

مضاعف گشتن DNA و غشاء هسته

دکتر شاپور باستان

مطالعات Williams و Ockey [۱۲] در سال ۱۹۷۱ روی سلولهای هاستر چینی که بعلت انتخاب میتوتیک بدون استفاده یا با استفاده از FdUrd همزمان شده اند نشان دهنده این است که وجود دانه‌ها را موقعی می‌توان در غشاء هسته مشاهده نمود که DNA در آخر زمان S یعنی در موقعی که هترو کروماتین مضاعف می‌شود نشانه گذاری شده باشد (توضیح اینکه FdUrd و آنتی‌بوتین از عمل مضاعف گشتن DNA جلوگیری نمی‌کنند بلکه این عمل را کندتر می‌کنند).

مطالعات ما بر روی سلولهای هاستر چینی که با ماده‌ای شیمیائی به نام Hydroxyurea سنکرو نیزه شده بودند عمل آمد زیرا این ماده از مضاعف گشتن DNA جلوگیری می‌کند یا به عبارت دیگر موقعیکه در مرحله G1 آنرا بکار بریم، در مرحله G1/S انتر فاز تقسیم سلولی را متوقف می‌کند [۱].

روش‌های آزمایش

الف - فیرو بلاستهای ناهمزمان میکروتوس اگرستیس (Microtus Agrestis) را ب مدت ۱۰ تا ۶۰ دقیقه در معرض تیمیدین (3H) قرار داده و بدین طریق آنرا نشانه گذاری نمودیم. سلولهای هاستر چینی: برای اینکه مشخص شود که عمل همانند سازی DNA در ارتباط با غشاء هسته است یا نه، سلولهای هاستر چینی ناهمزمان را با تیمیدین (3H) در فواصل ۳۰ ثانیه تا ۲۰ دقیقه نشانه گذاری نموده و سپس در محلول نمک دار بسیار سرد در معرض شستشو قرار گرفتند. بعد از اینکه این سلولها در محلول نمک دار سرد دیگر شستشو داده شدند از رشد آنها جلوگیری بعمل آمد. برای مطالعه علامت گذاری سطحی در زمانهای مختلف S، ۲۰ دقیقه از سلولها را در محیط Colcemid/ml. / 5ng کشت داده

مقدمه - ژاکوب و همکاران [۸] در سال ۱۹۶۳ رپلیکون را بعنوان واحد اصل مضاعف گشتن مولکول DNA در باکتریها بحساب آوردند و یاد آور شدند که نقطه شروع همانند سازی در ارتباط با غشاء سلولی می‌باشد. از آن زمان تا کنون کارهایی که بتوسط سایر دانشمندان صورت گرفته است رابطه فوق را تأیید کرده است [۱۱، ۶].

دو تن دیگر از دانشمندان [۴] در سال ۱۹۶۸ احتمال همانند سازی DNA و ارتباط آنرا با غشاء هسته در اوکاریوت‌ها مورد بررسی قرار دادند. مثلاً ابتدا سلولهای آمیون انسان را ب مدت ۲۴ ساعت در مجاورت مقدار زیادی تیمیدین و سپس ب مدت ۱۴ ساعت در آنتی‌بوتین قرار دادند و بدین طریق سلولها را همزمان نمودند. بدین ترتیب اغلب سلولها در ناحیه مشخصی از غشاء هسته و ناحیه سطحی هسته نشان‌دار شدند، در حالیکه چنین طرحی را در سلولهای ناهمزمان بطور نادر می‌توان مشاهده نمود. چنین بنظر می‌رسد که در اوکاریوت‌ها مضاعف گشتن DNA از غشاء هسته شروع می‌شود ولی پس از اتمام سنتز DNA، نقطه شروع مضاعف شدن همان نقطه قبلی نخواهد بود.

