

HALINA KRZANOWSKA

Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu
Instytut Zoologii UJ
Kraków

GENY Z SEKWENCJĄ HOMEOBOKSU A EWOLUCJA ZWIERZĄT

Genetyka rozwoju przez długi czas nie nadążała za szybkim rozwojem innych działów genetyki. A przecież wiadomo było od dawna, że kształtowanie się postaci osobnika, czyli morfogeneza, odbywa się według wzorów odziedziczonych po rodzicach, z czego wynika wniosek, że muszą być za to odpowiedzialne jakieś geny. Klasyczna metoda badania roli genów polega na analizie zmian spowodowanych mutacjami. Po czym jednak można rozpoznać geny kierujące morfogenezą? Ich mutacje powinny zaburzać plan budowy osobnika, powodując na przykład, że narządy pojawią się w nietypowym miejscu, liczbie czy stadium rozwoju, albo też nie rozwiną się wcale. Tego typu mutanty znano od kilkudziesięciu lat u gatunków o ściśle zdeterminowanym rozwoju mozaikowym, do jakich należy klasyczny obiekt badań genetycznych — muszka owocowa, *Drosophila melanogaster*. Jednak dopiero zastosowanie nowoczesnych metod biologii molekularnej pozwoliło na poznanie struktury i przypuszczalnej funkcji tych genów, co spowodowało przełom w genetyce rozwoju. Analiza ta doprowadziła do odkrycia konserwatywnej ewolucyjnie rodziny genów regulatorowych, wspólnej — jak się teraz wydaje — dla wszystkich zwierząt.

GENY KIERUJĄCE ROZWOJEM MUSZKI OWOCOWEJ


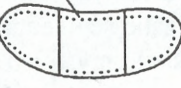


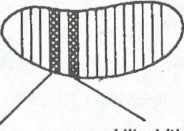
Punktem wyjścia badań genetycznych nad rozwojem muszki było odkrycie specjalnego typu mutacji, zwanych homeotycznymi, które powodują, że struktura typowa dla jednej okolicy ciała wykształca się w zupełnie innym miejscu, na przykład mutacja genu *Antennapedia* (*Antp*) powoduje, że zamiast czułka na głowie wyrasta odnóże, a mutacja *bithorax* (*bx*) wywołuje zamianę części segmentu odwłokowego na tułowiowy, wskutek czego wyrasta druga para skrzydeł. Stopniowo poznawano także inne mutacje rozwojowe, które zaburzały symetrię ciała, redukowały liczbę segmentów lub sposób ich wykształcenia. Analiza tych mutacji pozwoliła zidentyfikować około 100 tego typu genów, między innymi wpływających na wyznaczenie symetrii grzbieto-brzuszej lub wyznaczających pozycję na osi przednio-tylnej. Te ostatnie zostały najlepiej poznane, wiele z nich już sklonowano, poznano ich sekwencje nukleotydowe i zidentyfikowano kodowane przez nie białka. Co więcej, badano miejsca ekspresji tych genów w kolej-

nych stadiach rozwojowych u form dzikich i mutantów. W tym celu, metodą hybrydyzacji *in situ*, lokalizowano na przekrojach przez ciało zarodka transkrypty mRNA, stosując znakowane radioaktywnie sondy komplementarne do odpowiednich genów (lub antysensowne nici RNA), albo też wykrywano za pomocą specyficznych przeciwciał rozmieszczenie kodowanych przez te geny białek. Dzięki tym badaniom zaczyna się już wyłaniać obraz działania tych genów w rozwoju.

Rozwój muszki owocowej przebiega bardzo szybko; po zapłodnieniu, jądra zygoty dzielą się co około 10 minut, po czym jądra potomne otoczone cytoplazmą wędrują ku obwodowi jaja, tworząc po 2 i $\frac{1}{2}$ godz. od zapłodnienia syncytialną blastodermę, która następnie po utworzeniu błon komórkowych (celularyzacja) przekształca się w blastodermę komórkową, w środku wypełnioną żółtkiem (rys. 1). W 3 $\frac{1}{2}$ godz. po zapłodnieniu rozpoczyna się gastrulacja i ruchy komórkowe doprowadzające do powstania larwy, która po 20 godzinach wylega się z jaja a następnie przechodzi przez 3 stadia larwalne. Po 5 dniach powstaje poczwarka a po 9 dniach postać dorosła. Plan budowy osobnika zostaje zdeterminowany już pierwszego dnia rozwoju, w stadium blastodermy, gdyż wtedy uaktywniają się geny wyznaczające pozycję i organizację przyszłych segmentów ciała. Geny te kodują białka typu regulatorowego, które łączą się ze specyficznymi sekwencjami DNA w kontrolowanych przez siebie genach i jako czynniki transkrypcyjne uruchamiają ich transkrypcję, albo ją reprimują. Analiza ekspresji u form dzikich i mutantów wykazała, że geny kontrolujące rozwój zarodka wzdłuż osi przednio-tylnej występują w 5 grupach, tworzących hierarchiczny układ regulacyjny (Ingham 1988), przedstawiony na rysunku 1.

