

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

(в свете данных электронной микроскопии)

С. М. АКОПЯН, М. Г. ГАЛУСЯН

Обобщены электронномикроскопические данные последних лет, касающиеся структурной организации нуклеиновых кислот про- и эукариотов, а также ДНК вирусов. Рассмотрены особенности структуры внехромосомных элементов (плазмид, митохондриальной ДНК). Описаны основные электронномикроскопические приемы, позволяющие изучать структурную организацию нуклеиновых кислот указанных организмов и роль электронной микроскопии при исследовании молекулярных механизмов детерминации функций и экспрессии генома.

В последние годы многочисленные электронномикроскопические исследования структурной организации нуклеиновых кислот, выделенных из про- и эукариотов, значительно расширили наши представления о молекулярных механизмах функционирования клеток. Изучение ферментативного синтеза информационных областей отдельных генов в составе целой хромосомы [30, 42, 51], выделение и структурная характеристика индивидуальных молекул гетерогенных ядерных РНК [5], установление повторяющихся нуклеотидных последовательностей в геномах эукариотов [8, 100] и прокариотов [31], обнаружение родства геномов у различных организмов [37, 99, 107], построение карт частично денатурированных ДНК [57]—все это создало предпосылки для решения вопроса о структурных особенностях геномных районов, участвующих в транскрипционном процессе.

Параллельно с накоплением фактов, касающихся особенностей структуры высокополимерной ДНК (хромосомного материала клеток), увеличилось число электронномикроскопических публикаций, посвященных внехромосомным генетическим элементам. Последние, представленные молекулами ДНК с более низкой молекулярной массой (плазмиды у прокариотов [14], митохондриальная ДНК у эукариотов [6]), могут быть объединены по наиболее существенному для них признаку—способности к автономной репликации, т. е. способности реплицироваться без физического сцепления с клеточной хромосомой. Эти ДНК, относительно простые по своему строению, являются весьма удобными модельными системами для изучения на молекулярном уровне таких общebiологических закономерностей, как взаимодействие хромосомных и внехромосомных генов; механизмы репликации ДНК и т. д. Наконец, привлекательность этих моделей заключается в возможности

использования их в экспериментах по генетической инженерии, где они выступают в качестве векторных молекул, обеспечивающих амплификацию чужеродного генетического материала.

Хотя уже сейчас накоплено значительное количество фактов, касающихся особенностей структуры нуклеиновых кислот, и число их интенсивно продолжает расти, многие вопросы еще остаются нерешенными. В настоящем сообщении проводится анализ электронномикроскопических работ, посвященных изучению структурной организации линейных и кольцевых форм ДНК и РНК в про- и эукариотических клетках.

Картирование нуклеиновых кислот при помощи электронной микроскопии

Электронная микроскопия двуспиральных нуклеиновых кислот сделала большие успехи, главным образом благодаря применению метода белкового монослоя [63]. При этом двумерный препарат нуклеиновой кислоты, пригодный для использования в электронном микроскопе, получается благодаря образованию комплекса между монослоем белка (цитохром С) и молекулой полинуклеотида, а высокая степень его визуализации (рис. 1) достигается прокрашиванием солями урана или оттенением при круговом вращении металлами [37].

Структура гибридных молекул ДНК. При анализе структуры нуклеиновых кислот все методы гибридизации включают в себя последовательно проведенные плавление и ренатурацию и используются для решения широкого круга вопросов. Здесь мы сначала рассмотрим применение метода самоотжига при электронномикроскопическом изучении структуры ДНК, а затем различные подходы к изучению строения искусственно полученных гетеродуплексов.

ДНК большинства фагов характеризуются наличием на концах линейных молекул идентичных локусов. У ДНК фага λ избыточность геномного материала представлена двумя «липкими» одноцепочечными, самокомплементарными локусами на концах [70]. Процедура простого отжига переводит линейные молекулы ДНК фага λ в кольца и олигомеры, что и указывает на наличие «липких» концов. Аналогичный феномен наблюдается и у остальных лямбдоидных фагов. Наличие «липких» концов отмечено также у целого ряда фагов, выделенных из *Bacillus thuringiensis* [3, 4]. У многих же других фагов в процессе отжига образование колец не происходит, однако для визуализации концевой избыточности в геномах применяют обработку ДНК специфической для одного из концов цепи экзонуклеазой. Такой гидролиз приводит к появлению на концах ДНК небольших одноцепочечных локусов, и если в ДНК имелись концевые повторы, то последующий отжиг приведет к формированию кольцевых молекул. Схема, поясняющая образование таких колец, представлена на рис. 2а.

Экзонуклеаза III из *E. coli* [71], вызывая деградацию 1—3,5% ДНК фагов T2, приводила к появлению «липких» концов. Эта же нуклеаза была применена для анализа концевой избыточности ДНК фагов

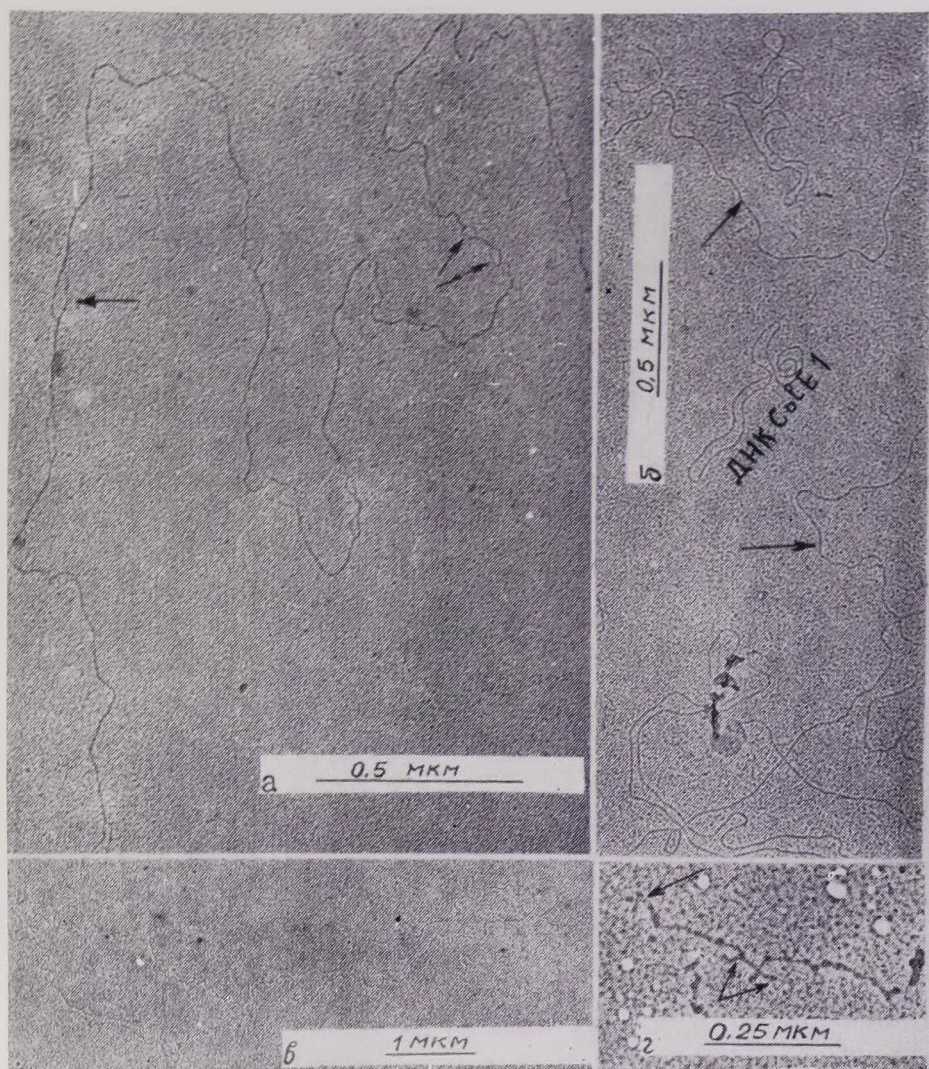


Рис. 1. ДНК фага Pf-16: а—фрагмент частично денатурированной (стрелка) молекулы [2]; б—фрагмент нативной (стрелка) молекулы [9]; в—плазмидная ДНК [1]; г—молекула стабильной ядерной РНК 28 S. Хорошо заметны вторичные структуры (стрелки)—«шпильки» [17 и неопубликованные данные].

