

Die genetische Regulation der Enzymsynthese

VON DR. P. STARLINGER

INSTITUT FÜR GENETIK DER UNIVERSITÄT KÖLN

Ein Bakterium würde für alle ihm möglichen Stoffwechselleistungen sehr viele Enzyme brauchen. Eine sinnvolle Regulation ermöglicht es ihm, im wesentlichen nur diejenigen Enzyme herzustellen, die unter den jeweils herrschenden Umweltbedingungen benötigt werden. An dieser Regulation ist der genetische Apparat beteiligt. Man unterscheidet Struktur-Gene (welche die Struktur der Enzyme bestimmen), Regulator-Gene (die wahrscheinlich Repressoren synthetisieren) und Operator-Gene (die vermutlich Angriffspunkte der Repressoren sind). Die Repressoren müssen inaktiviert werden, wenn ein Enzym synthetisiert werden soll. Das Zusammenspiel der Gene und der von ihnen abhängigen Substanzen wird beschrieben.

Einleitung

Viele Bakterien sind in der Lage, in chemisch sehr unterschiedlicher Umgebung zu wachsen und sich zu vermehren. Das Bakterium *Escherichia coli* z. B. ist ein Bewohner des Dickdarmes der Säugetiere. Dort findet es Abbauprodukte der tierischen Nahrung, die es für seinen eigenen Stoffwechsel verwenden kann. Die Sauerstoffversorgung des Dickdarmes ist schlecht, daher ist das Bakterium im Darm auf einen vorwiegend anaeroben Stoffwechsel angewiesen.

Im Laboratorium läßt sich *E. coli* auch in anderen Medien züchten, im einfachsten Fall in einer Lösung anorganischer Salze, unter denen sich eine Stickstoffquelle, sowie eine Energie- und Kohlenstoffquelle befinden muß. Ein derartiges Medium wird Minimalmedium genannt. Energiequelle können verschiedene organische Substanzen, darunter Kohlenhydrate, Alkohole und Carbonsäuren sein.

Das Bakterium *E. coli* kann aus den wenigen Bestandteilen des Minimalmediums seine gesamte Körpersubstanz aufbauen. Es muß etwa 20 Aminosäuren synthetisieren und diese zu Protein weiterverarbeiten. Außerdem werden Nucleinsäurebausteine, Zellwandbestandteile, Vitamine und andere Substanzen benötigt. Alle diese Moleküle werden in mehreren Stufen hergestellt („biochemische Reaktionsketten“), und jeder Syntheseschritt wird durch ein Enzym katalysiert. *E. coli* kann die Enzyme für alle wichtigen biochemischen Reaktionsketten selbst herstellen.

Diesem aufbauenden oder anabolischen Stoffwechsel kann man den abbauenden oder katabolischen Stoffwechsel gegenüberstellen. Seine Aufgabe ist u. a. die Umwandlung von Energie- und Kohlenstoffquellen in die zur Biosynthese benötigten Vorstufen. Zwischen dem anabolischen und dem katabolischen Stoffwechsel gibt es einen charakteristischen Unterschied: Bei den anabolischen Reaktionsketten ist das Endprodukt definiert. Die Anfänge der Reaktionsketten verlieren sich im Netzwerk des intermediären Stoffwechsels. Erst von bestimmten Verzweigungspunkten an werden sie eindeutig. — Bei den katabolischen Reaktionsketten liegt der Anfangspunkt fest. Hier verliert sich das Ende der Reaktionskette im intermediären Stoffwechsel. Die Verbindungen

im intermediären Stoffwechsel erfüllen also eine zweifache Aufgabe. Sie dienen als Vorstufen zur Biosynthese und sie sind Durchgangs- oder Endstufen des energieliefernden Abbaues. Man hat sie dieser Doppelfunktion wegen als „amphibolische Metabolite“ bezeichnet [1].

Die Zahl der Enzyme, die das Bakterium für diese Funktionen benötigt, liegt vermutlich in der Größenordnung von Tausend. Würden alle diese Enzyme zur gleichen Zeit und in etwa gleichen Mengen gebildet, so könnte die Zelle von jedem Enzym nur wenige Moleküle besitzen. Die chemischen Reaktionen in der Zelle wären dann sehr langsam. In Wirklichkeit teilt sich *E. coli* in einem guten Nährmedium in 20 Minuten einmal und verdoppelt in dieser Zeit seine Masse. Dies wird durch eine sinnreiche Regulation der Enzymsynthese ermöglicht. Sie sorgt dafür, daß die Zelle nur diejenigen Enzyme herstellt, die unter den herrschenden Umweltbedingungen benötigt werden.

1. Regulation der Enzymsynthese

Viele katabolische Enzyme werden nur dann gebildet, wenn das Substrat für diese Enzyme im Nährmedium vorhanden ist. Diese Regulation wurde früher als „enzymatische Adaptation“ bezeichnet [2]. Heute bevorzugt man den Ausdruck „induzierbare Enzymsynthese“ [3]. Auch die Bildung der anabolischen Enzyme kann die Zelle regulieren [4–6]. Aus weiter unten zu besprechenden Gründen wird diese Regulation als „reprimierbare Enzymsynthese“ bezeichnet.

