

*La Serie Universitaria de la Fundación Juan March presenta resúmenes, realizados por el propio autor, de algunos estudios e investigaciones llevados a cabo por los becarios de la Fundación y aprobados por los Asesores Secretarios de los distintos Departamentos.*

*El texto íntegro de las Memorias correspondientes se encuentra en la Biblioteca de la Fundación (Castello, 77. Madrid-6).*

*La lista completa de los trabajos aprobados se presenta, en forma de fichas, en los Cuadernos Bibliográficos que publica la Fundación Juan March.*

*Estos trabajos abarcan las siguientes especialidades: Arquitectura y Urbanismo; Artes Plásticas; Biología; Ciencias Agrarias; Ciencias Sociales; Comunicación Social; Derecho; Economía; Filosofía; Física; Geología; Historia; Ingeniería; Literatura y Filología; Matemáticas; Medicina, Farmacia y Veterinaria; Música; Química; Teología. A ellas corresponden los colores de la cubierta.*

Edición no venal 750 ejemplares,  
que se reparte gratuitamente a investigadores,  
Bibliotecas y Centros especializados de toda España.

*Estos trabajos fueron realizados dentro del período de vigencia del Plan Especial de Biología, 1973-1977.*

Fundación Juan March



FJM-Uni 26/27-Gen  
Genética.  
Semana de Biología (Madrid.) 197  
1031723



Biblioteca FJM

Fundación Juan March (Madrid)

SERIE UNIVERSITARIA



Fundación Juan March

# GENÉTICA

I Semana de Biología

Conferencias-coloquio sobre  
Investigaciones biológicas  
1977.

I Semana de Biología: Genética

FJM  
Uni-  
26  
Gen

26



Fundación Juan March  
Serie Universitaria

26

# GENETICA



Antonio Prevosti Pelegrín  
José Antonio Abrisqueta Zarrabe  
Francisco García Olmedo  
Antonio García-Bellido  
Pedro Santamaría Yáñez



Fundación Juan March  
Castelló, 77. Teléf. 225 44 55  
Madrid - 6

Fundación Juan March (Madrid)

*La Fundación Juan March no se solidariza necesariamente con las opiniones de los autores cuyas obras publica.*

**Depósito Legal: M-12660-1977**  
**I.S.B.N.-84-7075-049-6**  
**Ibérica. Tarragona, 34.Madrid-7**

Fundación Juan March (Madrid)

*Los trabajos contenidos en el presente volumen fueron expuestos por sus autores en las conferencias-coloquio celebradas en la Fundación Juan March, dentro de la I Semana de Biología, en abril de 1977, y resumen investigaciones realizadas dentro del período de vigencia del Plan Especial de Biología de la Fundación.*



## INDICE

	Página
I. ESTUDIO GENETICO DE POLIMORFISMOS MOLECULARES EN ESPECIES ANIMALES. . . . .	7
<i>por Antonio Prevosti Pelegrín</i>	
<i>I. Zaragaza Burillo</i>	
<i>A. Rodero Franganillo</i>	
Resultados obtenidos . . . . .	11
Discusión de los resultados y conclusiones . . . . .	15
Bibliografía . . . . .	16
II. CITOGENETICA DE LAS MALFORMACIONES CONGENITAS HUMANAS. . . . .	19
<i>por José Antonio Abrisqueta Zarrabe</i>	
<i>Amalia Pérez</i>	
<i>Clara Goday</i>	
<i>Jesús del Mazo</i>	
<i>Marta Luisa de Torres</i>	
<i>Vitalino Aller</i>	
<i>Marta Angeles Martín</i>	
<i>Angela Casado</i>	
<i>Soledad Carmona</i>	
Introducción . . . . .	21
Desarrollo del proyecto y resultados . . . . .	22
Examen citogenético de probandos afectados de malformaciones congénitas . . . . .	22
Estudio de la frecuencia y tipo de aberraciones cromosómicas en abortos espontáneos . . . . .	24
Análisis de los efectos causados sobre los cromosomas humanos de determinadas sustancias de uso habitual en la terapéutica clínica, con posible acción teratógena . . . . .	24
Estudio cromosómico de la meiosis humana . . . . .	25
Examen de posibles trastornos de la función molecular y estudio de ciertos marcadores genéticos . . . . .	26

<b>III. INTRODUCCION DE GENES EXTRAESPECIFICOS EN EL TRIGO .</b>	<b>31</b>
<i>por Francisco García Olmedo</i>	
<i>Angeles Delibes</i>	
<i>Rosa Sánchez-Monge</i>	
Material y métodos . . . . .	34
Resultados y discusión . . . . .	35
Referencias . . . . .	38
<b>IV. CONTROL GENETICO DE LA MORFOGENESIS EN DROSOPHILA.</b>	<b>43</b>
<i>por Antonio García-Bellido</i>	
<b>V. CONTEXTO PARA LA TECNICA DE TRANSPLANTACION EN EL HUEVO DE DROSOPHILA . . . . .</b>	<b>53</b>
<i>por Pedro Santamaría Yáñez</i>	

I

**ESTUDIO GENETICO DE POLIMORFISMOS MOLECULARES EN  
ESPECIES ANIMALES**

*por*  
*Antonio Prevosti Pelegrin*  
*I. Zaragaza Burillo*  
*A. Rodero Franganillo*

(DEPARTAMENTO DE GENETICA. FACULTAD DE BIOLOGIA.  
UNIVERSIDAD DE BARCELONA)



En 1966 Lewontin y Hubby (1966) publicaron su clásico trabajo en el que estimaron la variabilidad genética en Drosophila pseudoobscura, expresada en diferencias en la movilidad electroforética de proteínas, principalmente enzimas. Una tercera parte de los loci analizados resultaron polimórficos, a pesar de que con la técnica electroforética sólo suelen detectarse las sustituciones de aminoácidos con diferente carga eléctrica, de la superficie de la molécula. Posteriormente al trabajo anterior se han realizado análisis semejantes en especies de las más variadas posiciones sistemáticas, con resultados esencialmente idénticos. La existencia de esta abundante variabilidad genética detectable mediante una técnica sencilla, ha permitido la investigación de diversas cuestiones relacionadas con la estructura genética de las poblaciones.

Los Departamentos de Genética de las Facultades de Veterinaria de Córdoba y Zaragoza y el de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, tienen en curso de desarrollo un proyecto coordinado para estudiar la estructura genética de las

poblaciones de las especies ovina, bovina y de *Drosophila*. Dentro de este plan, se creyo de interés aprovechar las oportunidades que ofrece el análisis de los polimorfismos moleculares, solicitando a la Fundación Juan March la Ayuda que permite llevar a cabo el trabajo reseñado en la presente comunicación.

El trabajo sobre *Drosophila* se ha centrado en las poblaciones de dos especies: *D. melanogaster* y *D. subobscura*. Se trata de dos especies de características diferentes. Desde el punto de vista ecológico *melanogaster* está adaptada a los ambientes modificados por el hombre y es cosmopolita. Estas características ecológicas le restan interés como material de estudio de poblaciones naturales, pero por ser por mucho, la especie animal mejor conocida genéticamente, ofrece la posibilidad de relacionar los datos obtenidos en su estudio con un conjunto de conocimientos más amplios que en otras especies. En cambio, *subobscura* es una especie silvestre de distribución poco influida por el hombre, común en toda Europa, norte de Africa y Próximo Oriente. Se trabaja en esta especie en numerosos centros de investigación europeos y se conocen bastante bien algunas características de sus poblaciones naturales, en especial el polimorfismo cromosómico. En una reunión sobre genética ecológica de *Drosophila*, que tuvo lugar a principios de 1975 en la Universidad de Leeds (Inglaterra), se acordó la realización de un proyecto conjunto de varios centros europeos, para estudiar los polimorfismos enzimáticos de dicha especie.

Tanto en *D. subobscura* como en *D. melanogaster* se trata en primer lugar de obtener información sobre las características de estos polimorfismos en las poblaciones del suroeste de Europa y de las islas atlánticas (Canarias, Madeira y Azores), es decir, de estimar el grado general de polimorfismo, su distribución por sistemas de aloenzimas y su distribución geográfica. En segundo lugar, se está obteniendo información de un interés más general. Los datos sobre sistemas polimórficos dependientes de genes situados en el mismo cromosoma permiten determinar si existe equilibrio o desequilibrio en el ligamiento de los diversos alelos. La importancia del desequilibrio en

el ligamiento en la estructura genética de las poblaciones, está relacionada con el problema de si en la teoría genética de la Evolución deben considerarse como unidades de selección los genes aislados, grupos de genes ligados o incluso cromosomas enteros. Además, en especial en D. subobscura, se está analizando la asociación entre alelos de los genes que controlan a las aloenzimas y las ordenaciones cromosómicas, que resultan de las inversiones. Generalmente se acepta que distintas ordenaciones cromosómicas están diferenciadas genéticamente, lo cual explica que tengan distinto valor adaptativo. No obstante, no se poseen pruebas directas de que ésto sea así.

La investigación de la estructura genética de poblaciones de especies domésticas, como las ovina y bovina, ofrece algunas posibilidades de interés general para la teoría de la Evolución. En especial, en estas especies se tiene un mejor conocimiento del ambiente a que están sometidas sus poblaciones y, frecuentemente, también de su estructura reproductora, disponiéndose, a veces, incluso de genealogías. Esto, por sí solo, justificaría el interés de estudiar estas especies, para comparar con los datos obtenidos en las poblaciones naturales de *Drosophila*. No obstante, el estudio emprendido en ellas se dirige primordialmente, a objetivos más concretos y directos, obtener un mejor conocimiento de la estructura de su genotipo, con miras a la mejora. Concretamente, en las especies ovina y bovina se pretende como en *Drosophila* obtener, en primer lugar unos datos descriptivos sobre los polimorfismos enzimáticos, a saber el grado general de polimorfismo, qué enzimas son polimórficas, cómo se distribuye el polimorfismo por razas y dentro de éstas su distribución geográfica por poblaciones. También en estas especies se analiza el desequilibrio en el ligamiento. Finalmente, en este caso, los datos obtenidos podrán utilizarse para comparar genéticamente las distintas razas y aclarar las relaciones, principalmente filogenéticas, entre ellas.

#### Resultados obtenidos

*Drosophila melanogaster*. Se han recogido datos de 6 poblaciones

españolas: Vilavert (Tarragona), S. Sadurní d'Anoia (Barcelona), Bages (Barcelona), Perelada (Gerona), Yecla (Murcia) y Cheste (Alicante). Actualmente están en curso de estudio otras varias. Para poder relacionar el polimorfismo cromosómico con el enzimático y para poder diagnosticar los casos de desequilibrio en el ligamiento propiamente como tales o como debidos a la presencia de inversiones, en esta especie ha sido necesario investigar el polimorfismo cromosómico además del enzimático. Las frecuencias de inversiones halladas son muy superiores a lo que generalmente se admitía para esta especie. Por término medio un 25% de individuos de las poblaciones presentan alguna inversión. La más frecuente es la Curly del brazo izquierdo del cromosoma II que en Bages alcanza una frecuencia del 17,2%, le siguen la Payne del brazo derecho del cromosoma III con frecuencia de 12,3% en Vilavert y la Payne del brazo izquierdo que se halla en 10,3% de los individuos de Bages. Se han encontrado algunas inversiones nuevas, pero con frecuencias pequeñas.

Los sistemas enzimáticos estudiados, hasta ahora, en esta especie son: la esterasa-c, esterasa-6, leucinoaminopeptidasa-D, xantino deshidrogenasa y alcohol oxidasa que dependen de genes del cromosoma III y la alcohol deshidrogenasa,  $\alpha$ -glicero fosfatasa deshidrogenasa, amilasa y málico deshidrogenasa, cuyos genes se encuentran en el cromosoma II. En general, los datos obtenidos están de acuerdo con la situación hallada para los polimorfismos aloenzimáticos: hay considerable uniformidad en las diversas poblaciones estudiadas y concordancia con los datos obtenidos por otros autores en otras áreas geográficas. El resultado más interesante obtenido en estos datos es la existencia de un fuerte desequilibrio en el ligamiento entre los alelos de las ADH y  $\alpha$ -GPDH. Se observa un fuerte exceso de gametos  $ADH^- \alpha-GPDH^f$  y  $ADH^+ \alpha-GPDH^s$ , con el consiguiente déficit de las combinaciones recíprocas. Los valores hallados para el desequilibrio en el ligamiento, calculado por la fórmula  $d = ru - st$ , oscilan entre  $d = 0.046$  y  $d = 0.099$ , muy próximos a los máximos posibles dadas las fre-

cuencias alélicas en los genes afectados. Dichos valores máximos oscilan entre  $d = 0.052$  y  $d = 0.099$ . En la región donde se hallan localizados los genes para estos dos sistemas se ha detectado una inversión, que podría ser la causa del desequilibrio observado. No obstante, analizando sólo los individuos en los que no está presente la inversión se comprueba el mismo desequilibrio en el ligamiento y estadísticamente significativo. Debe concluirse que la inversión sólo refuerza y fija un desequilibrio que existe independientemente de ella. Este desequilibrio debe tener por origen una interacción epistática, que favorece las combinaciones de alelos que se encuentran en exceso.

Drosophila subobscura. Se llevan recogidos datos de 12 poblaciones: La Magdalena (Santander), Uztegui (Navarra), Castellar-nau (Barcelona), Picos de Europa (Santander), Córdoba, Ronda (Málaga), Las Mercedes I (Tenerife), Breña Alta (La Palma) ya estudiadas y Las Mercedes II (Tenerife), Hermigua (Gomera), Lovaina la Nueva (Bélgica) y Villars (Perigord, Francia) en curso de estudio. Los sistemas de aloenzimas estudiados son: esterasa-3, esterasa-5, esterasa-7, leucinoaminopeptidasa, xantindeshidrogenasa, aldehído oxidasa, peptidasa del cromosoma 0, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida y amilasa. En lo que a la distribución geográfica de los polimorfismos hallados en estas enzimas se refiere, en general, coincide con las características de uniformidad halladas en los sistemas de aloenzimas. No obstante, se encuentra una importante excepción, en algunos sistemas, como la EST-5 y la LAP, la variación de las frecuencias génicas es considerablemente menor en las poblaciones de las Islas Canarias. A diferencia de lo que ocurre en las poblaciones de Drosophila willistoni de las Antillas (Ayala et al., 1971), donde la reducción de variabilidad en el polimorfismo cromosómico en las poblaciones insulares comparadas con las continentales, no va acompañada de igual reducción en el polimorfismo enzimático, en las poblaciones canarias, por lo menos para algunas enzimas, la reducción se encuentra en ambos tipos de polimorfismos. Por lo demás, hasta

la terminación del trabajo es prematuro sacar otras conclusiones generales sobre la distribución geográfica de los polimorfismos enzimáticos de esta especie.

Otro resultado interesante es la asociación comprobada entre ordenaciones del cromosoma 0 y alelos de la EST-5 y la LAP. El alelo LAP<sup>1.00</sup> y las ordenaciones cromosómicas que contienen el complejo O<sub>3+4</sub>, así como LAP<sup>1.11</sup> y la ordenación "standard" se encuentran asociados a un alto nivel de significación estadística. El fenómeno es general en las poblaciones hasta ahora estudiadas y se comprueba tanto dentro de las mismas, como al comparar las frecuencias génicas y las ordenaciones cromosómicas entre poblaciones. En este último caso, la correlación entre dichas frecuencias es de  $r = 0.76 \pm 0.17$ .

La asociación entre alelos de la EST-5 y las ordenaciones del cromosoma 0 es más débil. Sólo en algunas poblaciones, es estadísticamente significativa, aunque en general se observa la misma tendencia en todas: frecuencias más altas del alelo EST-5<sup>1.00</sup> en la ordenación O<sub>7</sub> y del alelo EST-5<sup>0.91</sup> en la O<sub>st</sub>. La correlación entre poblaciones es, en este caso, de  $r = 0.61 \pm 0.25$ ; es decir, bastante alta, pero no llega al nivel de significado de 0.05. Parece que puede concluirse que, como en el caso de la LAP, los alelos de la EST-5 también están asociados a distintas ordenaciones del cromosoma 0, aunque más débilmente, por lo que es más difícil llegar a los niveles de significación estadística.

Hasta el momento no se ha detectado desequilibrio en el ligamiento entre los genes de los sistemas aloenzimáticos estudiados en esta especie.

Especie ovina. En esta especie se han obtenido muestras de individuos de 12 poblaciones, en general pertenecientes a diferentes razas: Castellana negra, Castellana blanca, Lacha, Churra ten sina, Talaverana, Churra ordeño (León), Lacha (Navarra), Segureña, Ojalada, Merino, Merino Landschaff y Rasa. Hasta ahora se han analizado los polimorfismos en las siguientes proteínas: hemoglobinas, albúminas, transferrinas, prealbúminas,  $\alpha$ -caseína,

$\beta$ -caseína, arilesterasas y, además, en el potasio eritrocitario.

Todos estos polimorfismos se han analizado en la raza merina española, siendo 4 las poblaciones de distinto origen estudiadas de esta raza. La raza merino, en general, tiene una alta frecuencia del alelo Es<sup>a</sup> de las arilesterasas. Los datos obtenidos en esta especie, hasta ahora, se han empleado principalmente para analizar las relaciones filogenéticas entre las razas estudiadas. Debe esperarse a tener datos más completos, para relacionarlos con los de *Drosophila* y considerar su significado en relación con la estructura genética de las poblaciones.

Especie bovina. En esta especie el trabajo se halla menos adelantado que en las anteriores. De momento, sólo se ha puesto a punto la técnica para analizar las albúminas, transferrinas, hemoglobinas, amilasa y anhidrasa carbónica.

#### Discusión de los resultados y conclusiones.

Puesto que el trabajo está en curso de desarrollo (no se ha llegado todavía a la mitad del período proyectado para el mismo), las conclusiones que pueden sacarse ahora son provisionales.

En la especie ovina (como se ha dicho antes) las conclusiones hasta ahora obtenidas se refieren a la filogenia de las razas españolas estudiadas. El análisis de las arilesterasas demuestra una gran semejanza entre el merino español y el de Rambouillet, descendiente directo del español.

Con las frecuencias génicas de las albúminas, hemoglobinas, transferrinas, prealbúminas y nivel de potasio se han calculado las distancias genéticas entre las razas Rasa, Manchega, Castellana negra, Lacha, Talaverana, Segureña, Churra y Merino española. Los resultados obtenidos sobre las relaciones filogenéticas entre dichas razas están de acuerdo con las previsiones anteriores de los etnólogos. Se comprueba que las razas Churra y Lacha, a pesar de constituir una agrupación independiente de las demás, están perfectamente diferenciadas. La raza Segureña queda próxima al conjunto de las Manchega y Castellana.

En *Drosophila*, la existencia de asociación entre alelos de los genes aloenzimáticos y ordenaciones cromosómicas, constituye una prueba directa de que las ordenaciones cromosómicas están diferenciadas genéticamente. Por otra parte, el hecho de que se encuentre una correlación entre poblaciones, del mismo sentido que la asociación comprobada dentro de las mismas, apoya el significado adaptativo de las aloenzimas que presentan la asociación. Puesto que hay fuertes razones para admitir que la variación geográfica en el polimorfismo cromosómico en *D. subobscura* es adaptativa, el anterior paralelismo apoya dicho significado adaptativo, más que la hipótesis neutralista. No obstante, esta hipótesis no queda totalmente excluida, puesto que cabe la posibilidad de que el distinto valor adaptativo de las ordenaciones cromosómicas, dependa de genes distintos de los aloenzimáticos aquí estudiados. El análisis de la variabilidad aloenzimática en cada ordenación cromosómica, dentro y entre poblaciones, puede ayudar a dilucidar este problema. Por ello, de algunas poblaciones, actualmente se están recogiendo más datos, para tener muestras suficientes de cada ordenación cromosómica. El aumento del número de poblaciones estudiadas también facilitará este análisis.

