

ENCUENTROS EN LA BIOLOGÍA es editado por

Editor ejecutivo
Salvador Guirado

Comité editorial
Ramón Muñoz-Chápuli
Antonio de Vicente
José Carlos Dávila
Francisco Cánovas
Francisca Sánchez Jiménez
Luis Javier Palomo
Antonio Flores
Félix L. Figueroa

Colabora en este número
Fernando Gallardo

2

Las plantas transgénicas como modelo para estudiar el metabolismo

3

Sofisticados mecanismos de comunicación entre bacterias fitopatógenas y plantas

4

Noticias

Editado con la colaboración del I.C.E. de la Universidad de Málaga

FAS: UN DETONADOR PARA LA MUERTE CELULAR

La homeostasis del organismo requiere un exquisito equilibrio entre proliferación y muerte celular. A pesar de las connotaciones negativas del término "muerte celular", lo cierto es que este proceso es fundamental en muchas ocasiones para un correcto funcionamiento del organismo (ver "Encuentros en la Biología, núm. 2, noviembre 1992). En concreto, la muerte celular programada es muy importante en el desarrollo del sistema inmunitario. Los linfocitos autorreactivos, que reconocen antígenos propios del organismo, deben morir para evitar problemas de autoinmunidad.

Una de las formas más conocidas de la muerte celular programada es la apoptosis, en la que se produce la condensación del citoplasma, la segmentación del núcleo y la degradación del DNA. Con objeto de profundizar en los mecanismos de la apoptosis, un equipo de investigadores japoneses desarrolló un anticuerpo monoclonal utilizando fibroblastos humanos como inmunógeno. Pudieron demostrar que el anticuerpo estaba dirigido contra un antígeno de superficie al que denominaron Fas [Yonchara et al., *J. Exp. Med.*, 169, 1747 (1989)]. El antígeno Fas se expresaba en varias células humanas, fundamentalmente en linfocitos T y fibroblastos, así como en hígado, timo, corazón, ovario y pulmón. Lo más notable de este anticuerpo es que cuando células expresando el antígeno Fas eran puestas en su presencia, mostraban signos de apoptosis y morían en poco tiempo. Esto podía atribuirse a dos causas: o bien el anticuerpo mimetizaba un factor que al unirse al antígeno Fas dispara el proceso de muerte celular, o bien bloqueaba la unión a Fas de un factor esencial para la supervivencia de la célula. Poco después se consiguió determinar la secuencia del cDNA

codificante para Fas [Itoh et al., *Cell*, 66, 233 (1991)]. La estructura primaria del antígeno mostraba una gran similitud con los receptores de TNF (factor de necrosis tumoral) y NGF (factor de crecimiento nervioso). Creía así la posibilidad de que Fas estuviera relacionado con la transducción de una señal desencadenante de la apoptosis. Los autores de este trabajo especulaban con la posibilidad de que los anticuerpos anti-Fas pudieran desempeñar algún papel terapéutico en el SIDA; en efecto, los linfocitos infectados por el HIV eran más sensibles a la acción citolítica del anticuerpo que los libres del virus.

Una relación entre el proceso de selección linfocitaria para evitar la autorreactividad y el antígeno Fas pudo establecerse muy pronto. En efecto, el gen codificante para Fas se asignó al cromosoma 19 del ratón, en las proximidades de una mutación recesiva bien conocida en esta especie, la *lpr* (por "linfoproliferación"). Los ratones *lpr* desarrollan una grave anomalía inmunitaria, con autoanticuerpos anti-DNA, artritis, glomerulonefritis y proliferación linfocitaria, un cuadro similar al lupus eritematoso sistémico humano. Dado que el antígeno Fas podría mediar en la apoptosis de linfocitos T autorreactivos, era tentador suponer que la mutación *lpr* afectaba al gen codificante del antígeno Fas. En efecto, un grupo estadounidense-japonés demostró alteraciones del gen codificante para Fas en ratones *lpr* [Watanabe-Fukunaga et al., *Nature*, 356, 314 (1992); Adachi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 1756 (1993)]. El problema del ratón mutante *lpr* radica en que la ausencia (o la presencia de una forma inactiva) de Fas en la superficie de sus linfocitos T impide desencadenar el proceso de apoptosis, con lo que linfocitos autorreactivos se acumulan y acaban provocando reacciones de autoinmunidad. Una prueba definitiva de que Fas media en la apoptosis ha venido de la mano del mismo equipo japonés [Ogasawara et al., *Nature*, 364, 806 (1993)]. La inyección intraperitoneal de pequeñas cantidades del anticuerpo anti-Fas en ratones produce su muerte en pocas horas por apoptosis masiva de los hepatocitos. Por supuesto,

Miogenina: Ahora sí se hizo blanco.

