

Z NOWSZYCH BADAŃ NAD MECHANIZMEM SYNTEZY WIRUSÓW ROŚLINNYCH

Kazimierz Miczyński

Katedra Botaniki WSR, Kraków

Duże zainteresowanie badaniami mechanizmów syntezy wirusów związane jest niewątpliwie z dużym znaczeniem jaki problem ten przedstawia zarówno z teoretycznego jak i praktycznego punktu widzenia. W aspekcie praktycznym badania te otwierają przed badaczem kuszącą, aczkolwiek w większości przypadków bardzo odległą jeszcze perspektywę skutecznej chemoterapii schorzeń wirusowych. W aspekcie zaś teoretycznym wirusy były i nadal pozostają modelowym obiektem badań dróg syntezy nukleoproteidów w ogóle, a to z uwagi na swą częściową niezależność od funkcji metabolicznych komórek gospodarza, — a co za tym idzie — łatwiejsze stosunkowo izolowanie i określanie istotnych cech fizyko-chemicznych niż ma to miejsce w odniesieniu do tzw. normalnych nukleoproteidów plazmy komórkowej. Można bez przesady stwierdzić, że badania nad wirusami stały się w ostatnim dziesięcioleciu podstawą i wiodącym czynnikiem dla rozwoju nowej dziedziny nauk biologicznych — biologii molekularnej, która to gałąź wiedzy reprezentuje w istocie badania nad budową i funkcją struktur komórkowych na poziomie molekularnym. Dlatego to zanim przejdziemy do rozważań nad specyfiką niektórych procesów związanych z namnażaniem się wirusa w zakażonej komórce dobrze jest sobie uświadomić ten fakt, że większość naszych wiadomości, dotyczących mechanizmu syntezy nukleoproteidów, m. in. takich istotnych problemów jak kod genetyczny i sposób przekazywania zawartych w nim informacji dla syntezy białek, uzyskana została właśnie na podstawie badań systemów wirusowych.

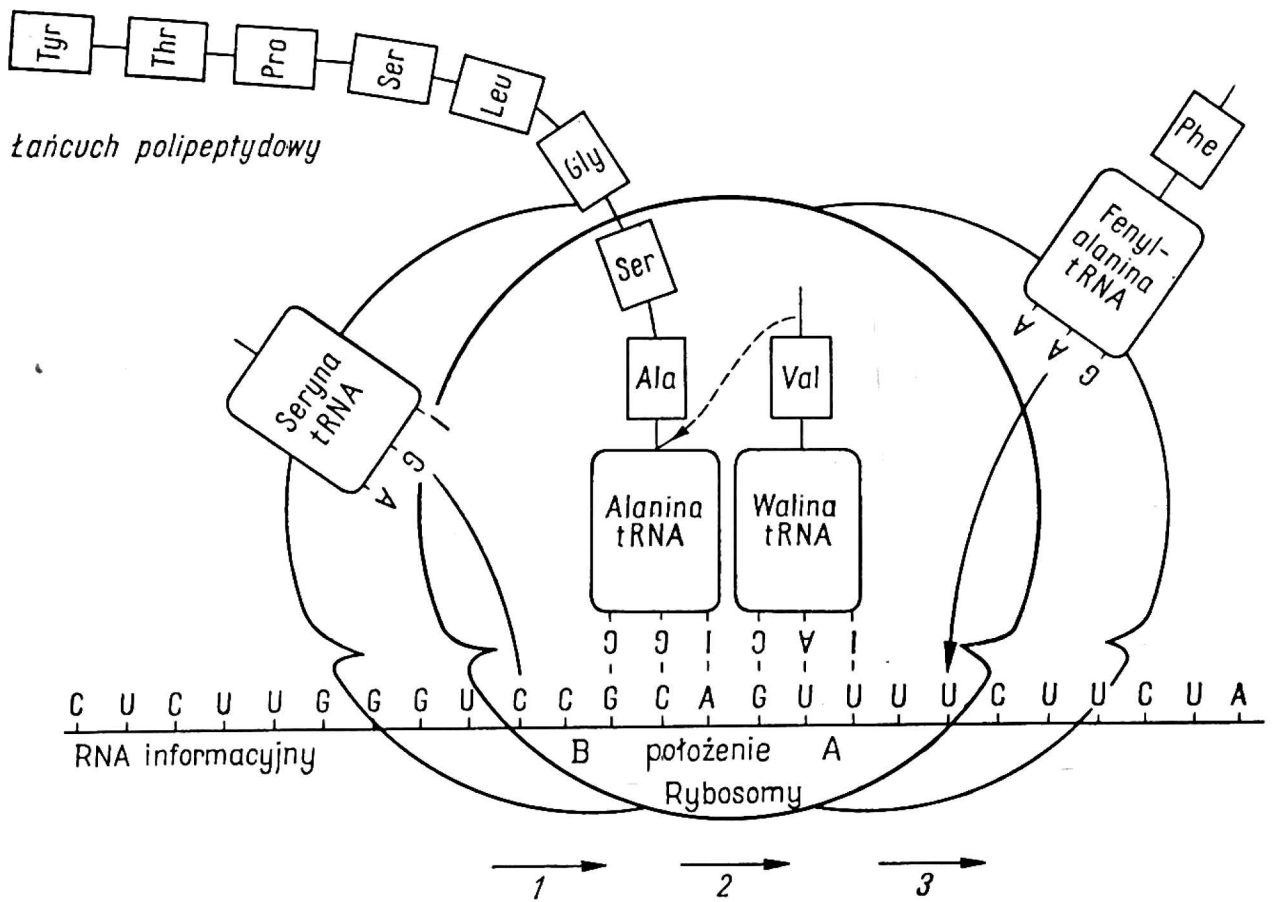
W niniejszym referacie pragnę przedstawić na tle aktualnie dzisiaj przyjmowanych teorii syntezy białek i kwasów nukleinowych pewne nowsze osiągnięcia i bardziej dyskusyjne momenty, dotyczące dróg syntezy wirusów roślinnych, a ściślej mówiąc, wirusów, zawierających w cząsteczce kwas rybonukleinowy (RNA), do których należą niemal wszystkie, dotychczas zbadane wirusy roślin wyższych.

OGÓLNE ZASADY BIOSYNTETY CZĄSTEK WIRUSOWYCH

Jest faktem stwierdzonym ponad wszelką wątpliwość, że nie istnieje jakiś jednolity schemat, według którego odbywałaby się synteza wszystkich wirusów. Przebiega ona wprawdzie według pewnych generalnych zasad, dotyczących wszystkich nukleoproteidów, niemniej jej szczegółowe mechanizmy nieraz znacznie się od siebie różnią w zależności od tego o jaki wirus chodzi. Szczególnie duże różnice pod tym względem istnieją pomiędzy wirusami, zawierającymi w cząsteczce wyłącznie kwas rybonukleinowy a tymi, które zawierają wyłącznie kwas dezoksyrybonukleinowy [DNA]. Wiadomości nasze, dotyczące mechanizmów syntezy tych pierwszych opierają się głównie na badaniach bakteriofagów zawierających RNA, mniejszych RNA-wirusów zwierzęcych typu polio a także prosto skonstruowanych wirusów roślin wyższych takich jak np. wirus mozaiki tytoniowej (WMT). RNA wszystkich tych wirusów występuje w postaci pojedynczego łańcucha nukleotydów, co decyduje o podobieństwie dróg ich syntezy w zakażonych komórkach.

Proces biosyntezy nowych cząstek wirusowych rozpoczyna się z chwilą uwolnienia wewnątrz komórki gospodarza materiału genetycznego wirusa w postaci wolnego kwasu nukleinowego. Można w tym procesie wyróżnić następujące fazy, wspólne w zasadzie dla wszystkich wirusów [34, 26] : 1) faza eklipsy lub latencji, podczas której zachodzi uwalnianie zakaźnej cząstki wirusowej od otoczki białkowej (kapsydu). Ponieważ zakaźność wolnego kwasu nukleinowego wirusa jest o wiele mniejsza od zakaźności całkowitej jego cząstki (wirionu) w fazie tej obserwuje się zazwyczaj zupełny zanik zdolności zakaźnych, 2) faza replikacji, wirusowego kwasu nukleinowego i ewentualnie innych typów RNA, towarzyszących temu procesowi, 3) faza wzrostu syntezy białek, w której stopniowo zaczyna dominować synteza białek kapsydu wirusa, 4) faza dojrzewania cząstek wirusowych, podczas której zachodzi wbudowywanie nowoutworzonych cząsteczek wirusowego kwasu nukleinowego do białkowych otoczek i powstawanie kompletnych wirionów. Należy od razu zaznaczyć, że przedstawiony tu podział na kolejne fazy całego procesu biosyntezy wirusa tylko w pewnym przybliżeniu odpowiada rzeczywistości następstwu w czasie poszczególnych etapów tej syntezy, gdyż, jak wykazują nowsze badania, pewna, aczkolwiek bardzo nieznaczna, liczba podjednostek białka kapsydu wirusa tworzy się już w fazie poprzedzającej replikację jego kwasu nukleinowego [34, 64, 105, 106].