El desequilibrio en el ligamiento entre alelos de la ADH y  $\alpha$ -GPDH del cromosoma II de *D. melanogaster*, también apoya la interpretación adaptativa de los polimorfismos en dichos sistemas. En este caso la prueba es más decisiva que en el anterior, sobre todo porque el desequilibrio se encuentra incluso si sólo se consideran los cromosomas libres de inversión en la zona donde se hallan los genes afectados. De momento, por tanto, los datos obtenidos en *Drosophila* apoyan más la hipótesis seleccionista que la neutralista, por lo menos en lo que se refiere a los sistemas de aloenzimas en los que se detectan los anteriores fenómenos de asociación y desequilibrio en el ligamiento.

#### Bibliografía

AYALA, J. et al. Polymorphism in Continental and Island Populations of *Drosophila willistoni*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68 :2480-2483. 1971.

LEWONTIN, R.C. and HUBBY, J.L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of Drosophila pseudoobscura. Genetics 54 :595-609. 1966.



II

**CITOGENETICA DE LAS MALFORMACIONES CONGENITAS  
HUMANAS**

*por*

*José Antonio Abrisqueta Zarrabe*

*Amalia Pérez*

*Clara Goday*

*Jesús del Mazo*

*María Luisa de Torres*

*Vitalino Aller*

*María Angeles Martín*

*Angela Casado*

*Soledad Carmona*

(INSTITUTO DE GENETICA Y ANTROPOLOGIA. CONSEJO SUPERIOR DE  
INVESTIGACIONES CIENTIFICAS. MADRID)



Extracto de la comunicación

INTRODUCCION.-

Este proyecto de investigación intenta conocer la dimensión citogenética en la etiología de las malformaciones congénitas y pretende valorar el alcance de determinados factores peristáticos en la génesis de las mismas.

Así mismo, trata de reconocer, mediante el análisis pertinente, la relación vigente entre una cromosomopatía y diferentes parámetros fenotípicos, y de estudiar algunas de las posibles alteraciones moleculares subyacentes en una anomalía o en ciertos tipos de heteromorfismo cromosómico.

Para los efectos del estudio, se ha entendido por "malformación congénita" cualquiera de las afecciones enumeradas en las categorías 310-315 y 740-759 de la "Clasificación Internacional de Enfermedades" (O.M.S., Vol. 1. 1968).

Para llevar a cabo esta investigación pluridimensional en torno a las malformaciones congénitas humanas, se ha desarrollado un plan de actuación desglosado en los siguientes capítulos o líneas de actuación:

- Examen citogenético de la desviación fenotípica congénita.
  - Neonatos y niños malformados.
  - Matrimonios con hijos polimalformados o aborto habitual.
  - Abortos espontáneos.

- Análisis de los mecanismos o de los factores involucrados en la génesis de una cromosomopatía.
  - Estudio de la meiosis.
  - Valoración de determinados factores exógenos: sustancias de posible acción teratógena.
- Examen de posibles trastornos de la función molecular y estudio de ciertos marcadores genéticos en probandos portadores de una alteración cromosómica.

En esta comunicación se ofrecen los resultados obtenidos en los doce primeros meses de realización del proyecto.

#### DESARROLLO DEL PROYECTO Y RESULTADOS.-

La investigación en curso se ha desarrollado desde distintas perspectivas parciales, aunque sin perder el horizonte de la totalidad, conforme a las líneas de actuación que a continuación se detallan.

#### EXAMEN CITOGENETICO DE PROBANDOS AFECTOS DE MALFORMACIONES

##### CONGENITAS:

Se ha efectuado el análisis citogenético de todos los pacientes previo microcultivo de linfocitos de sangre periférica. Cuando se ha detectado alguna anomalía cromosómica, sobre todo, estructural, se han aplicado las técnicas de bandas GTG ó QFQ, a fin de identificar los cromosomas o regiones cromosómicas implicadas en la alteración.

Este capítulo del proyecto se ha dividido en dos apartados fundamentales, de acuerdo con las características de la población analizada:

##### 1.- Muestra de población afecta de alguna anomalía congénita.-

El número de probandos examinados asciende a 182.

La cifra obtenida de anomalías cromosómicas, numéricas o estructurales se eleva a 43. La frecuencia es, por con-

siguiente, de 23,97 %.

En cuanto a las alteraciones estructurales menores o variantes del cariotipo, el número encontrado es de 15; siendo, por tanto, la frecuencia 8,28 %.

En consecuencia, la incidencia global de alteraciones citogenéticas hallada en la muestra analizada es de 32,25 %.

Entre los resultados obtenidos cabe destacar las siguientes fórmulas cromosómicas: 46,XY,4(r). Figura 1. 46,XX,t(3;17)(q12 ó q13; q25). Figura 2. 46,XX,-21,+t(21q 21q) 46,XY,-14,+t(14q 21q). 46,XY,18p-/46,XY. 47,XXX.

## 2.- Matrimonios con hijos polimalformados o aborto habitual.-

La población estudiada consta de 42 matrimonios, concretamente, de 82 esposos, ya que en dos matrimonios sólo pudo estudiarse uno de los cónyuges.

El análisis citogenético ha revelado que 18 de esos matrimonios presentan, en uno o en los dos cónyuges, alguna alteración cromosómica numérica o estructural, incluidos también los casos de heteromorfismo o variantes menores del cariotipo.

Las frecuencias se distribuyen de la siguiente manera: 4,92 % de anomalías cromosómicas numéricas y 19,94 % de anomalías estructurales denominadas menores.

La incidencia global de alteraciones citogenéticas ha sido, por consiguiente, de 24,86 %.

Finalmente, en relación a la posible acción de los factores peristáticos, destacamos el caso de un matrimonio en el que la mujer, aún siendo de cariotipo normal, presentaba en los cultivos un número relativamente alto de metafases aberrantes con aneuploidías, roturas y deleciones, causadas probablemente por la medicación que recibía (psicofármacos y otros preparados). Este matrimonio había tenido tres abortos.

ESTUDIO DE LA FRECUENCIA Y TIPO DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS  
EN ABORTOS ESPONTANEOS.-

Se han puesto a punto las técnicas de cultivo de fibroblastos, para poder así realizar el cultivo del tejido embrionario. El análisis viene condicionado, en gran parte, por la disponibilidad del material. Los restos abortivos se recogen, en la mayoría de las veces, después de legrado y debido a ello los huevos llegan incompletos e incluso con restos de tejido materno, que es necesario desechar. En otras ocasiones, los tejidos están tan macerados que es imposible conseguir un crecimiento celular aceptable. Otras veces, el material está contaminado por diversos microorganismos. Todo ello limita la eficacia de la técnica de cultivo.

En el transcurso de estos dos semestres se han recibido 57 restos embrionarios. Todos ellos fueron observados minuciosamente, consignando en cada caso las características morfológicas del huevo. Se han eliminado los restos que ofrecían dudas en cuanto a su constitución.

Entre los casos cariotipados cabe destacar las siguientes fórmulas cromosómicas: 47,XX,+16. Figura 3., en el que no se apreciaron ni el saco vitelino ni algún tipo de primordio embrionario. 45,X, con vellosidades coriónicas estrechas de aspecto muy denso y sin apenas ramificaciones, solamente algunas yemas trofoblásticas. 46,XYq+ y 46,XX/45,XX,-D. Cabe añadir un complemento triploide, no cariotipado, en una muestra con vellosidades coriónicas de aspecto pseudomolar, muy peculiares en las triploidías.

ANALISIS DE LOS EFECTOS CAUSADOS SOBRE LOS CROMOSOMAS HUMANOS  
DE DETERMINADAS SUSTANCIAS DE USO HABITUAL EN LA TERAPEUTICA  
CLINICA, CON POSIBLE ACCION TERATOGENA.-

En nuestro estudio hemos elegido psicofármacos, dada su frecuente utilización en la terapéutica psiquiátrica y de-

bido a que no existe un estudio profundo sobre su posible acción mutagénica desde el punto de vista citogenético.

Nuestra experiencia de laboratorio, por otra parte, ya nos había proporcionado la oportunidad de observar diversas alteraciones a nivel celular en algunos pacientes sometidos a la acción de preparados psicotropos.

El trabajo se ha realizado con pacientes que requieren atención psiquiátrica y cuyo tratamiento comporta la administración de psicofármacos durante largos períodos. Se ha efectuado en todos ellos un microcultivo de 72 horas de linfocitos de sangre periférica.

Los medicamentos administrados se distribuyen de la siguiente manera: 1.- Preparados neurolépticos. 2.- Tranquilizantes. 3.- Antiespasmódicos y antiepilépticos. 4.- Analgésicos.

Con el fin de obtener unos valores comparativos se ha venido realizando un estudio control paralelo con individuos sanos que no están sometidos a medicación alguna.

Hasta el momento, el número de pacientes estudiados, asciende a 18. La población normal testigo está compuesta por 10 individuos. En todos ellos se han examinado 50 metafases. Los resultados obtenidos se han distribuido en dos apartados fundamentales: aberraciones cromosómicas estructurales ("breaks", "gaps" y "h+". Figura 4) y aberraciones cromosómicas numéricas. Estas se distribuyen en un espectro más amplio, dentro de las poliploidías y aneuploidías, para mostrar la dispersión hallada en algunos casos.

#### ESTUDIO CROMOSOMICO DE LA MEIOSIS HUMANA.-

Se ha llevado a cabo en el varón, a partir de biopsias testiculares, y en la mujer, sólo en casos esporádicos y a nivel básico, a partir de ovarios fetales.

Inicialmente, se ha realizado el estudio de una serie de 12 varones afectos de anomalías a nivel del sistema.

genitourinario. El análisis de los espermatoцитos primarios ha comprendido la interpretación de las diferentes fases de la primera profase meiótica. En el estado de paquitena pueden individualizarse los bivalentes. El estado de diacinesis/metafase I permite un estudio amplio de la morfología y estructura de los 23 bivalentes, analizando el número de quiasmas por célula, por bivalente, por brazo de bivalente y el coeficiente de terminalización de los quiasmas.

El estudio de los espermatoцитos secundarios se ha centrado en la identificación de los cromosomas en la metafase II.

Posteriormente, el análisis de la meiosis ha sufrido, en el contexto del proyecto, un nuevo planteamiento. A ello nos ha obligado, por una parte, el escaso número de casos en que ha podido realizarse una biopsia testicular, por otra, la necesidad de disponer de técnicas más precisas para poder individualizar los bivalentes meióticos en el estado de paquitena.

En este sentido, las técnicas de bandas G y bandas Q, aplicadas anteriormente a los cromosomas mitóticos, están permitiendo establecer unos patrones de bandas específicas para cada bivalente e identificar de una manera objetiva cada cromosoma (Figura 5).

#### EXAMEN DE POSIBLES TRASTORNOS DE LA FUNCION MOLECULAR Y ESTUDIO DE CIERTOS MARCADORES GENETICOS.-

Se ha realizado una investigación sobre deficiencias enzimáticas en: glutation-reductasa, piruvato-kinasa y glucosa-6-fosfato dehidrogenasa. Paralelamente, se ha efectuado la determinación de las fracciones hemoglobínicas.

La muestra estudiada es de 43 probandos, afectos de malformaciones, que han sido distribuidos en diferentes grupos según sus características. Los resultados obtenidos no revelan anomalías importantes.

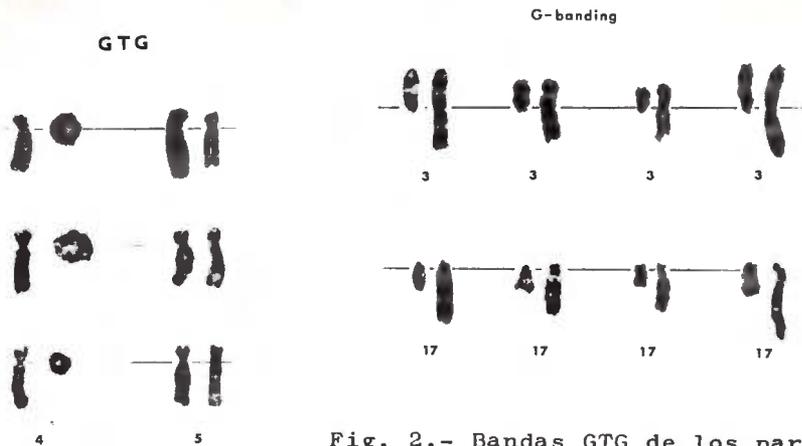


Fig. 2.- Bandas GTG de los pares 3 y 17 en un probando con translocación  $t(3q-;17q+)$ .

Fig. 1.- Bandas GTG de los pares 4 y 5 en un probando con  $46,XY,4(r)$ .

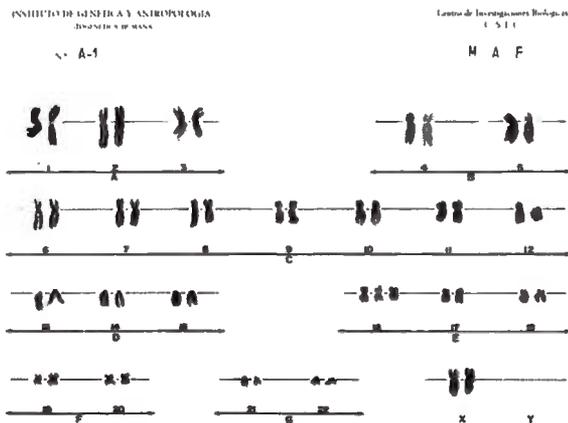


Fig. 3.- Cariotipo  $47,XX,+16$ , correspondiente a un huevo sin restos embrionarios, procedente de aborto espontáneo.



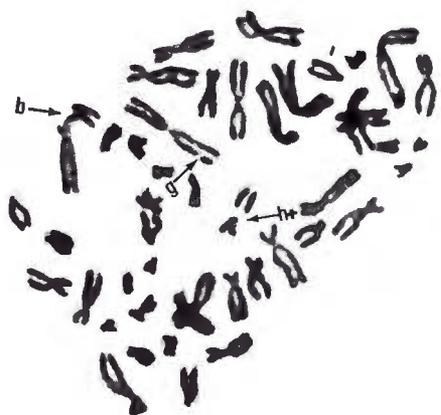
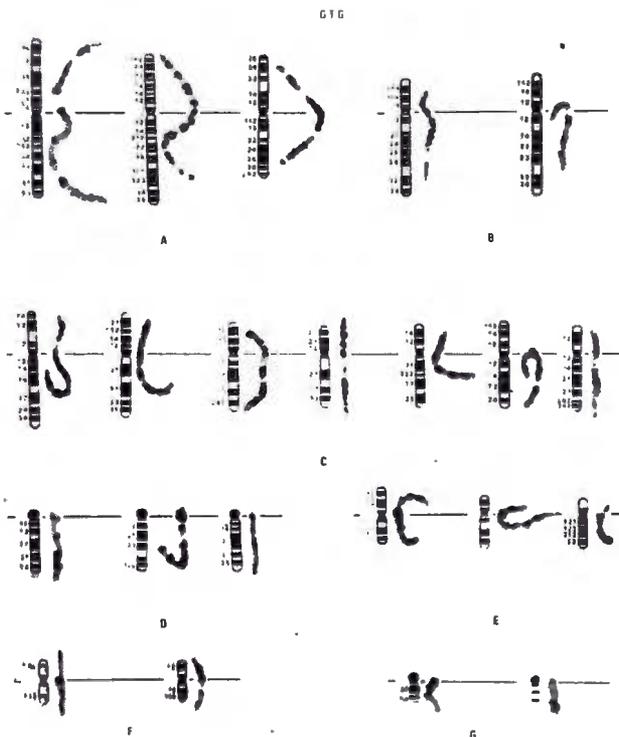


Fig. 4.- Metafase humana de un probando sometido a tratamiento (Lepo-nex). b="break"; g="gap"; h+= incremento de la constricción secundaria.

Fig. 5.- Patrón de bandas G en bivalentes paquiténicos tratados con tripsina y representación diagramática de dichas bandas.





**III**

**INTRODUCCION DE GENES EXTRAESPECIFICOS EN EL TRIGO**

*por*

*Francisco García Olmedo*

*Angeles Delibes*

*Rosa Sánchez-Monge*

(DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA. E. T. S. INGENIEROS AGRONOMOS.  
UNIVERSIDAD POLITECNICA DE MADRID)



La introducción de caracteres extragenéricos o extraespecíficos en plantas cultivadas tiene interés teórico y una reconocida importancia práctica (ver p.ej. ref.1).

En el caso de los trigos cultivados, pueden actuar como donadores de genes que controlan caracteres de calidad, de resistencia a agentes patógenos, etc., especies afines de los géneros *Secale*, *Agropyron* y *Aegilops*.

Los métodos empleados para la introducción de estos caracteres son variados y dependen de la afinidad existente entre la especie donadora y la receptora.

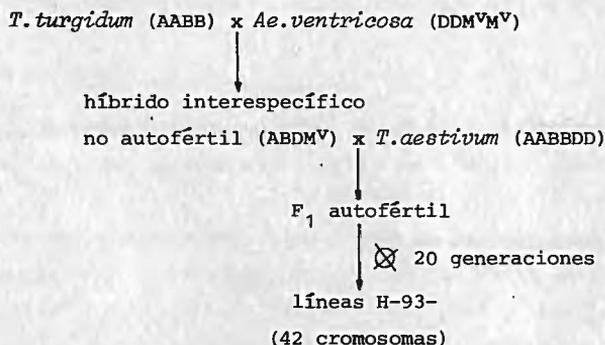
El proceso de transferencia requiere, en primer lugar, salvar los impedimentos que se presentan para el acceso del material genético extraño al núcleo receptor y, posteriormente, lograr la integración estable de dicho material.

El objetivo primordial del presente trabajo ha sido estudiar, por una combinación de métodos bioquímicos y citogenéticos, la transferencia génica extraespecífica en un cruzamiento doble [*Triticum turgidum* AABB x *Aegilops ventricosa* DDM<sup>MV</sup>] x *T.aestivum* AABBDD. El interés de este estudio estriba en las posibles ventajas que dicho tipo de cruzamiento puede presentar para la transferencia e integración estable de material genético del genomio MV de *Ae. ventricosa* en trigo hexaploide, frente a posibles métodos alternativos, tales como la hibridación directa o la obtención de un anfidiplóide puente.

*Ae.ventricosa* es una especie alotetraploide, de constitución genómica DDM<sup>MV</sup>, que posee caracteres interesantes, tales como resistencia al mal de pie, causado por el hongo *Cercospora herpotrichoides*, y al mosquito del trigo *Phytophaga destructor*. Su potencial como especie donadora de caracteres útiles ha sido sólo parcialmente explotado, habiéndose centrado los esfuerzos en la transferencia de genes del genomio D responsables de resistencia al mal de pie (ver refs.2,3).

## MATERIAL Y METODOS

Material biológico. Se han utilizado 70 líneas (H-93-1 a 70) obtenidas del modo siguiente:



Dichas líneas, el material parental y muestras de las especies *Ae. squarrosa* (DD) *Ae. comosa* (MM) y *Ae. uniaristata* (M<sup>LM</sup>M<sup>LM</sup>) fueron donadas por M. Alonso Peña (Cuenca). Se obtuvieron híbridos entre líneas H-93- y el parental *T. aestivum* (H-10-15) (fig.1).

Métodos bioquímicos. Se ha estudiado la distribución de 48 marcadores bioquímicos cuyo control genético y métodos de ensayo han sido descritos en las referencias que se citan entre paréntesis: proteínas NGE (4-8), extracto urea 2M (9), gliadinas (9), purotioninas (10-12), ésteres de esterol (13-17), isoenzimas de peroxidasa (9,18), isoenzimas de alcohol deshidrogenasa (19), isoenzimas de fosfatasa alcalina (9,19) y esterasas (9,20).