GENY POLARNOŚCI JAJA

Nadrzędną pozycję zajmują geny polarności jaja, które decydują o orientacji przedniej i tylnej części ciała. Są to geny powodujące tak zwany efekt mateczny, gdyż ich produkty zostają zdeponowane w oocytye jeszcze pod kontrolą genotypu matki. Jako przykład może posłużyć gen *bicoid* (*bcd*), wyznaczający przedni koniec ciała przyszłego zarodka. Zarodki mutantów są pozbawione głowy i struktur tułowiowych, ale można temu zapobiec przeszczepiając cytoplazmę z przedniej części jaj typu dzikiego. Gen *bicoid* ulega ekspresji w komórkach odżywczych występujących w jajniku matki, skąd cząsteczki mRNA przechodzą do oocyty, gdzie od razu zostają zakotwiczone (prawdopodobnie przez elementy cytoszkieletu), wyznaczając przedni biegun jaja. Zaraz po zapłodnieniu na matrycach mRNA zostaje zsyntetyzowane białko genu *bicoid*, które rozprzestrzenia się sięgając do połowy długości jaja i tworzy gradient stężenia, malejący ku tyłowi. Produkt genu *bicoid* zachowuje się jak typowy morfogen, to znaczy jak substancja wywołująca specyficzną indukcję, gdyż cytoplazma zawierająca białko tego genu po wprowadzeniu w dowolną okolice mutantu *bicoid* indukuje w miejscu iniekcji powstanie struktur charakterystycznych dla przedniej części ciała.

GODZINY ROZWOJU	EKSPRESJA GENÓW	KODOWANE BIAŁKA ZAWIERAJĄ	
0		POLARNOŚCI JAJA	H
2		SEGMENTACJI (GAP GENES)	PC
3		SEGMENTACJI (PAIR RULE GENES)	H
3		SEGMENTACJI (POLARNOŚCI SEGM.)	H
10		HOMEOTYCZNYCH	H

Rys. 1. Hierarchia genów regulatorowych uruchamianych w pierwszych 10 godzinach rozwoju zarodka *Drosophila melanogaster*; j — jądro. Schematycznie zaznaczono rozkład transkryptów mRNA lub białek kodowanych przez niektóre geny i układających się w coraz dokładniejszy wzór segmentacji. Białka kodowane przez te geny są czynnikami transkrypcyjnymi, zawierającymi homeodomenę (H) lub domenę palców cynkowych (PC). (Ingham 1988, Biggin i Tjian 1989b).

W tym samym czasie ulegają też translacji transkrypty innych genów wyznaczających tylny koniec jaja i niezbędnych do uformowania potem segmentów odwłokowych. Dane na temat efektów genów matczynych zestawiał Biliński (1992).

GENY SEGMENTACJI

Następną grupę stanowią geny segmentacji, uaktywniające się dopiero w zarodku. Dzielą się one na trzy kategorie. Pierwsze w szeregu hierarchicznym są geny, których transkrypcja przypada jeszcze na okres syncytialnej blastodermy. Ich mutacje powodują brak wielkich partii ciała (stąd angielska nazwa *gap genes*) i wczesną letalność. Aktywność tych genów jest uruchamiana lub reprimowana — zależnie od okolicy jaja — przez zdeponowane tam poprzednio produkty genów polarności jaja. Dzięki wzajemnym, skomplikowanym i słabo jeszcze poznanym oddziaływaniom, geny tej grupy są odpowiedzialne za wyznaczenie dużych stref zarodka (rys. 1), w obrębie których będą działały geny segmentacji niższej rangi.

Do drugiej kategorii należą geny o bardziej lokalnym działaniu, wyznaczające regiony tak zwanych parasegmentów (są to zaczątki segmentacji). Ekspresja tych genów zbiega się w czasie z celularyzacją blastodermy, a ich mutacje powodują brak co drugiego parasegmentu, na przykład mutanty genu *fushi tarazu* (*ftz*; po japońsku — za mało segmentów) nie mają parasegmentów nieparzystych, natomiast mutantom *even-skipped* (*eve*) brak parasegmentów parzystych (stąd angielska nazwa całej tej kategorii genów *pair rule genes*). Wspólne działanie genów pierwszej i drugiej kategorii doprowadza do podziału blastodermy zarodka na strefy odpowiadające przyszłym 14 parasegmentom.

Trzecią kategorię stanowią geny polarności segmentów (ang. *segment polarity genes*), które wyznaczają określoną część (przednią lub tylną) poszczególnych segmentów. U mutantów zaburzona część parasegmentu jest zbudowana jako lustrzane odbicie części pozostałej. Dopiero aktywność tych genów doprowadza do wytworzenia ostrych granic między parasegmentami (rys. 1).

Kolejna ekspresja przytoczonych dotąd kategorii genów stwarza więc coraz dokładniejszą mozaikę sygnałów pozycyjnych, wyposażając każdą komórkę w zestaw informacji precyzujących jej lokalizację w zarodku. Wprawdzie wzór ekspresji genów polarności jaja oraz dwu pierwszych grup genów segmentacji jest przemijający i zanika po gastrulacji, ale w komórkach pozostaje trwały ślad; jest nim trwała aktywacja odpowiednich genów polarności segmentów i genów homeotycznych (Ingham 1988).

GENY HOMEOTYCZNE KOMPLEKSU ANTENNAPEDIA I BITHORAX

Na dole hierarchii występuje kategoria genów homeotycznych, które decydują o prawidłowym typie zróżnicowania każdego segmentu zgodnie z jego pozycją wzdłuż osi przednio-tylnej (niektóre zaburzenia funkcji tych właśnie genów objawiają się jako mutacje homeotyczne, stąd nazwa). Główne geny homeotyczne występują w trzecim chromosomie muszki owocowej, w postaci dwu kompleksów genów sprzężonych, z których kompleks *Antennapedia* (ANT-C) wyznacza różnice między segmentem głowowym a trzema segmentami tułowia, zaś kompleks *bithorax* (BX-C) różnice między segmentami tułowia a odwłoka. Na przykład

larwy z całkowitym ubytkiem kompleksu BX-C mają głowę i przednią część tułowia normalną ale począwszy od czwartego parasegmentu wszystkie następne są zbudowane jednakowo.