Należy też wspomnieć o zaproponowanej jeszcze w 1962 r. przez Commonera hipotezie liniowej biosyntezy wirusa mozaiki tytoniu [26], według której syntezy RNA i białek kapsydu tego wirusa miałyby zachodzić równolegle w tym sensie, że obudowywanie nowo powstających cząstek wirusowego RNA podjednostkami białka następowałoby sukcesywnie w miarę polimeryzacji łańcucha RNA, przy czym kolejne mono-



Rys. 1. Translacja sekwencji nukleotydów informacyjnego RNA w sekwencje aminokwasów białka

Informacyjny RNA przechodzi przez kompleks rybosomalny złożony z podjednostek 30 S i 50 S. Każda z trójek nukleotydów związanego z rybosomem mRNA (tzw. kodon) łączy się z komplementarną trójką nukleotydów (tzw. antykodonem) odnośnego tRNA (kwasu nukleinowego przenośnikowego), do którego doczepiony jest odpowiedni aminokwas. Następnie cały łańcuch peptydowy doczepiony do poprzedniego tRNA zostaje przeniesiony przy pomocy specjalnego enzymu transferazy i połączony z grupą aminową aminokwasu złączonego z następnym tRNA. W ten sposób odczytywanie kodu zawartego w mRNA i doczepianie do łańcucha peptydowego kolejnych aminokwasów następuje na skutek przesuwania się rybosomu wzdłuż nici mRNA od strony lewej do prawej. Każdy rybosom wytwarza przypuszczalnie na swojej powierzchni dwa pola wiążące cząsteczki tRNA: pole A, wiążące nową cząsteczkę tRNA oraz pole B, wiążące poprzednią cząsteczkę tRNA z rosnącym łańcuchem peptydowym. (wg Fraenkel-Conrata)

mery białka byłyby syntetyzowane bezpośrednio na powstającej cząsteczce RNA. W świetle późniejszych badań hipoteza Commonera wydaje się mało prawdopodobną przede wszystkim ze względu na stwierdzoną różnymi metodami dość dużą niezależność syntezy białek kapsydu od syntezy wirusowego RNA. Okazało się bowiem, że oba te procesy można w pewnych granicach rozdzielić, działając np. na syntezę jednego lub drugiego z tych składników odpowiednimi, specyficznymi inhibitorami [12, 47, 27, 67]. U wielu przebadanych pod tym względem wirusów udało się stwierdzić nagromadzenie się w pewnych warunkach białek kapsydów nie związanych w cząstki z RNA [41, 67, 91], a czasem (jak np. w przypadku wirusa żółtaczkę rzepy lub mozaiki wspięgi chińskiej — *Vigna sinensis*) kompletnych, „pustych” kapsydów białkowych, które stale towarzyszą tym wirusom w zakażonej tkance [73, 115]. Ponadto wzrost koncentracji antygeny wirusowego w zakażonych komórkach poprzedzany jest zazwyczaj przez akumulację zakażonego materiału, wrażliwego na rybonukleazę, tzw. wolnego RNA, którym jest prawdopo-

dobnie obnażony RNA wirusowy w fazie poprzedzającej jego wbudowanie w cząsteczki wirionów [30, 92]. Tak więc bardziej prawdopodobną wydaje się teoria etapowego przebiegu biosyntezy cząsteczek wirusowych, postulująca nieco wcześniejsze wytworzenie się wirusowego RNA, który wykorzystując następnie rybosomalny aparat komórki gospodarza, działa jako RNA informacyjny (mRNA) i koduje bezpośrednio syntezę białek otoczki wirusa. Schemat translacji informacji zawartej w mRNA dla syntezy łańcucha polipeptydowego przy współdziałaniu rybosomów komórki przedstawia rys. 1.

BIOSYNTETA WIRUSOWEGO RNA I ZJAWISKA Z TYM ZWIĄZANE

Mechanizm biosyntezy i replikacji wirusowego RNA stał się w ostatnich latach przedmiotem intensywnych badań w laboratoriach wirusologicznych i biochemicznych całego świata. Genialna hipoteza Watsona i Cricka, dotycząca sposobu powielania się dwuniciowych struktur cząsteczek DNA, została, jak wiemy, z powodzeniem zastosowana również do wytłumaczenia syntezy różnych rodzajów RNA komórkowego [28] i stała się podstawą molekularnej interpretacji istoty genu. Jednym z jej zasadniczych stwierdzeń było wprowadzenie pojęcia „matrycy”, która warunkuje powstawanie idealnych kopii syntetyzowanych *de novo* cząsteczek kwasów nukleinowych na zasadzie komplementarności poszczególnych par zasad purynowych i pirymidynowych w nukleotydach. Ponieważ u większości wirusów zawierających RNA, zarówno roślinnych jak i zwierzęcych, mamy do czynienia z jednoniciowymi formami tego kwasu, zbudowanymi z pojedynczego łańcucha nukleotydów, nie było przez długi czas jasne, na jakiej zasadzie może odbywać się jego powielanie w zakażonej komórce, tym bardziej, że w normalnych, niezakażonych komórkach nie znaleziono żadnych enzymów, zdolnych do przeprowadzenia tego procesu [27, 47]. Enzymy takie muszą więc być zaindukowane przez sam genom wirusowy po jego wnikięciu do komórki [14, 67, 102].

Badania ostatnich 7 lat na tyle przyczyniły się do wyjaśnienia tego problemu, że na ich podstawie skonstruowano dość przekonującą hipotezę, tłumaczącą kolejne etapy replikacji wirusowego RNA. Punktem wyjścia było wykrycie w zakażonych komórkach specyficznego enzymu — replikazy RNA, prowadzącej syntezę RNA wirusowego oraz wykrycie nagromadzenia się dwuniciowych cząsteczek tego kwasu, tzw. dupleksów RNA [23, 80, 100, 111]. Obecność tych czynników stwierdzono dotychczas we wszystkich zbadanych przypadkach zakażeń RNA-wirusami niezależnie od tego, czy analizowano materiał roślinny, bakteryjny czy też zwierzęcy, przy czym pierwsze prace z tego zakresu zostały wykonane nad zawierającymi RNA bakteriofagami: f2 i MS2 z *Escherichia coli* [11, 13, 44, 65, 103, 113], a następnie nad niektórymi wirusami zwie-

rzęcymi, prace Montaigner i Sanders (nad wirusem encefalitu) [72] oraz Baltimore i in. [10] (nad wirusem polio) i roślinnymi, prace Weissmanna i in. [110] i Mandela i in. [68] (nad TMV), Ralpa i Clarka [79] oraz Bové [18] (nad wirusem żółtaczkę rzepy), Hirtha i in. [52] (nad wirusem mozaiki lucerny). Badania te wykazały, że u wszystkich tych wirusów proces replikacji wirusowego RNA przebiega według tych samych reguł chociaż z różną szybkością — najszybciej u bakteriofagów, nieco wolniej u TMV i niektórych wirusów zwierzęcych [32, 34]. Zasadniczą przesłanką nowej hipotezy jest stwierdzenie, że w zakażonych wirusem komórkach powstają cząsteczki RNA komplementarne pod względem układu nukleotydów w sensie teorii Watson-Cricka do RNA wirusa. Cząstki te, czyli tzw. nici minusowe (minus strands) RNA, służą następnie jako matryca w procesie odtwarzania identycznych kopii RNA wirusowego, które przyjęto nazywać niemi plusowymi (plus strands) [54, 100, 110, 111, 112]. Wiele przekonujących dowodów wskazuje na to, że proces replikacji RNA odbywa się tutaj bez udziału DNA, w odróżnieniu do replikacji normalnego RNA komórki, gdyż syntezę DNA można zahamować np. przez zadziałanie antybiotyku aktynowycyny bez ujemnego wpływu na dalszy przebieg syntezy wirusowego RNA [81, 82, 90]. Nie znaleziono też dotychczas w zakażonych komórkach cząstek DNA komplementarnych pod względem składu nukleotydów do RNA wirusowego [29].

Jedną z pierwszych reakcji, którą obserwuje się po zakażeniu komórki wirusem RNA są zaburzenia w syntezie normalnego RNA gospodarza. W komórkach zwierzęcych występuje wówczas często kompletne zahamowanie tej syntezy [34], chociaż w pewnych szczepach hodowli tkankowych, a także w komórkach bakteryjnych porażonych bakteriofagiem, takiego zahamowania nie obserwowano [53, 78]. Natomiast u roślin, zakażonych wirusem mozaiki tytoniu stwierdzono wówczas silną stymulację syntezy RNA [88]. Jest to jeden z dotychczas niezupełnie wyjaśnionych szczegółów metabolizmu zakażonych komórek roślinnych. Obserwowany wzrost syntezy RNA występuje głównie w jądrze komórkowym od razu w pierwszych stadiach po zakażeniu. Według klasycznych już dzisiaj badań Zecha [109, 120], polegających na mikrospektrofotometrii w świetle UV jąder komórek włosków tytoniu zakażonych sztucznie WMT, wzrost ten następował już w pół godziny po zakażeniu i utrzymywał się przez kilka następnych godzin na poziomie przewyższającym kilkakrotnie zawartość RNA w jądrach nie zakażonych. Dalsze badania wykazały, że chodzi tu przede wszystkim o RNA jąder [93, 94]. Podobne zjawisko zaobserwował Hirai w komórkach epidermy liścia, tyle że przebieg jego był w tym przypadku nieco wolniejszy [50]. Stymulacja syntezy RNA jądrowego pod wpływem zakażenia wirusem mozaiki tytoniu potwierdzona została w następnych latach przez wielu badaczy przy pomocy rozmaitych metod cytologicznych i biochemicznych [6, 19, 60, 88, 97]. Zastosowanie metody autoradiografii przy jednoczesnym użyciu aktyno-

mycyny D jako czynnika blokującego w normalnych komórkach syntezę RNA, pozwoliło stwierdzić, że w komórkach zakażonych TMV zachodzi w tych warunkach pomimo to intensywna synteza RNA w jąderkach [61, 93, 94]. Stwierdzenie to w połączeniu ze znanymi już wcześniej faktami niewrażliwości wirusów zawierających RNA na działanie aktynomycyny D [38, 82] mocno podbudowało lansowaną już wcześniej hipotezę, że synteza TMV-RNA zachodzi właśnie w jąderku i że stąd pochodzi obserwowany w pierwszych stadiach po zakażeniu wzrost zawartości RNA w tej organelli. Ponadto w opublikowanej w 1965 r. pracy Smith i Schlegel donoszą, że z liści tytoniu, zakażonych izotopami TMV, udało się im wyodrębnić radioaktywną frakcję jądrowego RNA, której skład nukleotydowy przypominał skład nukleotydów TMV-RNA [101].