ТЗ и Т7 [87]. ДНК фагов Т5 и Р22, являясь линейными молекулами без «липких» концов, после обработки экзонуклеазой III и отжига обнаруживают, электронномикроскопически, концевые повторы, т. е. также приобретают форму кольца [85].

На основании контролируемого гидролиза нуклеазой и электронномикроскопического изучения ДНК бактериофага Р22 было показано, что ее концевая избыточность составляет 2,5—5%. Интересно отметить, что внутриклеточная циклическая, сверхзакрученная форма ДНК этого фага короче внутрифаговой формы на величину повтора [86]. Разница в 7,5% между внутриклеточной циркулярной формой и ДНК, упакованной в вирионах, была также выявлена у индуцированного митомицином дефектного фага 15. Структура ДНК этого фага была проанализирована при помощи обычного метода денатурации с последующей ренатурацией и образованием при этом кольцевых форм, содержащих однонитевые хвосты (рис. 26). Формирование таких структур можно объяснить, если предположить, что ДНК данного фага имеет концевую избыточность и является смесью циклически переставленных молекул.

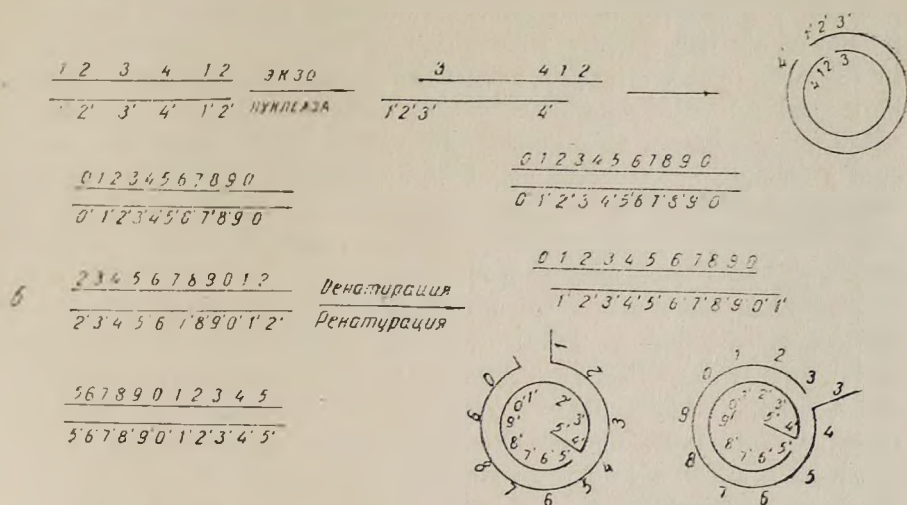


Рис. 2. Образование кольцевых структур из линейной ДНК с концевой избыточностью (0—9—последовательности нуклеотидов; 0'—9'—последовательности их комплементарные); а) образование колец после действия экзонуклеазы и самоотжига ДНК [19]; б) образование двуцепочечных колец с одноцепочечными хвостами после денатурации и самоотжига ДНК с циклической перестановкой и концевой избыточностью [26].

Оригинальная разновидность избыточного материала на концах молекул обнаружена при самоотжиге ДНК аденоассоциированного вируса (ААВ). В вирионах такого гибрида содержатся отдельные «+» и «—» цепи ДНК.

Если взятые отдельно «+» и «—» цепи отжечь на себя, то электронномикроскопически удастся визуализировать однонитевые кольца с одним небольшим дуплексным участком [24]. Это говорит о наличии

на концах одноцепочечных молекул ДНК инвертированных (обращенных) повторов. Гидролиз последних переводит кольцевые молекулы в линейные формы, а по степени необходимого для этого гидролиза можно определить величину обращенного повтора. Помимо обращенных повторов, в ДНК этого вируса при помощи электронной микроскопии была обнаружена перестановка генома [49]. В процессе отжига «+» и «—» цепей ААВ формируются двуспиральные линейные молекулы, не способные циклизироваться.

Обращенные повторы показаны также в ДНК аденовирусов. В результате денатурации и последующей ренатурации ДНК электронно-микроскопически были выявлены одноцепочечные кольца, соединенные при помощи обратных комплементарных участков на концах молекул [103].

Обращенные повторы имеются в плаزمиде R и F [94]. Ген резистентности к тетрациклину (Tet^b), присутствующий во многих плаزمиде, несет в себе внутренний обращенный повтор. Этот палиндром используется как репер при картировании плазмид [101]. Именно он обеспечивает интеграцию плазмид в хромосому бактерий [61].

Геном фага МЮ также имеет внутренний обращенный повтор [55]. В результате самоотжига происходит образование двуцепочечных молекул ДНК с односторонними участками на одном из концов и в середине молекулы. В серединном участке каждая из цепей отжигается на себя, что указывает на обращенный повтор. ДНК этого фага внедряется в большое количество участков в хромосому *E. coli*, инактивируя при этом гены в точке интеграции. Обращенный повтор у фага МЮ может служить в качестве репера при картировании генов *E. coli*, которые фаг МЮ инактивирует [54].

Обращенные повторы, палиндромы, обнаружены также при изучении генома эукариотов [108]. Причем палиндромные локусы у них составляют от 2 до 15% всей ДНК, а размеры их варьируют от нескольких десятков до нескольких тысяч пар нуклеотидов [18, 40, 108]. В электронном микроскопе обращенные повторы после отжига денатурированной ДНК в пределах одной нити имеют вид петель, если палиндромы располагаются на расстоянии в несколько тысяч нуклеотидов друг от друга, и шпилькоподобных структур—при tandemном расположении. Обращенные последовательности могут быть как повторяющимися, так и неповторяющимися [11, 40]. Примечательно, что палиндромы обнаруживаются и в составе единиц транскрипции генома [90]. Визуальное исследование частично денатурированной ДНК (асцитный рак Эрлиха мыши) с помощью электронного микроскопа показало наличие различных циклондных структур, в частности колец и так называемых лариатов (колец с хвостами) [8]. Предполагается, что формирование циклондов обоих типов обусловлено наличием повторяющихся последовательностей в частично денатурированных участках ДНК.

Геномы многих организмов содержат также внутренние прямые повторы. Для прокариотных геномов большую часть повторов составля-

ют гены рибосомальной РНК. От 7 до 9 наборов рибосомальных генов обнаружено при помощи электронной микроскопии в хромосоме *Bac. subtilis* [31].