Los análisis de nitrógeno y de aminoácidos, la determinación de la calidad tecnológica y el fraccionamiento de proteínas se realizaron por métodos standard.

Métodos citológicos. Se realizaron recuentos cromosómicos en meristemos radiculares de las líneas H-93- y se estudió la meiosis de dichas líneas y de sus híbridos con el parental *T. aestivum*. Las tinciones se llevaron a cabo por el método de Feulgen (figuras 2 y 3).

Determinaciones de resistencia a enfermedades. Fueron realizadas por los Dres. F. Dosba y G. Doussinault (CNRS, Rennes, Francia) según métodos descritos por ellos (3).

## RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 4 se representan los posibles casos de localización cromosómica de marcadores genéticos en el material parental y se consignan las frecuencias esperadas en la descendencia H-93- para los marcadores correspondientes a cada uno de los casos: *a*) marcador asociado a los genomios A, B o D de una sola de las especies parentales; *b*) marcador presente en los genomios A, B o D de dos de las especies parentales, pero en posición distinta; *c*) caso análogo al *a*, salvo que el marcador está además presente en el genomio MV; *d*) marcador en posiciones homólogas de los genomios A, B o D de dos de las especies parentales; *e*) marcador asociado sólo al genomio MV; *f*) caso análogo al *d*, salvo que el marcador está también presente en MV.

Sólo la presencia de marcadores correspondientes al caso *e* demuestra inequívocamente la transferencia de material genético del genomio MV, ya que los casos *d* y *f* pueden explicarse también por delección y el caso *c* no resulta útil cuando, como en nuestro estudio, la muestra de la descendencia no es aleatoria.

Se ha estudiado la distribución de 48 marcadores bioquímicos en las especies consignadas en la figura 4, con el objeto de realizar tentativamente su asignación a los distintos genomios, y en las líneas H-93-.

Los datos correspondientes a marcadores de los genomios A y B de *T. turgidum* y *T. aestivum* son compatibles con que la mayor parte de las ovocélulas del híbrido no autofértil ABDMV, recuperadas por fertilización con polen de *T. aestivum*, llevaran los genomios A y B completos. Los 10 marcadores del tipo *d* y el marcador del tipo *f* asignados a estos genomios aparecen con la frecuencia esperada del 100% en las líneas H-93-, mientras que los 5 marcadores tipo *a*, asociados a los parentales *Triticum*, aparecen con frecuencias comprendidas en el intervalo 32-72%, que son compatibles con la esperada del 50%, por no representar las líneas H-93- una muestra aleatoria de la descendencia.

Respecto al genomio D, 3 de 8 marcadores tipos *d* o *f* aparecen en las líneas H-93- con frecuencias próximas pero inferiores a la esperada del 100%, lo que, según se indicó, puede ser debido a transferencia no homóloga o a delección. Los marcadores tipo *a* o *b* aparecen con frecuencias compatibles con las esperadas.

Se encontraron 6 marcadores bioquímicos presentes en *Ae. ventricosa* (DDMV<sup>MV</sup>), *Ae. comosa* (MM) y *Ae. uniaristata* (M<sup>4</sup>M<sup>4</sup>) y ausentes en *T. aestivum*

(AABBDD), *T.turgidum* (AABB) y *Ae.squarrosa* (DD), que, por tanto, son presuntos marcadores del genomio M<sup>V</sup>. La distribución de estos marcadores en las líneas H-93- resultó ser la siguiente: isoenzima de fosfatasa alcalina (Aph-3), presente en las líneas H-93-1 y -33; isoenzima de peroxidasa (P<sub>xm</sub>), ausente en las líneas H-93-; isoenzima de alcohol deshidrogenasa (Adh<sub>u</sub>), presente en H-93-33; componente del extracto urea 2M (U-1), presente en las líneas H-93-1, -8, y -35; (U-3), ausente; componente(s) NGE-17<sup>Ae</sup><sub>1,2,3</sub>, presente(s) en 22 de las 70 líneas H-93-. La alta frecuencia de transmisión de este último marcador hace suponer que la localización del gen o genes que lo controlan correspondía al genomio D en el momento de realizar el cruzamiento objeto de nuestro estudio. Es decir, su translocación debió tener lugar del genomio M<sup>V</sup> al D en el *Ae.ventricosa* parental. Hay que señalar que en todas las líneas portadoras de este marcador está ausente el marcador NGE-17, controlado por el cromosoma 4D de *T.aestivum* cv. Chinese Spring.

Se ha determinado la resistencia al oidio (*Erysiphe graminis*; Pm), que es un carácter monogénico, en el material parental y en las líneas H-93-. Los resultados, que se resumen en la figura 4, indican que dicho factor de resistencia se transmite como controlado por el genomio M<sup>V</sup>.

Con objeto de estudiar la forma de integración del material genético transferido, se estudió la meiosis de las líneas H-93-1, -8, -33 y -35 y la de sus híbridos por el parental *T.aestivum*. También se incluyeron en el estudio las líneas H-93-10 y -51, en las que están ausentes los marcadores NGE-3 y -4. La meiosis de todas las líneas, excepto la H-93-33, resultó ser regular, no difiriendo significativamente de la del parental *T.aestivum* más que en el número de bivalentes abiertos. La línea H-93-33 presentó mayor irregularidad en las tres fases estudiadas: metafase I, anafase I y tétradas. El estudio meiótico de los híbridos revela la formación de 2-4 univalentes, según la línea H-93- hibridada, lo que indica, según los casos, 1 ó 2 cromosomas extraños. Esto supone una acotación por alto del número de cromosomas del genomio M<sup>V</sup> transferidos, por dos razones: i) por la incompleta homología de los genomios D de *Ae.ventricosa* y de *T.aestivum* y ii) porque en la práctica puede bastar que existan segmentos cromosómicos terminales translocados para que no tenga lugar apareamiento meiótico.

De las observaciones mitóticas en meristemas radiculares se había concluido previamente que todas las líneas H-93-, con la posible excepción de H-93-1, poseen 42 cromosomas. La línea H-93-1 presentaba mosaicos de células

con números cromosómicos múltiples de 7. Como se ha indicado, la meiosis de esta línea es, en cambio, regular y pone de manifiesto que posee también 42 cromosomas.

En el cuadro 1 se resumen los datos bioquímicos y citológicos correspondientes a estas líneas. Dichos datos indican que ha tenido lugar transferencia no homóloga del genomio M<sup>V</sup> de *Aegilops ventricosa* a trigo hexaploide, por sustitución cromosómica y por recombinación. Esto último se infiere de la distribución de los marcadores Aph-3, U-1 y Pm en confrontación con los números máximos de cromosomas M<sup>V</sup> presentes en las líneas que se consignan en el cuadro.

CUADRO 1. DISTRIBUCION DE MARCADORES GENETICOS Y NUMERO MAXIMO DE CROMOSOMAS M<sup>V</sup> EN LINEAS H-93- PROCEDENTES DE UN CRUZAMIENTO {*T.turgidum* x *Ae.ventricosa*} x *T.aestivum*.

Genomios	Marcadores*	Líneas H-93-					
		1	8	10	33	35	51
M <sup>V</sup>	Aph-3	+	-	-	+	-	-
	U-1	+	+	-	-	+	-
	Pm	-	+	-	+	+	-
	Adh-μ	-	-	-	+	-	-
D <sup>V</sup> /D <sup>A</sup>	NGE-3 y -4	-	-	-	+	+	-
	NGE-11	-	+	+	+	+	+
D <sup>V</sup>	NGE-17 <sub>Ae1,2,3</sub>	+	+	+	+	-	+
	Es-1 y -2	+	+	+	-	-	-
D <sup>A</sup>	NGE-17	-	-	-	-	+	-
	Adh-δ	+	-	+	-	-	+
	Ath-1 y -2	-	+	-	-	+	-
Número máximo de cromosomas M <sup>V</sup>		1	2	1	2	1	1

\* Símbolos explicados en el texto, excepto Ath-1 y -2 < > Athinas 1 y 2

Se ha investigado también si las modificaciones en las características bioquímicas del endospermo de trigo, resultantes de la transferencia génica, afectan a su calidad nutritiva y tecnológica. Los análisis de proteínas y de aminoácidos, así como los ensayos reológicos realizados, indican que, si bien algunas líneas presentan propiedades interesantes, no hay ninguna línea con

características excepcionales.

Otro aspecto de interés abordado en nuestro estudio ha sido el referente a la transferencia de resistencia al ataque por *Cercospora herpotrichoides*. El 47% de las líneas presentan a un nivel de resistencia que no difiere significativamente del correspondiente al parental *Ae. ventricosa*. Los intentos de Kimber (2) y de Dosba y Doussinault (3) no dieron por resultado líneas de trigo con resistencia equivalente a la de *Ae. ventricosa*, por lo que se especuló que dicha resistencia estaba sujeta a un control poligénico y que al menos algunos de los genes deberían estar localizados en el genoma MV. Los resultados presentes no soportan ninguna de las dos hipótesis.

El doble cruzamiento interespecífico objeto del presente estudio es extensible, como método de transferencia de variabilidad genética extraespecífica, a otras especies del mismo complejo *Aegilops-Triticum* y, posiblemente, a otros complejos alopoloides. Concretamente, se ha cubierto la primera etapa del cruzamiento para *Ae. crassa* (DDM<sup>CFM</sup>CR) y *Ae. cylindrica* (DDCC) y se ha obtenido el híbrido doble correspondiente a *Ae. triuncialis* (CCC<sup>UCU</sup>).

Finalmente cabe señalar que no es imposible que se puedan dar de forma natural cruzamientos del tipo del estudiado, ya que, por ejemplo, está bien establecido que el cruzamiento {*T. turgidum* x *Ae. ventricosa*}, primera etapa del que hemos estudiado, ocurre espontáneamente en Argelia.

RECONOCIMIENTO. Los autores reconocen la colaboración de Concepción Rodilla en el estudio citológico y de Pilar Gil en los análisis de proteínas.

## REFERENCIAS

1. Lacadena, J.R. (1976) *Genética*, 2ª Ed. AGESA, Madrid.
2. Kimber, G. (1967) *J. Agric. Sci. Camb.* 68, 373-376.
3. Dosba, F. & Doussinault, G. (1973) In *Proc. 4th Int. Wheat Genet. Symp.* Columbia, Mo. (ed. E.R.Sears & L.M.Sears) pp.409-414.
4. García-Olmedo, F. & Carbonero, P. (1970) *Phytochemistry*, 9, 1495-1497.
5. Aragoncillo, C., Rodríguez-Loperena, M.A., Carbonero, P. & García-Olmedo, F. (1975) *Anal. Biochem.*, 63, 603-606.
6. Rodríguez-Loperena, M.A., Aragoncillo, C., Carbonero, P. & García-Olmedo, F. (1975) *Phytochemistry*, 14, 1219-1223.

7. Aragoncillo, C., Rodríguez-Loperena, M.A., Carbonero, P. & García-Olmedo, F. (1975) *Theoret. Appl. Genetics*, 45, 322-326.
8. Rodríguez-Loperena, M.A., Aragoncillo, C., Torres, J.V. Carbonero, P. & García-Olmedo, F. (1975) *Plant Sci. Lett.*, 5, 387-393.
9. Delibes, A. & García-Olmedo, F. (1973) In *Proc. 4th Int. Wheat Genet. Symp.*, Columbia, Mo. (ed. E.R.Sears & L.M.S.Sears) pp. 161-166.
10. Carbonero, P. & García-Olmedo, F. (1969) *Experientia*, 25, 1110.
11. Fernández de Caleyá, R., Hernández-Lucas, C., Carbonero, P. & García-Olmedo, F. (1976) *Genetics*, 83, 687-699.
12. Hernández-Lucas, C., Fernández de Caleyá, R., Carbonero, P. & García-Olmedo, F. (1977) *Genetics* (en prensa).
13. García-Olmedo, F. (1968) *Nature*, 220, 1144-1145.
14. Torres, J.V. & García-Olmedo, F. (1974) *Plant Sci. Lett.*, 3, 213-217.
15. Torres, J.V. & García-Olmedo, F. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, 409, 367-375.
16. Carbonero, P., Torres, J.V. & García-Olmedo, F. (1975) *FEBS Lett.*, 56, 198-201.
17. Torres, J.V., Carbonero, P. & García-Olmedo, F. (1976) *Phytochemistry*, 15, 677-680.
18. MacDonald, T. & Smith, H.H. (1972) *Genetics*, 72, 77-86.
19. Hart, G.E. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 66, 1136-1141.
20. Nakai, Y. & Tsnewaki, K. (1971) *Jap. J. Genet.*, 46, 321-336.

GENOMIOS (n = 7)				ESPECIES												
A	B	D	M													
				<i>T. turgidum</i> AABB												
				<i>Ae. ventricosa</i> DDM <sup>V</sup> M <sup>V</sup>												
				<i>T. aestivum</i> AABBDD												
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Gen</th> <th>% esperado en H-93</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>a</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>b</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>c</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>d y f</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>e</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>		Gen	% esperado en H-93	a	50	b	75	c	50	d y f	100	e	0	Desviaciones debidas a transferencia no homologa idem o deleción transferencia no homologa		<i>Ae. comosa</i> MM
Gen	% esperado en H-93															
a	50															
b	75															
c	50															
d y f	100															
e	0															
			<i>Ae. uniaristata</i> M <sup>u</sup> M <sup>u</sup>													

FIG.4. Posibles localizaciones de los marcadores genéticos utilizados en el presente estudio

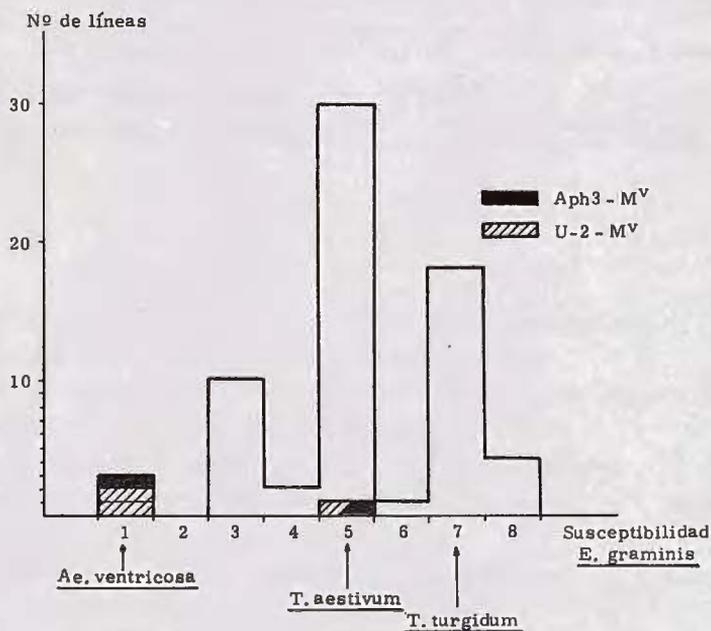
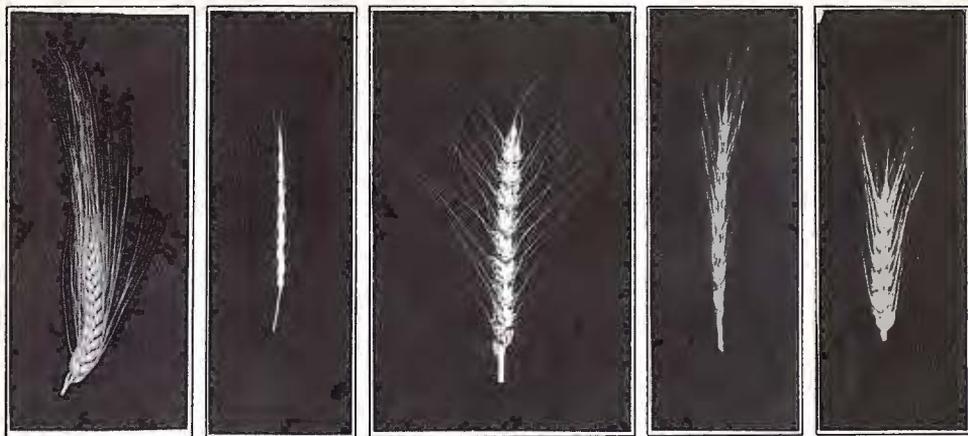
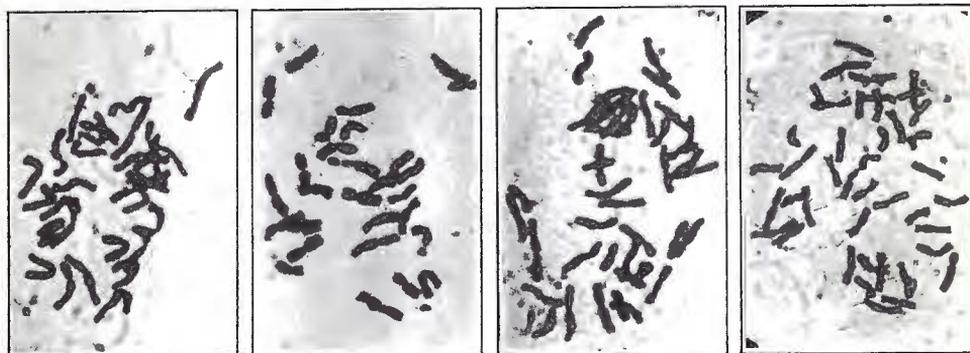


FIG.5. Distribución de los niveles de resistencia al oídio (*E. graminis*) en las 70 líneas H-93 y las 3 especies parentales *T. aestivum*, *T. turgidum* y *Ae. ventricosa*



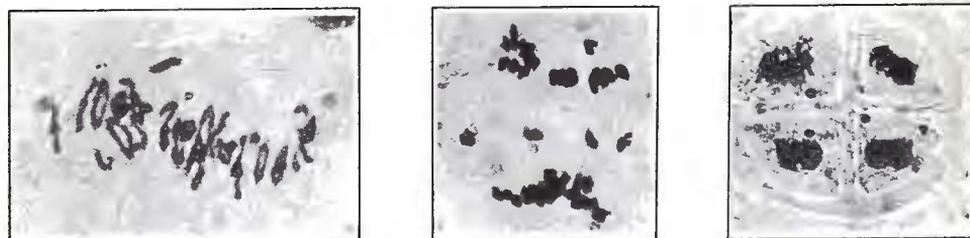
*T. turgidum*    *Ae. ventricosa*    *T. aestivum*    H-93-1    H-93-35

FIG. 1. ESPIGAS



*T. turgidum*                      *Ae. ventricosa*                      *T. aestivum*                      H-93-35  
 2n=28                                  2n=28                                  2n=42                                  2n=42

FIG. 2. MITOSIS



METAFASE I                                  ANAFASE I                                  TETRADAS  
 (2 univalentes)                                  (4 retardatarios)                                  (5 micronucleos)

FIG. MEIOSIS DE HIBRIDOS ENTRE LINEAS H-93 Y EL PARENTAL *T. aestivum*



**IV**

**CONTROL GENETICO DE LA MORFOGENESIS EN DROSOPHILA**

*por*

*Antonio García-Bellido*

**(INSTITUTO DE GENETICA. CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTIFICAS. MADRID)**



Entre los problemas mayores de la Biología todavía no resueltos está el de entender cómo se construye un organismo. Fue planteado a grandes rasgos por Aristóteles como el problema de la morfogénesis. Hoy día está formulado como - el problema de la diferenciación. En ambos casos consiste en entender los mecanismos que hacen que células se hagan diferentes unas de otras y se ordenen en sistemas espaciales (patrones morfológicos) característicos.