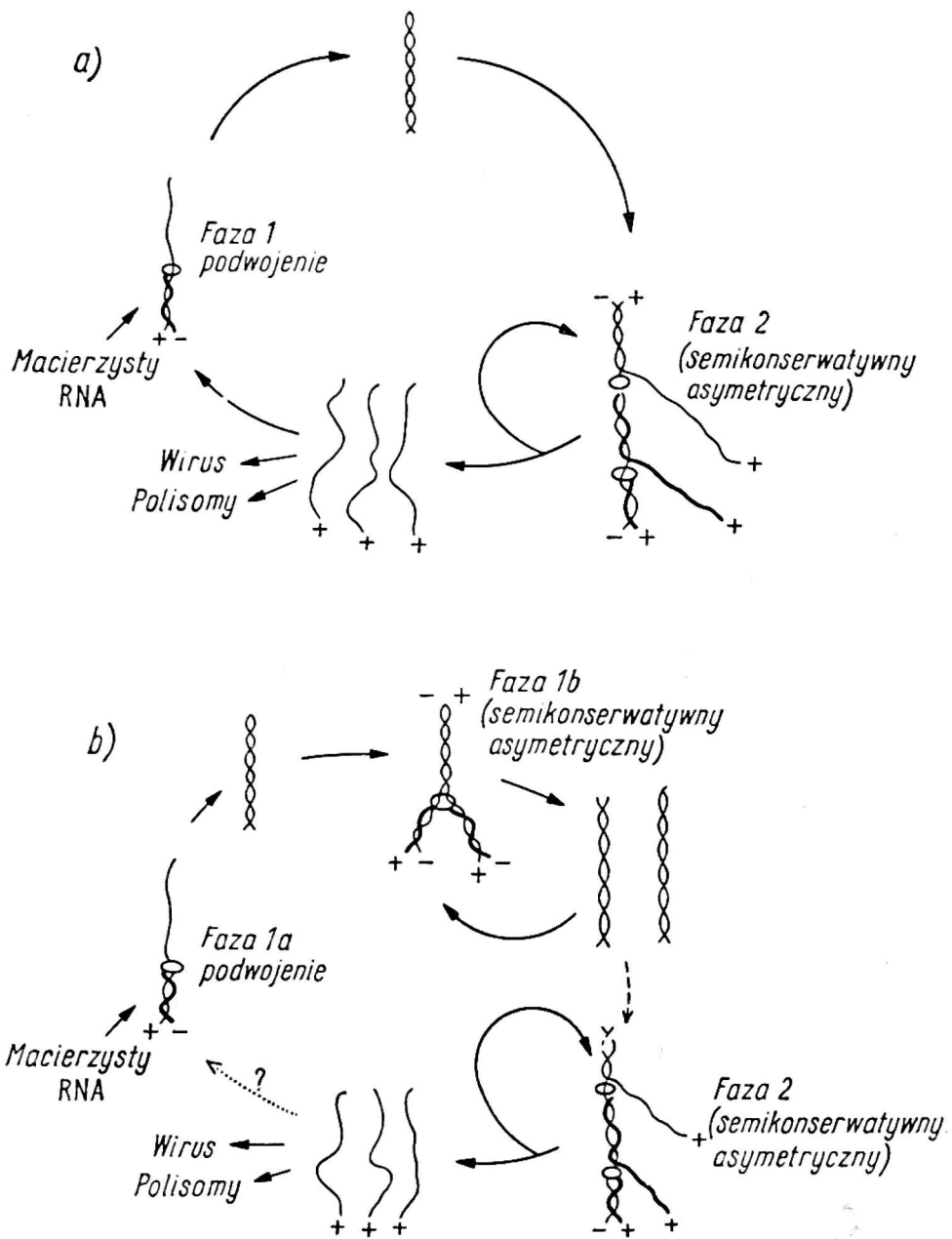
Dalsze prace, prowadzone w ostatnich kilku latach głównie w kierunku zbadania dynamiki syntezy różnych frakcji RNA w komórkach zakażonych wirusem wykazały jednak, że sprawa nie przedstawia się tak prosto. Stwierdzono przede wszystkim poprzez frakcjonowanie RNA w gradiencie gęstości, że w takich komórkach syntetyzowana jest frakcja RNA nie będąca ani wirusowym RNA, ani też RNA dwuniciowym, a mimo to niewrażliwa na działanie aktynomycyny D [8]. Frakcja ta o stałej sedymentacji ok. 17S odznaczała się dużą aktywnością wbudowywania radioaktywnych prekursorów RNA [97]. Obecność jej wykryto nie tylko w tytoniu zawirusowanym TMV, ale również w przypadku kilku innych wiroz, spowodowanych wirusami zawierającymi RNA, których rozwój przebiega normalnie w cytoplazmie, a to: w komórkach *Escherichia coli*, zakażonych bakteriofagiem MS2 [59], w komórkach tkanki nerkowej, zakażonych wirusem choroby pyska i racic [21], w przypadku zakażeń wirusem encefalomyelitu i wirusem choroby Newcastle [20, 104]. Jak wynika z ostatnich badań, przeprowadzonych nad tą frakcją przez Babosa i współpracowników [7, 8], w przypadku zakażenia TMV frakcji tej, mimo że jej stała sedymentacji pokrywa się ze stałą sedymentacji RNA jednej z frakcji rybosomalnych, nie można traktować jako normalnego RNA rybosomów komórki [108]. Wchodzi ona bowiem w skład zupełnie odrębnych podjednostek rybosomalnych o stałej sedymentacji ok. 40S. Takie podjednostki znaleziono już w kilku przypadkach związane zarówno z informacyjnym RNA jak i RNA wirusowym [56, 48, 69, 122]. Ich funkcja nie jest jednakże dotychczas zupełnie jasna.

Pewne światło na te stosunki rzucają prowadzone ostatnio dość intensywnie badania nad wpływem niektórych antybiotyków na syntezę wirusową — takich jak: aktynomycyna D, blastycydyna, mitomicyna, chloromycetyna, cycloheximid i in. Antybiotyki te podane we wczesnej fazie infekcji — przed albo zaraz po zakażeniu — hamują z reguły rozwój wirusa, podczas gdy podane później, często silnie go stymulują [40, 49, 51, 95]. Ponieważ mechanizm działania aktynomycyny D jest już dość gruntownie poznany [81] i wiemy, że działanie jej polega głównie na

zahamowaniu syntezy RNA kontrolowanego bezpośrednio przez DNA jądra komórkowego, przede wszystkim zaś RNA informacyjnego, można by przypuszczać, że właśnie wczesna synteza tego RNA i białek komórki gospodarza są w jakiś sposób związane z inicjacją procesu zakaźnego. Obserwowany wzrost syntezy komórkowego RNA w liściach tytoniu po zakażeniu TMV [8, 88], zdaje się potwierdzać takie przypuszczenie podkreślając jednocześnie znaczenie, jakie dla zapoczątkowania procesu zakaźnego może mieć RNA, którego synteza zależna jest od informacji DNA. Ten początkowy okres wrażliwości syntezy wirusowej na antybiotyki nazwany został fazą integracji [40], w której to fazie zachodzi bezpośrednio zetknięcie się i zasadnicze wzajemne oddziaływanie pomiędzy genami wirusa i zakażonej komórki. Można więc stąd wnioskować, że obserwowane zaburzenia metabolizmu RNA przedstawiają jakiś pośredni, uboczny etap wczesnych faz procesu wirusowej syntezy, związany z mechanizmem przestawienia funkcji wirusowego RNA z roli kwasu informacyjnego dla syntezy białek do roli matrycy dla produkcji nowych jego cząstek. Na słuszność takiej interpretacji wskazują też ostatnie prace Yamazaki nad RNA-bakteriofagiem R17 [55].

Drugim, występującym bardzo wczesnie po zakażeniu i chyba najistotniejszym efektem infekcji wirusowej jest synteza wspomnianego już uprzednio, specyficznego enzymu polimerazy RNA, czyli tzw. replikazy, którego funkcja ma dwoisty charakter. Enzym ten syntetyzuje w pierw na matrycy macierzystej cząstki wirusowego RNA komplementarne, minusowe nici RNA, a następnie wykorzystuje te ostatnie do kopiowania nici plusowych, czyli właściwych cząstek RNA wirusowego [77, 84]. Ostatnio udało się otrzymać ten enzym w postaci oczyszczonej z komórek bakteryjnych, zakażonych RNA-bakteriofagiem Q-beta [34] i okazało się, że zawiera on co najmniej jeden wielkocząsteczkowy składnik, znajdujący się również w normalnych, zdrowych komórkach [37, 96]. Pewne dane wskazują na to, że właśnie ten składnik odgrywa istotną rolę w pierwszej fazie replikacji — przy syntezie minusowej nici RNA [5]. Właściwym dowodem, świadczącym bezspornie o charakterze aktywności tego enzymu, było przeprowadzenie przy jego pomocy syntezy wirusowego RNA *in vitro*, przy czym okazało się, że uzyskane w ten sposób cząsteczki potomne mają nie tylko te same właściwości fizyko-chemiczne, ale posiadają również zdolność zakażenia [46, 103]. Zdolności tej nie mają natomiast minusowe nici RNA. Jeżeli jednak użyto ich w układzie *in vitro* jako matrycy do syntezy wirusowego RNA, synteza ta następowała natychmiast bez zwykłego w tym przypadku okresu latencji [31, 70, 112].