- [1] B. D. Davis, Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol. 26, 1 (1961).
- [2] H. Karrstrom, Ergebn. Enzymforsch. 7, 350 (1938).
- [3] J. Monod, Angew. Chem. 71, 685 (1959).
- [4] J. Monod u. G. Cohen-Bazire, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 236, 530 (1953).
- [5] H. J. Vogel, Proc. nat. Acad. Sci. USA 43, 491 (1957).
- [6] H. J. Vogel, in: The Chemical Basis of Heredity. John Hopkins Press, Baltimore, 1957, S. 686.

a) Induzierbare Enzymsynthese

Ein gut untersuchtes Beispiel ist die Bildung der β -Galactosidase (dieses Enzym spaltet β -Galactoside, darunter die in der Natur häufig vorkommende Lactose). Läßt man die Bakterien in Abwesenheit eines β -Galactosides wachsen, so finden sich in den Zellen nur Spuren des Enzyms (etwa 0,5–5 Moleküle pro Zelle). In einem lactose-haltigen Nährmedium bilden die Zellen die zehntausendfache Menge des Enzyms. Die Lactose wirkt als „Induktor“ der Enzymsynthese. Die Induktion der β -Galactosidase ist von *Monod* und seinen Mitarbeitern sehr genau untersucht und 1959 in dieser Zeitschrift besprochen worden [3]. Drei wichtige Ergebnisse dieser Untersuchungen seien hier noch einmal zusammengefaßt:

1. Außer der Lactose zeigen auch andere Stoffe eine Induktoreiwirkung, d. h. auch in ihrer Gegenwart wird β -Galactosidase gebildet. Alle Induktoren sind der Lactose sterisch ähnlich. Dagegen sind nicht alle Induktoren auch Substrate für die β -Galactosidase. Einige gute Induktoren besitzen nicht einmal eine meßbare Affinität zum Enzym. Sie können also keinen Enzym-Induktorkomplex bilden. Anscheinend wirkt der Induktorkomplex nicht direkt auf die Enzymmoleküle ein [7].

2. Nach der Zugabe des Induktors zu einer wachsenden Bakterienkultur werden die β -Galactosidase-Moleküle *de novo* aus Aminosäuren aufgebaut. Die Induktoreiwirkung besteht also nicht in der Aktivierung einer Enzymvorstufe, wie man sie von der Umwandlung des Trypsinogens in das Trypsin kennt. Vielmehr scheint der Induktorkomplex einen Einfluß auf die Synthese des Enzyms auszuüben [8].

3. β -Galactoside gelangen durch aktiven Transport in das Zellinnere. Verantwortlich für diesen Transport ist die Galactosid-Permease. Wahrscheinlich ist die Permease ein Enzym oder eine Gruppe von Enzymen. Die Wirkung der Permease läßt sich an der Aufnahme radioaktiver Galactoside in das Zellinnere messen. Die Permease ist ebenfalls induzierbar. Ihre Bildung wird durch die gleichen Induktoren angeregt, wie die Bildung der β -Galactosidase. Ein Induktorkomplex beeinflußt also die Bildung mehrerer Enzyme der gleichen Reaktionskette. (Die Reaktionskette besteht hier aus zwei Schritten: der Aufnahme der Galactoside in die Zelle und der hydrolytischen Spaltung. Die Spaltungsprodukte werden in Reaktionsketten abgebaut, die unter der Kontrolle anderer Induktoren stehen.)

Die hier mitgeteilten Befunde gelten auch für die Enzyme anderer katabolischer Reaktionsketten. Es scheint sich also um allgemeine Gesetzmäßigkeiten bei der Regulation katabolischer Enzyme zu handeln.

b) Die reprimierbare Enzymsynthese

1953 fanden *Monod* und *Cohen-Bazire* [4], daß die Synthese der Tryptophan-Synthetase durch das Produkt der von ihr katalysierten Reaktion, das Tryptophan, gehemmt wird. Ähnliche Effekte wurden bei anderen En-

[7] *J. Monod u. M. Cohn*, *Adv. Enzymol.* 13, 67 (1952).

[8] *D. S. Hogness, M. Cohn u. J. Monod*, *Biochim. biophysica Acta* 16, 99 (1955).

zymen beobachtet. *Vogel* führte für die Hemmung der Enzymsynthese durch das niedermolekulare Produkt der Enzymreaktion den Namen „Repression“ ein [5, 6]. In vielen Fällen werden die Enzyme einer Reaktionskette gemeinsam reprimiert [5, 6, 9].

Ein gut untersuchtes Beispiel ist die Repression der Enzyme, die an der Biosynthese des Arginins beteiligt sind. Wenn Zellen von *E. coli* in einem arginin-haltigen Nährmedium wachsen, werden alle sieben Enzyme der Arginin-Synthese nur noch in verschwindenden Mengen gebildet. Das Arginin-Molekül besitzt nur zum letzten der sieben Enzyme eine meßbare Affinität. Sein Einfluß auf die Synthese der Enzyme muß also indirekt sein. Zwischenprodukte der Arginin-Synthese, z. B. N-Acetyl-glutaminsäure oder Ornithin, sind wirkungslos. Sie unterdrücken nicht einmal die Synthese der Enzyme, von denen sie gebildet werden. Der Effekt ist also sehr spezifisch.

Mit radioaktiv markierten Verbindungen konnten *Yates* und *Pardee* zeigen, daß nach dem Aufhören der Repression die Enzyme aus den Aminosäuren neu aufgebaut werden. Wie die Induktion beeinflußt also auch die Repression die Synthese der Enzyme, nicht ihre Aktivität [10].