Oba kompleksy zostały sklonowane i zbadano ich ekspresję. Rozpoczyna się ona bezpośrednio przed celularyzacją blastodermy i początkowo jest dość rozległa tworząc zachodzące na siebie strefy. Ekspresją tą kieruje skomplikowana kombinacja produktów zarówno genów polarności jaja, jak i genów segmentacji. W miarę jak produktów tych przybywa, wskutek włączania się aktywności kolejnych kategorii genów segmentacji, ekspresja genów homeotycznych staje się coraz bardziej precyzyjna.

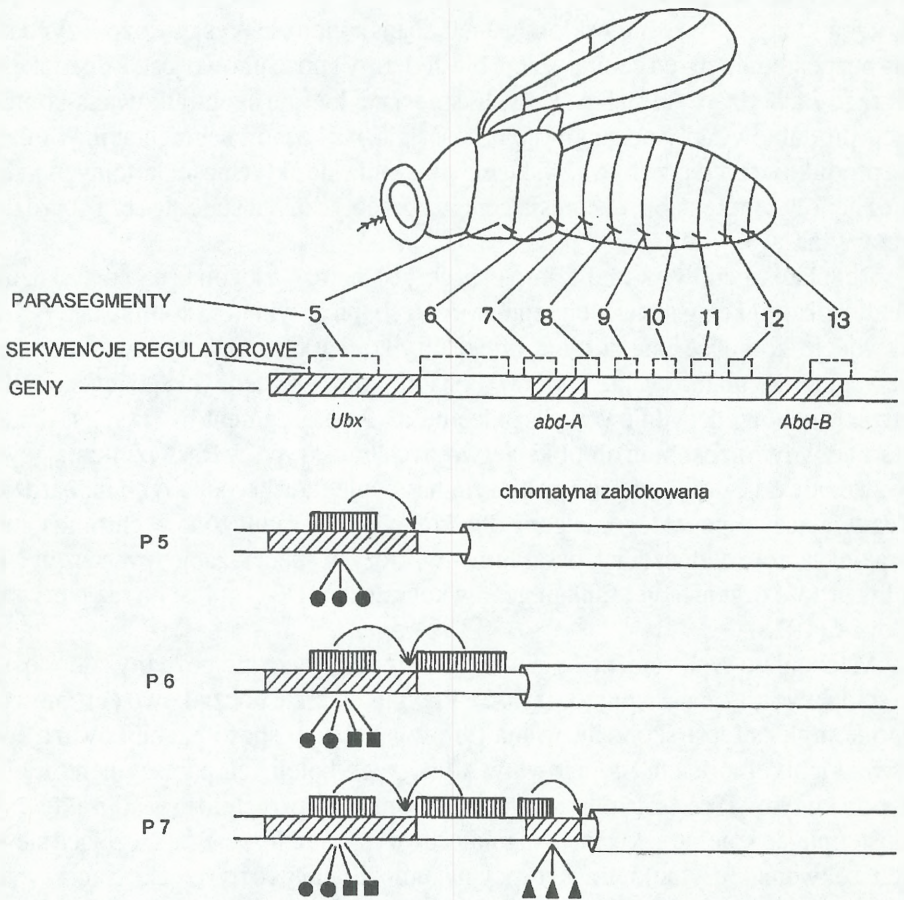
Regulacja genów w obu kompleksach jest bardzo złożona, na co wskazuje niezwykle długi ciąg sekwencji regulatorowych, na przykład w kompleksie BX-C sekwencje kodujące białka mają długość tylko 20000 nukleotydów, natomiast sekwencje regulatorowe aż 300000. Ponadto kompleks ten, składający się tylko z trzech genów, decyduje o wykształceniu aż 9 parasegmentów (rys. 2), dzięki alternatywnym sposobom obróbki pierwotnych transkryptów RNA, zmieniającym się zależnie od czasu i miejsca, w którym następuje transkrypcja. A co najbardziej zadziwiające — poszczególne geny obu kompleksów są ułożone w chromosomie w takiej samej kolejności jak parasegmenty, których specjalizację wyznaczają! Tę kolinearność organizacji i funkcji genów kompleksu BX-C opisał po raz pierwszy Lewis (1978).

Mechanizm tych zależności nie jest jeszcze dostatecznie poznany, ale można go sobie wyobrazić następująco (rys. 2). Przypuszczalnie początkowo chromatyna tego kompleksu jest skondensowana (lub w jakiś inny sposób zablokowana) we wszystkich komórkach. Stopniowo w komórkach kolejnych parasegmentów (od przodu ku tyłowi) coraz to dalsze odcinki chromatyny przechodzą w stan aktywny, udostępniając kolejne sekwencje regulatorowe w promotorze. Przyłączające się do tych sekwencji czynniki transkrypcyjne umożliwiają rozpoczęcie transkrypcji coraz dalej położonych genów. Jednocześnie czynniki te muszą mieć wpływ na alternatywne sposoby obróbki pierwotnego transkryptu, wskutek czego na matrycy trzech tylko genów powstaje szereg różnych cząsteczek mRNA i białek.

Opisany powyżej mechanizm powoduje, że zestaw zsyntetyzowanych białek regulatorowych zmienia się w komórkach kolejnych parasegmentów i wywołuje w pamięci komórkowej trwały ślad, zachowany nie tylko w komórkach larwy ale także w komórkach tarcz imaginalnych stanowiących zawiązki, z których powstaje w czasie przeobrażenia ciało dorosłego owada.