Specyficzność działania replikazy wirusowego RNA polega na tym, że w przeciwieństwie do polimeru RNA wyodrębnionego z komórek nie zakażonych, enzym ten nie jest zdolny do syntezy innych rodzajów RNA, nawet po dostarczeniu odpowiedniego wzorca [33, 45, 102]. Stwierdzono



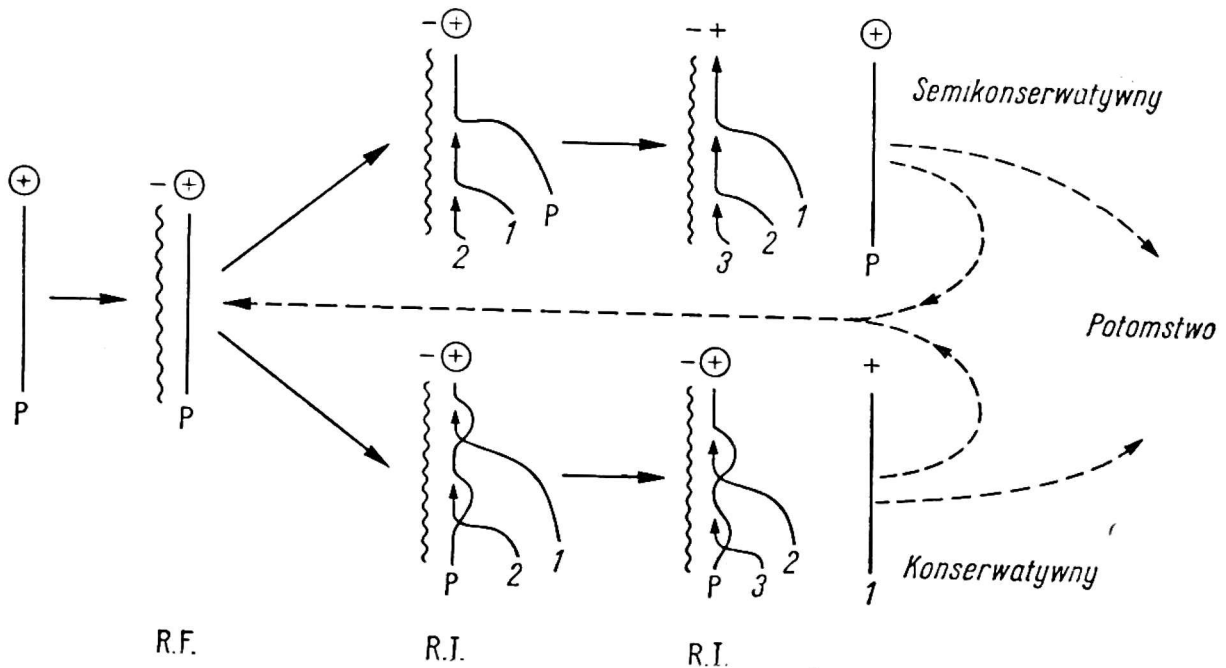
Rys. 2. Hipotetyczny schemat replikacji wirusowego RNA (wg Weissmanna) Macierzysta cząsteczka RNA zamienia się najpierw na cząsteczkę RNA dwuniciowego (faza 1), a następnie utworzony dupleks służy jako matryca do produkcji nici „plus” na drodze semi-konserwatywnego i asymetrycznego kopiowania (faza 2). Niektóre z nowo powstałych nici plusowych służą do syntezy nowych cząsteczek dwuniciowego RNA. Cząsteczki te mogą zresztą także powstawać na drodze symetrycznej replikacji (rys. b)

też, że synteza minusowych łańcuchów RNA zachodzi w przeciwnym kierunku (od 5 do 3 węgla) niż synteza łańcuchów plusowych, aczkolwiek dokładny mechanizm tej syntezy nie jest jeszcze dotychczas poznany [15]. Ponieważ, jak wspominałem, w komórkach zakażonych RNA-wirusami wykryto jednocześnie obecność dwuniciowych cząsteczek RNA (tzw. form replikacyjnych lub Hofschneidera), można się spodziewać, że w każdym akcie replikacji powstaje początkowo taka dwuniciowa cząstka [1, 35]. Syntezę takich dupleksów udało się też rzeczywiście otrzymać w systemach *in vitro* [2, 71]. W przypadku zakażeń kapusty wirusem mozaikowej żółtaczkę rzepy (turnip yellow mosaic) zawartość ich dochodzi np. do 1 mg/1 kg świeżej masy zakażonych liści [16]. Natomiast w tkankach zdrowych, nie porażonych wirusem, obecności ich nie stwierdzono. Oprócz wspomnianych, dwuniciowych form RNA w zakażonych komórkach mo-

żna znaleźć jeszcze inne jego cząsteczki, które nazwano kompleksami Francklina lub pośrednikami replikacyjnymi (replicative intermediates). Cząstki te składają się z podwójnych łańcuchów RNA, do których dołączona jest jeszcze pewna liczba niekompletnych nici plusowych [9, 36]. Wykrycie tych dwóch rodzajów cząstek pozwoliło na sformułowanie następującego schematu biosyntezy wirusowego RNA, podanego w 1966 r. przez Weissmanna i in. [111] (rys. 2). Wprowadzona do komórki macierzysta cząstka wirusowego RNA spełniałaby wpierw rolę RNA informacyjnego (mRNA) dla produkcji specyficznych dla wirusa białek [58, 76], a przede wszystkim enzymu replikazy. Pod wpływem tego enzymu następuje synteza komplementarnej nici minusowej RNA i wytworzenie formy o podwójnym łańcuchu (faza 1 na rys. 2a). Forma ta służy następnie jako matryca dla ciągłego kopiowania plusowych nici RNA, które są z niej kolejno jak gdyby wypierane w miarę postępu syntezy (faza 2 na rys. 2a). Stwierdzono, że na jednej takiej matrycy może się odbywać równocześnie synteza co najmniej 6 nici plusowych [53]. Równoległe do procesu kopiowania plusowych nici RNA na macierzystym dupleksie, w którym odtwarzanie łańcuchów wirusowego RNA odbywa się w sposób asymetryczny, gdyż tylko jedna z nici dupleksu służy jako matryca, zachodzi również namnażanie się dalszych cząstek dwuniciowego RNA w ten sposób, że mogą one powstawać przy udziale nowo powstałych nici plusowych lub też jako rezultat symetrycznej tym razem replikacji całego dupleksu podobnie, jak to ma miejsce przy replikacji cząstek DNA (rys. 2b). Nie jest też wykluczone, że powstawanie dwuniciowych form RNA w zakażonych komórkach odbywa się przy udziale obu tych mechanizmów. W ten sposób zachowany zostaje autokatalityczny charakter namnażania się wirusowego RNA, co objawia się szybkim wzrostem jego koncentracji, gwarantującym gwałtowne opanowanie metabolizmu komórki-gospodarza [102]. Ostatnie badania Robertsona i Zindera nad bakteriofagiem f2 [85] sugerują nawet, że również i synteza minusowych nici RNA może mieć charakter wielokrotnego, równoczesnego powielania na tej samej nici plusowej.

Należałoby jeszcze wspomnieć o tym, że replikacja pojedynczych nici RNA na dupleksowych matrycach może odbywać się w sposób konserwatywny lub semikonserwatywny (rys. 3). Pierwsze z tych określeń oznacza, że odnośne nici plusowe tworzą stałe kompleksy z minusowymi łańcuchami RNA i nie są z nich wypierane przez syntezę nowych nici plusowych, drugie zaś zakłada przejściowy tylko charakter form dwuniciowych. Wiele danych wskazuje na to, że ten drugi sposób replikacji wirusowego RNA jest bardziej prawdopodobny [53].

W tworzeniu form dwuniciowego RNA (dupleksów) bierze prawdopodobnie udział inny enzym aniżeli właściwa replikaza RNA, mimo że takiego enzymu dotychczas nie udało się wyodrębnić. Wskazywałyby na to m. in. doświadczenia przeprowadzone nad tzw. ułomnymi szczepami



Rys. 3. Zasada konserwatywnego i semikonserwatywnego powielania wirusowego RNA na dwuniciowych strukturach

pewnych wirusów, wrażliwymi na podwyższoną temperaturę. Szczepy te, jak wiadomo, nie namnażają się w podwyższonej temperaturze, a przyczyną tego, jak się okazało, jest fakt, że w tej temperaturze nie dochodzi do syntezy dwuniciowego RNA, chociaż zachodzić może synteza nici minusowego RNA [4]. Jeżeli natomiast synteza wirusa zapoczątkowana zostanie w niższej temperaturze, wówczas raz wytworzone dupлексы kontynuują kopiowanie plusowych nici RNA nawet i po przeniesieniu do temperatury wyższej [66, 111].