2. Genetische Einflüsse auf die Synthese der Enzyme

Die Fähigkeit zur Enzymsynthese ist eine erbliche Eigenschaft. Gelegentlich können erbliche Eigenschaften durch Mutation verändert werden. Die neu erworbene Eigenschaft ist dann ebenfalls erblich. Zellen, die eine Mutation tragen, bezeichnet man als Mutanten. Mutationen, die die Enzymsynthese verändern, seien wieder am Beispiel der β -Galactosidase und der Permease besprochen:

Man kennt mehrere Mutanten, die keine β -Galactosidase mehr bilden können, die aber nicht identisch sind. Manche Mutanten stellen ein Protein her, das der β -Galactosidase noch sehr ähnlich ist, β -Galactoside aber nicht mehr spalten kann. In anderen Mutanten läßt sich dagegen überhaupt kein Protein mehr nachweisen, das eine Ähnlichkeit mit β -Galactosidase zeigt. Beide Mutanten können aber noch Galactosid-Permease herstellen und damit Galactoside in das Zellinnere aufnehmen. Daneben gibt es Mutanten, die keine Permease mehr synthetisieren aber β -Galactosidase bilden können. Eine Mutation beeinflußt im allgemeinen also nur ein Enzym [11].

a) Struktur-Gene

Man nimmt heute an, daß für jedes Enzym eine Erbinheit verantwortlich ist, die man Gen nennt. Zwischen der Struktur des Gens und der Struktur des Enzyms besteht ein Zusammenhang: Die Anteile der Proteinstruktur werden durch Anteile des Gens determiniert. Daher können Mutationen in verschiedenen Anteilen des Gens

[9] *L. Gorini u. W. K. Maas*, *Biochim. biophysica Acta* 25, 208 (1957).

[10] *R. A. Yates u. A. B. Pardee*, *J. biol. Chemistry* 227, 677 (1957).

[11] *F. Jacob u. J. Monod*, *J. molecul. Biol.* 3, 318 (1961).

verschiedene Veränderungen im Protein hervorrufen. Gene, die Einzelheiten der Struktur eines Enzyms festlegen, nennt man Struktur-Gene.

Von den Struktur-Genen, die den Aufbau der β -Galactosidase und der Galactosid-Permease bestimmen, wird im Folgenden wiederholt gesprochen werden. Es lohnt sich daher, abkürzende Symbole einzuführen. Das Gen für die Bildung der Galactosidase heißt z . Liegt es in der Normal- oder Wildform vor, so wird es z^+ genannt. Eine Zelle mit dem z^+ -Gen kann β -Galactosidase herstellen. Durch Mutation kann das z -Gen unfähig zur Herstellung der β -Galactosidase werden. Man bezeichnet es dann als z^- . Es gibt mehrere Mutationen zum Zustand z^- .

Das Permease-Gen heißt y . Zellen mit dem Gen y^+ können Permease synthetisieren. Mutationen zum Zustand y^- machen die Zelle zur Permease-Herstellung unfähig.

b) Regulator-Gene

Neben Mutationen in den Struktur-Genen gibt es andere Mutationen, die die Bildung der β -Galactosidase und der Permease beeinflussen. Diese Mutationen greifen in die Regulation der Enzymsbildung ein: Normalerweise werden beide Enzyme nur in Gegenwart eines Induktors gebildet. Es gibt aber Mutanten, die beide Enzyme auch in Abwesenheit eines Induktors synthetisieren können. Man nennt die Synthese eines Enzyms in Abwesenheit eines Induktors „konstitutiv“.

Die β -Galactosidase aus „konstitutiven“ Mutanten zeigt keinen Unterschied zu dem Enzym, das in induzierbaren Zellen vorkommt. Die Mutation induzierbar \rightarrow konstitutiv beeinflußt also lediglich die Kontrolle der Enzymsynthese. Das Enzym selbst bleibt unverändert. Für die Regulation der Enzymsynthese gibt es demnach ein eigenes Gen. Dieses Gen wird Regulator-Gen genannt.

Das Regulator-Gen für die β -Galactosidase und Permease heißt i . Im Wildtyp liegt es in der Form i^+ vor. Zellen mit dem Gen i^+ sind für beide Enzyme induzierbar, sie bilden die Enzyme nur in Gegenwart eines Induktors. Die Mutation nach i^- macht die Zellen für beide Enzyme konstitutiv. Die Mutanten bilden die beiden Enzyme auch in Abwesenheit des Induktors [12]. Bei den anabolischen Reaktionsketten führt die Mutation im Regulator-Gen zur Aufhebung der Repression durch das Endprodukt der Reaktionskette. Die Mutanten bilden die Enzyme auch in Anwesenheit dieses Endproduktes [11, 13–15].

c) Lokalisation der Gene

Wir haben Gene bisher an Hand ihrer Wirkungen beschrieben. Sie lassen sich auch als getrennte Einheiten in der Zelle lokalisieren.

[12] M. Cohn u. J. Monod, in E. R. Gale u. F. Davies: 3rd Symposium Soc. Gen. Microbiol. Cambridge University Press, 1953, S. 132.

[13] G. N. Cohen u. F. Jacob, C.R. hebd. Séances Acad. Sci. 248, 3490 (1959).

[14] L. Gorini, W. Gundersen u. M. Burger, Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol. 26, 173 (1961).

[15] W. K. Maas, Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol. 26, 183 (1961).

Bei höheren Organismen (Pflanzen und Tieren) sind die Gene auf mikroskopisch sichtbaren Strukturen (Chromosomen) angeordnet. In Bakterien kann man mit dem Mikroskop keine Chromosomen erkennen. Genetische Daten deuten aber darauf hin, daß die Gene auch bei Bakterien auf einer linearen Struktur angeordnet sind. Man nennt auch diese Struktur ein „Chromosom“, obgleich sie morphologisch noch nicht bekannt ist, und man daher nicht weiß, ob sie mit den Chromosomen höherer Organismen Ähnlichkeit hat.

E. coli-Zellen können sich miteinander paaren: Zwischen den Zellen bildet sich eine Brücke aus Zellsubstanz, durch die sich das Chromosom der einen Zelle langsam in die andere Zelle hineinschiebt. Im allgemeinen trennen sich die Zellen wieder, bevor dieser Vorgang beendet ist. Das wandernde Chromosom bricht dann in zwei Stücke, von denen sich das eine noch in der Donorzelle, das andere in der Rezeptorzelle befindet. Die Rezeptorzelle enthält also kurz nach der Paarung oder „Konjugation“ ihr eigenes intaktes Chromosom und das Chromosomenfragment vom Konjugationspartner [16].