SEKWENCJA HOMEOKSUSU U *DROSOPHILA MELANOGASTER*

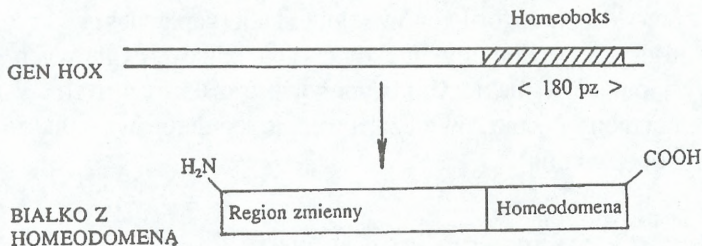
Klonowanie genów homeotycznych kompleksu ANT-C i BX-C wykazało, że wszystkie one zawierają sekwencję długości 180 nukleotydów o bardzo wysokim stopniu homologii. Sekwencja ta, odkryta w 1984 roku (McGinnis i współaut.



Rys. 2. Organizacja kompleksu *bithorax* (BX-C) u *Drosophila*. Kompleks składa się z 3 genów (*Ubx*, *abd-A* i *Abd-B*) oraz 9 sekwencji regulatorowych, wyznaczających strukturę parasegmentów 5–13. U dołu pokazano aktywność genów w parasegmentach P5, P6 i P7. W kolejnych parasegmentach odsłaniają się coraz dalsze odcinki chromatyny, udostępniając nowe sekwencje regulatorowe. Przyłączające się do nich czynniki transkrypcyjne (pionowo zakreskowane) uruchamiają transkrypcję i wpływają na sposób obróbki RNA, wskutek czego w każdym parasegencie powstaje inny zestaw białek (czarne kółka, kwadraty i trójkąty). (Alberts i współaut. 1989, zmienione).

1984b, Gehring 1987) i nazwana homeoboksem (ang. homeobox), została potem znaleziona również w genach polarności jaja i w wielu genach segmentacji (rys. 1) a także w niektórych genach wyznaczających oś grzbieto-brzuszną. (Historię badań, które doprowadziły do tych odkryć, interesująco opisała Kindhauser, 1986). Homeoboks koduje domenę białkową (rys. 3), czyli funkcjonalny fragment cząsteczki białka, o długości 60 aminokwasów (rys. 4), złożoną z trzech alfa-heli-

ksów, których struktura o motywie „heliks-skreć-heliks” (ang. helix-turn-helix) podobnego typu, jak w niektórych czynnikach transkrypcyjnych drożdży i prokariotów, od razu wskazywała na zdolność wiązania się ze specyficznymi sekwencjami DNA. Obecnie wiadomo, że homeodomena gra rolę czynnika regulującego transkrypcję, co w odniesieniu do niektórych genów zostało wykazane eksperymentalnie *in vivo* (Biggin i Tjian 1989a) i *in vitro* (Han i współaut. 1988).



Rys. 3. Gen z homeodomeoboksem koduje białko składające się z części zmiennej i bardzo konserwatywnej homeodomeny.

Metodą krystalografii rentgenowskiej wyznaczono już strukturę przestrzenną homeodomeny genu *engrailed* oraz sposób jej wiązania się z sekwencją TAATX w DNA (Kissinger i współaut. 1990).

Białka zawierające homeodomenę biorą udział w skomplikowanych oddziały-

HOMEODOMENA

Consensus
 RKRGRTTYTRYQTLELEKEFHFNRYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKIWFQNRMRKWKKEN

Labial (muszka owocowa)

NNS --- NF- NK- LT- ----- A- ----- NT- Q- N- T- V- ----- Q- -RV
 PGGL -- NF- TR- LT- ----- K- S- A- - V- -- AT- G- N- T- V- ----- Q- -RE

Hox-2.9 (mysz)

Antennapedia (muszka owocowa)

----- Q -----
 ----- Q ----- Y ----- T -----

Hox-2.3 (mysz)

Rys. 4. Sekwencja aminokwasów (oznaczenia jednoliterowe) homeodomeny w odpowiadających sobie genach u muszki owocowej i myszy. Kreski oznaczają aminokwasy zgodne z sekwencją stanowiącą konsensus (u góry). Klamrą oznaczono 12 aminokwasów, które wiążą się ze specyficznymi sekwencjami DNA w regulowanym przez daną homeodomenę genie. (De Robertis i współaut. 1990, zmienione).

waniach, regulując powiązane ze sobą funkcjonalnie zespoły genów. Jeżeli bowiem promotor jakiegoś genu ma wiele sekwencji rozpoznawanych przez różne homeodomeny (kodowane przez różne geny), to mogą one działać antagonistycz-

nie lub synergistycznie. W ten sposób niewielka liczba białek regulatorowych działając w różnych kombinacjach może kontrolować w sposób specyficzny aktywność wielu genów. To tłumaczy zarówno hierarchiczne zależności między tymi genami, jak i autoregulację, jeżeli sekwencja regulatorowa w promotorze jakiegoś genu jest rozpoznawana przez jego własny produkt.