Эукариотные геномы прямых повторов содержат значительно больше и они представлены не только рибосомальными генами [36]. Это так называемые перемежающиеся умеренные повторы, ограниченные с обеих сторон уникальными последовательностями. Эта характерная для эукариотов организация ДНК составляет около 70% генома. Наличие множества tandemно расположенных повторов в молекулах ДНК способствует после ренатурации образованию двуспиральных колец, идентифицируемых электронномикроскопически. Кинетика такого феномена детально исследована для ДНК *Xenopus laevis* [83].

Исследование структуры ДНК с помощью гетеродуплексов. Если при ренатурации расплавленных молекул ДНК ввести в раствор частично гомологичную ДНК, то часть этих молекул будет состоять из гетеродуплексов, в которых двунитевые участки будут представлены областями с гомологией между двумя ДНК, а одноститевые — районами, в которых последняя отсутствует. Примером гетеродуплексного анализа может служить эксперимент по совместному отжигу исходной ДНК и ДНК делеционного мутанта. В результате формирования гетеродуплекса появляется одноститевая петля, по величине равная исследуемой делеции. Впервые выявление делеционного мутанта фага λ в электронном микроскопе (одноститевая петля в гетеродуплексной ДНК) было продемонстрировано Дэвисом и Дэвидсоном [37]. Однако делеционная петля была представлена в виде «кустиков» — закрученной сама на себя. Для преодоления этого феномена в растворы для приготовления электронномикроскопических препаратов ДНК был введен формамид, который обеспечил одновременную визуализацию развернутой одноститевой петли на фоне двунитевого гетеродуплекса [107]. Метод гетеродуплексного анализа облегчается также, если для гибридизации используются разделенные цепи ДНК. Для «привязывания» делеций к физическим концам молекулы используют гетеродуплексную технику, но не с ДНК фага дикого типа (без делеций), а с ДНК, имеющей в качестве репера [96] характерную делецию. Анализ гетеродуплексных молекул позволил картировать гены для головки и хвоста бактериофага λ и исследовать тонкую структуру интегрируемого локуса этого вируса ($att^{\Phi 80}$) в бактериальный геном [38]. Аналогичные результаты с помощью электронной микроскопии гетеродуплексов были получены в отношении фагов SPO2 и $\Phi 105$ [31]. Полное картирование района ранних генов фага T7 с помощью делеционных мутантов было проведено на основании сравнительного анализа длин двуспиральных участков ДНК дикого фага и гетеродуплексов с делеционными мутантами [96]. При этом были получены электронномикроскопические данные, полностью совпадающие с результатами генетического анализа.

Весьма интересные данные были получены при выяснении степени родства ДНК фагов P2 и P2H YLis с помощью конструирования гетеродуплексов. Оказалось, что геномы этих фагов отличаются только в

участке иммунности, который и был локализован при помощи гетеродуплексов [29]. Высокая степень гомологии была продемонстрирована при исследовании гетеродуплексов между геномами Т-четных фагов. Было показано чередование областей полной гомологии, включающих несколько генов, с областями, полностью негомологичными. В целом эти фаги, как и лямбдоидные, имеют значительную степень родства и близкие молекулярные веса ДНК, несмотря на наличие нескольких вставок и делеций.

Широкое использование техники гетеродуплексного анализа позволило изучить тонкую структурную организацию генома опухолеродного вируса SV-40 [73]. Интерационный локус, перестановки в адено-SV-40 гибридах были также определены при помощи гетеродуплексов с рестриктазными фрагментами ДНК SV-40 [59]. Электронномикроскопическое изучение гомологии между ДНК различных серотипов аденовируса человека показало, что внутри групп, объединенных по степени онкогенности, существует большая гомология (около 70%), а между серотипами, принадлежащими к разным группам, она невелика (до 10%). Примечательно, что наиболее значительная гомология наблюдается между ДНК серотипов, входящих в группу А. Эта группа характеризуется тремя локусами полной гомологии, ограниченными участками, сравнительно мало комплементарными. В противоположность группе А, серотипы аденовирусов, входящих в группу С, сильно различаются по нуклеотидной последовательности.

Выяснение степени родства геномов эукариотических клеток было проведено при помощи электронной микроскопии рибосомальных ДНК двух близкородственных видов южноафриканских лягушек [45]. Области геномов, кодирующие 18S и 28S рибосомальные РНК этих двух видов, оказались полностью комплементарными друг другу, в то время как нетранскрибируемый участок ДНК имеет очень ограниченную гомологию.

В заключение хотелось бы упомянуть о приеме, позволяющем исследовать геномы, имеющие очень незначительную степень комплементарности [44]. С целью изучения родства между ДНК SV-40 и вируса полиомы жольцевую ДНК этих вирусов при помощи рестриктазы Eco RI переводили в линейную форму, в результате чего на концах линейных молекул появлялись «липкие» концы за счет разреза специфического для эндонуклеазы Eco RI сайта. После гибридизации таких молекул посредством «липких» концов и «зашивания» их лигазой образовывались ковалентно замкнутые кольцевые молекулы, составленные из ДНК SV-40 и вируса полиомы. В дальнейшем денатурация и быстрый отжиг при низких концентрациях ДНК привели к формированию двунитевых участков в тех районах, где соединенные в одну цепь ДНК SV-40 и полиомы имеют частичную гомологию. Таким образом, группе Дэвиса-Дэвидсона удалось локализовать единственный район этих онкогенных вирусов, имеющий гомологию и расположенный в области ранних генов вируса SV-40. Более того, авторам этого эксперимента,

благодаря описанной выше процедуре, удалось преодолеть техническую трудность обычного конструирования гетеродуплексов, а именно большую скорость отжига исследуемой нити ДНК со своей же комплементарной нитью, а не с чужой.

Карты частичного плавления ДНК. Первичная последовательность оснований известна в настоящее время только для ДНК двух организмов—фага MS2 и фага ϕ X174. Расшифровка первичной последовательности геномов других организмов, хотя и является в принципе возможной, но требует много средств и времени. Поэтому большое распространение получили приемы, позволяющие исследовать распределение нуклеотидов вдоль молекулы ДНК не полностью, а лишь в некотором приближении. Примером такого рода методов служит физическое картирование уникальных нуклеотидных последовательностей—специфических сайтов, узнаваемых эндонуклеазами различного происхождения, а также денатурационное картирование. Возможность построения денатурационных карт ДНК обусловлена значительной гетерогенностью распределения в ней ГЦ (гуанин—цитозин)—пар оснований. Воздействуя на ДНК денатурационными агентами, мы «расплетаем» ее легкоплавкие АТ (аденин—тимин)—обогащенные участки, в то время как тугоплавкие ГЦ-районы остаются в нативной форме (двухспиральной). Электронная микроскопия полученной частично расплавленной молекулы ДНК позволяет выявить эти легко- и тугоплавкие участки (рис. 1).

Таким образом, для картирования ДНК нужно зафиксировать ее в денатурированном виде и перевести молекулу из трехмерного состояния в двумерное, пригодное для электронной микроскопии. Для приготовления электронномикроскопического препарата используются денатурационные методики с применением метода белкового монослоя, который разбирался в первой части данного обзора.

Приступая к изложению основных данных о структуре ДНК, полученных с помощью построения карт частичной денатурации, отметим, что метод тепловой денатурации не дает точной воспроизводимости степени денатурации при разных температурах, однако положение легкоплавких участков хорошо воспроизводится. Гораздо большую воспроизводимость плавления можно достигнуть, используя для денатурации ДНК щелочные растворы [57].

