

JANUSZ MACIEJOWSKI

Katedra Ogólnej Hodowli Zwierząt WSR w Lublinie

NIEKTÓRE GENETYCZNE PROBLEMY ROZWOJU OSOBNICZEGO

Rozwój istot żywych rozpatrywany jest przez biologię w dwóch różnych płaszczyznach. Z jednej strony jako rozwój pojedynczego osobnika — ontogeneza, z drugiej zaś biologię interesują procesy rozwoju gatunków, ich ewolucja, dokonująca się — w porównaniu z ontogenezą — w ogromnie dużych jednostkach czasu, czyli filogeneza. Człowiek, stojąc przed nieznanym zjawiskiem, stara się najpierw zbadać jego przejawy i cechy charakterystyczne, ostatecznym jednak dążeniem jest poznanie mechanizmu działania pojedynczych procesów, które prowadzą do powstania i ukształtowania się interesującego go zjawiska. Najbardziej niezawodnym środkiem prowadzącym do tego celu jest eksperyment naukowy, który może potwierdzić lub zaprzeczyć postawionym z góry roboczym hipotezom i teoriom.

Wydawać by się mogło, że ontogeneza, zamykająca się w stosunkowo niedługich okresach czasu i dająca przez to badaczowi nieograniczone wprost możliwości zarówno obserwacji jak i eksperymentu, powinna być znacznie bliżej owego celu — poznania mechanizmów kierujących rozwojem — niż filogeneza. Nauka o ewolucji nie dysponuje tak bogatym materiałem opisowym, możliwości eksperymentu zredukowane są do minimum, wiadomości o odległych w czasie epokach również nie obfitują w nadmiar danych. Dlatego zaskakującym paradoksem może się wydawać, że odwrotnie w stosunku do oczekiwań, to właśnie nauka o ewolucji jest daleko bardziej zaawansowana w rozszyfrowaniu mechanizmów sterujących niż nauka o rozwoju osobniczym, która dopiero zaczyna wkra-
czać na ten etap poznania.

Ten pozorny paradoks nie będzie nas jednak dziwić, jeżeli uświadomimy sobie, że oba mechanizmy mają niemal krańcowo różny charakter. O ile w rozwoju osobniczym „intencją” natury jest możliwie wierne odtworzenie postaci rodziców przez potomstwo, w każdym następującym po sobie pokoleniu, bez względu na ewentualne zmiany otoczenia, w którym gatunek bytuje, o tyle poprzez filogenezę natura każdorazowo koryguje kierunek rozwoju gatunku, dostosowując go do aktualnych zmian środowiska. Ontogeneza w tendencji do wiernego kopiowania postaci przodków ma więc charakter deterministyczny — „konserwatywny”, pod-

czas gdy filogeneza jest jak gdyby tylko cieniem rozwoju osobniczego bez ustalonego z góry kierunku działania, jest jak gdyby strażnikiem bytu gatunku.

W dalszych rozważaniach zajmiemy się tylko ontogenezą, a te kilka zdań wstępu miały jedynie na celu zilustrowanie złożoności problemu rozwoju osobniczego i pokazanie wzajemnego stosunku zachodzącego między onto- i filogenezą.

Jak wspomniano już poprzednio, badania zjawisk ontogenezy, które trwają już ponad dwa stulecia¹, doprowadziły do bardzo szczegółowego poznania procesów rozwojowych wielu gatunków zwierząt, w tym również człowieka. Morfologia opisowa pozostawiła tu bardzo niewiele luk do uzupełnienia, fizjologia rozwoju ma również bardzo duże sukcesy do odnotowania. Pomimo jednak tych niewątpliwych osiągnięć w badaniach ontogenezy różnych gatunków, wciąż jesteśmy jeszcze bardzo daleko od podstawowego celu poznania — wyjaśnienia skomplikowanych mechanizmów rządzących rozwojem. Zasadniczy problem, jaki chciałaby tu biologia rozstrzygnąć, można by streścić w następującym pytaniu: na jakiej drodze i pod działaniem jakich bodźców z jednej zapłodnionej komórki rozwija się wielokomórkowy organizm o daleko posuniętej specjalizacji komórek i tkanek zarówno w ich budowie jak i funkcji? Lub inaczej formułując tę samą myśl — jakie mechanizmy sterują procesami rozwoju, powodując że organizm potomny powtarza w nim drogę przebytą przez rodziców?

Ponieważ jedynym materialnym łącznikiem pomiędzy pokoleniami są komórki rozrodcze, zdawano sobie od dawna sprawę, że to one właśnie przenoszą na organizm potomny informację o sposobie i kierunkach rozwoju przyszłego organizmu. Mechanizm działania tej substancji dziedzicznej i jej istota pozostawały nadal zagadką. Pierwszym, kto pokusił się o sformułowanie teorii rozwoju w oparciu o wspomniane fakty był — jeżeli nie traktować poważnie wcześniejszych teorii, zakładających istnienie „*vis vitalis*” lub inaczej nazywanych niematerialnych sił — A. Weissmann. Zakładał on, że procesy różnicowania komórek są wynikiem nierównomiernego podziału substancji dziedzicznej w procesie powstawania komórek potomnych. W ten sposób każda komórka realizowała plan rozwoju w stopniu odpowiadającym otrzymanej części substancji dziedzicznej, czyli tak zwanej idioplazmy. Warto odnotować, że teoria ta została sformułowana przed ponownym odkryciem praw Mendla i ze względu na swoją głęboką logikę została niemal bez zastrzeżeń przyjęta.