El desarrollo de un organismo, desde el huevo hasta el adulto aparece ante nuestra observación como un proceso contínuo. Para entender sus mecanismos causales es necesario - introducir variables en el proceso. Dos son las variables - más importantes: intervención experimental y mutación génica. Los resultados de esa interferencia se pueden describir en términos de unidades de varios niveles de complejidad; - desde el nivel anatómico o histológico hasta el molecular. Precisamente el elegir este nivel es de mayor importancia.

El gran éxito de la Biología molecular se ha derivado de elegir un nivel de observación, el molecular, que es el mismo del de intervención experimental o genética. Los organismos de estudio de la Biología molecular clásica son organismos unicelulares, bacterias y aun subcelulares bacteriofagos. En estos últimos está siendo posible entender la morfogénesis en términos de las propiedades de las moléculas - que los integran. Hoy día se puede decir que la forma de la cápsida de un virus se deriva por autoensamblaje de proteínas, cuya estructura terciaria y cuaternaria resulta de la

secuencia primaria de sus aminoácidos y esta directamente de la secuencia de los nucleótidos del ADN que los codifican. - Esta descripción molecular es imposible de realizar en procesos supracelulares porque la complejidad molecular es enorme. El nivel siguiente al molecular es el celular.

El gran paso de la Biología del siglo pasado fue el descubrimiento de que la unidad de construcción de los organismos son las células. Hoy día, sabemos que todas ellas llevan la información genética del cigoto y que esta se expresa en operaciones moleculares dentro de ellas. Debemos a C. Stern el fundamental descubrimiento de que las mutaciones génicas se manifiestan primariamente y autonomamente en células. Así pues la descripción de cómo se construye un organismo puede hacerse en términos de genes y de células. El problema de la morfogénesis, en organismos multicelulares, puede plantearse entonces así: ¿ por qué mecanismos genéticos las células se hacen diferentes y se ordenan en sistemas?, o dicho de otra manera, ¿ cómo las señales genéticas originadas dentro de las células se expresan en operaciones celulares y supracelulares?.

Este es el enfoque que damos en nuestro laboratorio en el análisis del desarrollo de un organismo multicelular como Drosophila. En este organismo convergen las posibilidades de distinguir y manejar células discretas y las variables y técnicas genéticas más sofisticadas de un organismo multicelular. El método de análisis básico utilizado en este estudio es el análisis clonal. Consiste en producir clones de células marcadas genéticamente, descendientes de una sola, y estudiar su comportamiento en un conjunto de células en crecimiento no marcadas. Una de las operaciones genéticas que pueden dar lugar al origen de un clon es la recombinación mitótica que puede ser inducida por varios agentes (p.e. rayos X) a tiempos deseados durante el desarrollo.

Si el marcador celular utilizado no afecta el proceso en crecimiento, el comportamiento de las células que lo llevan es representativo de toda la población normal. Así, de manera análoga al método de dilución isotópica, si sabemos cuando se inicia el clon, podemos conocer los parámetros numéricos normales del sistema en el que ha aparecido: número de células, ritmo de división, número de ciclos mitóticos, etc. Además, este análisis permite descubrir propiedades espaciales del sistema en crecimiento: orientación de ejes mitóticos, extensión y forma de los clones, que son característicos de las distintas regiones de un sistema, etc.

Donde este análisis ha avanzado más es en el estudio de los discos imaginales. Son estos derivados del ectodermo temprano, cuyas células se multiplican en superficie, manteniéndose en una capa monocelular, hasta la metamorfosis, cuando estas células diferencian cada una, una estructura cuticular discreta que permite identificarlas. Entre estos discos imaginales hemos elegido en este laboratorio uno como modelo, el disco imaginal dorsal mesotorácico que formará el mesotorax y ala del adulto. Es este el sistema hoy día mejor conocido en sus parámetros clonales normales y en el cual preguntas sobre el control genético de su morfogénesis tienen más posibilidades de estudio.

Existen en Drosophila mutantes que se denominan morfogenéticos porque sin afectar la diferenciación cuticular cambian el ordenamiento espacial de las estructuras cuticulares. De ellos, hay fundamentalmente dos tipos, aquellos que desorganizan el sistema, disruptivos, y aquellos que sustituyen un sistema por otro, homoeóticos. El estudio a nivel celular de los primeros puede permitirnos entender que funciones celulares son necesarias para la morfogénesis normal. El estudio de los segundos intenta conocer que mecanismos controlan el que las células se organicen en un número de sistemas, posiblemente finito, y como la información genética de las cé-

lulas se expresa en ordenarlas en estos conjuntos.

Durante el disfrute de la Beca de Biología, concedida a este grupo que dirijo, se han estudiado nuevos parámetros celulares, mutantes que los afectan, así como mutantes estrictamente morfogenéticos de las dos clases citadas arriba. A la vista de estos resultados está empezando a descubrirse una lógica genética en los mecanismos de morfogénesis. En lo que sigue trataremos de resumir los resultados fundamentales de este estudio.

Una propiedad de los mutantes Minute es reducir el ritmo de división celular (Morata y Ripoll 1975; Ferrús 1975). Son factores dominantes y su pérdida por recombinación mitótica en individuos heterocigóticos da lugar a clones de células normales que crecen a un ritmo normal. Estos clones son, pues, mucho más grandes que los clones normales producidos en individuos normales, no-Minute. Sorprendentemente estos clones grandes muestran líneas de restricción en la superficie de la cutícula derivada del disco de ala, delimitando "compartimentos" fijos (García-Bellido, Ripoll y Morata 1973 y 1976). Durante el desarrollo y conforme la población celular del disco aumenta, clones iniciados más tarde descubren nuevas restricciones que delimitan nuevos compartimentos. Es regla general que 1) estos compartimentos surgen por una segregación de la población celular en dos poblaciones, y 2) estas poblaciones son siempre de varias células. Así pues el desarrollo de un sistema multicelular como el del disco de ala, y esto ya se ha comprobado en otros discos imaginales, ocurre por segregaciones binarias de esta población que delimita y define las posibilidades de diferenciación de sus descendientes clonales.

Es en este contexto en el que cabe entender las transformaciones homoeóticas. Los alelos más extremos de los mutantes que las causan, afectan compartimentos enteros. Su -

efecto es convertir los derivados de un compartimento en derivados de otro. Sorprendentemente, la transformación causada por los alelos que corresponden a la falta de función del gen (amorfos) es unidireccional; entre segmentos embrionarios el cambio es de cualquier segmento hacia mesothorax y dentro de cada segmento, en cada disco imaginal, de compartimento posterior a anterior, de ventral a dorsal y posiblemente de distal a proximal. De estas reglas se infiere que la función normal de aquellos genes es permitir que existan caminos de desarrollo (segmentos o compartimentos) como alternativas a uno, posiblemente más primitivo (García-Bellido 1975). Estos mutantes son específicos de segmentos y de compartimentos y dobles mutantes entre ellos muestran un efecto aditivo. De esto se infiere que la acción de sus alelos normales es combinatorial, es decir, el camino de desarrollo queda definido por el efecto combinado de varios de estos genes funcionando, o no, en un código binario (García-Bellido 1975).

El análisis clonal de algunos de estos mutantes homoeóticos (García-Bellido y Santamaría 1972; Morata y García-Bellido 1976) ha permitido descubrir que este efecto sistémico sobre las células de un compartimento se refleja autónomamente en cada una de las células que llevan el genotipo mutante. - Estos resultados, confirmados para otros mutantes homoeóticos en otros laboratorios indican que 1) las señales génicas se registran e implementan en todas las células correspondientes del segmento o compartimento y 2) son necesarias constantemente para mantener en sucesivas generaciones celulares un determinado camino de desarrollo. En un esquema funcional estos genes se han llamado "selectores" (García-Bellido 1975). Dos preguntas se derivan inmediatamente de este esquema: ¿por qué mecanismos se activan estos genes en determinadas posiciones, segmentos o compartimentos, y no en otras? ¿cómo estas señales abstractas que actúan combinatorialmente se expresan en operaciones celulares concretas que definen las características morfogénicas de un compartimento?.

Contrariamente a lo que ocurre con la sustitución alélica durante el desarrollo de un selector por un alelo mutante, se dan casos en los que una alteración experimental al comienzo del desarrollo permanece irreversible durante todo el desarrollo subsiguiente, dando finalmente un fenotipo mutante. Este es el caso, p. e., de las fenocopias de bithorax, - una mutación correspondiente a un selector que determina la sustitución del segmento metatorácico por el mesotorácico. Tratamiento de huevos en el estadio del blastodermo con pulsos de temperatura o de eter etílico producen alteraciones semejantes (fenocopias) a las causadas por los mutantes del sistema bithorax. Análisis clonal y genético de estas fenocopias han mostrado que 1) la alteración se registra a nivel celular y se mantiene clonalmente, y 2) que la sensibilidad celular a estas fenocopias depende de la constitución genética del cigoto: aumenta cuando las células son heterocigóticas para una mutación en la región operador del sistema, pero no cuando son mutantes para alelos de los genes estructurales (Capdevila y García-Bellido 1974). Estos y otros resultados indican que estas fenocopias resultan de una interferencia en el mecanismo de señalización de posición. Esto ocurre posiblemente alterando la concentración de un inductor - que define posición y que interactúa con el producto de un gen "activador" del sistema bithorax, determinando que en unos casos el sistema bithorax quede abierto (esto es transcribible) en el segmento metatorácico en la condición normal o cerrado, como está normalmente en el mesotorax y en el caso de la fenocopia en el metatorax. Todavía no se sabe como esta condición del selector, abierto o cerrado para transcripción, se mantiene clonalmente.

La segunda pregunta: cómo se implementan las señales génicas de los selectores en términos morfogenéticos, no tiene una respuesta experimental todavía. Como hipótesis de trabajo se propone que las señales de los selectores se expresan por las operaciones de otros genes que, llamados "realizadores"

(García-Bellido 1975), determinarían comportamientos celulares genéricos, como ritmo de división, orientación ejes mitóticos, adhesividad y reconocimiento celular, etc., propiedades que se expresan en todos los sistemas en crecimiento pero de manera cualitativamente distinta en cada uno de ellos. Mutaciones morfogénéticas de tipo disruptivo podrían corresponder a algunos de estos genes realizadores. Mutaciones ya conocidas de este tipo (Santamaría y García-Bellido 1975) y otras aisladas nuevas (Ripoll y García-Bellido 1973; García-Bellido y Dapena 1974; Ferrús y García-Bellido 1976) han sido y están siendo estudiadas a nivel celular con el fin de entender qué funciones celulares son relevantes para la morfogénesis y preparar el camino para un entendimiento de cómo estas funciones se coordinan y son controladas genéticamente durante el desarrollo.



V

**CONTEXTO PARA LA TECNICA DE TRANSPLANTACION EN EL  
HUEVO DE DROSOPHILA**

*por*  
***Pedro Santamaría Yáñez***

**(CENTRE DE GENETIQUE MOLECULAIRE. CENTRE NATIONAL DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE. GIF-SUR-YVETTE. FRANCIA)**



En el estudio del desarrollo, uno o quizá el más importante tipo de análisis es el que se puede realizar sobre mosaicos genéticos. Un mosaico genético refiere al individuo, tejido o célula formado por más de un genotipo. Los mosaicos genéticos permiten analizar el proceso seguido por una célula y sus descendientes en un organismo en desarrollo. Es decir analizar procesos como : ritmo de división, migración celular, afinidad celular, interacciones celulares, estado de determinación, autonomía de diferenciación, etc.

Existen distintas técnicas para producir mosaicos genéticos, cada una con sus distintas aplicaciones, ventajas o desventajas.

Una de las más empleadas es la recombinación mitótica -lo que, hasta hace poco se ha venido llamando "crossing-over" somático- inducida por irradiación, normalmente rayos X. Mediante esta técnica una célula puede generar dos células descendientes, y los subsecuentes clones que son homocigóticos para todos los genes colocados en el cromosoma distalmente a la región que sufre la recombinación. Esos clones pueden ser identificados si el brazo cromosómico que ha sufrido la recombinación poseía en heterocigosis mutantes denominados marcadores celulares.

La ventaja de la técnica de recombinación mitótica inducida por rayos X es que el clon puede ser producido en un momento conocido. La desventaja es que, siendo la frecuencia en que se origina la recombinación, función del número de células, es difícil obtener mosaicos en los primeros estadios del desarrollo. Por otra parte, en el estudio de mutantes debe existir la posibilidad de asociarles mutantes marcadores celulares, lo cual no es siempre posible. Además, la posibilidad de una cierta mortalidad celular debida a la propia irradiación, debe siempre ser tenida en cuenta en el análisis de los resultados.



Otro tipo de análisis en mosaicos genéticos es el que se puede realizar en ginandros, individuos parte macho y parte hembra, producidos por la pérdida espontánea de un cromosoma sexual. Mutantes marcadores celulares pueden aparecer en hemicigosis en las células macho, permitiendo su reconocimiento.

En *Drosophila*, existen algunos cromosomas sexuales en anillo con una alta frecuencia de pérdida. También pueden producirse ginandros por el empleo de mutantes de acción materna o paterna como claret non-disjunction, paternal loss o mitotic loss inducer. La eliminación del cromosoma en anillo a la acción de claret tiene lugar preferentemente en la primera división nuclear del huevo.

La ventaja del empleo de ginandros es su espontaneidad. El inconveniente es que sólo permiten el análisis de genes ligados al cromosoma sexual aunque teóricamente se puede aceptar que translocaciones de pequeños fragmentos autosómicos al cromosoma X puedan ser perdidos con el mismo.

Otra técnica para producir mosaicos es la transplatación de órganos, tejidos o reagregados celulares en larvas o adultos. Así se pueden poner en contacto células o tejidos que en el desarrollo normal están separados y se pueden analizar las potencialidades de desarrollo de cada uno de los órganos, tejidos o células implantados. Esto permite analizar las interacciones entre órganos o células específicos con los genotipos deseados, mientras que con la recombinación mitótica o los ginandros, hay que esperar que el clon aparezca por suerte en el órgano deseado. Por otra parte, células que en el desarrollo normal nunca están en contacto pueden, por técnicas de transplatación, experimentar un desarrollo en contigüidad.

Un caso extremo de mosaico genético es el producido por fusión celular. Esta técnica puede ser muy útil en el análisis de regulación génica, su inconveniente es que en general, necesita el cultivo celular, lo que excluye su empleo en un análisis del desarrollo normal de un órgano.

La transplatación nuclear o celular en huevo es otro método de producción de mosaicos que, en este caso, reciben el nombre de quimeras. Técnicamente más difícil que los mecanismos anteriormente resumidos, posee ciertas características que pueden darle ventaja en determinados estudios de desarrollo. Estas características y las posibilidades de análisis que abre son estudiadas a continuación.

a) Esta técnica permite estudiar el estado de determinación de un núcleo o la reversibilidad de tal estado, si es que la determinación entendida como el compromiso de la célula en un camino específico de desarrollo, afecta en alguna manera al núcleo y no es un fenómeno que sólo puede ser aplicado a la célula como un ente indivisible. Los experimentos de transplatación nuclear en huevo han demostrado tanto en anfibios como en insectos que núcleos de células aparentemente diferenciadas son totipotentes y pueden asumir el desarrollo completo de un individuo.

b) Mediante la técnica de transplatación nuclear en huevo, se pueden analizar problemas de interacción nucleocitoplásmica. El huevo recibe de la madre, además del núcleo, una cantidad de organulos, algunos de los cuales como las mitocondrias, se autoreproducen. Las mitocondrias aun teniendo funciones semejantes son diferentes entre especies muy próximas e incluso entre individuos de la misma especie, variando la estructura de su D N A, lo cual puede estar en el origen de algunos de los fenómenos de efecto materno o de herencia extracromosómica descubiertos. Algunos genes nucleares pueden estar regulados por represores codificados por el D N A mitocondrial.

c) También mediante la transplatación en huevo puede ser posible identificar los factores que pueden producir específicos microambientes en el ooplasma. Asumiendo que la madre deja en el huevo, si no una información en mosaico, es decir específica para cada uno de los órganos que se van a originar de las distintas regiones del huevo -por ejemplo en forma de m R N A-, si al menos una información general que puede ser interpretada por las células condicionando la elección de un camino específico de desarrollo. Estos experimentos podrán realizarse mediante la transplatación entre embriones de piezas del cortex e implantación en el huevo de

citoplasma proveniente de células diferenciadas o la implantación de las mismas células en regiones específicas del huevo.

d) El análisis de los mosaicos producidos por transplatación nuclear puede permitir la identificación de tejidos particulares directamente afectados por mutaciones específicas, letales o morfogénicas e identificar qué órganos y en qué forma -autónoma o no- son afectados por la mutación. Con la ventaja sobre otras técnicas de producción de mosaicos genéticos, de que los mutantes marcadores celulares pueden estar en cualquier cromosoma y no necesariamente ligados a la mutación en estudio. También, cierto tipo de mutantes, letales o estériles (especialmente los dominantes) que afectan tejidos específicos, podrán ser mantenidos y estudiados mediante la producción de las quimeras adecuadas por medio de la transplatación nuclear o celular en huevo.

e) La localización de centros específicos de coordinación o control en estudios de neurobiología o de comportamiento, puede recibir un aporte sustancial mediante la producción de mosaicos por transplatación nuclear.

f) Es un método ideal para realizar un análisis genético de células somáticas. Trabajando con cultivo celular de Drosophila, se puede hacer todo el análisis bioquímico realizado en E. coli. Con la ventaja de que por la transplatación, núcleos provenientes de esos cultivos celulares pueden ser integrados en el polo germinal del huevo, integrarse en las gonadas y dar origen a individuos en los que poder estudiar el efecto del mutante en cuanto a desarrollo y morfogénesis se refiere.

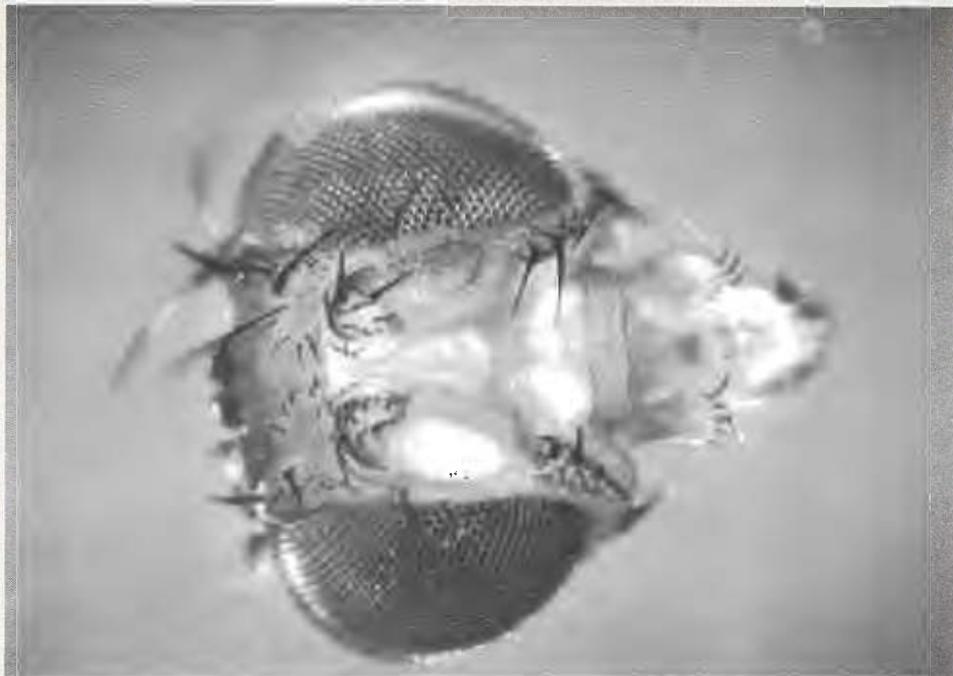
g) Ya de por sí interesantes desde el punto de vista inmunológico, las quimeras, en circunstancias adecuadas, pueden ofrecer claves en el análisis de fenómenos de inmuno-reacción y producción de antígenos.

h) El análisis de tumores, la especificidad de tejido de ciertas líneas tumorales y las distintas posibilidades de desarrollo y diferenciación de las mismas pueden ser analizadas también en quimeras.