При построении карт частичной денатурации обращает на себя внимание тот факт, что АТ-обогащенные районы у ДНК различного происхождения могут быть распределены в двух вариантах: в случаях асимметричности легкоплавких участков в молекуле карты характеризуются выраженными пиками и небольшим фоном (это так называемые блочные плотности АТ-пар); в тех же случаях, когда ДНК обладает последовательностью оснований, близкой к случайной, на картах с пиками, как правило, отмечается высокий фон.

В качестве денатурирующего агента обычно используют карбонатный буфер (рН 11—12) с 10%-ным содержанием формальдегида. За-

тем приготовление электронномикроскопических препаратов проводят с использованием метода белкового монослоя с формамидом.

Классическим подтверждением того факта, что АТ-пары располагаются в легкорасплетаемых районах ДНК, являются результаты частичного щелочного плавления ДНК фага λ [95]. Частичной денатурации были подвергнуты ДНК фага λ и ДНК этого же фага, в которой тимин был замещен на бромурацил. При сравнении этих двух щелочных карт плавления было обнаружено, что в целом они совпадают. Таким образом, был сделан вывод, что легкоплавкие участки ДНК, выделяемые при плавлении в присутствии формальдегида, соответствуют АТ-обогащенным последовательностям, т. е. денатурационные карты представляют собой карту распределения АТ-богатых участков.

В этой части обзора мы хотели бы остановиться также на технической стороне составления карт частичного плавления. Обычно длина участков молекул промеряется при помощи курвиметра после фотографического увеличения [62]. Далее для сопоставления отдельных частично расплавленных молекул друг с другом обычно проводится нормализация их изображений по длине. Следующим этапом является взаимная ориентация полученных нормализованных схем частично расплавленных молекул. Сначала изображения схем молекул наносятся на узкие полоски бумаги, затем вся совокупность изображений разбивается на подгруппы, внутри которых прослеживается очевидное сходство в расположении денатурированных участков. Далее строится гистограмма распределения расплавленных районов по длине.

Большинство сведений относительно расположения нуклеотидных последовательностей вдоль молекул ДНК, полученных с помощью анализа денатурационных карт, касается вирусных геномов. Построение таких карт, в частности, позволяет визуально различить левый и правый концы молекулы ДНК, что дает возможность непосредственно сопоставлять результаты физико-химических и генетических исследований. Так, при помощи этого метода были определены места прикрепления РНК- [51] и ДНК-полимераз к геному фага Т7, а также направление репликации ДНК Т7 [30, 42] и участок терминации синтеза рибонуклеиновых кислот. Было показано, что у фагов Р2 и 186 правый, а у фагов Р4 и λ левые концы ДНК первыми упаковываются при морфогенезе этих вирусных частиц [80]. Метод непосредственной щелочной денатурации дал возможность картировать фрагменты рестрикции на молекулах ДНК и, таким образом, ответить на вопрос, на каком участке, по длине и нуклеотидному составу располагаются рестрикционные сайты эндонуклеаз [74].

Денатурационное картирование в щелочных условиях было применено для идентификации в ДНК вируса герпеса вставок рибонуклеотидов, а также наличие обращенных повторов [102]. Оказалось, что внутренние районы ДНК этого вируса имеют ту же характерную картину частичной денатурации, что и концевые участки молекулы. Для ДНК мутанта вируса герпеса при помощи этого методического приема

было обнаружено тандемное удвоение некоторых ГЦ-обогащенных районов ДНК [46]. На карте щелочного плавления амплифицированной 5S рибосомальной ДНК шпорцевой лягушки имеется повторяющийся локус, состоящий из денатурированного и нативного районов. Анализ ГЦ-состава амплифицированной ДНК и 5S РНК позволил сделать вывод, что трудно расплетаемый участок величиной в 700 нуклеотидных пар содержит последовательность, комплементарную 5S РНК [7].

В большинстве перечисленных выше работ изучали ДНК, обладающие выраженными флуктуациями плотности АТ-пар (блочностью оснований). Действительно, карты, построенные для таких ДНК, асимметричны, имеют хорошо заметные пики.

Для других ДНК с последовательностями оснований, близкими к случайной (о чем можно судить по узкому интервалу плавления), построение денатурационных карт в большинстве случаев не позволяет легко отличить один конец от другого [2, 91], хотя встречаются вирусные геномы с характерным репером [3, Акопян и др.—неопубликованные данные]. Наличие таких реперов для ДНК фага Tg9, лизирующего штамм *Bac. thuringiensis*, и ДНК фага FT4, лизирующего *Pseudomonas putida* (в нашем случае), создает возможность точной ориентации частично расплетенных молекул относительно друг друга по концам.

Заканчивая этот раздел, следует также отметить, что для составления карт сверхскрученных вирусных ДНК применяются оригинальные методические подходы с использованием в качестве денатурирующих агентов в одном случае 32 белка—продукта 32 гена фага T2, в другом—водорастворимого карбодимида. 32 белок позволяет обнаружить мелкие области денатурации из-за высокого контраста одноцепочечных районов [41], а карбодимид модифицирует гуанин и тимин [81]. В обоих случаях в электронном микроскопе видны открытые кольцевые молекулы с одним хорошо заметным денатурированным районом. Как полагают авторы, эти расплетенные участки определяют степень сверхспиральности изученных ими ДНК.

Наконец, внесение специфических двуспиральных разрывов (с помощью нуклеазы *Eco RI*) позволило успешно картировать щелочное плавление ДНК вирусов полиомы [69] и SV-40 [75].

Структура кольцевых, автономно реплицирующихся молекул ДНК
Существенную роль при изучении структурных особенностей циркулярных ДНК играет электронномикроскопический анализ, основанный на определении конфигураций, размеров, молекулярного веса, а также ряда деталей тонкой организации этих молекул. Мы рассмотрим в первую очередь данные о структуре плазмидных ДНК прокариотических клеток, затем остановимся на основных результатах электронномикроскопических исследований, посвященных изучению митохондриальных ДНК эукариотических организмов.

Хотя бактериальные плазмиды открыты сравнительно недавно, к

настоящему времени в мировой литературе накоплено значительное количество фактов, касающихся проблем генетики и биогенеза плазмидных ДНК. Такое положение сложилось в результате как резко возросшего в последние годы интереса к теоретическим аспектам проблемы внехромосомных факторов наследственности, так и ее весьма важного прикладного значения.

Проведенные с помощью электронномикроскопического метода прямые наблюдения плазмидных ДНК подтвердили те данные о размере, кольцевой форме и сверхскрученности, которые были получены косвенным путем при других различных исследованиях. Так, измерение контурных длин индивидуальных молекул плазмид позволило определить их молекулярный вес [64], и уже отсюда был непосредственно выведен один из параметров репликации—среднее число плазмид на хромосому бактериальной клетки [14]. Существенные различия в количестве копий кольцевых молекул на хромосому и размерах были выявлены при исследовании нетрансмиссибельных (неспособных переносить из одной клетки в другую собственный и чужой генетический материал) и трансмиссибельных плазмид. Последние, детерминирующие процесс конъюгации, как правило, имеют крупные размеры и молекулярный вес их превышает 50 мегадальтон. Молекулярный вес нетрансмиссибельных плазмид практически не бывает выше 10 мегадальтон. Репликация их находится под так называемым релаксивным (ослабленным) контролем и количество копий их может достигать 10 и более на хромосому, в то время как число трансмиссибельных, репликация которых строго контролируется, не превышает 1—2 копий на клетку [33]. Исключением являются плазмиды, занимающие промежуточное положение,—плаزمида R6K имеет число копий на хромосому 10 и молекулярный вес 26 мегадальтон. Описан также целый ряд кольцевых ДНК с различными молекулярными весами—так называемые крипточеские плазмиды, функции которых до настоящего времени не известны [9, 67, 93]. О большой вариабельности молекулярных весов говорят электронномикроскопические данные, свидетельствующие о наличии у некоторых микроорганизмов гигантских плазмидных ДНК. Так, кольцевая ДНК с молекулярным весом 400 мегадальтон, выделенная из бактерий рода *Rhizobium*, идентифицирована как плазмид, обуславливающая клубеньковость у бобовых растений [77].