Tak więc cząstka wirusowego RNA spełnia w zakażonej komórce jak gdyby podwójną funkcję: funkcję wzorca dla syntezy podobnych sobie cząsteczek poprzez tworzenie form dwuniciowych, oraz funkcję informacji dla syntezy specyficznych dla wirusa białek. Badania nad pierwszą z tych funkcji w aspekcie enzymatycznym prowadzone były w ciągu ostatnich kilku lat również na porażonych wirusami roślin wyższych [2, 3, 17, 18]. Autorom tym udało się wyizolować z roślin kapusty chińskiej, porażonej wirusem mozaikowej żółtaczki rzepy, replikazę RNA, wykazującą podobne właściwości, jak opisane powyżej replikazy otrzymane z zakażeń bakteriofagami. Niestety badanie tego enzymu w systemach *in vitro* dało o wiele mniej informacji niż analogiczne badania systemów bakteryjnych, tak że wnioski o podobnym mechanizmie replikacji RNA wirusów roślin wyższych opierają się dotychczas głównie na wykryciu w zakażonych tkankach dwuniciowych replikacyjnych form RNA.

BIOSYNTETA BIAŁEK WIRUSOWYCH

Wczesne stosunkowo pojawianie się replikazy RNA wirusowego w procesie biosyntezy wirusów roślinnych wskazuje na to, że procesy syntezy przynajmniej niektórych białek i RNA wirusowego mogą zachodzić rów-

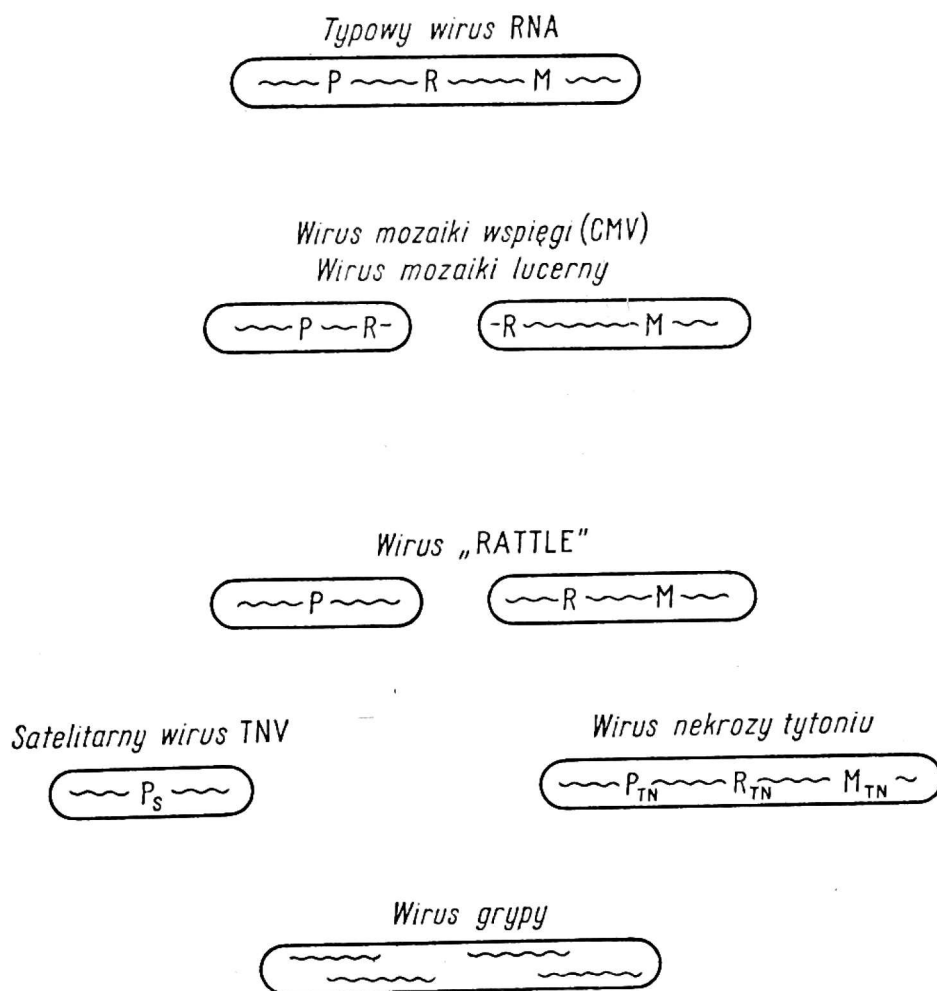
noległe. Należy tylko zdać sobie sprawę z tego, o jaki rodzaj białek tu chodzi. Wielofunkcyjność wirusowego RNA wskazuje na policistronowy charakter jego genomu, tym bardziej, że oprócz funkcji związanych bezpośrednio z mechanizmem replikacji cząstek wirusa genom ten steruje jeszcze innymi procesami, charakterystycznymi dla reakcji zakażonej komórki na infekcję wirusową. Wyniki dotychczasowych badań, przeprowadzonych głównie na RNA-bakteriofagach oraz na TMV wskazują, że genom tych wirusów steruje syntezą co najmniej trzech (a najprawdopodobniej jeszcze wielu więcej) różnych białek, których produkcja kontrolowana jest w czasie przy pomocy nieznanymi bliżej mechanizmów [24, 25, 34]. Są to białka enzymatyczne typu replikazy, białka otoczki (kapsydu) wirusa oraz tzw. białko „A”, które w przypadku zakażeń bakteriofagami nazwano czynnikiem dojrzewania, przypisując mu w praktyce wszystkie pozostałe funkcje enzymatyczne związane z tzw. dojrzewaniem cząstki wirusowej, a więc zarówno sam proces wbudowywania wirusowego RNA do białek kapsydu, jak i wszelkie funkcje związane z reakcjami komórki na zakażenie [119]. Doświadczenia przeprowadzone zarówno w systemach *in vivo* jak i *in vitro* — głównie na bakteriofagach — przy zastosowaniu specyficznych inhibitorów syntezy białek, podawanych w różnym czasie po zakażeniu, oraz przy pomocy analizy elektroforetycznej białek, pozyskiwanych z tak traktowanych obiektów, wykazały, że zarówno białko kapsydu jak i białka „A” tworzą się już w pierwszym momencie po zakażeniu, jeszcze przed pojawieniem się replikazy RNA [34, 64]. Białka te można było odróżnić m. in. po tym, że białko kapsydu odnośnych wirusów nie zawiera aminokwasu histydyny. Następnie pojawia się jednak replikaza, która działa aż do chwili wytworzenia się ok. 6 podjednostek białka otoczki wirusowej cząstki. Podjednostki te tworzą wówczas w bliżej jeszcze nieokreślony sposób kompleks z wirusowym RNA (lub być może z jego formą replikacyjną) [86], który hamuje dalszą syntezę replikazy oraz osłabia wybitnie syntezę białek „A”, forując w ten sposób syntezę dalszą białek kapsydu [105, 106]. Blokowanie syntezy replikazy przez białka kapsydu jest procesem wysoce specyficznym dla danego wirusa w tym sensie, że daje ono efekt wyłącznie z homologicznym RNA [34]. Niewątpliwie istnieją jeszcze inne mechanizmy, kontrolujące syntezę białek wirusowych, jak np. sam skład wirusowego RNA, na co wskazują wyniki doświadczeń z tzw. ułomnymi (defective) mutantami wirusów, u których stwierdzono np. brak zdolności do produkcji replikazy [98, 99], względnie białek kapsydu, czy też wreszcie enzymów kontrolujących łączenie się RNA z tymi białkami w kompletne cząstki wirusowe [57, 64, 121].

Z poruszonym powyżej zagadnieniem regulacji syntezy poszczególnych białek wirusa łączy się ściśle problem tzw. komplementacji genetycznej genomów wirusowych badany w ostatnich latach szczególnie intensywnie na różnych wirusach roślinnych z uwagi na stosunkowo prostą

ich strukturę genetyczną, jak również i na to, że niektóre z nich występują w postaci kilku różnych cząstek. Przyjmując hipotezę kodowania poszczególnych aminokwasów tworzących się białek przez co najmniej trzy nukleotydy łatwo obliczyć, że np. informacja niezbędna dla syntezy białka kapsydu wirusa mozaiki tytoniu, którego podjednostki składają się z łańcucha 158 aminokwasów, wymagać będzie co najmniej 158×3 , tzn. ok. 470 nukleotydów genomu wirusowego, co stanowi ok. 80% całkowitej ich liczby [75]. Podobnie informacja dla syntezy replikazy wirusowego RNA zawarta jest w ok. 1400 nukleotydach [34], czyli łącznie oba te białka kodowane są przez prawie jedną trzecią wszystkich nukleotydów wirusa mozaiki. Należy się więc spodziewać, że cały genom wirusa TMV składa się z kilku (nie więcej jak dziesięciu) tylko cistronów i w związku z tym wszystkie funkcje, realizowane w komórce przez ten wirus, zależą od działania tych kilku genów.

Istnieją jednak wirusy, których RNA składa się z o wiele mniejszej liczby nukleotydów. Skrajnym przykładem jest satelitarny wirus nekrozy tytoniu, będący jak gdyby pasożytem wirusa nekrozy. Jego RNA zawiera tylko ok. 1200 nukleotydów, podczas gdy podjednostki białka kapsydu zbudowane są z 400 cząsteczek aminokwasów [83, 87]. Jak łatwo obliczyć, w genomie tego wirusa nie ma miejsca na żadną dodatkową informację poza informacją dotyczącą syntezy samego kapsydu i dlatego też wirus ten namnażać się może wyłącznie w obecności wirusa nekrozy tytoniu, który przypuszczalnie dostarcza mu nieswoistej replikazy, jak również enzymów do wszystkich innych funkcji.