El individuo completo (Fig. 1) es una hembra Drosophila melano-gaster mosaico en la cabeza. El huevo receptor era de genotipo vermilion brown, produciendo las células sin pigmento del ojo izquierdo. Los núcleos inyectados eran de genotipo yellow-forked. Estos núcleos son normales para los genes que controlan la producción de pigmentos en el ojo. Las células formadas con dichos núcleos aparecen en la mitad derecha de la cabeza.

La Figura 2 corresponde a la cabeza de un mosaico interespecífico. El huevo receptor era de Drosophila simulans y normal. Los núcleos inyectados eran de Drosophila melano-gaster y mutantes para yellow y forked. Las células formadas con los núcleos inyectados aparecen en la mitad izquierda de la cabeza donde se aprecian las quetas claras y torcidas, debido a los mutantes yellow y forked. Mitad izquierda Drosophila melano-gaster. Mitad derecha Drosophila simulans.









**FUNDACION JUAN MARCH**  
**SERIE UNIVERSITARIA**

**Titulos Publicados:**

- 1.— *Semántica del lenguaje religioso/A. Fierro*  
(Teología. España, 1973)
- 2.— *Calculador en una operación de rectificación discontinua/A. Mulet*  
(Química. Extranjero, 1974)
- 3.— *Skarns en el batolito de Santa Olalla/F. Velasco*  
(Geología. España, 1974)
- 4.— *Combustión de compuestos oxigenados/J. M. Santiuste*  
(Química. España, 1974)
- 5.— *Películas ferromagnéticas a baja temperatura/José Luis Vicent López*  
(Física. España, 1974)
- 6.— *Flujo inestable de los polímeros fundidos/José Alemán Vega*  
(Ingeniería. Extranjero, 1975)
- 7.— *Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental*  
José Antonio Salva Lacombe (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1973)
- 8.— *Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos/José Plá Carrera*  
(Matemáticas. España, 1974)
- 9.— *El fenómeno de inercia en la renovación de la estructura urbana.*  
Francisco Fernández-Longoria Pinazo (Urbanización del Plan Europa 2.000  
a través de la Fundación Europea de la Cultura)
- 10.— *El teatro español en Francia (1935-1973)/F. Torres Monreal*  
(Literatura y Filología. Extranjero, 1971)
- 11.— *Simulación electrónica del aparato vestibular/J.M. Drake Moyano.*  
(Métodos Físicos aplicados a la Biología. España, 1974)
- 12.— *Estructura de los libros españoles de caballerías en el siglo XVI.*  
Federico Francisco Curto Herrero (Literatura y Filología. España, 1972)
- 13.— *Estudio geomorfológico del Macizo Central de Gredos*  
M. Paloma Fernández García (Geología. España, 1975)
- 14.— *La obra gramatical de Abraham Ibn ° Ezra/Carlos del Valle Rodriguez*  
(Literatura y Filología. Extranjero, 1970)

- 15.— *Evaluación de Proyectos de Inversión en una Empresa de producción y distribución de Energía Eléctrica.* Felipe Ruíz López (Ingeniería. Extranjero, 1974)
- 16.— *El significado teórico de los términos descriptivos.*/Carlos Solís Santos (Filosofía. España, 1973)
- 17.— *Encaje de los modelos econométricos en el enfoque objetivos-instrumentos relativos de política económica.*/Gumersindo Ruíz Bravo (Sociología. España, 1971)
- 18.— *La imaginación natural (estudio sobre la literatura fantástica norteamericana).*/Pedro García Montalvo (Literatura y Filología. Extranjero, 1974)
- 19.— *Estudio sobre la hormona Natriurética.*/Andrés Purroy Unanua (Medicina, Farmacia y Veterinaria. Extranjero, 1973)
- 20.— *Análisis farmacológico de las acciones miocárdicas de bloqu coastes Beta-Adrenérgicos.*/José Salvador Serrano Molina (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1970)
- 21.— *El hombre y el diseño industrial.*/Miguel Durán-Lóriga (Artes Plásticas. España, 1974)
- 22.— *Algunos tópicos sobre teoría de la información.*/Antonio Pascual Acosta (Matemáticas. España, 1975)
- 23.— *Un modelo simple estático. Aplicación a Santiago de Chile.* Manuel Bastarreche Alfaro (Arquitectura y Urbanismo. Extranjero, 1973)
- 24.— *Moderna teoría de control: método adaptativo-predictivo Teoría y realizaciones.*/Juan Manuel Martín Sánchez (Ingeniería España, 1973)
- 25.— *Neurobiología (I Semana de Biología. Conferencia-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*







La Serie Universitaria de la Fundación Juan March presenta resúmenes, realizados por el propio autor, de algunos estudios e investigaciones llevados a cabo por los becarios de la Fundación y aprobados por los Asesores Secretarios de los distintos Departamentos.

El texto íntegro de las Memorias correspondientes se encuentra en la Biblioteca de la Fundación (Castello, 77. Madrid-6).

La lista completa de los trabajos aprobados se presenta, en forma de fichas, en los Cuadernos Bibliográficos que publica la Fundación Juan March.

Estos trabajos abarcan las siguientes especialidades: Arquitectura y Urbanismo; Artes Plásticas; Biología; Ciencias Agrarias; Ciencias Sociales; Comunicación Social; Derecho; Economía; Filosofía; Física; Geología; Historia; Ingeniería; Literatura y Filología; Matemáticas; Medicina, Farmacia y Veterinaria; Música; Química; Teología. A ellas corresponden los colores de la cubierta.

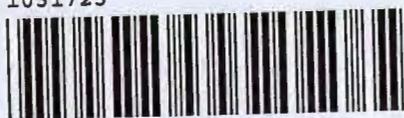
Edición no venal 750 ejemplares, que se reparte gratuitamente a investigadores, Bibliotecas y Centros especializados de toda España.

Estos trabajos fueron realizados dentro del período de vigencia del Plan Especial de Biología, 1973-1977.

Fundación Juan March



FJM-Uni 26/27-Gen  
Genética.  
Semana de Biología (Madrid.) 197  
1031723



Biblioteca FJM

Fundación Juan March (Madrid)

SERIE UNIVERSITARIA



Fundación Juan March

# GENETICA

## I Semana de Biología

Conferencias-coloquio sobre  
Investigaciones biológicas  
1977.

FJM  
Uni-  
27  
Gen

27

I Semana de Biología: Genética

27



Fundación Juan March  
Serie Universitaria

27

# GENETICA



Enrique Cerdá Olmedo  
María Luisa Salas Falgueras  
Claudio Fernández de Heredia Adánez  
Carlos Alonso Bedate  
Fernando Jiménez González-Anleo  
Pedro Puigdoménech Rosell  
Julián Perera González



Fundación Juan March  
Castelló, 77. Teléf. 225 44 55  
Madrid - 6

Fundación Juan March (Madrid)

*La Fundación Juan March no se solidariza necesariamente con las opiniones de los autores cuyas obras publica.*

Depósito Legal: M-12661-1977  
I.S.B.N.-84-7075-050-X  
Ibérica. Tarragona,34.Madrid-7

Fundación Juan March (Madrid)

*Los trabajos contenidos en el presente volumen fueron expuestos por sus autores en las conferencias-coloquio celebradas en la Fundación Juan March, dentro de la I Semana de Biología, en abril de 1977, y resumen investigaciones realizadas dentro del período de vigencia del Plan Especial de Biología de la Fundación.*



## I N D I C E

	Página
I. MUTACION: MECANISMOS Y APLICACIONES . . . . .	7
<i>por Enrique Cerdá Olmedo</i>	
1. Mecanismo de la mutagénesis con nitrosoguanidina . . . . .	9
2. Mecanismos de replicación del cromosoma bacteriano . . . . .	10
3. Biosíntesis de caroteno . . . . .	11
4. Comportamiento de <i>Phycomyces</i> . . . . .	13
5. Genética de <i>Phycomyces</i> . . . . .	14
6. Efectos genéticos de contaminantes ambientales . . . . .	15
II. POLIADENILATO POLIMERASAS EN CELULAS NORMALES Y TRANSFORMADAS POR VIRUS ONCOGENICOS . . . . .	17
<i>por María Luisa Salas Falgueras</i>	
III. CONTROL DE LA EXPRESION GENETICA DURANTE EL DESARROLLO TEMPRANO DE ARTEMIA SALINA . . . . .	25
<i>por Claudio Fernández de Heredia Adánez</i>	
IV. TAMAÑO Y DISTRIBUCION DE LAS SECUENCIAS DE ACIDO POLIADENILICO EN EL DNA POLITENICO Y RNA DE DROSOPHILA HYDEI . . . . .	31
<i>por Carlos Alonso Bedate</i>	
V. CONTROL DE LA MORFOGENESIS DEL BACTERIOFAGO $\phi$ 29 POR PROTEINAS NO PRESENTES EN LA PARTICULA VIRAL . . . . .	39
<i>por Fernando Jiménez González-Anleo</i>	
VI. APROXIMACION A LA ESTRUCTURA Y LA FUNCION DE UNA PROTEINA DE LA CROMATINA, LA HISTONA H1, POR RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR . . . . .	47
<i>por Pedro Puigdoménech Rosell</i>	
Introducción . . . . .	49
Resultados . . . . .	49

Conclusiones . . . . .	53
Bibliografía. . . . .	53
VII. CARACTERIZACION ESTRUCTURAL DE HISTONAS DE LEVADURA. ESTUDIOS DE DICROISMO CIRCULAR . . . . .	55
<i>por Julián Perera González</i>	

I  
**MUTACION: MECANISMOS Y APLICACIONES**

*por*  
*Enrique Cerdá Olmedo*

(DEPARTAMENTO DE GENETICA, FACULTAD DE CIENCIAS,  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA)



Este proyecto cubre varias líneas de investigación diferentes en bacterias y hongos, relacionadas todas con la obtención y la utilización de mutantes. La variedad interna del proyecto puede ser desventajosa desde el punto de vista del avance rápido en una dirección determinada y también para el prestigio de los científicos que lo realizan, pero es producto de una decisión consciente motivada por la necesidad de mejorar la formación de estudiantes y nuevos investigadores dentro del contexto científico general del país y del sevillano en particular.

1. Mecanismo de la mutagénesis con nitrosoguanidina. Este compuesto, cuyo nombre completo es N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, llama la atención porque las abundantes mutaciones que induce no están distribuidas aleatoriamente sobre el ADN, sino concentradas en las regiones en replicación en el momento del tratamiento. Esta relación entre acción de la nitrosoguanidina y replicación del ADN abre la posibilidad de que una o varias proteínas celulares intervengan como mediadoras en la acción mutagénica del compuesto.

Hemos intentado obtener mutantes de *Escherichia coli* en los que la nitrosoguanidina no sea capaz de inducir mutaciones. Partimos de una estirpe desarrollada por nosotros para la que el azúcar arabinosa es un eficaz antibiótico, diseñamos un microensayo rápido que permite detectar en una sola colonia bacteriana si la nitrosoguanidina es capaz de inducir mutaciones a resistencia a arabinosa y lo aplicamos a unas veinte mil colonias procedentes de células tratadas con nitrosoguanidina. Aislamos así la estirpe SE43, en la que la nitrosoguanidina no es capaz de inducir mu-

taciones, no sólo a resistencia a arabinosa, sino a cualquier otro fenotipo mutante.

SE43 es extraordinariamente sensible a las acciones letales de la radiación ultravioleta y de la nitrosoguanidina, lo que sugiere que tiene algún defecto en los mecanismos de reparación de daños inducidos al ADN. Es normal, tanto en mutación como en inactivación, ante el metanosulfonato de etilo. Es distinta de las demás mutaciones conocidas hasta ahora en los mecanismos de reparación, ya que todas éstas son mutagenizadas normal o casi normalmente por la nitrosoguanidina. SE43 crece defectuosamente y nunca alcanza altas densidades en cultivo líquido, motivos por los que probablemente no ha sido encontrada al buscar mutantes defectuosos en el mecanismo de reparación:

La existencia de la estirpe SE43 indica que la mutagenicidad de la nitrosoguanidina no es consecuencia exclusiva de su acción química sobre el ADN, sino que exige la participación de proteínas bacterianas. Nos proponemos investigar la naturaleza del defecto de este mutante en cuanto a mutación y reparación.

Otra forma de abordar el mismo problema es estudiar el efecto de la nitrosoguanidina sobre mutantes con diferentes alteraciones conocidas en el mecanismo de replicación. La nitrosoguanidina es capaz de mutagenizar normalmente todas las estirpes de este tipo. Encontramos que algunos mutantes *dnaE* (ó *polC*) eran menos sensibles a la acción mutagénica de la nitrosoguanidina en condiciones en que la tercera polimerasa del ADN se encontraba inactiva, pero no hemos podido confirmar este resultado en general y no podemos asegurar que esta enzima intervenga necesariamente en el mecanismo de mutación por nitrosoguanidina.

2. Mecanismos de replicación del cromosoma bacteriano. Dadas las propiedades de la nitrosoguanidina, la mutación simultánea de dos genes tras un tratamiento con este compuesto sugiere que ambos se replican a la vez. Con este criterio se puede estudiar el recorrido de los puntos de replicación sobre los cromosomas. Hemos investigado la inducción simultánea de mutaciones en pares de genes de *Escherichia coli*, con frecuencia superior a la esperada si los dos hechos fueran independientes.

Las mutaciones en los genes *ara* (incapacidad de utilizar ara binosa como fuente de carbono) van acompañadas muy frecuentemente de mutaciones en los genes *leu* (requerimiento de leucina), como era de esperar, dada la estrecha vecindad de estos dos grupos de genes sobre el cromosoma, y también de mutaciones en el gen *crp* (implicado en la represión catabólica). Los genes *crp* y *ara* se encuentran muy lejos sobre el cromosoma y hemos de concluir que son replicados simultáneamente por equipos de replicación diferentes. Este resultado está de acuerdo con la replicación bidireccional del cromosoma por dos equipos de replicación distintos que hayan salido simultáneamente de un origen situado en el minuto 87 del mapa normalizado del cromosoma y avancen simultánea y sincrónicamente en direcciones opuestas. Hemos encontrado además indicios de otros pares de genes lejanos que se replican simultáneamente.

Hemos investigado también la inducción simultánea de mutaciones dobles en la región donde presumiblemente se encuentra el origen de replicación (minuto 87 del mapa normalizado y sus vecinos). Se encuentran abundantes mutantes dobles que afectan a genes situados a más de cinco minutos de distancia en el mapa genético, por lo que han tenido que ser inducidos por los dos equipos de replicación al comienzo de su recorrido, cuando empiezan a alejarse uno del otro.

Proyectamos determinar con mayor precisión el origen de la replicación y el avance de los puntos de replicación.

3. Biosíntesis de caroteno. En trabajos anteriores, aplicamos un nuevo método experimental que aprovecha las peculiaridades de la heterocariosis en *Phycomyces*, la complementación cuantitativa, para estudiar la ruta de síntesis del  $\beta$ -caroteno y su determinación genética. Intervienen fundamentalmente cuatro genes: *carB*, responsable de la enzima deshidrogenasa del fitoeno, 4 de las cuales actúan sucesivamente para convertir el fitoeno en licopeno; *carR*, responsable de la enzima ciclasa del licopeno, 2 de las cuales actúan sucesivamente para convertir e éste en  $\beta$ -caroteno; *carS*, gen regulador, formalmente análogo a un represor bacteriano; y *carA*, gen de función desconocida, cuyos mutantes carecen de  $\beta$ -

caroteno y de sus precursores de 40 carbonos. La biosíntesis tiene lugar en un complejo enzimático que funciona como una cadena de montaje, pasando sustratos de unas enzimas a otras.

Nuestra actual hipótesis de trabajo es que *carA* y *carR* no son genes distintos, sino dos partes de un mismo gen, productor de una cadena polipeptídica bifuncional. Por ahora, esta hipótesis se ve apoyada por las siguientes observaciones:

(a) Muchos mutantes carecen de ambas funciones, y no complementan con mutantes *carA* ni *carR*. Es difícil aceptar que sean dobles mutantes *carA carR*.

(b) La clasificación de los mutantes blancos y rojos obtenidos por tratamiento de estirpes amarillas, productoras de  $\beta$ -caroteno, con los mutágenos nitrosoguanidina, que produce sobre todo sustituciones de unas bases por otras en el ADN, e ICR-170, que produce con frecuencia desfases en la clave genética apoya la idea del gen bifuncional.

(c) El análisis de los pigmentos producidos por heterocariotes con diversas combinaciones de alelos *carA* nos ha llevado a concluir que el producto de este gen interviene en la ciclación del licopeno, facilitando el transporte de sustratos de unas enzimas a otras y la readmisión de sustratos semielaborados del medio externo al complejo enzimático.

(d) No hemos encontrado recombinantes entre *carA* y *carR*. Los mutantes *carR* son estériles, pero se han podido estudiar cruzamientos con heterocariotes que llevan mutaciones *carR* y alelos normales.

(e) Este laboratorio descubrió que la vitamina A estimula grandemente la síntesis de caroteno y es capaz de compensar el defecto genético de los mutantes *carA*, haciéndoles producir una cantidad apreciable de caroteno. Por otra parte, la 2-(4-clorofenil tio)-triatilamina,  $\delta$  CPTA, impide la ciclación y provoca la acumulación de los precursores licopeno y  $\gamma$ -caroteno. Los mutantes que hemos aislado por responder poco a la vitamina A son poco sensibles al efecto del CPTA y los mutantes que hemos obtenido por responder poco al efecto del CPTA son también poco sensibles al de la vitamina A. Finalmente, en la estirpe silvestre, la presencia

de la vitamina A impide el efecto anticiclación del CPTA. Estas observaciones sugieren alguna relación entre los productos de *carA* y *carR*, blancos probables respectivos de la vitamina A y del CPTA.

4. Comportamiento de *Phycomyces*. La complejidad de sus respuestas sensoriales y la sencillez organizativa y facilidad de manejo del organismo hacen de *Phycomyces* un buen modelo para el estudio del comportamiento. Desde hace tiempo se sospecha que el fototropismo de los esporangióforos de *Phycomyces* es mera consecuencia de variaciones locales en la velocidad del crecimiento (mecismos), aparecidas en respuesta a variaciones locales en intensidad luminosa. Hemos completado un modelo cuantitativo del funcionamiento de *Phycomyces*, que supone que los fotoreceptores están colocados en la superficie celular y giran con ella alrededor del eje del esporangióforo. Expuestos a iluminación lateral, el cambio de intensidad más significativo que encuentran los fotoreceptores en su giro es el paso por una de las dos bandas brillantes provocadas por el enfoque de la luz por el propio esporangióforo. Hemos calculado las respuestas esperadas en cada momento de este giro y hemos simulado el comportamiento de *Phycomyces* con ayuda de un ordenador del Ministerio de Educación y Ciencia. Los resultados concuerdan con las numerosas observaciones experimentales existentes, explican, por primera vez, diversas relaciones matemáticas entre estímulos y respuestas antes conocidas pero incomprensibles, e identifican los elementos fundamentales de la geometría y de la mecánica del hongo responsables de su fototropismo.