Гигантских размеров плазмидные ДНК обнаружены также у бактерий рода *Agrobacterium*, с молекулярными весами 77—180 мегадальтон [72, 111]. Бактериальная плазмид с молекулярным весом 202 мегадальтон была электронномикроскопически идентифицирована у бактериальных клеток *Pseudomonas putida* [35].

По-видимому, гетерогенность плазмид по длине связана с их своеобразными метаболическими свойствами, т. е. с фенотипическими признаками, сообщаемыми клетке-носителю. Исследование в электронном микроскопе многокопийных плазмид R6K и RP4 (факторов устойчивости к ампициллину, стрептомицину, тетрациклину, конамицину)

выявило различия в молекулярных весах—26 и 36 мегадальтон соответственно [65]. В клетках *Pseudomonas putida*, способных в качестве единственного источника углерода утилизировать ряд ароматических соединений (нафталин, салицилаты, бензилсульфонат и др.), электронномикроскопически было обнаружено у штамма P^dG7 [1, 10] три типа плазмидных молекул: 29—33; 15—18, 3—5 мегадальтон. Крошечные кольцевые молекулы ДНК (мини-плазмиды) с молекулярными весами от 1 до 5 мегадальтон были также обнаружены у ряда кишечных микроорганизмов [35] и энтероидных бактерий (Захарян и др., Га-лушко и Акопян, в печати).

Во всех случаях для определения молекулярных весов плазмидных ДНК с помощью количественного анализа контурных длин используются развернутые (релаксированные) молекулы, т. е. ДНК, лишенные сверхскрученного состояния [51].

Большую роль в изучении тонкой организации плазмидных геномов сыграл отмеченный выше метод конструирования гетеродуплексов [37, 39]. Целая серия электронномикроскопических исследований, посвященных выявлению степени родства между различными плазмидными геномами (F и R плазмидами *E. coli*), была проведена при помощи этого технического приема [22, 78]. Не исключено, что выявленные гомологичные области между этими плазмидами являются детерминантами формирования у бактерий половых ворсинок, обеспечивающих конъюгативный процесс.

Важнейшей характеристикой плазмидных ДНК является построение электронномикроскопических карт этих молекул. Визуальное исследование [16] однитовой молекулы ДНК R6K выявило наличие трех структур типа «стебель—петля», хорошо дифференцируемых друг от друга, так как две из них образуют характерную структуру, которую можно назвать «транспозон на транспозоне» (от английского слова transposition, что означает способность данной структуры переноситься и встраиваться в определенных условиях в другие участки генома). «Стебли» этих структур представляют собой обращенные повторы в цепи ДНК, а «петли»—цуклеотидные последовательности между ними. Как было отмечено выше, плаزمид R6K детерминирует устойчивость клеток к ампициллину, в связи с чем было высказано предположение о соответствии одной из структур «стебель—петля» на ее ДНК какому-либо из известных ампициллиновых транспозонов. Как показал гетеродуплексный анализ плазмид R6K и RSF 2124 (плазмида Col E1 с введенным в нее ампициллиновым транспозоном), область гомологии соответствовала ампициллиновому транспозону и локализовалась на одном из указанных участков ДНК R6K обращенных повторов, т. е. у таких гетеродуплексных молекул структура «транспозон на транспозоне» уже не выявлялась: одна из структур «стебель—петля» замещалась двуниевым участком гомологии. Наличие инвертированных повторов было выявлено и у плазмиды pAS3—делеционного мутанта плазмиды R6K, утратившей детерминант устойчивости к стрептомицину, с молекулярным весом 18,8 мегадальтон [16].

До сих пор мы касались плазмидных ДНК, представленных в клетках в виде кольцевых мономерных молекул. Однако нередко встречаются плазмиды и в мультимерной форме — так называемые катенаны. В электронном микроскопе последние выглядят в виде двунитевых колец, сцепленных между собой как звенья одной цепи. Так, в клетках *Proteus mirabilis* электронномикроскопически были идентифицированы ДНК фактора Col E1-K30 с разными молекулярными весами: 4,2; 8,5; 12,7 мегадальтон. Соответственно первая из них была представлена мономером, вторая — димером, третья — тримером [49]. Совершенно аналогичная картина была ранее продемонстрирована в отношении ДНК эукариотических клеток [32, 56, 84]. Такие мультимерные формы циркулярных молекул были идентифицированы при электронномикроскопическом изучении митохондриальных ДНК (мтДНК) человека (HeLa и лейкемических лейкоцитов), а также мтДНК, выделенных из ооцитов вьюна [7]. Хотя к настоящему времени накоплено большое число работ, касающихся функций и роли мультимерных молекул в жизнедеятельности как прокариотических, так и эукариотических клеток [6, 14], данные эти противоречивы, и многие вопросы в этой связи остаются еще открытыми.

Морфология и размер мономерной мтДНК с помощью электронной микроскопии были впервые изучены в 1966 году [25, 76]. В исследуемых препаратах мтДНК присутствовали, как правило, в виде кольцевых молекул с молекулярным весом 10 мегадальтон. Исключение составляла лишь мтДНК, выделенная из фибробластов мышей линии LD, где молекулы в основном представляли собой димеры с молекулярным весом 20 мегадальтон. В основном этот физический параметр для мтДНК различных эукариотических организмов, исследованных до настоящего времени, составляет 10 мегадальтон с некоторой вариабельностью в контурной длине (в пределах 15—20%) в зависимости от ионной силы растворов, применяемых для образования белкового монослоя [106]. С другой стороны, небольшие различия в молекулярных весах мтДНК (на примере *Drosophila*) могут быть обусловлены различным содержанием АТ-нуклеотидных пар, определенных построением карт частичной денатурации изученных мтДНК [43].

Отсутствие в митохондриальных геномах повторяющихся последовательностей затрудняет анализ первичной структуры данных молекул в животных клетках. Сведения по этому вопросу ограничены единичными сообщениями [20, 53]. В этих исследованиях приводятся данные, указывающие на наличие в мтДНК повторяющихся нуклеотидных последовательностей размером около 350 пар [20] и коротких гомополимерных районов длиной в несколько десятков (20—30) нуклеотидов. Имеется также ряд исследований по составлению денатурационных карт [20, 43, 110]. На основании анализа карт частичной денатурации у различных мтДНК было выявлено 3—4 легкоплавких участка. Относительно каких-то функциональных свойств этих районов в составах молекул мтДНК пока ничего не известно, хотя имеются предположения

[20], что они могут соответствовать промоторным участкам, узнаваемым РНК-полимеразой.

Весьма перспективным подходом к изучению первичной структуры митохондриальных геномов стало построение рестрикционных карт с помощью расщепления мтДНК различными эндонуклеазами [89].

