

ESTAT ACTUAL DEL CONEIXEMENT DE L'ESTRUCTURA DEL MATERIAL GENÈTIC

Antoni Prevosti *

Rebut: maig 1984

SUMMARY

Present state of the knowledge of the structure of genetic material

The answers to the question, what is a gene? have been changing since this term was coined by Johannsen. The classical gene was an abstract entity; it was the unit of function, mutation and recombination in the genetic material. This concept was the result of the application of the Mendelian method of genetic analysis until the forties of the present century. From Benzer's dissection of the rII region of the T4 phage there arose an operative concept of gene based on the cis-trans effect. However, with the development of Molecular Genetics, it soon became possible to visualize the gene as a precise material unit, a DNA segment with information for the synthesis of functional molecules, whether protein or RNA. The techniques of recombinant DNA, that give us an exact knowledge of DNA sequences, have shown a greater complexity in genetic information than was previously expected. Overlapping genes, segments of DNA carrying information in both chains, split genes and the possibility of different m-RNA being processed from these genes, make it impossible et present to give a precise definition of gene which corresponds to a real material entity having a general validity. At this moment «gene» is only an operative term useful in genetic analysis. This is a paradox, now that we are on the verge of creating new genes. Also it is becoming apparent that the genome is organized in other units besides the genes, in which the information carried by the genes is integrated. Thus, the new definition of the gene must take into account not only the elements of which the gene is composed but also its relationships to the larger units of which it is an integral part.

EL MENDELISME I EL CONCEPTE DE GEN

Fins als anys 40 el desenvolupament de la Genètica depengué de l'anàlisi formal de la transmissió hereditària de les característiques biològiques. Aquesta anàlisi, l'anàlisi genètica, és basada en el mètode mendelià que consisteix en l'estudi de la descendència obtinguda en encreuar individus d'una mateixa espècie diferents en un o uns pocs caràcters concrets; per exem-

ple, ulls blaus o ulls negres en l'home, llavors llises o rugoses en els pèsols, etc. Esquemàticament, pot dir-se que l'observació de com són aquests caràcters en els individus d'aquesta descendència i de les freqüències en què es presenten, va conduir Mendel a la formulació de les seves lleis i, juntament amb unes poques observacions citològiques, els genètics posteriors, a la teoria cromosòmica de l'herència. Els resultats obtinguts amb el mètode mendelià portaren també a concebre que

* Departament de Genètica. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona. Avgda. Diagonal, 645. 08028 Barcelona.

la transmissió hereditària es produeix per mitjà d'unes unitats discretes, els gens. Aquests foren, durant tot el període mendelià, unes unitats abstractes deduïdes dels resultats obtinguts amb els encreuaments, encara que la teoria cromosòmica de l'herència els situava en els cromosomes i suposava que havien d'ésser constituïts químicament per alguna de les substàncies presents en aquests orgànuls cel·lulars, és a dir, els àcids nucleics i les proteïnes.

Amb el refinament de les tècniques de l'anàlisi genètica, el concepte precís del que són els gens va anar evolucionant. En formular-se la teoria cromosòmica de l'herència, els anys vint, el gen es concep com a unitat hereditària de mutació, de recombinació i de funció. Aquesta concepció va cristallitzar en una imatge, fruit de l'abstracció dels resultats obtinguts amb l'anàlisi genètica i no de l'observació, segons la qual els cromosomes serien com un rosari en què els grans correspondrien als gens. Aquests eren, per tant, unes unitats discretes que tenien cadascuna una funció genètica, és a dir, la facultat de transmetre una propietat determinada de l'organisme. A més es creia que en intercanviar-se amb els cromosomes homòlegs, en el procés de la recombinació, ho feien sempre sencers; els cromosomes es trencaven entre els gens, mai no dintre dels gens. Finalment, també des del punt de vista dels canvis mutacionals es comportaven com a unitats i no eren formats per parts que poguessin mutar amb independència les unes de les altres. Això no obstant, els anys quaranta, observacions realitzades primer a *Drosophila*, però que van culminar amb l'anàlisi realitzada per Benzer en la transmissió del caràcter rII (lisi ràpida de tipus II) en el bacteriòfag T4, demostraren que dins dels gens hi ha recombinació i diferents llocs de mutació. Aleshores, el gen deixà de ser la unitat de recombinació i de mutació, i de les propietats que l'havien definit només conservà la de ser unitat de funció. Els resultats obtinguts per Benzer continuaven essent basats en la tècnica de l'anàlisi genètica pròpia de la genètica formal, encara que adaptada a les característiques biològiques dels bacteriòfags. Per això, encara que dels resultats obtinguts s'indueixen unes unitats hereditàries amb unes propietats diferents de les que se'ls havia atribuït fins aleshores, aquestes unitats continuaven sent tan abstractes com els gens conce-