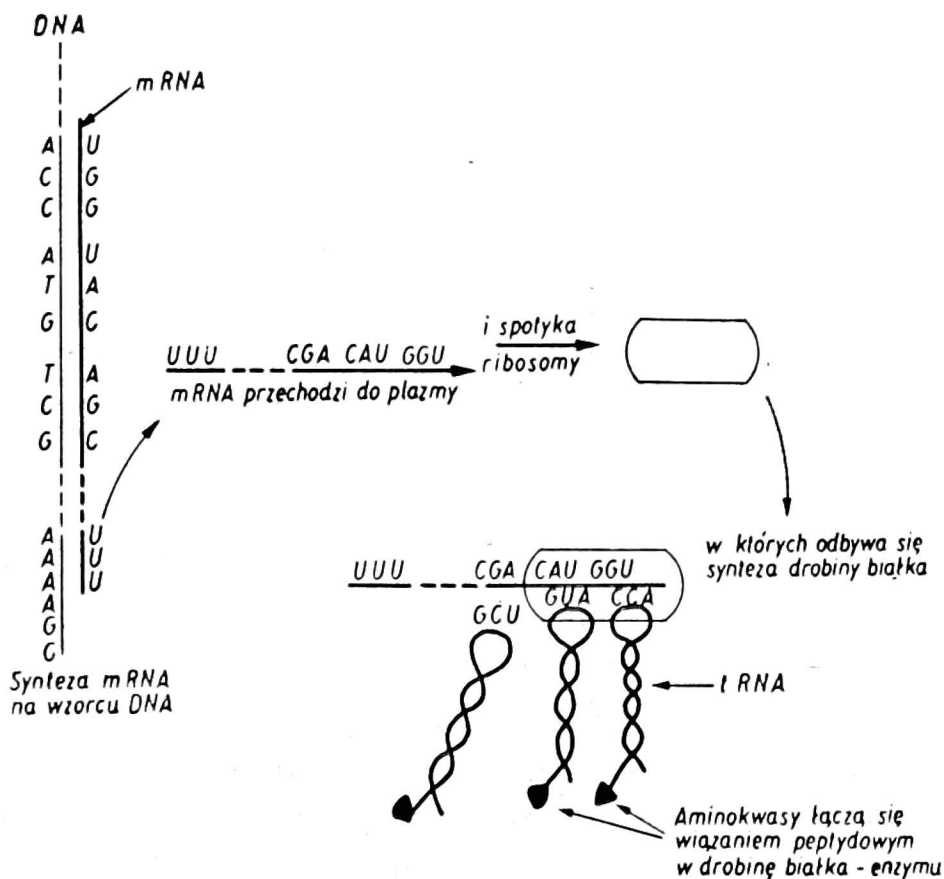
¹ Obalenie przez K. F. Wolffa w 1759 r. teorii preformacji można uważać za datę narodzin nauki o rozwoju. Argumentem Wolffa były obeszwacje nad rozwojem zarodka kury.

Gwoli ścisłości należy zresztą dodać, że same prawa Mendla nie mogły jej ani potwierdzić, ani obalić i dopiero rozwój teorii chromosomowej w genetyce, zapoczątkowanej i rozwiniętej przez T. H. Morgana i jego szkołę, zamiast ułatwić — skomplikował wyjaśnienie problemów ontogenezy. Z teorii tej, popartej zresztą licznymi obserwacjami i doświadczeniami, wynikało niezbicie, że siedliskiem genów — a więc informacji genetycznej — są chromosomy umieszczone w jądrze komórki. Wcześniej jeszcze wiadano, że podział chromosomów w procesie mitozy jest doskonale ekwiwalentny. Każda komórka potomna otrzymuje zatem pełny komplet informacji genetycznej, co stanowi zaprzeczenie słuszności teorii Weissmanna. Stwierdzono wprawdzie (14, 19, 20), że niektóre owady (np. *Miastor metraloas*, *Larionoptera rubi*, *Heteropeza pygmaea*) mają w komórkach somatycznych mniejszą liczbę chromosomów niż w komórkach szlaku zarodkowego, nie jest jednak wcale pewne, czy te różnice mogłyby w jakiś sposób, przynajmniej w części, zrehabilitować teorię Weissmanna. U zdecydowanej większości gatunków bez wątpienia wszystkie komórki somatyczne mają pełny garnitur chromosomów, charakterystyczny dla danego gatunku.

Jeżeli pogląd o monopolistycznej roli jądra w przenoszeniu substancji dziedzicznej jest słuszny, to ogromnie interesujące jest zbadanie, w jaki sposób określona komórka, rozporządzając „pełnym tekstem” informacji genetycznej wybiera z niego tylko te fragmenty, które są jej potrzebne do rozwoju. Aczkolwiek dzisiejszy stan wiedzy nie pozwala jeszcze na pełną odpowiedź na postawione pytanie, to jednak ostatnie osiągnięcia genetyki molekularnej, połączone z wynikami badań cytogenetyków, uchylili rąbka tajemnicy tego ogromnie skomplikowanego procesu.

Osiągnięcia molekularnej genetyki można streścić następująco (7, 8, 10): nośnikiem „pamięci genetycznej” jest kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA), który przy pomocy układu 4 zasad tworzy tak zwany kod genetyczny, zawierający informację syntezy określonych białek — enzymów. Trzy obok siebie leżące w nici DNA zasady stanowią „hasło” dla określonego aminokwasu. Synteza białek odbywa się w plazmie komórki, informacja o jego budowie zawarta jest w jądrze. Przenośnikiem informacji z jądra do plazmy jest jedna z odmian kwasu rybonukleinowego (RNA) tak zwany messenger RNA (mRNA) — posłaniec, który powstaje na odpowiednim odcinku DNA w formie negatywowego odbicia kolejności zasad. mRNA wędruje do plazmy i łączy się z występującymi tam rybosomami. W plazmie występuje również inny rodzaj RNA, tak zwany transfer (tRNA) — przenośnik, którego drobiny są prawdopodobnie specyficzne dla każdego aminokwasu. Drobina tRNA łączy się z określonym aminokwasem i przenosi go do rybosomu, w którym „tkwi” nić mRNA. Triplet zasad w mRNA i odpowiadający mu triplet w tRNA służą prawdopod-

nie jako znak rozpoznawczy kolejności „zgłaszania się” drobin tRNA, niosących określone aminokwasy. Dwa sąsiednie aminokwasy łączą się ze sobą wiązaniem peptydowym, rybosom przesuwa się dalej wzdłuż nici mRNA, a drobiny tRNA, które oddały swoje aminokwasy, są uwalniane. Po przejściu rybosomu przez całą długość nici mRNA powstaje kompletna drobina białka, zsyntetyzowanego dokładnie według wzoru wziętego z nici DNA w jądrze komórkowym. Powstała drobina białka — jako enzym — włącza się do procesów przemiany materii w komórce i katalizuje przebieg takich lub innych reakcji ana- lub katabolicznych. Na uproszczonym schemacie, proces powstawania enzymu można przedstawić następująco (rys. 1).



