

LA REGULACIÓ DEL FUNCIONAMENT DELS GENS

per ANTONI PREVOSTI

Les propietats de les cèl·lules depenen del tipus de molècules que sintetitzen, per tal com aquestes són la base de llurs característiques funcionals i estructurals. La genètica ha demostrat que els tipus de molècules propis de cada classe de cèl·lula són el resultat del funcionament de gens que tenen una informació específica per a cada classe de molècules. Per tant, per aquesta via, els gens són els reguladors bàsics de les propietats cel·lulars. Aquest fet ha estat precisat a poc a poc. Primer hom demostrà que l'herència és portada gairebé exclusivament pels cromosomes i, per tant, allò que hi ha de continuïtat en les característiques dels éssers vius és transmès per mitjà dels gens. En els anys quaranta hom comprovà que els gens, utilitzant els enzims com a intermediaris, són els reguladors primers del metabolisme cel·lular. Finalment en els darrers vint anys han estat descobertes les característiques moleculars del material genètic i del seu funcionament bàsic.

Des del moment que nasqué aquesta idea sobre el significat fonamental dels gens com a reguladors de les propietats cel·lulars, sorgí el problema de la diferenciació cel·lular. Les cèl·lules dels organismes pluricel·lulars tenen generalment totes la mateixa dotació de gens. No obstant això, llurs propietats poden ésser molt diferents. Posem per cas, el metabolisme, l'estructura, les classes i proporcions de molècules, són enormement diferents en una cèl·lula nerviosa, muscular, epitelial, etc., d'un animal superior. Adhuc en els organismes unicel·lulars trobem diferències considerables, en diferents fases del cicle biològic, en relació amb l'ambient en què es troben i depenent d'altres factors, sense que aquestes diferències vagin acompanyades de diferenciació en el contingut de material genètic. ¿Com, doncs, cèl·lules que tenen idèntica dotació de gens, tenen propietats tan diverses? La contestació lògica a aquesta pregunta és que la presència d'un gen en una cèl·lula no implica que aquest funcioni sempre igualment. En cada estat de diferenciació cel·lular alguns gens poden anar funcionant, dirigint la síntesi de les molècules per a les quals porten

informació específica, altres gens poden no funcionar i els que funcionen poden fer-ho a ritmes diferents. Aquesta contestació és clara i sembla evident; però, com, amb quin mecanisme es produeix, això? Aquest és un problema clàssic a la genètica, respecte al qual tenim contestacions molt minses.

Només als microorganismes coneixem alguns mecanismes, comprovats, que expliquen estats alternatius del funcionament dels gens. En aquesta reunió tractarem de presentar qüestions que es trobin a la frontera dels coneixements biològics actuals. Per això intentarem de discutir esquemàticament aquests mecanismes demostrats en els sistemes biològics procariotes, tractant de donar una base per a discutir el problema de la diferenciació cel·lular en els organismes pluricel·lulars eucariotes. Ja fa anys que hom diu que contestar a aquest problema és un dels principals objectius immediats de la Biologia. Assolit ràpidament, en els últims anys, el coneixement dels mecanismes del funcionament primari dels gens, sembla que el pas següent hagi d'ésser l'anàlisi dels mecanismes que regulen el funcionament dels gens i, per tant, fan possible la diferenciació cel·lular. No obstant això, passa el temps i, en especial pel que fa a la diferenciació cel·lular en el desenvolupament embrionari dels eucariotes pluricel·lulars, continuem sabent ben poca cosa.

El model de regulació del funcionament dels gens més fermament demostrat és el de l'operó en els procariotes. Recordem que aquest és un sistema de regulació negativa, per tal com una proteïna (la substància repressora), per a la qual té informació un gen dit «regulador», pot bloquejar o no la formació d'ARN missatger per un o uns gens estructurals específics (amb informació per proteïnes de funció enzimàtica). La substància repressora s'uneix al segment d'ADN format pels gens estructurals que regula, en una regió diferenciada a l'extrem d'aquests gens, regió anomenada «operador» (vegeu la fig. 1). Al costat de l'operador, oposat al