Tras el aislamiento y el estudio de numerosos mutantes, hemos hecho anteriormente un esquema general de las conexiones entre receptores sensoriales y respuestas, determinando el lugar que corresponde a cada uno de los productos génicos identificados. Hemos estudiado ahora nuevos mutantes, pero sin añadir nada realmente nuevo al esquema anterior. Hemos estudiado la fotoinducción de caroteno en algunos de los mutantes ya existentes, concluyendo que sólo los mutantes del gen *madB* son anormales para esta función sensorial. La fotocarotenogénesis es la única respuesta sensorial bien estudiada que depende del nivel absoluto, y no del cambio, en la iluminación, lo que supone la ausencia del mecanismo

de adaptación presente en las demás respuestas. Como consecuencia de este estudio, el gen *madB* es el más probable candidato para determinar la estructura de la proteína que, unida a riboflavina, constituye el fotoreceptor. Los genes *madA* y *madC* probablemente determinen el mecanismo de adaptación. Los otros cuatro genes conocidos determinan funciones comunes a varios tropismos y mecanismos, es decir, funciones tardías del proceso sensorial.

5. Genética de *Phycomyces*. El sistema genético de *Phycomyces* es original en que miles de núcleos haploides de cada uno de los parentales de sexo opuesto emigran a una célula común especializada, la zigospora, y eventualmente producen unas diez mil esporas haploides como progenie. En investigaciones anteriores, encontramos que sólo un núcleo diploide, formado por la fusión de un núcleo haploide de cada sexo, sufre meiosis y sus productos haploides se reproducen mitóticamente para determinar toda la progenie.

En cruzamientos recientes, hemos encontrado que los núcleos de un parental no recombinan jamás entre sí, sino sólo con núcleos del otro parental. Si uno de los parentales es un heterocarionte intersexual, que contenga proporciones muy desequilibradas de núcleos de ambos sexos, se comporta genéticamente como determina la fracción mayoritaria. Los núcleos minoritarios no se cruzan con los del sexo opuesto del mismo parental, sino con los núcleos de su mismo sexo procedentes del otro parental. Concluimos que existe una identificación sexual de cada núcleo de *Phycomyces* que está determinada, no por los genes del mismo núcleo, sino por el fenotipo predominante en el micelio. Además, este hecho nos permite obtener recombinantes entre genomas del mismo sexo.

Hemos investigado la variabilidad electroforética de varias proteínas en muchas estirpes silvestres de *Phycomyces* procedentes de diversos países. La fosfatasa alcalina es extraordinariamente constante en todas ellas, encontrándose siempre en las dos mismas bandas electroforéticas. Las esterasas, por el contrario, presentan una extrema variabilidad, tanto por el número de bandas (de 1 a 6) como por su localización. Las principales bandas de proteínas del extracto crudo son también muy variables. El grado de diferenciación genética entre diversas estirpes silvestres de *Phyco*

*myces* parece muy superior al encontrado en organismos superiores.

6. Efectos genéticos de contaminantes ambientales. Hemos empleado dos ensayos desarrollados en nuestro laboratorio para el estudio de los efectos genéticos de los contaminantes ambientales. Se trata de un ensayo simplificado para la detección de mutágenos en la bacteria *Salmonella typhimurium*, de gran sensibilidad, precisión e independencia de artefactos experimentales, y de un ensayo con *Phycomyces* para determinar las causas de la muerte celular.

Todos los fungicidas comerciales que hemos investigado matan a las células a través de acciones citoplásmicas, no relacionadas con los núcleos. Varios de ellos, de uso común actual en España, son mutagénicos, incluso a concentraciones de una parte por millón. La espectacular correlación existente entre mutagenicidad y carcinogénesis y el peligro que supone un aumento de las tasas de mutación exigen que sean sustituidos por otros fungicidas no mutagénicos.

El potente mutágeno ICR-170 produce daños mitóticos (que impiden la división futura del núcleo afectado), mutaciones letales recesivas y daños citoplásmicos.

El calor no es mutagénico ni siquiera en condiciones subletales. Su acción letal depende del estado de las esporas tratadas; si están en reposo, su acción es citoplásmica, pero si han comenzado a germinar, se detecta un componente importante de daños mitóticos.

*Participaron en estas investigaciones E. Cerdá Olmedo, I. González Roncero, I. López Díaz, J. R. Medina Precioso, F. Murillo Araujo, M. C. Pueyo de la Cuesta, R. Ruiz Vázquez, R. Rull García, S. Torres Martínez y H. I. Yaxán.*



II

**POLIADENILATO POLIMERASAS EN CELULAS NORMALES Y  
TRANSFORMADAS POR VIRUS ONCOGENICOS**

*por*

*María Luisa Salas Falgueras*

(INSTITUTO DE BIOLOGIA DEL DESARROLLO. CONSEJO SUPERIOR DE  
INVESTIGACIONES CIENTIFICAS. MADRID)



En organismos eucarióticos el producto primario de la transcripción nuclear es un RNA heterogéneo con un tamaño que oscila entre los 5000 y 50.000 nucleótidos, siendo, por lo tanto, su peso molecular 10 a 100 veces mayor que el del RNA mensajero citoplasmático. El RNA nuclear heterogéneo (HnRNA) da lugar al RNA mensajero (mRNA) por un proceso de maduración, todavía no bien definido, pero que debe incluir un paso de excisión nucleolítica. Una de las pruebas que se han presentado para demostrar la existencia de una relación precursor-producto entre el HnRNA y el mRNA es la presencia, en ambas moléculas, de una cadena de poli A de 100 a 250 nucleótidos de longitud unida covalentemente a sus extremos 3'-hidroxilo. Se ha sugerido que la adición de poli A al HnRNA podría actuar como una señal para procesar estas moléculas a mRNA y que las secuencias de poli A juegan un papel fundamental en el transporte del mensajero del núcleo al citoplasma. Además de su función nuclear y de transporte, el poli A podría alterar la traducción de los mRNAs y la estabilidad citoplasmática de los mismos.

La síntesis de las secuencias de poli A parece ser posttranscripcional y posiblemente está catalizada por la poli A polimerasa, un enzima que se encuentra ampliamente distribuido en organismos eucarióticos y procarióticos. Este enzima cataliza in vitro la síntesis de poli A, utilizando como sustrato ATP y requiriendo como iniciador de la reacción un RNA. En los casos estudiados, el producto sintetizado se encuentra unido covalentemente al extremo 3'-OH del RNA.

En un estudio de la regulación posttranscripcional de la expresión del genoma parece, por lo tanto, muy importante examinar los factores que pueden controlar la adición de poli A al HnRNA y mRNA. En este trabajo se consideran los siguientes factores: posible existencia de varias formas de poli A polimerasa; niveles de estos enzimas dependiendo del estado fisiológico de la célula y, finalmente, características de la reacción de

poliadenilación in vitro.

Este estudio ha sido realizado utilizando un sistema de células animales en cultivo que presenta, entre otras, las siguientes ventajas : posibilidad de trabajar con una población celular homogénea, esencial para investigar la existencia de varias formas de poli A polimerasa en una célula; simplifica el control de las condiciones externas y hace posible la comparación de las poli A polimerasas en diferentes estados fisiológicos celulares (estado de reposo frente al de proliferación celular); asimismo, es posible comparar células normales y transformadas por virus, con el fin de ver si la transformación afecta de alguna manera a los niveles ó propiedades de estos enzimas.

Hemos examinado la presencia de poli A polimerasas en un clón de la línea establecida de fibroblastos de hamster (NIL) y en un subclón de esta línea (NIL-HSV), transformada por el virus del sarcoma de hamster. Los resultados indican la existencia de tres formas de poli A polimerasa, designadas I, IIA y IIB, en cultivos densos de NIL y NIL-HSV. Las formas IIA y IIB también están presentes en las células normales y transformadas creciendo exponencialmente. La poli A polimerasa I no se ha detectado en NIL en fase logarítmica, mientras que las células transformadas contienen niveles comparables de este enzima en fase estacionaria y logarítmica. Hay que resaltar el hecho de que no se ha encontrado ninguna poli A polimerasa específica de las células transformadas.

La caracterización de estos enzimas como poli A polimerasas se ha basado en los siguientes criterios : 1) gran especificidad por ATP; 2) requerimiento de un RNA como iniciador de la reacción; 3) identificación del producto como poli A por varios métodos; 4) requerimiento de un extremo 3'-hidroxilo en el iniciador; 5) unión covalente del poli A sintetizado a dicho extremo.

Las poli A polimerasas se han separado por cromatografía en DEAE-celulosa y fosfocelulosa. Además de su distinto comportamiento cromatográfico, los tres enzimas muestran diferentes

requerimientos por cationes divalentes.

Se ha llevado a cabo un estudio más extenso de las propiedades de las poli A polimerasas IIA y IIB, las dos formas más abundantes en la célula, y de las características de la reacción que catalizan estas enzimas.

Las poli A polimerasas IIA y IIB presentan una serie de propiedades enzimáticas similares, tales como la  $K_m$  para el ATP y la inhibición por sal, fosfato inorgánico, pirofosfato inorgánico y N-etilmaleimida, observándose algunas diferencias en las curvas de actividad en función del pH y, como se indicó anteriormente, en el efecto de los cationes divalentes.

No se han encontrado diferencias significativas en la especificidad para el iniciador de las poli A polimerasas IIA y IIB. En nuestras condiciones in vitro ambas enzimas son poco específicas, mostrando actividad con una serie de RNAs y polirribonucleótidos sintéticos e, incluso, con DNA y polideoxirribonucleótidos. Esta inespecificidad para el iniciador de las poli A polimerasas no descarta la posibilidad de que estas enzimas tengan una acción más específica in vivo. Dicha especificidad podría estar determinada por la localización intracelular de las poli A polimerasas ó por factores adicionales que se pierden durante el proceso de aislamiento y purificación de estas enzimas.

Aunque las poli A polimerasas no parecen discriminar entre diferentes tipos de RNA, hemos observado que existe un efecto claro del tamaño del RNA sobre su actividad como iniciador. Dentro de los márgenes examinados, cuanto mayor es el peso molecular del RNA mayor es su eficacia como iniciador.

Las diferencias más notables entre las poli A polimerasas IIA y IIB se encuentran en la afinidad por el iniciador y en la longitud del poli A sintetizado. Las curvas de saturación de las poli A polimerasas con respecto al iniciador, indican que la polimerasa IIA tiene una afinidad mucho mayor por el RNA que la polimerasa IIB. Por otra parte, la polimerasa IIA sintetiza cadenas de poli A considerablemente más largas que el enzima IIB. Además, mientras que la longitud del producto sintetiza-

do por la forma IIB disminuye al aumentar la concentración del RNA iniciador, en el caso de la polimerasa IIA no varía dicha longitud. Teniendo en cuenta la gran afinidad de la polimerasa IIA por el RNA, podemos postular la siguiente hipótesis que explicaría los resultados anteriores. Una molécula del enzima IIA se une a una molécula de iniciador y extiende la cadena de poli A sin disociarse del complejo. De este modo la longitud del producto sería siempre la misma, independientemente de la relación iniciador/enzima. Por el contrario, la polimerasa IIB después de añadir cada residuo de AMP se disociaría del iniciador-producto y podría unirse a otras moléculas de RNA; en este caso, por lo tanto, cuanto mayor sea la relación iniciador/enzima, menor será la longitud del producto. Según esta hipótesis, la polimerasa IIA podría actuar preferentemente en la extensión de las cadenas de poli A, mientras que el enzima IIB tendría una misión iniciadora.

Las propiedades físico-químicas de las poli A polimerasas IIA y IIB, resumidas en la Tabla I, son muy similares. Ambos enzimas muestran un punto isoeléctrico de 6 y un coeficiente de sedimentación de 3,5-4 S. El peso molecular en estado nativo del enzima IIA es 145.000 y el del enzima IIB 155.000. Se propone un modelo estructural según el cual estos enzimas estarían compuestos por dos subunidades, una catalítica de peso molecular 60.000-65.000 y otra no catalítica de peso molecular 85.000-90.000. Por sedimentación en gradientes de sacarosa las subunidades se disociarían, detectándose solamente la catalítica de 3,5-4 S.

Tabla I. Propiedades físico-químicas de las poli A polimerasas IIA y IIB

Enzima	Punto isoeléctrico	Coficiente de sedimentación	Peso molecular nativo	Movilidad electroforética en condiciones disociantes.
Poli A polimerasa IIA	6	3,5-4 S	145.000	Dos bandas de peso molecular 85.000 y 60.000
Poli A polimerasa IIB	6	3,5-4 S	155.000	Dos bandas mayoritarias de peso molecular 90.000 y 65.000



**III**

**CONTROL DE LA EXPRESION GENETICA DURANTE  
EL DESARROLLO TEMPRANO DE ARTEMIA SALINA**

*por*

*Claudio Fernández de Heredia Adanez*

(INSTITUTO DE ENZIMOLOGIA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTI-  
GACIONES CIENTIFICAS. FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD  
AUTONOMA. MADRID)



El problema de la diferenciación celular y del desarrollo de los organismos superiores es uno de los campos de investigación más atractivos y prometedores de la biología actual. En nuestro acercamiento al estudio del problema de la diferenciación y desarrollo partimos del postulado, generalmente admitido, de que el control de la expresión de la información genética en los organismos eucariotes es la base molecular de la diferenciación a sus distintos niveles. Por ello, el estudio de los mecanismos que regulan la expresión de la información genética es un paso previo para el esclarecimiento y comprensión del proceso de diferenciación a nivel molecular. En los organismos eucariotes el control de la expresión de la información genética es un problema muy complejo debido a la multiplicidad de niveles que pueden ser operativos: organización del genoma, estructura de la cromatina, transcripción y procesamiento de los RNA, traducción, interacciones moleculares de los productos de traducción, segregación de estos procesos en el tiempo y en el espacio. Solo rompiendo la complejidad del sistema y conociendo mejor las propiedades de sus componentes aislados podremos proponer hipótesis concretas sobre la regulación de los procesos de diferenciación. El abordaje genético debe jugar el importante papel de verificar estas hipótesis mediante la investigación de mutantes relacionados con los procesos de diferenciación y desarrollo.

El sistema biológico elegido para estos estudios ha sido el crustáceo Artemia salina, organismo cada vez más utilizado por distintos grupos de investigadores interesados en estos problemas. Se trata de un organismo que vive en medios de alta concentración salina, su ciclo biológico es relativamente corto y puede reproducirse en el laboratorio. La hembra adulta puede ser vivípara u ovípara. En el último caso, los huevos fecundados se desarrollan hasta gástrula dentro del ovisaco, se enquistan y son expulsados al exterior. Tras sufrir desecación, las gastrulas enquistadas (quistes) pueden permanecer viables durante años. Cuando estos quistes se

incubaban en una solución salina se desarrollan dando lugar a animales adultos en aproximadamente tres semanas. El período de gástrula enquistada a larva es el más estudiado desde el punto de vista bioquímico debido a la disponibilidad comercial de los quistes y al tipo un tanto especial de desarrollo en el que con intensa actividad morfogénica, se pasa de gástrula a larva sin aumento del número de células. El hecho de que tanto el desarrollo embrionario postgastrular como el larvario temprano puedan sincronizarse en el laboratorio hacen a este sistema muy adecuado para el estudio de las bases moleculares del control de la expresión genética durante el desarrollo.

A lo largo del primer año de desarrollo del proyecto de investigación sobre regulación de la expresión genética a nivel de transcripción durante la diferenciación de Artemia salina, hemos centrado nuestra atención por una parte en la resolución de problemas metodológicos necesarios para abordajes experimentales posteriores y por otra parte a un análisis de los cambios temporales de la maquinaria de transcripción tanto desde el punto de vista del estado del DNA y la cromatina como de las actividades enzimáticas directamente implicadas o relacionadas con el proceso de transcripción. Igualmente hemos estudiado la variación en los niveles de enzimas degradativos de ácidos nucleicos y proteínas con el doble propósito de esclarecer su posible papel durante el proceso de diferenciación y poder controlar su acción deletérea durante la experimentación.

En relación con el primer punto se han desarrollado métodos que permiten obtener poblaciones homogéneas y sincrónicas de Artemia en distinto estadio del desarrollo; se ha conseguido hacer permeables los quistes a precursores de ácidos nucleicos y proteínas y se han puesto a punto métodos directos y sensibles para el estudio de interacciones entre el DNA y las proteínas. La separación de poblaciones homogéneas de distintos grados de desarrollo (embriones, prenauplias y nauplias) se ha conseguido mediante combinación de métodos basados en separación en gradientes de densidad con la propiedad de fototropismo positivo que poseen las nauplias nadadoras. El marcaje de macromoléculas, con precursores radiactivos en los primeros estadios del desarrollo venía impedido por la impermeabilidad básica de los quistes a precursores de ácidos nucleicos

y proteínas. Se ha conseguido, mediante tratamientos con combinaciones apropiadas de hipoclorito sódico y disolventes orgánicos, permeabilizar los quistes a estos precursores, sin pérdida apreciable en la viabilidad de los mismos. La necesidad de estudiar las interacciones entre DNA y proteínas nos llevaron al desarrollo de métodos simples, directos y sensibles basados en la alta reactividad de las proteínas con la fluorescamina o del DNA con el ácido diaminobenzoico y análisis de los complejos formados mediante fluorometría.

En relación con el análisis de los cambios temporales de la maquinaria de transcripción, se ha podido aislar cromatina funcionalmente activa y poner de manifiesto que su modificación por enzimas acetilantes viene regulada no solo por la variación de los niveles de estas enzimas a lo largo del desarrollo, sino también por la modulación de estas actividades enzimáticas por efectores cuyos niveles varían también durante el desarrollo. Se han purificado y caracterizado tres RNA polimerasas. Los cambios cuantitativos encontrados para estas actividades enzimáticas durante el desarrollo embrionario y primeras fases del desarrollo larvario y su sensibilidad a distintos efectores hacen muy verosímil su implicación como reguladores del proceso de transcripción. Los altos niveles de diguanosintetrafosfato en las fracciones nucleares de quistes de Artemia y su desaparición rápida y total durante las primeras etapas del desarrollo, hacían a este compuesto buen candidato como regulador de la expresión de la información genética. Se ha iniciado un estudio de la acción de este compuesto sobre la transcripción y se han podido identificar y caracterizar el enzima responsable de su rápida degradación.

Con el doble propósito de poder esclarecer su posible papel durante el proceso de diferenciación de Artemia y de poder controlar su acción deletérea durante la experimentación, se ha realizado una exploración de enzimas degradativos de ácidos nucleicos y proteínas y de los cambios de sus niveles en distintos estadios del desarrollo. Se ha visto que los quistes poseen niveles muy pequeños de estos enzimas degradativos y que estos niveles aumentan muy significativamente durante el desarrollo larvario temprano. Se han purificado y caracterizado parcialmente DNAsas, una RNAsa con alta eficacia para ruptura de enlaces entre restos de uridina, dos ami-

noacil-tRNA hidrolasas con distinto grado de especificidad y varias proteasas, una de las cuales parece tener un papel importante en la degradación selectiva de una de las RNA polimerasas y otra en la degradación de las plaquetas de vitelo durante los primeros estadios del desarrollo. En relación con estas plaquetas de vitelo se ha obtenido evidencia experimental que apunta fuertemente hacia que posean un papel no solo de material de reserva sino tambien de almacenaje informacional. El gran aumento de actividades mitocondriales que se observa durante los primeros estadios del desarrollo de Artemia parece deberse a un desvelamiento de mitocondrias almacenadas en estos corpúsculos.

Personas que integran el equipo de investigación: A. Cano, M. Carratalá, J.V. Castell, R. Castro, M. Cervera, A. Coloma, J. Cruces, M.C. Dominguez, C.F. Heredia, P. Llorente, R. Marco, A. Moreno, C. Osuna, D. Pascual-Salcedo, A. Pestaña, M. Quintanilla, J. Sebastian, A. Sillero, M.A.G. Sillero, A. Ruiz y C.G. Vallejo.