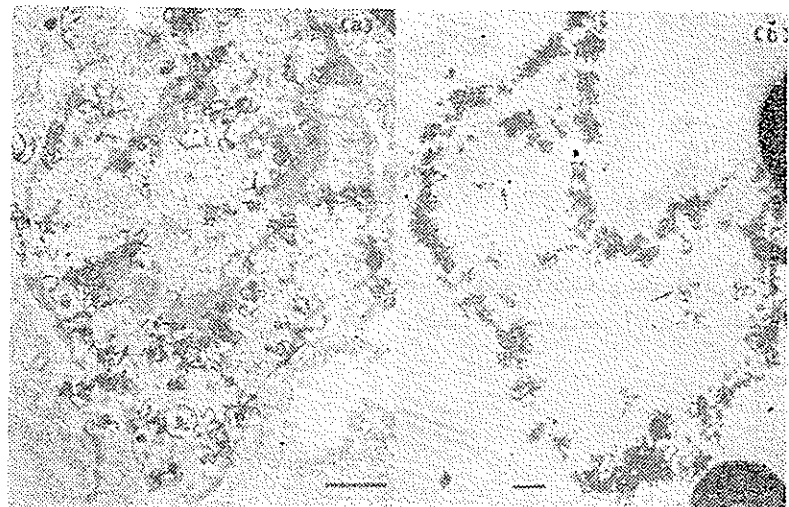
در دو سال اخیر مطالعات بیوشیمیائی زیادی انجام گرفته که نشان می‌دهد در اوکاریوت‌ها نقطه شروع همانند سازی در ارتباط با غشاء هسته می‌باشد [۷].

از مطالعات اتورادیو گرافی که بتوسط Milner [۹] در سال ۱۹۶۸ صورت گرفته چنین بنظر می‌رسد که در لئفوسیت‌های انسانی که بتوسط Phytohemagglutinin تحریک گشته است، عمل همانند سازی در محل اتصال بین هترو کروماتین و او کروماتین صورت می‌گیرد.

شکل ۱

اتورادیو گرافی سلولهای *Microtus agrestis* تهیه شده به توسط میکروسکوپ الکترونیکی که با تیمیدین [3H] بمدت ۱۰ دقیقه نشانه گذاری شده است.

(a) طرح پراکنده (b) طرح سطحی بدون اینکه توده های هترو کروماتین واقع در کروموزومهای جنسی (علامت های حامل) نشانه گذاری شده باشد. این نشانه گذاری سطحی محتملا معرف مضاعف گشتن هترو کروماتین انتر کال می باشد
(Comings 1971,a, b,1972)



نتیجه: سلولهای ناعمر زمانی که بمدت ۱۰ تا ۶ دقیقه در معرض تشکیلات نشانه دار قرار گرفته اند از نظر ساختمانی تشکیلات مشابهی را دارا بوده اند. از ۵۴ سلولی که مورد آزمایش قرار گرفتند، در ۲۳ تای آنها عناصر ژنتیکی بطور منتشر وجود داشته اند (شکل 1-a) و در ۲۴ تای این سلولها این عناصر موقعیت سطحی را دارا بوده اند (شکل 1-b)، در حالی که در ۶ سلول باقیمانده قسمتهای علامت گذاری شده را بطور موضعی در بخش های مختلف هترو کروماتین مشاهده می شود. سلولهایی از نقطه نظر مطالعه بیشتر مورد توجه بوده اند که علامت نشانه گذاری شده را بتوان در قطعات بزرگ هترو کروماتین مشاهده نمود.

چنین تصویری شود که سلولها در اواخر حدمیانی S در معرض علامات نشانه دار قرار گرفته اند، زیرا علامات نشانه دار سطحی بیشتر نشان دهنده همانند سازی هترو کروماتین انتر کالراست تا هترو کروماتین سانترومیریک [۳،۲].

ج - سلولهای هاستر چینی: اگر محل همانند سازی در غشاء هسته باقی بماند، اغلب سلولهای علامت گذاری شده توسط تیمیدین (3H) موقعیتی سطحی را بخود میگیرند. برای اینکه درصد دانه های ژنتیکی غشاء هسته را تعیین گردد سلولهای انتخاب نموده و بمدت زمان ۵/۴، ۲/۱۰، ۳/۱۰ و ۳/۱۰ دقیقه نشانه دار می گردند.