Электронномикроскопический анализ мтДНК, выделенных из различных источников (клеток мартышек—BSC, человека—HeLa, мыши—LA9, а также клеток крысиной печени), показал, что такие нуклеазы, как Eco RI, Hind III, Hpa I, Hpa II, Bam I, расщепляют митохондриальные геномы на фрагменты с различными контурными длинами и большим разбросом числа самих рестрикт (2—6).

Наиболее интересные данные получены при анализе рестрикционных карт мтДНК после гидролиза рестриктазой Hae III [79]. В этом случае, в зависимости от источника, из которого выделялась мтДНК, число фрагментов составляло 20—30. Примечательно, что у близкостоящих видов (например, у лошади и осла) была выявлена значительная общность фрагментов—50%, в то время как у отдаленных видов (лошадь—собака) такой картины не удавалось наблюдать.

Заканчивая эту часть обзора, отметим, что здесь мы коснулись в основном структурной организации мтДНК, выделенных из нормально развивающихся клеток высших эукариотов. Что же касается данных о структуре мтДНК растений, грибов, одноклеточных водорослей, низших эукариотов и морфологических особенностей мтДНК при различных патологиях, они также представлены в литературе [6, 15].

Структура молекул одноцепочечных нуклеиновых кислот (РНК). Электронная микроскопия природных однонитевых нуклеиновых кислот с помощью метода белкового монослоя выявляет характерный для них вид «кустиков», лишенных регулярной структуры [37]. Хотя контурные длины таких «кустов» и дают некоторое представление о форме и размерах молекул, значительно больше информации о структуре РНК было получено при помощи электронной микроскопии денатурированных молекул [88]. При этом для приготовления препаратов РНК обычно в качестве денатурирующего агента используют раствор 8М мочевины в одном литре формамида. Приготовленные таким способом препараты РНК имеют удовлетворительный контраст и индивидуальные молекулы при этом бывают в достаточной степени расправленными с характерными для вторичной структуры стабильными элементами—так называемыми «шпильками». Так, для картирования элементов вторичной структуры рибосомальных РНК (рРНК) из клеток HeLa был применен метод получения препаратов из 80%-ного комбинированного раствора формамида и мочевины [105]. Было показано при этом, что 18S рРНК не имеет видимых элементов вторичной структуры, в то время как в более обогащенной гуанином и цитозином 28S рРНК имеется несколько отчетливых, закономерно расположенных «шпилек» (обращенных повторов вдоль молекул). Хотя в литературе имеются данные о гетерогенности вторичной структуры в 45S рибосомальном пред-

шественнике [97], столь же характерные стабильные «шпильки» были обнаружены и у ряда предшественников рибосомальных РНК из клеток HeLa. Сопоставление карт вторичной структуры рРНК и их предшественников позволило картировать участки рРНК и промежутки между ними в предшественниках. Таким образом, на основании электронномикроскопических данных была предложена схема процессингирования (созревания) рРНК в клетках HeLa. Обработка специфической экзонуклеазой 3' конца 28S рРНК позволила ориентировать карту вторичной структуры относительно физических (визуализированных в электронном микроскопе) концов 28S рРНК. Аналогичную картину наблюдали с помощью этого технического приема при изучении процесса созревания рРНК в температурно-чувствительном мутанте клеточной линии ВНК-21 [109]. Имеются сравнительные сведения относительно структурной организации рРНК и их предшественников также для большого числа видов позвоночных [92]. Обнаружено, что в ходе эволюции увеличивался как молекулярный вес предшественников рРНК, так и величина «шпилек» вторичной структуры. Взаимное же расположение «шпилек» вдоль молекул РНК и их число в общем не изменялись. Таким образом, было показано, что участки предшественников, отсутствующие в созревших рРНК, претерпели большую эволюцию, чем элементы вторичной структуры 28S рРНК.

Метод электронномикроскопического картирования вторичной структуры использовался и для анализа рДНК [104]. ДНК денатурировали и готовили препараты из растворов с 10%-ным содержанием формамида и 0,4 М мочевины. При этом обнаруживались те же элементы вторичной структуры, что и в рРНК, денатурированных в 80%-ной мочеvine-формамиде. Таким образом, были выявлены гетерогенность в транскрибируемых и нетранскрибируемых промежуточных районах рДНК и гомогенность в участках, кодирующих рРНК.

Методы построения денатурационных карт и конструирования гетеродуплексов успешно были использованы также при изучении структурной организации геномов РНК-содержащих вирусов [12, 19]. Сравнительный анализ физических карт геномов двух пикорнавирусов—вируса энцефаломиокардита и вируса полиомиелита типа I (репликативные двунитевые РНК) показал значительные отличия в количестве денатурированных участков. Большая степень денатурации (распределения АУ-пар) наблюдалась у вируса полиомиелита. Построение таких карт вирусов позволит в дальнейшем выявить делеции у дефектных интерферирующих частиц [19]. Анализ гетеродуплексных РНК (геномы вирусов полиомиелита типов I и III) обнаружил, что молекулярный вес этих двух типов вирусов приблизительно одинаков и эволюция геномов у них осуществляется путем накопления точечных мутаций, а не за счет протяженных вставок и делеций. На это указывает отсутствие характерной одноцепочечной петли, отходящей от двуспиральных областей сконструированных гетеродуплексов [12].

Относительно недавно появились данные, свидетельствующие о наличии в ядрах эукариотов стабильных видов РНК (нерибосомальной

природы) с параметрами седиментации 28S и 18S [13, 17, 98]. Так, выделен из эритробластов голубя новый вид стабильной ядерной РНК (28S) с характерной для нее вторичной структурой, заметно отличающейся от структуры как информационной РНК голубина голубя, так и 28S рРНК [17]. Предполагается [48], что стабильная 28S ядерная РНК соответствует интерхроматиновым гранулам, выявляемым электронномикроскопически в интерфазных ядрах эукариотических клеток [82]. Что же касается назначения этих ядерных РНК, то этот вопрос остается еще открытым. Однако авторы полагают, что «в ядре могут запасаться не только зрелые информационные РНК, но и их гигантские предшественники» [28]. Такая форма запасаания информационных РНК может иметь определенный смысл в плане расширения возможностей посттранскрипционной регуляции, так как большее число неинформативных последовательностей открывает возможности для более сложной системы селекции и переноса в цитоплазму требуемых информационных РНК. Роль узнавающих сайтов могут выполнять многочисленные «пилилки» и копии с повторов, имеющиеся в стабильных ядерных РНК [5].

Электронномикроскопическое картирование вторичных структур ядерных стабильных РНК находится в стадии изучения (рис. 1).

Резюмируя, следует отметить, что приведенный материал демонстрирует существенное преимущество электронномикроскопического подхода к анализу структуры нуклеиновых кислот: без особых модификаций одни и те же методы могут быть успешно использованы для изучения как эукариотического, так и прокариотического геномов. С помощью одних и тех же технических приемов обнаружены повторы и АТ-, ГЦ-богатые участки в структуре как прокариотов, так и эукариотов, а также выявлена степень гомологии геномов различных видов в зависимости от их эволюционного родства.