Rys. 1. Schemat syntezy drobin białka w plazmie komórki, na podstawie otrzymanej informacji genetycznej

Osiągnięcia genetyki molekularnej ogromnie wzbogaciły naszą wiedzę o istocie i roli genu i potwierdzały sformułowaną przez Beadle'a, Tatum i Horowitza (wg. 4) hipotezę o genetycznym sterowaniu rozwoju przez system enzymów, hipotezę określaną skrótowo „jeden gen — jeden enzym”. Z drugiej strony zdajemy sobie sprawę z tego, że przytoczony schemat wyjaśnia raczej system przekazywania i odczytywania informacji genetycznej, nie udzielając odpowiedzi na interesujące nas pytanie — dlaczego i w jaki sposób różne komórki „odczytują” tylko tę jej część, która jest im potrzebna, nie korzystając z całości. Aby choć w części odпові-

dzieć na to pytanie — w zakresie na jaki nam pozwala stan współczesnej wiedzy — musimy pokrótce przypomnieć niektóre znane już od dość dawna fakty z embriogenezy niektórych gatunków zwierząt (3, 13).

Komórka jajowa, w przeciwieństwie do plemnika, zawiera sporą ilość plazmy. Ilość ta w stosunku do masy jądra jest zazwyczaj znacznie większa niż w przeciętnej komórce somatycznej. Komórka jajowa, mimo że w większości przypadków przypomina kształtem kulę, wcale nie ma symetrii promienistej — lecz dwuboczną, przy wyraźnie zaznaczonej biegunowości komórki. Oznacza to, że nie tylko jądro nie leży w punkcie centralnym komórki, lecz również to, że plazma nie jest materiałem jednorodnym i skład jej zmienia się na przestrzeni od bieguna wegetatywnego do animalnego. W wyniku bruzdkowania zapłodnionego jaja powstają komórki potomne, wśród których plazma komórki jajowej — w przeciwieństwie do materiału jądrowego — nie została podzielona w sposób równoważny, zarówno od strony ilościowej jak i jakościowej. Oznacza to, że informacja genetyczna rozwoju zawarta w jądrze zostaje przekazana każdej potomnej komórce w pełnym komplecie, ale realizacja tych założeń dziedzicznych będzie przebiegać od samego początku rozwoju w innych warunkach środowiska wewnętrznego. Te spostrzeżenia wyjaśniają wprawdzie bardzo wiele, ale wciąż jeszcze nie dają możliwości zrozumienia mechanizmu selektywnego działania informacji genetycznej w różnicujących się komórkach. Tym cenniejsze wydają się być wyniki badań Jacoba i Monoda (11, 16, 17) — laureatów nagrody Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii w roku 1965, które rzucają trochę światła na ten skomplikowany problem.

Gospodarkę materiałową i energetyczną ustroju cechuje daleko posunięta oszczędność. W normalnie funkcjonującym organizmie produkowane są tylko takie ilości różnych substancji, jakie zaspakajają aktualne potrzeby przemiany materii. Biosynteza lub odbudowa określonej substancji następuje w ustroju przez szereg szczebli pośrednich, przy czym przejście od jednej formy do następnej jest sterowane przez specyficzny dla danej reakcji enzym. W przypadku kiedy produkt końcowy łańcucha reakcji nagromadzony został w dostatecznej ilości, lub dostarczony z zewnątrz, cała reakcja ustaje. Dzieje się tak dlatego, że według wszelkiego prawdopodobieństwa końcowy produkt łańcucha reakcji unieczynnia enzym pierwszego etapu reakcji, a tym samym przerywa cały proces, gdyż enzymy następnych etapów nie mają odpowiednich substratów do ich dalszego przekształcania. Ta inaktywacja pierwszego enzymu przez produkt końcowy została nazwana przez Jacoba i Monoda „efektem allosterycznym”, a substancja inaktywująca — „efektorem”. Tego rodzaju sterowanie, jako jeden ze sposobów oszczędnego gospodarowania, jest nie-

wątpliwie bardzo korzystne dla ustroju, nie stanowi jednak na pewno jedynego sposobu uchronienia się przed „rozrzutnością”.

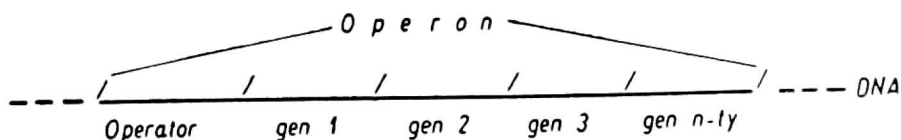
Zanim powrócimy do innych sposobów, które z rozwojem wydają się być bardziej związane niż efekt allosteryczny, warto zwrócić uwagę na ważne odkrycia Demereca, Hartmana i wsp. (wg 2.), które poprzedziły i ułatwiły badania nad sterowaniem produkcji enzymów. Badali oni mianowicie mutanty pewnego szczepu bakterii niezdolne do określonych reakcji przy syntezie tryptofanu, przy czym poszczególne grupy mutantów różniły się między sobą rodzajem defektu, to znaczy brak zdolności syntezy tego aminokwasu wynikał u różnych grup z innych przyczyn. Kiedy przy pomocy transdukcji ustalono położenie zmutowanych loci, okazało się, że wszystkie one zlokalizowane są we wzajemnym bezpośrednim sąsiedztwie. Dalsze badania ujawniły, że nie jest to odosobniony przypadek. Stwierdzono, że również geny warunkujące etapy łańcucha syntezy histydyny, treoniny, izoleucyny i wielu innych związków, leżą w swoim bezpośrednim sąsiedztwie.

Enzymy u mikroorganizmów można ogólnie podzielić na konstytucyjne — to znaczy takie, które są wytwarzane stale oraz adaptacyjne, których produkcja jest uruchomiana w przypadku zaistniałej potrzeby. Jest to drugi sposób, przy pomocy którego organizm — jeszcze skuteczniej niż w przypadku poprzednim — może oszczędnie gospodarzyć swoimi zasobami. Tak na przykład szczepy bakterii rosnące na pożywce z dodatkiem glukozy nie produkują enzymów do odbudowy galaktozydów. W przypadku zmiany źródła energii, to jest zastąpienia glukozy — laktozą, bakterie rozpoczynają produkcję enzymów potrzebnych do odbudowy tego cukru. Również w tym przypadku genetyczne loci dla produkcji tych enzymów leżą obok siebie.

Monod w badaniach nad indukowaniem produkcji enzymów u bakterii wyosobnił dwie przeciwstawne sobie grupy mutantów. Jedna z nich charakteryzowała się produkcją ciągłą enzymów odbudowujących laktozę, niezależnie od rodzaju cukru w pożywce; bakterie drugiej grupy przeciwnie — zatraciły w ogóle zdolność wytwarzania tych enzymów. Krzyżowania testowe wykazały, że w obu przypadkach chodzi o tak zwane mutacje punktowe i co więcej — okazało się, że lokalizacja obu mutacji jest ściśle identyczna.