نتایج شکل ۱ در جدول I نشان دهنده اینست که درصد دانه های غشاء هسته بترتیب عبارت بودند از ۵۳/۴ و ۵۴/۱۰ و ۵۷/۲ و ۵۸/۸ و ۶۲/۶ درصد. این آمار نشان دهنده اینست که نسبت دانه های سطحی با افزایش زمان علامت گذاری مقادیرش بیشتر می شود. نتایج فوق نشان دهنده اینست که نقطه همانند سازی باغشاء هسته در ارتباط نمی باشد.

وسلولهای میتوتیک جدا گردیدند. سپس این سلولها را بمدت ۴ دقیقه در طی دوره سلولی نشانه دار نمودند. مدت رویدادهای مختلف سیکل سلولی در زمان های مختلف عبارتست از:

زمان G1 در حدود یک ساعت است، در فواصل ساعتی بین ۱ تا ۱۹ کروماتین همانند سازی می کند که این فاصله برای همانند سازی هترو کروماتین بین ۷ تا ۱۲ ساعت است. برای اینکه بتوان بلافاصله بعد از زمان G1 دوره S سلولهای میتوتیک را نشانه گذاری نمود این سلولها را در محیطی که حاوی 100 ng هیدروکسی یوریا در 10mm، ادنوزین و 17nm آمیو پترین بود قرار داده و بمدت ۶ ساعت کشت داده شدند. سپس سلولها را سه بار بمدت زمانهای مختلف در محیط کشت واسط دیگری رشد داده و آنرا با تیمیدین (3H) در زمانهای مختلف نشانه گذاری نمودند:

(۱) نشانه گذاری شده بمدت ۱۰ دقیقه (۲) مدت ۱۰ دقیقه در اثر قرار داده و سپس بمدت ۱۰ دقیقه نشانه گذاری شدند
(۳) مدت ۲۰ دقیقه در اثر قرار داده و بمدت ۱۰ دقیقه نشانه دار شدند
(۴) نشانه گذاری شده بمدت ۳۰ دقیقه (۵) مدت ۱۰ دقیقه در اثر و بمدت ۳۰ دقیقه نشانه دار گردیدند.

علت اینکه آزمایشات به ۵ روش فوق بعمل آمد اینست که مضاعف گشتن DNA بلافاصله بعد از خارج نمودن هیدروکسی یوریا صورت نمی گیرد [۱].

بالاخره برای تعیین میزان پراکنندگی دانه ها در سلولهای مورد آزمایش، سلولها را در یک دوره سلولی علامت گذاری نموده و آنها را در سیکل سلولی بعدی مورد مطالعه قرار گرفتند. طرز عمل بدین طریق است که سلولهای میتوتیک را بمدت ۲ تا ۴ ساعت در آدنوزین و آمیو پترین کشت داده و بعد بمدت ۱۰ دقیقه در محیط تیمیدین (3H) قرار می گیرند. سپس آنها را ۳ بار شسته و پس از یک شب کشت از رشد آنها جلوگیری بعمل می آید.

دقیقه پس از خروج این ماده مقدار سنتر بجدا کتر خود می رسد. ۵ دقیقه مختلف برای نشان گذاری بعد از خروج هیپروکسی یوریا مورد آزمایش قرار گرفته است (به روش های آزمایشات نتایج مشابهی بدست آمده است و بطور کلی می توان گفت که درصد دانه های متصل به غشاء بین ۹/۳ و ۱۲/۹ تغییر می کند. (البته ملاحظه می شود که نتایج فوق، با نظریه کامینگ و کاکفودا [۴] مبنی بر اینکه همانند سازی DNA در غشاء هسته شروع می شود وفق نمی دهد) موقعیکه درصد دانه های که به غشاء هسته چسبیده اند را برای تمام فواصل (با نضام قسمت راست در GI/S انترفاز) در نظر بگیریم (تابلو ۲) ملاحظه می کنیم که مقدار این دانه ها در ابتدای مرحله S به حداقل و در انتهای S به حداکثر خود می رسند.