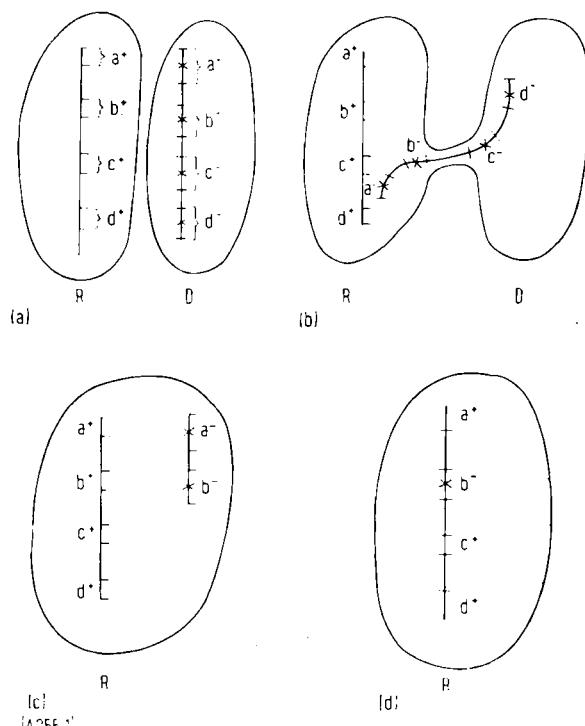


Abb. 1. Konjugation und genetische Rekombination bei *E. coli*.

a) Rezeptorzelle (R) und Donorzelle (D) vor der Paarung. Das Chromosom der Rezeptorzelle trägt die vier Gene a^+ , b^+ , c^+ und d^+ . Auf dem Chromosom der Donorzelle sind die vier Gene mutiert und werden als a^- , b^- , c^- und d^- bezeichnet.

b) Konjugation. Die beiden Zellen haben sich gepaart. Zwischen den Zellen befindet sich eine Brücke aus Zellplasma gebildet, durch die sich das Chromosom der Donorzelle in die Rezeptorzelle schiebt.

c) Zustand der Rezeptorzelle nach der Trennung. Die beiden Zellen haben sich getrennt, bevor das Chromosom des Donors vollständig in die Rezeptorzelle gelangt war. Das Donorchromosom ist bei der Trennung der Zellen zerbrochen. Ein Fragment befindet sich jetzt in der Rezeptorzelle.

d) Rekombination. Ein Stück des Donorchromosoms mit dem Gen b^- ist in das Chromosom des Rezeptors eingebaut worden. Der Rest des Chromosoms ist aus dem Rezeptorzell-Chromosom verloren gegangen.

[16] F. Jacob u. E. L. Wollman: Sexuality and the Genetics of Bacteria. Academic Press, New York 1961.

Das Chromosomenfragment wird von der Rezeptorzelle normalerweise nicht auf ihre Tochterzellen vererbt. Es gibt aber einen Vorgang („Rekombination“), bei dem Gene vom Fragment auf das intakte Chromosom übertragen werden. Der Mechanismus der Rekombination ist noch unbekannt, ihre Folgen aber kann man beschreiben: Nach der Rekombination verhält sich das Chromosom so, als hätte es ein Stückchen seines eigenen Materials verloren und an dessen Stelle ein entsprechendes Stückchen aus dem Chromosomenfragment übernommen (Abb. 1).

Zwei Gene, die auf dem Chromosomenfragment nahe beieinander liegen, werden häufiger gemeinsam auf das Chromosom der Rezeptorzelle übertragen als Gene, die weit voneinander entfernt sind.

Die Häufigkeit, mit der Gene bei der Rekombination voneinander getrennt werden, ist ein Maß für ihre Entfernung voneinander auf dem Chromosom. Die Rekombination nimmt keine Rücksicht auf die Grenzen der Gene. Das Stückchen des Chromosomenfragments, das bei der Rekombination in das Chromosom der Rezeptorzelle eingebaut wird, endet nicht notwendigerweise an der Grenze eines Gens, sondern kann mitten in einem Gen beginnen oder enden. So können auch verschiedene An- teile des gleichen Gens miteinander rekombiniert werden.

3. Die Funktion der Regulator-Gene

Struktur-Gene bestimmen die Einzelheiten der Enzymstruktur. Für die Regulator-Gene ist ein ähnliches „Genprodukt“ noch nicht bekannt. Die genetische Analyse kann aber indirekte Aufschlüsse über die Wirkungsweise der Regulator-Gene geben. Wir betrachten dies wieder am Beispiel der β -Galactosidase und der β -Galactosidase-Permease.

Durch bakterielle Konjugation kann man in eine Rezeptorzelle ein Chromosomenfragment aus einer Donorzelle einführen. Man kann es nun so einrichten, daß sich auf dem Chromosom der Rezeptorzelle ein z^+ -Gen, auf dem Chromosomenfragment dagegen ein z^- -Gen befindet [*]. Das z^+ -Gen sorgt für die Bildung der biologisch wirksamen β -Galactosidase. Das z^- -Gen kann keine β -Galactosidase hervorbringen. Das z^- -Gen stört aber das z^+ -Gen nicht in seiner Tätigkeit. Es genügt daher, daß ein z^+ -Gen in der Zelle vorhanden ist, damit das Enzym gebildet wird.

Eine derartige Analyse kann man auch für das i -Gen durchführen [17]. Durch bakterielle Konjugation läßt es sich erreichen, daß sich in der gleichen Zelle ein i^+ -Gen und ein i^- -Gen befindet. Diese Zellen sind induzierbar, d. h. sie bilden die β -Galactosidase nur in Gegenwart der Lactose oder eines anderen Induktors. Das i^+ -Gen ist also dominant über das i^- -Gen. Nach heuti-

[*] Es macht prinzipiell nichts aus, welches der beiden Gene sich auf dem intakten Chromosom und welches sich auf dem Fragment befindet. Feinere Unterschiede werden der Einfachheit halber vernachlässigt.