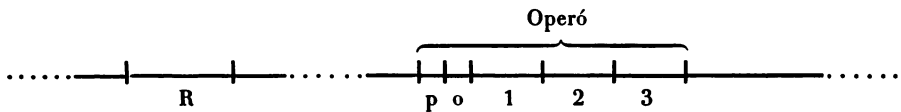


FIG. 1. — La línia representa un segment del cromosoma d'un bacteri, que conté un operó i el gen que regula el seu funcionament. R = gen regulador, p = regió promotora, o = operador, 1, 2 i 3 = gens estructurals

qual són situats els gens estructurals, hi ha una altra regió diferenciada, la regió promotora o «promotor», que constitueix un senyal per a la iniciació de la transcripció. En el promotor se situa l'ARN-polimerasa, enzim que va dirigint, en recórrer des d'aquest extrem l'operó, la síntesi

d'un ARN missatger continu per tots els gens de l'operó. Quan el repressor se situa sobre l'operador resta bloquejat el pas de l'enzim i, amb això, també la síntesi del missatger.

Aquest conjunt de promotor, operador i un o diversos gens estructurals, que tenen informació per proteïnes enzimàtiques que funcionen en la mateixa via metabòlica, constitueix una unitat de transcripció coordinada, la qual ha estat anomenada «operó» per Jacob i Monod.

La unió del repressor amb l'operador, en el cas dels operons dits induïbles, com és l'operó lac d'*Escherichia coli*, es realitza quan al bacteri no hi ha substància inductora. Aquesta, en el cas de l'operó lac és la lactosa, que s'uneix a la substància repressora, i canvia aleshores la seva conformació, que deixa d'ésser adequada per a unir-se a l'operador. Com que els enzims de l'operó lac tenen per funció d'utilitzar la lactosa com a font d'energia per al bacteri, la inducció de la formació d'aquests enzims per la lactosa és clarament un fenomen adaptatiu. Dóna una flexibilitat adaptativa al metabolisme bacterià.

En els operons repressibles la substància repressora, controlada pel gen regulador, per ella sola no té la conformació adequada per a unir-se a l'operador. Necessita unir-se a una altra molècula, el «corepressor», per a adquirir aquesta conformació. El corepressor sol ésser un metabòlit essencial de la bactèria, com un aminoàcid, posem la histidina. Així, si al medi de cultiu dels bacteris hi ha histidina, aquesta, unint-se amb el repressor de l'operó de la histidina, fa que sigui bloquejada la formació de l'ARN missatger pels gens que regeixen la síntesi dels enzims que intervenen en la biosíntesi de la histidina. Igualment succeeix quan, no havent-hi histidina al medi de cultiu, el bacteri n'ha sintetitzada sobrerament respecte a les seves necessitats per a la síntesi proteica. Per contra, quan al bacteri no hi ha histidina, el repressor no pot bloquejar i resten lliures els gens que porten la informació per als enzims necessaris per a sintetitzar aquest aminoàcid. També en aquest cas el funcionament de l'operó és clarament adaptatiu. Regula la biosíntesi de metabòlits cel·lulars (com la histidina) segons les necessitats cel·lulars.

L'altre model de regulació del funcionament dels gens que volem presentar, és un model de regulació positiva. Es tracta en aquest cas d'un model que explica la seqüència ordenada i determinada del procés de la morfogènesi dels bacteriòfags T. En aquest procés, com és sabut, van entrant en funcionament successiu diversos grups de gens, que porten informació per a les proteïnes estructurals del bacteriòfag. La successió en què són elaborades aquestes proteïnes, i per tant, en què funcionen els gens que les controlen, és sempre la mateixa, amb la qual cosa encaixen aquestes proteïnes les unes amb les altres, segons un procés ordenat que comença per les del «cap» i acaba per les dels filaments de la «cua».

Han estat descoberts recentment uns factors dits σ , que són proteïnes que s'uneixen a l'ARN polimerasa, encarregada de la transcripció del missatge genètic, o sigui de la formació del missatger. Quan l'ADN d'un bacteriòfag del grup T entra dins *E. coli*, l'ARN polimerasa del bacteri té una especificitat per a reconèixer els punts d'iniciació de la transcripció (regions promotores) només d'alguns gens del bacteriòfag. Aquesta especificitat depèn d'un factor σ que conté l'ARN polimerasa bacteriana. Ha estat comprovat que, sense aquest factor, l'ARN polimerasa del bacteri no té cap especificitat i transcriu qualsevol gen del bacteriòfag, fins i tot les dues cadenes de l'ADN de cada gen.