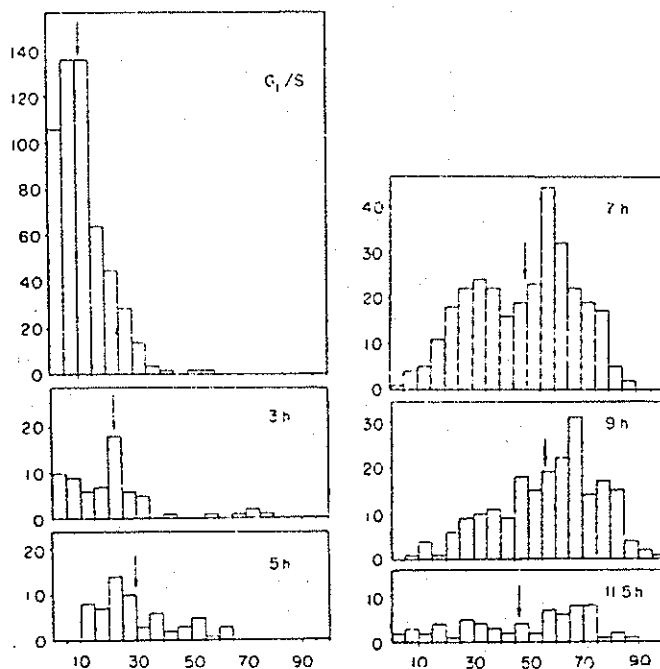
	۳۰ ثانیه	۲ دقیقه	۴ دقیقه	۱۰ دقیقه	۲۰ دقیقه
	۶۵	۲۴۸	۱۹۳	۱۹۷	۱۲۶
(۱)	{ ۱۱/۲ ۴/۶	{ ۲۶/۲ ۸/۸	{ ۳۱/۶ ۱۰/۹	{ ۴۳/۰ ۱۴/۲	{ ۵۰/۹ ۲۶/۳
(۲)	{ ۵۳/۴ ۲۱/۱	{ ۵۴/۱ ۲۰/۶	{ ۵۷/۲ ۲۲/۱	{ ۵۸/۸ ۲۳/۱	{ ۶۲/۱ ۱۹/۶

جدول ۱ - سلولهای ناهمزمانی که با تیمیدین 3H بمدت زمانهای بین ۱۰ تا ۲۰ دقیقه نشان گذاری شده اند

- (۱) تعداد دانه ها بطور متوسط در هر سلول
(۲) متوسط درصد دانه های متصل به غشاء هسته

در سلولهای ناهمزمان، درصد دانه های متصل به قسمت سطحی غشاء هسته بیش از درصد دانه های است که در بخش زیرین دانه های قبلی قرار گرفته اند و مقدار درصد دانه های سطحی در سلولهای ناهمزمان بین ۵۳ تا ۶۲ تغییر می کند. این قضیه بسادگی تمایل اتصال کروماتین به غشاء هسته را می رساند و منتج به این نظریه می شود که این کروماتین مشرا کم تر از کروماتین مرکزی است [۵]. و این امکان بوجود می آید که ممکن است همانند سازی DNA بعضی از رپلیکونها، توسط غشاء هسته کنترل شود. طرز عمل بدین طریق است که اگر سلولها را با انتخاب میتوتیک همزمان و در محیط حاوی آمیوتوپترین و آدنوزین بمدت ۴ ساعت کشت داده و بمدت ۱۰ دقیقه با تیمیدین (3H) نشان گذاری کنند ملاحظه می شود که پس از اینکه آنها را شسته و بمدت یک شب رشد دهند درصد دانه ها در غشاء هسته ۳۷ درصد خواهد شد. چون مقدار این درصد برابر دیگر مقادیری است که در ابتدای مرحله S بدست آمده، لذا چنین می توان نتیجه گرفت که

اگر فرض کنیم که هیچ رابطه ای بین همانند سازی DNA و غشاء هسته وجود ندارد و با اینکه فقط DNA هترو کروماتین با غشاء ارتباط دارد، می بایستی درصد دانه های متصل به غشاء در ابتدای مرحله S کم و بتدریج که به مرحله آخر S نزدیک می شویم (یعنی موقعیکه کروماتین نشان داده می شود) زیاد گردد.



تابلو ۱ - سلولهای هاستر جینی ناهمزمان که بمدت زمانهای ۰/۵، ۲، ۴، ۱۰، ۲۰ دقیقه با تیمیدین [3H] نشان گذاری شده اند، محور عرضی، درصد دانه های متصل به هسته و محور طولی، تعداد سلولهای مورد آزمایش را نشان میدهد.