[17] A. B. Pardee, F. Jacob u. J. Monod, J. molecular Biol. 1, 165 (1959).

ger Vorstellung bedeutet dies, daß das i -Gen im i^+ -Zustand ein biologisch wirksames Produkt herstellt, das die Synthese der Galactosidase und der Permease hemmt. Der Induktor muß diesen Hemmstoff oder „Repressor“ inaktivieren (Abb. 2a, b). Die Mutation nach i^- macht die Bildung des Repressors unmöglich. Die Zellen können dann auch ohne Induktor die Enzyme bilden (Abb. 2d).

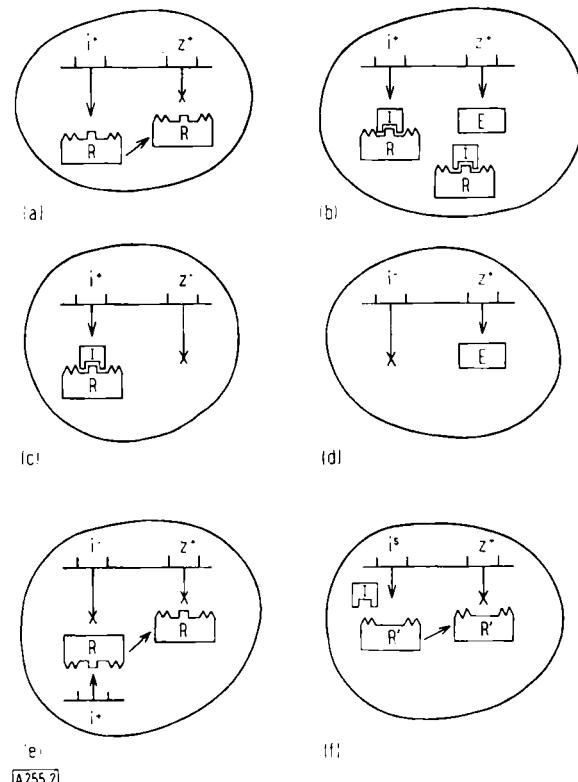


Abb. 2. Wirkungsweise des Struktur-Gens z und des Regulator-Gens i (Schematische Darstellung).

- Das i^+ -Gen sorgt für die Bildung des Repressors R. Dieser hindert das z^+ -Gen an der Herstellung des Enzyms.
- Der Repressor R ist durch einen niedermolekularen Induktor I inaktiviert worden. Das z^+ -Gen kann das Enzym E synthetisieren.
- Der Repressor ist durch den Induktor inaktiviert worden. Das z -Gen trägt aber eine Mutation zum Zustand z^- . Daher wird kein funktionsfähiges Enzym hergestellt.
- Die Mutation des i -Gens nach i^- verhindert die Synthese des Repressors. Daher kann das z^+ -Gen auch in Abwesenheit des Induktors Enzym herstellen.
- Die Bakterienzelle hat eine Konjugation durchgemacht. Dabei ist ein Chromosomenfragment in die Zelle eingeführt worden, das das i^+ -Gen trägt und den Repressor herstellt. Der Repressor hindert das z^+ -Gen an seiner Aktivität. Enzym wird nicht synthetisiert.
- Die Mutation des i -Gens nach i^- verändert den Repressor so, daß er nicht mehr mit dem Induktor reagieren kann. Daher wird jetzt auch in Gegenwart des Induktors kein Enzym mehr gebildet.

Diese Hypothese erklärt auch die Tatsache, daß Stoffe mit guter Induktorkwirkung keine Affinität zum Enzym besitzen müssen. Nach den Annahmen von *Pardee, Jacob und Monod* müßte vielmehr eine Affinität zum Repressor vorhanden sein. Diese kann man aber zur Zeit noch nicht prüfen, da Repressor-Substanzen bisher noch nicht isoliert worden sind.

Bei der Repression der anabolischen Enzyme ist die Situation ähnlich: Auch hier ist die Reprimierbarkeit dominant über die Nicht-Reprimierbarkeit, der Repressor wird offenbar auch hier unter der Kontrolle des

Regulator-Gens hergestellt. Er ist aber unwirksam, so lange er nicht mit einem kleinen Molekül, nämlich mit dem Endprodukt der Reaktionskette, reagiert hat [13]. Man bezeichnet Stoffwechselprodukte, welche die Synthese ihrer Enzyme unterdrücken, daher auch als Corepressoren.

Eine weitere Mutation im Regulator-Gen

Neben den Mutationen i^+ und i^- gibt es noch eine Mutation i^0 . Sie wurde von *Jacob, Monod* und Mitarbeitern nachgewiesen [18]. In i^0 -Mutanten kann die Bildung der β -Galactosidase und der Permease nicht mehr induziert werden. Weder Lactose noch ein anderer Induktor vermag in diesen Mutanten die Bildung der beiden Enzyme anzuregen. *Jacob* und *Monod* nehmen an, daß die Mutation nach i^0 zu einer Veränderung des Repressors führt, die ihn unfähig macht, mit dem Induktor zu reagieren. Der Repressor ist aber noch in der Lage, die Bildung der Enzyme zu blockieren (Abb. 2f). Erwartungsgemäß ist das Gen i im Zustand i^0 dominant über i^+ und i^- .

