

T.D. 204

B

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDIO BIOQUÍMICO DE LAS INTERACCIONES ENTRE
MUTANTES QUE AFECTAN A LA SÍNTESIS DE PTERIDINAS
Y XANTOMATINA EN DROSOPHILA MELANOGASTER

TESIS DOCTORAL

FRANCISCO J. SILVA MORENO

BIBLIOTECA
FACULTAT DE C. BIOLÒGIQUES
VALÈNCIA

UMI Number: U607634

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607634

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

José Luis Ménsua Fernández, Catedrático y director del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València,

CERTIFICO: Que Francisco José Silva Moreno, licenciado en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo mi dirección la Memoria de Investigación que lleva el título: "Estudio bioquímico de las interacciones entre mutantes que afectan a la síntesis de pteridinas y xantomatina en Drosophila melanogaster", para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la Universitat de València.

Y para que así conste, en cumplimiento de la legislación vigente, expido el siguiente certificado en Burjassot a cuatro de Junio de mil novecientos ochenta y seis.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'José Luis Ménsua Fernández', written in a cursive style with a long horizontal stroke at the end.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. José Luis Ménsua Fernández, Director del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universitat de València, por haberme iniciado en la investigación de la Genética, y por sus consejos y ayuda prestados durante la realización de esta tesis doctoral.

Al Dr. Juan Ferré, M^a Dolores Real, Yolanda Bel y M^a Teresa Calatayud por su actitud siempre favorable al comentario y discusión de los problemas que surgieron durante la realización de este trabajo.

Al Dr. K. Bruce Jacobson por las interesantes discusiones que mantuvimos sobre el problema del efecto de la mutación red sobre la síntesis de pteridinas.

A todos los miembros del Departamento de Genética por las muchas ocasiones en las que me han prestado su ayuda desinteresada.

A mis padres,
a Francesc y
a Enriqueta.

INDICE

INDICE

Páginas

1. Introducción	1
1.1. Pigmentos oculares	3
1.2. Biosíntesis de omocromos	7
1.3. Biosíntesis de pteridinas	9
1.4. Función de los omocromos y pteridinas	15
1.5. Mutantes de color de ojos de <u>D. melanogaster</u>	17
1.6. Interacciones entre las rutas de síntesis de las pteridinas y la xantomatina	24
1.7. Importancia clínica de las pteridinas	27
2. Material y Métodos	30
2.1. Cultivo de Drosophila	31
2.2. Organismo biológico	32
2.3. Síntesis de dobles mutantes	36
2.4. Experimentos con medio suplementado	42
2.5. Detección y cuantificación de pteridinas, pigmento marrón y otros metabolitos relacio- nados	42
2.6. Medición de la actividad GTP ciclohidrolasa	66
2.7. Ensayo de las actividades enzimáticas biop- terina sintasa y dihidrobiopterín oxidasa	76
3. Resultados	78
3.1. Síntesis de cepas dobles mutantes de color de ojos	79
3.2. Descripción de las manchas cromatográficas	93
3.3. Detección de quinoleinas en las cepas dobles mutantes	105
3.4. Cuantificación de pteridinas en dobles mutan <u>tes</u> de <u>D. melanogaster</u>	110
3.5. Estudio de la interacción producida por el mutante <u>red</u>	140

4.. Discusión .	164
5.. Conclusiones	192
6.. Bibliografía	198

1. INTRODUCCION

Drosophila melanogaster Meigen es un insecto perteneciente al Orden de los Dípteros y que es conocido vulgarmente como mosca del vinagre. En los ojos de este organismo pueden diferenciarse dos estructuras: la retina y el lóbulo óptico. La retina está formada por un conjunto de unas 800 facetas u omatidios. En los omatidios, a su vez, pueden diferenciarse dos partes, por un lado el aparato dióptrico que se encarga de la percepción de la luz y, por otro, las células retinulares o fotorreceptoras que convierten los estímulos luminosos en eléctricos.

El aparato dióptrico se halla rodeado de células pigmentarias que absorben los rayos de luz que no entran perpendicularmente en los omatidios. Existen tres tipos de células pigmentarias: primarias, secundarias y basales. Las primarias (dos por omatidio) rodean al aparato dióptrico; las secundarias (nueve por omatidio) rodean a las células retinulares y a las primarias y se extienden hasta la membrana basal de la retina; y las basales (nueve por omatidio) se sitúan en la parte más interior de la retina.

Las células pigmentarias contienen en Drosophila dos tipos de pigmentos: los omocromos y las pteridinas. Estos pigmentos no se encuentran libres en el citoplasma de las células, sino que se hallan depositados en unas estructuras esféricas con membrana denominadas gránulos pigmentarios. Las pteridinas y los omocromos están contenidas en gránulos pigmentarios diferentes y se distribuyen, también de forma diferente, en dos de los tres tipos de células pigmentarias.

Las células pigmentarias primarias contienen solamente gránulos de omocromos, mientras que las secundarias contienen los dos tipos de gránulos (Shoup, 1966; Fuge, 1967). La formación de estos gránulos es también diferente según el pigmento que contienen. Así, por ejemplo, los gránulos que contienen omocromos se producen a partir del retículo endoplásmico liso, mientras que los que contienen pteridinas lo hacen a partir de las vesículas del aparato de Golgi (Fuge, 1967). La formación de los gránulos pigmentarios es independiente de la síntesis de pigmentos, de tal forma que los gránulos se forman aunque la síntesis de pigmentos esté interrumpida. Estos tipos de gránulos pigmentarios presentan la apariencia de estructuras formadas únicamente por la membrana sin ningún contenido interior.

1.1. Pigmentos oculares

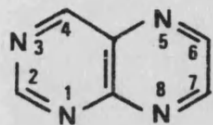
Los pigmentos presentes en los ojos de Drosophila melanogaster pertenecen según su estructura química al grupo de los omocromos o al de las pteridinas.

Becker (1942) fue el primero en utilizar el término omocromos. Los dividió según su peso molecular en dos tipos: omatinas (bajo peso molecular) y ominas (alto grado de polimerización). Linzen (1967) propuso una subdivisión de los omocromos basada en criterios estructurales. Según él, pertenecían al grupo de las omatinas aquellos compuestos que contenían el grupo 1-2-pirimidino-3H-fenoxazina, y al de las

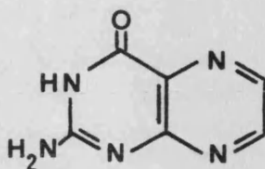
omina los que producían, tras su hidrólisis ácida, 3-hidroxiquinurenina y "pigmento IV". Esta última sustancia era un pigmento de color rojo-ladrillo que en condiciones fuertes se separaba en 3-hidroxiquinurenina y una hidroxiquinona que contiene un átomo de azufre.

Los dos únicos omocromos presentes en los ojos de Drosophila melanogaster son la xantomatina y la dihidroxantomatina, pertenecientes ambos al grupo de las omatinas. En los túbulos de Malpighi del mutante red Malpighian tubules se ha encontrado otro tipo de omocromo, la omina A, el cual al acumularse produce el color rojo de los túbulos (Wessing y Bonse, 1966).

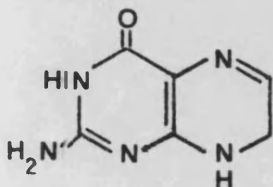
En los ojos de Drosophila melanogaster, así como en todo el cuerpo, hay una amplia representación de compuestos que tienen como grupo básico el anillo de pteridina (figura 1). La mayor parte de estos compuestos son incoloros y, por tanto, no pueden considerarse como pigmentos. Sin embargo, hay algunos que sí presentan color: los pigmentos rojos y los pigmentos amarillos. Los pigmentos rojos, llamados genéricamente "drosopterinas", son sustancias que presentan dos anillos de pteridina en sus moléculas. Este grupo está compuesto por, al menos, seis sustancias distintas: la drosopterina (la más abundante), la isodrosopterina, los dos isómeros de la aurodrosopterina, la neodrosopterina y "la fracción e" (Schwinck y Mancini, 1973). Los pigmentos amarillos más abundantes son la sepiapterina y la isosepiapterina. Hay, sin embargo, varias sustancias que



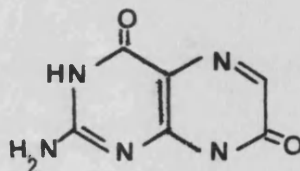
PTERIDINA



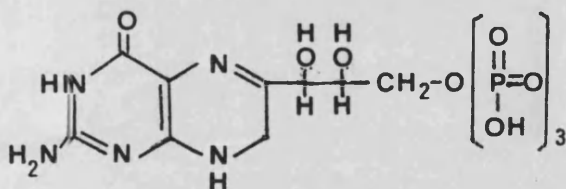
PTERINA



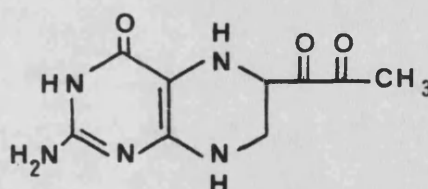
DIHIDROPTERINA



ISOXANTOPTERINA

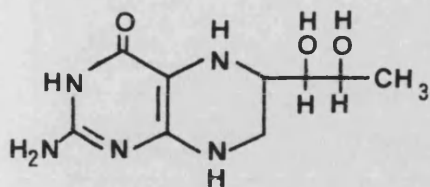


DIHIDRONEOPTERINA-PPP

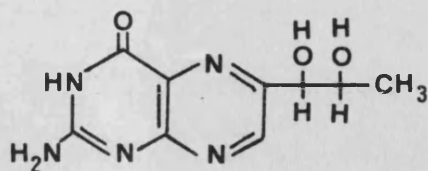


6-PIRUVOILTETRAHIDROPTERINA

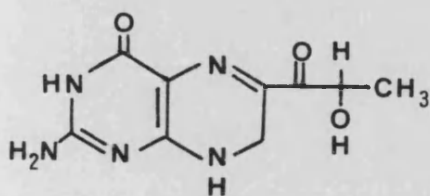
Figura 1.- Estructuras químicas de las pteridinas.



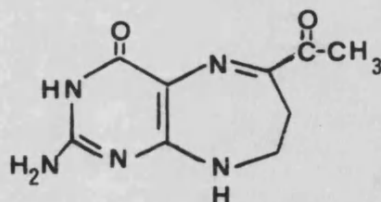
TETRAHIDROBIOPTERINA



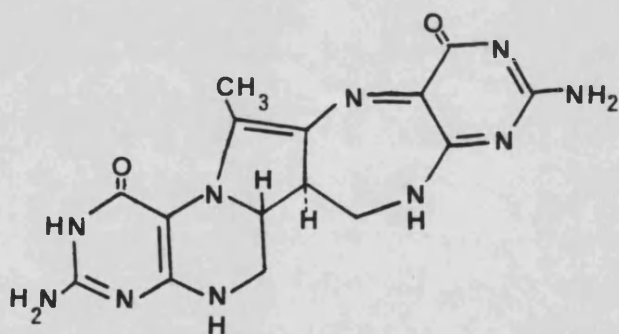
BIOPTERINA



SEPIAPTERINA



6-ACETILDIHIDROHOMOPTERINA



DROSOPTERINA

Figura 1 (continuación)

presentan color y fluorescencia amarilla y que, aunque apenas se detectan en la cepa tipo salvaje, se acumulan en varios mutantes de color de ojos. Estas sustancias corresponden a las manchas nº 8, 20, 21 y 22 descritas por Ferré et al. (1986).

La mayor parte de las pteridinas encontradas en Drosophila melanogaster pueden también denominarse pterinas. Este nombre se utiliza actualmente para denominar a aquellos compuestos cuyo anillo de pteridina presenta un grupo amino en posición 2 y un grupo oxo en posición 4 (figura 1).

1.2. Biosíntesis de omocromos

El esclarecimiento de la ruta de síntesis de los omocromos estuvo en sus comienzos ligado a los primeros trabajos en genética bioquímica. Beadle y Ephrussi (1936), con sus experiencias de trasplantes de discos imaginales en Drosophila melanogaster, correlacionaron mutaciones del genoma con alteraciones del metabolismo, pudiendo así establecer que las mutaciones vermilion y cinnabar interrumpían un paso de la secuencia de reacciones que conducía a la síntesis del pigmento marrón. Los metabolitos intermediarios en ésta síntesis, a los que denominaron sustancias v⁺ y cn⁺, fueron identificados posteriormente por Butenandt et al. (1940, 1949).

La ruta de síntesis de la xantomatina (figura 2) está en la actualidad casi completamente dilucidada (Phillips y

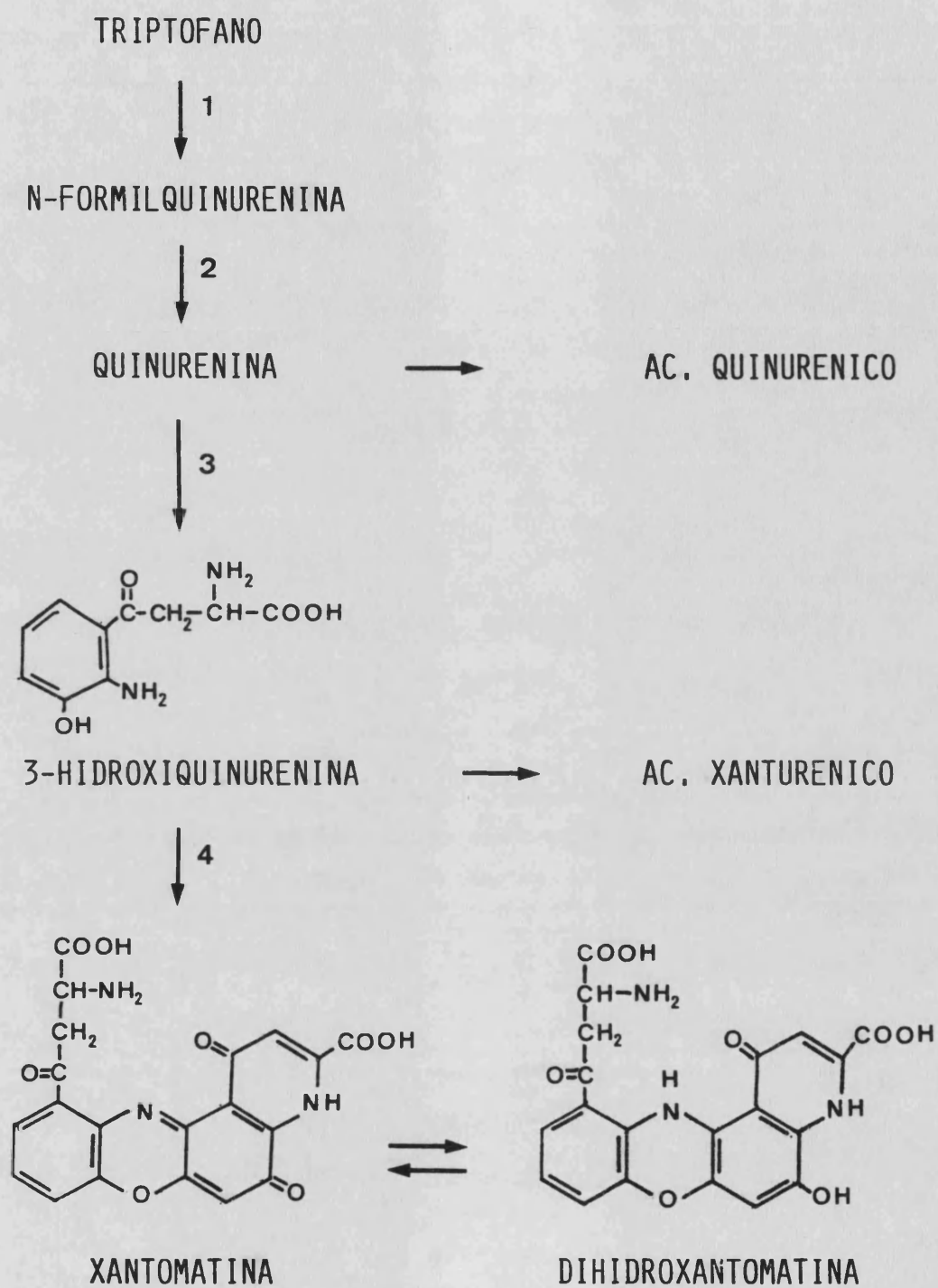


Figura 2.- Ruta de biosíntesis del pigmento marrón

Los enzimas que corresponden a cada paso son: (1) triptófano oxigenasa, (2) quinurenina formamidasa, (3) quinurenina hidroxilasa y (4) fenoxacinona sintasa.

Forrest, 1980; Ferré et al., 1985). Sin embargo, algunas de las reacciones laterales no han sido totalmente aclaradas. También, hay dudas de que realmente exista la enzima fenoxacinona sintasa, ya que se ha observado que in vitro es muy fácil la oxidación espontánea de 3-hidroxiquinurenina a xantomatina y, además, no se ha podido atribuir esta actividad enzimática a ningún gen concreto.

1.3. Biosíntesis de pteridinas

Los trabajos realizados en la última década permitieron establecer la mayor parte de los pasos enzimáticos de la biosíntesis de pteridinas. En la figura 3 puede observarse una ruta global de biosíntesis de las pteridinas basada en los conocimientos actuales. Sin embargo, esta ruta no ha sido totalmente clarificada existiendo todavía controversia sobre ciertos pasos (ver figura 4).

La ruta de biosíntesis parece constar, en cualquier caso, de un tronco común inicial, a partir del cual se producen varias ramificaciones que conducen como productos finales a la isoxantopterina, las drosopterinas, la tetrahidrobiopterina y la biopterina.

El precursor de las pteridinas es el GTP. Esta sustancia por acción de la enzima GTP ciclohidrolasa es transformada en 7,8-dihidroneopterina trifosfato que es la primera pteridina sintetizada en la ruta (Burg y Brown,

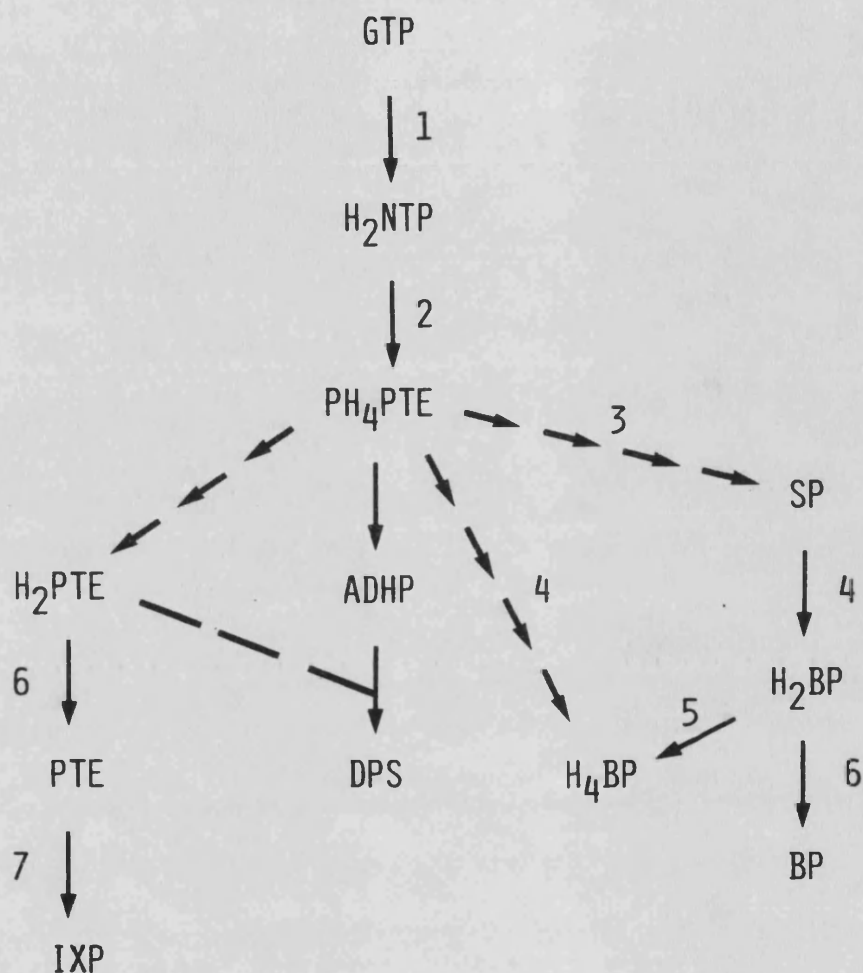


Figura 3.- Ruta de biosíntesis de las pteridinas

Las líneas discontinuas indican aquellos pasos en los que se desconoce si actúa una o varias enzimas. Abreviaturas usadas : GTP (guanosina trifosfato), H₂NTP (dihidroneopterina trifosfato), PH₄PTE (piruvoiltetrahydropterina), H₂PTE (dihidropterina), PTE (pterina), IXP (isoxantopterina), ADHP (acetildihidrohomopterina), DPS (drosopterinas), SP (sepiapterina), H₂BP (dihidrobiopterina), H₄BP (tetrahidrobiopterina) y BP (biopterina). 1=GTP ciclohidrolasa, 2=sepiapterina sintasa A o piruvoiltetrahydropterina sintasa, 3=sepiapterina sintasa B, 4=biopterina sintasa, 5=dihidrofolato reductasa, 6=dihidropterín oxidasa y 7=xantín deshidrogenasa.

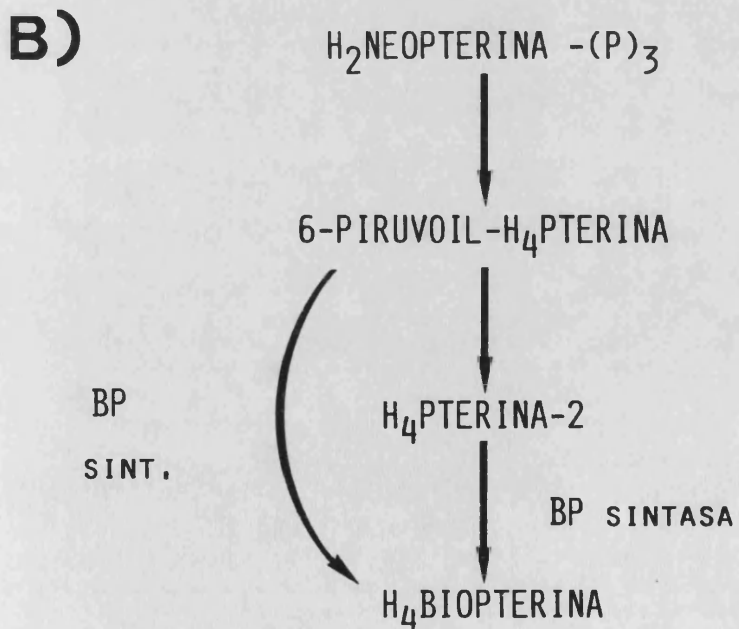
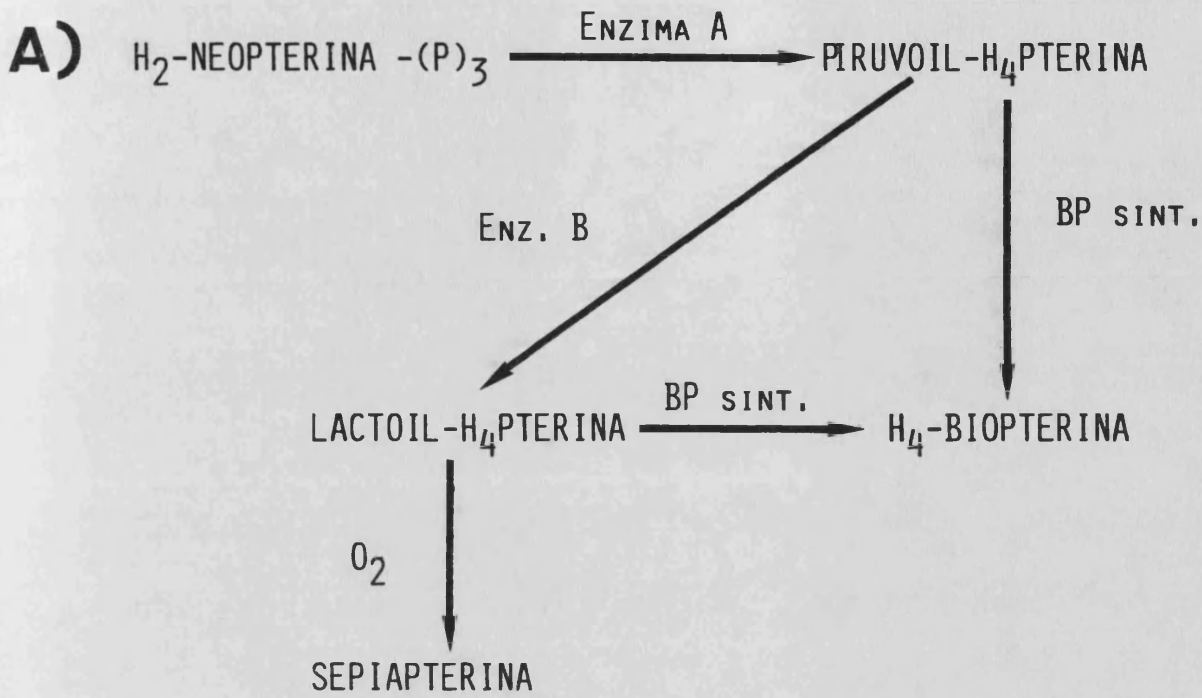


Figura 4.- Ruta de síntesis "de novo" de la tetrahydrobiopterina
 A) Switchenko et al. (1984). B) Smith y Nichol (1984).

1968; Fan et al., 1976; Fan y Brown, 1976). El siguiente paso en la ruta de síntesis consiste en la transformación de este compuesto en sepiapterina. Para esta transformación son necesarios dos pasos enzimáticos sucesivos catalizados por las enzimas sepiapterina sintasa A y B (Fan et al., 1975; Krivi y Brown, 1979). El compuesto que se forma tras la acción de la sepiapterina sintasa A fue denominado compuesto X al no poder ser identificado por su extremada labilidad.

La sepiapterina es metabolizada a dihidrobiopterina por acción de la biopterina sintasa o sepiapterina reductasa (Matsubara et al., 1966; Fan y Brown, 1979). Este compuesto puede ser reducido a tetrahidrobiopterina por acción de la dihidrofolato reductasa (Taira, 1961b) u oxidado a biopterina por medio de la enzima dihidropterín oxidasa (Fan y Brown, 1979; Unnasch y Brown, 1982). Esta enzima es, a su vez, capaz de transformar la dihidropterina en pterina, presentado esta última un mayor tiempo de recambio y una menor K_m que la dihidrobiopterina (Unnasch y Brown, 1982). La pterina producida se transforma en isoxantopterina por acción del enzima xantín deshidrogenasa (Forrest et al., 1956). Esta enzima puede también utilizar como sustrato otras sustancias no pterídnicas como la xantina y la hipoxantina.

Los pasos que presentan más dudas y para los que todavía no han sido caracterizados los enzimas son el de la dihidroneopterina trifosfato a dihidropterina y los que conducen a la síntesis de las drosopterinas. Yim et al.

(1981) caracterizaron una enzima que eliminaba la cadena lateral de la neopterina produciendo dihidropterina. Observaciones posteriores con mutantes de color de ojos inducen a pensar que el precursor directo de la dihidropterina no es la neopterina trifosfato sino el compuesto X. Los pasos necesarios que necesitaría esta síntesis son desconocidos. Tampoco han sido caracterizados los pasos enzimáticos implicados en la biosíntesis de drosópteras. Wilson y Jacobson (1977b) detectaron la existencia de un compuesto que se acumula en grandes cantidades en la mutación Henna-recessive³ (Hn^{r3}), y que parecía ser uno de los dos precursores de las drosópteras. Wiederrecht et al. (1981) lo identificaron como 2-amino-4-oxo-6-acetil-7,8-dihidro 3H, 9H-pirimido 4-5b 1,4 diazepine (PDA). Posteriormente, Jacobson et al. (1982) han propuesto para esta sustancia el nombre de 6-acetildihidrohóptera. El otro precursor de las drosópteras parece que sería la dihidropterina, en base a la estructura química de las drosópteras.