نتایج فوق نشان دهنده اینست که در ساعت های ۵، ۳، ۰، ۷، ۹ بعد از میتوز مقدار درصد دانه های متصل به غشاء بترتیب عبارت بودند از ۲۲/۶، ۲۰/۳، ۴۸/۱، ۵۶/۳، ۴۶/۸ درصد. این نتایج نشان میدهد که نقاط نشان دار سطحی در مرحله اولیه S کم و در مرحله آخر S زیاد می باشد، افت آن در ساعت ۱۱/۵ شاید به این علت باشد که در این زمان بعضی از سلولها تقسیم گشته و در حقیقت در ابتدای زمان S بوده اند.

برای اینکه انتشار دانه ها در ابتدای زمان S مورد مطالعه قرار گیرند، ابتدا سلولها را با انتخاب میتوتیک همزمان نمودند و سپس در هیپروکسی یوریا و آمیوتوپترین کشت داده شدند. آمالیدی و همکارانش در ۱۹۷۲ با استفاده از طریق فوق نشان دادند که عمل تقسیم در همان مراحل اولیه S آهسته متوقف گشته و همانند سازی DNA بطور دائم صورت نمی گیرد. دانشمندان فوق مشاهده نمودند که نشان دار شدن DNA در ابتدای زمان S موقعی بجدا کتر خود می رسد که هیپروکسی یوریا را از سلول خارج کنند. ویست

مشاهده نمود، موقعیکه سلولها بمدت زیادی در معرض FdUrd یا آم‌توپترین قرار گیرند، دانه‌ها بتدریج در اطراف هسته جمع می‌گردند. او این امر را به علت تغییرات تدریجی در طی نمود طولانی و غیر متعادل تفسیر نمود.

مسئله فوق برای باردیگر در سلولهای هامستر چینی مورد مطالعه قرار گرفته است. انتخاب این سلولها بدین منظور بود که آنها را می‌توان براحتی با انتخاب میتوتیک ومورد استفاده قرار دادن هیدروکسی یوریا همزمان نمود. (ماده فوق باعث می‌شود که مشابه سازی DNA G1/S انتر فاز متوقف نشود [۱]). با مطالعاتی که بعمل آمده ملاحظه شد که در ابتدای مرحله S سیکل سلولی نقاط نشانه‌دار را کمتر از مواقع دیگر می‌توان مشاهده نمود (تابلو ۲). با آزمایش فوق می‌توان نتیجه گرفت که لااقل در ابتدای مرحله S مشابه سازی DNA در غشاء هسته شروع نمی‌شود و مشاهدات قبلی را بعلمت تغییرات ماهیت که در اثر آم‌توپترین بوجود آمده در نظر گرفت [۱۰] اگر آم‌توپترین فقط مشابه سازی DNA را آهسته نماید تقسیم سلولی ممکن است تا مرحله آخر S پیشرفت نماید وبهین دلیل هم هست که میتوان نقاط نشانه دار متصل به غشاء را مشاهده نمود.

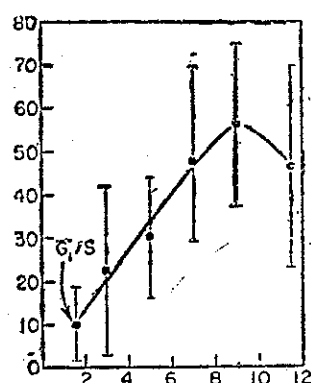
عده‌ای نیز در طی مطالعاتی باین اصل معتقدند که نقطه مشابه سازی در باکتریها محتملا در ارتباط باغشاء سلولی است. در حالیکه در اوکاریوتها این ارتباط با غشاء هسته است وعقیده آنها بر این اصل است که رابطه‌ای بین DNA تشکیل شده و کمپلکس پروتئین لیپیدی رامشاهده نموده‌اند [۳] ولی با این گونه مطالعات شیمیائی نمی‌توان از نقطه نظر رابطه غشاء سلولی و مضاعف گشتن DNA به يك اصل کلی رسید زیرا این امکان وجود دارد که چربی موجود در حقیقت چربی مختص غشاء باشد.