4. Die Wirkungsweise des Repressors

Auf Grund dieser Befunde machten *Monod* und *Jacob* einige Voraussagen über die Wirkungsweise des Repressors, die sie durch Experimente stützen konnten:

Der Repressor ist sehr spezifisch. Der unter dem Einfluß des i -Gens gebildete Repressor beeinflußt ausschließlich die β -Galactosidase und die β -Galactosid-Permease. Dies ist nur zu erklären, wenn man annimmt, daß der Repressor mit einer anderen Struktur reagiert, um seine Wirkung zu entfalten. Diese Struktur muß ebenfalls spezifisch sein, sonst würde sie mit jedem beliebigen Repressor reagieren. Außerdem muß sie etwas mit der Synthese der beiden Enzyme zu tun haben. Aus der negativen, hemmenden Rolle des Repressors folgt also die Existenz einer Struktur, die eine positive, fördernde Rolle bei der Proteinsynthese spielt. *Jacob* und *Monod* nannten diese Struktur den „Operator“. Sie betonten ausdrücklich, es sei nicht die Frage, ob ein solcher Operator existiere, sondern wo und wie er in die Synthese der Enzyme eingreife [19].

a) Operator-Gene

Wenn der Operator eine spezifische Struktur ist, dann muß er unter der Kontrolle eines Gens stehen. Auch das „Operator-Gen“ sollte mutieren können, beispielsweise so, daß der Operator nicht mehr mit dem Repressor reagieren kann. Der Operator sollte dann in jedem Falle die Synthese der von ihm kontrollierten Enzyme gewährleisten, d. h. unabhängig davon, ob Repressoren, Induktoren usw. anwesend sind. Eine solche Mutation im Operator-Gen müßte also zur konstitutiven Enzymsynthese führen und das Merkmal Konstitutivität sollte dominant über das Merkmal Induzierbarkeit sein – im Gegensatz zur Konstitutivität, die durch Mutation im Regulator-Gen hervorgerufen wird.

[18] C. Wilson, D. Perrin, F. Jacob u. J. Monod, unveröffentlicht, zit. nach [22].

[19] F. Jacob u. J. Monod, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 249, 1282 (1959).

Solche Mutanten mit verändertem Operator-Gen sind isoliert worden. Während der Normalzustand des Gens mit o^+ bezeichnet wird, erhält die dominante Mutation zur Konstitutivität das Symbol o^c . Alle o^c -Mutanten bilden ohne Induktor sowohl die β -Galactosidase als auch die Permease. Offenbar gibt es für beide Enzyme nur einen gemeinsamen Operator, wie es für beide auch nur einen gemeinsamen Repressor gibt [19a]. Mit Hilfe der Rekombinantanalyse kann man zeigen, daß das o -Gen auf dem Chromosom dem z -Gen unmittelbar benachbart ist.

Eine andere Mutation macht den Operator unfähig, seine Funktion bei der Synthese der beiden Enzyme auszuüben. Diese Unfähigkeit ist unabhängig von der Anwesenheit des Induktors oder vom Zustand des Regulatorgens i . Die Mutation trägt den Namen o^0 . Erwartungsgemäß ist sie rezessiv gegenüber o^+ oder o^c [19a].

b) Die Wirkungsweise des Operator-Gens

Bisher wurde verschiedentlich untersucht, ob ein Gen dominant oder rezessiv war. Dafür mußte das Gen zweimal in der gleichen Zelle vorhanden sein. Es war bei diesen Erörterungen gleichgültig, auf welchem Chromosom sich das Gen in der Zelle befand. Bei der folgenden Untersuchung kommt es auf die Wechselwirkung zweier Gene an, und hier ist die Position der Gene auf den Chromosomen nicht mehr gleichgültig.

Gene, die sich auf dem gleichen Chromosom befinden, stehen nach der genetischen Nomenklatur in *cis*-Stellung. Gene, die sich auf verschiedenen Chromosomen befinden, sind in *trans*-Stellung.

Das o -Gen wirkt nun offenbar nur, wenn es sich in *cis*-Stellung zum z -Gen befindet. In *trans*-Stellung ist es unwirksam. Man kann dies durch Rekombinantanalyse zeigen: Befindet sich z. B. auf demselben Chromosom ein o^c -Gen und ein z^+ -Gen, so werden β -Galactosidase und Galactosid-Permease auch in Abwesenheit des Induktors synthetisiert.

Man kann es aber auch so einrichten, daß sich in der Rezeptorzelle das o^c -Gen zusammen mit einem z^- -Gen auf dem gleichen Chromosom befindet, und in diese Zelle durch Konjugation ein Chromosomenfragment einführen, auf dem sich o^+ neben z^- befindet. Hier ist (unter dem Einfluß von o^+ und z^-) die Enzymsynthese induzierbar, d. h. nur in Gegenwart eines Induktors möglich. In Abwesenheit des Induktors wird (unter dem Einfluß von o^c und z^-) ein enzymatisch unwirksames Protein gebildet, das der β -Galactosidase ähnelt.

Das Operator-Gen kann also nur auf Gene wirken, die auf dem gleichen Chromosom stehen. Seine Wirkung reicht nicht bis zu einem anderen Chromosom in der gleichen Zelle [19a]. Dieser Befund wirft ein ganz neues Licht auf die Wirkungsweise des Operator-Gens: Wäre das Produkt des Operator-Gens ein vom Gen verschiedener Operator, so müßte man sehr spezielle Annahmen machen, um zu erklären, daß dieser Operator nur auf Gene wirkt, die sich auf dem gleichen Chromosom befinden wie das Operator-Gen. Viel wahrscheinlicher ist es, daß das Operator-Gen selbst die Funktion des

[19a] F. Jacob, D. Perrin, C. Sanchez u. J. Monod, C.R. hebd. Séances Acad. Sci. 250, 1727 (1960).

Operators ausübt. Die Wechselwirkung zwischen Operator-Gen und Struktur-Gen spielt sich nach dieser Annahme auf der Ebene der Gene, nicht der Genprodukte ab.