To pozornie mało znaczące odkrycie dało początek daleko idącym zmianom w teorii genu. Mutacja w przeciwstawnych kierunkach przypominała — jeżeli użyć dość odległego porównania — zamek, który w przypadku zagubienia klucza pozostaje stale otwarty lub zamknięty. Zamek ów otwiera lub zamyka łańcuch syntezy lub odbudowy określonego związku, poprzez „udostępnienie” lub „zamknięcie” informacji genetycznej, zawartej na odcinku nici DNA, dotyczącej syntezy potrzeb-

nych w tym celu enzymów. Zmutowany gen ze względu na swoją funkcję został nazwany „operatorem”, w przeciwieństwie do genów strukturalnych, których aktywność uzależniona jest od operatora i które przekazują za pośrednictwem mRNA szyfr syntezy określonego enzymu. Nie zostało dotychczas w pełni wyjaśnione, czy gen operator pełni tylko rolę zamka zamykającego lub otwierającego dostęp do genów strukturalnych określonego łańcucha reakcji, czy też może sam jest równocześnie genem strukturalnym pierwszego etapu tej reakcji. Odcinek nici DNA, w którym obok siebie położone są geny warunkujące powstawanie enzymów sterujących kolejnymi etapami określonej reakcji, nazwano operonem. Operon rozpoczyna gen operator, za którym ułożone są geny strukturalne, co schematycznie przedstawia rys. 2.



Rys. 2

Jeżeli operator ze względu na swoje funkcje został porównany z zamkiem, to z kolei należałoby się zastanowić, co jest kluczem do jego otwarcia lub zamknięcia. Tu okaże się, że nasze porównanie nie było zbyt ścisłe. Operator stanowi bowiem tylko jeden z elementów zamka, który do pełnego zamknięcia potrzebuje innego jeszcze elementu, który z pierwszym łączyłby się na drodze powinowactwa chemicznego, tworząc „zaryglowaną” całość. Aby uczynić operon, należałoby wobec tego przy pomocy innej substancji związać „ryglujący” operator związek i ona właśnie byłaby kluczem.

Podstawę do tego typu rozumowania dały odkrycia Pardee, Monoda i Jacoba (wg 4) wskazujące na istnienie dodatkowych mechanizmów regulujących przebieg syntezy u bakterii. Stwierdzono mianowicie, że obok mutacji w locus operatora operonu laktozy występują inne, które w konsekwencji prowadzą do zjawisk identycznych z poprzednio opisanymi, to jest do produkcji ciągłej enzymów odbudowujących laktozę, nawet w przypadku, kiedy cukier ten nie znajduje się w pożywce bakterii. O tym, że ta druga mutacja nie jest identyczna z pierwszą, świadczą następujące doświadczenia: w przypadku mutacji operatora mogą powstawać mutanty o produkcji ciągłej enzymów (O^c — w przeciwieństwie do normalnego allelu O^+). Zmutowany gen O^c w heterogenotach O^c/O^+ otrzymanych na drodze transdukcji lub seksdukcji jest dominujący wobec genu normalnego, to znaczy osobniki o tym genotypie charakteryzują się nieprzerwaną produkcją adaptacyjnych normalnie enzymów. Komórki heterogenetyczne, które prócz zmutowanego genu O^c zawierają dodatko-

wo zmutowane geny strukturalne, warunkujące powstanie jednego określonego enzymu, będą również produkować w sposób ciągły wszystkie enzymy z wyjątkiem tego, którego dotyczy mutacja. Jeżeli literami a , b , c oznaczymy kolejne enzymy, których geny zlokalizowane są w jednym operonie, to w zależności od stanu operatora (O^c lub O^+) uzyskuje się następujące wyniki:

$O^c a^+ b^+ c^+$ — produkcja ciągła enzymów a , b , c

$O^+ a^+ b^+ c^+$ — produkcja indukowana enzymów a , b , c

$O^c a^+ b^- c^+$ — produkcja ciągła enzymów a , c , przy braku b

$O^+ a^+ b^- c^+$ — produkcja indukowana enzymów a , c , przy braku b

$O^c a^+ b^- c^+ / O^+ a^+ b^+ c^+$ — produkcja ciągła enzymów a , c , przy braku b , przy indukcji pożywką pojawia się również enzym b

W oparciu o tego rodzaju doświadczenia wysnuto właśnie uzasadnione przypuszczenie, że gen operator strukturalnie jest związany z pozostałymi genami określonego łańcucha reakcji, a nie uczynnia je wtórnie poprzez produkt swojego działania. Odwrotnie rzecz się ma, jeżeli chodzi o wspomniany już drugi rodzaj mutacji. Fenotypowe objawy tej mutacji są takie same jak przy mutacji operatora (O^c) — to jest, bez indukowania pożywką odbywa się ciągły proces produkcji enzymów — normalnie adaptacyjnych. Że jednak chodzi w tym przypadku o inny rodzaj mutacji niż poprzednio, świadczy zachowanie się komórek heterogenetycznych. Komórki takie mimo niewątpliwego posiadania w swoim genomie zmutowanego genu zachowują się normalnie, to znaczy rozpoczynają produkcję enzymów jedynie w przypadku dodania do pożywki substancji, do której odbudowy enzymy te są przeznaczone. Zmutowany gen jest zatem recesywny w stosunku do allelu normalnego. Zachowanie się komórek heterogenetycznych świadczy również, że gen ten nie jest związany strukturalnie z operonem tylko steruje nim przy pomocy innych substancji, które muszą być produkowane w oparciu o „genetyczny zapis” tego właśnie genu. Produkt działania tego genu, który stanowi ową brakującą część hipotetycznego zamka, nazwano represorem, a gen który warunkuje jego powstanie — genem regulatorem. Różnice w zachowaniu się mutantów wyjaśnia niżej przedstawiony zapis:

Genotyp $O^c a^+ b^+ c^+ / O^+ a^+ b^+ c^+$ — produkcja ciągła wszystkich 3 enzymów.

Genotyp $R^c O^+ a^+ b^+ c^+$ — produkcja ciągła wszystkich 3 enzymów, ponieważ zmutowany gen regulator (R^c) nie powoduje produkcji substancji blokującej operator.