Esta ruta ha sido, sin embargo, puesta en entredicho tras el descubrimiento de Nichol et al. (1983) de que, en tejidos de mamíferos, la tetrahidrobiopterina podía ser sintetizada en presencia de un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa (metotrexato). Por dicha razón se planteó que podía existir una ruta "de novo" que conduciría directamente a la tetrahidrobiopterina, sin pasar por la dihidrobiopterina. Estudios posteriores permitieron la

identificación del compuesto X como 6-piruvoiltetrahydropterina (Switchenko et al, 1984). El trabajo realizado por estos investigadores alteró sustancialmente los conocimientos que se tenían sobre la ruta de síntesis de las pteridinas. Así, según estos autores, la ruta que conducía a la síntesis de tetrahydrobiopterina no necesitaba pasar por la sepiapterina, sino que podía sintetizarse directamente a partir del compuesto X por medio de la enzima biopterina sintasa. La función principal de esta enzima in vivo sería esta reacción y no la síntesis de dihydrobiopterina a partir de sepiapterina. A su vez, cuestionaron la función de la enzima sepiapterina sintasa B que transformaba el compuesto X en sepiapterina, demostrando que el producto formado en la reacción enzimática era lactoiltetrahydropterina, el cual al trabajar en condiciones oxidantes se oxidaba a sepiapterina. El compuesto lactoiltetrahydropterina puede transformarse también en tetrahydrobiopterina por acción de la enzima biopterina sintasa. Sin embargo, el rendimiento en la producción de tetrahydrobiopterina no solo no aumenta en presencia del producto de la enzima B sino que disminuye, con lo que estos autores propusieron que el camino in vivo hasta la tetrahydrobiopterina pasaba exclusivamente por la sepiapterina sintasa A (que red denominaron como piruvoiltetrahydropterina sintasa) y la biopterina sintasa (figura 4), siendo la piruvoiltetrahydropterina el único intermediario in vivo de esta síntesis.

Smith y Nichol (1984) llegaron a conclusiones similares, aunque no idénticas, trabajando con tejidos de mamíferos. Así, encontraron que entre la dihidroneopterina trifosfato y la tetrahydrobiopterina había dos intermediarios a los que denominaron H₄-pterina-1 y H₄-pterina-2 (figura 4). El primero de ellos parece que correspondería a la piruvoiltetrahydropterina, mientras que el segundo sería una tetrahydropterina distinta de la lactoiltetrahydropterina encontrada por Switchenko et al. (1984).

1.4. Función de los omocromos y pteridinas

Linzen (1967) propuso tres posibles funciones para los omocromos: pigmentos oculares auténticamente funcionales, donadores y aceptores de electrones y productos de deshecho.

Respecto a su función como pigmentos, parece que impedirían el paso de luz lateral entre los omatidios, permitiendo una mayor agudeza visual. Se ha podido observar que mutantes sin ningún tipo de pigmento en los ojos (omocromos o pteridinas) exhiben una menor agudeza visual (Burnet et al., 1968).

La función de los omocromos como productos de deshecho se basa en la no toxicidad de estas sustancias. Por esta razón los excesos de triptófano, que sí resultarían tóxicos para el organismo, son metabolizados y transformados en omocromos. Estas sustancias podrían considerarse como

productos de excrección a pesar de que se acumulen a lo largo de la vida del organismo (Linzen, 1967). Otra observación que confirma esta función de los omocromos es la baja toxicidad que produce un exceso de triptófano en la dieta de la cepa tipo salvaje, mientras que la cepa mutante vermilion que no puede metabolizar el triptófano a omocromos ve disminuida fuertemente su viabilidad (vease resultados, pag. 153).

El estado de oxidación variable de los omocromos ha llevado a varios autores a considerar la hipótesis de que estas sustancias puedan intervenir en la respiración de las células. Bückman (1965) observó, sin embargo, que sólo en periodos de anoxia la xantomatina podía tener como función menor el papel de aceptor de electrones.

Las pteridinas presentan un mayor número de funciones que los omocromos. Así, al igual que éstos, pueden actuar como pigmentos de protección frente a la luz y como productos de deshecho del exceso de un compuesto (nitrógeno). Harmsen (1966) considera que ciertas pteridinas que se acumulan en gran cantidad en el organismo pueden ser los productos de excrección de las pteridinas activas fisiológicamente, así como de las pirimidinas. En algunos casos, como ocurre con los cuerpos grasos de mariposas, la función de excrección puede estar acompañada por la de un almacenamiento potencialmente reversible.

Una función muy importante de algunas pteridinas es la de ser cofactores en ciertas reacciones enzimáticas. Kaufman

(1963) descubrió que la tetrahidrobiopterina era el cofactor necesario para la hidroxilación de la fenilalanina a tirosina. Posteriormente se han detectado otras reacciones enzimáticas en las que se necesita éste u otro cofactor pteridínico (Rembold y Gyure, 1972).

La amplia distribución que presentan estas sustancias en tejidos y organismos diferentes, ha dado lugar a muchas hipótesis sobre otras posibles funciones (efectores de la proliferación celular, el primer aceptor de energía de la fotosíntesis, etc.).

1.5. Mutantes de color de ojos de Drosophila melanogaster

En Drosophila melanogaster se conocen mas de 70 mutaciones que afectan al color de los ojos. Esta alteración se debe a una variación en las cantidades normales de los pigmentos oculares (omocromos y pteridinas).

Aunque son varios los mutantes en los que se ha detectado un efecto específico sobre una de las dos rutas de síntesis, es bastante habitual que este efecto vaya acompañado por una alteración de la otra ruta de síntesis de pigmentos oculares. Tomando en cuenta esta consideración, vamos a ver ahora cuales han sido los genes de color de ojos descritos como estructurales o reguladores para los enzimas de las dos rutas de síntesis.

A) Ruta de síntesis de los omocromos

Los primeros genes estructurales que se descubrieron

fueron vermilion y cinnabar. Estos genes codificaban las enzimas triptófano oxigenasa (Baglioni, 1959; Kaufman, 1962) y quinurenina hidroxilasa (Ghosh y Forrest, 1967a), respectivamente. El patrón de pteridinas de estos mutantes es similar al del tipo salvaje.

Respecto a la enzima quinurenina formamidasa no se han encontrado mutantes de Drosophila melanogaster que bloqueen este paso enzimático. De las varias hipótesis planteadas resulta bastante atractiva la de Moore y Sullivan (1978). Estos investigadores encontraron que existían dos tipos de quinurenina formamidasa en D. melanogaster, codificadas por loci enzimáticos diferentes. Esto les hizo proponer que la existencia de mutantes que bloquearan la actividad quinurenina formamidasa se debía a que sólo una rara doble mutación en ambos loci podría producir un mutante que viera afectada la síntesis de pigmento marrón.

El último paso de la ruta de síntesis está catalizado por la enzima fenoxacinona sintasa. Hay dos mutantes, cardinal y karmoisin, que acumulan 3-hidroxiquinurenina durante el desarrollo y presentan cantidades disminuidas de pigmento marrón (Howells et al., 1977). La controversia que existe sobre la función in vivo de esta enzima hace dudar si alguno de ellos puede considerarse como el gen estructural, ya que aunque se ha detectado en el primero una baja actividad de la enzima, también ésta se ha observado en otros mutantes deficientes en omocromos como, por ejemplo, vermilion y cinnabar, cuyos defectos enzimáticos están

claramente caracterizados en otras dos enzimas anteriores de esta ruta de síntesis.

Otro mutante que parece afectar específicamente la síntesis de omocromos es scarlet. Este mutante no acumula 3-hidroxiquinurenina y presenta cantidades normales de quinurenina y triptófano (Phillips y Forrest, 1980). Esta falta de 3-hidroxiquinurenina no es debida a una actividad baja de la enzima quinurenina hidroxilasa (Ghosh y Forrest, 1967a), sino que parece estar relacionada con un defecto en el mecanismo de transporte o acumulación de quinurenina en los túbulos de Malpighi y en los ojos, durante el desarrollo (Howells *et al.*, 1977).

B) Ruta de síntesis de las pteridinas

La detección de los genes estructurales que codifican esta ruta de síntesis está siendo mucho más difícil. Esto se ha debido a los diferentes efectos pleiotrópicos que produce un único defecto génico en esta ruta de síntesis, así como al hecho de que probablemente muchos de estos genes estructurales tienen una función vital en el organismo y, por tanto, mutaciones que afectan a esta función provocarían la letalidad del individuo, e impedirían su detección.

El primer mutante que pudo relacionarse con un defecto enzimático fue rosy (Forrest *et al.*, 1956). Este mutante no poseía isoxantopterina, ni presentaba actividad de la enzima xantina deshidrogenasa (XDH). La demostración de que el locus rosy era el gen estructural para este enzima fue obtenida con los estudios de Yen y Glassman (1965) y Gelbart *et al.*

(1974). Posteriormente se han descubierto otros genes que parecen controlar la actividad xantín deshidrogenasa. Las mutaciones marron-like (mal) y cinnamon (cin) no presentan actividad XDH, mientras el mutante low xanthin dehydrogenase (lxg) presenta un actividad de alrededor del 20%.

Los genes cin y lxg parecen estar relacionados con la síntesis de un cofactor que sería imprescindible para la actividad XDH (Warner y Finnerty, 1981). El mutante mal, por el contrario, presenta cantidades normales del cofactor. Esto, ha llevado a plantear dos hipótesis sobre su función. Según la primera, el gen mal actuaría en el procesamiento de la enzima XDH, mientras la segunda hipótesis propondría que el cofactor presente en el mutante mal no sería activo fisiológicamente (Warner y Finnerty, 1981). Este cofactor contiene molibdeno y una pterina que presenta una cadena lateral en posición 6 (Johnson et al., 1980). Los efectos pleiotrópicos de estos mutantes se deben al hecho de que este cofactor parece ser necesario para la acción de varias enzimas (piridoxal oxidasa (PO), aldehído oxidasa (AO), sulfito oxidasa (SO), etc.).

Bogaart y Bernini (1981) han encontrado que los mutantes cin y lxg apenas presentan actividad sulfito oxidasa. Esto se debería a la necesidad por parte de la enzima del cofactor de molibdeno. El hecho de que mal posea una actividad normal podría explicarse por la presencia del cofactor de molibdeno. Este cofactor podría ser funcional sólo en algunas enzimas, mientras que para la XDH, AO y PO

no sería activo.

Existen varios mutantes que afectan a la actividad de la enzima GTP ciclohidrolasa (GTPCH). Evans y Howells (1978) observaron que las mutaciones raspberry (ras) y prune (pn) alteraban la actividad de la enzima durante el desarrollo, presentando una actividad disminuida respecto al tipo salvaje en adultos y aumentada en pupas. Sin embargo, estos mutantes no podían considerarse genes estructurales para la enzima al no presentar una relación proporcional entre la actividad enzimática y la dosis génica. Mackay y O'Donnell (1983) realizaron un amplio estudio con casi todos los mutantes de color de ojos en un intento de encontrar el gen estructural para la enzima. Encontraron que varios mutantes alteraban la actividad de la enzima. De ellos, el único que presentó una relación entre la dosis génica y la actividad enzimática fue el locus Punch. Por tanto, este gen sería probablemente el estructural para la enzima GTPCH. Otros genes como red Malpighian tubules, rose, raspberry o prune podrían actuar como reguladores de su actividad enzimática.

La segunda enzima de la ruta de síntesis es la sepiapterina sintasa A (o piruvoiltetrahydropterina sintasa). Solo se ha descubierto un locus cuyas mutaciones produzcan una disminución de la actividad. Este locus es purple (pr) cuyos alelos tienen actividades del enzima entre el 8% y 30% de la del tipo salvaje (Yim et al., 1977); Krivi y Brown, 1979). Yim et al. (1977) demostraron también la existencia de una relación entre el número de copias de pr⁺

y la actividad enzimática, por lo que presumiblemente este locus es el gen estructural para dicho enzima.

No se conocen todavía los genes que codifican las enzimas de las ramas de la ruta de síntesis que conducen a la biopterina. Esto puede ser debido, en parte, a que una mutación en alguna de estas enzimas no produciría variaciones en las cantidades de los pigmentos rojos, que son los que mayoritariamente dan el color al ojo; por tanto, estos mutantes pasarían desapercibidos visualmente a no ser que produjeran algún otro efecto sobre la síntesis de pteridinas que afectara a las cantidades de drosopterinas.

Los mutantes clot (cl) y sepia (se) parecen estar involucrados en el control de la actividad de las enzimas que producen la transformación de piruvoiltetrahidropterina en acetildihidrohomopterinina (Wilson y Jacobson, 1977b; Ferré et al., 1983; Wiederrecht et al., 1984). El mutante clot presenta, sin embargo, una actividad de la enzima GTP ciclohidrolasa ligeramente disminuida (Mackay y O'Donnell, 1983), lo que hace pensar que probablemente no sea un gen estructural en la biosíntesis de acetildihidrohomopterinina. Por el contrario, el mutante sepia no afecta a ninguna de las otras enzimas de la ruta para las que se ha medido su actividad. Esto hace pensar que probablemente sea el gen estructural para alguna de las enzimas que conducen a la síntesis de 6-acetildihidrohomopterinina. No existen, sin embargo, datos de la relación entre actividad enzimática y dosis génica, al no estar todavía bien caracterizadas estas

enzimas.

Los pasos enzimáticos que conducen a la síntesis de pterina no han sido todavía caracterizados, excepto el último paso de dihidropterina a pterina que está catalizado por la enzima dihidropterín oxidasa (Unnasch y Brown, 1982). Hubby (1962) propuso que el mutante *little isoxanthopterin* (lix) podía actuar en un paso anterior a la pterina. Para esto se basó en las pequeñas cantidades de pterina e isoxantopterina que presentaba este mutante en los testículos y, en la baja cantidad de pterina del doble mutante ry² lix. No se han realizado estudios posteriores que pudieran localizar dicho mutante en algún paso enzimático concreto.

Ferré et al. (1986) han planteado la posibilidad de que tanto lix como los loci *bordeaux* (bo) y *dark eye* (dke) puedan estar actuando como genes estructurales o reguladores en alguno de los pasos que hay entre la piruvoyltetrahidropterina y la pterina. Su hipótesis se basa en el efecto específico de los mutantes de estos loci sobre la ruta de las pteridinas (los niveles de pigmento marrón y sus metabolitos son similares al tipo salvaje) y en las bajas cantidades de pterina e isoxantopterina que presentan dichos mutantes.

Otro locus que también podría ser el gen estructural de alguna enzima de la ruta de síntesis de las pteridinas es el locus *Henna* (Hn). Wilson y Jacobson (1977b) propusieron que este gen podría estar actuando en el paso enzimático

entre la 6-acetildihidrohomopterinina y las drosopterinas, basándose para ello en la gran acumulación de la primera sustancia que presenta el mutante Hn^{ra} . Sin embargo, la casi total ausencia de isoxantopterina y pterina en dicho mutante parece sugerir que estaría actuando en uno de los pasos enzimáticos que hay entre la piruvoiltetrahidropterina y la dihidropterina (Ferré *et al.*, 1983), explicándose la reducción de la cantidad de drosopterinas y el aumento de la 6-acetildihidrohomopterinina como una consecuencia de la falta de dihidropterina (precursor, junto con la 6-acetildihidrohomopterinina, de las drosopterinas). Los acúmulos de otras pteridinas (sepiapterina, biopterina, etc.) podrían explicarse por la existencia de una mayor cantidad de piruvoiltetrahidropterina, al no poderse metabolizar ésta a dihidropterina.

1.6. Interacciones entre las rutas de síntesis de las pteridinas y la xantomatina

En el apartado anterior se ha descrito un pequeño número de mutantes de color de ojos que afectan de forma específica a una de las dos rutas de síntesis de pigmentos oculares. El resto de los mutantes de color de ojos conocidos presenta la característica de afectar simultáneamente a la síntesis y/o acumulación de los dos tipos de pigmentos.

Se han propuesto muchas hipótesis encaminadas a

explicar porqué un solo defecto genético puede conducir a alteraciones en dos rutas de síntesis independientes.

Los trabajos más clásicos proponían las hipótesis erróneas de que hubiera un sustrato común en las dos rutas de síntesis (Nolte, 1952), o que ambos pigmentos se acumularan en los mismos gránulos pigmentarios y, por dicha razón, un defecto en la formación de los gránulos afectara a la acumulación de ambos tipos de pigmentos (Kühn, 1956).

Hipótesis más recientes han tratado de explicar estas interacciones en términos de cofactores o inhibidores enzimáticos. El conocimiento que se tenía de que ciertas hidroxilasas necesitaban un cofactor pteridínico para su funcionamiento, hizo que Ghosh y Forrest (1967a) propusieran que la quinurenina hidroxilasa podía estar incluida en este caso. Por tanto, un defecto en la ruta de síntesis de las pteridinas podría conducir a una inhibición de la síntesis de la xantomatina. Sullivan *et al.* (1973) han encontrado, sin embargo, que los diferentes alelos de white presentan niveles normales de quinurenina hidroxilasa a pesar de presentar un rango en la cantidad de pteridinas que va desde la total ausencia hasta valores superiores, en algunas pteridinas, de los que presenta el tipo salvaje.

Se ha propuesto, también, que el enzima triptófano oxigenasa pudiera ser inhibido o activado por algunas pteridinas (Ghosh y Forrest, 1967b). No se ha propuesto ninguna hipótesis en sentido inverso, es decir, que algún metabolito de la ruta de síntesis de la xantomatina inhiba

una enzima de la síntesis de pteridinas.

Sullivan *et al.* (1974) han propuesto una hipótesis más plausible para explicar la existencia de la gran variedad de fenotipos de color de ojos conocidos. Esta hipótesis está basada en el descubrimiento de que, para la síntesis de pigmentos oculares, es necesario un transporte y una acumulación de sus precursores durante el desarrollo. Por tanto, defectos en este sistema de transporte podrían conducir a fenotipos mutantes de color de ojos. Los mutantes deficientes en ambos tipos de pigmentos podrían explicarse si el mecanismo de transporte tuviera puntos en común para sus respectivos precursores (Sullivan y Sullivan, 1975). En base a esta hipótesis se llevaron a cabo varias experiencias con precursores (o probables precursores) de ambos tipos de pigmentos. Los estudios sobre los precursores de la xantomatina han permitido descubrir que hay varios mutantes que son incapaces de acumular quinurenina intracelularmente, tanto en los túbulos de Malpighi como en los ojos (Sullivan y Sullivan, 1975). Howells *et al.* (1977) también demostraron que varios mutantes no acumulan 3-hidroxiquinurenina durante su desarrollo, a pesar de presentar niveles normales de la actividad del enzima quinurenina hidroxilasa.

No se han encontrado evidencias claras que demuestren que este tipo de transporte se produce también con precursores de la biosíntesis de las pteridinas. Sullivan *et al.* (1979) detectaron, sin embargo, que algunos mutantes (a diferencia del individuo normal) no eran capaces de absorber

ciertas purinas (guanina, xantina y riboflavina) en los túbulos de Malpighi. De ellos, la guanina parecía la mas probable como precursora del GTP. Sin embargo, fueron incapaces de obtener cantidades apreciables de GTP, marcado radiactivamente, a partir de guanina marcada radiactivamente ni en los ojos del individuo tipo salvaje, ni en sus túbulos de Malpighi. No hay, por tanto, evidencias claras de que se necesite algún tipo de transporte de precursores de la síntesis de las pteridinas, a pesar del hecho de que algunos mutantes sean incapaces de absorber algunas purinas.

1.7. Importancia clínica de las pteridinas

En los últimos años se ha puesto de manifiesto que para el normal funcionamiento del organismo humano son necesarias pequeñas cantidades de algunos tipos de pteridinas. Desde hace tiempo se conoce la función del ácido fólico y la riboflavina como vitaminas. Ambas son factores de crecimiento y sus deficiencias suelen provocar trastornos de crecimiento y algunos tipos de anemia.

Otra enfermedad producida por un defecto de una pteridina es la "fenilcetonuria atípica" (Niederwieser et al., 1979; Curtius et al., 1979). La fenilcetonuria clásica consiste en un defecto del enzima responsable de la transformación de la fenilalanina en tirosina (fenilalanina hidroxilasa). La acumulación de fenilalanina producida por este defecto provoca una serie de trastornos en el

organismo de los cuales el retraso mental de los niños que presentan esta enfermedad es el más importante. Este retraso puede ser fácilmente evitado suministrando al paciente una dieta baja en fenilalanina.

La fenilcetonuria atípica se caracteriza por unos síntomas mucho más extremos y por no responder los pacientes a una dieta baja en fenilalanina. Este tipo de fenilcetonuria está causado por la ausencia total o parcial de la tetrahidrobiopterina, que es el cofactor necesario para varias enzimas hidroxilasas. Las más conocidas son la fenilalanina hidroxilasa (Kaufman, 1963), la tirosina hidroxilasas (Brenneman y Kaufman, 1964) y la triptófano hidroxilasa (Jequir et al., 1969). Los dos últimos enzimas están incluidos en las rutas biosintéticas de varios neurotransmisores necesarios para el normal funcionamiento del organismo, de aquí que la fenilcetonuria atípica presente síntomas más graves que los de la fenilcetonuria clásica.

El tratamiento de los pacientes con fenilcetonuria atípica ha consistido habitualmente en el suministro de tetrahidrobiopterina o, dada su inestabilidad, de alguno de sus precursores más estables. Estos últimos variaban según el tipo de lesión metabólica de cada paciente. Se han descubierto defectos en varios de los enzimas de la ruta de síntesis de las pteridinas como la GTP ciclohidrolasa (Niederwieser et al., 1984), dihidropterín reductasa (Niederwieser et al., 1982), etc.

Se ha podido observar que, asociada a varios tipos de enfermedades, se produce una alteración de los niveles de pteridinas en sangre y orina. En pacientes con varios tipos de tumores cancerígenos se ha encontrado que en un 70% de ellos la neopterina se encuentra aumentada frente a los individuos sanos, mientras que en un 22% de ellos lo está la biopterina. En general, sin embargo, el cociente neopterina/biopterina suele estar aumentado en pacientes con procesos cancerosos (Rokos et al., 1980).

Estas alteraciones en los niveles de pteridinas también se han encontrado asociadas a defectos inmunológicos y transtornos neurológicos y psiquiátricos (ver revisión de Nichol et al., 1985).

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. Cultivo de Drosophila

Se utilizaron botellas de vidrio de 150 ml, en las cuales se colocaban 30 ml de comida compuesta por harina de maíz, azúcar, levadura y agar, a la que se le añadían antifúngicos (p-oxibenzoato de metilo y ácido propiónico). Los cultivos fueron mantenidos en una cámara termorregulada a 25°C.

Cuando el objetivo de los cultivos era simplemente su mantenimiento, las moscas eran transpasadas a una botella de comida fresca con una periodicidad de aproximadamente un mes.

Cuando se iba a realizar algún tipo de experimento, moscas de las cepas de mantenimiento eran colocadas a poner huevos en un vidrio de reloj que contenía agar, alcohol etílico y ácido acético. Los huevos, depositados sobre esta superficie, eran recogidos y sembrados a razón de 100 huevos por botella, con el objetivo de que no hubiera competencia en los cultivos. En algunos experimentos se utilizaron viales mas pequeños que contenían solo 10 ml de comida. En estos viales se sembraron solo 70 moscas.

La necesidad de utilizar cultivos sin competencia en nuestros experimentos radicaba en el fuerte efecto que tiene el tamaño de las moscas sobre la cantidad de pigmentos, enzima, etc.

2.2. Organismo biológico

El ser vivo empleado en estos experimentos ha sido Drosophila melanogaster conocido vulgarmente como la mosca del vinagre. Como cepa normal para este organismo se utilizó la cepa Oregon R fundada a partir de moscas salvajes capturadas en Oregon (EE.UU.) en 1925. Todos los mutantes con los que se ha trabajado, excepto los alelos pr^{c4} y pr^{m2b} , se encuentran descritos en Lindsley y Grell (1968). Los mutantes de color de ojos utilizados se describen a continuación, estando entre paréntesis su abreviatura y su localización en el cariotipo de la especie: bordeaux (bd, 1:12.5), brown (bw, 2:104.5), cardinal (cd, 3:75.7), carmine (cm, 1:18.9), carnation (car, 1:62.5), cinnabar (cn, 2:57.5), claret (ca, 3:100.7), clot (cl, 2:16.5), chocolate (cho, 1:5.4), dark eye (dke, 2:73), deep orange (dor, 1:0.3), garnet (g, 1:44.4), Henna recessive^a (Hnr^a, sinónimo sed:sepiaoid, 3:23.0), karmoisin (kar, 3:51.7), light (lt, 2:55), lightoid (ltd, 2:56), little isoxanthopterin (lix, 1:23), pale ocelli (po, 2:65.2), pink (p, 3:48), prune (pn, 1:0.8), purple (pr, 2:54.5), purple^{c4} (pr^{c4}), purple^{m2b} (pr^{m2b}), purpleoid (pd, 2:106.4), Punch^a (Pu^a, 2:97), raspberry (ras, 1:32.8), red Malpighian tubules (red, 3:53.6), rose^a (rs^a, 3:35), rosy (ry, 3:52), ruby (rb, 1:7.5), safranin (sf, 2:71.5), scarlet (st, 3:44), sepia (se, 3:26), sunburst (snb, 3:34 ó 47), vermilion (v, 1:33).

La mayor parte de la cepas con las que se trabajó

fueron conseguidas de colecciones de mutantes de otros laboratorios. Algunas de estas cepas llevaban, además del mutante de color de ojos, otras mutaciones morfológicas (no de color de ojos), varias de ellas fueron conseguidas de laboratorios extranjeros, mientras que otras fueron sintetizadas en nuestro laboratorio. Todas las cepas de color de ojos utilizadas para la síntesis de los dobles mutantes (excepto la cepa lix) fueron cruzadas por Oregon R y recuperada la mutación en la F₂. De esta forma, se redujo, en parte, el background genético al incorporar las cepas aproximadamente la mitad de los genes de la cepa tomada como estándar (Oregon R).

A continuación, se enumeran todas las cepas utilizadas en este trabajo, su procedencia y las mutaciones que portaban:

bg: Bowling Green, USA (1982)

bw: Bowling Green (1981)

ca: Pasadena, USA (1980)

car: Bowling Green (1980)

cd: Bowling Green (1980)

cd e: Sintetizada para este trabajo (1981)
(e=ebony, 3:70.7)

cd tx: Sintetizada para este trabajo (1981) (tx=taxi,
3:91)

cho sc: Bowling Green (1980) (sc=scute, 1:0.0)

cl: Bowling Green (1982)

ed dp^{ce} cl: Bowling Green (1981) (ed=echinoid, 2:11;

dp^o=dumpy-oblique, 2:13)
cm: Bowling Green (1980)
cm ct⁶: Pasadena (1981) (ct⁶=cut-6, 1:20.0)
cn: Bowling Green (1980)
dke c: Bowling Green (1980) (c=curved, 2:75.5)
C1B/dor: Bowling Green (1980) (B=Bar, 1:57)
g: Bowling Green (1980)
g sd: Amhrest, USA (1981) (sd=scalloped, 1:51.5)
Hn^r³: Bowling Green (1980)
Hn^r³ ri: Sintetizada para este trabajo (1981) (ri=radius incompletus, 3:47)
kar cu: Pasadena (cu=curled, 3:50.0)
lix: Utah, USA (1980)
lt: Alberta, Canada (1981)
ltd: Bowling Green (1980)
ltd b: Sintetizada para este trabajo (1981) (b=black, 2:48.5)
p: Pasadena (1980)
pd: Pasadena (1980)
pn: Bowling Green (1980)
sc pn: Austin, USA (1981) (sc=scute, 1:0.0)
y pn: Pasadena (1981) (y=yellow, 1:0.0)
po_vg: Pasadena (1981) (vg=vestigial, 2:67)
pr: Pasadena (1980)
b pr: Sintetizada para este trabajo (1981) (b=black, 2:48.5)
pr vg: Sintetizada para este trabajo (1981)

(yg=vestigial, 2:67)

cn pr^{c4}/pr^{meb}: Oak Ridge, USA (1984) (cn=cinnabar, 2:57.5)

cn pr^{c4}/pr^{meb} se: Oak Ridge (1984) (cn=cinnabar, 2:57.5; se=sepia, 3:26)

Pu^e/SM1(Cy): Bowling Green (1980) (SM1: Inversión (2LR) Second Multiple; Cy=Curly 2:6.1)

ras: Davis, USA (1980)

rb: Pasadena (1980)

nd rb: Bowling Green (1981) (nd=notchoid, 1:3.0)

red: Bowling Green (1980)

red ri: Sintetizada para este trabajo (1981) (ri=radius incompletus, 3:47)

red ss: Sintetizada para este trabajo (1981) (ss=spineless, 3:58.5)

rs^e: Pasadena (1980)

h rs^e: Sintetizada para este trabajo (1981) (h=hairy, 3:26.5)

rs^e ri: Sintetizada para este trabajo (1981) (ri= radius incompletus, 3:47)

ry: Pasadena (1981)

se: Requena, España (1980)

se h: Pasadena (1980) (h=hairy, 3:26.5)

b sf: Pasadena (1980) (b=black, 2:48.5)

snb: Pasadena (1980)

st: Bowling Green (1981)

cp st th: Jerusalén, Israel (1981) (cp=clipped, 3:45.3;

th=thread, 3:43.2)

v: Pasadena (1979)

2.3. Síntesis de dobles mutantes

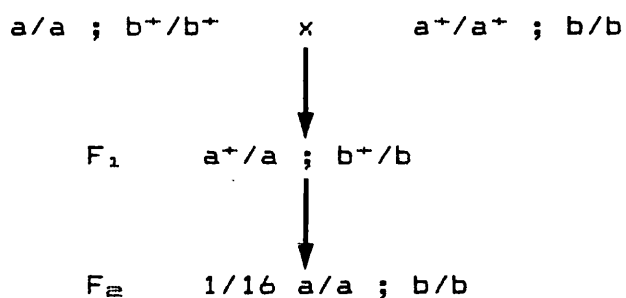
Los dobles mutantes fueron obtenidos a partir del cruce de las cepas de mutantes simples descritas en el apartado anterior. Individuos portadores de las dos mutaciones se obtuvieron en la F2 o F3 del cruce, dependiendo de que se tratara de un cruce entre mutaciones localizadas en el mismo o en distinto cromosoma.

