

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

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

Fraude jurásico

Una reseña aparecida en *Nature* o la película "Parque Jurásico" ha provocado una cierta polémica debido a una frase de su autor, el editor adjunto Henry Gee: "El esquema científico no es completamente escandaloso. A menos que uno mire demasiado cerca, no hay nada imposible en ello, en teoría". A lo que un miembro de la empresa BioEssays, radicada en la universidad de Cambridge, ha contestado que al menos dos factores hacen imposible la "síntesis" de dinosaurios de la forma descrita en la película [Wilkins, *Nature*, 364, 568 (1993)]. En primer lugar, el DNA, no importa como de bien conservado esté, sufre pre-lesiones mutacionales con una tasa proporcional al tiempo, y estamos hablando de más de 65 millones de años. En segundo lugar, y más grave aún, es imprescindible una compatibilidad grande entre el genoma y el citoplasma para garantizar el desarrollo y eso sólo es posible entre especies muy cercanas. Para obtener un dinosaurio hace falta un buen genoma de dinosaurio en un citoplasma de dinosaurio, y no hay forma de conocer y reproducir la composición de este último.

que afecta la expresión de ciertos genes en plantas. Aunque, las enzimas de los anteriores ejemplos, glutamina sintetasa y fosfoenolpiruvato carboxilasa, presentan pocos laxos comunes aparentes, puesto que ambas enzimas están involucradas en procesos metabólicos diferentes, la alteración de estas actividades enzimáticas *in vivo* puede poner de manifiesto otros mecanismos de regulación desconocidos. Por ejemplo, se ha descrito la inducción de los genes de la fosfoenolpiruvato carboxilasa por la glutamina [Sugiharto, B. y Sugiyama, T., *Plant Physiol.*, 98, 1403 (1992)], por lo que las plantas transgénicas que contienen niveles alterados de la glutamina sintetasa pueden representar un buen modelo para estudiar la regulación metabólica de la expresión de la fosfoenolpiruvato carboxilasa. En definitiva, la expresión de proteínas heterólogas en plantas transgénicas puede permitir el estudio de sistemas de regulación poco conocidos y la identificación de otros desconocidos, lo que permite un mejor conocimiento del papel biológico de la proteína. F.G.

SOFISTICADOS MECANISMOS DE COMUNICACIÓN ENTRE BACTERIAS FITOPATÓGENAS Y PLANTAS

Los hongos y bacterias fitopatógenos expresan baterías de genes implicados en el establecimiento de la infección, mientras que una serie de genes se expresan en la planta como parte de su respuesta. La patogenicidad y el rango de hospedador son determinados por varias funciones positivas de la bacteria y por el fallo de la planta para reconocer la bacteria e inducir las reacciones de defensa.

Las interacciones entre bacterias fitopatógenas y sus plantas huésped se pueden dividir en dos grandes categorías:

a) compatible, en la que se observa un crecimiento rápido y abundante de la población bacteriana sobre los tejidos vegetales provocando el desarrollo de los síntomas de la enfermedad, p.e. la infección por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* sobre la mayoría de las variedades cultivadas de tomate. b) incompatible, el crecimiento microbiano es muy limitado y no se observan síntomas de la enfermedad, esta interacción incompatible está normalmente correlacionada con la inducción de la respuesta de hipersensibilidad (HR), p.e. tras la inoculación de *P. syringae* pv. *tomato* sobre plantas de tabaco. La HR también se presenta en casos de resistencia específica de la planta frente a ciertos genotipos de la bacteria, p.e. tras la inoculación de cepas de la raza 5 de *P. syringae* pv. *glyciniae* sobre algunas variedades de cultivo de soja resistentes a esta raza, como la Acme. Por el contrario, la inoculación de bacterias no fitopatógenas, como *Pseudomonas fluorescens* o *Escherichia coli*, en plantas no produce la aparición de la HR.

El rango de hospedador de un gran número de bacterias patógenas de plantas viene determinado por factores positivos que incrementan la virulencia o el rango de hospedador (p.e. toxinas o enzimas líticas que degradan las paredes celulares facilitando la entrada del patógeno y su nutrición) y factores negativos que los reducen, como los genes de avirulencia (*avr*), que provocan la HR en plantas no susceptibles restringiendo el rango de hospedador [Keen & Staskawicz, *Ann. Rev. Microbiol.*, 42, 421 (1988)]. La HR tiene un papel fundamental en la manifestación de la resistencia de las plantas a las enfermedades infecciosas, e implica efectos relativamente rápidos sobre las membranas plasmáticas del vegetal, seguidas de una rápida necrosis de las células infectadas o próximas al punto de invasión; igualmente se produce una rápida desrepresión de varios genes de la planta, induciéndose la síntesis de diferentes sustancias implicadas en los mecanismos de defensa de la planta: fitoalexinas, calosa, lignina, proteínas relacionadas con la patogénesis (PR). Esta HR hace que la invasión microbiana fracase y no se manifieste la enfermedad. La activación de la respuesta de defensa es inducida por medio de moléculas señal o "elicitors", que son moléculas tanto del patógeno como de la planta, que se unen

4

¿Somos primos de los hongos?