Podobną sytuację mamy z wirusami tzw. wieloskładnikowymi, występującymi w postaci kilku różnych cząstek, różniących się z reguły wielkością i ciężarem molekularnym. Przykładem może być wirus mozaiki wspięgi chińskiej (*Vigna sinensis*), składający się z trzech poliedralnych komponentów, z których tylko dwa zawierają kwas nukleinowy lub wirus mozaiki lucerny, zawierający 3 lub 4 rodzaje cząstek [22]. Żadna z tych cząstek z osobna czy też wyizolowane z nich RNA nie są zakaźne. Zakaźność pojawia się dopiero przy łącznym wprowadzeniu do komórki co najmniej dwóch cząstek, zawierających RNA [42, 116, 118]. Doświadczenia genetyczne, prowadzone z różnymi szczepami tych wirusów, jak również próby syntezy poszczególnych komponentów w układach *in vitro* (np. badania Van Ravenswaay'a nad wirusem mozaiki lucerny [117]) doprowadziły do wniosku, że we wszystkich tych przypadkach mamy do czynienia z rozdziałem poszczególnych funkcji genetycznych (cistronów) wirusowego RNA pomiędzy odnośne cząstki wirusa [114] (rys. 4). I tak np. u obu wyżej wspomnianych wirusów informacja dla syntezy białka kapsydu zawarta jest w mniejszym, czyli tzw. górnym komponente, informacja dla pozostałych białek — w komponente większym (dolnym), natomiast informacja dla replikazy RNA wirusowego rozdzielona jest pomiędzy oba komponenty, co wskazywałoby na polime-



Rys. 4. Schemat rozdziału genomu wirusowego pomiędzy poszczególne cząstki w systemach wieloskładnikowych (wg Fraenkel-Conrata)

P, R i M reprezentują trzy poznane dotychczas cistrony (geny) odpowiedzialne za syntezę: białka kapsydu wirusa, replikazy RNA i białek A u różnych wirusów roślinnych. W przypadku satelitarnego wirusa nekrozy tytoniu gen P satelity jest różny od analogicznego genu cząstki właściwego wirusa

ryczny charakter tego enzymu. Inaczej nieco przedstawia się sprawa z wirusem tzw. nekrotycznej kędzierzawki tytoniu (tobacco rattle virus), który składa się z dwu pałeczkowatych cząstek różnej długości (180 i 75 μ m). Okazało się, że tylko dłuższa z tych cząstek jest zakaźna, ale sama zdolna jest syntetyzować w zakażonej tkance tylko niekompletne cząstki wirusa, pozbawione białkowej otoczki [39, 62, 63, 89]. W tym przypadku cistron, kodujący syntezę białka kapsydu tego wirusa, znajduje się niewątpliwie w cząstce krótszej.

Badania prowadzone nad takimi wieloskładnikowymi wirusami, które z uwagi na komplementarność ich funkcji genetycznych zaproponowano nazywać ko-wirusami wykazały, że rozdział cistronów pomiędzy poszczególne komponenty wirusa jest zjawiskiem dość powszechnym i występuje zarówno wśród wirusów roślin wyższych jak i wirusów bakterii i zwierząt [43, 74]. Fakt komplementacji genetycznej stwierdzono ponadto pomiędzy różnymi szczepami tego samego wirusa o charakterze defektywnym, występującymi w stanie naturalnym lub też otrzymanymi na drodze sztucznej mutacji u normalnie jednoskładnikowych wirusów, takich jak np. wirus mozaiki tytoniu [107]. Otwiera to nowe, niezwykle interesujące perspektywy w badaniach funkcji genetycznych wirusowego RNA.

LITERATURA

1. Amman J., Delius H., Hofschneider P. H.: Isolation and properties of an intact phage specific replicative form of RNA-phage M-12. *J. molec. Biol.* 1964, t. 10, s. 557
2. Astier-Manifacier S., Cornuet P.: Replication de l'acide ribonucleique de virus de la mosaïque jaune du Navet. Étude d'une RNA polymerase. *C. r. Acad. Sci. Paris*, 1964, t. 259, z. 23, s. 4401—4402
3. Astier-Manifacier S., Cornuet P.: Isolation of turnip yellow mosaic virus RNA replicase and assymetrical synthesis of polynucleotides identical to TYMV-RNA. *Biochim. biophys. Res. Comm.* 1965, t. 18, s. 283
4. Astier-Manifacier S., Boistard P., Cornuet P., Huppert J., Laperre H., Maury Y.: Effet de la temperature sur la replication *in vitro* du RNA du phage FH5. *Ann. Epiphyt. Hors-s. Étud. de Virologie*, 1968, s. 19, s. 9—19
5. August J. T.: Mechanism of synthesis of bacteriophage RNA. *Nature*, 1969, t. 222, s. 121
6. Babos P.: Ribonucleic acid turnover in tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Nature*, 1966, t. 211, s. 972
7. — The ribonucleic acid content of tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Virology*, 1966, t. 28, s. 282—289
8. Babos P., Shearer G. B.: RNA synthesis in tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Virology*, 1969, t. 39, s. 286—295
9. Baltimore D.: Structure of the poliovirus replicative intermediate RNA. *J. molec. Biol.* 1968, t. 32, s. 359
10. Baltimore D., Becker J., Darnell J. E.: Virus specific double-stranded RNA in poliovirus infected cells. *Science*, 1964, t. 143, s. 1034
11. Baltimore D., Eggers H. J., Franklin R. M., Tamm J.: Poliovirus induced RNA-polymerase and the effects of virus specific inhibitors on its production. *Proc. Natn. Acad. Sci USA*, 1963, t. 49, s. 843—849
12. Baltimore D., Girard M., Darnell J. E.: Aspects of synthesis of poliovirus RNA and the formation of virus particles. *Virology*, 1966, t. 29, s. 179—189
13. Baltimore D., Franklin R. M.: Preliminary data on a virus specific enzyme system responsible for the synthesis of viral RNA. *Biochem. biophys. Res. Comm.* 1962, t. 9, s. 388
14. Baltimore D., Franklin R. M.: A new ribonucleic acid polymerase appearing after mengo virus infection of HeLa cells. *J. biol. Chem.*, 1963, t. 238, s. 3395—4000
15. Bishop D. H. L., Pace N. R., Spiegelman S.: The mechanism of replication: a novel polarity reversal in the *in vitro* synthesis of QB-RNA and its complement. *Proc. natl. Ecad. Sci. USA*, 1967, t. 58, s. 1790
16. Bockstahler L. E.: Biophysical studies on double-stranded RNA from turnip yellow mosaic virus infected plants. *Molec. Gen. Genetics*, 1967, t. 100, s. 337—348
17. Bové J. M.: Turnip Yellow Mosaic Virus (TYMV): Assymetric synthesis of virus RNA *in vitro*. 7th Int. Congress Biochem. Tokyo C 140, 1967, s. 699
18. Bové J. M., Bové C., Mocquot B.: Turnip yellow mosaic RNA synthesis *in vitro*: Evidence for native double-stranded RNA. *Biochim. biophys. Res. Comm.* 1968, t. 32, s. 480
19. Basler E. Jr., Commoner B.: The effect of tobacco mosaic virus biosynthesis on the nucleic acid content of tobacco leaf. *Virology*, 1956, t. 2, s. 13—28
20. Bratt A. N., Robinson W. S.: Ribonucleic acid synthesis in cells infected with Newcastle disease virus. *J. molec. Biol.* 1967, t. 23, s. 1—21
21. Brown F., Cartright B.: Virus specific ribonucleic acids in baby hamster cells infected with foot-and-mouth disease virus. *Nature*, 1964, t. 204, s. 855—856

22. Bruening G., Agrawal H. O.: Infectivity of a mixture of cowpea mosaic virus ribonucleoprotein components. *Virology*, 1967, t. 31, s. 217
23. Burdon R. H., Billeter M. A., Weissman C., Werner R. C., Ochoa S., Knigh C. A.: Replication of viral RNA. Presence of a virus specific double stranded RNA in leaves infected with tobacco mosaic virus. *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, 1964, t. 52, s. 768
24. Capecchi M. R.: Cell-free protein synthesis programmed with R-17 RNA, identification of two phage proteins. *J. molec. Biol.* 1966, t. 21, s. 733
25. Clark J. M., Chang A. Y., Spiegelman S., Reichman M. E.: The in vitro translation of a monocistronic message. *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, 1965, t. 34, s. 1193
26. Commoner B.: Linear biosynthesis of tobacco mosaic virus: development and test of a model. *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, t. 48, s. 2076—83, 1962
27. Cooper S., Zinder N. D.: The growth of an RNA bacteriophage. The role of DNA synthesis. *Virology*, 1962, t. 18; s. 405—411
28. De Robertis E. D. P., Nowiński W. W., Saez F. A.: *Cytologia*. PWN, Warszawa 1969, s. 424
29. Doi R., Spiegelman S.: Homology test between the nucleic acid of an RNA virus and the DNA in the host cell. *Science*, 1962, t. 138, s. 1270
30. Engler R., Schramm G.: Infectious ribonucleic acid as precursor of tobacco mosaic virus. *Nature*, 1959, t. 183, s. 1277
31. Feix G., Pollet R., Weissmann C.: Replication of viral RNA XVI. Enzymatic synthesis of infectious viral RNA with non-infectious Q-B minus strand as template. *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, 1968, t. 59, s. 145
32. Fenwick M. L., Erikson R. L., Franklin R. M.: Replication of the RNA of bacteriophage R17. *Science*, 1964, t. 146, s. 527—30
33. Fiers W., Verplancke H., Van Styrendaele B.: The synthesis of Bacteriophage MS2 RNA *in vitro*. — "Regulation of Nucleic acid and Protein Biosynthesis" Elsevier publsh. Amsterdam 1967, s. 154
34. Fraenkel-Conrat H.: *The Chemistry and biology of viruses*. Acad. Press, New York 1969
35. Francke B., Hofschneider P. H.: Über infektiöse Substrukturen aus *Escherichia coli* Bacteriophagen VII. Formation of a biologically intact replicative form in ribonucleic acid bacteriophage M-12 infected cells. *J. molec. Biol.* 1966, t. 16, s. 544
36. Franklin R. M.: Purification and properties of the replicative intermediate of the RNA-bacteriophage R 17. *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, 1964, t. 55, s. 1504
37. Franze de Fernandez M. T., Eoyang L., August J.: Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage QB-RNA. *Nature*, 1968, t. 219, s. 588
38. Franklin R. M., Rosner Y.: Localisation of RNA synthesis in Mengo-virus infected cells. *Biochim, bioph. Acta*, 1962, t. 55, s. 240—241
39. Frost R. R., Harrison B. D., Woods R. D.: Apparent symbiotic interaction between particles of tobacco rattle virus. *J. gen. Virology*, 1967, t. 1, s. 57
40. Furusawa J., Ouchi S., Akai S.: A role of cycloheximide induced ribonucleic acid metabolism and its bibartite effect on TMV multiplication. *Phytopath. Z.* 1970, t. 68, s. 232
41. Gianinazzi S., Vallée J. C.: Temperature et synthèse de matériel proteique viral chez le *Nicotiana Xanthi* nc. infectée par le virus de la mosaïque du Tabac. *C. r. Acad. Sci. Paris* 1969, t. 269, s. 593—595
42. Gibbs A. J., Nixon H. L., Woods R. D.: Properties of purified preparations of luzerne mosaic virus. *Virology*, 1963, t. 19, s. 441—442
43. Hanafusa H., Hanafusa T., Rubin H.: The defectiveness of Rous sarcoma virus. *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, 1963, t. 49, s. 572