Genotyp $R^c O^+ a^+ b^+ c^+ / R^+ O^+ a^+ b^+ c^+$ — enzymy produkowane jedynie
 $\leftarrow \text{—————} \rightarrow$
 w przypadku indukcji.

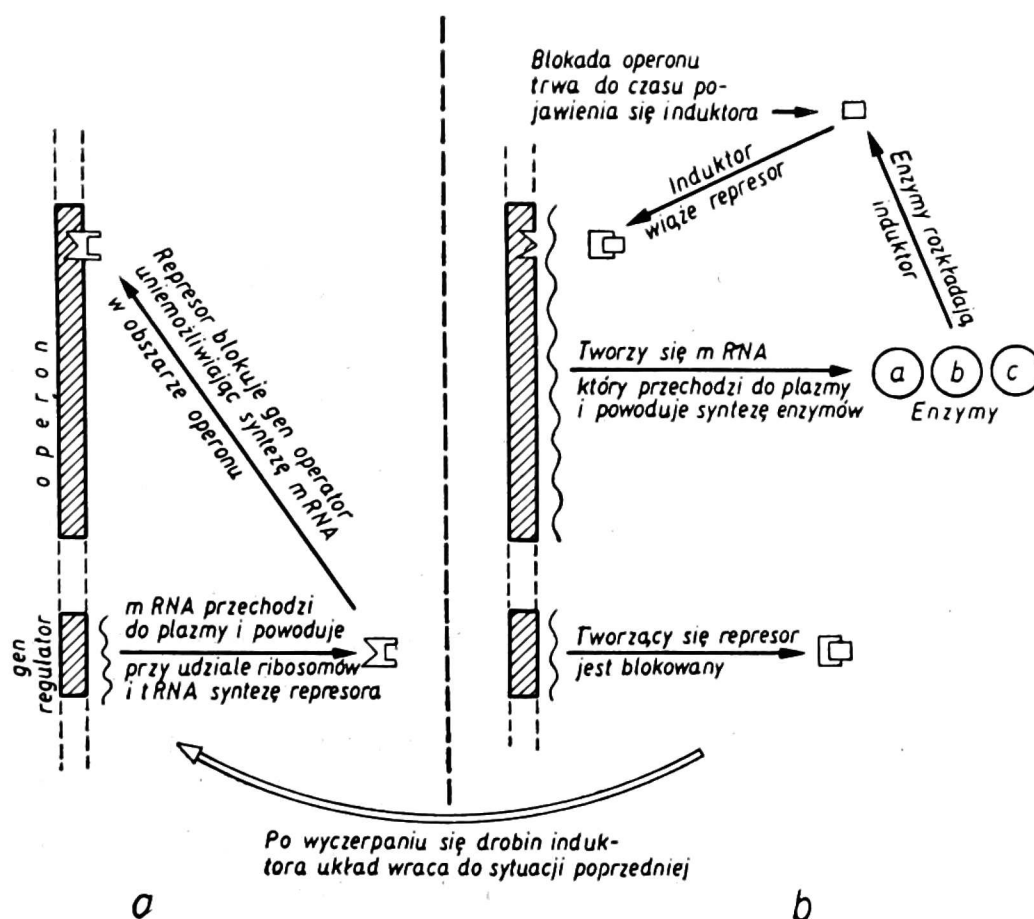
Produkt genu regulatora (R^+) unieczynnia oba operony.

Nie wdając się w bardziej szczegółowe rozważania nad doświadczeniami, które doprowadziły wspomnianych ostatnio autorów do sformułowania hipotezy o genetycznym sterowaniu produkcji enzymów, wspomnieć jedynie należy dla pełnego zrozumienia zasad funkcjonowania przedstawionego mechanizmu o ostatnim jego elemencie, to jest o substancji pełniącej rolę klucza uruchamiającego mechanizm. Ponieważ adaptacyjne enzymy pojawiają się w przypadku, kiedy dodatek określonej substancji (np. laktoza zamiast glukozy) wymaga ich obecności do odbudowy tego związku, logicznie trzeba przyjąć, że drobina substancji, na którą skierowana będzie działalność enzymów, stanowi klucz otwierający zamek operonu. Substancję taką nazwano induktorem.

Enzymy jednak ze względu na charakter swojej działalności można ogólnie podzielić na dwie zasadnicze grupy, to jest na kataboliczne (one służyły jako przykład naszych rozważań) i anaboliczne, prowadzące syntezę różnych potrzebnych komórce związków. Mechanizm uczynniania produkcji obu grup enzymów będzie miał nieco inny przebieg w obu przypadkach. Enzymy kataboliczne pojawią się w przypadku obecności związku, który należy odbudować, enzymy anaboliczne — przeciwnie — pojawią się wówczas, kiedy zajdzie potrzeba syntezy określonego związku. Tutaj induktorem — choć nazwa ta w tym przypadku nie jest zbyt szczęśliwa — jest nagromadzenie się końcowego produktu syntezy, którego drobiną aktywują represor (również ta nazwa nie jest dla tego przypadku właściwa), ten z kolei łącząc się z operatorem unieczynnia cały operon i wstrzymuje produkcję zbędnych już enzymów. Wyczerpywanie się nagromadzonego produktu syntezy w komórce jest ponownie sygnałem do wznowienia produkcji. Taki proces sterowania syntezą enzymów anabolicznych nie został wzięty przez analogię obserwacji i badań nad enzymami katabolicznymi, lecz został doświadczalnie potwierdzony w badaniach nad syntezą niektórych aminokwasów.

Dotychczasowe badania nie wyjaśniły jeszcze na czym polega aktywacja bądź inaktywacja represora, jaki charakter chemiczny ma represor, na czym polega zablokowanie bądź uczynnienie operonu za pośrednictwem operatora. Z dużym prawdopodobieństwem można jednak przypuszczać, że gen regulator, działając zdalnie poprzez swój produkt — represor na gen operator, nie odchyła się w tym działaniu od ogólnego poznanego schematu przekazywania informacji genetycznej. Logicznie należałoby przyjąć, że gen regulator jest szyfrem na produkcję określonej drobiną białka, które jest syntetyzowane w oparciu o przeniesioną do plazmy informację przez mRNA. Jeżeli represorem jest istotnie białko, to wstępne badania wskazują że rolę tę spełniają najprawdopodobniej histony, które w komórkach organizmów wyższych występują w ścisłym połączeniu z DNA. Bonner i Huang stwierdzili (wg 5), że DNA związany

z histonem nie może służyć jako „matryca” do produkcji RNA w obecności polimerazy RNA, w przeciwieństwie do sytuacji, kiedy enzym ten powoduje taką syntezę, jeżeli DNA występuje w stanie wolnym. To stwierdzenie mogłoby wyjaśniać, na czym polega zablokowanie operonu, lub jego uczynnienie. Geny jednego operonu, czyli odcinek DNA z odpowiednią informacją genetyczną, która dotyczy syntezy potrzebnych do określonej reakcji enzymów, mogą przekazać tę informację do realizacji w plazmie jedynie za pośrednictwem mRNA. Połączenie represora z genem operatorem uniemożliwia tworzenie się cząsteczki RNA na przestrzeni określonego operonu. Cały proces regulacji można schematycznie zobrazować następująco (rys. 3).