Если в структурной организации геномов на уровне ДНК особых различий между эукариотами и прокариотами не выявляется, то в основных молекулярных механизмах функционирования генома эукариотов обнаружен целый ряд особенностей: разобщенность в процессах транскрипции и трансляции; более сложная организация генома, а также механизма регуляции генной активности и, наконец, способность к дифференцировке. Тот факт, что геномы многих организмов имеют нуклеотидные последовательности в избыточном количестве (например, на один ген у дрозофилы в среднем приходится в 20—30 раз больше ДНК, чем это требуется для синтеза соответствующего белка [1], или гигантская плазмиды с молекулярным весом 202 мегадальтон, для которой единственные известные функции—это катаболизм толуола и конъюгационный перенос [35]), скорее говорит в пользу усложнения регуляторных процессов, по крайней мере у эукариотов (точка зрения Бриттена—Дэвидсона), чем об увеличении числа генов. Поэтому, когда еще нет единого мнения относительно организации и функционирования геномов, особенно у эукариотических организмов, очевидна

необходимость сочетанного анализа данных генетических, биохимических и электронномикроскопических исследований, проводимых в настоящее время.

Институт экспериментальной биологии
АН АрмССР

Поступило 12.11 1979

ՆՈՒԿԼԵԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ԿԱՌՈՒՅՎԱԾՔԸ

(էլեկտրոնային մանրադիտակի տվյալների հիման վրա)

Ս. Մ. ՀԱԿՈՅԱՆ, Մ. Հ. ԳԱԼՈՒՍՏՅԱՆ

Աշխատանքում ներկայացված են վերջին տարիներին կատարված էլեկտրոնամանրադիտակային տվյալները պրո- և էուկարիոտների, ինչպես նաև վիրուսների ԴՆԹ-ի կառուցվածքի մասին:

Առանձին բաժնում քննարկվել է արտաբրոմատոմալ տարրերի (պլազմիդներ, միտոքոնդրիալ ԴՆԹ) կառուցվածքի առանձնահատկությունները: Նկարագրված են հիմնական էլեկտրոնամանրադիտակային մոտեցումները, որոնց շնորհիվ ուսումնասիրվում են նշված օրգանիզմների նուկլեինաթթուների կառուցվածքը և էլեկտրոնային մանրադիտակի դերը գենոմի դետերմինացիայի ֆունկցիայի և էքսպրեսիայի մոլեկուլային մեխանիզմների ուսումնասիրման մեջ:

STRUCTURAL ORGANIZATION OF NUCLEIC ACIDS

(according to new electron-microscopic data)

S. M. AKOPIAN, M. G. GALUSTIAN

The electron-microscopic data of last years on the structural organization of nucleic acids of pro- and eucaryotes and DNA viruses are presented. In a separate section the peculiarities of the extrachromosomal elements structure (plasmides and mitochondrial DNA) are examined.

The general electron-microscopic methods for study of the structural organization of nucleic acids are described. The importance of the electron-microscopic research of molecular mechanisms for determination of genom functions and its expression is shown.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агабалян А. С., Захарян Р. А., Акопян С. М., Бакунц К. А., Израелян Ю. А., Азарян Н. Г. Микробиология, 27, 97, 1978.
2. Акопян С. М., Захарян Р. А., Агабалян А. С., Захарян Э. Г., Кочарян Ш. М. XV Чехослов. конф. по электронной микроскопии. 13, 1977.
3. Бозуш В. Г., Каратаев Г. И., Баев А. С., Пермогоров В. И. Мол. биол., 11, 5, 1167, 1977.
4. Бозуш В. Г., Смирнов В. Б., Ребенкиш Б. А., Пермогоров В. И., Азизбекян Р. Р. Мол. биол., 11, 4, 901, 1977.
5. Газарян К. Г., Тарантул В. З. Онтогенез, 9, 1, 20, 1977.

6. Гаузе Г. Г. Митохондриальная ДНК. М., 1968.
7. Гаузе Г. Г., Михайлов В. С. ДАН СССР, 217, 1197, 1974.
8. Дектярев С. В., Акифьев А. П. ДАН СССР, 224, 2, 449, 1975.
9. Захарян Р. А., Агабалин А. С., Акопян С. М., Гаспарян Н. С., Кочарян Ш. М. Биолог. ж. Армении, 8, 818, 1978.
10. Захарян Р. А., Агабалин А. С., Акопян С. М., Кочарян Ш. М., Боронин А. М. ДАН СССР, 232, 482, 1977.
11. Куприянова Н. С., Тимофеева М. Я., Баев А. А. Мол. биол., 10, 412, 1976.
12. Липская Г. Ю., Чумаков Н. М., Агол В. И. ДАН СССР, 235, 965, 1977.
13. Лихтечштейн А. В., Картошкин В. М., Пикер Е. Г., Шапот В. С. Мол. биол., 8, 703, 1974.
14. Майнелл Г. Бактериальные плазмиды. М., 1976.
15. Насс М. М. К. Сб.: Молекулярная генетика митохондрий. 184, Л., 1977.
16. Степанов А. И., Якубов Л. З., Абаланина Е. Г., Бебуров М. Ю. ДАН СССР, 238, 1462, 1978.
17. Тирантул В. З., Липасова В. А., Баранов Ю. И., Газарян К. Г. Мол. биол., 3, 864, 1974.
18. Черч Р. Б., Рысков А. П., Георгиев Г. П. Мол. биол., 8, 631, 1974.
19. Чумаков Н. М., Липская Г. Ю., Агол В. И. ДАН СССР, 232, 969, 1977.
20. Шугалий А. В., Митрохин Ю. Н., Герман А. В., Галкин А. П., Тодоров И. Н. ДАН СССР, 214, 1216, 1976.
21. Якубов Л. З., Абаланина Е. Г., Бебуров М. Ю., Степанов А. И. Генетика, 14, 1863, 1978.
22. Anthoni W. M., Deonier R. C., Lee H.-J., Hsu M.-T., Ohtsubo E., Davidson N., Broda P. J. Mol., 89, 647, 1974.
23. Beermann W. In: Results and problems in cell differentiation, Springer. Berlin—Heidelberg—N. Y., 4, 1, 1973.
24. Berns K. G., Kelly T. J. J. Mol. Biol., 82, 267, 1974.
25. Borst P., Rattenberg G. J. C. M. Biochem. et Biophys. Acta, 114, 645, 1966.
26. Brown W. M., Vinograd J. Proc. Nat. Acad. Sci USA, 71, 4617, 1974.
27. Brown D. D., Wensink P. C., Jordan E. Proc. Nat. Acad. Sci USA, 68, 3175, 1971.
28. Chan L.—N. L. Nature, 261, 157, 1976.
29. Chattazaj D. K., Inman R. B. Virology, 55, 174, 1973.
30. Cherny D., Aleksandrow A. A., Larudnaya L. J., Kasaganow Yu. N., Lazurkin Yu. S., Beabashashvili R. Sh., Savochkina L. P. Eur. J. Biochem., 79, 309, 1977.
31. Chow L., Davidson N. J. Mol., Biol., 75, 265, 1973.
32. Clayton D. A., Vinograd J. Nature, 216, 652, 1967.
33. Clowes R. S. Bact. Rev., 36, 361, 1972.
34. Cozzarelli N. K., Kelly R. B., Kornberg A. A. Proc. Nat. Acad. Sci USA, 60, 992, 1968.
35. Daggleby C. J., Bayley S. A., Worsey M. J., Williams P. A., Broda P. J. of Bacter., 130, 1274, 1977.
36. Davidson E. H., Gatan G. A., Angerer R. C., Britten R. J. Chromosoma, 51, 253, 1975.
37. Davis R., Davidson N. Proc. Nat. Acad. Sci USA, 60, 243, 1968.
38. Davis R., Parkinson J. S. J. Mol. Biol., 56, 403, 1971.
39. Davis R., Simon M., Davidson N. Methods in Enzymology, 21D, 413, 1971.
40. Deininger P. L., Schmidt C. W. J. Mol. Biol., 105, 773, 1976.
41. Deltus H., Westphal V., Axelrod N. J. Mol. Biol., 74, 677, 1973.
42. Dressler D., Wolfson J., Magarin M. Proc. Nat. Acad. Sci Wash., 69, 996, 1972.
43. Fauron C. M.—R., Wolstenholme D. K. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 3623, 1976.
44. Ferguson J., Davis R. W. J. Mol. Biol., 94, 135, 1975.
45. Forshett A. B., Davidson N., Brown P. B. J. Mol. Biol., 90, 301, 1974.