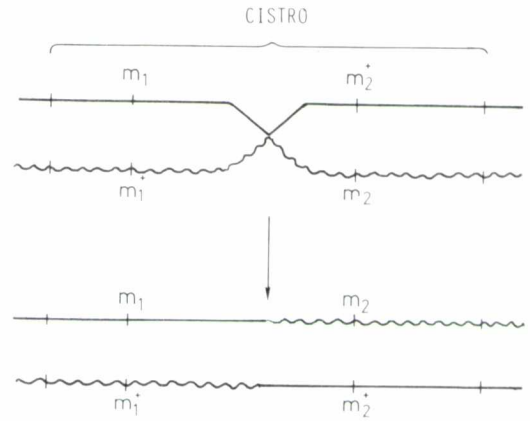


FIG. 1. Recombinació intracistrònica i efecte cis-trans. m_1 i m_2 , mutacions; m_1^+ i m_2^+ , constitucions genètiques normals. A dalt, cistrons homòlegs amb mutacions en posició trans. A baix, cistrons homòlegs amb mutacions en posició cis. Es pot passar de dalt a baix per recombinació.

but quant es va desenvolupar la teoria cromosòmica de l'herència. Benzer va preferir abandonar el concepte de gen i substituir-lo per uns altres tres només operatius, basats en la metodologia que l'havia portat a definir-los, sense pretendre que necessàriament corresponguessin a un coneixement de la realitat de l'estructura del material genètic. Així, formulà el concepte de mutó, la unitat de mutació, el segment més curt del material hereditari que és capaç de mutar independentment; el recó, la unitat de recombinació, el segment més petit del material hereditari que pot recombinar-se; i el cistron, el segment més llarg del material hereditari dins del qual pot presentar-se l'efecte cis-trans.

Tant el mutó com el recó són parts del cistron. Un cistron és una unitat formada per nombrosos llocs de mutació (mutons). També conté nombrosos reconos o sigui unitats que poden recombinar-se; per això els cistrons homòlegs poden intercanviar material, quan en aparellar-se els cromosomes homòlegs ells també ho fan. És a dir, pot presentar-se recombinació genètica intracistrònica. En virtut d'això (fig. 1), si un cistron porta una mutació m_1 i el seu homòleg una de diferent m_2 , aquestes poden recombinar-se originant un cistron amb les dues mutacions m_1 i m_2 i l'altre sense cap. Quan les dues mutacions estan en cada cistron homòleg es diu que estan en posició trans, si estan en el mateix cistron, en posició cis. És lògic que quan estan en

posició trans cap dels dos cistrons no realitzi la seva funció normal, donat que tots dos són afectats per un canvi mutacional. Aleshores la funció normal d'aquest cistró mancarà a l'organisme. En canvi, quan les dues mutacions estan en posició cis i el cistró homòleg no en té cap, aquest realitza la funció normal i l'organisme la presentarà. Aquest fet, que quan dues mutacions estan en posició trans, l'organisme presenti l'efecte mutant mentre que quan estan en posició cis presenti el normal, se'n diu efecte cis-trans. Basant-se en aquest efecte, Benzer va definir el cistró com al segment més gran del cromosoma dins del qual es presenta l'efecte cis-trans.

El cistró és en realitat una unitat de funció. Amb el desenvolupament de la Genètica molecular es va anar veient que els cistrons controlen la síntesi de polipèptids específics i que les mutacions determinen canvis en els aminoàcids d'aquests polipèptids. A conseqüència d'aquests canvis els polipèptids poden perdre la seva funció o realitzar-la deficientment. Per això els cistrons es varen considerar equivalents a unitats de funció.