IV

TAMAÑO Y DISTRIBUCION DE LAS SECUENCIAS DE ACIDO  
POLIADENILICO EN EL DNA POLITENICO Y  
RNA DE DROSOPHILA HYDEI

*por*

*Carlos Alonso Bedate*

(DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR. CENTRO  
DE BIOLOGIA MOLECULAR. UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID)



Las técnicas más modernas empleadas en biología molecular han introducido nuevos puntos de vista en lo referente a la organización y expresión del genomio de los seres superiores y a su evolución. Es cierto que la mayoría de estos nuevos puntos de vista se derivan inmediatamente de la aplicación de estas técnicas. Sin embargo faltan muchos datos para esclarecer los mecanismos del funcionamiento, elaboración de productos y evolución del DNA y sus superestructuras.

Puesto que se han detectado secuencias de ácido poliadenilico en moléculas de mRNA y HnRNA<sup>1-2</sup> y estas secuencias parecen ser parte integrante fundamental de algunos mRNA el estudio del metabolismo de estas secuencias es de especial importancia en lo que se refiere a la expresión génica.

Se conoce que la mayoría de las moléculas de mRNA se transcriben de secuencias únicas del DNA<sup>3-4</sup> y se ha propuesto que la adición de poli (A) al extremo 3' de los precursores nucleares sea un paso importante en la elaboración y transporte del mRNA al citoplasma<sup>5-6</sup>. Ya que la poliadenilación de la molécula de RNA es post-transcripcional<sup>7</sup>, aunque sin embargo una gran cantidad de mRNA no está poliadenilado<sup>8-9</sup>, es muy probable que en todas o en gran parte de las moléculas se efectúe a un RNA previamente poliadenilado y no a un RNA que no contenga en el extremo 3' de su mRNA algún fragmento rico en adeninas. En este caso el mecanismo de regulación por el cual

unas moléculas de RNA contienen poli A y otras no estaría -  
codificado en el mismo DNA ya que los precursores nucleares  
del mRNA citoplasmático pueden estar transcritos de fragmen-  
tos de DNA que contienen o no secuencias de poli (dT) en su  
molécula y que servirían como los iniciadores para la prolon-  
gación y formación de la cadena de poli A. Esto induce a pen-  
sar que en el DNA deben existir fragmentos de poli (dA):poli  
(dT). Con objeto de determinar este presupuesto se ha estudia-  
do la proporción de secuencias de poli (dA) en el DNA y cRNA  
lo mismo que su tamaño. Las secuencias de poli (dA) se han -  
identificado por medio de la hibridación de  $^3\text{H}$ -poli (U) al -  
DNA y cRNA. El tamaño ha sido determinado por electroforesis  
en geles de poliacrilamida al 10%.

Dado que los cromosomas politénicos son un material ex-  
celente para la localización in situ de fragmentos específi-  
cos del DNA se ha realizado la hibridación in situ de  $^3\text{H}$  poli  
(U) a los cromosomas de *D. hydei* con objeto de determinar en  
ellos la distribución al azar o específica de las secuencias  
de poli (dA).

El DNA se obtuvo de nucleos politénicos siguiendo una -  
metodología anteriormente descrita<sup>10</sup>. La purificación del DNA  
se llevó a cabo en columnas de hidroxapatita. RNA complemen-  
tario de cRNA este DNA se transcribió in vitro.  $^3\text{H}$  poli (U) -  
se sintetizó in vitro con la polinucleótido fosforilasa de -  
*Micrococcus polysideicticus* con una actividad específica de -  
 $1.3 \times 10^5$  cpm/ug. Las moléculas de poli (U) radioactivo se hi-  
bridaron en filtros o en solución (2 x SSC = 0,30 M NaCl y  
0,030 M citrato sódico) al DNA o cRNA. El tiempo de hibrida-  
ción fué 3 1/2 hrs y la temperatura 30°C, puesto que ésta  
temperatura es la óptima encontrada para la hibridación de -  
poli (U) al DNA o cRNA. 0,012 ug de DNA o cRNA se colocaron  
sobre los filtros y la misma cantidad se hibridó a 2.4 ng de  
 $^3\text{H}$  poli (U) en 5 uL. de 2 x SSC. La hibridación in situ se -

realizó en idénticas condiciones.

En la tabla 2 se indica que el 0,43% - 0,48% del DNA desnaturalizado se satura con  $^3\text{H}$  poli (U) cuando el DNA se fija en filtros y que sólo el 0,37% del DNA desnaturalizado se satura con  $^3\text{H}$  poli (U) cuando está en solución. Por otro lado el 0,20% - 0,21% del DNA no desnaturalizado forma complejos con el  $^3\text{H}$  poli (U). Puesto que las cadenas de poli (dA) presentes en el DNA desnaturalizado pueden unirse a dos cadenas de poli (U) y aún la doble cadena poli (dA):poli (dT) puede asociarse con una cadena de poli (U), la cantidad de poli (dA) en el DNA debe de ser 0,23% - 0,25% del total. Así pues  $6 \times 10^5$  residuos de ácido uridílico deben existir en el genoma de *D. hydei*. De igual manera el 0,23% - 0,31% del cRNA se satura con poli (U). Esto parece indicar que las dos cadenas del DNA se transcriben in vitro y que no existe transcripción diferencial de las secuencias del DNA.

Después de la incubación del DNA o cRNA con un exceso de  $^3\text{H}$  poli (U) los híbridos DNA-cRNA: poli (U) se separaron de las cadenas libres de poli (U) mediante la digestión con RNase. Los híbridos se precipitaron con ETOH y se disolvieron en buffer E (0,4 M Tris - HCL pH 7,4, 0,06 M acetato sódico, 0,003 M EDTA). Usando como referencia el RNA 4S y 5S de *E. Coli* se calculó que los tamaños de  $^3\text{H}$  poli (U) que hibridan al DNA eran de 40 nucleótidos en longitud. Como se debía esperar los tamaños de poli (dA) y poli (rA) en el DNA y cRNA respectivamente son iguales.

Con objeto de comprobar el grado de homogeneidad interna y especificidad de los híbridos formados se efectuó la desnaturalización de los mismos en presencia de una larga cantidad de poli (U) no marcado. Se observó que la transición en las cercanías del punto de fusión era bastante ancha debido muy probablemente a heterogeneidad interna de la molécula de poli

(dA) o poli (rA). El  $T_m$  de los híbridos es 45°C.

<sup>10</sup> Bishop había descrito con anterioridad que en el DNA de pato los fragmentos de ácido poliadenílico no estaban todos distribuidos en una misma región del DNA sino que estaban entremezclados con secuencias de DNA que no formaban híbridos con poli (U). La hibridación in situ de <sup>3</sup>H poli (U) a los cromosomas politénicos confirma que los fragmentos de poli (U) - se distribuyen a lo largo de los cromosomas sin especificidad. Los lugares que contienen secuencias altamente repetitivas no contienen más fragmentos de poli (U) que otras regiones de los cromosomas. Se calculó que los cromosomas no desnaturalizados retienen el 9% de la cantidad total de poli (dA) del DNA. Este resultado indica que la eficiencia de hibridación in situ de estos fragmentos es del 9%. Estos experimentos junto a algunos descritos en la literatura científica no permiten dudar el que la adición de ácido poliadenílico a la molécula de mRNA sea posttranscripcional, sobre todo teniendo en cuenta que el tamaño de la molécula de poli (A) en el mRNA citoplasmático de *Drosophila hydei* de unos 150 nucleótidos de longitud<sup>11</sup>. Parece además que la adición se efectúa a un RNA que está previamente poliadenilado y que no ocurre a un RNA que no lo está. Así pues se podría pensar que la señal de adición o no adición de ácido poliadenílico a la molécula de RNA está codificada en el mismo DNA. En este presupuesto sería más lógico pensar que los organismos más ricos en genes serían al mismo tiempo más ricos en poli (A). Aunque una correlación de este tipo se podría efectuar en casos determinados, sin embargo no existen datos suficientes que permitan establecer la proporción entre la complejidad analítica del DNA, número de genes y cantidad de poli (U). La distribución no específica de los fragmentos de poli (A) en los cromosomas politénicos parecería indicar que la mayoría de los genes tienen una secuencia de poli (A) y que ésta podría servir como lugar de iniciación para una poli (A) polimerasa. Es necesario examinar

si el fragmento de poli (dT) en el DNA está en el extremo 3' de la secuencia codificante del mRNA. Puesto que la longitud media de los fragmentos de poli (dA) en el DNA es de 40 nucleótidos se puede calcular que deben existir 15,000 de estas secuencias en el DNA. Es notorio que la cantidad propuesta - de genes que existen en *Drosophila* sea del mismo orden.

La confirmación de la adición posttranscripcional de residuos de adenina a la molécula de HnRNA o mRNA viene dada por uno de los experimentos más sugerentes llevados a cabo - por Pages<sup>12</sup>. Este autor demuestra de una manera directa por hibridación in situ que a pesar de que no existen moléculas - de RNA poliadeniladas en el puff 2-48BC<sup>13</sup>, moléculas de mRNA poliadeniladas en el citoplasma son codificadas en esa región. Clara indicación de que la poliadenilación no se realiza - por transcripción ni en el cromosoma mismo.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Edmons, H., et al (1971). Proc. Nat. Acad. Sci 68 1336-1340
2. Galau, G.A., et al (1974). Cell 2 9-21.
3. Davidson, E.H., et al (1975) Cell 4 217-238.
4. Darnell, J.E., et al (1971) Science 174, 507-510.
5. Brawerman, G., et al (1975) Cell 5 271-280.
6. Nemer, M., et al (1974) J. Mol. Biol 89 534-454.
7. Nemer, M., (1975) Cell 6 559-570.
8. Jelinek, W., (1973) J. Mol. Biol. 75, 515-532.
9. Slater, I., et al (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. 70 n°2 406
10. Bishop, J.O., et al (1974) J. Mol. Biol. 85, 75-86.
11. Pages, M., et al (1976) Acta Embri. Exp. (in press). n° 3
12. Pages, M., Tesis doctoral (1976).
13. Bieseling, et al Cell (1976) n° 8, 299-304

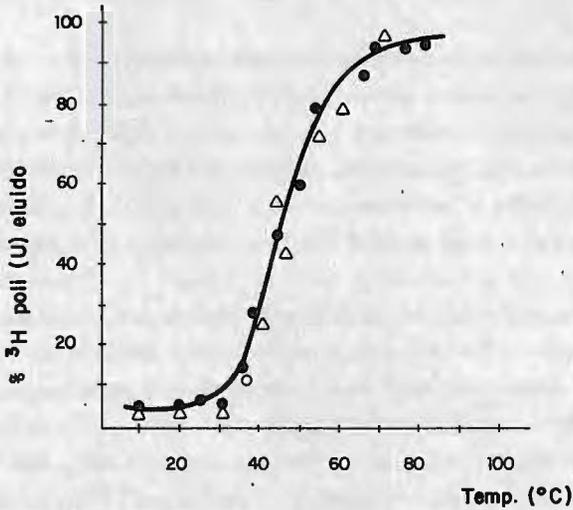
CURVA DE FUSION DE LOS COMPLEJOS FORMADOS ENTRE DNA o cRNA y  $^3\text{H}$  POLI(U).

Tabla 1 SATURACION DEL DNA Y cRNA CON ACIDO POLIURILICO

	% Reacción DNA fix / poli U	% Reacción DNA sol / poli U
DNA desnaturalizado	0,43 - 0,48	0,37
DNA nativo	0,23 - 0,25	0,20 - 0,25
cRNA	—	0,23 - 0,31



Hibridación in situ del  $^3\text{H}$  poli (U) con el DNA nativo..

V

**CONTROL DE LA MORFOGENESIS DEL BACTERIOFAGO  $\phi$  29  
POR PROTEINAS NO PRESENTES EN LA PARTICULA VIRAL**

*por*

*Fernando Jiménez González-Anleo*

(INSTITUTO DE BIOLOGIA DEL DESARROLLO. CONSEJO SUPERIOR DE  
INVESTIGACIONES CIENTIFICAS. MADRID)



Los bacteriófagos se están empleando como sistemas modelo en el estudio de muchos de los problemas que hoy se plantea la Biología Molecular, ya que los procesos que tienen lugar durante la infección de una bacteria por un fago pueden considerarse, en su conjunto, como el ciclo biológico más sencillo y el más fácilmente abordable desde un punto de vista experimental. El estudio de uno de estos procesos, la morfogénesis de las partículas virales, se considera un punto de partida idóneo en el estudio de la morfogénesis de todo tipo de estructuras biológicas.

El bacteriófago  $\phi 29$  presenta dos características, una partícula viral de elevada complejidad estructural y una molécula de DNA de pequeño tamaño (1), cuya combinación le convierte en un candidato muy adecuado para el estudio de problemas morfogenéticos. Es de suponer que  $\phi 29$ , al no disponer de una gran capacidad genética, tendrá que adaptarse, para la morfogénesis de la compleja estructura de la partícula viral, a unos mecanismos lo más económicos posibles, los que podríamos considerar como esenciales en la morfogénesis de un virus y que, lógicamente, han de ser los de mayor trascendencia biológica. Por esta razón se inició en nuestro laboratorio el estudio de la morfogénesis de  $\phi 29$ , analizándose, en una primera etapa, la función de las proteínas estructurales en la formación de la partícula viral (2) y, en una segunda etapa, objeto de este trabajo, la función de las proteínas no estructurales.

De los 17 cistrones identificados hasta el momento en el genoma de  $\phi 29$  (3), los cistrones 1, 2, 3, 5, 6 y 17 intervienen en la síntesis del DNA viral y el cistrón 4 en el control de la transcripción tardía. Los cistrones 8-12 determinan la síntesis de las proteínas estructurales del fago y el producto del cistrón 14 está implicado en la lisis de la bacteria (4), desconociéndose hasta el momento la función de las proteínas determinadas por los restantes cistrones. Por ello, en este trabajo se ha

investigado la posible función en la morfogénesis de la partícula viral de las proteínas no estructurales determinadas por estos cistrones aún no caracterizados, los cistrones 7, 13, 15 y 16, y por otro lado se han analizado los cistrones implicados en la replicación del DNA viral, con objeto de determinar si la síntesis de DNA es necesaria para la formación de partículas virales y, en caso negativo, caracterizar las partículas en las que se encapsula el DNA.

El análisis se ha llevado a cabo mediante el empleo de mutantes letales condicionales del fago en los distintos cistrones. Se han utilizado tanto mutantes sensibles a supresor (sus) como mutantes sensibles a temperatura (ts), prestándose mayor atención a los primeros por ser los que proporcionan una información más precisa. El estudio ha comprendido la determinación de las características de la infección en condiciones restrictivas de B. subtilis con mutantes en los diferentes cistrones, analizándose el desarrollo de fago infectivo, la síntesis de DNA viral, los tipos de partículas producidas y su estabilidad, así como la eficiencia de ensamblaje de las proteínas estructurales. A continuación se han purificado las partículas producidas por cada mutante, analizándose por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, observación en el microscopio electrónico y electroforesis en gel de poliacrilamida. En tercer lugar se han realizado experimentos de bajada de temperatura de cultivos de bacterias infectadas con mutantes ts y de complementación in vitro de las partículas producidas por mutantes sus, para determinar el carácter de intermedio o de producto abortivo en la morfogénesis de las partículas producidas por diversos mutantes. Por último se han determinado las proteínas inducidas por Ø29 con afinidad por DNA, con objeto de caracterizar proteínas posiblemente implicadas en la encapsulación del DNA.

Los resultados obtenidos y las conclusiones que de ellos se derivan pueden esquematizarse en los siguientes puntos:

- La proteína p7 es esencial para la formación de la cabeza de Ø29, ya que mutantes sus en el cistrón 7 no forman ningún tipo

de estructuras. Esta proteína constituye el núcleo sobre el que se ensambla la proteína mayoritaria de la cabeza, HP1.

- La replicación del DNA del virus no es esencial para la formación de la cabeza. Mutantes en los cistrones que intervienen en la síntesis del DNA ensamblan las proteínas de la cabeza con normalidad, produciendo precabezas con un núcleo de proteína p7, si milares a las precabezas detectadas durante la morfogénesis de otros bacteriófagos y que son las estructuras en las que se encapsula el DNA viral.

- La proteína p16 parece estar implicada en la encapsulación del DNA, ya que mutantes en este cistrón producen el mismo tipo de partículas que las que se acumulan en ausencia de síntesis de DNA y, por otro lado, la proteína tiene afinidad por DNA y está presente en estructuras semejantes a precabezas.

- Mutantes sus en el cistrón 13 producen una pequeña cantidad de partículas con DNA, transformables en fago infectivo por complementación in vitro, y una mayoría de partículas vacías que aparentemente han perdido el DNA en el interior de la bacteria. De este resultado puede concluirse que la proteína p13 interviene en una de las etapas finales de la morfogénesis de Ø29, provocando su ausencia la inestabilidad del DNA encapsulado.

- La proteína p15 no es esencial para el desarrollo de Ø29 ya que mutantes sus en el cistrón 15 producen una cierta cantidad de fago infectivo. Su función puede estar relacionada con la encapsulación del DNA, dada su afinidad por DNA y su presencia en estructuras semejantes a precabezas.

Los resultados obtenidos sobre la función de las proteínas no estructurales de Ø29 en la formación de la partícula viral, unidos a los obtenidos previamente en el estudio de la función de las proteínas estructurales (2), sugieren una posible ruta morfogenética para el ensamblaje del bacteriófago Ø29, cuyo esquema se presenta en la figura 1.

(1) Anderson, D.L., Hickman, D.D., Reilly, B.E., J. Bacteriol. 91, 2081 (1966).

(2) Camacho, A., Jiménez, F., de la Torre, J., Carrascosa, J.L.,

- Mellado, R.P., Vázquez, C., Viñuela, E., Salas, M., Eur. J. Biochem., en prensa.
- (3) Mellado, R.P., Moreno, F., Viñuela, E., Salas, M., Reilly, B.E., Anderson, D.L., J. Virol. 19, 495 (1976).
- (4) Carrascosa, J.L., Camacho, A., Moreno, F., Jiménez, F., Mellado, R.P., Viñuela, E., Salas, M., Eur. J. Biochem. 66, 229 (1976).

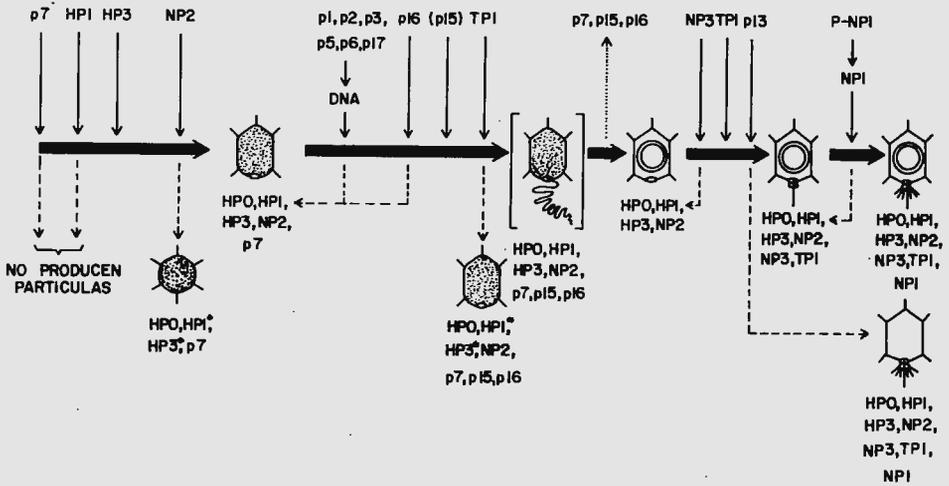


Figura 1. Esquema de la ruta morfogenética de Ø29.