46. Frenkel N., Jacob R. J., Honess K. W., Huyward G., Kocker H. J. *J. of Virology* 16, 153, 1975.
47. Garon C. F., Berry K. W., Hierholzer J. C., Rose J. A. *Virology*, 54, 414, 1973.
48. Gasaryan K. G., Nicolaew A. J., Tarantul V. Z. *FEBS Lett.*, 84, 320, 1977.
49. Gerry N., Kelly T. J., Berns K. Y. J. *Mol. Biol.*, 79, 207, 1973.
50. Goebel W., Hellnski D. R. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 61, 1406, 1968.
51. Gomez B., Lang D. J. *Mol. Biol.*, 70, 239, 1972.
52. Helinski D. R., Clewel D. B. *Ann. Rev. Biochem.*, 40, 885, 1971.
53. Hradecna Z., Szybalski W. *Virology*, 32, 633, 1967.
54. Hsu M.—T., Davidson N. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 69, 2823, 1972.
55. Hsu M.—T., Davidson N. *Virology*, 58, 229, 1975.
56. Hudson B., Vinograd J. *Nature*, 216, 647, 1967.
57. Inman R. B., Sehnos M. J. *Mol. Biol.*, 49, 93, 1970.
58. Janiv M., Croissan T. O., Cuzin F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 57, 1074, 1974.
59. Kelly T. J. *J. of Virology*, 15, 1267, 1975.
60. Kelly T. J., Lewis A. M., Lewine A. S., Siegel S. J. *Mol. Biol.*, 89, 113, 1974.
61. Kleckner N., Chan R., Tye B., Batstein D. J. *Mol. Biol.*, 97, 561, 1975.
62. Kleinschmidt A. K. *Methods in Enzymology*, 12B, 361, 1968.
63. Kleinschmidt A. K., Zanu R. Z. *Naturforsch.*, 14b, 770, 1959.
64. Kocrot F. T., Carter B. J., Garon C. F., Rase J. A. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 70, 215, 1973.
65. Kontomichalon P., Maitani M., Clowes R. C. J. *Bact.*, 104, 33, 1970.
66. Lang D., Maitani M. *Biopolymers*, 9, 373, 1970.
67. Lee C. S., Davidson N. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 32, 757, 1968.
68. Lai G. G., Nathans D. J. *Mol. Biol.*, 89, 179, 1974.
69. Lerense R., Yavin M. *J. of Virology*, 16, 720, 1975.
70. Mac Hattie L. A., Thomas C. A. *Science*, 144, 1142, 1964.
71. Mac Hattie L. A., Ritchie C., Thomas C. A. J. *Mol. Biol.*, 23, 355, 1967.
72. Merlo D. J., Nester E. W. *J. of Bacter.*, 119, 76, 1977.
73. Mertz J. E., Berg P. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71, 4879, 1974.
74. Monjardino J., James A. W. *Nature*, 255, 242, 1954.
75. Mulder C., Delius H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69, 3215, 1972.
76. Nass M. M. K. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 56, 1215, 1966.
77. Nuti M. P., Ledeboer A. M., Lepidl A. A., Schilpercort P. A. J. *Gen. Microbiol.*, 100, 241, 1977.
78. Ohtsubo E., Doenier R., Lee H.—J., Davidson N. J. *Mol. Biol.*, 84, 565, 1974.
79. Potter S. S., Newbold J. E., Hutchison C. A., Edgell M. H. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 72, 4496, 1975.
80. Pruss G., Goldstein A. N., Calendar R. *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, 6, 2367, 1974.
81. Pulleyblank D., Morgan A. J. *Mol. Biol.*, 94, 1, 1975.
82. Puvion E., Bernhard W. J. *Cell Biol.*, 67, 200, 1975.
83. Pyeritz R. E., Thomas C. A. J. *Mol. Biol.*, 87, 463, 1974.
84. Radloff R., Baner W., Vinograd J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 57, 1514, 1967.
85. Rhoades M., Rhoades E. J. *Mol. Biol.*, 69, 187, 1972.
86. Rhoades M., Thomas C. A. J. *Mol. Biol.*, 37, 45, 1968.
87. Ritchie D., Thomas C. A., Mac Hattie L. A., Wensink P. C. J. *Mol. Biol.*, 23, 365, 1967.
88. Robberson D., Aloni Y., Attardi G., Davidson N. J. *Mol. Biol.*, 60, 473, 1971.
89. Robberson D., Clayton D. A., Morrow J. F. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71, 4447, 1974.
90. Ryskov A. P., Kramerov D. A., Georgiev G. P. *Biochem. et. biophys. Acta*, 447, 214, 1976.
91. Saigo K. *Virology*, 68, 166, 1975.

92. Schibler U., Wyler T., Hagenbach O. J. Mol. Biol., 91, 503, 1975.
93. Shahrabadi M., Bryan L., Van Den Elzen H. J. Gen. Microbiol., 21, 592, 1975.
94. Sharp P., Cohen S., Davidson N. J. Mol. Biol., 75, 235, 1973.
95. Schnos M., Inman R. B. J. Mol. Biol., 51, 612, 1970.
96. Simon M., Studier F. M. J. Mol. Biol., 79, 249, 1973.
97. Slach J. H. W., Saritran M.—L., Loening H. E. Nature, 253, 282, 1975.
98. Spohr G., Imaizumi T., Scherrer K. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 5009, 1974.
99. Szybalski W., Szybalski J. H. Cancer, 4, 536, 1974.
100. Thomas C. A., Pyeritz R. E. et. al. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 38, 353, 1974.
101. Tye B., Chan R., Batstein D. J. Mol. Biol., 85, 485, 1974.
102. Wadsworth S., Jacob R. J., Roizman B. J. of Virology, 15, 1487, 1975.
103. Walfson J., Dressler D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 3054, 1972.
104. Wellauer P. K., David I. B. J. Mol. Biol., 89, 379, 1974.
105. Wellauer P. K., David I. B., Kelly D. E., Perry R. P. J. Mol. Biol., 89, 357, 1974.
106. Wellauer P. K., Weber R., Wyler T. J. Ultrastruct. Res., 42, 377, 1973.
107. Westmoreland B., Szybalski W., Ris H. Science, 163, 1343, 1969.
108. Wilson D., Thomas C. A. J. Mol. Biol., 84, 115, 1974.
109. Wintrow I. J. Mol. Biol., 100, 141, 1976.
110. Wolstenholme D. R., Kirschner R. G., Gross N. J. J. Cell Biol., 53, 393, 1972.
111. Zuenen I., Van Larebeke N., Teuchy H., Van Montagu M., Schell J. J. Mol. Biol., 86, 109, 1974.