Ser la unitat de funció era la propietat fonamental dels gens en el concepte clàssic, com ho era ja en els «elements» per pèols grocs o verds, rugosos o llisos, etc., que digué Mendel que porten els gàmetes. Aquests elements s'entenen com a unitats de transmissió i com a determinants dels caràcters hereditaris i, per tant, com a unitats de funció. Per això, en considerar-se que els cistrons són unitats de funció, molts genètics van abandonar el concepte purament operatiu de cistró, tornant a emprar el terme de gen, encara que per expressar un concepte diferent del clàssic. El gen passà a ser només la unitat de funció, però a més deixà de ser una entitat abstracta. Al nou concepte de gen no s'hi va arribar indirectament, a conseqüència d'una inducció per explicar els resultats obtinguts amb l'anàlisi genètica, com s'havia fet a la Genètica clàssica. Amb el desenvolupament de la Genètica molecular es coneixia la identitat química del material hereditari que és l'ADN, i també que en aquest hi ha segments que porten informació per la síntesi de polipèptids específics. Aquests segments eren els cistrons, als quals es va passar a dir-ne gens, però essent unitats materials definides, que amb les tècniques de la Bioquímica es poden conèixer directament.

El mètode mendelià o d'anàlisi genètica conduí primer a una definició abstracta del gen, després amb els treballs de Benzer a un concepte purament operant, característic del tipus de coneixement que la ciència pot obtenir quan és al límit de les seves possibilitats experimentals. Però, en el cas de la Genètica, aquest límit era només el d'una metodologia. La combinació de l'anàlisi genètica amb la bioquímica resultà un poderós instrument nou, que obrí extraordinàries possibilitats per aprofundir en el coneixement del material hereditari i en el mecanisme del seu funcionament. Amb aquesta conjugació de tècniques s'inicià una nova etapa de la Genètica, la de la Genètica molecular.

LA GENÈTICA MOLECULAR I EL CONCEPTE DE GEN

La Genètica molecular investiga la base química de l'herència des del punt de vista estructural: quines són les substàncies químiques que formen el material hereditari i com estan organitzades; i, des del punt de vista funcional, amb quins mecanismes aquestes molècules es repliquen, com es transmeten i com determinen les propietats genètiques dels organismes.

Conceptualment, la primera conclusió important de la Genètica molecular va ser que les propietats genètiques dels àcids nucleics es basen en el fet que aquests poden portar informació. En els sistemes vivents, les seqüències lineals de nucleòtids dels àcids nucleics porten informació, de la mateixa manera que les seqüències de lletres de les paraules d'un llenguatge en porten en els sistemes culturals. Així, el gen es concep com un segment d'ADN que porta informació per ser traduïda en la seqüència d'aminoàcids d'un polipeptid determinat. Aquest concepte ja no és abstracte, correspon a un ens material molt concret, amb unes propietats físiques, químiques i biològiques molt concretes.

No obstant això, aquest concepte de gen tampoc no va ser definitiu, ja que es basava en un coneixement incomplet de l'organització i el funcionament del material genètic. La primera modificació va ser només un retoc. En descobrir-se els gens que porten informació per la síntesi dels ARNs ribosòmics i de transferència que no es tradueixen en proteïnes, el concepte que els gens porten informació per la síntesi d'una cadena polipeptídica determinada va

perdre generalitat, tot deixant de ser vàlid per a definir-los. Això no obstant, encara es va poder mantenir que el gen és la unitat de funció, considerant-lo un segment d'ADN que té informació per la síntesi d'una molècula amb una funció específica, sia una cadena d'ARN o una cadena polipeptídica. En tots dos casos, la informació del gen es transcriu en una cadena d'ARN, però en alguns gens aquest ARN més o menys modificat ja és la molècula funcional a la cèl·lula, mentre que en altres, l'ARN és un missatger que transporta la informació des de l'ADN dels cromosomes als ribosomes del citoplasma, on té lloc la «traducció» a una seqüència d'aminoàcids que formen una cadena polipeptídica específica.