Rys. 3. Schemat regulacji syntezy enzymów indukowanych
a — brak syntezy. Represor utworzony za pośrednictwem genu regulatora blokuje operator, uniemożliwiając syntezę mRNA w obszarze całego operonu. *b* — pojawia się induktor, który wiąże represor odblokowując operator. Na obszarze całego operonu tworzy się mRNA, który przechodząc do plazmy w obecności ribosomów i tRNA powoduje syntezę enzymów *a*, *b*, *c*. Enzymy odbudowują drobinę induktora. Po wyczerpaniu się drobin induktora represor ponownie blokuje operator i cały układ powraca do sytuacji przedstawionej w części *a* schematu

Schemat na rys. 3 dotyczy regulacji syntezy enzymów katabolicznych. Analogicznie można by przedstawić proces regulacyjny przy syntezie enzymów anabolicznych, wydaje się to jednak zbędne wobec załączenia w tekście opisu różnic w mechanizmie tych dwóch procesów.

Przytoczony schemat przyjmuje, że regulacja powstawania enzymów odbywa się przez uczynnianie lub blokowanie możliwości tworzenia odpowiedniej drobiny mRNA w danym operonie. Uzyskane wyniki doświadczeń nad mutantami można jednak również tłumaczyć inaczej (2, 17). Ta druga możliwość zakłada, że mRNA jest tworzony stale, blokowana jest natomiast możliwość jego odczytywania przez rybosomy. W przypadku takim produkt genu regulatora łączyłby się z operatorem nie w DNA lecz w nici mRNA. Zablokowanie jednego końca cząsteczki mRNA jest wystarczające do unieczynnienia syntezy, bowiem jak wykazały badania (2), „odczytywanie” informacji zawartej w drobinie mRNA odbywa się jednokierunkowo. Dotychczasowe wyniki badań nie rozstrzygnęły na razie w sposób przekonywający, który z tych wariantów regulacji istotnie ma miejsce w komórce — pierwszy czy drugi, a być może oba — różnie dla różnych przypadków. Zdaniem Monoda (17) bardziej prawdopodobna jest hipoteza pierwsza (przedstawiona schematycznie na rys. 3).

Niezależnie od regulacji produkcji enzymów przez blokadę i uczynnianie operatora, badania Amesa i Hartmana (1) wykazały, że istnieje również możliwość takiej regulacji przy samym odczytywaniu informacji zawartej w mRNA. Prowadzone przez tych autorów doświadczenia nad mutantami bakterii niezdolnymi do syntezy histydyny wykazały występowanie tak zwanych mutacji biegunowych (polarnych). Polegają one na tym, że niezdolności bakterii do syntezy tego związku, wywołanej np. mutacją 4 genu w operonie, towarzyszy zmniejszona produkcja enzymów uwarunkowanych genami leżącymi za zmutowanym locus. Różnicę między mutacją nie polarną i polarną najlepiej wyjaśni następujący prosty schemat, w którym obecność enzymu w normalnej ilości oznaczamy plusem (+), brak enzymu minusem (—), a obecność enzymu w ograniczonej ilości znakiem ∞ :

	Kolejność genów w operonie						
	1	2	3	4	5	6	7
Osobniki normalne	+	+	+	+	+	+	+
Mutacja niepolarna 4. genu	+	+	+	—	+	+	+
Mutacja polarna 4. genu	+	+	+	—	∞	∞	∞

Zjawisko ograniczenia syntezy enzymów, których geny leżą za zmutowanym locus w operonie, można tłumaczyć następująco: utworzona dla całego operonu informacyjna nić mRNA jest odczytywana w całości przez przesuwające się po niej rybosomy od początku do końca. Zmutowany locus może stanowić przeszkodę do dalszego przesuwania się rybosomów i jedynie niektórym z nich udaje się ją pokonać i przejść do końca nici, syntetyzując wszystkie enzymy. Rybosomy, które na przeszkodzie odpadają — a musiałoby być ich większość — prowadzą syntezę tylko tych enzymów, których informacja budowy zawarta jest na początku nici

mRNA, przed zmutowanym locus. Można byłoby to porównać — używając bardzo uproszczonego schematu — do dwóch kół zębatach, z których jedno utraciło jeden tryb. Obracanie kół do uszkodzonego miejsca przebiega normalnie, ale napotykając na wyłom koło napędzane zatrzymuje się, chociaż czasami udaje się przeszkodę pokonać. Taką przeszkodą w nici mRNA może być zmieniona jedna zasada w określonym triplecie. Powstały w ten sposób nowy triplet może być bezsensowny, to znaczy może nie odpowiadać żadnemu aminokwasowi i w takim przypadku nie istnieją drobiny przenośnika tRNA, które odpowiadałyby takiemu tripletowi. Mogą to być jednak również triplety sensowne, ale rzadko „używane”, dla których liczba odpowiednich drobin tRNA jest stosunkowo bardzo mała. W takim przypadku liczba rybosomów, które przeszłyby przez całą długość nici mRNA, byłaby determinowana częstością występowania cząsteczek tRNA odpowiadających temu rzadkiemu tripletowi. Jeżeli bowiem częstotliwość poszczególnych drobin tRNA nie jest zawsze wystarczająca do „wysycenia” nimi komplementarnych tripletów na mRNA, to te „deficytowe” cząsteczki staną się czynnikiem regulującym rozmiary syntezy.