La detección de los individuos dobles mutantes en la descendencia de estos cruces fue realizada de varias formas, dependiendo de que el fenotipo del doble mutante fuera distinto o igual al de los mutantes simples. Los métodos utilizados fueron los siguientes:

A) Mutantes situados en distintos cromosomas

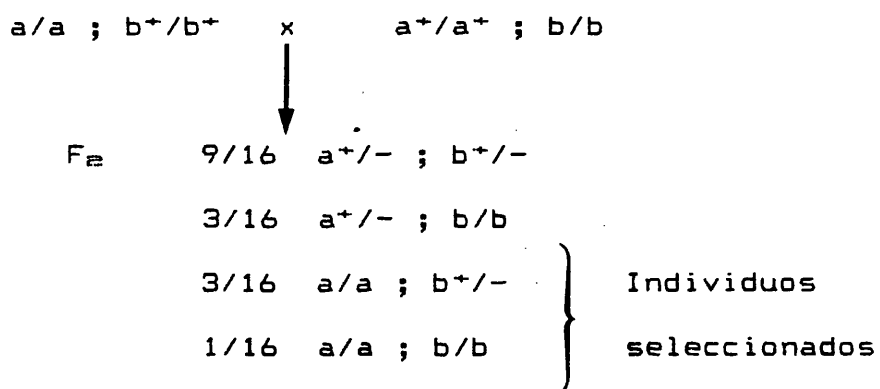
A-1) Fenotipo del doble mutante distinguible visualmente del de los mutantes simples (interacción). El doble mutante podía por tanto separarse fijándose en el fenotipo de color de ojos.

a(mutante simple), b(mutante simple), ab(doble mutante)

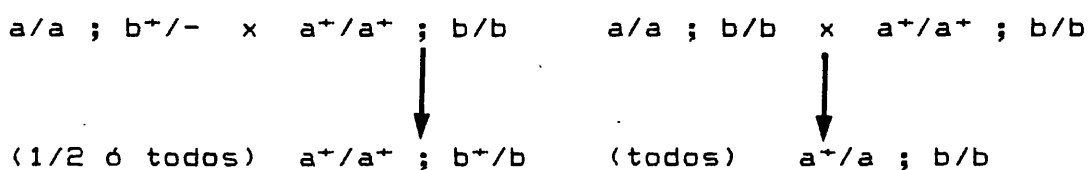


A-2) Fenotipo del doble mutante igual a uno de los mutantes simples (epistasia). Se pueden usar 3 métodos:

A-21) Selección de parejas de fenotipo epistático y pruebas de alelismo de sus descendientes con el mutante hipostático. (a, gen epistático; b, gen hipostático).



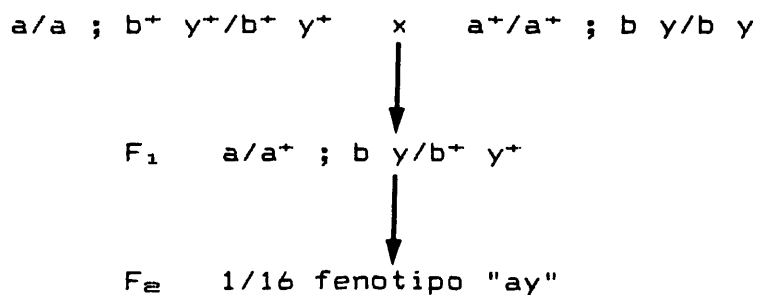
Formación de parejas de fenotipo "a" con los individuos seleccionados y cruzamiento prueba por individuos b/b ; a⁺/a⁺



A-22) Uso de marcadores morfológicos ligados a los mutantes de color de ojos, especialmente al mutante hipostático. (a, gen epistático; b, gen hipostático).

a,b (mutaciones de color de ojos)

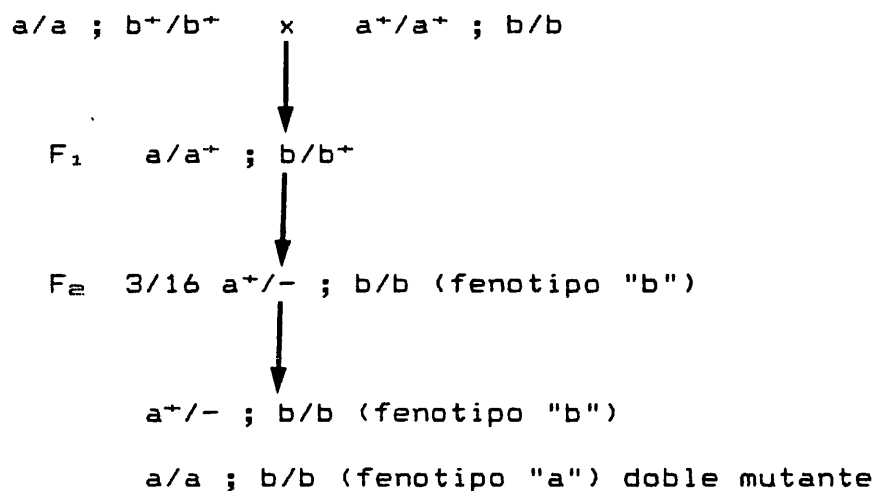
y,z (mutaciones morfológicas, no de color de ojos)



(genotipo probable a/a ; by/by. Frecuencia menor de 1/16, dependiendo de la frecuencia de recombinación entre "b" e "y")

Formación de parejas fenotipo "ay" y cruzamiento prueba de hembras de la F₁ con machos "b".

A-23) Selección de individuos de fenotipo hipostático (machos y hembras vírgenes), obteniendo a partir de su descendencia individuos de fenotipo epistático correspondiente al doble mutante. En este caso se realizaban posteriormente pruebas de alelismo para confirmar el genotipo doble mutante. (a, gen epistático).

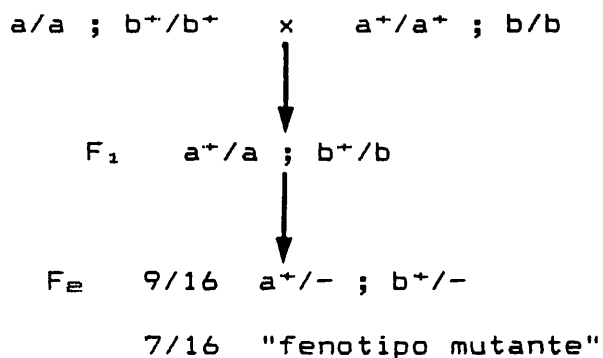


A-3) Fenotipos del doble mutante y de cada uno de los mutantes simples indistinguibles visualmente.

a,b (mutaciones de color de ojos)

Fenotipo "a" = fenotipo "b" = fenotipo "ab"

A-31) Recogida de parejas de individuos mutantes y realización con la descendencia de pruebas de alelismo.



Selección de parejas de fenotipo mutante y retrocruzamiento de los individuos de su descendencia por individuos de las cepas "a" y "b".

A-32) Uso de dos marcadores morfológicos ligados a cada uno de los mutantes a cruzar.

a,b (mutaciones de color de ojos)

y,z (mutaciones morfológicas, no de color de ojos)

a y/a y ; b⁺ z⁺/b⁺ z⁺ x a⁺ y⁺/a⁺ y⁺ ; b z/b z

↓
F₁ a y/a⁺ y⁺ ; b z/b⁺ z⁺

↓
F₂ 1/16 "fenotipo y z"

(fenotipo probable ay/ay bz/bz)

Selección de parejas de fenotipo mutante y retrocruzamiento de los individuos de su descendencia por individuos de las cepas "a" y "b".

B) Mutantes situados en el mismo cromosoma

Se utilizan los mismos métodos que en el apartado A). Hay que resaltar, sin embargo, que los mutantes marcadores son útiles fundamentalmente cuando se encuentran situados entre los dos genes mutantes:

a y b⁺/a y b⁺ x a⁺ y⁺ b/ a⁺ y⁺ b

↓
F₁ a y b⁺/a⁺ y⁺ b

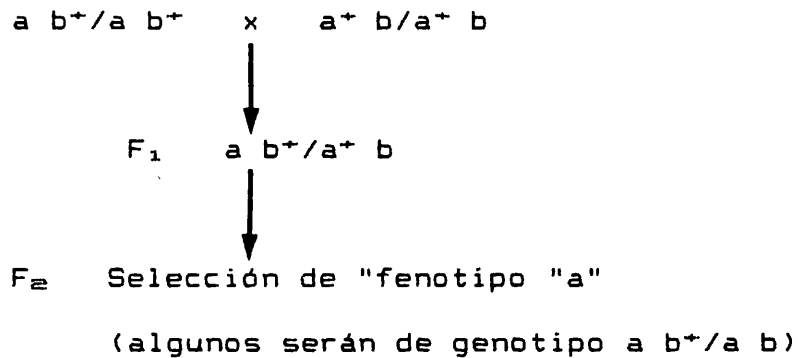
↓
F₂ Selección de individuos fenotipo "a y⁺ b⁺"

(Genotipo probable "a y b⁺/a y⁺ b")

Los individuos de fenotipo a y⁺ llevarán un

cromosoma con los dos genes mutantes de color de ojos "a" y "b", a no ser que haya habido doble recombinación. En su descendencia ya aparecerán individuos dobles mutantes, que bien podrán distinguirse visualmente, si hay interacción, o bien se recurrirá a hacer parejas y posteriormente pruebas de alelismo.

Otro método utilizado era cruzar hembras vírgenes de la F₂, que presentaran una de las mutaciones, por machos de la otra cepa mutante. Los individuos de la descendencia de este cruce que presentaran fenotipo mutante serían portadores de un cromosoma recombinante portador de los 2 genes mutantes; cruzando estos individuos obtendríamos en su descendencia individuos dobles mutantes que dependiendo de su fenotipo podrían ser separados visualmente o detectados por pruebas de alelismo.



$$\begin{array}{c}
 ab^+ / ab^+ \quad \times \quad a^+ b / a^+ b \\
 \downarrow \\
 100\% \text{ fenotipo normal}
 \end{array}$$

$$\begin{array}{c}
 ab^+ / a\ b \quad \times \quad a^+ b / a^+ b \\
 \downarrow \\
 1/2 \text{ fenotipo normal} \\
 1/2 \text{ fenotipo "b" (} ab / a^+ b)
 \end{array}$$

2.4. Experimentos con medio suplementado

Se usaron dos tipos de medios suplementados. El primero lo estaba con 3-hidroxiquinurenina, y se obtuvo diluyendo esta sustancia en un pequeño volumen de agua destilada. Volúmenes de esta solución equivalentes a cantidades de 1 ó 2 mg de 3-hidroxiquinurenina fueron añadidos a tubos que contenían 10 ml de comida recién hecha, removiendo hasta conseguir una distribución uniforme del líquido añadido en la comida. El segundo tipo de medio se obtuvo mezclando directamente en los tubos la cantidad deseada de L-triptófano (0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 gramos) con 10 ml de comida.

2.5. Detección y cuantificación de pteridinas, pigmento marrón y otros metabolitos relacionados

Cromatografía en capa fina

Este método ha sido el más utilizado en las cuantificaciones de las pteridinas. En este método se usaban placas de cromatografía de 20 x 20 cm con una capa de celulosa microcristalina de 0.25 mm de espesor. Tras poner los extractos en los puntos de toque de las placas, se realizaba una cromatografía bidimensional, usando como primer solvente isopropanol/acetato amónico 2% (1:1), y

como segundo solvente cloruro amónico 3%. Las placas se desarrollaban durante 3 horas en el primer solvente, con lo que el frente del solvente alcanzaba el 60% de la longitud de la placa, y 50 minutos en el segundo solvente, con lo que el frente alcanzaba el 90%. Después del desarrollo de cada uno de los solventes las placas se dejaban secar durante toda la noche (Ferré *et al.*, 1983). Todos estos procesos se llevaron a cabo en una cámara oscura en condiciones de luz roja tenue.

El procedimiento utilizado para obtener los extractos consistía en homogeneizar 80 cabezas de mosca, previamente separadas del cuerpo con un escalpelo, y 10 cuerpos de machos en 0.2 ml de metanol/ ácido acético/ agua (4:1:5) (MAA). Los individuos utilizados en la mayoría de los experimentos tenían 9 días de edad. La razón de emplear predominantemente cabezas se debe a que es en este lugar donde se acumulan la mayor parte de pteridinas, mientras que los cuerpos de machos se añaden al existir una pteridina (la isoxantopterina) que apenas se acumula en las cabezas, mientras que se presenta en grandes cantidades en los testículos de los machos. Este homogeneizado era centrifugado a 4000 x G durante 2 min., y del sobrenadante se obtenían muestras de 10 microlitros con las que se realizaban las cromatografías.

Una vez los cromatogramas estaban secos, las sustancias eran cuantificadas en un espectrofluorímetro que llevaba acoplado un accesorio para poder medir

directamente sobre las manchas del cromatograma. La cuantificación se realizaba buscando, en las condiciones de medición de cada sustancia (Tabla 1), el máximo de fluorescencia de la mancha. Esta búsqueda se realizaba al disponer el accesorio de unos mandos que permitían mover la placa en los dos ejes de coordenadas. La única sustancia que no se podía cuantificar por su emisión fluorescente era la 6-acetil-dihidrohomopterinina (ADHP) ya que no presentaba fluorescencia. por eso se recurrió a la medición del área de la mancha sobre el cromatograma como método de detección de la cantidad de sustancia que llevaba cada extracto.

Los resultados de estas cuantificaciones se expresan en forma de valores relativos (porcentajes) respecto a la cepa tipo salvaje (Oregon R). Hemos utilizado esta forma no solo porque es la más sencilla, sino porque para la interpretación de los efectos de las cepas mutantes es suficiente su comparación con los valores que presenta el individuo normal.

De esta forma se realizaron calibrados de las diferentes sustancias con la cepa estándar (Oregon R). Con estos calibrados se comprobó que la relación entre número de cabezas y fluorescencia no era lineal más que para un número muy bajo de cabezas. Estos pequeños intervalos de linealidad presentaban el inconveniente de que el cociente entre la emisión fluorescente de la sustancia y la de la capa de celulosa (blanco) era muy

Tabla 1.- Condiciones usadas para la medición de la fluorescencia de las manchas del cromatograma

Las rendijas de excitación y emisión fueron variadas ligeramente en las últimas mediciones para compensar la pérdida de intensidad de la lámpara de xenon del espectrofluorímetro. (*) la medición se hizo por barrido de la superficie de la mancha.

Sustancia	Long. de onda de excitación (nm)	Long. de onda de emisión (nm)	Rendijas		Ventana accesorio TLC (mm)	Filtro
			Excit. (nm)	Emis. (nm)		
Neodrosopterina	468	568	10	8	5 x 5	--
Drosopterina	468	550	10	5	5 x 5	--
Isodrosopterina						
Aurodrosopterina	468	550	10	10	2 x 2	--
Isoxantopterina	350	408	10	8	5 x 5	--
Sepiapterina	420	512	10	10	5 x 5	43
Dihidrobiopterina	366	438	10	10	5 x 5	39
Pterina						
Biopterina						
Acido xanturénico	354	448	10	10	5 x 5	39
Drosopterina*	468	550	5	5	5 x 5	--
Acetildihidrohomopterina*	469	512	10	20	5 x 5	--

bajo, con lo cual pequeños errores en el grosor de la capa de celulosa podían afectar mucho al resultado obtenido. Además, al desconocer a priori la cantidad de cada sustancia que presentaban los distintos mutantes, resultaba enormemente difícil conseguir hacer un extracto en el que la sustancia a cuantificar cayera dentro de dicho intervalo. Había que tener en cuenta, además, que al ser varias las sustancias que se cuantificaban, resultaba casi imposible obtener cromatogramas a una concentración en la que todas ellas produjeran una emisión fluorescente que fuera lo suficientemente alta para ser medida y que, además, se situara dentro del intervalo de linealidad. Por estas razones, se optó por trabajar en intervalos de la curva de concentración mucho más grandes, aunque en ellos la curva no fuera lineal. Se intentó, en estos casos, que la pendiente de la curva fuera lo suficientemente alta para evitar que pequeños errores en la fluorescencia condujeran a grandes errores en la concentración. Un ejemplo de las curvas obtenidas para cada una de las sustancias cuantificadas puede observarse en las figuras 5 a 10. Los intervalos en los que se trabaja en cada una vienen determinados por flechas.

Un problema adicional que surgía con estas curvas consistía en que los valores obtenidos en la medición de un extracto de la misma concentración disminuían con el tiempo, debido a que la bombilla de xenon del

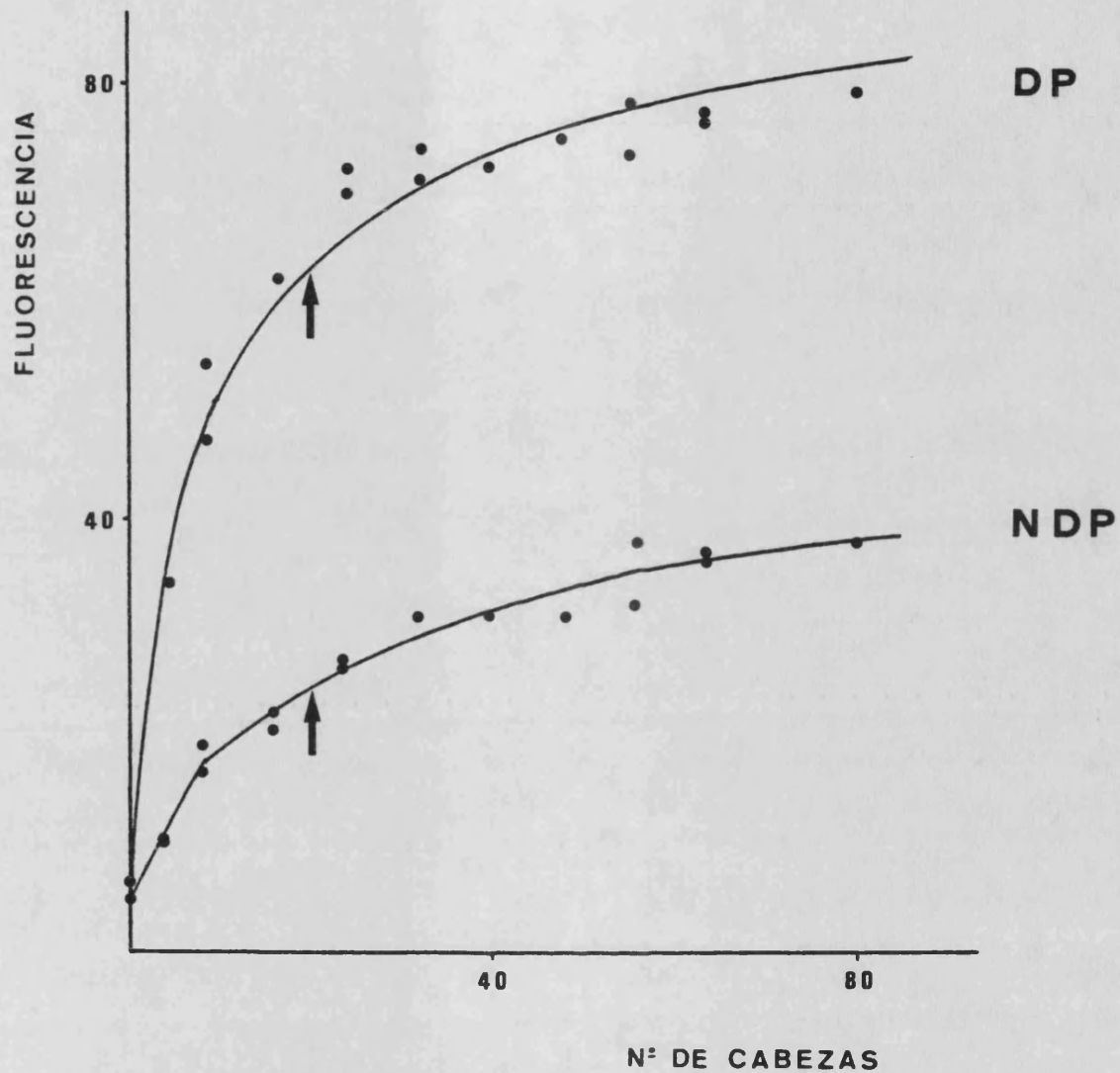


Figura 5.- Curva de concentración de la neodrosoptherina (NDP) y la drosoptherina (DP) realizadas con la cepa Oregon R. Las flechas indican el intervalo de la curva en el que se trabajó.

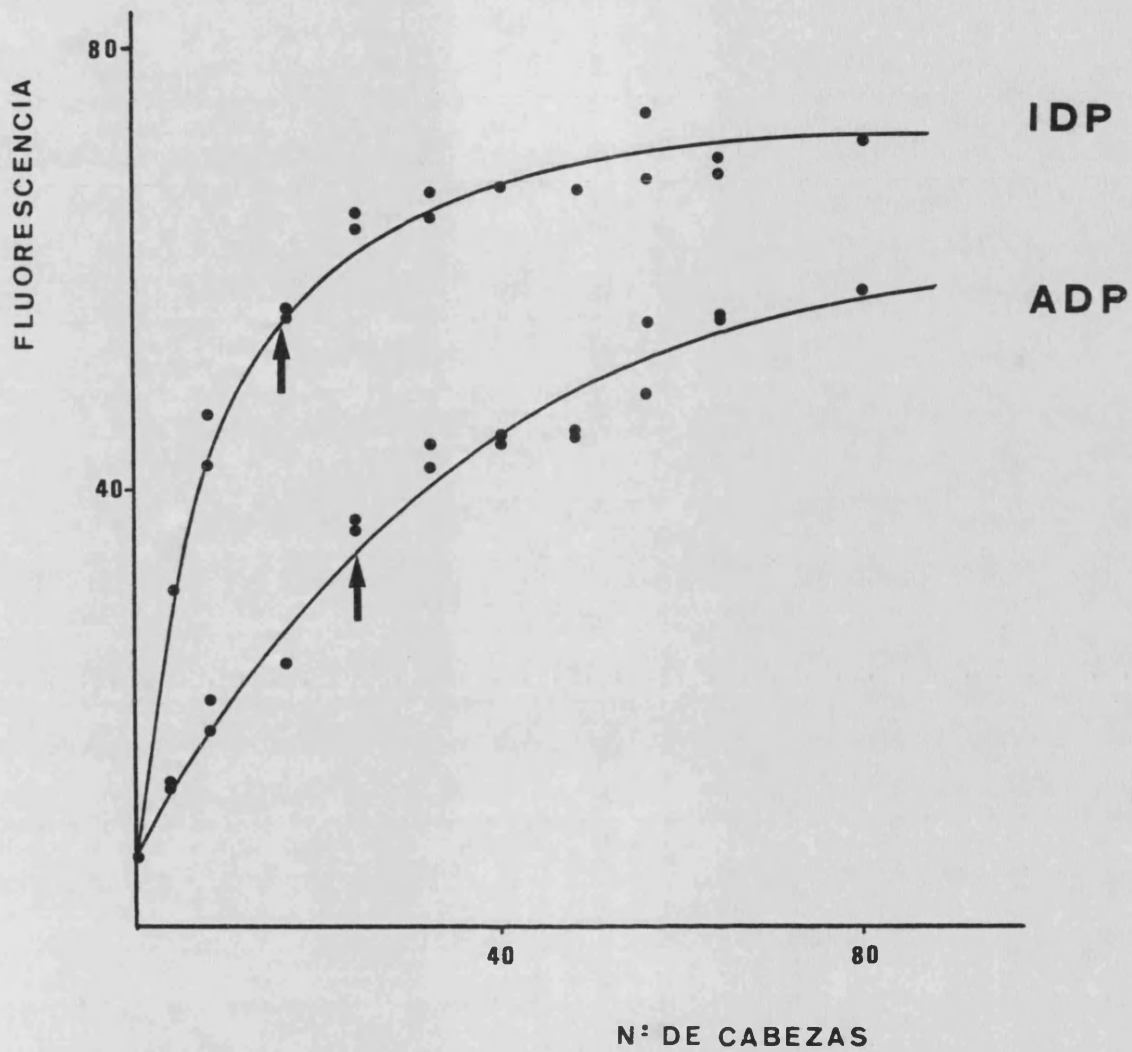


Figura 6.- Curvas de concentración de la isodrosóptera (IDP) y la aurodrosóptera (ADP) realizadas con la cepa Or-R. Las flechas indican el intervalo de la curva en el que se trabajó.

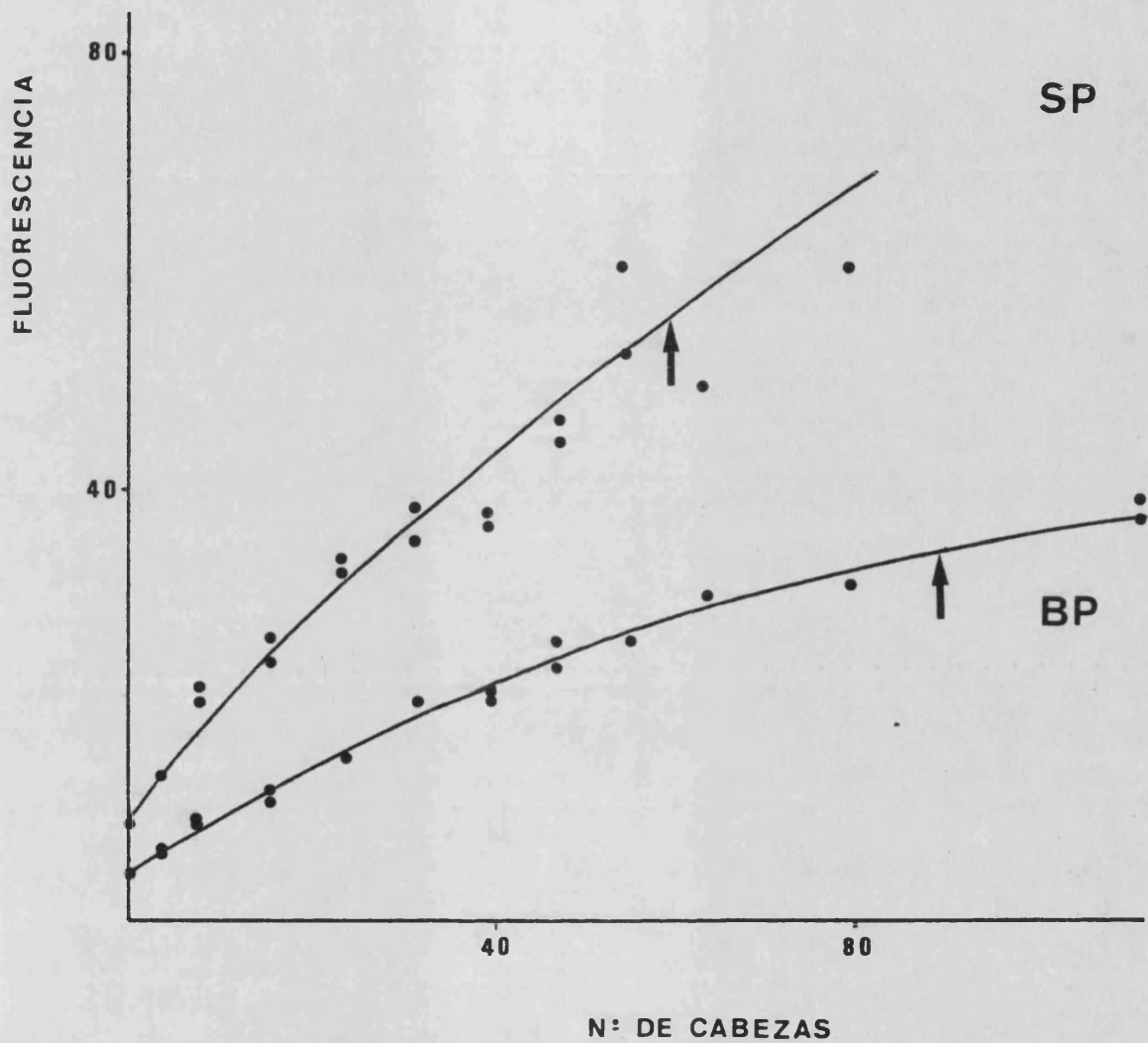


Figura 7.- Curvas de concentración de la sepiapterina (SP) y la biopterina (BP) realizadas en la cepa Oregon R.

Las flechas indican el intervalo de la curva en el que se trabajó.