Les dificultats importants pel nou concepte de gen s'han produït en començar-se a seqüenciar l'ADN. En aprofundir-se en el coneixement de l'estructura del material genètic, s'ha anat descobrint una sèrie de situacions que cada vegada fan més difícil mantenir un concepte de gen unitari, amb validesa general.

Un dels descobriments que, actualment, fa difícil de donar una definició precisa del gen és el dels «gens superposats». A la definició del gen com un segment d'ADN que porta informació per la síntesi d'una molècula amb una funció específica, hi ha implícita la idea que aquests segments d'ADN porten informació per una sola espècie de molècules. Això és cert en la major part dels casos, però l'existència dels «gens superposats» indica que hi ha excepcions, en les quals un mateix segment d'ADN pot portar informació per 2 o fins i tot 3 cadenes polipeptídiques diferents. En els gens que es tradueixen per polipèptids, la informació que porta l'ADN, o millor la seva transcripció en ARN missatger, que és el que directament es tradueix en les proteïnes, es llegeix per triplets, grups de tres nucleòtids consecutius, cada un dels quals equival a un aminoàcid de la cadena polipeptídica. A més, perquè la traducció de la informació de l'ARN missatger sigui correcta ha de fer-se llegint-lo seguit, per triplets, a partir d'un punt precís. És a dir, si tinguéssim una seqüència de nucleòtids d'ARN, UACUACUACUAC, on cada lletra simbolitza un nucleòtid, la lectura podria ser correcta començant per la U, i aleshores seria UAC UAC UAC, amb la qual cosa la informació correspondria a la síntesi d'un polipèptid format per

4 aminoàcids idèntics de tirosina que correspon al triplet UAC. En la major part dels gens les altres dues lectures possibles (les altres dues pautes de la lectura), que en l'exemple correspondrien a començar a llegir per A o per C, U ACU ACU ACU AC i UA CUA CUA CUA C, no tenen cap sentit, no porten informació i no es tradueixen en cap cadena polipeptídica. Això no obstant, en els gens superposats, diferents pautes de lectura porten informació correcta, fet pel qual un mateix segment d'ADN porta informació per la síntesi de 2 o 3 proteïnes diferents. Això es va descobrir en l'ADN de dos virus de bacteris, el Φ x174 i el G4.

Així, un segment d'ADN amb informació per la síntesi d'un polipèptid pot ser inclòs (ser-ne una part) dintre d'un segment més llarg, que té informació per la síntesi d'un polipèptid diferent i més llarg. També pot ser que l'extrem final de la seqüència d'ADN que porta informació per la síntesi d'un polipèptid, llegint-se amb una pauta de lectura diferent porti informació per la síntesi del començament d'un altre polipèptid. Fins i tot s'han trobat casos en què petits segments d'ADN llegits en cada una de les tres pautes de lectura possibles porten informació per 3 polipèptids diferents. Aquesta situació es pot interpretar considerant que a vegades els gens poden estar parcial o totalment superposats. Així pot mantenir-se la definició de gen com a unitat de funció, consistent en un segment d'ADN amb informació per la síntesi d'una molècula específica. No obstant això, en aquesta definició hi anava implícita la idea que els segments d'ADN que formen els gens especifiquen una espècie de molècules i només una. Amb el descobriment dels «gens superposats» deixà de ser vàlida la relació unívoca implícita entre els gens concebuts com a unitats de funció i segments específics d'ADN. Els gens encara poden ser unitats de funció, però ja no unitats materials independents unes de les altres, unívocament relacionades amb una funció específica. Iguales conseqüències té la situació detectada en casos en què, com en algunes regions de l'ADN del bacteriòfag λ , les dues cadenes de la doble hèlix porten informació per una proteïna diferent. Generalment només una de les dues cadenes codifica la informació, mentre que l'altra serveix per a transmetre-la quan l'ADN es replica i per establir la molècula.