Należy tu wspomnieć, że kolejność ułożenia informacji genetycznej w operonie — liczona od genu operatora — jedynie w rzadkich przypadkach odpowiada kolejności etapów określonej reakcji. Z drugiej strony wiadomo, że aktywność poszczególnych enzymów nie jest jednakowa. Gdyby w każdym przypadku rybosomy przechodziły przez całą długość nici mRNA, to liczba cząsteczek wszystkich enzymów zakodowanych w tej nici byłaby sobie równa, co wobec różnej ich aktywności wcale nie byłoby rzeczą potrzebną. Badania Amesa i Hartmana (1) zdają się wskazywać, że kolejność genów w operonie zależy od aktywności enzymów, które są przez te geny warunkowane. Geny determinujące powstanie enzymów o słabszej aktywności są położone bliżej, aktywne dalej od początku nici mRNA. „Deficytowe” drobiny tRNA powodują, że odczytywanie informacji zawartej w nici mRNA staje się stopniowo coraz trudniejsze i o wiele mniej rybosomów kończy syntezę enzymów na ostatnim triplecie mRNA, aniżeli zaczyna. To powoduje, że liczba drobin poszczególnych enzymów jest zróżnicowana, stosownie do potrzeb wynikających z ich aktywności.

Badania Zabina (wg 2) nad operonem szlaku galaktozy zdają się potwierdzać te założenia. Autor ten stwierdził mianowicie, że przeciętnie na 25 moli β -galaktozydazy przypada tylko 1 mol innego enzymu z tego łańcucha reakcji — tiogalaktozydo transacetylazy. Gen warunkujący powstanie pierwszego enzymu zlokalizowany jest bezpośrednio za operatorem. Tak więc zdaje się nie ulegać wątpliwości, że obok regulacji syntezy enzymów w oparciu o blokowanie i uczynnianie operatora na poziomie

DNA, lub może również RNA, dodatkowa regulacja występuje w odczytywaniu informacji mRNA przez rybosomy, przy czym rolę regulującą spełnia tutaj ograniczona liczba drobin tRNA o tak zwanych „rzadkich” tripletach. Logicznie można by przypuszczać, że nierównomierna liczba drobin przenośnika tRNA wynika z kolei z działania nie poznanego dotychczas mechanizmu regulującego rozmiary syntezy tych związków.

Czy położenie genów warunkujących powstanie enzymów o wyraźnie ząębającym się działaniu w jednym operonie jest powszechną regułą, trudno jest dzisiaj odpowiedzieć. Obok poznanych układów operonowych znane są również przypadki, kiedy geny odpowiedzialne za powstanie określonych enzymów współdziałających w jakiejś reakcji rozkładu lub syntezy nie są zlokalizowane w swoim bezpośrednim sąsiedztwie, lecz „rozrzucone” w całym genomie. Zjawisko takie stwierdzono głównie u grzybów. Tak na przykład Hawthorne i Mortimer (wg 9) zbadali, że geny warunkujące poszczególne etapy syntezy histydyny u drożdży są rozproszone. Do podobnych wniosków doszli, badając zdolności syntezy tego związku u *Neurospora crassa*, Weber i Case (wg 9). Bliższe jednak badania Finka (9) nad syntezą histydyny u drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) wykazały, że i tu można odkryć pewne układy operonowe. Badania tego autora nad regionem genetycznym określanym jako hi-4 wykazały, że odpowiedzialny on jest za trzy etapy syntezy histydyny, mianowicie — w kolejności rozmieszczenia informacji genetycznej — za trzeci, drugi oraz ostatni.

Wyniki tych badań nie oznaczają oczywiście, że układy operonowe informacji genetycznej są powszechną regułą u wszystkich organizmów. Część genów występuje na pewno w stanie rozproszonym w całym genomie i wiązać się to może z ich pleiotropowym działaniem. Regulacja aktywności pojedynczo zlokalizowanych genów nie została dotychczas poznana, ale sądzić należy, że może ona również odbywać się na podobnych zasadach jak poprzednio omówione. Nie wykluczone są oczywiście również inne mechanizmy, których zasad działania dotąd jeszcze nie znamy.

Proces genetycznego sterowania syntezą enzymów został zbadany na mikroorganizmach. Powstaje stąd w pełni uzasadniona wątpliwość, w jakiej mierze te doniosłe odkrycia można przenieść na świat organizmów wielokomórkowych oraz czy ma to jakiś związek z dyskutowanym procesem ontogenezy. W dużej różnorodności świata ożywionego ma wprowadzić każdy gatunek sobie tylko swoiste cechy i właściwości zarówno natury morfologicznej jak i biochemicznej, tym niemniej jednak wszystkie je łączy zasadniczo podobny przebieg podstawowych procesów biochemicznych. Przykładem może służyć proces spalania cukrów, czy też synteza wielu podstawowych związków organicznych. Bliższym przykładem

będzie stosunek w komórkach zwierząt wyższych adeniny do tyminy i gwaniny do cytozyny, wskazujący podobnie jak u bakterii na komplementarność tych związków. Te i szereg innych podobieństw wskazują, że u podstaw życia leżą te same podstawowe procesy niezależnie od zróżnicowanych ewolucyjnie form, w których są one realizowane. To z kolei daje podstawę do uzasadnionego poglądu, że odkryte na mikroorganizmach sposoby przekazywania informacji genetycznej mają charakter powszechny, choć na pewno w szczegółach nie zawsze identyczny.

W oparciu o poznane procesy regulacji syntezy enzymów u bakterii zrodził się pogląd, że mechanizmy te nie są wyłącznym przywilejem mikroorganizmów, lecz że w podobnej postaci działają one również u organizmów wyższych. Stwierdzono na przykład, że etap w spalaniu cukrów zwany reakcją Embdena Meyerhofa, w której bierze udział 5 enzymów, nie tylko identycznie przebiega u wszystkich badanych organizmów od drożdży do ssaków, ale co więcej — ilościowy stosunek wzajemny poszczególnych enzymów jest również stały dla różnych organizmów (15). To daje podstawy do przypuszczenia, że regulacja ich syntezy na poziomie molekularnym ma podobny, jeżeli nie identyczny przebieg u różnych organizmów.