Las partículas entre líneas gruesas representan intermedios en el ensamblaje del fago. Las líneas continuas representan el momento de actuación de las proteínas correspondientes. Las líneas a trazos indican las partículas acumuladas después de la infección con cada mutante. El paréntesis en la proteína p15 indica que puede ser dispensable. Las partículas entre corchetes representan un posible intermedio en la encapsulación del DNA. La línea punteada indica la salida de las proteínas p7, p15 y p16 de las cabezas de fago.



VI

**APROXIMACION A LA ESTRUCTURA Y LA FUNCION DE UNA  
PROTEINA DE LA CROMATINA, LA HISTONA H1, POR  
RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR**

*por*

*Pedro Puigdoménech Rosell*

(INSTITUTO DE BIOLOGIA FUNDAMENTAL. UNIVERSIDAD AUTONOMA  
DE BARCELONA)



### Introducción.

Se ha descubierto recientemente que la cromatina está compuesta de subunidades globulares, denominadas nucleosomas. Estos los forman ocho proteínas (dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4) y un fragmento de DNA plegado a su alrededor. En este modelo, del que se ha publicado una revisión (1), faltaba un elemento: la quinta fracción de histona, H1. Tal histona no se halla en el interior de los nucleosomas, no interacciona con otras histonas, aunque sí con el DNA, y posee estructura terciaria en al menos parte de su cadena. La cromatina del esperma de invertebrados marinos es un sistema ideal para estudiar la estructura de la cromatina y establecer paralelismos evolutivos. En efecto, por una parte se trata de un sistema inactivo y por tanto homogéneo y con histonas no modificadas y además muy condensado para caber en la cabeza del espermatozoide. Por otra parte las histonas se caracterizan por una casi total invariabilidad en la evolución. La variación mayor se halla en el esperma de equinodermos y moluscos donde, a diferencia de otras especies, hay una histona H1 aunque muy distinta de la de tejidos somáticos por lo que también se llama  $\phi^1$ . El objeto del presente estudio es la estructura y función de la histona H1 por comparación con su homóloga la  $\phi^1$ .

### Resultados.

Si núcleos de espermatozoides del erizo de mar Arbacia lixula son sometidos a digestión con nucleasa de Staphylococcus aureus obtenemos un DNA que consiste en bandas discretas múltiples de una unidad fundamental (2). Ello nos indica que en el esperma de

los equinodermos la cromatina posee también subunidades globulares. Es interesante destacar que la talla de los fragmentos de DNA producidos por la digestión en el esperma de erizo de mar es mayor que la de otros sistemas incluyendo los núcleos de embriones de la misma especie. Así la unidad repetitiva del esperma es de 205 pares de bases mientras que la de los embriones o eritrocitos de pollo es 180. Efectuando digestiones exhaustivas se puede observar que el producto de las mismas es igual para todos los sistemas, una partícula de 140 pares de bases, por ello la mayor talla de la unidad repetitiva debe proceder de los segmentos de DNA internucleosomas. Es importante recordar en este punto que la mayor diferencia entre las proteínas del esperma de erizo de mar y otros sistemas, incluyendo los embriones de la misma especie, se encuentra en la histona H1.

Los efectos de la fuerza iónica sobre la cromatina son muy notables en términos de solubilidad. En efecto, la turbidez de una disolución de cromatina de timo de ternera aumenta a partir de 50 mM NaCl pasa por un máximo y disminuye hacia 0,3 M NaCl siendo igual que en agua pura a partir de 0,4 M NaCl. Este efecto puede medirse también en términos de precipitación o contracción de la cromatina y desaparece si se extrae previamente la histona H1. El efecto de contracción se presenta también en la cromatina de erizo de mar aunque ésta no es soluble hasta fuerzas iónicas más elevadas (entre 0,6 y 0,7 M NaCl). Que este efecto puede ser debido a la histona  $\phi_1$  ya nos lo indica el hecho de que en ésta hay la mayor diferencia entre las cromatinas comparadas, sin embargo es posible obtener evidencia directa por espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)(3). En efecto, en el espectro RMN de la cromatina a fuerza iónica baja o intermedia se observan pocas señales. Ello es debido a que en el complejo con el DNA la mayor parte de la molécula se halla inmovili-

zada con lo que las señales son tan anchas que llegan a hacerse invisibles. Sin embargo a partir de 0,7 M NaCl comienzan a aparecer señales que a 0,8 M NaCl son identificables como las de la histona  $\phi 1$ , indicando que se ha separado del DNA. Es interesante destacar que el espectro de la histona  $\phi 1$  aparece cuando se produce la resolubilización de la cromatina.

Es posible profundizar en la interacción de la histona  $\phi 1$  con el DNA estudiando los complejos artificiales  $\phi 1$ -DNA; éstos se estudiaron tanto por RMN como por turbidez en función de la fuerza iónica. Se pudo observar que el efecto de precipitación del complejo está también presente y en la misma zona de fuerzas iónicas que para la cromatina. Al mismo tiempo el espectro RMN de la proteína aparece entre 0,70 y 0,80 M NaCl. De ello podemos concluir que la contracción de la cromatina en función de la fuerza iónica es producida por la histona  $\phi 1$  y que tal efecto es independiente de las otras histonas.

Entre la histona  $\phi 1$  y la H1 somática varían algunos aminoácidos. De éstos es de destacar la proporción de arginina de la histona  $\phi 1$  (11,2%, la H1 de timo de ternera tiene 1,8%). Se realizó el estudio de precipitación y de RMN a distintas fuerzas iónicas de los complejos de DNA con histonas  $\phi 1$  que poseen distinta composición de aminoácidos. Dos de éstas son destacables: la histona  $\phi 1$  de Holothuria tubulosa que tiene una proporción de arginina intermedia (3,9%) y la de Mytilus edulis que la tiene muy elevada (29,4%). En estos dos casos se observó también la correspondencia entre la resolubilización del complejo y la aparición del espectro RMN de la proteína. Ambos efectos se dan a fuerzas iónicas correlacionadas con su proporción de arginina; éstos ocurren a 0,4-0,5 M NaCl para la histona H1 de timo de ternera, a 0,5-0,6 M NaCl para Holothuria tubulosa, 0,7-0,8 para los erizos de mar y 0,8-0,9 M NaCl para Mytilus edulis. Por ello la proporción del

residuo arginina parece un mecanismo evolutivo para producir una mayor condensación y protección de la cromatina.

Como ya se ha indicado antes la histona  $\phi 1$  es un caso extremo de variación evolutiva entre las histonas. Tales variaciones afectan a su interacción con el DNA, parece pues interesante también conocer cómo afectan a su estructura (4). Por RMN se demostró de que al menos en parte de su cadena la histona H1 se pliega formando una estructura terciaria (5). Tal evidencia procedía de la aparición de señales desplazadas a muy alto campo en el espectro de la histona H1 a alta fuerza iónica. Efectos de este tipo se observan en proteínas globulares y se interpretan como debidas a la perturbación magnética que crean a su alrededor los grupos de carácter aromático. Tal efecto observado para la histona H1 indicaba que la cadena polipeptídica se pliega apareciendo contactos entre residuos concretos, es decir, una estructura terciaria. Era posible que de la histona H1 de timo de ternera a la histona  $\phi 1$  de esperma de erizo de mar los cambios de secuencia ocasionaran cambios estructurales. Para ello se estudió el espectro de RMN de esta histona en función de fuerza iónica, pH, temperatura, etc. El resultado obtenido fue que la histona  $\phi 1$  de Arbacia lixula presenta a alta fuerza iónica señales indicativas de la existencia de una estructura terciaria, que además se hallan en posiciones casi idénticas a las de la H1. Si se tiene en cuenta que desviaciones de décimas de Angstrom pueden dar lugar a desplazamientos notables de tales señales debemos concluir que permanecen elementos de secuencia suficientes para que parte de la estructura terciaria se haya conservado casi intacta. Se estudiaron también los cambios en dicroísmo circular comprobándose que la formación de estructura terciaria se acompaña de formación de hélice  $\alpha$  hasta valores de 25%. Se estudió asimismo el comportamiento de otras proteínas de la misma familia, tales como las de Holothuria tubu-

losa o de Mytilus edulis. La primera de éstas sólo posee una fenilalanina como aromático, por ello hay menor número de señales desplazadas. Una de ellas, la más desplazada, se conserva y por ello podemos decir que es la fenilalanina la que, en contacto con un grupo metilo, provoca tal señal; tal contacto parece importante para la formación de estructuras terciarias en el grupo H1. La histona  $\phi 1$  de Mytilus edulis no da evidencias de estructura terciaria ni secundaria, tal proteína aparece intermedia entre histonas y protaminas.

#### Conclusiones.

La histona  $\phi 1$  posee una estructura terciaria en al menos la zona central de su cadena. Tal estructura conserva elementos homólogos a los de la H1. La histona  $\phi 1$  es responsable de la contracción de la cromatina con la fuerza iónica. La mayor proporción de arginina de las  $\phi 1$  da lugar a una mayor protección contra la fuerza iónica. La interacción con el DNA se efectúa sin intervención de otras histonas, por tanto probablemente en el segmento internucleosomal. Este es de mayor longitud y ello es coherente con la mayor eficiencia en la contracción de la cromatina ya que en igual longitud de solenoides formados por nucleosomas puede haber así más cantidad de DNA. La función de la histona H1 y proteínas afines parece residir en el segundo orden de estructuración de la cromatina, la ordenación de los nucleosomas.

#### Bibliografía.

- (1) Bradbury E.M., (1976) Trends in Biochem. Sci., 1, 7-9
- (2) Ruiz-Carrillo A. & Puigdoménech P., manuscrito en preparación
- (3) Puigdoménech P., Martínez P., Cabré O., Palau J., Bradbury E.M. & Crane-Robinson C., (1976) Eur.J.Biochem., 65, 357-363
- (4) Puigdoménech P., Cabré O., Palau J., Bradbury E.M. & Crane-Robinson C., (1975) Eur.J.Biochem., 59, 237-243
- (5) Bradbury E.M., Cary P.D., Chapman G.E., Crane-Robinson C., Danby S.E., Rattle H.W.E., Boublik M., Palau J. & Avilés F.J. (1975), Eur.J.Biochem., 52, 605-613



**VII**

**CARACTERIZACION ESTRUCTURAL DE HISTONAS DE  
LEVADURA. ESTUDIOS DE DICROISMO CIRCULAR**

*por*  
*Julián Perera González*

(DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA. FACULTAD DE CIENCIAS.  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID)





Los problemas planteados en torno a la estructura de la cromatina adquieren nuevos maticos en el caso de organismos eucarióticos unicelulares. Al no existir diferenciación celular, no cabe hablar de una represión permanente de partes amplias del genoma. Pero, la presencia de histonas en estos organismos (Tonino, G.J.M. y Rozijn, T.H., *Biochim. Biophys. Acta* 124, 427 (1966); Wintersberger, V., Smith, P. y Letnansky, K., *Eur. J. Biochem.* 33, 123 (1973); Duffus, J.H., *Biochim. Biophys. Acta* 223, 627 (1971); Hsiang, M. y Cole, R.D., *J. Biol. Chem.* 248, 2007 (1973); Mohberg, J. y Rusch, H.P., *Arch. Biophys.* 138, 413 (1970)) plantea un nuevo interrogante acerca de la naturaleza de tales histonas y de su posible función en la célula.

Igualmente, la detección de nucleosomas en levadura (Lohr, D. y van Holde, K.E., *Science* 188, 165 (1975)) y en *Physarum polycephalum* (Hozier, J.C. y Kaus, R., *Chromosoma* 57, 95 (1976)) ha contribuido en gran manera a dirigir la atención hacia estos organismos.

El conjunto de histonas presentes en *Sacharomices cerevisiae* se ha aislado mediante extracción de cromatina purificada, con ácido diluido. La homogeneización del material biológico en disolución salina diluida, tamponada a pH 6.5, permite la obtención de una cromatina cruda, todavía levemente contaminada con componentes citoplasmáticos. La purificación de este material se ha llevado a cabo mediante sedimentación a través de medios de elevada densidad.

La electroforesis en gel de poliacrilamida al 20% permite obtener, para el componente de histona total, una imagen consistente en 3 bandas electroforéticas, denominadas, provisionalmente, a, b y c, en orden de movilidad creciente.

Los métodos de fraccionamiento usuales han permitido poner de manifiesto la heterogeneidad del material presente en la tan

da electroforética intermedia. Tanto la cromatografía en CM-celulosa, como la utilización de disolventes orgánicos, concretamente disolución de etanol-ácido clorhídrico, han llevado a una parcial separación de fracciones, distinguiéndose un componente soluble en etanol-clorhídrico, cuya imagen electroforética presenta bandas b y c, y otro insoluble formado por proteínas que migran como bandas a y b. Conclusión lógica de estos resultados es la admisión de la existencia de dos fracciones ricas en arginina, bandas b2 y c, y otras dos ricas en lisina, bandas a y b1.

Este parcial fraccionamiento de las histonas de levadura se ha extendido al aislamiento y purificación de los distintos componentes. Las dos histonas ricas en lisina se han separado mediante cromatografía en gel. El fraccionamiento de las dos restantes se ha conseguido igualmente, bien por gel-filtración, bien por precipitación fraccionada con acetona de su disolución en etanol-clorhídrico.

El aislamiento de estas cuatro fracciones ha permitido su identificación y caracterización mas profunda. Todos los resultados parecen indicar la ausencia de una histona semejante a la H1 de timo de ternera, al menos en cantidades equiparables. Existen dos fracciones moderadamente ricas en lisina, bandas a y b1, del tipo de la H2B de timo de ternera. Otra fracción, b2, de composición intermedia entre H2A y H3 de timo, y una cuarta, c, de movilidad electroforética idéntica a la H4 de organismos superiores, si bien de composición relativamente distinta.

De la consideración conjunta de estas características moleculares de las histonas de Sacharomyces cerevisiae frente a la organización de su material genético, surge un gran número de atractivos interrogantes; y uno de ellos es, sin duda, la diferencia estructural existente entre la proteína presente en la banda electroforética, c, de mayor movilidad y la que puede considerarse su homóloga, H4 de organismos superiores.

Son ya clásicos los trabajos que condujeron a la dilucidación de la secuencia de las correspondientes histonas H4 de ternera y guisante; estos y otros resultados han llevado a admitir una gran constancia evolutiva en la estructura de esta fracción. Por esta razón

las diferencias existentes entre la composición de la histona H4 de levadura y la de sus homólogas de organismos superiores, aunque leves, son altamente significativas y de gran interés, en tanto en cuanto permiten la contemplación de un período evolutivo más amplio.

Otras características de esta fracción resultan muy semejantes a las correspondientes a otras histonas H4 de organismos superiores. Así, el residuo amino-terminal, determinado por reacción con cloruro de dansilo, se encuentra bloqueado, muy probablemente acetilado. También, el peso molecular de la histona de levadura, calculado mediante electroforesis en presencia de SDS, es coincidente con el de su homóloga de timo.

Sin embargo, estudios adicionales han contribuido a resaltar las peculiaridades propias de esta fracción de Sacharomyces cerevisiae. Así, los experimentos de autoasociación llevados a cabo mediante ultracentrifugación, indican que la histona de levadura agrega con mucha mayor facilidad que su homóloga de timo.

Por otra parte, los estudios conformacionales desarrollados por difracción circular, reflejan distinta proporción de estructura secundaria ordenada en la fracción de levadura, así como un diferente comportamiento conformacional con la variación de determinados parámetros de la disolución.

La caracterización física y química de la histona H4 de Sacharomyces cerevisiae ha conducido a resaltar su parcial semejanza con histonas homólogas de organismos superiores, y las importantes diferencias que, respecto a estas, presenta. El conocimiento de la implicación que tales diferencias tengan en la funcionalidad de la cromatina, requerirá un análisis paralelo del resto de las fracciones, así como un profundo estudio de su integración en la estructura del material genético.





FUNDACION JUAN MARCH  
SERIE UNIVERSITARIA

**Titulos Publicados:**

- 1.— *Semántica del lenguaje religioso/A. Fierro*  
(Teología. España, 1973)
- 2.— *Calculador en una operación de rectificación discontinua/A. Mulet*  
(Química. Extranjero, 1974)
- 3.— *Skarns en el batolito de Santa Olalla/F. Velasco*  
(Geología. España, 1974)
- 4.— *Combustión de compuestos oxigenados/J. M. Santiuste*  
(Química. España, 1974)
- 5.— *Películas ferromagnéticas a baja temperatura/José Luis Vicent López*  
(Física. España, 1974)
- 6.— *Flujo inestable de los polímeros fundidos/José Alemán Vega*  
(Ingeniería. Extranjero, 1975)
- 7.— *Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental*  
José Antonio Salva Lacombe (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1973)
- 8.— *Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos/José Plá Carrera*  
(Matemáticas. España, 1974)
- 9.— *El fenómeno de inercia en la renovación de la estructura urbana.*  
Francisco Fernández-Longoría Pinazo (Urbanización del Plan Europa 2.000  
a través de la Fundación Europea de la Cultura)
- 10.— *El teatro español en Francia (1935–1973)/F. Torres Monreal*  
(Literatura y Filología. Extranjero, 1971)
- 11.— *Simulación electrónica del aparato vestibular/J.M. Drake Moyano.*  
(Métodos Físicos aplicados a la Biología. España, 1974)
- 12.— *Estructura de los libros españoles de caballerías en el siglo XVI.*  
Federico Francisco Curto Herrero (Literatura y Filología. España, 1972)
- 13.— *Estudio geomorfológico del Macizo Central de Gredos*  
M. Paloma Fernández García (Geología. España, 1975)
- 14.— *La obra gramatical de Abraham Ibn <sup>c</sup> Ezra/Carlos del Valle Rodriguez*  
(Literatura y Filología. Extranjero, 1970)

- 15.— *Evaluación de Proyectos de Inversión en una Empresa de producción y distribución de Energía Eléctrica.*  
Felipe Ruíz López (Ingeniería. Extranjero, 1974)
- 16.— *El significado teórico de los términos descriptivos.*/Carlos Solís Santos  
(Filosofía. España, 1973)
- 17.— *Encaje de los modelos econométricos en el enfoque objetivos-instrumentos relativos de política económica.*/Gumersindo Ruíz Bravo  
(Sociología. España, 1971)
- 18.— *La imaginación natural (estudio sobre la literatura fantástica norteamericana).*/Pedro García Montalvo  
(Literatura y Filología. Extranjero, 1974)
- 19.— *Estudio sobre la hormona Natriurética.*/Andrés Purroy Unanua  
(Medicina, Farmacia y Veterinaria. Extranjero, 1973)
- 20.— *Análisis farmacológico de las acciones miocárdicas de bloqueantes Beta-Adrenérgicos.*/José Salvador Serrano Molina  
(Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1970)
- 21.— *El hombre y el diseño industrial.*/Miguel Durán-Lóriga  
(Artes Plásticas. España, 1974)
- 22.— *Algunos tópicos sobre teoría de la información.*/Antonio Pascual Acosta  
(Matemáticas. España, 1975)
- 23.— *Un modelo simple estático. Aplicación a Santiago de Chile.*  
Manuel Bastarache Alfaro (Arquitectura y Urbanismo. Extranjero, 1973)
- 24.— *Moderna teoría de control: método adaptativo-predictivo*  
*Teoría y realizaciones.*/Juan Manuel Martín Sánchez  
(Ingeniería España, 1973)
- 25.— *Neurobiología (I Semana de Biología. Conferencia-coloquio*  
*sobre Investigaciones biológicas 1977)*
- 26.— *Genética (I Semana de Biología. Conferencia-coloquio*  
*sobre Investigaciones biológicas 1977)*