En un número anterior (Encuentros en la Biología, núm. 6, marzo 1993) comentábamos acerca de los factores de transcripción miogénicos, capaces de transformar distintas células en cultivo en células musculares. También veíamos que, de forma inesperada, la inactivación en el ratón de los genes codificantes para dos de estos factores, MyoD y myf-5, carecía de efectos sobre el desarrollo muscular. Por tanto, estos factores no parecían jugar, por sí mismos, un papel clave en dicho desarrollo. La situación está algo más clara después de que dos equipos, de forma independiente y simultánea, hayan conseguido inactivar el gen de un tercer factor miogénico, la miogenina [Hasty et al., *Nature*, 364, 501 (1993) y Nabeshima et al., *Nature*, 364, 533 (1993)]. En este caso, los ratones nacieron casi sin músculo esquelético, muriendo por insuficiencia respiratoria aguda. En los lugares donde debió formarse músculo se observaron grandes masas de mioblastos indiferenciados que, en cultivo, sí produjeron los miotubos plurinucleados típicos de las fibras musculares. Por tanto la miogenina parece ser un factor esencial para la formación del músculo esquelético.

los ratones *lpr* (que no producen la forma activa de Fas) sobreviven sin problemas a la inyección. Estos resultados ponen seriamente en cuestión la posibilidad comentada antes para el uso de anti-Fas en el tratamiento del SIDA.

Muchas preguntas quedan en el aire: ¿Por qué los hepatocitos expresan Fas? Probablemente este antígeno está implicado en procesos normales de apoptosis de hepatocitos, tal vez para eliminar aquellos cuyo DNA está dañado por mutágenos. ¿Podría estar Fas relacionado con algunos casos inexplicables de hepatitis fulminante observados en humanos? Y la pregunta principal, ¿cuál es y quién produce el ligando normal que se une al antígeno Fas y que desencadena la apoptosis? R.M.

LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS COMO MODELO PARA ESTUDIAR EL METABOLISMO

Las técnicas de biología molecular permiten en la actualidad la construcción de genes que no existen en la naturaleza (genes quiméricos) y el estudio de su expresión en organismos superiores gracias al desarrollo de diversas técnicas de transformación. Una gran parte de los trabajos se realizan en ciertas especies vegetales (p.e. tabaco) gracias a la facilidad que presentan para la transformación, regeneración y cultivo *in vitro*. La técnica de transformación más utilizada es la infección con *A. tumefaciens*. Algunas cepas de esta bacteria poseen la capacidad de producir tumores en varias especies de vegetales, gracias a la existencia de un elemento extracromosómico con capacidad de inducir el crecimiento tumoral [plásmidos Ti (tumour-inducing)]. La transformación de las células vegetales se debe a la integración en el genoma vegetal de una región de los plásmidos Ti que se denomina T-DNA (transferred DNA; para más detalles ver Old, R.W. y Primrose, S.B, *Principles of gene manipulation*, 1989). Para facilitar la identificación de las células transformadas, junto con el gen quimérico objeto de

estudio, se introduce dentro de la región T un gen marcador (p.e. resistencia a la kanamicina) que permite, en un medio selectivo, el crecimiento e identificación de las células recombinantes. Los organismos transgénicos representan una magnífica herramienta de trabajo para estudiar el papel fisiológico de una proteína. Una de las estrategias utilizadas es la represión del gen que codifica la proteína mediante la expresión de un gen quimérico que produce mRNA antisentido. La represión del gen endógeno puede afectar a multitud de procesos de desarrollo o vías metabólicas, permitiendo conocer mejor la función biológica de la proteína que codifica el gen. Así, Hamilton y col. [*Nature*, 346, 284, (1990)] identificaron la enzima formadora de etileno mediante la producción de RNA antisentido en plantas transgénicas de tomate. Los niveles de esta proteína en las plantas transgénicas fueron notablemente disminuidos y como resultado de ello, la producción de etileno. Una segunda posibilidad de conocer mejor la función de una proteína es su sobreproducción. Hudspeth y col. [*Plant Physiol.*, 98, 458 (1992)] expresaron la fosfoenolpiruvato carboxilasa de maíz en tabaco, enzima clave en la fotosíntesis de plantas C4 donde los niveles de esta proteína son 10 veces superiores a los existentes en plantas con metabolismo C3. En las plantas transgénicas de tabaco (tipo C3) la expresión de la enzima de maíz provocó el aumento en el contenido de malato, indicando que el metabolismo del carbono resultó afectado por la expresión de la enzima heteróloga y que el control de los niveles de la fosfoenolpiruvato carboxilasa es importante para la realización de la fotosíntesis de tipo C3. Además, los cambios metabólicos producidos por la introducción de una proteína pueden afectar al comportamiento fisiológico de las células y conllevar cambios en la expresión de los propios genes endógenos. Hirel y col. [*Plant Mol. Biol.*, 20, 207 (1992)] observaron que la expresión de la isoenzima citosólica de la glutamina sintetasa de soja en plantas transgénicas de tabaco provoca la inducción en las hojas del gen nativo que codifica la enzima citosólica, cuyos niveles normales de expresión son bajos. Dado que la glutamina sintetasa es responsable de la asimilación de amonio y síntesis de glutamina, Hirel y col. sugieren la existencia de un control metabólico