با استفاده از میکروسکپ الکترونیک نتایج بهتری را از نقطه نظر این رابطه بدست آورده‌اند، ولی متأسفانه باکتریها بمراتب کوچکتر از آنند که بتوان آنها را بطریق فوق مورد آزمایش قرار داد وبالطبع مطالعاتی که از نقطه نظر میکروسکپ الکترونیک بدست آمده فقط به اوکاریوت‌ها محدود می‌شود. وحتی در اوکاریوت‌ها نیز بوضوح می‌توان مشاهده نمود که رابطه‌ای بین دوشاخه مشابه سازوغشاء وجود ندارد ولی بعضی از مشخصات دو شاخه مشابه ساز نشان می‌دهد که اقلا در موقعیکه دوشاخه از یکدیگر جدا می‌گردند باغشاء در ارتباط هستند. اما تا آنقدری که به رابطه بین غشاء هسته ومضاعف گشتن DNA مربوط است می‌توان اظهار داشت که هتروکروماتین در ارتباط باغشاء هسته و قسمت سطحی هسته می‌باشد و مضاعف گشتن DNA نیز در انتهای زمان S صورت می‌گیرد.

کروماتین‌ها اگر در یک دوره سلولی در ارتباط باغشاء نباشند در دوره سلولی بعدی نیز باغشاء در ارتباط نخواهند بود.

بحث: احتمال چند نوع رابطه بین غشاء هسته و همانند سازی DNA وجود دارد.

- (۱) سنتز DNA ممکن است در غشاء هسته شروع شود.
- (۲) دوشاخه همانند ساز ممکن است در غشاء هسته چه در شروع سنتز و چه پس از ایجاد زنجیر نیز باقی بماند.
- (۳) هتروکروماتینی که دیر همانند سازی می‌کند ممکن است در ارتباط باغشاء باشد.
- (۴) هیچ رابطه‌ای بین غشاء هسته و مشابه سازی DNA وجود ندارد.



تابلو ۲- درصد دانه های متصل به غشاء در سلولهای هامستر چینی سنکرونیزه شده که با تیمیدین [3H] بمدت ۴ دقیقه در G1/S در زمانهای مختلف بعد از میتوز علامت گذاری شده است.

در طی آزمایشی ملاحظه شد، موقعیکه سلولهای آم‌نیون انسان با مقدار زیادی تیمیدین و آم‌توپترین همزمان گردید [۴]، بطور وضوح دانه‌هایی در غشاء هسته و اطراف هسته مشاهده شد. (در سلولهای ناهمزمان فقط چند هسته از این طرح پیروی نمودند) از آزمایش فوق چنین نتیجه گرفته شد که همانند سازی DNA در غشاء هسته شروع و دوشاخه مشابه ساز از ناحیه غشاء با ایجاد زنجیری که در اثر نوپدید می‌آید دوره می‌شوند.

در آزمایش دیگری که بر روی سلولهای هامستر چینی که بتوسط انتخاب میتوتیک با آم‌توپترین یا 5-FdUrd همزمان شده بودند صورت گرفت [۱۲] در ابتدای مرحله S شواهدی دال بر وجود ماده نشانه گذاری شده در غشاء وجود نداشت ولی اوکی، [۱۰] در آزمایشی که در ۱۹۷۲ انجام داد نشان داد که بازدارنده‌های تیمیدیلات سنتتاز در حقیقت از مشابه سازی DNA در ابتدای مرحله S جلوگیری نمی‌کنند، او همچنین

چینی را با تیمیدین نشاندار علامت گذاری کرده و بتوسط میکروسکپ الکترونیکی و به کمک روش های اتورادیوگرافی مورد مطالعه قرار گرفته است. ضمناً در این آزمایشات سلولهای ناهمزمان از نقطه نظر تقسیم سلولی نیز بمدت زمان نیم تا ۲۰ دقیقه نشان گذاری شده است.