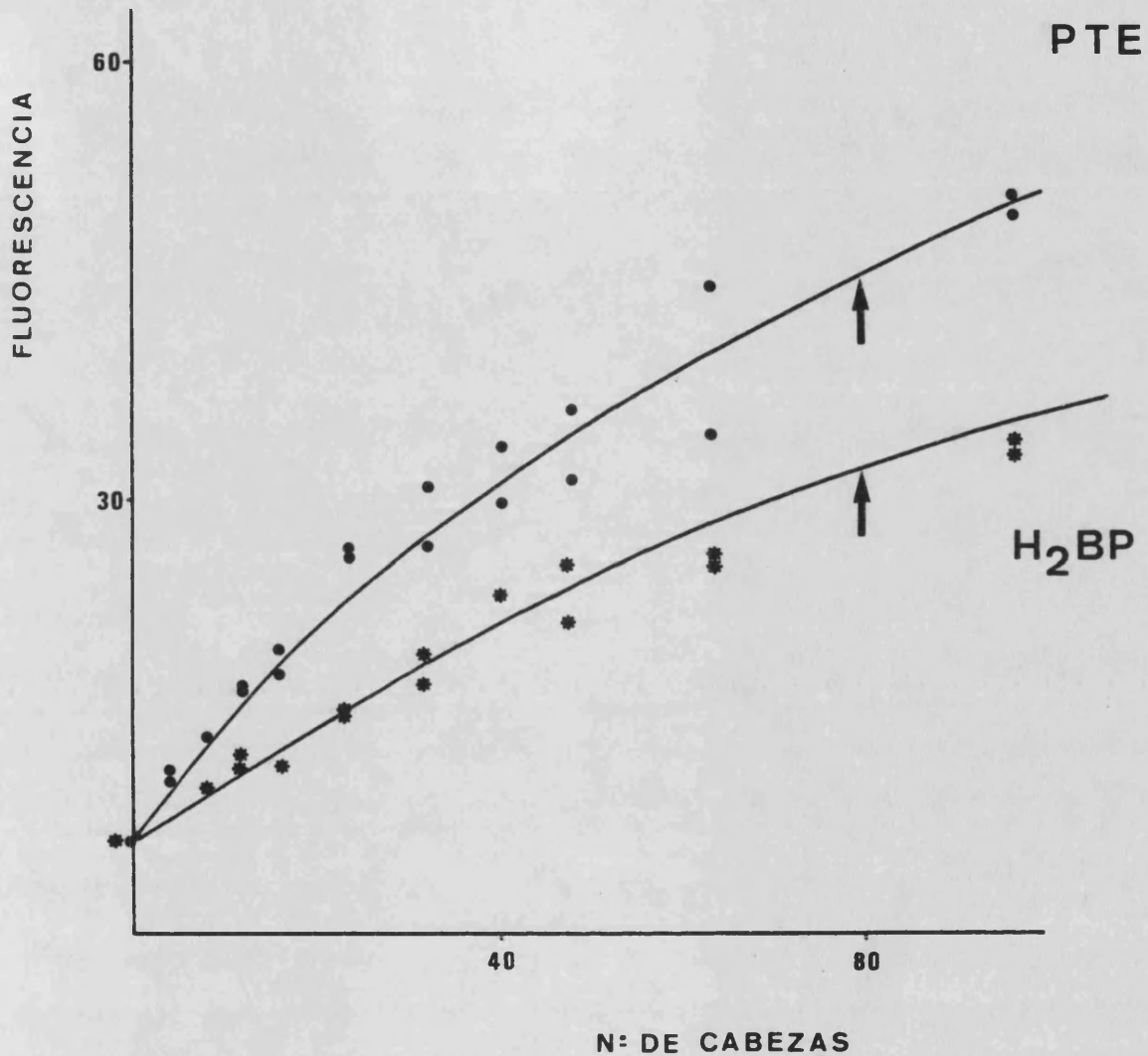


Figura 8.- Curvas de concentración de la pterina (PTE, •) y la dihidrobiopterina (H₂BP, *) realizadas con la cepa Oregon R.

Las flechas indican el intervalo de las curvas en el que se trabajó.

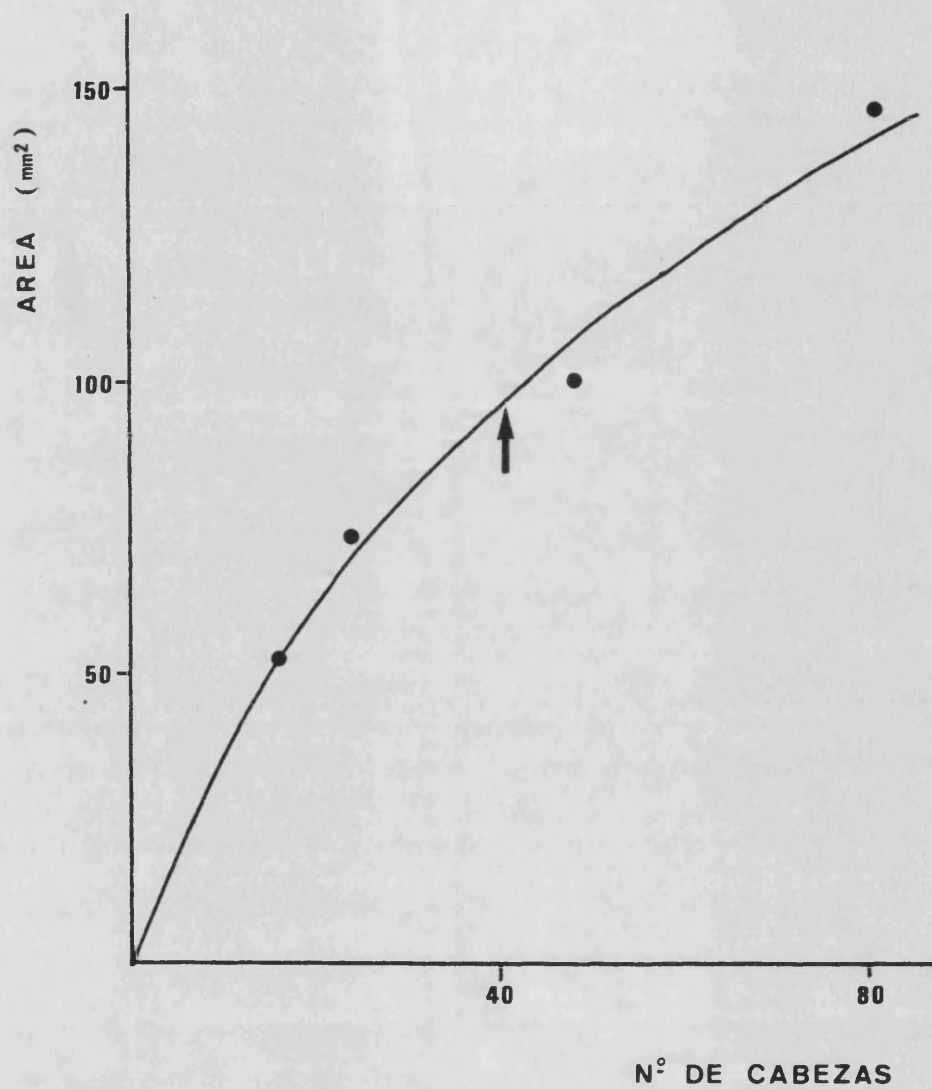


Figura 9.- Curva de concentración de la acetildihidrohomopterinina (ADHP) realizada con la cepa Henna recessive-3.

La flecha indica el intervalo de la curva en el que se trabajó.

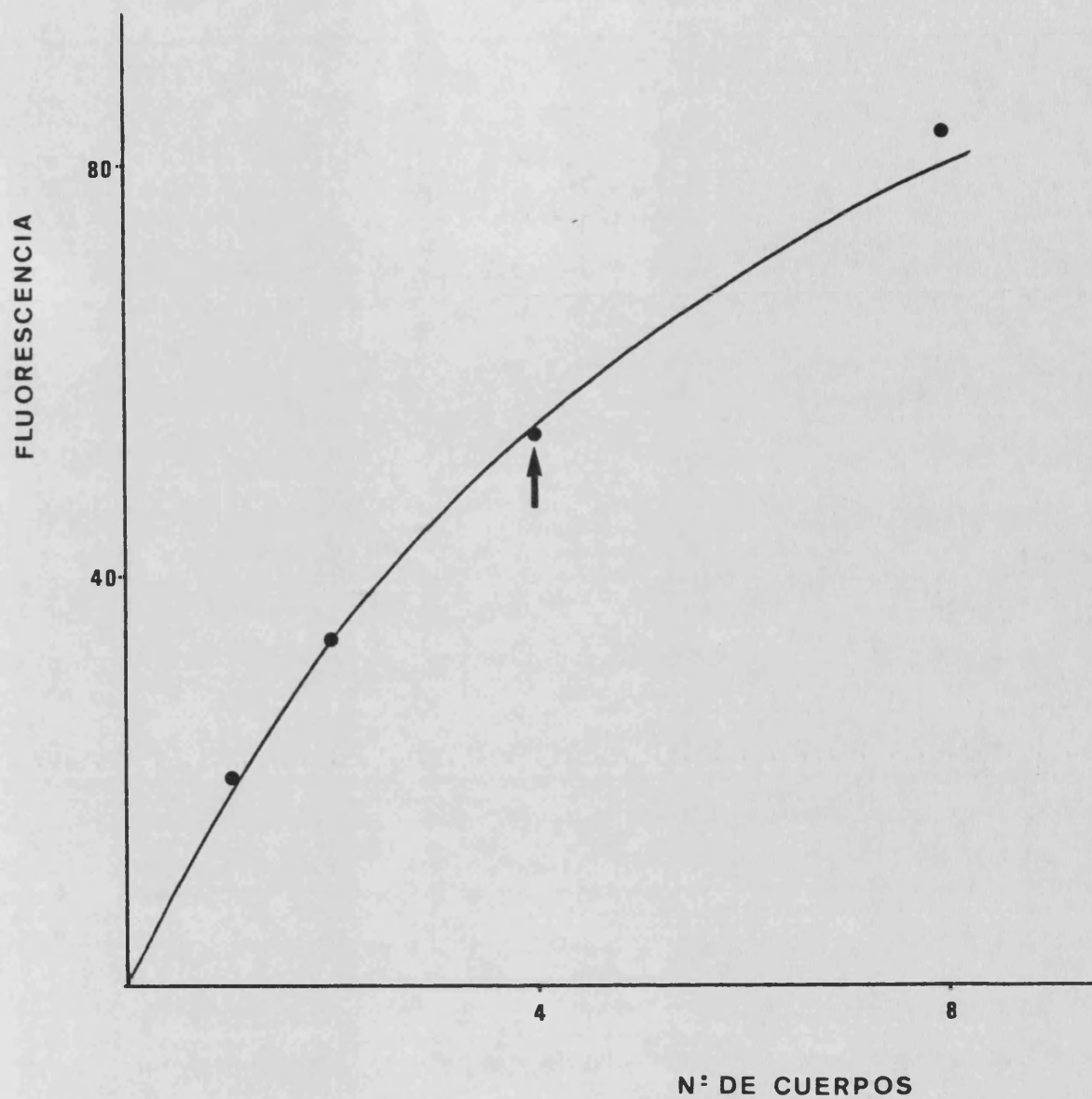


Figura 10.- Curva de concentración de la isoxantopterina (IXP) realizada con extractos de cuerpos de la cepa Or-R. La flecha indica el intervalo de la curva en el que se trabajó.

espectrofluorímetro iba perdiendo intensidad.

Para poder comparar valores obtenidos en un momento concreto con otros medidos varias semanas después, se utilizaron factores de corrección que se basaban en la disminución de la intensidad fluorescente detectada mediante el uso de estándares en las condiciones de medición de las manchas. Estos estándares fueron para sustancias de fluorescencia azulada el tetrafenil butadieno, para sustancias de fluorescencia amarilla el ovaleno, y para sustancias de fluorescencia roja la rodamina B.

En cualquier caso estas correcciones se realizaron dentro de un intervalo de tiempo de 3 meses como máximo. A partir de aquí se volvía a realizar otro calibrado y se comparaban los mutantes cuantificados posteriormente con el nuevo calibrado.

A lo largo del período en que se realizó este trabajo, el método de cuantificación de pteridinas sufrió varios cambios que intentaban, por un lado, aumentar la exactitud de los resultados y, por otro, conseguir métodos más rápidos.

Lo primero que se hizo fue separar en homogeneizados diferentes los cuerpos y las cabezas para evitar, por un lado, que las sustancias presentes en los cuerpos afectaran al desarrollo de los cromatogramas y, por otro, para poder cuantificar con mayor exactitud la isoxantopterina, ya que esta sustancia se situaba en el

cromatograma en un punto cercano al de la sepiapterina. Por esta razón, en aquellos mutantes que presentaban un exceso de sepiapterina, la mancha de isoxantopterina se presentaba distorsionada.

El método utilizado para la cuantificación de isoxantopterina consistió en homogeneizar 10 cuerpos sin cabeza en 0.2 ml de MAA, y posteriormente, tras su centrifugado, se sacaban 10 microlitros del sobrenadante, los cuales eran depositados en la parte inferior derecha del cromatograma. En la parte inferior izquierda del mismo cromatograma se depositaba el extracto de cabezas. Tras desarrollarse la placa en el primer solvente, la isoxantopterina se separaba de las otras pteridinas presentes en baja cantidad en el cuerpo. El cromatograma era luego desarrollado en la segunda dimensión, pero la isoxantopterina ya no se veía afectada por este desarrollo. En la figura 11 puede observarse la disposición final de las manchas en un cromatograma realizado según el método anterior.

Otro de los problemas que se intentó solucionar consistía en que, cuando se medía la fluorescencia de cada mancha en los cromatogramas, el área de las ventanas con las que se trabajaba era siempre inferior al tamaño de la mancha. Así, aunque se buscaba la zona de máxima emisión fluorescente de la mancha, el resto de ella no era medido. Por tanto, las variaciones en el desarrollo de los cromatogramas que producían manchas con mayor o

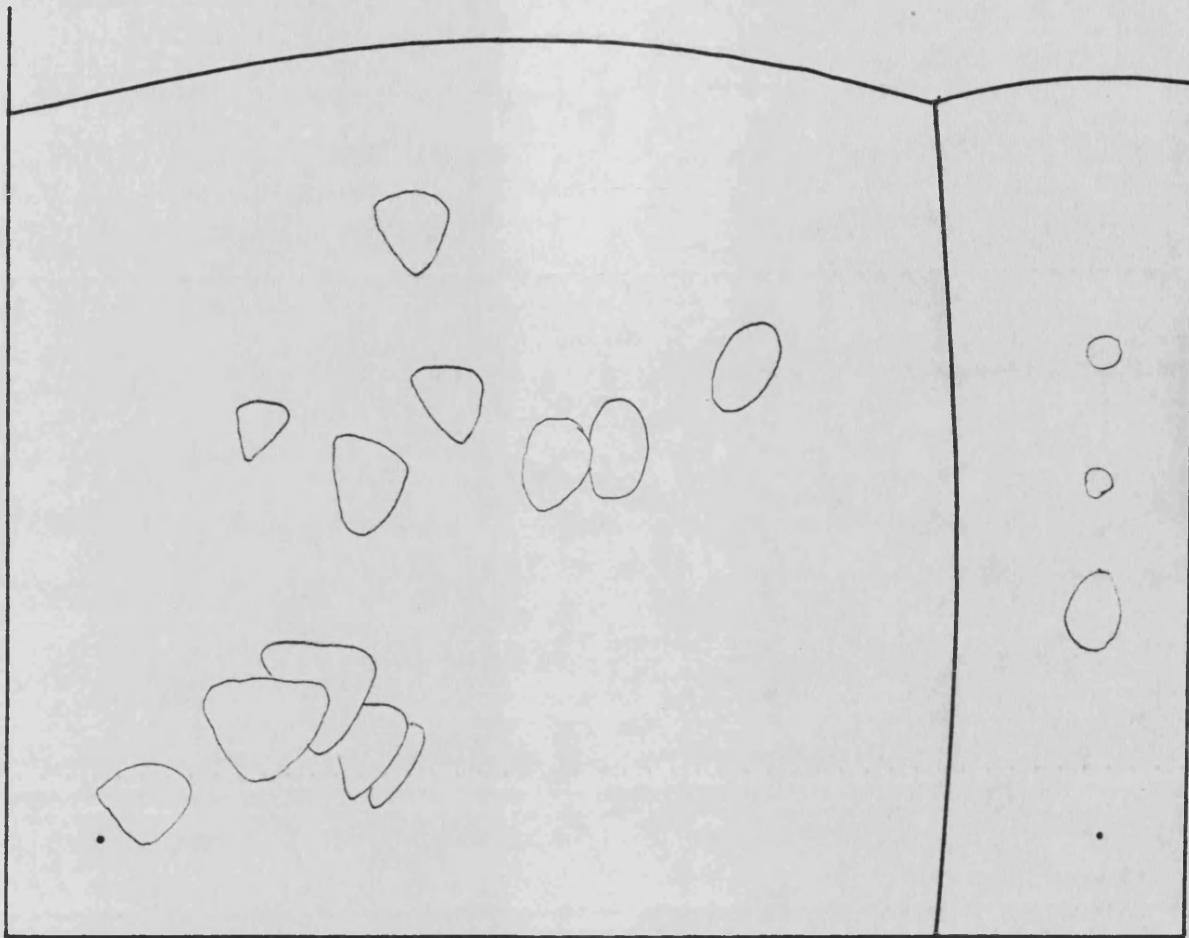


Figura 11.- Disposición final de las manchas en un cromatograma hecho con extractos de cabezas (bidimensional) y cuerpos (unidimensional).

menor extensión, provocaban que manchas con la misma cantidad de sustancia tuvieran distinta emisión fluorescente. Debido a esto, se optó por hacer barridos de la emisión fluorescente de las manchas, combinando así los parámetros de concentración y área de cada mancha. Esto permitía obtener un resultado más exacto. Los barridos obtenidos en el papel de la impresora se recortaban tomando como línea base la emisión de la celulosa en dichas condiciones, calculando a continuación el área comprendida bajo la curva mediante el pesaje de los recortables en una balanza de precisión. A partir de estas áreas se podía calcular la cantidad relativa de cada sustancia frente al individuo tipo salvaje.

Aunque este método permitía una mayor precisión que el anterior, el tiempo necesario para cuantificar un mutante aumentó considerablemente, por lo que se optó por restringir este método solo a aquellas sustancias como la drosóptera y la sepiapterina (ver figura 12) que presentaban una mancha de mayor área. El resto de las manchas se siguieron cuantificando mediante el máximo de emisión fluorescente aunque, a partir de este momento, se calculó en cada placa el blanco (emisión fluorescente de la celulosa) para cada sustancia. Estos blancos se calcularon mediante la medición de la emisión fluorescente, en las mismas condiciones de medición de la mancha, de un punto de la placa donde no existía ninguna sustancia fluorescente. Este blanco era luego restado del

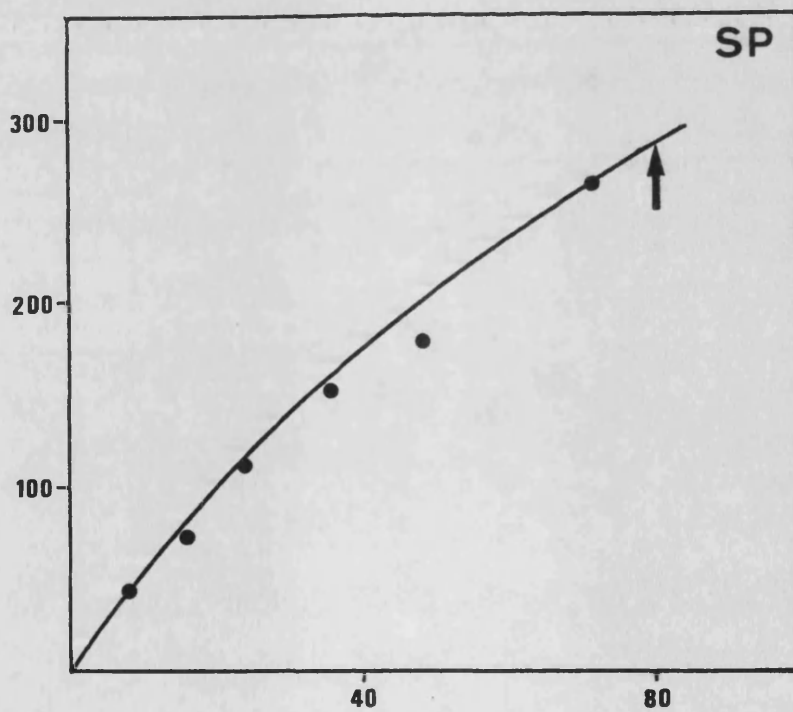
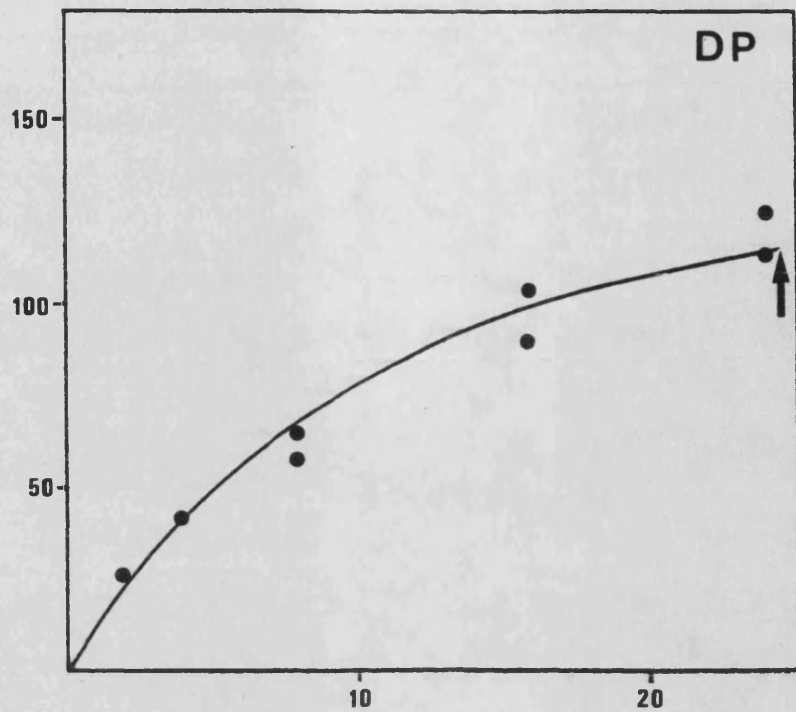


Figura 12.- Curvas de concentración de la drosopterina (DP) y la sepiapterina (SP) obtenidas mediante barrido de fluorescencia de la mancha.

En ordenadas se representa la superficie (mm²) y en abscisas el nº de cabezas del extracto.

valor de cada mancha, con lo que se obtenía un dato que no estaba afectado por las pequeñas variaciones en el grosor de la capa de celulosa, las cuales conllevaban diferencias en la emisión fluorescente.

La 6-acetildihidrohomopterinina (ADHP) es una sustancia que no presenta fluorescencia en los solventes utilizados en nuestro método cromatográfico. Su método de cuantificación consistía en determinar la superficie sobre la que se extendía en la placa. Como ya se ha mencionado en apartados anteriores, la superficie sobre la placa de una mancha puede verse afectada por varios factores. Por dicha razón, intentamos buscar algún método que permitiera cuantificar la sustancia de forma más precisa. Tras probar, sin resultado positivo, si la sustancia presentaba fluorescencia en otros solventes, descubrimos que dejando secar los cromatogramas en la oscuridad durante un tiempo largo, se podía detectar una fluorescencia no muy alta de esta sustancia. La razón de esta fluorescencia no se conoce, pero puede ser debida a una oxidación de la ADHP a una sustancia fluorescente, a la pérdida de agua, o a alguna reacción desconocida que produzca a partir de la ADHP una sustancia fluorescente. Aceptando que las condiciones ambientales que producen esta fluorescencia son similares dentro de un corto intervalo de tiempo, cuantificamos esta sustancia utilizando el método de barrido (que incluye la fluorescencia mas el área de la mancha). Ver figura 13.

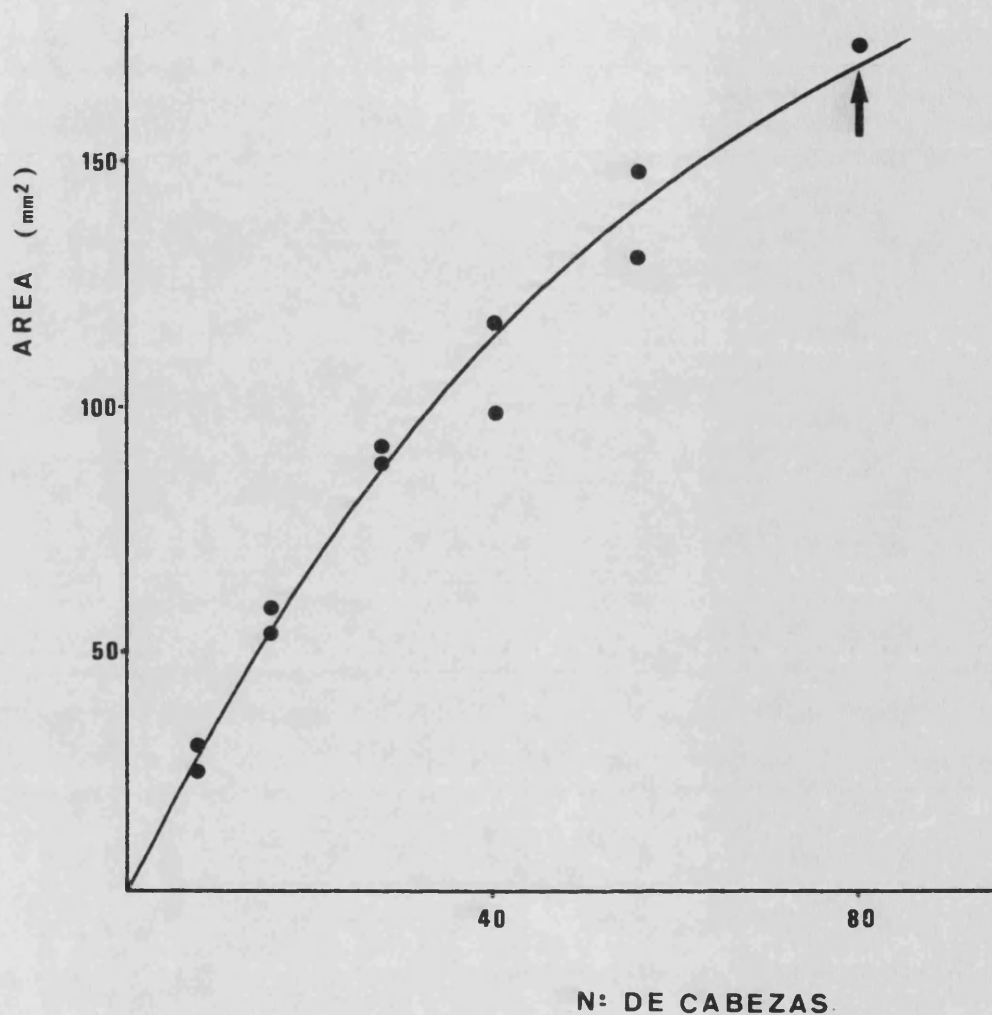


Figura 13.- Curva de concentración de la acetildihidrohomopterinina obtenida mediante barrido de fluorescencia.

Se utilizaron extractos de la cepa Henna recessive-3. La flecha indica el intervalo de la curva en el que se trabajó.

Las condiciones de medición fueron: longitud de onda de excitación 468 nm y de emisión 512 nm. Los cromatogramas que se medían habían estado secándose en la cámara oscura durante 1 semana. Este método fue utilizado únicamente en los casos en los que dentro de un intervalo de tiempo pequeño se cuantificaban tanto las cepas mutantes como la cepa tipo salvaje (Oregon R).

En algunos experimentos en los que no era necesaria la cuantificación de todas las pteridinas, se utilizó la cromatografía unidimensional. En los experimentos de suplementación de la dieta con triptófano, la biopterina fue cuantificada por cromatografía unidimensional en el solvente cloruro amónico al 3% (45 minutos). Este método fue también utilizado cuando se cuantificó la biopterina en extractos de moscas recién nacidas de las cepas cn, red, red y Or-R.

Quantificación de isoxantopterina

En el apartado anterior se describen los métodos de cuantificación conjunta de isoxantopterina y otras pteridinas por cromatografía en capa fina. Posteriormente hemos desarrollado un método que resulta bastante más sensible y preciso para la cuantificación de isoxantopterina. Esta sustancia se acumula mayoritariamente en los testículos de los machos, mientras que la cantidad que se detecta en cabezas es muy

baja. Por otro lado, la cantidad de otras pteridinas presentes en los cuerpos es bastante baja, comparativamente a la de isoxantopterina. Por esta razón, intentamos determinar la cantidad de isoxantopterina directamente en cuerpos de machos sin cabeza. El método consistió en homogeneizar 2 cuerpos de machos en 2 ml de agua destilada. Tras centrifugar los extractos, se midió su fluorescencia en un espectrofluorímetro (longitud de onda de excitación a 350 nm y de emisión a 408 nm; rendijas de emisión y excitación 5 nm).