Ciekawych danych z dziedziny genetyki i rozwoju dostarczają badania chromosomów olbrzymich ze ślinianek larw niektórych muchówek. Chromosomy te w niektórych odcinkach wykazują charakterystyczne nabrzmienia nazywane pierścieniami Balbianiego od nazwiska ich odkrywcy, lub z angielska „puffs”. Badania Beermanna (wg 4) wykazały, że chromosomy pochodzące z różnych faz rozwojowych larwy *Chironomus tentans* mają nabrzmienia zlokalizowane w różnych miejscach. Nasunęło to przypuszczenie, że istnieje związek między powstawaniem nabrzmienia a aktywnością genów tam zlokalizowanych. Przypuszczenia te można uznać za potwierdzone przez doświadczenia nad krzyżówką dwóch różnych form *Chironomus*, które różniły się między sobą obecnością lub brakiem granulek w grupie komórek śliniankowych. U formy, u której granulki występują, stwierdzono obecność dodatkowego „puffu”, którego nie obserwowano u formy przeciwstawnej. U mieszańców stwierdzono niepełną koniugację obu homologów, a w występującym wskutek tego rozwidleniu zaobserwowano nabrzmienie tylko na jednej z odnóg i zgodnie z oczekiwaniem o połowę mniejszą liczbę granulek. Przekonywającym dowodem, że nabrzmienie chromosomu jest istotnie miejscem zaktywowanego genu, jest wielokrotnie potwierdzone metodą autoradiografii, że „puff” jest miejscem bardzo aktywnej syntezy RNA, a zatem logicznie należy sadzić — przekazywaniem informacji genetycznej do realizacji w plazmie.

Te oraz wiele innych — nieraz bardzo skomplikowanych — doświadczeń wskazują, że posiadanie przez wszystkie komórki ustroju pełnego

kompletu informacji genetycznej nie oznacza wcale jednakowego wykorzystania przez nie potencjalnych możliwości metabolicznych. Nieekwiwalentny podział plazmy już w trakcie bruzdkowania jaja stwarza niejednakowe środowisko wewnętrzne w poszczególnych komórkach lub grupach komórek, a to z kolei powoduje uczynnienie różnych genów w różnych komórkach. Należy przypuszczać, że tak pojęty rozwój ma charakter łańcuchowy, to znaczy produkty działania jednego genu lub operonu są z kolei induktorami uczynniającymi następne operony lub pojedyncze geny, albo też represorami blokującymi działanie innych.

Doświadczenia, które potwierdziłyby to przypuszczenie przeprowadzili Clever i Karlson (wg 12) oraz Karlson (12). Hormon występujący u owadów — ecdyson — wywołuje przepoczwarczenie się larw. Pojawia się on w określonym stadium rozwoju larwalnego i wyzwala szereg procesów prowadzących do przekształcenia larwy w poczwarkę. Wspomniani autorzy wykazali, że proces przepoczwarczenia można przyspieszyć wstrzykując larwom ecdyson. Jednoczesne badania chromosomów ślinianek wykazały, że wstrzyknięcie tego hormonu zmienia w krótkim czasie układy nabrzmiń na chromosomach. Pojawiają się nowe „puffy” zmieniające się w czasie, co wskazuje na łańcuchowy system sprzężeń tego procesu. Dokładny mechanizm uczynniania i blokowania potrzebnych w rozwoju genów, działających na zasadzie sprzężenia zwrotnego, nie został jeszcze u organizmów wyższych poznany. Stąd nie można oczywiście twierdzić, że działanie jego jest identyczne z tym, jakie zaobserwowano u bakterii, organizmów bądź co bądź znacznie różniących się swoją budową i funkcjami w porównaniu z ustrojem wielokomórkowym. Z przytoczonych jednak wstępnych wyników badań można logicznie wnosić, że taki mechanizm regulacyjny na pewno u nich istnieje. To z kolei daje podstawę do poszukiwania przyczyn różnicowania się komórek i tkanek w ontogenezie wielokomórkowców w oparciu o procesy regulacyjne metabolizmu na poziomie molekularnym. O skali zainteresowania tym zagadnieniem mogą świadczyć liczne sympozja poświęcone genetycznym procesom różnicowania. Za punkt wyjścia do rozważań tego problemu brane są mechanizmy regulacji syntezy enzymów u bakterii (6, 18), w świetle czego nowe odkrycia z dziedziny fizjologii rozwoju uzyskują nową interpretację. Wszystko wskazuje, że nauka o rozwoju stoi w przededniu nowych rewelacyjnych odkryć.

Prof. Delbrück pisał dowcipnie o wynikach prac Watson i Cricka: „...że byłoby wprost nie do uwierzenia, gdyby natura nie zechciała zrobić żadnego użytku z cudownych odkryć panów Watsona i Cricka”. Miejmy nadzieję, że i dalsze odkrycia w tej dziedzinie — przede wszystkim inicjatorów badań nad zagadnieniem procesów regulacji na

poziomie molekularnym Monoda i Jacoba — zostaną przez ...naturę podobnie przychylnie potraktowane.

LITERATURA

1. Ames B. N. and R. E. Hartman. 1963. The Histidine Operon. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28: 349—356.
2. Ames B. N. and R. G. Martin. 1964. Annual Rev. Biochem. 33: 235—258.
3. Brachet J. 1964. Biochemia rozwoju. PWN. Warszawa.
4. Bresch C. 1964. Klassische und Molekulare Genetik. Springer Verlag. Berlin, Göttingen, Heidelberg.
5. Butler J. A. 1965. Nature 207; 5001: 1041.
6. Cantoni G. L. and A. Monroy. 1966. Science 151; 3710: 596—597.
7. Crick F. H. C. 1963. Angew. Chemie 75.
8. Crick F. H. C., L. Barnett, S. Brenner and J. R. Watts-Tobin. 1961. Nature 192; 1227.
9. Fink G. R. 1966. Genetics 53: 445—459.
10. Jacob F. and J. Monod. 1961. J. Mol. Biol. 3: 318—356.
11. Jacob F. and J. Monod. 1964. Regulacija aktiwnosti genow. Regulatornyje Miechanizmy Kletki. Wyd. Mir. Moskwa.
12. Karlson P. 1966. Naturwissenschaften 53: 445—453.
13. Kaufman L. 1965. Zesz. Nauk. U. J. CXVI z. 10.: 81—90.
14. Kraczkiewicz Z. 1950. Zoologica Poloniae, 5: 73—117.
15. Mier P. D. and D. W. K. Cotton. 1966. Nature, 209; 5027: 1022—1023.
16. Monod J. i F. Jacob. 1964. Obszczije wywody: Teleonomiczeskije Miechanizmy w Processach Kletocznowo Obmiena, Rosta i Differencirowki. Regulatornyje Miechanizmy Kletki. Wyd. Mir. Moskwa.
17. Monod J. 1966. Endocrinology, 78: 412—425.
18. Smith H. H. 1965. Science, 147; 3705: 1847—1849.
19. Ulrich H. 1934. Rev. Suisse Zool., 41.
20. White M. J. D. 1946. J. Morph., 79: 323—370.