Entre els gens transcrits inicialment a causa de l'especificitat del factor σ bacterià, n'hi ha un que té la informació per a l'elaboració d'un segon factor σ . Aquest, un cop format, substitueix el factor σ inicial de l'ARN polimerasa, amb la qual cosa canvia l'especificitat d'aquest enzim, i reconeix les regions promotores del segon grup de gens que entra en joc a la morfogènesi del bacteriòfag. Sembla probable que entre aquest segon grup de gens n'hi hagi un amb informació per a la síntesi d'un tercer factor σ , que amb l'ARN polimerasa serveix per a iniciar la transcripció del tercer grup de gens del bacteriòfag. Així successivament, per l'acció de diversos factors σ poden anar entrant en joc, en seqüència ordenada i definida, tots els grups de gens del bacteriòfag.

Amb el descobriment dels factors σ veiem que la regulació del funcionament dels gens pot ésser feta per variacions a l'ARN polimerasa. En el cas concret conegut de la morfogènesi dels virus, la seqüència definida d'elaboració dels factors σ ens mostra com la iniciació d'una via de diferenciació pot conduir a una determinació de la via en el futur. Tal com ens apareix, almenys de moment, en els virus, aquest procés és rígid i poc flexible, puix que el primer pas sembla conduir indefectiblement al segon, aquest al tercer i així successivament. La falta de flexibilitat sembla ésser la característica d'alguns processos de diferenciació durant el desenvolupament embrionari. La determinació a què arriben moltes cèl·lules embrionàries a partir d'uns certs moments del desenvolupament, freqüentment molt abans que la seva morfologia i la seva fisiologia demostrin la via que han iniciat, presenta una certa semblança, almenys exterior, amb el procés determinat pels factors σ en els bacteriòfags.

La falta de flexibilitat, des d'un cert punt d'un procés del desenvolupament, pot tenir uns certs avantatges. Comporta una major seguretat d'arribar a la meta convenient. En aquest sentit, un mecanisme com el de l'operó no sembla que sigui l'adequat per a controlar molts processos de regulació del funcionament dels gens en els organismes superiors durant el desenvolupament. Les diferències entre les cèl·lules dels diferents teixits dels organismes pluricel·lulars són més estables que els estats alter-

natiu del funcionament dels operons bacterians, amb ARN missatger de vida molt curta. No obstant això, sembla una explicació massa senzilla que la determinació de les cèl·lules embrionàries depengui d'un procés idèntic al que controla la morfogènesi dels virus. Pot ésser, però, que a la base dels dos processos hi hagi elements semblants.

Podem pensar que mecanismes de regulació basats en inducció i repressió siguin l'inici d'alguns processos morfogenètics en els quals hom demostra influència de factors externs a la cèl·lula que es diferencia, com en el cas de la inducció embrionària pels organitzadors de Spemann. Aquests podrien actuar com a inductors del funcionament de gens amb informació per als primers factors σ iniciadors de vies determinades de diferenciació. Uns altres estats de funcionament de les cèl·lules dels organismes superiors, com els induïts per moltes accions hormonals (està comprovat que les hormones poden determinar la posada en funcionament d'uns certs gens), poden ajustar-se també més fàcilment al model de l'operó.

I aquí vull acabar. M'he limitat a parlar dels mecanismes de regulació del funcionament dels gens que coneixem en els procariotes. En els eucariotes hi ha dades interessants per discutir sobre el significat dels «inflaments» en els cromosomes gegants, sobre els experiments de trasplantament de nuclis, sobre l'acció concreta de les hormones sobre la síntesi proteica d'unes certes cèl·lules, sobre el possible paper de les histones com a reguladors del funcionament dels gens, sobre la possible existència de gens reguladors a *Drosophila* o fins i tot a l'home. Però tot això no serveix encara per a formar un model coherent de la regulació del funcionament dels gens en els organismes eucariotes. Ho deixo, per tant, perquè sigui tractat, quan a algú li sembli interessant de fer-ho, a la discussió que és el principal objecte d'aquesta reunió. Tractar sistemàticament de tots aquests punts seria massa llarg i no ens restaria temps per a discutir-los. Amb el que he dit em sembla que ja he donat una base per a la discussió, que és el que es tractava d'assolir.

DISCUSSIÓ

ROSELL

Si el bacteriòfag porta el factor σ , com és que *Escherichia coli* està preparat per a rebre'l?