Para calcular el efecto que sobre el método tenían las otras pteridinas presentes en los cuerpos, se utilizó como testigo el mutante marron-like, al cual no se le ha detectado isoxantopterina. Por otro lado, se utilizaron comparativamente cuerpos de machos y de hembras, pues estas últimas apenas poseen isoxantopterina, pero presentan cantidades similares del resto de las pteridinas. Los resultados obtenidos se observan en la tabla 2. Comparando los valores de machos y hembras de Oregon R se aprecia que el efecto del resto de las pteridinas es como máximo del 3%. Sin embargo, si comparamos los valores de machos y hembras de marron-like con los de Oregon R podemos afirmar con seguridad que el efecto de las otras pteridinas es despreciable (menor del 1%). En la figura 14 puede observarse la linealidad de la curva de concentración.

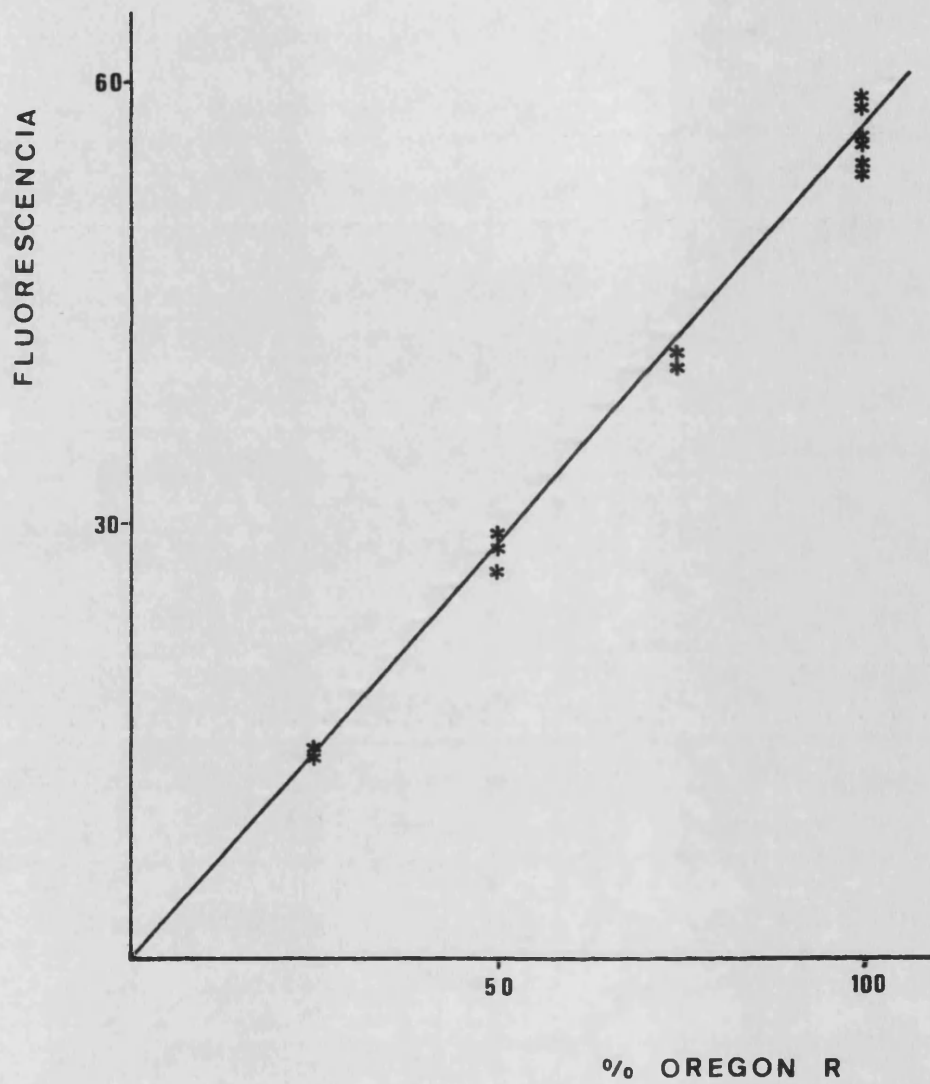


Figura 14.- Curva de concentración de la isoxantopterina obtenida mediante el método de cuantificación en cubeta.

Tabla 2.- Cuantificación de isoxantopterina en cubeta

<u>Cepa</u>	<u>Fluorescencia</u>	<u>%_Oregon_R</u>
Or-R	machos 57.5 ± 2.0	100.0
	hembras 1.8 ± 0.1	3.2
mal	machos 0.6 ± 0.0	1.0
	hembras 0.6 ± 0.0	1.0

Cuantificación del pigmento marrón

En el experimento de cuantificación de la GTP ciclohidrolasa de la cepa cn red, cuya dieta había sido suplementada con 3-hidroxiquinurenina, se cuantificó la cantidad relativa de pigmento marrón como método para detectar cual había sido la asimilación por las moscas de 3-hidroxiquinurenina.

El método utilizado está basado en el de Real et al. (1985), al cual se le introdujo una modificación en el número de moscas utilizado. Se emplearon solamente 10 parejas de moscas para cada cuantificación, haciendo 2 repeticiones por cepa.

Detección de metabolitos de la ruta de síntesis del pigmento marrón por cromatografía en papel

En los experimentos de detección de metabolitos de la biosíntesis del pigmento marrón se utilizó la técnica de cromatografía en papel. El método está basado en Ikemoto (1981).

Pupas (0,1 gramos) de 1-2 días de edad fueron homogeneizadas en 0.3 ml de metanol. Tras centrifugar a 15600 x g (2 minutos), el sobrenadante fue aplicado sobre una hoja de papel Whatman nº 1, desarrollándose posteriormente en el solvente butanol/ácido acético/agua (4:1:1) durante una hora y media. Después de secados, los cromatogramas fueron pulverizados con una solución de 4-nitralina diazodada (tamponada) para fenoles (Merck, 1975). La solución fue obtenida mezclando en frío 5 ml de solución de 4-nitranilina (0.5% en ClH 2N) con 0.5 ml de solución de nitrito de sodio (5% en agua), agregando a continuación 15 ml de solución de acetato de sodio (20% en agua). Tras el secado de los cromatogramas, fueron observados a la luz ultravioleta y a la ambiental.

Otro método empleado fue el de Ehrlich (para aminas) (Merck, 1975). La solución de pulverización se obtuvo mezclando 0.5 gr. de 4-dimetilaminobenzaldehído-ácido acético en 50 ml (12.5 ml de ClH 36% y 37.5 de metanol). Se realizaron cromatogramas unidimensionales con los solventes

n-butanol/ácido acético/agua (4:1:1) y isopropanol/acetato amónico 2% (1:1). Los tiempos de desarrollo fueron de 2 horas y 4 horas con 45 minutos, respectivamente. Se hicieron, a su vez, cromatografías bidimensionales con los solventes mencionados anteriormente. El método empleado consistió en homogeneizar 40 pupas de 1-2 días de edad en 0.2 ml de metanol. Tras la centrifugación del extracto, se recogieron 30 microlitros del sobrenadante y se aplicaron en el papel de cromatografía; luego, los cromatogramas fueron colocados en los solventes y tras su secado, fueron pulverizados con la solución de Ehrlich y dejados secar en una estufa a 35°C durante 15 minutos.

Quantificación de 3-hidroxiquinurenina

El procedimiento usado está basado en el método de Ryall y Howells (1974), el cual es una modificación del método de detección de o-aminofenoles de Inagami (1954).

Pupas de 2 días de edad (0.1 gramos) fueron homogenizadas en 1.2 ml de ácido tricloroacético al 10%; a continuación, los extractos fueron centrifugados a 15600 x g durante 15 minutos. Del sobrenadante se tomaron muestras de 0.4 ml. Una de ellas (a la que se añadió 0.4 ml de agua destilada) sirvió como blanco, mientras a la otra se le añadieron 0.4 ml de 0.1% nitrito sódico. La absorbancia fue medida a 400 nm, cuatro minutos después

de la adición del NaNO_2 . En la figura 15 puede observarse la curva de concentración para Or-R.

Quantificación de drosopterinas

Las drosopterinas se cuantificaron individualmente en cromatografía en capa fina de celulosa, según el método descrito en el apartado de cromatografía en capa fina. Sin embargo, en algunos casos en los que no era necesaria más que la medición conjunta de las drosopterinas, se utilizó el método de Real et al. (1985).

Diez cabezas (5 de machos y 5 de hembras) seccionadas longitudinalmente por la mitad fueron situadas en 1 ml de alcohol etílico acidificado durante 22 horas (bajo condiciones de oscuridad a 25°C). Tras este periodo, la solución fue centrifugada a $15600 \times g$ y la absorbancia medida a 480 nm. Se hicieron 2 ó 3 determinaciones por cepa (ver figura 16).

2.6 Medición de la actividad GTP ciclohidrolasa

Separación del enzima de los compuestos fluorescentes de bajo peso molecular

Para conseguir la separación de las proteínas de

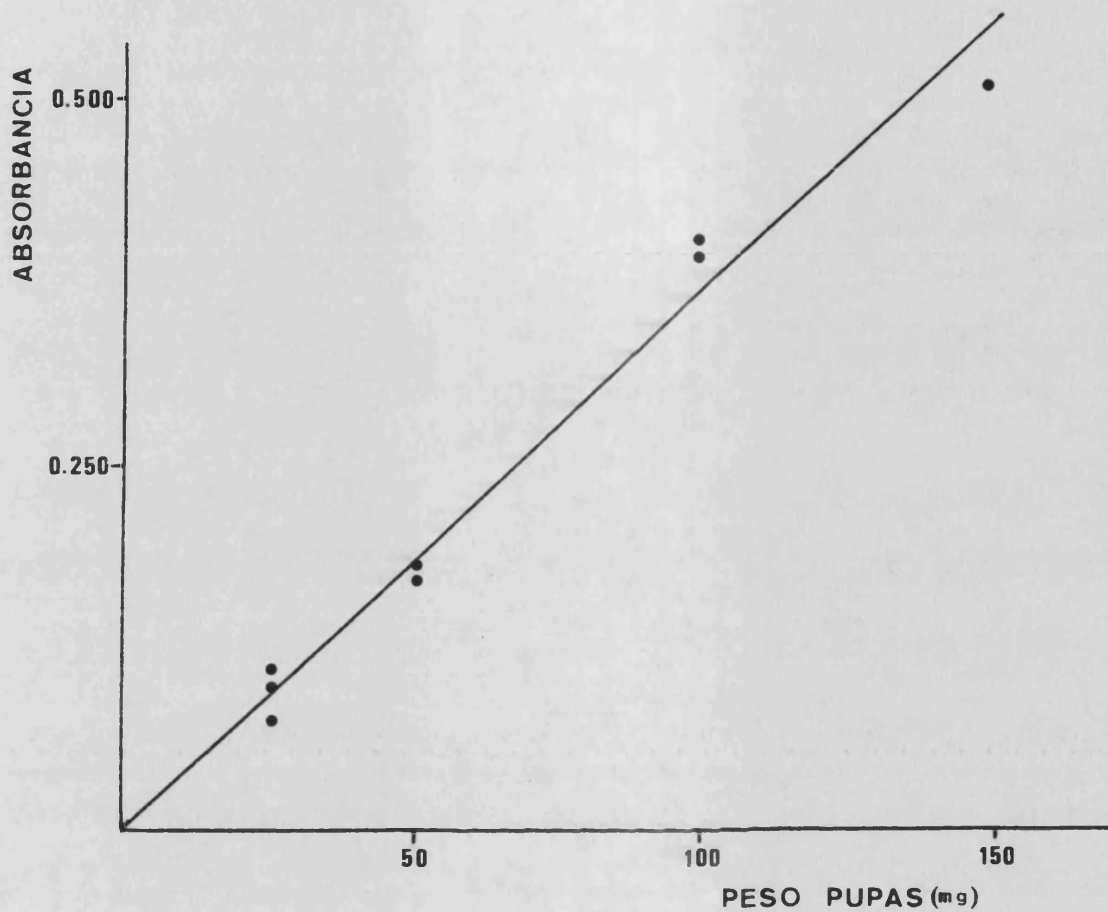


Figura 15.- Cuantificación de 3-hidroxiquinurenina.

Curva de concentración de Oregon R.

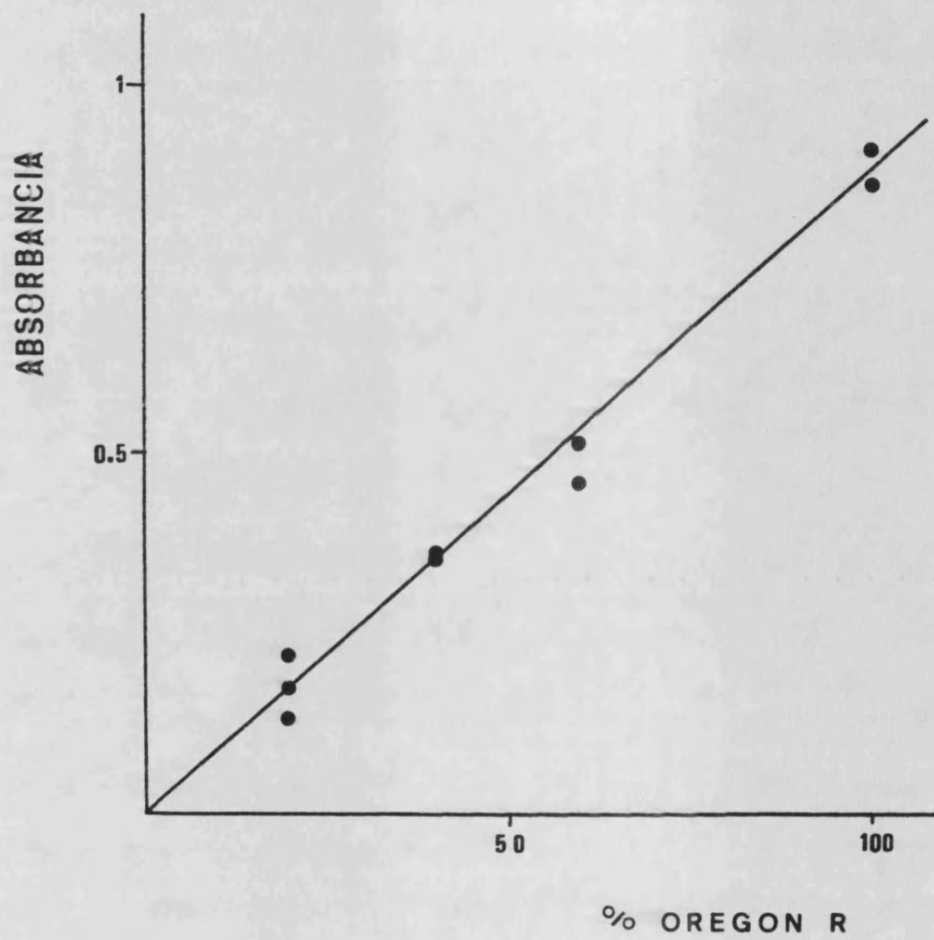


Figura 16.- Curva de concentración de las drosopterinas, medidas según el método de Real et al. (1985).

los compuestos fluorescentes (principalmente pteridinas), se probaron 2 métodos: 1) utilización de carbón activo y 2) separación por cromatografía en Sephadex G-25.

El primer método fue descartado al necesitar una gran cantidad de carbón activo para eliminar toda la fluorescencia de los extractos y no obtener resultados reproducibles. El segundo método se probó con una columna de sephadex de 50 x 3 cm. Con este método las proteínas se separaban fácilmente de los compuestos fluorescentes de bajo peso molecular, pero presentaba el defecto de que la muestra original quedaba muy diluida. Para evitarlo se recurrió al método de Neal y Florini (1973), el cual utiliza pequeñas columnas de sephadex acopladas a tubos de centrífuga. En nuestros ensayos utilizamos columnas de 5.5 x 1 cm de sephadex G-25, las cuales eran colocadas sobre un tubo de centrífuga y, tras poner las muestras sobre la columna, se centrifugaba a bajas revoluciones (1000 x g).

Para comprobar la separación de las proteínas de las pteridinas, se realizó una prueba con albúmina de suero bovina como proteína y sepiapterina y formilpterina como pteridinas. En la figura 17 puede observarse como el 97% de la proteína se recupera tras hacer pasar primero 0.5 ml de la solución de albúmina y añadir, a continuación, 1.5 ml de agua de 0.5 en 0.5 ml. Las pteridinas, por el contrario solo se eluían a partir de los 2.5 ml.

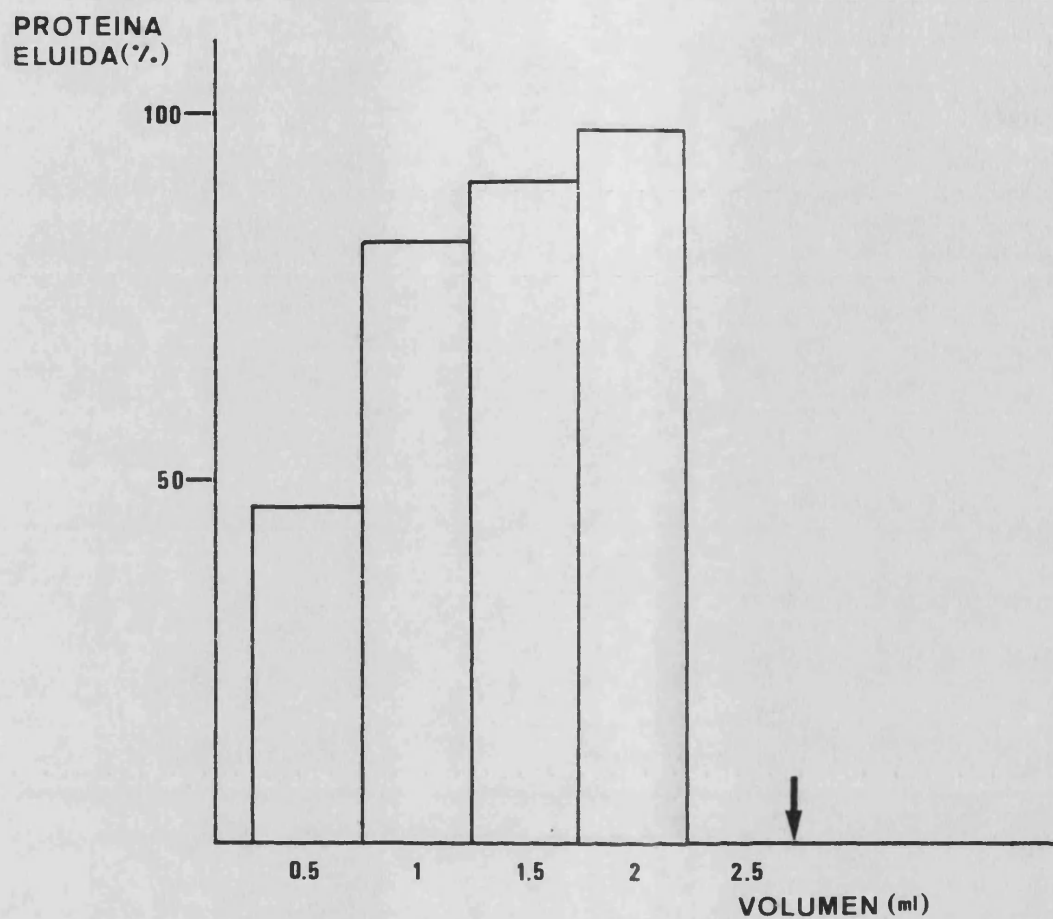


Figura 17.- Separación de pteridinas y albúmina de suero bovino en columnas de Sephadex G-25 según el método de Neal y Florini (1973).

La flecha indica el momento a partir del cual comienzan a eluirse las pteridinas.

Las pruebas que se hicieron con los extractos de proteínas de *Drosophila* demostraban, a su vez, que la separación del enzima GTP ciclohidrolasa era aún más clara que con albúmina, ya que la primera tiene un peso molecular mucho mayor. En este caso alrededor del 75% de la actividad enzimática se obtenía en los primero 0.4 ml, mientras que en los siguientes se recuperaba casi el 25% restante.

Ensayo enzimático

Se recogieron moscas adultas de 0-8 horas desde la emergencia del adulto. Estas moscas fueron congeladas a -20°C y mantenidas así por espacios de tiempo inferiores a dos semanas antes de su uso. Para el ensayo enzimático se emplearon 60 vabezas de mosca (30 de machos y 30 de hembras), las cuales fueron homogeneizadas en 0.6 ml de una solución que contenía 0.1 M Tris ClH (pH=8.5), 10 mM EDTA, 2 mM azida sódica y 0.1 M cloruro sódico. Los extractos fueron centrifugados a $15600 \times g$ durante 2 minutos. Para obtener extractos libres de pteridinas, se utilizó el procedimiento de Neal y Florini (1973). Del sobrenadante se recogió 0.4 ml de extracto crudo, el cual era aplicado a las columnas de sephadex (equilibradas en la misma solución que el homogenizado). Tras centrifugar a $1000 \times g$ durante 2 minutos, se volvía a añadir otros 0.4 ml de la solución y se repetía la centrifugación. De

esta forma, casi el 100% del enzima buscado se recogía en las dos fracciones; éstas eran combinadas y usadas para los ensayos enzimáticos.

Las condiciones para el ensayo enzimático fueron tomadas parcialmente de Fukushima *et al.* (1977) y Fan y Brown (1976). GTP (0.2 ml) fue añadido a la fracción cromatográfica con lo que se obtenía una concentración final de 0.2 mM. A continuación, los tubos de ensayo eran incubados a 42 °C en la oscuridad durante 1 hora. La reacción se detenía mediante la acidificación del medio con 2 ml de ClH 0.1 N. El producto de reacción enzimático (dihidroneopterina trifosfato) que era muy poco fluorescente fue oxidado con 0.1 ml de una solución de iodo (1 gr de iodo y 2 gr de ioduro potásico en 100 ml de agua) durante 15 minutos. De esta forma se obtenía la neopterina trifosfato, compuesto que era mucho más fluorescente que la forma reducida. Para eliminar el exceso de iodo sin reaccionar se añadió 0.05 ml de ácido ascórbico 0.1 M. Por último, la solución fue llevada a pH 8 con 1 ml de Tris 0.4 M.

La actividad de los extractos fue determinada midiendo su fluorescencia en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer MPF-44B. Las condiciones de medición utilizadas fueron: longitud de onda de excitación a 370 nm y de emisión a 454 nm y rendijas de excitación y emisión 10 nm. Una unidad de enzima fue definida como la cantidad de enzima que era capaz de producir 1 nmol de

dihidroneopterina trifosfato en 60 minutos de reacción.

Para determinar el valor fluorescente de 1 nmol del producto oxidado de la neopterina trifosfato se recurrió, al no existir ésta sustancia comercialmente, a la dihidroneopterina fosfato. Esta sustancia tiene un coeficiente de extinción molar muy parecido al de la dihidroneopterina trifosfato.

El proceso seguido consistió en obtener una solución de dihidroneopterina fosfato, de la cual se extrajeron muestras de diferentes concentraciones. Estas muestras fueron sometidas al mismo protocolo (exceptuando la adición de GTP) que se utiliza en los ensayos enzimáticos. La neopterina fosfato, producida tras la oxidación, fue medida en el espectrofluorímetro. Por otro lado, se determinó la absorbancia en muestras de la solución inicial y, partiendo del coeficiente de extinción molar de la dihidroneopterina trifosfato (5.1 mM^{-1}), se calculó la concentración de la solución. Tras esto, se relacionaron los valores de fluorescencia con la cantidad de nanomoles que poseían las muestras, siendo representados en una gráfica (figura 18). Para poder transformar los valores de actividad enzimática, de las diferentes cepas analizadas, en porcentajes sobre la actividad de la cepa tipo salvaje (Oregon R), se realizó una curva de concentración con esta cepa. Se compararon el número de cabezas utilizado en cada extracto con las unidades de actividad enzimática obtenidas en los

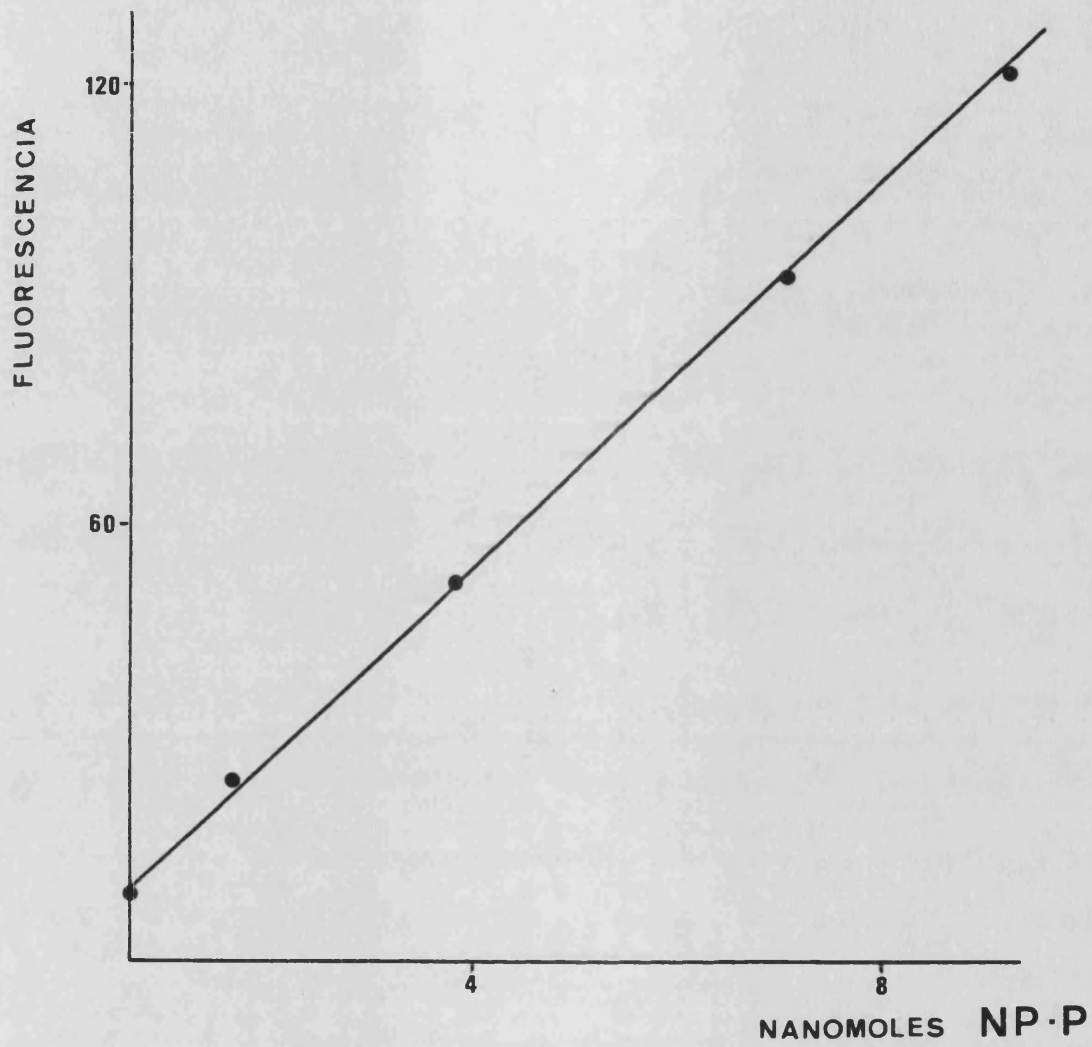


Figura 18.- Curva de concentración de la neopterina fosfato.