نتیجه اینکه ارتباطی بین مقدار غشاء دانه دارو زمانهای بکاررفته در آزمایش وجود نداشته و ضمناً الزامی ندارد که نقطه شروع همانند سازی نزدیک غشاء هسته قرار گرفته باشد ولی در موقعیکه سلولها در ابتدای مرحله S از نظر تقسیم سلولی همزمان شده باشند در مقدار غشاء دانه دار خیلی تقلیل حاصل خواهد شد و این مبین آن است که سنتز DNA از ناحیه غشاء هسته شروع نمی گردد.

وقتی سلولهایی که به علت انتخاب میتوتیک همزمان شده اند را در زمانهای مختلف دوره حیاتی سلول نشان گذاری کنیم، مقدار درصد دانه های سطحی در ابتدای زمان S کم و بتدریج که به انتهای مرحله S یعنی زمانیکه هتروکروماتین شروع به همانند سازی میکند نزدیک می شویم زیاد می گردد.

با نشان گذاری سلولهای *Microtus Agrestis* ناهمزمان میتوان نشان داد که ایجاد علامتهای سطحی به علت مضاعف گشتن هتروکروماتین می باشد. نتایج به دست آمده نشان دهنده این است که هیچ ارتباطی بین غشاء هسته و مضاعف گشتن مولکول DNA وجود ندارد.

توضیح اینکه اگر هیچ رابطه ای بین مضاعف گشتن DNA و غشاء هسته وجود نداشت می بایستی که در ابتدای مرحله S دانه ها بطوریکه نواخت در تمام هسته و در آخر مرحله S در اطراف غشاء هسته و اطراف هسته قرار گیرند. ولی با مطالعه سلولهای هاستر چینی که با انتخاب میتوتیک همزمان گشته اند [۱۲] چنین بنظر می رسد که نظریه فوق صادق نیست و در مقاطع تهیه شده توانستند تغییر تدریجی دانه ها را از بخش مرکزی تا سطحی از ابتدا تا انتهای مرحله S مشاهده نمایند (تابلو ۲)

چون هتروکروماتین در غشاء هسته متمرکز می شود، می توان وجود رابطه ای را بین غشاء هسته و مضاعف گشتن DNA (تا حدی که به رپلیکونهای هتروکروماتین مربوط است) در نظر گرفت ولی وجود مقدار زیاد هتروکروماتین در بخش سطحی هسته سلولی که فاقد غشاء است امکان رابطه فوق را کم می نماید.

با آزمایشاتی که تا کنون بعمل آمده همچنین می توان اظهار نظر نمود که غشاء هسته رلی در شروع و یا ادامه همانند سازی DNA ندارد و بخشهای نشاندار سطحی معرف مضاعف گشتن بعدی DNA هتروکروماتینی است که در داخل غشاء هسته و اطراف ناحیه سطحی هسته متمرکز می گردد.

خلاصه -- برای اینکه رابطه بین غشاء هسته و همانند سازی مولکول DNA مورد بررسی قرار گیرد. سلولهای هاستر

References

- 1- Amaldi, F., Carnevali, F., Leoni, L. & Mariotti, D. (1972). *Expt. Cell Res.* 74, 367.
- 2- Comings, D.E. (1972a). *Expt. Cell Res.* 71, 106.
- 3- Comings, D.E. (1972b). *Advanc. Human Genetics*, 3, 237.
- 4- Comings, D.E. & Kakefuda, T. (1968). *J. Mol. Biol.* 33, 225.
- 5- Fakan, S., Turner, G.N., Pagano, J.S. & Hancock, R. (1972). *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.* 69, 2300.
- 6- Fielding, P. & Fox, C.F. (1970). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 157.
- 7- Hecht, N.B. & Stern, H. (1971). *Expt. Cell Res.* 69, 1.
- 8- Jacob, F., Brenner, A. & Cuzin, F. (1963). *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* 28, 329.
- 9- Milner, G.R. (1969 a) *J. Cell Sci.* 4, 569.
- 10- Ockey, C.H. (1972) *Expt. Cell Res.* 70, 203.
- 11- Siccardi, A.G., Shapiro, B.M., Hirota, Y. & Jacob, F. (1971). *J. Mol. Biol.* 56, 475.
- 12- Williams, C.A. & Ockey, C.H. (1971) *Expt. Cell Res.* 63, 365.