PREVOSTI

Sembla que deu tractar-se d'una adaptació del bacteriòfag al seu hoste bacterià.

MODELELL

El doctor Prevosti ha parlat d'un cert control a nivell de missatger. Un exemple a nivell de síntesi de proteïnes mostrat en un treball recent que fa referència a una síntesi *in vitro* diu que al fag λ , constituït únicament per ARN, una molècula molt petita de pm $1,1 \times 10^6$ porta informació per a tres o quatre proteïnes. Aquestes proteïnes tenen les particularitats següents: A és una proteïna específica per a la reproducció del fag, C està encarregada del recobriment del fag i P és una polimerasa específica en la formació de l'ARN.

En el cas d'*E. coli*, en la traducció *in vitro*, els nivells de producció de les tres proteïnes en el ribosoma són: A, 5; C, 100; P, 10. Si es tracta de ribosomes de *Bacillus stearothermophilus* els diferents nivells són respectivament: 5, 5, 5. Es tracta d'un fag específic d'*E. coli* i pot demostrar que un gen té una eficàcia de traducció més gran o més petita. El tipus de ribosoma influeix en l'eficiència del gen, cosa que pot ésser deguda a la seqüència o a l'estructura ternària del missatger.

ROSELL

És un fag específic d'*E. coli*? La resta pot ésser una maquinària artificial.

MODELELL

Demuestra l'existència d'unes certes diferències entre els dos ribosomes que poden fer que un gen tingui més o menys eficiència.

ROSELL

Resulta que la resta és un artefacte.

VINAS

Podem pensar que aquí jugui un sistema com el que ha indicat el doctor Prevosti. Però cal tenir en compte que aquests ribosomes no estan

purificats sinó que es troben en un brou en què existeixen impureses. Pot ésser que les diferents peculiaritats no siguin del fag, sinó dels ribosomes que a través de la purificació sofreixin algun canvi.

MODELELL

Hom creu que tot això és així perquè els ribosomes poden tenir adscrita una altra proteïna.

SUBIRANA

Sembla que implica un control a nivell de traducció i no de transcripció.

PREVOSTI

És evident que els ribosomes tenen importància per a la transcripció, però no ho veig tan clar per a la regulació dintre un mateix organisme. Les diferències en els ribosomes poden ésser degudes a diferències en els gens que porten informació per a llurs proteïnes i llur ARN. En aquest cas aquests gens serien els veritables reguladors.

SUBIRANA

O que els ribosomes actuessin sempre igual, o si hi ha d'haver alguna regulació ha de venir de l'ADN, la qual cosa representa un control indirecte del ribosoma.

MODELELL

No és un control directe sinó indirecte o secundari.

ROSELL

No es fa una regulació a nivell individual; en un fag sí, però no en la cèl·lula.

PARÉS

Per a l'aplicació del model repressor en els organismes superiors és bàsic que el recanvi de missatges sigui ràpid —*turnover* actiu—. ¿Hi ha

informació, que desconec, sobre si aquest recanvi és ràpid en els organismes superiors?

PREVOSTI

Hi ha casos que sí i altres que no.

PARÉS

Aquest mecanisme sols és regulador en un *turnover* breu.

PREVOSTI

Es tracta d'un mecanisme molt flexible que pot ésser inadequat per als organismes superiors.

SUBIRANA

Hi ha ribonucleics estables, com és el cas de l'ou no fecundat, que es desemmascaren en el procés de la fecundació i aleshores són capaços de transmetre informació.

PARÉS

Són molt inestables en els organismes superiors?

SUBIRANA

El model de Jacob i Monod no ha pogut ésser demostrat de moment en els organismes superiors, encara que són possibles variants d'aquests mecanismes amb probable intervenció de sistemes hormonals.

VINAS

La diferenciació cel·lular és molt ràpida en els organismes superiors; posem per cas el que succeeix en la medulla òssia. L'ARN missatger té una vida mitjana molt curta. Per contra, al final del desenvolupament la situació és molt més estable.

PARÉS

Tenia la idea que en un cultiu de teixit hi havia diferenciació.