44. Haruna J., Nozu., Oktaba Y., Spiegelman S.: An RNA replicase induced by and selective for a viral RNA — isolation and properties. Proc. natn. Acad. Sci. USA, 1963, t. 50, s. 905
45. Haruna J., Spiegelman S.: Specific template requirements of RNA replicases. Proc. natn. Acad. Sci USA, 1965, t. 54, s. 579
46. Haruna J., Spiegelman S.: Autocatalytic synthesis of a viral RNA *in vitro*. Science, 1965, t. 150, s. 885
47. Haywood A. M., Sinsheimer R. L.: Inhibition of protein synthesis in *E. coli* protoplasts by actinomycin D. J. molec. molec. Biol. 1963, t. 6, s. 247—249
48. Hensaw E. C.: Messenger RNA in rat liver polyribosomes. Evidence that it exists as ribonucleoprotein particles. J. molec. Biol. 1968, t. 36, s. 401—411
49. Hirai T., Hiroshima A., Itobe T., Takahashi T., Shimomura T., Hayashi Y.: Inhibitory effect of blasticidin S on tobacco mosaic virus multiplication. Phytopath. 1966, t. 56, s. 1236—1240
50. Hirai T., Nakagoki Y.: Microspectrophotometric studies on leaf epidermis of TMV infected tobacco plants. In: "Viruses of plants" ABR. Beemster and J. Dijkstra eds. Intsc. Publish. New York 1966, s. 90—92
51. Hirai T., Shimomura T.: The mode of action of some antibiotics in their inhibitory effect on tobacco mosaic virus multiplication. Phytopath. Z. 1960, t. 40, s. 35—44
52. Hirth L., Pinck M.: Isolement par chromatographie sur colonnes d'hydroxyapatite du RNA replicatif du virus de la mosaïque de la Lucerne. Zesz. probl. Nauk rol. nr 111, 1971
53. Hofschneider P. H., Hansen P.: The replication cycle. In: "Molecular basis of Virology". — Reinhold publishers — New York 1968, s. 169
54. Hotham-Iglewski B., Phillips L. A., Franklin R. M.: Viral RNA transcription-translation complex in *Escherichia coli* infected with bacteriophage R 17. Nature, 1968, t. 219, s. 700
55. Yamazaki H.: Mechanism of early inhibition by an RNA phage of protein and RNA synthesis in infected cells. Virology, 1969, t. 37, s. 429
56. Joklik W. K., Becker Y.: Studies on the genesis of poliribosomes. II. The association of nascent messenger RNA with the 40 S subribosomal particle. J. molec. Biol. 1965, t. 13, s. 511—520
57. Kassanis B.: Satellitism and related phenomena in plant and animal viruses. Adv. Virus Res. 1968, t. 13, s. 147
58. Kelly R. B., Gould J. L., Sinsheimer R. L.: The replication of bacteriophage MS2. IV. RNA components specifically associated with infection. J. molec. Biol. 1965, t. 11, s. 562
59. Kelly R. B., Sinsheimer R. L.: A new RNA component in MS-2 infected cells. J. molec. Biol. 1964, t. 8, s. 602—605
60. Kubo S.: Chromatographic studies of RNA synthesis in tobacco leaf tissues infected with tobacco mosaic virus. Virology, 1966, t. 28, s. 229—235
61. Langenberg W. G., Schlegel D. E.: Localisation of tobacco mosaic virus protein in tobacco leaf cells during the early stages of infection. Virology, 1969, t. 37, s. 86—88
62. Lister R. M.: Possible relationship of viruses specific products of tobacco rattle virus infections. Virology, 1966, t. 28, s. 350
63. Lister R. M., Bracker E. E.: Defectiveness and dependence in three related strains of tobacco rattle virus. Virology, 1969, t. 37, s. 262
64. Lodish H. F.: Bacteriophage f2 RNA: control of translation and gene order. Nature, 1968, t. 220, s. 345
65. Lodish H. F., Cooper S., Zinder N. D.: Host dependent mutants of the bacterio-

- phage f2. IV. On the biosynthesis of a viral RNA polymerase. *Virology*, 1964, t. 24, s. 60—70
66. Lodish H. F., Zinder N. D.: Replication of the RNA bacteriophage f2. *Science*, 1966, t. 152, s. 372
67. Luria S. E., James E., Darnell J. E.: *Wirusologia ogólna*. PWN, Warszawa 1970
68. Mandel H. G., Matthews R. E. F., Matus A., Ralph R. K.: Replicative form of plant virus RNA. *Biochim. biophys. Res. Comm.* 1964, t. 16, s. 604
69. McConkey E. H., Hopkins J. W.: Subribosomal particles and the transport of messenger RNA in HeLa cells. *J. molec. Biol.* 1965, t. 14, s. 257—270
70. Mills D. R., Bishop D. H. L., Spiegelman S.: The mechanism and direction of RNA synthesis templated by free minus strands of a little variant of QB-RNA. *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, 1968, t. 60, s. 713
71. Mills D. R., Pace N. R., Spiegelman S.: The *in vitro* synthesis of a noninfectious complex containing biologically active viral RNA. *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, 1966, t. 56, s. 1778
72. Montaigner L., Sanders F. K.: Replicative forms of encephalomyocarditis virus ribonucleic acid. *Nature*, 1963, t. 199, s. 664
73. Markham R., Smith K. M.: Studies of the virus of turnip yellow mosaic. *Parasitology*, 1949, t. 39, s. 330
74. Mosing G.: Genetic recombination in bacteriophage T4 during replication of DNA fragments. *Cold Spring Harbour symposia Quant. Biol.* 1963, t. 28, s. 35—42
75. Mundry K. W.: Plant Virus — Host cell relations. *Ann. Rev. Phytopath.* 1963, t. 1, s. 173—196
76. Oktaba Y., Spiegelman S.: Transitional control of protein synthesis in a cell-free system directed by a polycistronic viral RNA. *Science*, 1963, t. 142, s. 493—97
77. Pace N. R., Bishop D. H. L., Spiegelman S.: The kinetics of product appearance and template involvement in the *in vitro* replication of viral RNA. *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, 1967, t. 58, s. 711—715
78. Phagemann P. G., Swim H. E.: Replication of Mengo Virus. L. Effect on synthesis of macromolecules by host cells. *J. Bact.* 1966, t. 91, s. 2317
79. Ralph R. K., Clark M. F.: Intracellular location of double-stranded plant viral ribonucleic acid. *Biochim. biophys. Acta* 1966 t. 119, s. 29—30
80. Ralph R. K., Wójcik S. J.: Double-stranded tobacco mosaic virus RNA. *Virology*, 1969, t. 37, s. 276
81. Reich E., Goldberg J. H.: Actinomycin and nucleic acid function. *Prog. nucl. Acid Res.*, 1964, t. 3, s. 183
82. Reich E. R., Franklin R. M., Shatkin A. J., Tatum E. L.: Action of actinomycin D on animal cells and viruses. *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, 1962, t. 48, s. 1238—1240
83. Reichman M. E.: The satellite tobacco necrosis virus. A single protein and its genetic code. *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, 1964, t. 52, s. 1009
84. Reichman M. E., Clark J. M.: Current status of *in vitro* synthesis of plant viruses. *A. Rev. Phytopath.* 1968, t. 6, s. 295.
85. Robertson H. D., Zinder N. D.: Identification of the terminus of nascent f2 bacteriophage RNA. *Nature*, 1968, t. 220, s. 69
86. Robertson H. D., Webster R. E., Zinder N. D.: Bacteriophage coat protein as repressor. *Nature*, 1968, t. 218, s. 533
87. Roy D., Leśnaw J., Fraenkel-Conrat H., Reichmann M. E.: The protein subunit of the satellite tobacco necrosis virus. *Virology*, 1969, t. 38, s. 368—369
88. Röttger B.: Ribonucleic acids of healthy and tobacco mosaic virus infected tobacco leaves. *Biochim. biophys. Acta.* 1965, t. 95, s. 525—531
89. Sängner H. L.: Characteristics of tobacco rattle virus. I. Evidence that its two