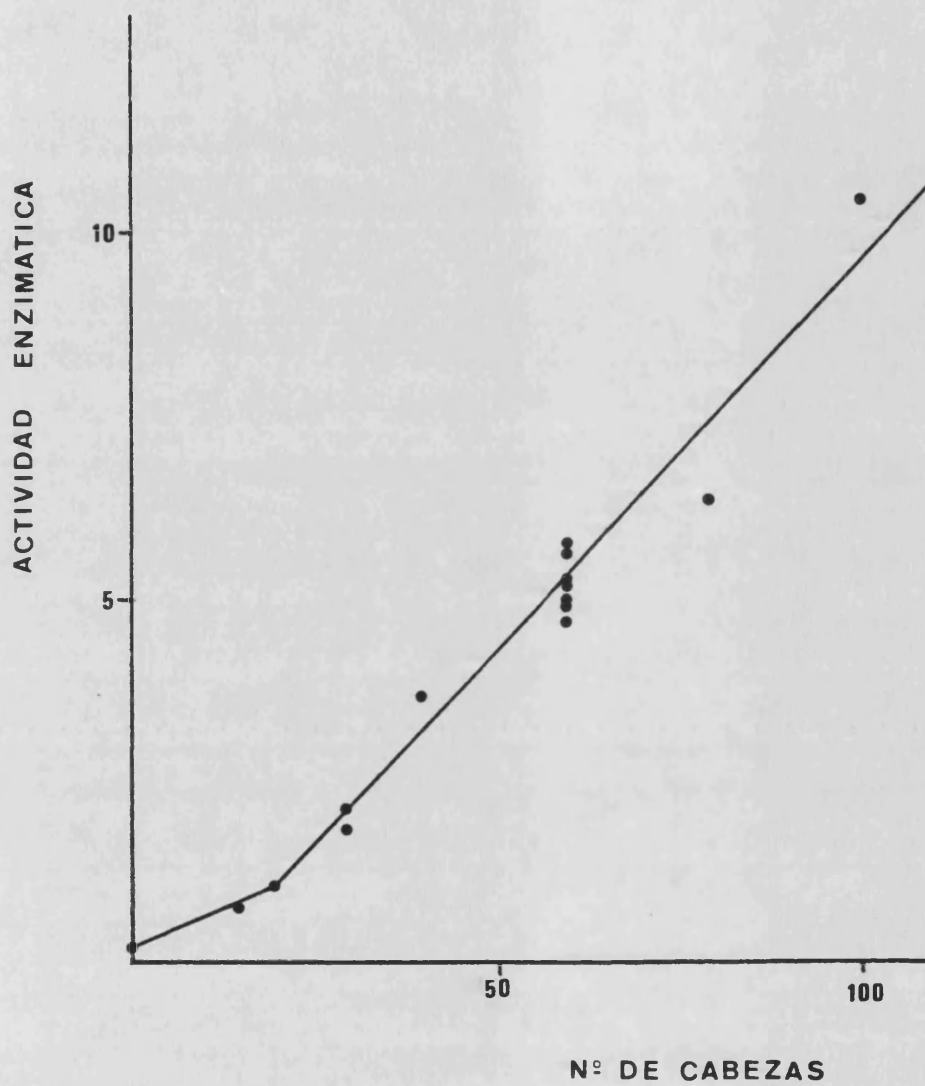


Figura 19.- Curva de concentración de la actividad de la enzima GTP ciclohidrolasa.

ensayos. La gráfica obtenida (figura 19) mostró la existencia de una ligera cooperatividad positiva. Este comportamiento de la enzima ha sido detectado también por Weisberg y O'Donnell (1986) en el tampón Tris, mientras que para el tampón fosfato, la cooperatividad positiva es mucho más alta.

2.7. Ensayo de las actividades enzimáticas biopterina sintasa y dihidropterín oxidasa

El método utilizado está basado en el de Ferré y Jacobson (1985). Doscientas moscas (100 machos y 100 hembras) entre 36 y 48 horas de edad desde la emergencia del adulto, las cuales habían sido mantenidas en el congelador a -20°C fueron homogenizadas en 1.5 ml de tampón fosfato 0.1 M. Los extractos obtenidos fueron centrifugados a $43700 \times g$ durante 30 minutos.

Con el fin de separar las proteínas de los compuestos fluorescentes de bajo peso molecular, alíquotas de 0.4 ml del sobrenadante fueron pasadas por pequeñas columnas de sephadex G-25, tal como se describe en el apartado dedicado al ensayo de la actividad GTP ciclohidrolasa.

Para llevar a cabo el ensayo de la actividad biopterina sintasa se añadió NADPH 2 mM y sepiapterina 0.015 mM en un volumen final de 1.5 ml, mientras que para el ensayo de actividad dihidropterín oxidasa se añadió

únicamente el sustrato de reacción (sepiapterina). Estos extractos fueron incubados en la oscuridad durante 2 horas a 37°C, tras lo cual se hicieron pasar a través de un cartucho de Sep-Pak (Waters). La sepiapterina quedaba retenida en el cartucho siendo, tras un lavado con agua, eluida en 2 ml de metanol.

Los blancos utilizados para ambos ensayos enzimáticos consistieron, por un lado, en incubar los extractos proteicos en las mismas condiciones de reacción pero sin el sustrato, el cual era añadido momentos antes de pasarlo por el cartucho de Sep-Pak y, por otro, en hervir el extracto enzimático e incubarlo posteriormente con el sustrato de la reacción. Ambos blancos dieron valores equivalentes.

Las actividades enzimáticas fueron calculadas en base a los nanomoles de sepiapterina metabolizados durante la reacción. Para cuantificarlos, se midió la fluorescencia de la sepiapterina eluida del cartucho de Sep-Pak en un espectrofluorímetro (longitud de onda de excitación a 420 nm y de emisión a 520 nm, rendijas de excitación y emisión 10nm). La actividad dihidropterín oxidasa fue determinada por la diferencia entre los nanomoles de sepiapterina iniciales y los que quedaban tras los ensayos enzimáticos sin NADPH. La actividad biopterina sintasa fue determinada restando los nanomoles de sepiapterina de los ensayos enzimáticos sin NADPH de la de los ensayos enzimáticos con NADPH.

3. RESULTADOS

33.1. Síntesis de cepas dobles mutantes de color de ojos

Utilizando las cepas de mutantes simples de color de ojos descritas en el apartado de material y métodos, se sintetizaron doscientas treinta y ocho cepas dobles mutantes de color de ojos. Una selección de estas cepas fue utilizada para los estudios cuantitativos del patrón de pteridinas.

A continuación se citan todas las cepas dobles mutantes sintetizadas, indicando el color de ojos observado. Hay que hacer la salvedad de que el color de ojos varía con la edad en la mayor parte de las cepas. Por dicha razón se indica, en muchas cepas, tanto el color de ojos en moscas recién nacidas (rn) como el color que las moscas adultas adquieren con la edad (ad).

Los diferentes tipos de colores observados están compuestos por la mezcla de los colores producidos por tres tipos de pigmentos: la xantomatina, que presenta un color marrón o marrón rojizo, según su estado de oxidación; las dirospterinas, que presentan color rojo; y la sepiapterina y otros pigmentos amarillos, que en moscas jóvenes producen el color amarillo; este tipo de pigmentos con la edad oscurecen el color del ojo. Este cambio puede observarse fácilmente en moscas de la cepa cn₁se, las cuales solo poseen un tipo de pigmentos (amarillos), pero presentan dos tipos de color de ojos, según la edad. Las moscas recién nacidas presentan ojos de color amarillo, pero al cabo de unas pocas horas este color oscurece, hasta convertirse en negro en moscas de

varios días de edad.

Las cepas de dobles mutantes han sido ordenadas de forma que, primero se dan las cepas portadoras de un gen mutante en el segundo cromosoma y otro en el tercero, después las que llevan un gen mutante en el cromosoma X y otro en el segundo cromosoma o en el tercero, y por último las cepas que llevan las dos mutaciones situadas en el mismo cromosoma (primero las del segundo cromosoma, después las del tercero y, por último, las del cromosoma X). Dentro de cada uno de estos grupos se ha seguido el orden alfabético, que para el segundo cromosoma sería: bw, cl, cn, dke, lt, ltd, pd, pe, pr, Pu^m y sf; para el tercer cromosoma: ca, cd, Hn^m, kar, p, red, rs^m, ry, se, snb y st; yy, para el cromosoma X: bo, car, cho, cm, dor, g, lix, pn, ras, rb y v.

Algunas de las cepas son portadoras, junto a los dos genes mutantes de color de ojos, de mutaciones morfológicas que fueron utilizadas para facilitar su síntesis. Las abreviaturas de estas mutaciones aparecen entre paréntesis inmediatamente después de las de color de ojos.

En una parte de estas cepas se ha determinado el patrón de pteridinas. Para la localización más sencilla de estos patrones, al final de la descripción del color de ojos de cada cepa, se cita la tabla y el número de la cepa, dentro de la tabla, en el que se puede localizar.

Cepas portadoras de un gen mutante en el segundo cromosoma
y otro en el tercero

bw ca --- amarillento parduzco, más claro que bw (rn).

Tabla 10, nº 1.

bw cd --- blanco ligeramente sucio (rn). Se oscurece algo,

hasta marrón muy claro (ad). Tabla 10, nº 12.

bw Hn^r --- epistático bw.

bw kar (cu) --- marrón claro (rn).

bw p --- amarillento parduzco (rn).

bw red (ri) --- marrón amarillento, con una zona incolora.

Tabla 10, nº 6.

bw rs² --- amarillento parduzco (rn). Marrón más anaranjado

(ad).

bw ry --- epistático bw.

bw se --- epistático bw.

bw snb --- amarillento claro sucio (rn). Oscurece con la

edad a naranja parduzco, nunca oscuro (ad).

bw st --- blanco.

cl ca --- epistático ca. Tabla 7, nº 11.

cl cd --- naranja tipo ca (rn). Oscurece a tonalidades muy
oscuras (ad).

cl Hn^r (ri) --- algo menos oscuro que se. Tabla 7, nº 7.

cl kar (cu) --- granate con ocelos blancos (rn). Epistático

cl con ocelos blancos (ad).

cl p --- epistático p. Tabla 7, nº 12.

cl red (ri) --- oscuro tipo red. Tabla 7, nº 8 y tabla 11,

nº 2.

cl rs² --- epistático rs². Tabla 6, nº 26.

cl se (h, ed, dp²) --- epistático se. Tabla 7, nº 6.

cl snb --- epistático snb.

cl st --- naranja (rn). Oscurece a tipo cl (ad).

cn ca --- naranja claro (rn).

cn Hn² --- naranja sucio (rn). Oscurece con la edad, sin llegar a se (ad). Tabla 8, nº 8.

cn p --- naranja muy claro (rn). Oscurece con la edad al aumentar el pigmento rojo y algo de pigmento marrón (ad). Tabla 8, nº 17.

cn red --- rojizo como cn, pero con menor porcentaje de pigmento rojo. Tabla 11, nº 4.

cn rs² --- naranja, con mayor porcentaje de rojo que de amarillo. Tabla 6, nº 15.

cn ry --- naranja claro. Tabla 8, nº 1.

cn se --- marrón amarillento (rn). Epistático se (ad). Tabla 8, nº 11.

cn snb --- naranja traslúcido (rn). Se enrojece un poco (ad).

dke ca (c) --- algo más oscuro que ca (rn). Oscurece (ad). Tabla 9, nº 15.

dke cd (c) --- naranja tipo ca, sucio (rn). Oscurece bastante (ad). Tabla 9, nº 16.

dke Hn² (c, ri) --- epistático Hn². Tabla 9, nº 3.

dke kar (c, cu) --- rojizo anaranjado (rn). Oscurece (ad).

dke p (c) --- algo más parduzco que p (rn). Oscurece (ad).

Tabla 9, nº 17.

dke red (c, ri) --- epistático red. Tabla 11, nº 6.

dke rs² (c) --- granate más oscuro que rs² (rn). Oscurece (ad). Tabla 9, nº 17.

dke se (c) --- epistático se. Tabla 9, nº 21.

dke snb (c) --- algo más rojizo y pardo que snb (rn). Oscurece (ad).

dke st (c) --- rojizo con mancha ocular.

lt cd --- naranja amarillento.

lt kar (cu) --- epistático lt.

lt red --- marrón amarillento claro.

lt se --- marrón claro o beige. Tabla 8, nº 10.

lt st --- más anaranjado que lt.

ltd ca --- naranja claro brillante con zona incolora. Tabla 6, nº 22.

ltd cd (tx, b) --- epistático ltd o cd. Tabla 9, nº 6.

ltd Hn² --- naranja acaramelado, algo parduzco (rn). Oscurece casi hasta Hn² con zona incolora (ad). Tabla 6, nº 19.

ltd kar (cu) --- naranja algo sucio (rn). Granate con cierto brillo (ad).

ltd p --- naranja claro con zona incolora (rn). Oscurece a marrón brillante con zona incolora (ad). Tabla 6, nº 7.

ltd red --- naranja con ligera zona incolora, mayor proporción de rojo que de amarillo (rn). Rojizo oscuro (ad). Tabla 6, nº 24 y tabla 11, nº 7.

ltd rs² --- naranja claro (rn). Marrón muy claro, con algo

de naranja y zona incolora (ad). Tabla 6, nº 3.

ltd ry --- naranja claro amarillento.

ltd se --- amarillento sucio (rn). Oscurece a se (ad).

ltd smb --- naranja claro brillante con zona incolora (rn).
Marrón brillante con zona incolora (ad).

ltd stt --- más anaranjado que st, pero difícil de
distinguir. Tabla 6, nº 13.

pd ca --- epistático ca.

pd cd --- naranja (rn). Oscurece (ad).

pd kar (cu) --- naranja rojizo sucio (rn). Oscurece (ad).

pd p --- epistático p.

pd rs² --- epistático rs².

pd snb --- epistático snb, tal vez algo más anaranjado.

pd st --- naranja algo más oscuro que pr_{st}.

po st (vg) --- epistático st.

pr ca --- naranja muy difuminado, cercano a ca (rn). Tabla
8, nº 21.

pr cd --- naranja traslúcido (rn). Naranja rojizo (ad).
Tabla 9, nº 18.

pr Hn² (b, ri) --- granate. Tabla 8, nº 6.

pr kar (cu) --- naranja tipo ca. Tabla 9, nº 19.

pr p (b) --- epistático p. Tabla 8, nº 22.

pr red (b) --- epistático red. Tabla 11, nº 9.

pr rs² (b, h) --- casi epistático rs², aunque algo más
oscuro y rojizo.

pr snb (b) --- epistático snb.

pr st --- naranja claro.

Pu² cd (Cy, e) --- naranja claro.
 Pu² kar (Cy, cu) --- naranja rojizo.
 Pu² rs² (Cy, h) --- epistático rs².
 Pu² se (Cy, h) --- más claro que se, parduzco oscuro. Tabla
 8, nº 9.
 Pu² st (Cy) --- naranja claro. Tabla 9, nº 7.
 sf ca (b) --- epistático ca.
 sf cd (b) --- calabaza (rn).
 sf kar (b, cu) --- naranja sucio.
 sf p (b) --- epistático p. Tabla 8, nº 19.
 sf rs² (b) --- epistático rs², ligeramente más oscuro.
 sf snb (b) --- epistático snb.
 sf red (b, ss) --- epistático sf.
 sf se (b, h) --- más oscuro que sf.
 sf st (b) --- naranja amarillento. Tabla 8, nº 20.

Cepas portadoras de un gen mutante en el cromosoma X y otro
en el 2^o o el 3^o cromosoma

bo se --- epistático se.
 car bw --- marrón claro amarillento (rn). Rojizo parduzco
 tipo ca (ad).
 car cm --- naranja claro (rn). Rojo algo oscuro (ad). Tabla
 9,, nº 8.
 car dkce (c) --- algo más oscuro que car (rn). Oscurece
 mucho, pero manteniendo siempre un claro componente
 rojizo (ad). Tabla 8, nº 14.

car ltd --- naranja claro con zona incoloraa (rn). Naranja algo más parduzco con zona incolora ((ad). Tabla 6, nº 4.

car ca --- naranja claro parduzco (rn). Rojjo oscuro (ad).

car cd --- naranja claro (rn). Rojo. Rojjo oscuro tipo cl (ad).

car kar (cu) --- naranja parduzco (rn). Rojjo oscuro (ad).

car p --- naranja claro parduzco (rn). Oscurece manteniendo el brillo y un alto porcentaje de rojo (ad).

car rs² --- naranja parduzco (rn). Rojo oscuro (ad).

car snb --- naranja claro parduzco (rn). Roojo oscuro (ad).

cho bw (sc) --- epistático cho. Tabla 10, nº 7.

cho cl (sc, ed, dp²) --- muy oscuro, algo más claro que se. Tabla 7, nº 9.

cho cn (sc) --- naranja claro (rn). Naranjaa rojizo (ad).

cho dke (sc, c) --- oscuro, mucho más claro que cho. Tabla 9, nº 9.

cho lt (sc) --- naranja sucio.

cho ltd (sc) --- naranja claro con zona inccolora.

cho pd (sc) --- pardo oscuro con baja proporción de naranja (rn). Oscurece a granate oscuro parduzcco (ad).

cho pr (sc, b) --- marrón oscuro (rn). Oscurece (ad).

cho Pu² (Cy, sc) --- epistático cho.

cho sf (sc, b) --- epistático cho (individuos viables pero estériles).

cho cd (sc) --- más claro que cho (rn). (Oscurece a cho (ad).

cho Hn² (sc, ri) --- marrón oscuro tipo cho.

cho kar ((sc, cu) --- calabaza sucio o marrón (rn). Oscurece (ad)..

cho p (ssc) --- más anaranjado que p (rn). Oscurece a granaate (ad).

cho red ((sc, ri) --- oscuros tipo cho o red. Tabla 11, nº 5.

cho rs² ((sc) --- marrón claro.

cho snb ((sc) --- algo más parduzco que snb.

cho st (ssc) --- naranja amarillento.

cm bw --- pardo amarillento claro (rn). Naranja parduzco claro (ad).

cm cl --- rojizo algo oscuro. Tabla 7, nº 10.

cm cn --- naranja claro (rn). Rojo algo oscuro (ad). Tabla 8, nº 16.

cm dke (c) --- más anaranjado que cm (rn). Oscurece a granaate (ad). Tabla 8, nº 15.

cm lt --- naranja más claro que lt.

cm ltd --- naranja muy claro, con zona incolora (rn). Naranja claro parduzco (ad).

cm pr --- naranja, menos rojizo que cm (rn). Rojizo. Rojo oscuro (ad).

cm Pu² (Cy) --- epistático cm.

cm sf (b) --- epistático cm (rn).

cm ca --- naranja parduzco (rn). Oscurece algo (ad).

cm cd --- naranja rojizo claro (rn). Rojo algo oscuro (ad).

cm p --- naranja claro parduzco.

cm reed --- epistático cm. Tabla 11, nº 3.
 cm rs³ --- naranja parduzco.
 cm ry' --- naranja parduzco.
 cm se' --- casi epistático se.
 cm sn**tb** --- naranja claro parduzco (rn). Oscurece algo (ad).
 dor bw --- blanco con ligero tinte marrón.
 dor c**cd** --- amarillo limón.
 dor cm --- amarillo limón.
 dor ka**r** (cu) --- amarillento menos claro que dor_cn.
 dor l**td** --- blanco ligeramente sucio.
 g bw --- marrón amarillento claro (más amarillento y claro
 que bw).
 g cl ("sd,, dp², ed) --- epistático cl. Tabla 6, nº 18 y
 tabla 7, nº 13.
 g cn --- naranja claro (rn). Naranja rojizo (ad). Tabla 6,
 nº 14.
 g dke (c) --- más anaranjado que g (rn). Rojizo. Rojizo
 oscuro (ad). Tabla 6, nº 10.
 g lt --- algo más claro que lt. Tabla 6, nº 5.
 g l**td** --- blanco. Tabla 6, nº 1.
 g pr --- más anaranjado que g.
 g Pu² (Cyy) --- casi epistático Pu².
 g sf (b) --- epistático g.
 g ca --- naranja claro parduzco.
 g cd --- naranja claro (rn). Rojizo (ad).
 g Hn² --- naranja parduzco claro (ad). Oscurece (ad).
 g kar (cu). naranja parduzco (rn). Parduzco rojizo (ad).

g p ---- naranja parduzco.

g rs²² --- naranja parduzco (rn). Oscurece algo (ad). Tabla 6,, nº 6.

g se (h) --- naranja parduzco(rn). Oscurece (ad).

g snb) --- naranja parduzco.

g st ---- naranja claro amarillento. Tabla 6, nº 9.

pn bw) --- epistático bw.

pn cl (y, ed, dp²²) --- rojizo algo oscuro (rn). Oscurece (ad). Tabla 7, nº 4.

pn cn --- naranja traslúcido (rn). Naranja con alta proporción de rojo (ad). Tabla 9, nº 12.

pn dk²² (y, c) --- oscuros tipo pn. Tabla 9, nº 2.

pn lt²² --- naranja claro con una gran zona incolora. Tabla 6,, nº 16.

pn pr (y, vg) --- rojizo oscuro. Tabla 9, nº 4.

pn po (y, vg) --- rojizo bastante claros (rn). Oscurece (ad).

pn ca --- más brillante que ca y con zona incolora (rn).

pn cd --- naranja claro parduzco (rn). Naranja rojizo (ad).

pn Hn²² (y, ri) --- epistático pn. Tabla 8, nº 2.

pn kar (cu) --- naranja algo sucio (más claro cuando es recién nacido).

pn p --- naranja tirando a pn.

pn red (y, ss) --- marrón claro, con poca cantidad de amarillo y algo de rojo. Tabla 11, nº 8.

pn rs²² (y, h) --- rojizo brillante.

pn se (sc, h) --- algo más claro que se. Tabla 8, nº 4.

pn snb --- menos claro que pn_{ca}.

pn st --- naranja claro con zona incolora.

ras bw --- epistático bw.

ras cl --- similar a ras, aunque más oscuro. Tabla 7, nº 3.

ras cn --- naranja amarillento con zona incolora (rn).
Naranja (ad). Tabla 9, nº 13.

ras lt --- naranja algo parduzco.

ras ltd --- naranja claro con zona incolora (rn). Tabla 6,
nº 17.

ras pr (vg) --- casi epistático ras. Tabla 9, nº 10.

ras ca --- naranja parduzco brillante (rn). Marrón sin
brillo (ad).

ras cd --- naranja claro con zona incolora (rn). Marrón
brillante (ad). Tabla 9, nº 5.

ras Hn^{ra} (ri) --- epistático ras. Tabla 8, nº 3.

ras kar (cu) --- naranja claro con zona incolora (rn).
Naranja con mayor proporción de rojo que de amarillo
(ad).

ras p --- marrón anaranjado.

ras rs^{ra} --- epistático ras.

ras se (h) --- más claro que se. Tabla 8, nº 5.

ras snb --- naranja claro con zona incolora.

rb bw --- amarillento parduzco (rn). Marrón rojizo claro
(ad). Tabla 10, nº 8.

rb cn --- naranja claro (rn). naranja rojizo (ad).

rb dke (c) --- epistático rb. Tabla 6, nº 11.

rb ltd --- blanco. Tabla 6, nº 2.

rb pd --- más claro que rb.

rb pr (b) --- más anaranjado que rb (rn). Rojizo algo oscuro (ad). Tabla 6, nº 20.

rb Pu² --- más anaranjado que rb.

rb sf (b) --- similar a rb.

rb ca --- naranja parduzco claro.

rb cd (tx) --- naranja claro (rn). Rojo, similar a cm (ad).

rb Hn² --- naranja parduzco (rn). Oscurece (ad).

rb kar (cu) --- naranja rojizo algo oscuro (rn). Naranja sucio (ad).

rb p --- naranja parduzco. Tabla 6, nº 8.

rb red (ri) --- epistático rb. Tabla 6, nº 23 y tabla 11, nº 10.

rb rs² --- naranja amarillento parduzco.

rb se --- similar a se.

rb snb --- naranja parduzco.

rb st --- naranja acaramelado.

v bw --- blanco, con tinte algo rosado. Tabla 10, nº 9.

v cl --- anaranjado tipo ca (rn). Oscurece a cl (ad). Tabla 7, nº 1.

v dke (c) --- rojo mate algo anaranjado. Tabla 8, nº 18.

v lt --- naranja mate con mayor porcentaje de amarillo que de rojo. Tabla 8, nº 13.

v pd --- rojizo anaranjado (bastante similar a y).

v pr --- naranja claro (rn).

v Pu² (Cy) --- naranja claro.

v sf (b) --- naranja claro (rn).

v ca --- naranja claro.

v Hn^{ra} --- naranja claro algo sucio (rn). Epistático Hn^{ra}
(ad).

v p --- naranja.

v red --- naranja claro con zona ocular incolora. Tabla 11,
nº 11.

v snb --- naranja claro.

Cepas portadoras de dos genes mutantes en el 2º cromosoma

bw pr --- más amarillento que bw. Tabla 10, nº 15.

bw cn --- blanco. Tabla 10, nº 3.

bw ltd --- blanco. Tabla 10, nº 4.

cl cn --- naranja (rn). Epistático cl (ad). Tabla 7, nº 2.

cl ltd --- rojizo. Tabla 6, nº 25.

cl pr --- granate oscuro. Tabla 7, nº 5.

cn dke --- rojo mate algo anaranjado (rn). Oscurece (ad).
Tabla 9, nº 14.

cn pd --- naranja algo parduzco.

cn pr --- naranja claro (rn). Tabla 9, nº 1.

dke ltd (c) --- rojizos.

ltd pd --- naranja. Tabla 6, nº 21.

Cepas portadoras de dos genes mutantes en el 3º cromosoma

cd red --- algo más claro que red. Tabla 11, nº 1.

se Hn^{ra} --- epistático se. Tabla 8, nº 7.

bo lix --- epistático bo. Tabla 8, nº 23.

Cepas portadoras de dos genes mutantes en el cromosoma X

g v --- naranja claro.

lix se --- epistático se. Tabla 9, nº 20.

lix dke (c) --- epistático dke. Tabla 8, nº 24.

pn ras (sc) --- similar a pn y a ras. Tabla 9, nº 11.

3.2. Descripción de las manchas cromatográficas

Uno de los objetivos de esta tesis doctoral ha sido el estudio del patrón de pteridinas en cepas dobles mutantes de color de ojos de Drosophila melanogaster. Para llevar a cabo este estudio, las pteridinas fueron separadas sobre cromatogramas bidimensionales en los cuales aparecían como manchas reconocibles por sus Rfs y por su fluorescencia (ver figura 20). Los patrones de pteridinas de cada cepa mutante se obtuvieron cuantificando las pteridinas mas importantes (neodrosopterina, drosopterina, isodrosopterina, aurodrosopterina, sepiapterina, acetildihidrohomopterina, dihidrobiopterina, biopterina, isoxantopterina y pterina) y detectando la presencia o ausencia de otras pteridinas de menor importancia que aparecían eventualmente en los cromatogramas. Una parte importante de estas pteridinas fueron estudiadas e identificadas por Wilson y Jacobson (1977a) y Ferré et al. (1986) (ver tablas 3 y 4).

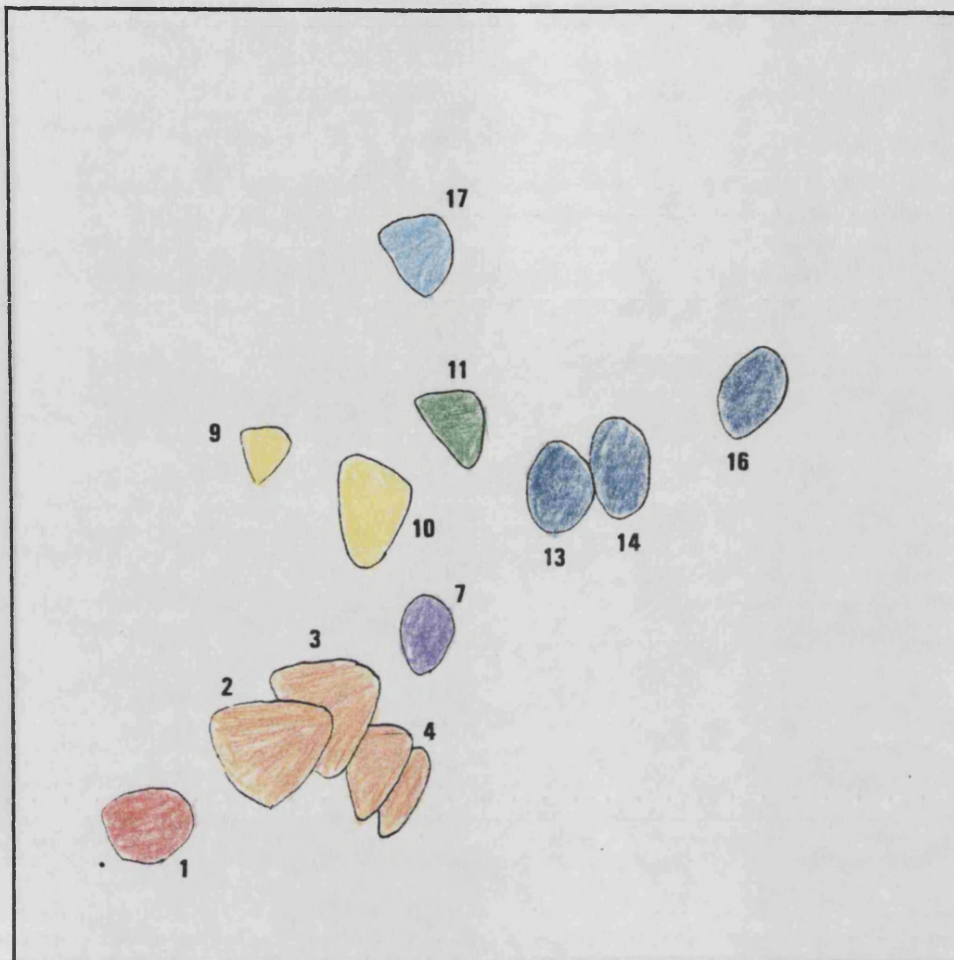


Figura 20.- Cromatogramas en capa fina de extractos de D. melanogaster, tal como se ven al irradiarlos con luz ultravioleta de 365 nm.

Primer solvente: isopropanol/2% acetato amónico (1:1).

Segundo solvente: 3% cloruro amónico.