Diese Annahme läßt sich gut mit den heutigen Vorstellungen über die Wirkungsweise der Struktur-Gene vereinbaren: Gene bestehen aus Desoxyribonucleinsäure (DNS), und die in den Genen enthaltene Information liegt in der Aufeinanderfolge der Nucleotide in der DNS, so wie die Information eines geschriebenen Textes in der Aufeinanderfolge der Buchstaben liegt. Unmittelbares Genprodukt ist eine Ribonucleinsäure (RNS), deren Nucleotidsequenz durch die DNS bestimmt wird. Die DNS dient als Matrize bei der Synthese der RNS. Die RNS wirkt dann ihrerseits als Matrize bei der Proteinsynthese [20, 21]. Monod und Jacob vermuten nun, daß die Bildung der RNS-Moleküle nur an bestimmten Punkten der DNS beginnen kann. Diese Startpunkte sind die Operator-Gene. Der Repressor kann nach dieser Annahme mit dem Operator-Gen reagieren. Durch diese Kombination würde der Startpunkt für die RNS-Synthese blockiert, und damit die Funktion des Gens unmöglich gemacht. Durch die Blockierung eines solchen Startpunktes kann natürlich nur ein Gen ausgeschaltet werden, das sich auf dem gleichen Chromosom befindet (Abb. 3) [22].

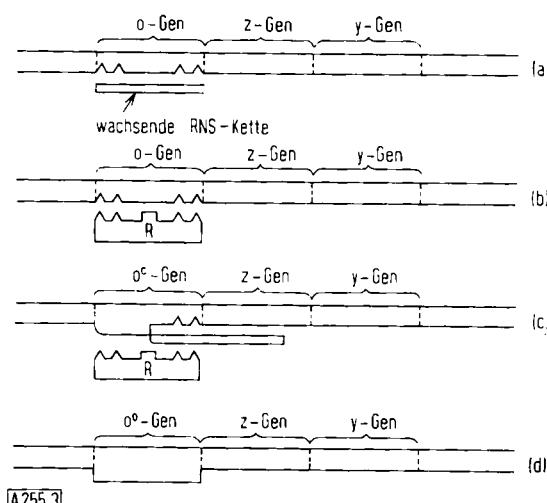


Abb. 3. Wirkungsweise des Operator-Gens.

Die Schemazeichnung stellt einen Ausschnitt aus einem Chromosom dar. Dieser Ausschnitt enthält die Gene σ (Operator-Gen), z (Struktur-Gen der β -Galactosidase) und y (Struktur-Gen der Galactosid-Permease). Die DNS der Gene ist die Matrize für die Synthese der RNS. Die Synthese besteht in der Addition von Nucleotiden an die wachsende Kette. Die Auswahl der Nucleotide übernimmt die Matrize. Die RNS-Kette wächst vom σ -Gen aus.

- a) Normales σ -Gen, kein Repressor anwesend. Die Synthese der RNS an der DNS-Matrize geht ungehemmt vor sich.
- b) σ -Gen durch Repressor blockiert. Keine RNS-Synthese möglich.
- c) σ -Gen mutiert nach σ^c . Der Repressor kann nicht mehr mit dem Operator reagieren. Daher geht die Synthese der RNS an der DNS-Matrize auch in Anwesenheit des Repressors ungestört vor sich.
- d) σ -Gen mutiert nach σ^0 . Auch ohne Repressor ist das σ -Gen durch die Mutation blockiert. Die Synthese der RNS ist nicht mehr möglich.

[20] S. Brenner, F. Jacob u. M. Meselson, Nature (London) 190, 576 (1961).

[21] F. Gros, H. Hiatt, W. Gilbert, C. G. Kurland, R. W. Risborough u. J. D. Watson, Nature (London) 190, 581 (1961).

[22] F. Jacob u. J. Monod, Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol. 26, 193 (1961).

Für die Einheit aus Operator-Gen und den von ihm kontrollierten Struktur-Genen schlugen Monod und Jacob den Namen „Operon“ vor [19a]. Das „Operon“ ist die Einheit der Funktionsausübung.

5. Andere Operone

Es gibt Hinweise darauf, daß die Synthese anderer Enzyme in der gleichen Weise reguliert wird, wie wir es hier für die β -Galactosidase und die Galactosid-Permease beschrieben haben. Aber in keinem anderen System sind so zahlreiche Experimente ausgeführt worden.

1. Bei *E. coli* und dem verwandten Bakterium *Salmonella typhimurium* wurden die Gen-Orte für mehrere biochemische Reaktionsketten auf dem Chromosom bestimmt. Sehr oft sind die Gene für die Enzyme einer Reaktionskette einander benachbart [23]. Dies könnte ein Hinweis auf die Organisation auch dieser Gene in Operonen sein.
2. Die Enzyme für die Biosynthese des Histidins hängen von Genen ab, die einander auf dem Chromosom benachbart sind. Die Bildung dieser Enzyme wird durch das Endprodukt der Reaktionskette, das Histidin, gehemmt. Bei Repression und Derepression bleibt das Mengenverhältnis der Enzyme dieser Reaktionskette stets gleich [24]. Auch dies ist ein Hinweis auf die Organisation der Gene in einem Operon.
3. Der Lactose-Abbau endet mit der Spaltung in Galactose und Glucose. Die Galactose kann in drei Schritten in Glucose umgewandelt werden. Diese drei Enzyme sind induzierbar. Sie werden stets im gleichen Mengenverhältnis gebildet [25]. Lederberg isolierte eine Mutante, die alle drei Enzyme nicht mehr herstellen kann. Es könnte sich um eine Mutation im Operator-Gen handeln, die der σ^0 -Mutation entspricht [26]. Buttin isolierte eine Mutante, die alle drei Enzyme konstitutiv synthetisiert. Die Mutation ist dominant über den Wildtyp mit induzierbarer Enzymsynthese. Es scheint sich um eine Mutation zu handeln, die der Mutation σ^c im β -Galactosid-Operon entspricht [27].