- particles are functionally defective and mutually complementing. *Molec. gen. Genet.* 1968, t. 101, s. 346—350
90. Sanger H. L., Knight C. A.: Action of actinomycin D on RNA synthesis in healthy and virus infected tobacco leaves. *Biochim. biophys. Res. Comm.* 1963, t. 13, s. 455
91. Sarkar S., Jockusch H.: Wild type and defective coat proteins of tobacco mosaic virus. Electrophoretic analysis of plant extracts in polyacrylamide gels. *Biochim. biophys. Acta.* 1968, t. 106, s. 259—261
92. Sarkar S.: The amount and nature of ribonuclease sensitive infectious material during biogenesis of tobacco mosaic virus. *Z. Vererb. Lehre*, 1965, t. 67, s. 166—185
93. Schlegel D. E., Smith S.: Sites of virus synthesis in plant cells in: „Viruses of Plants” — A. B. R. Beemster and J. Dijkstra edtrs. Intersc. publish. New York, 1966, s. 54—60
94. Schlegel D. E., Smith S., De Zoeten G. A.: Sites of virus synthesis within cells. *A. Rev. Phytopath.* 1967, t. 5, s. 223—234
95. Semal. J.: Effects of actinomycin D in plant virology. *Phytopath. Z.* 1967, t. 59, s. 55—71
96. Shapiro L., Franze de Fernandez M. T. August J. T.: Resalution of two factors required in the QO-RNA polymerisation reaction. *Nature*, 1968, t. s. 478
97. Shigematsu A., Mizusawa Y. Hirai T.: Incorporation of two radioactive amino-acids into the nucleic acid fraction in tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Virology*, 1966, t. 28, s. 331—338
98. Shimura Y., Kaizer H., Nathans D.: Fragments of MS2 RNA as messengers for specific bacteriophage proteins. Fragments of thiouracil-containing particles. *J. molec. Biol.* 1968, t. 38, s. 453
99. Shimura Y., Moses R. E., Nathans D.: Coliphage MS2 containing 5-fluorouracil. II. RNA deficient particles formed in the presence of 5-fluorouracil. *J. molec. Biol.* 1967, t. 28, s. 95—99
100. Shipp W. R., Haselkorn R.: Double stranded RNA from tobacco leaves infected with TMV. *Proc natn. Acad. Sci. USA*, 1964, t. 52, s. 401—404
101. Smith S. H., Schlegel D. E.: The incorporation of ribonucleic acid precursors in healthy and virus infected plants. *Virology*, 1965, t. 26, s. 180—189
102. Spiegelman S., Haruna I.: A rationale for an analysis of RNA replication. *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, 1966, t. 55, s. 1539
103. Spiegelman S., Haruna I., Holland I. B., Beaudreau G., Mills D. R.: The synthesis of a self-propagating and infectious nucleic acid with a purified enzyme. *Proc natn. Acad. Sci. USA*, 1965, t. 54, s. 919—924
104. Sreevalsan T., Lockart R. Z.: Heterogenous RNAs occurring during the replication of western equine encephalomyelitis virus. *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, 1966, t. 55, s. 974—981
105. Sugiyama T., Nakada D.: Control of translation of SM-2 RNA cistrons by MS2 coat protein. *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, 1967, t. 57, s. 1744
106. Sugiyama T., Nakada D.: Translational control of bacteriophage MS2-RNA cistrons by MS2 coat protein; polyacrylamide gel electrophoretic analysis of proteins synthesised *in vitro*. *J. molec. Biol.* 1968, t. 31, s. 431
107. Szackalskaja N. D., Atabekow I. D., Sacharowskaja G. N., Dżawachija W. G.: Reprodukcyjna temperaturoczuwstwitelnego sztamma wirusa tabaczonej mozaiki pri niepermissiwnych usłowiach w prisustwie sztamma pomoszcznika. *Biologiczeskije Nauki*, 1968, t. 8, s. 101—103
108. Wagner E. K., Penzman S., Ingram V.: Methylation patterns of HeLa cell ribosomal RNA and its nuclear precursors. *J. Molec. Biol.* 1967, t. 29, s. 371—387

109. Wettstein D., Zech H.: The structure of nucleus and cytoplasm in hair cells during tobacco mosaic virus reproduction. *Z. Naturf.* 1962, t. 17b, s. 376—379
110. Weissmann C., Billeter M. A., Schneider M. C., Knight C. A., Ochoa S.: Replication of viral RNA. VI. Nucleotide composition of the replicative form of tobacco mosaic virus RNA and of its component strands. *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, 1965, t. 53, s. 653
111. Weissmann C., Billeter M. A., Vinuela E., Bibonati M.: Double stranded RNA and the replication of viral RNA. in "Viruses of Plants" — Beemster ABR and J. Dijkstra eds. Intersc. Publish. New-York, 1966, s. 249—274
112. Weissmann C., Feix G., Slor H., Pollet R.: Replication of viral RNA. Single stranded minus strands as template for the synthesis of viral plus strands *in vitro*. *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, 1967, t. 57, s. 1871—1875
113. Weissmann C., Simon L., Ochoa S.: Induction by an RNA-phage of an enzyme catalysing incorporation of ribonucleotides into ribonucleic acid. *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, 1963, t. 49, s. 407—414
114. Wood H. A., Bancroft J. B.: Activation of a plant virus by related incomplete nucleoprotein particles. *Virology* 1965, t. 27, s. 94—98
115. Van Kammen A.: Purification and properties of the components of cowpea mosaic virus. *Virology*, 1967, t. 31, s. 633
116. Van Kammen A.: The relationship between the components of cowpea mosaic virus. I. Two ribonucleoprotein particles necessary for the infectivity of CPMV. *Virology*, 1968, t. 34, s. 312—317
117. Van Ravenswaay Classen J. C., Van Leuven A. B. J., Duijts G. A. H., Bosch L.: In vitro translation of alfalfa mosaic virus RNA. *J. molec. Biol.* 1967, t. 23, s. 535—540
118. Van Vloten-Doting L., Kruseman J., Jaspars E. M. J.: The biological function and mutual dependence of bottom component and top components of alfalfa mosaic virus. *Virology*, 1968, t. 34, s. 728—731
119. Vinuela E., Algranati J. C., Ochoa S.: Synthesis of virus specific proteins in *Escherichia coli* infected with the RNA bacteriophage MS-2. *Eur. J. Biochem.* t. 1. s. 3—7
120. Zech H., Vogt-Köhne.: Ultravioletmikroskopische Untersuchungen an Tabakmosaikvirus *in situ*. *Naturwissenschaften*, 1955, t. 42, s. 337—339
121. Zaitlin M., Ferris W. R.: Unusual aggregation of a nonfunctional tobacco mosaic virus protein. *Science*, 1964, t. 143, s. 1451—1452
122. Girard M., Latham H., Penman S., Darnell J. E.: Entrance of newly formed messenger RNA and ribosomes into HeLa cytoplasm. *J. molec. Biol.* 1965, t. 11, s. 187—201

Казимеж Мичиньски

ИЗ НОВЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ НАД МЕХАНИЗМОМ СИНТЕЗА РАСТИТЕЛЬНЫХ ВИРУСОВ

Резюме

Настоящая работа представляет обзор новейших достижений в области исследований над биосинтезом вирусов, содержащих в своей частичке рибонуклеиновую кислоту (РНК). Автор подробно описывает гипотезы, касающиеся механизмов вирусной „репликации” РНК, а также связанные с этим явления нарушения в синтезе нормальной РНК зараженных вирусом клеток.

В дальнейшем были обсуждены проблемы синтеза отдельных белков, специфических

для генома вируса, их последовательность во времени, а также вопрос генетической комплементарности у некоторых растительных вирусов. Согласно общепринятой в настоящее время гипотезе Вейсмана и сотрудников, „репликация” вирусной РНК происходит на основе образования двухнитных структур РНК, аналогичных структуре ДНК. В создании этих структур активное участие принимает специфический для вируса энзим-репликаза РНК, вырабатываемая в зараженной клетке под влиянием кодированной информации в геноме вируса. Этот геном также кодирует синтез белка оболочки (капсида) вирусной частицы и других, еще не полностью изученных белков, как энзиматического характера, так и конституционного, участвующих в процессе созревания вируса. У вирусов, состоящих из нескольких видов частиц, информация (гены), касающаяся синтеза отдельных видов этих белков, часто разделена между отдельными компонентами.

Kazimierz A. Miczyński

NEW RESEARCH IN THE MECHANISM OF THE SYNTHESIS OF PLANT VIRUSES

Summary

The present paper provides a review of recent achievements in the field of studies on the biosynthesis of viruses containing in their molecule the ribonucleic acid (RNA). The author amply discusses hypotheses concerning mechanisms of the replication of virus RNA and related phenomena of disturbance in the synthesis of regulator RNA by cells infested with virus.

Further there were discussed problems of the synthesis of individual proteins specific for the virus genome, their sequence in time, and the problem of genetic complementation in certain plant viruses. According to generally accepted hypothesis of Weissmann *et al.*, the replication of virus RNA occurs on the principle of the formation of two-stranded structures of RNA similar to the structure of DNA. The enzyme specific for virus — RNA replicase produced in the infested cell under the impact of information coded in virus genome, takes an active part in the formation of these structures. This genome codes also the synthesis of the protein of the cover (capsid) of virus molecule and other, still not completely known proteins of enzymatic and constitutional nature, which take part in the process of virus maturation. In viruses composed of several various kinds of particles the information (genes) concerning the synthesis of individual types of these proteins is frequently divided among individual components.