L'existència dels «gens partits» en els eucariotes, accentua encara més el que acabem de dir. La major part dels gens eucariotes són formats per introns i exons. Els exons són els segments d'ADN que porten la informació per la síntesi de les molècules funcionals, que en els «gens partits» són distribuïts discontinuament, ja que entre ells hi ha seqüències de nucleòtids que no porten informació, a les quals s'ha donat el nom d'introns. L'ADN dels «gens partits» es transcriu en un ARN que conté els introns i els exons, però abans de convertir-se en un ARN funcional o de ser traduït en una cadena polipeptídica és sotmès a un procés de «maduració» que li talla els introns. Després els exons se solden entre si, formant un ARN funcional o un ARN missatger continu, que pot ser traduït en un polipèptid. L'ARN que resulta de la transcripció d'alguns «gens partits» pot ser sotmès a processos de maduració alternatius, que originen diferents ARN missatgers i, per tant, polipèptids també diferents. Aquesta organització dels gens eucariotes augmenta les dificultats per relacionar el concepte de gen amb una estructura concreta del material genètic. La relació unívoca entre funció i unitat d'estructura material és cada vegada menys sostenible.

Les dificultats per acotar el concepte de gen encara augmenten més en considerar les idees sobre l'origen evolutiu dels «gens partits». Sembla molt versemblant que els exons siguin antics gens més curts, que en el transcurs de l'evolució s'han reunit. Els introns serien segments d'ADN adjacents a aquests gens primitius, que haurien quedat al seu costat en formar-se les unitats d'ordre superior d'informació, més complexes, que serien els gens partits. Aquesta idea es basa en l'existència de «dominis» a les proteïnes, és a dir, unitats funcionals diferenciades dintre de les cadenes proteïques; els exons portarien informació per aquests dominis. A més, la conservació de l'estructura de «gens partits» seria important per l'evolució dels gens, donat que permetria la formació de nous gens per recombinació d'exons entre gens diferents. D'acord amb aquesta interpretació molts gens serien unitats compostes, almenys des del punt de vista del seu origen. Definir-los com a unitats de funció resultaria, per tant, confús.

Ens trobem, doncs, en una situació en què no és possible donar una definició dels

gens ben acotada, que respongui a un concepte homogeni i que s'ajusti a una entitat real. En el context dels coneixements actuals el terme gen correspon a un concepte bastant imprecís. Ens referim a una unitat de transmissió hereditària que al mateix temps ho és de funció, ja que es manifesta amb alguna característica detectable en el fenotip; però ni com a unitats de transmissió ni de funció els gens mantenen una identitat material constant. Això no obstant, la utilització del terme gen continua sent operant tant en l'anàlisi genètica com a la Genètica molecular. Tots els textos de Genètica, encara que especialment els més moderns ja no s'atreveixen a definir-lo, continuen utilitzant-lo, p. e., a l'Enginyeria genètica diem que s'ha aconseguit introduir en bacteris el gen de la insulina de l'home i que aquests bacteris elaboren insulina humana perquè dins d'ells el gen funciona. En l'anàlisi genètica és totalment universal la utilització de lletres per simbolitzar els gens. Encara que imprecís, el concepte de gen continua sent fonamental a l'anàlisi genètica. Després d'haver evolucionat al llarg del procés que ens ha portat als coneixements actuals tornem a utilitzar un concepte molt pròxim al que s'utilitzava als començaments de la Genètica, en un cert sentit comparable al de Mendel quan escrivia que les cèl·lules reproductores porten elements per als caràcters hereditaris. Utilitzem un concepte útil, operant, prescindint de quina sigui l'entitat material real dels gens. Hi ha, no obstant això, una diferència entre Mendel i nosaltres. Mendel desconeixia totalment quina podia ser la base material dels elements de què parlava. Nosaltres tenim un coneixement molt precís d'aquesta base i fins i tot és gairebé al nostre abast de fabricar gens nous, però la complexitat de les estructures que coneixem no ens permet, almenys de moment, arribar a un concepte sintètic que presenti una relació unívoca amb l'estructura real del material hereditari. Freqüentment en la ciència hem d'acontentar-nos amb situacions com aquesta; per entendre'ns i per operativitat utilitzem conceptes poc acotats i que corresponen a una simplificació de la realitat. Molt freqüentment l'avenç científic és possible per aquesta simplificació, que permet copsar els trets més sobresortints dels fenòmens. Això ens porta a generalitzacions, moltes vegades poc exactes, però que són operatives, no solament per mani-

pular la Natura, sinó també com a graons que permeten anar aprofundint en el seu coneixement. La història de la ciència ens mostra casos d'aquests, en què idees que ara ens semblen superficials, per poc acotades, han estat molt fecundes per l'avenç del coneixement.