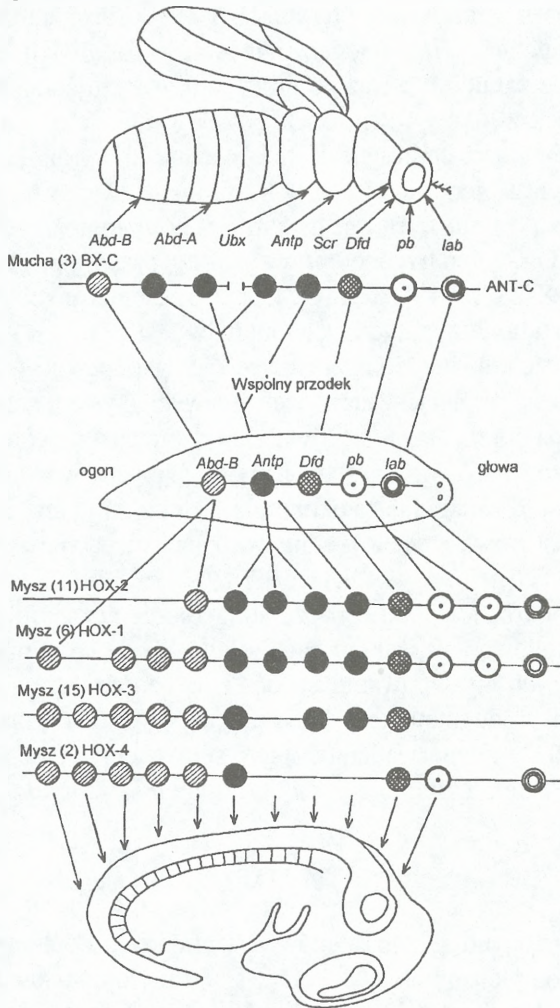
Inne geny kierujące rozwojem *Drosophila*, ale nie zawierające homeoboksu, kodują inne domeny białkowe zdolne do specyficznego wiązania z DNA. Na przykład w pierwszej kategorii genów segmentacji (gap genes) wykryto obecność fragmentu kodującego domeny białkowe typu palców cynkowych (ang. zinc fingers) występujące w niektórych czynnikach transkrypcyjnych. W niektórych genach segmentacji opisano również sekwencję regulatorową oznaczoną symbolem Pax (ang. paired box).

SEKWENCJE HOMEOKSUKU U SSAKÓW

Odkrycie sekwencji homeoboksu w genach kierujących rozwojem *Drosophila* od razu nasunęło przypuszczenie, że może ona odgrywać rolę także u innych organizmów. Rzeczywistość przeszła jednak najśmielsze oczekiwania! Posługując się tą sekwencją jako sondą do hybrydyzacji DNA, otrzymanego z banku genomów różnych zwierząt, stwierdzono obecność homeoboksu zarówno u bezkręgowców jak i kręgowców, w tym także u ssaków (Levine i współaut. 1984, McGinnis i współaut. 1984a). Geny zawierające homeoboks zostały dość dobrze zbadane u myszy i człowieka, u których znaleziono ich już około 30, i nazwano genami *Hox* (De Robertis i współaut. 1990, Duboule i współaut. 1990). U obu gatunków geny te występują w 4 grupach (każda w innym chromosomie) jako kompleksy HOX (rys. 5). Ułożenie genów w każdym z kompleksów wykazuje bardzo duże podobieństwo do połączonych kompleksów ANT-C i BX-C u *Drosophila* (jakkolwiek nie w każdym z kompleksów występują wszystkie geny), to znaczy najbardziej homologiczne w stosunku do siebie geny są ułożone w tej samej kolejności. Homologia dotyczy głównie sekwencji kodującej homeodomenę, a zwłaszcza jej fragment składający się z 12 aminokwasów (rys. 4) biorących bezpośredni udział w wiązaniu homeodomeny z DNA (Krumlauf 1992). Co więcej, okazało się, że podobnie jak u *Drosophila* istnieje związek między kolejnością ułożenia genów w chromosomie a topografią ich aktywności wzdłuż osi ciała! Geny usytuowane najbliżej końca 5'DNA wyznaczają topografię struktur położonych najbardziej ku tyłowi. Zwłaszcza przednia granica ekspresji poszczególnych genów *Hox* w układzie nerwowym oraz w odcinkach sklerotomu (zaczątki kręgow) zarodka myszy jest bardzo wyraźna i odpowiada kolejności tych genów w chromosomie (rys. 5).

Geny kompleksów HOX wykazują podobieństwo do genów homeotycznych u *Drosophila* nie tylko pod względem struktury; zachowały one także swe pierwotne funkcje: po wprowadzeniu do organizmu muszki owocowej genu myszy

odpowiadającego genowi *Antennapedia* i spowodowaniu jego nadmiernej ekspresji, uzyskano muchy z odnóżami zamiast czułków, podobnie jak przy nadmiernej ekspresji własnego genu (Akam 1991).



Rys. 5. Podobieństwo układu i ekspresji genów kierujących rozwojem: u góry u muszki owocowej (kompleks BX-C i ANT-C), u dołu u myszy (4 kompleksy HOX; liczby w nawiasach oznaczają numer chromosomu). Pozycja genu w kompleksie decyduje o miejscu jego ekspresji wzdłuż osi przednio-tylnej ciała zwierzęcia (strzałki). Geny o największym stopniu homologii oznaczono takimi samymi symbolami. W środku: kompleks genów składających się na zotyp w wspólnego domniemanego przodka wszystkich zwierząt. (Duboule i współaut. 1990, Krumlauf 1992, uproszczone).

Jakkolwiek wciąż jeszcze nie jest wyjaśniona funkcja tych genów u kręgowców, nie ulega wątpliwości, że grają one rolę w różnicowaniu się postaci osobnika. Dowiodły tego bezpośrednio badania, w których po wprowadzeniu do zarodków żaby *Xenopus* produktów genu *Hox* (lub przeciwciał skierowanych przeciw białkom kodowanym przez te geny) uzyskano zaburzenia rozwojowe (Harvey

i Melton 1988, Wright i współaut. 1989). Podobne wyniki uzyskano u myszy transgenicznych, którym wprowadzono zmutowane geny *Hox* (Balling i współaut. 1989). W jednym z takich doświadczeń (Chisaka i Capecchi 1991) metodami inżynierii genetycznej otrzymano myszy transgeniczne, zawierające zamiast normalnego genu *Hox-1.5*, gen zmutowany i całkowicie niefunkcjonalny. Homozygoty takie zamierały zaraz po urodzeniu wykazując niedorozwój narządów pochodzących z łuków i kieszonek skrzelowych (m.in. brak grascy, mała tarczyca, nienormalności chrząstek itp.). Wskazuje to wyraźnie, że gen ten jest niezbędny do życia i bierze udział w kontroli powstawania narządów. Ponadto wyniki te świadczą o tym, że nawet najbardziej homologiczne do genu *Hox-1.5* (w kompleksie HOX-1 gen trzeci od prawej strony; rys. 5) geny zlokalizowane w kompleksach HOX-2 i HOX-4 różnią się jednak od niego funkcjonalnie, skoro nie mogą go zastąpić u homozygotycznych mutantów.