Las sustancias a las que corresponden los números con los que se identifican las manchas pueden observarse en las tablas 3 y 4. Las manchas nº 4, 8, 15, 29 y 30 son comentadas en el apartado de resultados.

(A) Cromatograma con las manchas más frecuentes que aparecen en las cepas mutantes.

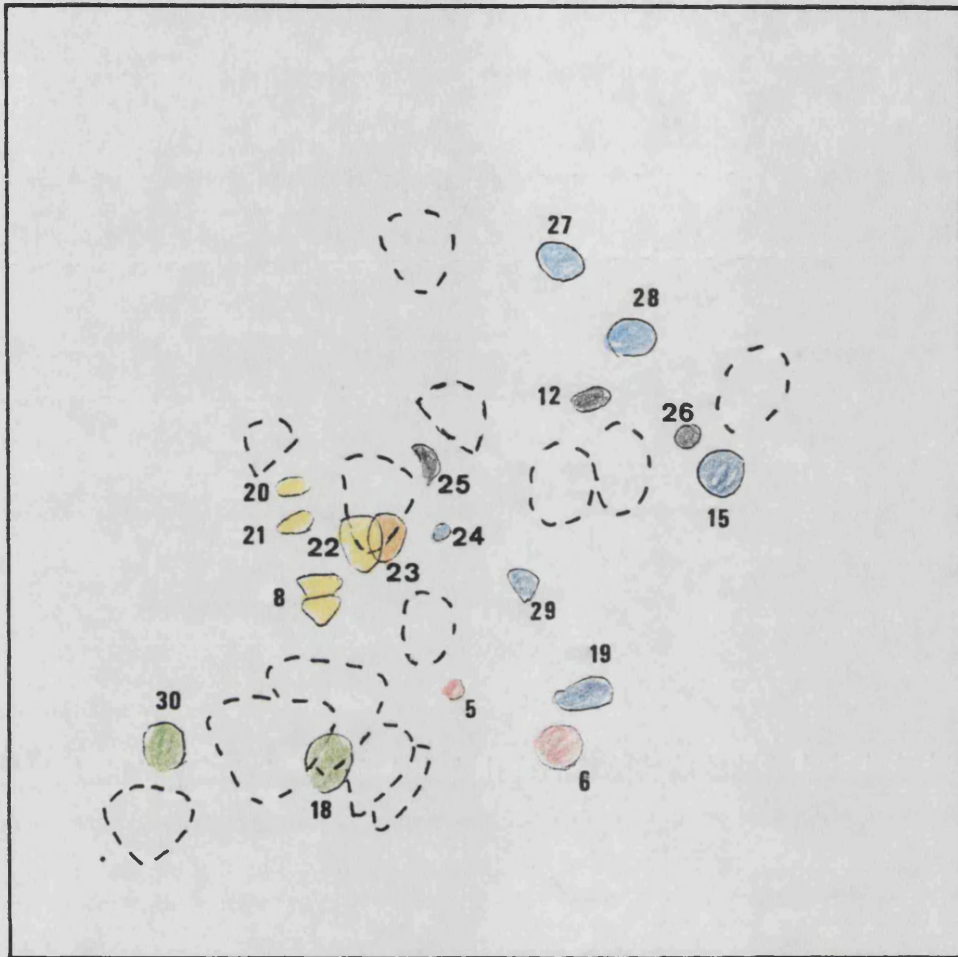


Figura 20 (continuación)

(B) Cromatograma con las manchas que aparecen ocasionalmente en las cepas mutantes.

Tabla 3.- Descripción de las manchas cromatográficas según Wilson y Jacobson (1977a)

<u>Mancha nº</u>	<u>Fluorescencia</u>	<u>Color</u>	<u>Nombre</u>
1	roja	rojo	neodrosopterina
2	rojo-naranja	rojo-naranja	drosopterina
3	rojo-naranja	rojo-naranja	isodrosopterina
4	rojo-naranja	rojo-naranja	aurodrosopterinas
7	púrpura	incolora	isoxantopterina
9	amarilla	amarillo	deoxisepiapterina
10	amarilla	amarillo	sepiapterina
14	azul	incolora	pterina
16	azul	incolora	biopterina
17	azul clara	incolora	ácido xanturénico
26	amarillo-naranja	amarillo-naranja	3-hidroxiquinurenina

Tabla 4.- Descripción de las manchas cromatográficas según Ferré (1985)

<u>Mancha nº</u>	<u>Fluorescencia</u>	<u>Color</u>	<u>Sustancia</u>
5	roja	rojo	desconocida *
6	roja	rojo	desconocida *
8	amarilla	amarillo	dihidroformilpterina
11	marrón-verdosa	marrón	acetildihidrohomopterina
12	quencher	marrón	desconocida *
13	azul	incolora	dihidrobiopterina
15	azul	incolora	neopterina
18	verde	amarillo	ácido dihidropterín carboxílico
19	azul	incolora	ácido pterín carboxílico
20	amarilla	amarillo	desconocida
21	amarilla	amarillo	acetildihidropterina
22	amarilla	amarillo	desconocida *
23	naranja	naranja	riboflavina
24	azul	incolora	desconocida *
25	azul	incolora	propionilpterina *
27	azul clara	incolora	ácido quinurénico
28	azul clara	incolora	glucósido del ácido xanturénico

* Las manchas 5 y 6 son probablemente productos de degradación de las drosopterinas. La mancha nº12 parece un producto de degradación de la nº11. Las manchas 24 y 25, por su posición, parecen ser productos de oxidación de la mancha 22 y la deoxisepiapterina producidos durante el periodo de secado entre los solventes. La mancha nº22 es el primer compuesto que se acumula en los ojos durante el desarrollo del insecto (Morcillo y Ménsua, 1983).

Dada la gran cantidad de cepas analizadas en este trabajo, hemos intentado ampliar el estudio sobre estas pteridinas detectando la presencia o ausencia en las diferentes cepas mutantes y estableciendo su relación con la ruta de síntesis de las pteridinas.

En la figura 20 podemos observar dos dibujos, que corresponden a un cromatograma con las manchas más frecuentes encontradas en cepas normales y mutantes (A), y a otro, con aquellas manchas que aparecen sólo ocasionalmente en cepas normales y algunas mutantes o en algún estadio de desarrollo distinto del utilizado habitualmente (B). Las manchas números 29 y 30 han sido descritas por primera vez en este trabajo, mientras que se ha ampliado la información que se tenía sobre las manchas números 4, 8 y 15 descritas anteriormente por Ferré (1984).

Manchas cromatográficas descritas anteriormente

La mancha nº 15 fue identificada por Ferré (1984) como formada por la mezcla de los compuestos neopterina y biopterina. La biopterina se producía al oxidarse una parte de la dihidrobiopterina durante el secado del primer solvente, presentando por dicha razón el R_f de la dihidrobiopterina en el primer solvente y el de la biopterina en el segundo. Esta degradación se produce sólo ocasionalmente cuando se descuidan las condiciones luminosas (luz roja tenue) durante el secado de los cromatogramas.

Extremando las condiciones para evitar estas degradaciones, se observa que en el mutante purple y en varias de sus cepas dobles mutantes aparece esta mancha, aunque en este caso el Rf del segundo solvente es ligeramente inferior al de la biopterina (ver figura 20). Este Rf coincide con el de la neopterina, sustancia que ha sido hallada anteriormente en *Drosophila* (Kato e a., 1980). La presencia de esta sustancia en el mutante purple podría explicarse al tener bloqueado dicho mutante el paso enzimático entre dihidroneopterina trifosfato y piruvoiltetrahydropterina (ver figura 3). La dihidroneopterina trifosfato acumulada podría transformarse en neopterina bien in vivo o por las condiciones de extracción.

Para confirmar que esta mancha estaba mayoritariamente formada por neopterina, se hicieron dos experimentos. En el primero se utilizó la cepa pr₁cd (presenta la mancha nº 15) invirtiendo el orden de los solventes. De esta forma, si la mancha fuera debida a la biopterina producida por degradación aparecería en una posición diferente, pero si fuera neopterina, seguiría apareciendo en la misma posición. El experimento confirmó la segunda hipótesis. El otro experimento realizado consistió en utilizar una cepa mutante que llevara un alelo purple mucho más extremo que el usado habitualmente, con lo que si esta sustancia era neopterina, se acumularía en mayor proporción. Se utilizó la cepa cn pr⁴/pr^{2b}__se, en la cual los genes cn y se no afectan a la acumulación de neopterina. El cromatograma encontrado en



esta cepa puede observarse en la figura 21. La mancha número 15 presentaba una extensión y fluorescencia superior a la encontrada en el mutante simple purple.

En el cromatograma de la figura 21, puede observarse también que la mancha nº 8, identificada parcialmente por Ferré (1984) como 7-8, dihidroformilpterina, está compuesta por la superposición de dos manchas de la misma fluorescencia y color. Estas dos manchas podrían ser dos formas racémicas de la dihidroformilpterina, al igual que ocurre con la aurodrosopterina.

La mancha nº 8 aparece en los cromatogramas de varias cepas mutantes de color de ojos, siendo la cepa purple la que más la acumula. El hecho de que la cepa en _____ se acumule esta sustancia en cantidad mucho mayor que en la cepa purple nos sugiere que la dihidroformilpterina es un compuesto que se produce en la ruta de síntesis de las pteridinas, a partir de la dihidroneopterina trifosfato por una ruta lateral distinta de la ruta por la que se sintetizan el resto de las pteridinas.

En la figura 20 (A) puede observarse la separación de las dos formas racémicas de la aurodrosopterina. La existencia de estas dos sustancias había sido descrita por Rokos y Pfleiderer (1975), pero en los cromatogramas sólo se observaba una única mancha que correspondía a las dos formas de aurodrosopterina. Trabajando , con extractos más concentrados, y en condiciones en las que se obtenía una mayor resolución de los cromatogramas, se pudo detectar la

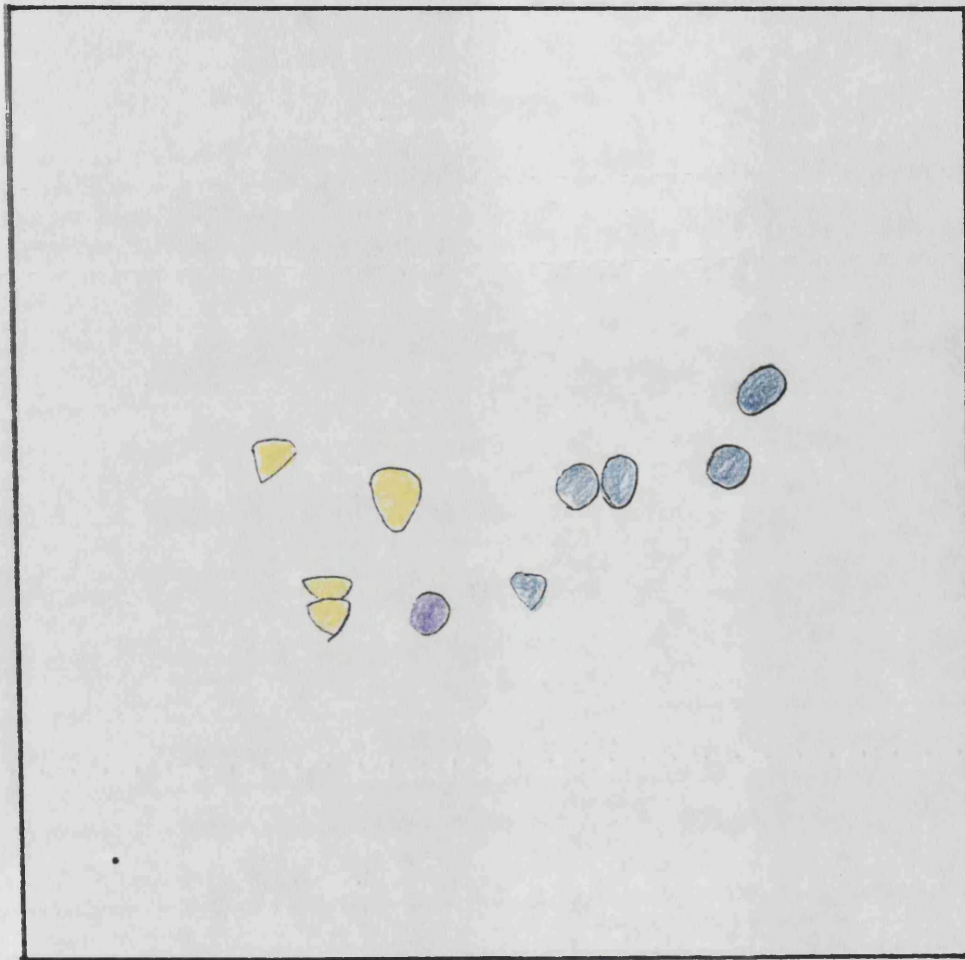


Figura 21.- Cromatograma de la cepa $\underline{pr}^{c4}/\underline{pr}^{m2b}$ se cn.

presencia de las dos sustancias, aunque muy solapadas como se observa en la figura 20.

Ferré et al. (1986) describieron la presencia de la mancha nº 18 en cromatogramas del mutante sepia. Esta mancha por sus Rfs y fluorescencia parecía corresponder al ácido dihidropterín carboxílico. El solapamiento de la mancha nº 18 con las de las drosopterinas impide distinguir si esta sustancia se presenta en la cepa tipo salvaje y en otras cepas mutantes de color de ojos, excepto en la cepa clot, en la cual puede detectarse a pesar de poseer drosopterinas.

Se ha intentado determinar si el ácido dihidropterín carboxílico es un intermediario en la ruta de síntesis de las pteridinas o únicamente un producto de degradación de alguna de ellas. Según la primera hipótesis, la detección de esta sustancia en los mutantes sepia y clot se debería a que ambos acumulan en gran cantidad el intermediario piruvoiltetrahydropterina, el cual se transformaría en otras pteridinas situadas posteriormente en la ruta de síntesis, mientras que, según la segunda hipótesis, la aparición de esta sustancia, sólo en estos mutantes, sería debida a la formación en mayor cantidad de productos de degradación, al estar muy acumuladas varias de las pteridinas.

Si esta sustancia fuera un intermediario en la ruta de síntesis de las pteridinas, el paso más probable sería entre la PH₄PTE (una pterina con una cadena lateral en posición 6 de tres carbonos) y la dihidropterina (sin cadena lateral). Ferré et al. (1986) han propuesto que el gen Henna puede

controlar alguno de los enzimas de este paso, presumiblemente el primero, siendo ésta la causa por la que apenas aparece pterina e isoxantopterina en los cromatogramas de la mutación Hn^{ra} y, por el contrario, aparecen acumuladas la SP, BP y ADHP. Se intentó, por tanto, detectar la presencia de esta sustancia en los cromatogramas de las cepas tipo salvaje y Hn^{ra} . Se realizaron cromatogramas a partir de extractos muy concentrados (640 cabezas de mosca/ 0.2 ml) de $Qr-R$ y Hn^{ra} , no detectándose ninguna traza de la sustancia. Esto contrasta con el hecho de que esta sustancia es fácil de detectar a una concentración 6 veces más pequeña en los mutantes sepia y clot.

Al no conseguir detectar el metabolito en las cepas Hn^{ra} y $Qr-R$ se optó por utilizar como cepas equivalentes se Hn^{ra} y se . Si la mutación Hn^{ra} impidiera la síntesis del ácido dihidropterín carboxílico, la cepa mutante se_Hn^{ra} debería presentar una cantidad menor de la sustancia que la cepa se . Los resultados obtenidos fueron, en unidades de fluorescencia, 16.9 ± 0.5 para se y 18.6 ± 0.5 para se_Hn^{ra} , lo cual indica que esta sustancia no ve reducida su presencia (síntesis) por el defecto genético de Hn^{ra} .

Manchas cromatográficas descritas por primera vez

Se han descubierto dos nuevas manchas que aparecen únicamente en algunas cepas mutantes. La mancha nº 29 se ha

detectado únicamente en cromatogramas de la cepa cn
pr⁴/pr^{2b}_se (figura 21). En los cromatogramas de esta cepa
se observa una pequeña traza de fluorescencia azulada que
presenta el mismo Rf que la mancha nº 8 en el primer
solvente (isopropanol / acetato amónico 2% (1:1)), y un Rf
mayor en el segundo solvente (cloruro amónico 3%). Por su
fluorescencia y Rfs, esta sustancia podría ser el producto
oxidado de la 7-8,dihidroformilpterina, es decir, la
formilpterina.

El hecho de no haber podido detectar esta sustancia
más que en la cepa anteriormente citada, confirma el que se
trata de un producto de degradación de la mancha nº 8, ya
que ésta es la única cepa en la que se acumula la
dihidroformilpterina en cantidades apreciables.

La mancha nº 30 también ha sido descrita por primera
vez. Se ha detectado en los cromatogramas de las cepas
mutantes simples sepia y clot, así como en algunas cepas
dobles mutantes de sepia (se_Hn^{ra}, y_se). Esta sustancia
presenta los mismos máximos de excitación y emisión (400 y
467 nm, respectivamente) que la mancha nº 18 (ácido
dihidropterín carboxílico), aunque se presenta en cantidades
mucho más bajas. Esta sustancia no ha sido identificada,
pero es presumiblemente un producto de degradación de otras
pteridinas.

A continuación se citan aquellas cepas dobles mutantes
en las que se han encontrado estas pteridinas de menor
importancia.

El ácido dihidropterin carboxílico (mancha nº 18) ha sido encontrado en las cepas cl_se, cn_se, pn_se, v_se y se_Hn^{ra}.

La mancha nº 30 ha sido detectada en las cepas cl_se, cm_se, v_se y se_Hn^{ra}.

La neopterina (mancha nº 15) ha sido detectada en las cepas cn_Hn^{ra}, pr_ca, pr_cd, pr_kar, pr_red, sf_st, pn_cn, ras_pr, cl_pr y cn_pr^{ca}/pr^{mb}_se.

La dihidroformilpterina (mancha nº 8) ha sido detectada en cantidades superiores a las de la cepa normal en las cepas cn_ry, dke_Hn^{ra}, pr_ca, pr_cd, pr_kar, pr_e, pr_red, sf_st, cho_cl, cho_red, pn_pr, pn_se, ras_cl, ras_pr, rb_pr, cl_pr, se_Hn^{ra}, pn_ras y cn_pr^{ca}/pr^{mb}_se.

La riboflavina (mancha nº 23) ha sido detectada en cantidades superiores a las del individuo tipo salvaje en la cepa dke_Hn^{ra}.

Por último, la formilpterina (mancha nº 29) ha sido detectada únicamente en la cepa cn_pr^{ca}/pr^{mb}_se.

3.3. Detección de quinoleinas en las cepas dobles mutantes

En los cromatogramas de extractos de cabezas de Drosophila melanogaster se detectan, en ocasiones, algunas quinoleinas, las cuales se caracterizan por presentar fluorescencia azul clara. De estos metabolitos, el ácido xanturénico es el que aparece con mayor frecuencia y en suficiente cantidad para poder ser cuantificado. Las otras

dos quinoleinas que se detectan en los cromatogramas de algunas cepas mutantes son el ácido quinurénico y el glucósido del ácido xanturénico.

A continuación se detallan las quinoleinas encontradas en las cepas dobles mutantes. Las abreviaturas utilizadas fueron XTC (ácido xanturénico), QC (ácido quinurénico) y XTCgl (glucósido del ácido xanturénico).

Cepas	XTC	QC	XTCgl
bw ca	7	ND	ND
bw cd	13	ND	ND
bw red	ND	ND	ND
cl ca	ND	ND	ND
cl Hn ^{ra}	60	ND	ND
cl p	TR	ND	ND
cl red	ND	ND	ND
cl rs ^e	30	ND	ND
cl se	65	ND	ND
cn Hn ^{ra}	ND	TR	ND
cn p	ND	ND	ND
cn red	ND	ND	ND
cn rs ^e	ND	ND	ND
cn ry	ND	ND	ND
cn se	ND	ND	ND
dke ca	ND	ND	ND
dke cd	70	ND	ND
dke Hn ^{ra}	70	ND	ND

dke p	TR	ND	ND
dke red	15	ND	ND
dke se	43	ND	ND
lt se	ND	ND	ND
ltd ca	ND	ND	ND
ltd cd	ND	ND	ND
ltd Hn ^{re}	ND	ND	ND
ltd kar	ND	ND	ND
ltp p	ND	ND	ND
ltd red	ND	ND	ND
ltd rs ^{re}	ND	ND	ND
ltd st	ND	ND	ND
pr ca	ND	ND	TR
pr cd	70	ND	TR
pr Hn ^{re}	50	ND	ND
pr kar	TR	ND	ND
pr p	ND	ND	ND
pr red	16	ND	TR
Pu ^{re} se	30	ND	ND
Pu ^{re} st	15	ND	TR
sf p	18	ND	ND
sf st	10	ND	TR
car cn	ND	ND	ND
car dke	30	ND	ND
car ltd	ND	ND	ND
cho bw	ND	ND	ND
cho cl	ND	ND	ND

cho dke	ND	ND	ND
cho red	ND	ND	ND
cm cl	ND	ND	ND
cm cn	ND	ND	ND
cm dke	TR	ND	ND
cm red	ND	ND	ND
g cl	30	ND	ND
g cn	ND	ND	ND
g dke	16	ND	ND
g lt	ND	ND	ND
g ltd	ND	ND	ND
g rs ²	ND	ND	ND
g st	ND	ND	ND
lix dke	121	ND	ND
lix se	60	ND	ND
pn cl	29	ND	ND
pn cn	ND	ND	ND
pn dke	58	ND	ND
pn ltd	ND	ND	ND
pn pr	13	ND	ND
pn Hr ³	14	ND	ND
pn red	ND	ND	ND
pn se	28	ND	ND
ras cl	31	ND	ND
ras cn	ND	ND	ND
ras ltd	10	ND	ND
ras pr	32	ND	TR

ras cd	50	ND	TR
ras Hn ^{2a}	55	ND	ND
ras se	37	ND	ND
rb bw	TR	ND	ND
rb dke	TR	ND	ND
rb ltd	ND	ND	ND
rb pr	ND	ND	TR
rb p	ND	ND	ND
rb red	37	ND	ND
v cl	ND	ND	ND
v dke	ND	ND	ND
v lt	ND	ND	ND
v red	ND	ND	ND
v se	ND	ND	ND
bw pr	7	ND	ND
cl cn	ND	ND	ND
cl ltd	ND	ND	ND
cl pr	22	ND	TR
ltd pd	ND	ND	ND
cd red	ND	ND	ND
se Hn ^{2a}	81	ND	ND
bo lix	40	ND	ND
pn ras	63	ND	TR

3.4. Cuantificación de pteridinas en dobles mutantes de Drosophila melanogaster

Se han cuantificado las pteridinas en una parte de las cepas de dobles mutantes de color de ojos sintetizadas.

Las cepas que son homocigóticas para dos mutaciones de color de ojos deben tener un patrón de pteridinas equivalente a la suma de las acciones de las dos mutaciones. Cuando esto no ocurre, decimos que se ha producido una interacción entre los dos genes mutantes. Para poder distinguir estas interacciones necesitamos conocer cual sería el patrón esperado de pteridinas de la cepa doble mutante, suponiendo un efecto aditivo de los efectos de las dos mutaciones. Los patrones de pteridinas esperados para las cepas dobles mutantes se han calculado basándose en los datos de los mutantes simples estimados por Ferré *et al.* (1986) (ver tabla 5), excepto para los mutantes *sepia* y *clot*, ya que en este trabajo las cepas utilizadas no tenían el mismo origen geográfico. Tras ser cuantificadas las pteridinas en estas dos cepas mutantes, los valores encontrados diferían significativamente, en algunas sustancias, de los descritos por Ferré *et al.* (1986). Estos nuevos valores fueron de 2750% de SP y 620% de BP para nuestra cepa *sepia*, y de un 37% de DP e IDP para nuestra cepa *clot*. Estos datos fueron utilizados para el cálculo de los valores esperados de pteridinas en las cepas de dobles mutantes de *sepia* y *clot*. Si, por ejemplo, una mutación

Tabla 5.- Cuantificación de xantomatina y pteridinas en mutantes de color de ojos de Drosophila melanogaster (Ferré et al., 1986)

Abreviaturas utilizadas: NDP (neodrosopterina), DP (drosopterina), IDP (isodrosopterina), ADP (aurodrosopterinas), SP (sepiapterina), ADHP (acetildihidrohomopterina), IXP (isoxantopterina), PTE (pterina), H₂BP (dihidrobiopterina), BP (biopterina), XTM (xantomatina), ND (no detectado) y TR (traza).

Cepa	XTM	NDP	DP	IDP	ADP	SP	ADHP	IXP	PTE	H ₂ BP	BP
Or-R	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
bo	107	33	46	41	85	160	180	15	49	80	120
bw	71	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ca	30	5	5	7	17	110	90	50	11	47	180
car	60	13	20	18	61	200	200	100	24	100	260
cd	12	85	100	100	100	91	140	78	81	94	93
cho	66	4	4	5	12	110	TR	57	47	130	700
cl	160	19	54	47	8	1400	ND	120	530	470	260
cm	43	31	36	32	55	200	120	20	34	67	180
cn	4	91	86	89	90	100	84	63	95	80	82

Tabla 5.- (continuación)

Cepa	XTM	NDP	DP	IDP	ADP	SP	ADHP	IXP	PTE	H ₂ BP	BP
dke	153	20	51	55	86	130	110	66	38	61	120
g	68	17	19	19	42	210	160	54	24	53	180
Hn ^{r3}	125	9	20	20	ND	460	450	ND	ND	150	440
kar	28	120	110	95	80	120	130	84	72	100	130
lix	102	58	48	56	100	200	150	ND	32	62	110
lt	10	10	9	10	35	120	94	46	13	88	170
ltd	8	43	36	35	63	200	200	33	26	95	170
p	21	18	20	19	43	100	86	59	30	72	180
pd	58	17	19	19	59	120	83	100	29	87	160
pn	81	22	22	32	18	160	87	88	34	95	140
pr	122	45	39	36	20	64	35	87	39	58	110
Pu ²	135	49	31	29	24	21	TR	29	53	23	40
ras	96	17	13	15	5	70	TR	110	58	49	100
rb	38	34	25	36	55	160	94	29	37	50	150

Tabla 5.- (continuación)

Cepa	XTM	NDP	DP	IDP	ADP	SP	ADHP	IXP	PTE	H ₂ BP	BP
red	31	8	5	7	22	100	85	51	40	96	420
rs ²	43	43	50	44	100	140	130	89	52	91	150
ry	138	21	42	33	61	110	69	ND	200	130	250
se	142	ND	ND	ND	ND	5700	ND	95	1600	1200	920
sf	95	100	89	76	100	61	130	66	120	100	120
snb	16	7	9	12	30	84	91	71	22	73	200
st	2	80	93	88	95	100	120	69	60	96	78
v	3	93	80	79	93	150	110	110	100	100	100

Nota.- Los coeficientes de variación de estos valores fueron menores de 15% para la isoxantopterina, menores del 20% para las drosopterinas y la dihidrobiopterina, y menores del 25% para la sepiapterina, ADHP, PTE y BP.

presenta un 50% de una pteridina y otra presenta un 20% de la misma pteridina, la cepa doble mutante debería presentar una cantidad del 10% obtenida multiplicando la cantidad del primer mutante en tanto por uno (0.5) por la del segundo mutante (0.2). Este método debería utilizarse para cada una de las pteridinas. Cuando uno de los mutantes presenta una cantidad de una pteridina superior a la del individuo tipo salvaje (tanto por uno mayor de 1) realizamos también el mismo tipo de operación. Sin embargo, cuando los valores de dos mutantes son superiores a 1, hay que utilizar el método con precaución. Así, por ejemplo, la cepa mutante sepia acumula varias pteridinas al tener interrumpida totalmente la síntesis de pigmentos rojos, mientras que la mutación clot interrumpe sólo parcialmente esta síntesis, acumulando las mismas pteridinas pero en menor cantidad. La cepa doble mutante "sepia clot" tendría un valor esperado para estas pteridinas que no sería equivalente al resultante de multiplicar los valores obtenidos en tantos por uno de los dos mutantes. Esto se debe a que existiría un límite en la cantidad de pteridinas acumuladas que vendría determinado por la cantidad de precursor disponible. Como esta cantidad es difícil de calcular, en estos casos comparamos directamente los valores observados con los patrones de pteridinas de los mutantes simples (ver tabla 5).

Basándonos en los patrones de pteridinas obtenidos, según este método, hemos podido comparar los observados en nuestras cuantificaciones. A continuación, se

describen los patrones de pteridinas observados en las cepas dobles mutantes, agrupándolos según el tipo de interacción que produzcan.

Se han formado seis grupos con los dobles mutantes analizados:

---El grupo I incluye aquellas cepas que contienen las mutaciones garnet, lightoid, rose² o ruby, y cuyos patrones de pteridinas no coinciden con los esperados, caracterizándose por presentar la mayor parte de las pteridinas disminuidas frente a lo esperado.