L'ESTRUCTURA DEL GENOMA

Amb el progrés dels coneixements de la Genètica, a més de canviar el concepte de gen també ha anat variant la idea que es tenia de l'organització del genoma i de les seves propietats. Clàssicament, es pensava que per damunt dels gens el genoma a penes estava organitzat. Semblava que els gens eren distribuïts a l'atzar dins dels cromosomes. Dintre del nucli, encara que situats al llarg dels cromosomes, es creia que els gens no presentaven més ordenació que les mongetes dins d'un sac. La primera prova precisa contrària a aquestes idees va ser el descobriment dels operons als bacteris. Des d'aleshores, cada dia tenim més proves que el material genètic presenta una organització superior a la dels gens. El material genètic és organitzat en relació amb el control ordenat del seu funcionament. El descobriment dels operons en fou la primera indicació, però l'estructura genètica de regions com la del complex bitòrax a *Drosophila* o l'ordenació en els mamífers dels gens de les famílies de les globines segons l'ordre en què actuen durant el desenvolupament, en són exemples més recents. En aquest aspecte encara ens falten moltes coses per conèixer i la investigació de l'estructura del genoma en aquest sentit és un dels camps de treball actuals amb més perspectives.

Un altre problema d'interès sobre l'estructura del genoma, el plantegen les seqüències repetides d'ADN, que presenten freqüentment distribucions específiques, agrupades en determinades regions dels cromosomes. Algunes d'aquestes seqüències són formades per gens repetits com els que tenen la informació per la síntesi dels ADNs ribosòmics, de transferència, les histones, etc., però d'altres, no tenen cap funció reconeguda amb seguretat. A aquestes, alguns autors les han qualificades de «gens egoïstes», suposant que no tenen cap funció i que la seva abundància es deu al fet que tendeixen a duplicar-se en el genoma. Aquesta tendència tindria per con-

seqüència una espècie de selecció natural a nivell molecular en favor dels segments d'ADN que les formen, que no comportaria cap avantatge per a l'organisme, sinó més aviat una despesa de materials i d'energia inútils. El fet és que la part del genoma eucariot portadora d'informació (per la síntesi de proteïnes o d'ADNs ribosòmics i de transferència) és una fracció, en algunes espècies bastant petita, de tot l'ADN que conté el genoma.

L'estabilitat de l'organització del genoma també és molt més petita del que es pensava. Primer, s'observà que els bacteriòfags temperats poden inserir el seu ADN en el cromosoma bacterià. Després, es va comprovar que també en els eucariotes hi ha virus que poden inserir la seva informació genètica en els cromosomes de la cèl·lula: els retrovirus, que porten la informació genètica en ARN, però determinen l'elaboració d'un enzim que transcriu aquest ARN en ADN, el qual s'insereix en els cromosomes. Aquests fenòmens es van considerar casos de parasitisme. Posteriorment, als bacteris es van descobrir les seqüències d'inserció que fan possible la inserció dels plàsmids en el cromosoma bacterià. Després en els eucariotes, s'hi han trobat els transposons, que són seqüències amb la propietat de canviar de posició en els cromosomes i, freqüentment, de formar una rèplica i d'inserir-la en un lloc del cromosoma diferent del que ocupen. Tots aquests elements semblen estar relacionats filogenèticament, és a dir, sembla que s'han originat els uns dels altres i que constitueixen una situació patològica que altera el funcionament normal (més eficaç) de les cèl·lules. Això no obsta perquè el dinamisme que donen a l'organització del genoma no tingui importància biològica a llarg termini, perquè facilita la seva evolució.

Hem de concloure, per tant, que estem en un moment de crisi, que encara no sabem com es resoldrà, del concepte de gen. A més, el gen no és l'única unitat dins de l'organització del material genètic. Com diu Mayr, el genoma conté un programa genètic, i aquest per funcionar eficaçment requereix nivells d'organització superiors als dels gens. Amb això l'acotament del concepte de gen encara és més difícil, ja que fa necessari, a més d'acotar-lo en relació amb els elements d'ordre inferior, fer-ho, també, respecte a les estructures d'ordre superior.