SUBIRANA

Sembla que el model de Jacob i Monod pot ésser aplicat als organismes superiors sense gaires modificacions. No obstant això, cal recordar que el nucli de llurs cèl·lules és molt més complex que en els procarïotes. Una de les diferències més característiques és deguda a l'existència de proteïnes bàsiques (histones) associades amb l'ADN. Creiem que aquestes proteïnes poden tenir la funció d'amplificar la informació continguda en la seqüència de bases de l'ADN. El complex ADN-histones pot prendre una conformació en l'espai que depengui de la seqüència de bases de l'ADN. Aleshores els diferents efectors poden reconèixer les diferents zones de la cromatina, activant o reprimint els gens corresponents segons l'estat de diferenciació i fisiològic de la cèl·lula. D'acord amb aquest model, les histones donarien a l'ADN una versatilitat més gran en llurs interaccions, i permetrien una gamma més àmplia d'interaccions que no pas la permesa per una interacció directa entre l'ADN i els seus efectors. Al mateix temps, les histones, per a poder actuar com a amplificadors, estan subjectes a grans restriccions estructurals, per tal com han d'interactuar específicament amb l'ADN i els seus efectors, la qual cosa podria explicar llur gran estabilitat evolutiva. En tot cas és evident que aquestes proteïnes han sobreviscut a l'evolució sense canviar perquè llur paper és important i delicat.

BAGUÑA

Voldria fer dos comentaris al que ha dit el doctor Prevosti sobre l'aplicació del mecanisme de control positiu d'ARN polimerasa al desenvolupament en animals superiors. Ja que el nombre mitjà de tipus cel·lulars en un organisme pluricel·lular és aproximadament de 50 (això sense comptar els subtipus possibles, d'altra part també estabilitzats) on cadascun prové de la diferenciació peculiar a partir de soques de cèl·lules indiferenciades o embrionàries, si acceptem que per a cada pas en llur diferenciació és imprescindible l'existència d'un factor de tipus proteic (α , β , γ ... σ) que alteri l'estructura d'ARN polimerasa en forma que per a cadascun sigui activada la transcripció de determinades bateries de gens, crec que aquest mecanisme és bastant improbable per dues raons: 1) de moment, només coneixem l'existència d'un tipus d'ARN polimerasa en animals superiors; 2) en aquest cas, i a causa del nombre de tipus cel·lulars i dels successius passos en cadascuna de les diferenciacions, aquesta molècula hauria de tenir un nombre equivalent de subunitats per a ésser alterada convenientment segons l'etapa, fet que no sembla massa plausible.

En segon lloc, aquest mecanisme de diferenciació, ¿no és més factible d'explicar-lo per mitjà del concepte de jerarquització gènica resultant d'una llarga evolució, atès que implica l'existència de gens primaris o sensors (superreguladors) que reaccionin enfront dels inductors específics activant aleshores tot un conjunt nombrós de gens secundaris en etapes successives en forma coordinada?

El comentari en què el doctor Parés ha expressat els seus dubtes sobre l'existència de mecanismes anàlegs als de Jacob i Monod en animals superiors, no em sembla del tot exacte. En primer lloc, el fet que per a establir mecanismes de regulació ràpida i fina tal com existeixen en bacteris, calgui la presència d'ARN missatgers de vida curta, no invalida que existeixin mecanismes anàlegs de regulació més lenta a través d'existència d'ARN missatgers de vida bastant més llarga. Si bé és cert que no hi ha ARN missatgers de vida curta en eucariotes, l'existència en ells d'ARN de vida més llarga implica que hi pugui haver mecanismes de regulació i control anàlegs als de Jacob i Monod que operin en temps d'acció més prolongats. La raó essencial per tal que això pugui ocórrer és que cal tenir molt en compte que el «microambient» cel·lular és molt més estable que el «microambient» bacterià, puix que en aquell hi ha nombrosos mecanismes homeostàtics que procuren que les variables essencials es mantinguin dins valors estables. D'aquesta manera, els canvis d'adaptabilitat d'una cèhula són força més lents que els d'un bacteri, la qual cosa implica que els mecanismes de regulació puguin operar amb missatgers de vida més llarga, i que siguin formalment anàlegs als demostrats per Jacob i Monod en procariotes.