6. Ausblick

Die Experimente von Jacob und Monod und die aus ihnen gewonnenen Folgerungen und Hypothesen haben der genetischen Forschung ein völlig neues Feld eröffnet. Neben den klassischen Struktur-Genen sind die Regulations-Genen getreten, die ein sinnvolles Zusammenspiel im Stoffwechsel der Zelle ermöglichen. Es ist noch

[23] M. Demerec u. P. Hartman, Ann. Rev. Microbiol. 13, 377 (1959).

[24] B. N. Ames u. B. Garry, Proc. nat. Acad. Sci. USA 45, 1453 (1959).

[25] M. Yarmolinsky, E. Jordan u. H. Wiesmeyer, Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol. 26, 217 (1961).

[26] E. Lederberg in: W. Hayes u. R. C. Clowes, 10th Symposium Soc. Gen. Microbiol. Cambridge University Press, S. 115.

[27] G. Buttin, Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol. 26, 213 (1961).

nicht abzusehen, wie sich dieses Forschungsgebiet entwickeln wird. Sicher wird es für den Chemiker sehr reizvoll sein, Repressoren zu isolieren und ihre Wirkungsweise zu erforschen. Eine besonders wichtige Frage ist es, ob sich ähnliche Zusammenhänge auch bei höheren Organismen finden, oder ob sie auf die Bakterien beschränkt sind. Beim Pilz *Neurospora crassa* wurden Regulator-Gene beschrieben [28]. Monod und Jacob wiesen bereits darauf hin, daß die Regulations-Gene besser als die Struktur-Gene geeignet sind, um die komplizierten Vorgänge der Differenzierung und auch des malignen Wachstums bei höheren Organismen zu beschreiben.

7. Terminologie

bakterielle Konjugation	parasexueller Vorgang bei Bakterien. Zwei Bakterienzellen paaren sich, und die Donorzelle überträgt ein Stück ihres Chromosoms auf die Rezeptorzelle. Als Technik verwendet zur Prüfung von → Dominanz und Positionseffekten (→ cis-Position, → trans-Position)	konstitutiv	Enzmysynthese findet auch in Abwesenheit eines Induktors statt. Konstitutivität wird hervorgerufen durch Mutation im → Regulator-Gen oder im → Operator-Gen. → Operator-Gen für die Synthese der β -Galactosidase und der Galactosid-Permease.
cis-Position	Zwei Gene befinden sich in cis-Position, wenn sie auf dem gleichen Chromosom lokalisiert sind.	Operator-Gen	Mutationszustände: o ⁺ normales Operator-Gen o ^c Operator-Gen übt seine Funktion bei der Proteinsynthese noch aus, reagiert aber nicht mit dem Repressor o ⁰ Operator-Gen übt seine Funktion bei der Enzmysynthese nicht mehr aus.
Corepressor	Endprodukt einer anabolischen Reaktionskette. Unterdrückt die Bildung der Enzyme dieser Kette. Wirkt wahrscheinlich durch Aktivierung des → Repressors.	Operon	Gestattet die Tätigkeit mehrerer, ihm unterstellt → Struktur-Gene. Wird durch → Repressor inaktiviert. Wirkt nur in → cis-Position zum Struktur-Gen. Vielleicht Startpunkt der genabhängigen RNS-Synthese.
dominant	Befindet sich ein Gen zweimal in verschiedenen Mutationszuständen, in der gleichen Zelle, so zeigt die Zelle im allgemeinen nur die Eigenschaft des einen Mutationszustandes. Dieser heißt dominant.	Regulator-Gen	Einheit der Funktionsausübung, besteht aus → Operator-Gen und nachgeordneten → Struktur-Genen.
i-Gen	Regulator-Gen für die Synthese der β -Galactosidase und der β -Galactosid-Permease. Verantwortlich für die Bildung des → Repressors. Mutationszustände: i ⁺ normaler Repressor i ⁻ kein Repressor i ^s abartiger Repressor.	Rekombination	beeinflußt die Tätigkeit anderer Gene, vermutlich durch Bildung des → Repressors.
Induktor	niedermolekularer Stoff, der die Synthese eines induzierbaren Enzyms ermöglicht. Im allgemeinen: Substrat der Enzymreaktion oder diesem sterisch verwandt. Reagiert vermutlich mit dem → Repressor.	Repressor	hypothetisches Produkt des → Regulator-Gens. Unterdrückt die Enzmysynthese durch Reaktion mit dem → Operator-Gen. Wird durch → Induktor inaktiviert, durch → Corepressor aktiviert.
		rezessiv	Befindet sich ein Gen zweimal in verschiedenen Mutationszuständen in der gleichen Zelle, so zeigt die Zelle im allgemeinen nur die Eigenschaft des einen Mutationszustandes. Der nicht ausgeprägte Mutationszustand heißt rezessiv.
		Struktur-Gen	wirkt bei der Synthese der Enzyme mit und legt die Details der Enzymstruktur fest.
		trans-Position	Zwei Gens befinden sich in trans-Position, wenn jedes von ihnen auf einem anderen Chromosom lokalisiert ist. → Struktur-Gen der Galactosid-Permease.
		y-Gen	Mutationszustände: y ⁺ normale Permeasebildung y ⁻ keine Permeasebildung → Struktur-Gen der β -Galactosidase
		z-Gen	Mutationszustände: z ⁺ normale Galactosidasebildung z ⁻ keine Galactosidasebildung.

[28] N. H. Horowitz, M. Fling, H. MacLeod u. Y. Watanabe, Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol. 26, 233 (1961).