Wykryto jeszcze inne bardzo interesujące zjawisko: pewne geny *Hox*, których ekspresja pojawia się najpierw w narządach osiowych (system nerwowy, zawiązki kręgow), wykazują potem ekspresję również w narządach obwodowych, na przykład w kończynach, i to również w sposób uporządkowany w układzie proksymalno-dystalnym. Jest to zadziwiająca ekonomia, dzięki której ten sam system regulacyjny zostaje zastosowany wielokrotnie w różnych etapach rozwoju (Duboule i współaut. 1990, Vogels i współaut. 1990).

Należy też podkreślić wielkie znaczenie metodologiczne odkrycia sekwencji homeoboksu. Ponieważ u ssaków nie pojawiają się mutanty homeotyczne (prawdopodobnie ich występowaniu zapobiegają bardzo duże zdolności regulacyjne), nie można było metodami klasycznymi wyszukać genów kierujących rozwojem. Na ich ślad naprowadziła dopiero sekwencja homeoboksu, zidentyfikowana najpierw dzięki mutantom homeotycznym u *Drosophila*.

ZOOTYP

Spośród sprzężonych ze sobą genów zawierających homeoboks i wchodzących w skład kompleksów BX-C i ANT-C u muszki owocowej, przynajmniej 5 genów stanowi konserwatywny ewolucyjnie zespół (rys. 5, w środku), który wykryto u tak odległych od siebie grup zwierząt, jak kręgowce, lancetnik, pijawki, nicienie, robaki płaskie (Kenyon i Wang 1991). Co ciekawsze, u wszystkich zwierząt, u których zbadano wzór ekspresji tych genów, był on taki sam, jak u muszki owocowej, to znaczy ekspresja pierwszego genu w kompleksie (od końca 3'DNA) rozpoczyna się w przedniej części ciała, a ekspresja kolejnych genów przypada na rejony położone coraz to dalej w kierunku tylnym.

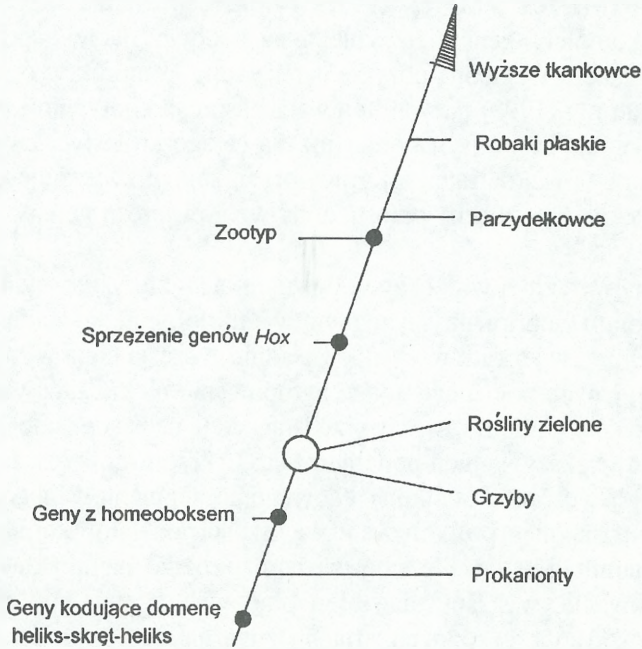
Odkrycia te nasunęły interesujące wnioski (Slack i współaut. 1993). I tak, porównanie ekspresji poszczególnych genów kompleksu u lancetnika i kręgowca sugeruje, że głowa kręgowca jest homologiczna do przednich, choć nie podlegających cefalizacji, segmentów niższych strunowców. Z kolei porównanie pijawki

i owada świadczy, iż ten sam wzór ekspresji może być wykorzystany w ontogenezie, mimo różnych sposobów powstawania segmentów. I wreszcie przykład nicieni wskazuje, iż takim samym wzorem posługują się także organizmy o ściśle ustalonych liniach komórkowych i bardzo niewielkiej liczbie komórek. Okazało się, że taka sama grupa genów występuje też u jamochłonów, między innymi u koralu *Acropora formosa* (Miller i Miles 1993). Wyniki te prowadzą do wniosku, że konserwatywny kompleks genów *Hox* nie musi kodować jakiejś specyficznej struktury, ale wyznacza względną pozycję danej grupy komórek w organizmie. Slack i współautorzy (1993) nazwali ten wzór ekspresji zootypem i postulują, że stanowi on wspólną cechę (synapomorfię) dla całego królestwa zwierząt, co pozwala na podanie nowej definicji tej grupy organizmów: zwierzę jest to organizm, który wykazuje specyficzny przestrzenny wzór ekspresji genów, nazwany zotypem.