Los especialistas en comparación de secuencias macromoleculares no paran de darnos sorpresas. Una cuestión en la que se está trabajando actualmente es la de clarificar las relaciones filogenéticas entre los grandes grupos de eucariotas, o dicho de otra forma, ¿cuál es el grupo actual más emparentado con los animales? Podrían ser los hongos, según especialistas estadounidenses en evolución molecular. En efecto, la comparación de las secuencias del rRNA de la subunidad 16S, una molécula muy conservada entre los seres vivos, muestra que animales, hongos y coanoflagelados forman un grupo bien definido, separado de plantas y otros protozoos [Wainright et al., *Science*, 260, 340 (1993)]. De hecho, desde Haeckel ya se presumía una relación entre coanoflagelados y esponjas, y también se ha propuesto una derivación de los hongos a partir de protistas flagelados. Por si fuera poco, animales y hongos se asemejan en algunas rutas biosintéticas, concretamente las de hidroxiprolina, quitina, celulosa y ferritina.

a receptores de membrana disparando una cadena de señales que activa los genes de defensa de la planta.

Mediante el estudio genético de varios sistemas patógeno-planta se ha demostrado una interacción "gen a gen" en la determinación de la resistencia o susceptibilidad de variedades vegetales determinadas a distintas razas fisiológicas de un microorganismo patógeno, mediante pares de genes complementarios en el huésped y el patógeno. En estas interacciones "gen a gen", un gen de resistencia de una variedad de cultivo concreta confiere resistencia frente a las razas fisiológicas del patógeno que expresan el gen de avirulencia complementario, esta incompatibilidad genética se manifiesta por la inducción de la HR. La expresión de genes de avirulencia también puede controlar la resistencia de plantas no huésped, así; *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* es patógeno de pimiento y tomate, pero incapaz de provocar la enfermedad en plantas incompatibles como soja, judía o tabaco, en las que induce la HR; pues bien, un gen de avirulencia aislado de la raza 1 de esta bacteria convierte a *X. campestris pv. phaseoli*, patógeno de judía, en una bacteria que induce la HR en todas las variedades de judía. Es decir, los genes de avirulencia pueden participar también en la restricción del rango de hospedador a niveles taxonómicos superiores a la especificidad raza microbiana-variedad vegetal; de manera, que las plantas podrían poseer baterías de genes de resistencia complementarios de genes de avirulencia concretos para cada patógeno potencial, genes que deberían tener funciones adicionales en la planta. Por otra parte, los genes de avirulencia de la bacteria actúan negativamente desde el punto de vista del microorganismo, reduciendo su rango de hospedador; entonces ¿por qué no se han perdido?, está claro que estos genes de avirulencia deben conferir también algunas ventajas aún desconocidas, tal vez sean necesarios para manifestar la virulencia o para sobrevivir fuera del hospedador [Dixon & Lamb, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 41, 339 (1990)]

En las interacciones compatibles para que la infección tenga éxito y se manifieste la patogenicidad bacteriana pueden ser necesarios más de cien genes [Lamb et al., *Cell*, 56, 215 (1989)]. Entre los genes bacterianos implicados en la patogenicidad destacan los genes *hrp*

(hipersensitive response and pathogenicity), que aunque no está clara su función, se ha propuesto que juegan un papel clave en la capacidad de las bacterias fitopatógenas para interactuar con la planta, siendo necesarios tanto para que se manifieste la enfermedad en la planta huésped, como para inducir la HR en plantas no compatibles. Así, la clonación de genes *hrp* de *P. syringae* en *P. fluorescens* o *E. coli* permite a estas bacterias inducir la HR en tabaco. En las mutaciones de genes *hrp* es difícil separar la menor capacidad de crecimiento de las bacterias in planta de la pérdida de la capacidad de inducir la HR o la patogenicidad; los efectos fenotípicos de una mutación *hrp* ¿se deben a la incapacidad de la bacteria mutante para crecer normalmente en los tejidos de la planta? ¿o los productos de los genes *hrp* participan más directamente en la respuesta patogénica? [Willis et al., *Molecular Plant-Microbe Interact.*, 4, 132 (1991)].

Los genes *hrp* están muy conservados en homología y función en la mayoría de las bacterias fitopatógenas. Además recientemente se ha publicado en dos artículos simultáneos, que las secuencias predecibles para las proteínas codificadas por genes *hrp* de *P. solanacearum* y *X. campestris* presentan una notable similitud con la secuencia de factores de virulencia fundamentales de bacterias patógenas de mamíferos, como *Yersinia pestis*, *Y. enterocolitica*, *Shigella flexneri* o *E. coli* [Gough et al. y Fenselau et al., *Molecular Plant-Microbe Interact.*, 5, 384 (1992)]; estas proteínas de las bacterias patógenas de animales están implicadas en la secreción extracelular de factores esenciales de patogenicidad. Por analogía se ha propuesto que los genes *hrp* estarían implicados en la secreción de moléculas esenciales para la interacción de la bacteria y la planta, quizás en la exportación de moléculas implicadas en la patogenicidad, y que también actuarían, directa o indirectamente, como "elicitors" sobre la planta; éstos podrían ser los productos de los genes de avirulencia, que al parecer se expresan constitutivamente, pero sólo son secretados si están presentes las proteínas *hrp*; estos factores secretados inducirán la HR en interacciones incompatibles, al ser reconocidos por receptores codificados por los genes de resistencia de la planta, o provocarán la enfermedad si no son reconocidos en las interacciones compatibles. A.V.