També voldria expressar al doctor Subirana que no crec que hi hagi incompatibilitat entre la presència d'histones en les cèhules superiors i l'existència en elles de mecanismes de Jacob i Monod, per tal com en una cèhula diferenciada hom pot distingir dues regions gèniques més o menys ben definides: una de «tancada» que codifica per a les proteïnes estructurals i funcionals pròpies dels altres tipus cel·lulars, i una d'«oberta» que codifica per a les proteïnes pròpies de la cèhula. A la primera, no li cal regulació, amb la qual cosa pot estar reprimida sempre per mitjà de proteïnes bàsiques tipus histones. La segona, per contra, ha d'ésser susceptible de regulació, la qual cosa és molt probable que impliqui l'existència de mecanismes fins de regulació (modulació) semblants als de Jacob i Monod.

PREVOSTI

Em sembla encertada l'objecció sobre que sigui únic el mecanisme que serveixi per a explicar-ho tot. Seria un mecanisme extraordinàriament

rígid. Sembla necessari que hi hagi altres mecanismes. Però creure que factors semblants als σ constitueixin un mecanisme que hi intervingui d'alguna manera, no crec que presenti cap dificultat. Podria haver-hi uns reguladors de reguladors, els quals elaborarien substàncies que determinarien que altres gens es posessin en marxa. És una qüestió pensable, però ens manca base experimental.

SUBIRANA

En complicar-se l'organització, per a un organisme superior és un avantatge de disposar d'uns repressors fixos que ho reprimeixin tot menys el que necessita cada cèl·lula. No hi ha incompatibilitat amb les histones.

MODELELL

Com s'explica que les histones ho reprimeixin quasi tot?

SUBIRANA

Pot servir d'explicació el model abans esmentat.

PARÉS

En contestació a Baguñà cal dir que en els bacteris l'ARN missatger dura poc, mentre que en els organismes superiors és molt més estable. Això fa que els processos de parada i desaparició tinguin una certa inèrcia i l'acció resti un xic esbarrada; no seria tan ràpid. Sembla que, junt al mecanisme de Jacob i Monod han de coexistir d'altres mecanismes.

SUBIRANA

Un sistema lent és el dels enzims maternals en l'ou, els quals van desapareixent a mesura que avança el desenvolupament de l'embrió fins que apareixen els enzims propis del nou ésser.

PALAU

Hi ha certs tipus d'histones que poden tenir un paper de moduladors de la regulació i que poden explicar un control general del sistema. D'altra banda hi ha una histona molt rica en lisina que sembla que intervé en els mecanismes de condensació i desespiralització de cromosomes.

Aquest mecanisme pot controlar el mecanisme de reproducció d'ADN. També cal tenir en compte que durant la condensació és impedita la síntesi d'ARN.

ROSELL

Si hi ha poques histones i totes són molt semblants en totes les espècies, és molt difícil de visualitzar les múltiples conformacions per a adaptar-se al gran nombre de gens que existeixen en els organismes superiors encara que aquests estiguin disposats en zones.

SUBIRANA

Això, certament, és una dificultat, però cal tenir en compte que hi ha almenys cinc components en les histones, la qual cosa dóna una gran possibilitat de complexitat. En l'ADN es combinen 4 bases, i en les histones 5 molècules. Cal remarcar que tot això és simplement especulatiu i pot ésser fals. Tanmateix jo crec que les histones desenrotllen quelcom molt important al costat d'ADN.

PREVOSTI

Si la diferenciació depengués d'una diferència estructural en el complex histona-ADN, específica en cada gen, això no explicaria diferents especificitats en les cèl·lules dels diversos teixits. Seria, per tant, difícil d'explicar com les hormones determinen respostes específiques en aquests teixits.

SUBIRANA

La resposta específica pot estar condicionada per les proteïnes que porta la cèl·lula, sensibles a l'acció de cada hormona d'una forma específica en cada teixit.

ROSELL

Com es pot explicar la diferència entre cromosomes gegants i normals?

SUBIRANA

Ho desconec.

DOMINGO

Tinc la impressió que fem un xic de filosofia en el camp de la ciència. Surten constantment milions de coses que tot just estan entrellucades. En el primer Congrés Internacional de Microbiologia fou presentat com novetat el bacteriòfag, cosa que fou ridiculitzada, fent-hi broma. No obstant això, tot el que allí fou dit encara no ha estat suficientment esbossat. Per exemple, no sabem on es generen. Apareixen bacteriòfags disintèrics els quals aleshores transformen el disintèric en un agent de morbositat disminuïda i al mateix temps desapareix el bacteriòfag.