Zotyp jest najwyraźniej widoczny w pewnym charakterystycznym dla każdego taksonu stadium embrionalnym, znanym w embriologii jako stadium filotypowe. Jest to stadium, w którym wszystkie zasadnicze części ciała występują już w swoich definitywnych położeniach jako zgrupowania niezróżnicowanych komórek. W tym właśnie stadium wszyscy przedstawiciele należący do tego samego typu wykazują największy stopień podobieństwa. U kręgowców jest to stadium pączka ogonowego, u owadów stadium całkowicie już segmentowanego zarodka, a u nicieni stadium osiągnięte po ukończeniu większości podziałów komórkowych. Nie są to stadia najmłodsze, gdyż te mogą się bardzo różnić, na przykład zależnie od typu bruzdkowania, wykształcenia błon płodowych i tym podobnych, co wynika z przystosowania do różnych strategii związanych z rozrodem, czy też różnych wymagań pokarmowych zarodka. Konserwatywne stadium filotypowe występuje w rozwoju pomiędzy owym zmiennym stadium wczesnym a stadiami późniejszymi, znowu podatnymi na zmiany typu adaptacyjnego. Znamienny jest fakt, że właśnie na stadium filotypowe danej grupy przypada szczyt ekspresji zotypu i najprostszy jego wzór.

Zgromadzone dotąd dane wskazują, że wielokomórkowe *Eukaryota* nie należące do królestwa zwierząt, jak rośliny, grzyby i śluzowce również zawierają pewne geny z sekwencją homeoboksu. Na przykład u kukurydzy zidentyfikowano białko zawierające homeodomę, kodowane przez gen *Knotted-1*. Gen ten wydaje się też regulować procesy rozwojowe, ponieważ jego mutacje powodują nieprawidłowy rozwój użytkowania liści (Vollbrecht i współaut. 1991). Homeodomena kodowana przez gen *Knotted-1* wykazuje największe podobieństwo (około 35% homologii) do homeodomeny kodowanej przez jeden z genów człowieka oraz do białka genu występującego u drożdży. Mamy tu więc do czynienia z bardzo konserwatywną ewolucyjnie sekwencją. Jednakże u żadnych organizmów poza zwierzętami nie występuje sprzężony zespół genów z homeoboksem o charakterystycznym dla zotypu przestrzennym wzorze ekspresji (Slack i współaut. 1993).

Jak już poprzednio wspomniano, homeodomena kodowana przez sekwencję homeoboksu, należy do grupy białek regulatorowych o strukturze typu „heliks-skret-heliks”. Białka takie występują już u organizmów prokariotycznych. Zestawiając wszystkie powyższe dane, Slack i współautorzy (1993) przedstawili hipotetyczną filogenezę zootypu (rys. 6). Najpierw w ewolucji pojawiły się geny



Rys. 6. Ewolucja zootypu (Slack i współaut. 1993).

kodujące białko regulatorowe typu „heliks-skret-heliks” mające zdolność wiązania się z DNA. Z tych genów przez duplikacje i mutacje (porównaj artykuł: Krzanowska 1987) wyewoluowały geny kodujące sekwencję homeoboksu. Dalsze duplikacje doprowadziły do powstania kompleksu ściśle sprzężonych ze sobą genów wykazujących specyficzny przestrzenny wzór ekspresji charakterystyczny dla zootypu. Tak powstało prazwierzę. Inaczej mówiąc, istniał kiedyś wielokomórkowy przodek wszystkich zwierząt (rys. 5), a był nim pierwszy organizm, wykazujący zootyp. Nie możemy powiedzieć, jak ten przodek wyglądał, gdyż zootyp jest systemem informacji pozycyjnych, który nie musi kodować określonej struktury.

W toku ewolucji zwierząt bezkręgowych, drogą kolejnych duplikacji powstawały nowe geny. Gromadzące się w nich mutacje powodowały zróżnicowanie kodowanych przez nie białek, zwłaszcza w odcinku zmiennym (rys. 3). Nawet struktura homeodomeny, jakkolwiek bardzo konserwatywna, jednak różni się nieco w poszczególnych genach (rys. 4), co wpływa na ich funkcje regulatorowe. Wykazano bowiem, że zamiana jednego zaledwie aminokwasu w homeodomenie może spowodować, że będzie ona rozpoznawała inną sekwencję DNA (Treis-

ma ni współaut. 1989). Także zmiany w niektórych konserwatywnych odcinkach poza homeodomeną wpływają na specyficzność wiązania z DNA. W miarę jak przybywało genów z homeoboksem, mogła się zwiększać precyzja regulacji procesów rozwojowych. Warto dodać, *Drosophila* ma bardziej skomplikowany układ tych genów (rozbiecie na dwa kompleksy: ANT-C i BX-C) niż chrząszcz *Tribolium castaneum*, u którego występuje tylko jeden kompleks, podobnie jak u niższych zwierząt (Stuart i współaut. 1991). Natomiast ewolucji kręgowców towarzyszyły (lub ją poprzedziły) kilkakrotne duplikacje już nie pojedynczych tylko genów ale całego kompleksu HOX, gdyż u niższych kręgowców, podobnie jak u ssaków, występują już 4 takie kompleksy (rys. 5). Widocznie dopiero z wielokrotniony zestaw informacji pozycyjnych i regulacyjnych umożliwił zaprogramowanie rozwoju tak skomplikowanych organizmów, jak kręgowce. Odkrycia ostatnich lat otworzyły więc fascynujący nowy rozdział badań genetycznych nad ewolucją genów kierujących rozwojem.

HOMEODOMAIN GENES AND ANIMAL EVOLUTION

Summary

Genetic studies revealed that many genes regulating development in the fruit fly *Drosophila melanogaster* contain a short DNA fragment (180 bp), called the homeobox. It codes for a protein domain (homeodomain) that binds to a specific DNA sequence in the target gene, regulating its expression. In the fruit fly, main homeobox genes are tightly linked in two complexes (ANT-C and BX-C) on chromosome 3. The position of each gene in the cluster is colinear with its expression along the antero-posterior axis of the body: expression of the first gene at the 3' end of the cluster commences at anterior body levels of the embryo, and for each gene moving along the chromosome in the 5' direction, the expression commences at a more posterior level. With the aid of DNA probes complementary to the homeobox sequence, homeobox genes were discovered in other animals. In the mouse and man (and probably in all vertebrates) there are four homeobox gene clusters, each on a different chromosome and each showing homology to combined ANT-C and BX-C complexes in *Drosophila*, with a similar pattern of expression. The arrangement of homeobox genes is highly conserved in evolution. The cluster of at least five homeobox genes with antero-posterior spatial expression has been found in animals belonging to many different phyla, from the most primitive metazoans (cnidarians) to vertebrates. Consequently, possession of this specific set of homeobox genes involved in pattern formation has been proposed as the character the zootype defining the kingdom *Animalia* (Slack J. M. W., Holland, P. H. and Graham C. F. 1993 *Nature* 361, 490-442).

LITERATURA

- Akam M., 1991. *Wondraus transformation*. *Nature* 349, 282.
Alberts B., Brav D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D., 1989. *Molecular Biology of the Cell. II ed.*, Garland Publishing Inc., New York and London.
Balling R., Mütter G., Gruss P., Kessel M., 1989. *Craniofacial abnormalities induced by ectopic expression of the homeobox gene Hox-1.1 in transgenic mice*. *Cell* 58, 337-347.

- Biggin M. D., Tjian R., 1989 a. *A purified Drosophila homeodomain protein represses transcription in vitro*. Cell 58, 433–440.
- Biggin M. D., Tjian R., 1989 b. *Transcription factors and the control of Drosophila development*. Trends in Genetics 5, 377–383.
- Biliński S., 1992. *Powstawanie i depozycja matczynych czynników rozwojowych w oocytach bezkręgowców*. Postępy Biologii Komórki 19, 23–34.
- Chisaka O., Capecchi M. R., 1991. *Regionally restricted developmental defects resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene *hox-1.5**. Nature 350, 473–479.
- De Robertis E. M., Oliver G., Wright C. V. E., 1990. *Homeobox genes and the vertebrate body plan*. Scientific American 263, 26–32.
- Duboule D., Dollé P., Gaunt S. J., 1990. *Les genes du developpement des mammiferes*. La Recherche 21, 294–303.
- Gehring W. J., 1987. *Homeoboxes in the study of development*. Science 236, 1245–1252.
- Han K., Levine M., Manley J. L., 1988. *Synergistic activation and repression of transcription by Drosophila homeobox proteins*. Cell 56, 573–583.
- Harvey R. P., Melton D. A., 1988. *Microinjection of synthetic Xhox-1A homeobox mRNA disrupts somite formation in developing Xenopus embryos*. Cell 53, 687–697.
- Ingham P. W., 1988. *The molecular genetics of embryonic pattern formation in Drosophila*. Nature 335, 25–34.
- Kenyon C., Wang B., 1991. *A cluster of Antennapedia-class homeobox genes in a nonsegmented animal*. Science 253, 516–517.
- Kindhauser M.-K., 1986. *Przełom w biologii rozwoju*. Wszechświat 87, 1–5.
- Kissinger C., Liu B., Martin-Blanco E., Kronberg T., Pabo C., 1990. *Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: A framework for understanding homeodomain-DNA interactions*. Cell 63, 579–590.
- Krumlauf R., 1992. *Evolution of the vertebrate Hox homeobox genes*. BioEssays 14, 245–252.
- Krzanowska H., 1987. *Ewolucja genów*. Kosmos 36, 297–313.
- Levine M., Rubin G. R., Tjian R., 1984. *Human DNA sequences homologous to a protein coding region conserved between homeotic genes of Drosophila*. Cell 38, 667–673.
- Lewis E., 1978. *A gene complex controlling segmentation in Drosophila*. Nature 276, 565–570.
- McGinnis W., Hart C. P., Gehring W. J., Ruddle F. H., 1984a. *Molecular cloning and chromosome mapping of a mouse DNA sequence homologous to homeotic genes of Drosophila*. Cell 38, 675–680.
- McGinnis W., Levine M. S., Hafen E., Kuroiwa A., Gehring W. J., 1984b. *A conserved DNA sequence in homeotic genes of the Drosophila Antennapedia and bithorax complexes*. Nature 308, 428–433.
- Miller D. J., Miles A., 1993. *Homeobox genes and the zootype*. Nature 361, 490–492.
- Slack J. M. W., Holland P. W. H., Graham C. F., 1993. *The zootype and the phylotypic stage*. Nature 361, 490–492.
- Stuart J., Brown S., Beeman R., Denell R., 1991. *A deficiency of the homeotic complex of the beetle Tribolium*. Nature 350, 72–74.
- Treisman J., Gonczy P., Vashishtha M., Harris E., Desplan C., 1989. *A single amino acid can determine the DNA binding specificity of homeodomain proteins*. Cell 59, 553–562.
- Vogels R., De Graaff W., Deschamps J., 1990. *Expression of the murine homeobox-containing gene Hox-2.3 suggests multiple time-dependent and tissue-specific roles during development*. Development 110, 1159–1168.
- Vollbrecht E., Veit B., Sinha N., Hake S., 1991. *The developmental gene Knotted-1 is a member of a maize homeobox gene family*. Nature 350, 241–243.
- Wright C. V. E., Cho K. W. Y., Hardwicke J., Collins R. H., De Robertis E. M., 1989. *Interference with function of a homeobox gene in Xenopus embryos produces malformations of the anterior spinal cord*. Cell 59, 81–93.