---El grupo II está formado por las cepas dobles mutantes de clott. Esta mutación presenta interacciones con mutaciones que afectan a la síntesis de pteridinas, siendo su efecto principal un aumento en la cantidad de drosopterinas.

---El grupo III es una miscelanea de cepas con patrones de pteridinas diferentes de lo esperado. En este grupo las interacciones son muy variadas.

---El grupo IV está formado por las cepas cuyo patrón de pteridinas es similar al esperado. En este grupo no se incluyen aquellas cepas portadoras de la mutación cl, red o bw, cuyo patrón de pteridinas no difiere significativamente del esperado, y que se presentan en los grupos I, VI y V, respectivamente.

---En el grupo V se incluyen los dobles mutantes de brown. Estas cepas presentan como característica principal la ausencia total de pteridinas consecuencia de la presencia de la mutación bw.

---En el grupo VI hemos incluido los dobles mutantes de red. Se ha hecho un apartado especial con estas cepas, dado que existe una interacción especial entre la mutación red y las mutaciones que afectan a la síntesis de xantomatina.

Grupo_I: Cepas dobles mutantes que contienen las mutaciones garnet, lightoid, rose² y/o ruby, y cuyos patrones de pteridinas no coinciden con los esperados.

Un primer grupo de mutantes entre los que se aprecia una fuerte interacción está formado por las mutaciones garnet (g), lightoid (ltd), rose² (rs²) y ruby (rb). Cuando se analiza el patrón de pteridinas de una cepa portadora de dos de estas mutaciones se observa que la cepa presenta una cantidad de pteridinas muy inferior a la esperada. Los dos casos mas extremos son las cepas g_ltd y rb_ltd, ambas con fenotipo de color de ojos prácticamente blanco y con un patrón de pteridinas que presenta sólo trazas de algunas drosópteras (ver tabla 6, n^o 1 y 2). Estos patrones de pteridinas contrastan con las cantidades esperadas de drosópteras, sepiapterina y biopterina.

En la tabla 6 se presentan los patrones de pteridinas de otras cepas dobles mutantes que también presentan interacciones similares, aunque menos extremas. Las cepas ltd_rs², car_ltd, g_lt, g_rs² y ltd_p (n^o 3 al 7) presentan cantidades de todas las pteridinas inferiores a las esperadas. De todas ellas, la biopterina es la que se

Tabla 6.- Cuantificación de pteridinas en dobles mutantes de color de ojos (I)

Cepas dobles mutantes de las mutaciones garnet, lightoid, rose² y rubý, cuyos patrones de pteridinas observados presentan diferencias con los esperados (números pequeños).

Ver tabla para las abreviaturas.

Cepa	NDP	DP	IDP	ADP	SP	ADHP	IXP	PTE	H2BP	BP
(1) g ltd	TR 7	TR 7	ND 7	ND 26	ND 420	ND 320	ND 18	ND 6	ND 50	ND 306
(2) rb ltd	TR 15	TR 9	TR 13	ND 35	ND 320	ND 188	ND 10	ND 10	ND 48	ND 255
(3) ltd rs ²	5 18	3 18	3 15	6 63	52 280	TR 260	13 29	ND 14	37 86	101 255
(4) car ltd	6 6	3 7	3 6	8 38	100 400	107 400	14 33	ND 6	39 95	201 442
(5) g lt	3 2	2 2	2 2	5 15	54 252	TR 150	22 25	TR 3	24 47	125 306
(6) g rs ²	6 7	4 10	4 8	10 42	77 294	50 208	26 48	3 12	52 48	205 270
(7) ltd p	8 8	5 7	3 7	7 27	13 200	16 172	22 19	ND 8	40 68	53 306
(8) rb p	13 6	5 5	3 7	9 24	70 160	57 81	24 17	TR 11	65 36	220 270

Tabla 6 (continuación)

	Cepa	NDP	DP	IDP	ADP	SP	ADHP	IXP	PTE	H2BP	BP
(9)	g st	15	10	9	15	116	106	44	ND	66	150
		14	18	17	40	210	192	37	14	51	140
(10)	g dke	5	7	7	16	69	64	14	4	50	200
		3	10	10	36	273	176	36	9	32	216
(11)	rb dke	6	11	9	17	82	51	2	11	23	187
		7	13	20	47	208	103	19	14	31	180
(12)	ltd kar	20	15	18	29	246	114	34	15	79	388
		52	40	33	50	240	260	28	19	95	221
(13)	ltd st	21	18	16	24	165	128	32	11	41	237
		34	33	31	60	200	240	23	16	91	133
(14)	g cn	10	7	8	20	103	165	44	17	79	201
		15	16	17	38	210	134	34	23	42	148
(15)	cn rs ²	22	16	15	32	154	158	48	14	71	227
		39	43	39	90	140	109	56	49	73	123
(16)	pn ltd	16	18	14	25	114	82	47	59	97	165
		9	8	11	11	320	174	29	9	90	238
(17)	ras ltd	12	8	8	10	29	TR	16	44	44	132
		7	5	5	3	140	2	36	15	47	170

Tabla 6 (continuación)

Cepa	NDP	DP	IDP	ADP	SP	ADHP	IXP	PTE	H2BP	BP
(18) g cl	30 3	29 10	30 9	ND 3	2107 2940	ND ND	109 65	400 127	400 249	264 468
(19) ltd Hn ^{r3}	8 4	7 7	7 7	ND ND	381 920	193 900	ND ND	ND ND	97 143	361 748
(20) rb pr	14 15	10 10	9 13	20 11	24 102	83 33	9 25	16 14	46 29	67 165
(21) ltd pd	22 7	9 7	7 7	20 37	108 240	121 166	24 33	14 8	65 83	179 272
(22) ltd ca	5 2	6 2	5 2	8 11	54 220	33 180	1 17	TR 3	20 45	54 306
(23) rb red	28 3	16 1	15 3	31 12	128 160	130 80	26 15	17 15	75 48	236 630
(24) ltd red	15 3	11 2	10 2	34 14	89 200	160 170	17 17	19 10	73 91	188 714
(25) ltd cl	14 8	14 19	17 16	21 5	2335 2800	ND ND	23 40	502 138	275 447	247 442
(26) cl rs ²	15 8	19 27	19 21	21 8	3555 1960	ND ND	91 107	360 276	585 428	344 390

encuentra disminuida en menor proporción. Así, mientras la cantidad de biopterina es aproximadamente la mitad de la esperada, el resto de pteridinas presentan valores mucho más disminuidos.

Las siete cepas dobles mutantes mencionadas anteriormente son las que presentan las interacciones más fuertes. Sin embargo, son varias las cepas dobles mutantes portadoras al menos de una de las mutaciones mencionadas al principio del apartado que presentan algún tipo de interacción. Así, por ejemplo, las cepas rb_p, g_st, g_dke y rb_dke (n^o 8 al 11) presentan la mayor parte de las pteridinas disminuidas frente a lo esperado, excepto la biopterina que presenta valores equivalentes. El patrón de pteridinas de las cepas ltd_kar, ltd_st, g_cn y cn_rs (n^o 12 al 15) es también diferente del esperado, aunque en este caso sólo algunas pteridinas se encuentran disminuidas, mientras otras presentan valores similares o incluso aumentados (biopterina).

Por último, en algunas de estas cepas dobles mutantes no se cumple el modelo observado anteriormente, según el cual la biopterina es la sustancia que se ve menos afectada por esta interacción disminuidora. Este es el caso de las cepas pn_ltd y ras_ltd (n^o 16 y 17) en las que las dirospterinas y la pterina se encuentran aumentadas frente a lo esperado, mientras que el resto de las pteridinas (entre ellas la biopterina) se encuentran disminuidas.

Otro grupo está formado por las cepas ltd_Hn^{ra}, rb_pr,

ltd_pd y ltd_ca (n^os 19 al 22). Los patrones de pteridinas de estas cepas presentan la característica de que las drosopterinas se encuentran en cantidades similares e incluso ligeramente aumentadas, mientras que el resto de las sustancias está generalmente disminuido, incluyendo entre ellas a la biopterina.

Por último, hemos incluido en el grupo I cinco cepas dobles mutantes en las que aunque es posible que las mutaciones g, ltd, rb y rs^m produzcan la interacción de tipo disminuidora, ésta se ve compensada por otra de tipo opuesto como las que producen la mutación red y la mutación cl (ver grupos II y VI), con lo que los patrones de pteridinas son más difíciles de interpretar. Son las cepas g_cl, rb_red, ltd_red, ltd_cl y cl_rs^m (n^os 18 y 23 al 26). En el caso de la cepa cl_rs^m, por ejemplo, la mayor parte de las pteridinas presentan valores similares a los esperados.

Grupo_II: Dobles mutantes de clot

Los patrones de pteridinas de las cepas dobles mutantes de clot (cl) pueden observarse en la tabla 7. Los dobles mutantes que aparecen en esta tabla han sido divididos en tres grupos, según que la mutación que acompaña a cl afecte específicamente a la ruta de síntesis de la xantomatina, a la de las pteridinas o a ambas rutas a la vez.

En la primera clase estarían las cepas en las que el

Tabla 7.- Cuantificación de pteridinas en dobles mutantes de color de ojos (II)

Cepas dobles mutantes de clot.

Cepa	NDP	DP	IDP	ADP	SP	ADHP	IXP	PTE	H ₂ BP	BP
(1) v cl	25 18	20 30	22 29	ND 7	2258 2100	ND ND	105 132	450 530	425 470	187 260
(2) cn cl	35 17	29 32	28 33	TR 7	1965 1400	ND ND	75 76	375 504	450 376	251 213
(3) ras cl	9 3	7 5	4 6	TR ND	106 980	ND ND	86 132	78 307	85 230	141 260
(4) pn cl	18 4	11 8	10 12	3 1	535 2240	ND ND	90 106	69 180	238 447	190 364
(5) cl pr	61 9	29 14	22 13	16 2	326 896	ND ND	88 104	129 207	117 273	127 286
(6) cl se	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND	3500 (\$)	ND ND	107 114	807 (\$)	1382 (\$)	621 (\$)
(7) cl Hn ^{r3}	19 2	31 7	31 7	ND ND	4365 6440	ND ND	TR ND	253 ND	450 705	221 1144
(8) cl red	23 2	22 3	21 3	17 2	1420 1400	ND ND	73 61	495 212	680 451	406 1092

Tabla 7 (continuación)

Cepa	NDP	DP	IDP	ADP	SP	ADHP	IXP	PTE	H ₂ BP	BP
(9) cho cl	12 1	10 2	13 2	21 1	838 1540	ND ND	48 68	323 249	941 611	413 1820
(10) cm cl	25 6	21 13	32 12	16 4	3312 2800	ND ND	10 24	138 180	264 315	227 468
(11) cl ca	12 1	18 2	20 3	13 1	3080 1540	ND ND	62 60	391 58	500 221	421 468
(12) cl p	9 3	14 7	16 7	14 3	2016 1400	ND ND	76 71	290 159	450 338	384 468
(13) g cl	30 3	29 7	30 7	ND 3	2107 2940	ND ND	109 65	400 127	400 249	264 468

(§) Comparar el valor observado directamente con los que presentan los mutantes simples (Tabla 5).

mutante que acompaña a cl afecta específicamente a la ruta de síntesis de la xantomatina. Se han analizado las cepas y cl y cn_cl (n^o 1 y 2). Estas dos cepas presentan un valor de pteridinas bastante similar al esperado, si exceptuamos unas ligeras diferencias en las cantidades de drosopterinas.

En la segunda clase se han situado aquellas mutaciones que afectan a alguno de los pasos enzimáticos de la ruta de síntesis de las pteridinas y que, a su vez, no producen alteraciones importantes en la ruta de síntesis de la xantomatina. Las mutaciones pn y ras afectan al primer enzima de la ruta, la GTP ciclohidrolasa (Evans y Howells, 1978), la mutación pr actúa en el segundo paso de la ruta, la sepiapterina sintasa A (Yim *et al.*, 1977). El gen sepia controla el paso entre la PH₄PTE y la ADHP (Wilson y Jacobson, 1977b), mientras que la mutación Hn^r afecta con gran probabilidad a alguno de los pasos entre la PH₄PTE y la H₂PTE (Ferré *et al.*, 1986).

Las mutaciones pn y ras (n^o 3 y 4) producen al combinarse con cl cepas mutantes cuyo patrón de pteridinas se caracteriza por una epistasia parcial de las mutaciones pn y ras. Las cantidades de drosopterinas son similares a las esperadas, mientras que el resto de las pteridinas se encuentra en cantidad menor de lo esperado, con valores mucho más cercanos a los de las mutaciones simples pn y ras que a los de la mutación cl.

De forma similar, la cepa cl_pr (n^o 5) presenta en la mayor parte de las pteridinas cantidades inferiores a las

esperadas, estando éstas más cercanas a las que presenta la mutación pc que a las de la cepa clot. Sin embargo, una diferencia importante es el aumento de la cantidad de drospterinas, que llega a ser aproximadamente el doble del esperado.

La cepa se-cl (nº 6) presenta un patrón similar al de la cepa sepia, siendo en este caso determinante el bloqueo total de la síntesis de drospterinas que produce la mutación sepia. La cepa cl-Hn^{ra} (nº 7), por el contrario, presenta una clara interacción entre las dos mutaciones. Por un lado, la cantidad de drospterinas es cuatro veces superior a la esperada, y por otro las cantidades de dihidrobiopterina y biopterina son inferiores a las esperadas y similares a las que presenta el mutante simple clot. También es de destacar la presencia de un 253% de pterina, cuando esta sustancia no se detecta en el mutante Hn^{ra}. Sin embargo, aunque el mutante Hn^{ra} no acumula esta sustancia si que es capaz de producir una pequeña cantidad de dihidropterina, el precursor de la pterina, aunque la mayor parte de esta sustancia parece que es utilizada para la síntesis de drospterinas.

En la tercera clase se incluyen aquellas cepas portadoras de mutaciones que afectan a las dos rutas de síntesis. Los patrones de pteridinas que presentan se caracterizan por poseer una cantidad de drospterinas superior a la esperada, mientras que el resto de las pteridinas suele estar aumentado o presentar valores

similares a los esperados.

Dos cepas dobles mutantes de clot (ltd_cl y cl_rs^m), que tambien han sido cuantificadas, aparecen en la tabla 6 (n^os 25 y 26). La primera presenta una cantidad de drosópteras similar a la esperada con una ligera disminución en el resto de las pteridinas, a excepción de la pterina. La segunda presenta una cantidad similar a la esperada de todas las pteridinas, excepto la sepiapterina que está más acumulada de lo esperado. Aunque estas dos cepas podrían contradecir el tipo de interacción observado en las cepas de esta tercera clase, es importante destacar que el tipo de interacción que producen las mutaciones ltd y rs^m en las cepas dobles mutantes es precisamente el opuesto al que produce la mutación clot, con lo que las cepas ltd_cl y cl_rs^m podrían presentar patrones cercanos a lo esperado al anularse los dos tipos opuestos de interacciones que presentan.

Grupo_III: Otras cepas dobles mutantes cuyos patrones de pteridinas no coinciden con los esperados.

En la tabla 8 se presentan los datos de varias cepas dobles mutantes cuya principal característica en común es la de presentar un patrón de pteridinas diferente del esperado. Se han excluido de este grupo las cepas que son portadoras de las mutaciones garnet, lightoid, rose^m, ruby, clot y red Malpighian tubules, ya que estas cepas son estudiadas como

Tabla 8.- Cuantificación de pteridinas en dobles mutantes de color de ojos (III)

Otras cepas dobles mutantes cuyos patrones de pteridinas no coinciden con los esperados.

Cepa	NDP	DP	IDP	ADP	SP	ADHP	IXP	PTE	H ₂ BP	BP
(1) cn ry	7 19	9 36	9 29	22 55	183 110	121 58	ND ND	300 190	61 104	213 205
(2) pn Hn ^{r3}	TR 2	5 4	4 6	ND ND	165 736	120 392	ND ND	ND ND	78 143	171 616
(3) ras Hn ^{r3}	13 2	2 3	2 3	ND ND	104 322	97 5	TR ND	ND ND	62 74	94 440
(4) pn se	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND	342 (\$)	ND ND	44 84	142 544	261 1140	807 868
(5) ras se	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND	69 1925	ND ND	52 105	53 928	175 588	241 620
(6) pr Hn ^{r3}	9 4	4 8	4 7	ND ND	91 294	252 158	5 ND	ND ND	115 87	191 484
(7) se Hn ^{r3}	ND ND	ND ND	ND ND	ND ND	3238 (\$)	ND ND	TR ND	342 ND	1130 (\$)	454 (\$)
(8) cn Hn ^{r3}	10 8	8 17	10 18	ND ND	723 460	438 378	3 ND	ND ND	253 120	506 361

Tabla 8 (continuación)

Cepa	NDP	DP	IDP	ADP	SP	ADHP	IXP	PTE	H ₂ BP	BP
(9) Pu ² se	ND	ND	ND	ND	161	ND	8	123	219	124
	ND	ND	ND	ND	578	ND	28	848	276	248
(10) lt se	ND	ND	ND	ND	832	ND	44	262	577	205
	ND	ND	ND	ND	3300	ND	44	208	1056	(\$)
(11) cn se	ND	ND	ND	ND	2900	ND	53	669	545	322
	ND	ND	ND	ND	2750	ND	60	1520	960	508
(12) v se	ND	ND	ND	ND	2765	ND	100	1289	403	858
	ND	ND	ND	ND	(\$)	ND	105	1600	1200	620
(13) v lt	7	3	3	11	87	133	40	ND	38	123
	9	7	8	33	180	103	51	13	88	170
(14) car dke	5	5	5	15	125	139	83	21	95	248
	3	10	10	52	260	220	66	9	61	312
(15) cm dke	4	10	8	6	85	58	5	25	28	188
	6	18	18	47	260	132	13	13	41	216
(16) cm cn	22	14	13	21	120	111	6	39	79	305
	28	31	28	50	200	101	13	32	54	148
(17) cn p	27	7	8	15	109	83	63	16	102	341
	16	17	17	39	100	72	37	29	58	148
(18) v dke	14	21	21	38	115	172	54	35	46	163
	19	41	43	80	195	121	73	38	61	120

Tabla 8 (continuación)

Cepa	NDP	DP	IDP	ADP	SP	ADHP	IXP	PTE	H ₂ BP	BP
(19) sf p	17 18	12 18	11 14	26 43	20 61	110 112	68 39	27 36	41 72	157 216
(20) sf st	13 80	12 83	12 67	23 95	140 61	97 156	66 46	6 72	69 96	200 94
(21) pr ca	26 2	12 2	16 3	24 3	28 70	78 32	28 44	24 4	41 27	135 198
(22) pr p	30 8	13 8	14 7	21 9	21 64	59 30	12 51	15 12	14 42	40 198
(23) bo lix	23 19	24 22	25 23	67 85	203 320	304 270	ND ND	10 16	146 50	289 132
(24) lix dke	32 12	49 24	47 31	82 86	119 260	128 165	9 ND	10 12	91 38	180 132

(\$) Comparar el valor observado directamente con los que presentan los mutantes simples (Tabla 5).

casos particulares en otros grupos.

La cepa gn₁ry (nº 1) presenta una cantidad de drosopterinas muy inferior a la que presenta la mutación simple ry. Esta disminución de la síntesis de drosopterinas se combina con un aumento en las cantidades de sepiapterina, pterina y acetildihidrohomopterina, lo que podría indicar que la interacción entre los dos genes se situaría en el paso en el que la dihidropterina se une a la acetildihidrohomopterina para formar las drosopterinas. Al quedar bloqueado parcialmente dicho paso la acetildihidrohomopterina se acumularía, así como la dihidropterina que se transformaría en pterina.

Las mutaciones Hn^r y se se caracterizan por interrumpir la síntesis de drosopterinas produciendo, por dicha causa, un gran acúmulo de algunos de sus precursores. Cuando estas dos mutaciones se combinan con las mutaciones pn y ras, que alteran la actividad enzimática de la GTPCH, los patrones de pteridinas resultantes son mucho más parecidos a los que presentan los mutantes simples pn y ras que a los de los mutantes Hn^r y se. Esto parece indicar una epistasia por parte de las mutaciones pn y ras. Esta epistasia es casi total para el caso de la cepa pn_Hn^r (nº 2), y es solo parcial para las cepas ras_Hn^r, ras_se y pn_se (nºs 3 al 5). En las cuatro cepas mencionadas, las cantidades de drosopterinas coinciden con las esperadas (en el caso de pn_se y ras_se, ausencia total), mientras la ausencia de isoxantopterina y pterina en Hn^r se mantiene

también en las cepas pn_{Hn}^{r³} y ras_{Hn}^{r³}.

La cepa pr_{Hn}^{r³} (nº 6) presenta para las sustancias SP y BP un efecto similar al observado para los dobles mutantes de pn y ras comentados anteriormente. Aunque el mutante Hn^{r³} produce una gran acumulación de estas dos sustancias, este doble mutante presenta valores mucho más cercanos a los del mutante pr que a los esperados. El patrón de pteridinas del resto de las sustancias es mucho más variado, y mientras varias de ellas se presentan en cantidades similares a las esperadas, otras como las drospterinas se encuentran ligeramente disminuidas o ligeramente aumentada como la ADHP.

Finalizando con los dobles mutantes que presentan la mutación Hn^{r³} hemos situado también en esta tabla a las cepas cn_{Hn}^{r³} y se_{Hn}^{r³} (nºs 7 y 8). La primera presenta un patrón de pteridinas ligeramente diferente del esperado. Así, las drospterinas están disminuidas y esta disminución parece conducir a un aumento de otras pteridinas (SP, H₂BP, BP y ADHP). La cepa se_{Hn}^{r³} presenta un patrón de pteridinas más complejo. Por un lado, hay varias sustancias que están ausentes, como las drospterinas, la ADHP y la IXP. La ausencia de las dos primeras es típica de la mutación sepia, mientras que la de la segunda lo es de la mutación Hn^{r³}. Por otro lado, la SP y la H₂BP están en cantidades equivalentes a las encontradas en sepia, mientras que la BP presenta un valor similar al del mutante Hn^{r³}. Un caso especial es la presencia de pterina, a pesar de que el mutante Hn^{r³} no

presenta dicha sustancia. Esta presencia puede ser explicada porque la baja cantidad de dihidropterina que sintetiza teóricamente el mutante Hn^{ra} , al no poder unirse a la sustancia ADHP para formar drosopterinas, se metaboliza a pterina. Sin embargo, la cantidad de pterina (342%) parece muy alta para ser debida únicamente a esta razón, siendo posible también que cierto porcentaje de esta sustancia sea debido a la degradación de sepiapterina u otras pteridinas durante el proceso de extracción de las pteridinas oculares.

Otras cepas dobles mutantes que incluyen la mutación *sepia* y que presentan algún tipo de interacción entre genes son las cepas Pu^{ra}_{se} , lt_{se} , cn_{se} y v_{se} (n^o 9 al 12). En las dos primeras, el patrón de pteridinas obtenido, para la SP y BP, se parece más a los mutantes Pu^{ra} y lt que a *sepia*, mientras que la ausencia total de drosopterinas y ADHP se mantiene invariable, tanto en estas dos cepas como en las cepas cn_{se} y v_{se} . En estas dos últimas cepas, las mutaciones cn y v parecen producir una ligera interacción con la mutación *sepia*, que en el caso de la cepa cn_{se} se traduce en una disminución de H_2BP , BP y PTE frente a lo esperado, mientras que en el caso de v_{se} , solo la H_2BP está disminuida.

El resto de las cepas presenta patrones de pteridinas difíciles de explicar. Por un lado, hay una serie de cepas (v_{lt} , car_{dke} , cm_{dke} , cm_{cn} y cn_p (n^o 13 al 17)) cuyos patrones podrían ser consecuencia de interacciones similares a las descritas en el grupo I. Estas interacciones podrían

equivaler a aquellas en las que la mayor parte de las pteridinas están disminuidas, mientras que la BP está solo ligeramente disminuida frente a lo esperado. Hay incluso algunos casos en los que la BP está aumentada, como ocurría con algunas cepas del grupo I. Por otro lado, las cepas sf_p y sf_st (n^os 19 y 20) presentan una interacción equivalente, aunque en la última la disminución de drosopterina es muy grande, mientras que la SP y la BP están bastante aumentadas.

Hay, por último, cuatro cepas que presentan extrañas interacciones. Las cepas pr_ca y pr_p (n^os 21 y 22) presentan una cantidad de drosopterinas y ADHP superior a la esperada. Este aumento parece compensarse con un descenso de otras pteridinas (SP y BP). Las cepas bo_lix y lix_dke (n^os 23 y 24), que contienen mutantes que producen una disminución de las cantidades de PTE e IXP (Ferré *et al.*, 1986), presentan cantidades de H₂BP y BP aumentadas, estando el resto de las sustancias en cantidades similares a las esperadas, mientras que solo la SP se encuentra disminuida.

Grupo IV: Cepas dobles mutantes cuyo patrón de pteridinas es similar al esperado.

En la tabla 9 se presentan las cepas dobles mutantes cuyos patrones de pteridinas son, más o menos, similares a los esperados. Las combinaciones de dobles mutantes que aparecen en esta tabla son bastante variadas, aunque cabe

Tabla 9.- Cuantificación de pteridinas en dobles mutantes de color de ojos (IV)

Cepas dobles mutantes cuyo patrón de pteridinas es similar al esperado.

Cepa	NDP	DP	IDP	ADP	SP	ADHP	IXP	PTE	H ₂ BP	BP
(1) cn pr	65 41	49 34	42 32	34 18	23 64	33 29	69 55	50 37	45 46	94 90
(2) pn dke	6 4	20 11	16 18	8 15	143 208	67 96	74 58	14 13	78 58	153 168
(3) dke Hn ^{r3}	5 2	8 10	8 11	ND ND	431 598	294 495	ND ND	ND ND	123 92	361 528
(4) pn pr	27 10	15 9	12 12	12 4	41 102	31 30	55 77	24 13	54 55	89 154
(5) ras cd	11 14	8 13	8 15	TR 5	25 64	ND TR	100 86	85 47	44 46	122 93
(6) ltd cd	30 37	34 36	35 35	33 63	39 182	409 280	9 26	28 21	83 89	118 158
(7) Pu ² st	33 39	23 29	24 26	24 23	12 21	ND TR	23 20	55 32	16 22	32 31
(8) car cn	16 12	9 17	10 16	32 55	165 200	192 168	97 63	16 23	81 80	209 213
(9) cho dke	4 1	2 2	2 3	5 10	78 143	10 TR	47 38	7 18	61 79	335 840

Tabla 9 (continuación)

Cepa	NDP	DP	IDP	ADP	SP	ADHP	IXP	PTE	H ₂ BP	BP
(10) ras pr	10 8	4 5	3 5	2 1	26 45	8 TR	63 107	21 23	32 28	69 110
(11) pn ras	16 4	7 3	5 5	3 1	44 112	TR TR	100 97	37 20	55 47	87 140
(12) pn cn	25 20	28 19	17 28	13 16	62 160	23 73	84 55	54 32	118 76	165 115
(13) ras cn	21 15	9 11	7 13	4 5	29 70	TR TR	69 69	52 55	53 39	147 82
(14) cn dke	21 18	67 44	44 49	123 77	150 130	152 92	74 42	33 36	68 49	145 98
(15) dke ca	28 1	6 3	4 4	9 15	161 143	42 99	42 33	18 4	61 29	234 216
(16) dke cd	14 17	43 51	31 55	97 86	158 118	140 154	79 51	29 31	62 57	94 112
(17) dke p	3 4	6 10	5 10	17 37	139 130	52 95	42 39	14 11	59 44	184 216
(18) pr cd	35 38	19 39	21 36	18 20	33 58	50 49	67 68	26 32	55 55	62 102
(19) pr kar	78 54	21 43	21 34	16 16	30 77	37 46	42 73	34 28	55 58	67 143

Tabla 9 (continuación)

Cepa	NDP	DP	IDP	ADP	SP	ADHP	IXP	PTE	H ₂ BP	BP
(20) lix se	ND	ND	ND	ND	2662	ND	5	659	1089	411
	ND	ND	ND	ND	(\$)	ND	ND	512	744	682
(21) dke se	ND	ND	ND	ND	2148	ND	57	735	864	558
	ND	ND	ND	ND	(\$)	ND	63	608	732	(\$)

(\$) Comparar el valor observado directamente con los que presentan los mutantes simples (Tabla 5).

destacar la ausencia de interacción del gen mutante cinnabar con mutaciones como purple, carnation, prune, raspberry y dark eye, a diferencia de lo que ocurre en la cepas cn_cy o cn_red, donde el mutante cn produce una fuerte interacción con rosy y red Malpighian tubules.

Los patrones de pteridinas que se observan en la tabla 9 no son, como es lógico suponer, exactamente iguales a los esperados. Hay ligeras diferencias en las cantidades de algunas sustancias, aunque estas diferencias no se consideran suficientemente importantes como para suponer la existencia de interacción entre las mutaciones.

Grupo_V: Cepas dobles mutantes de brown.

Se han analizado los patrones cromatográficos de las cepas bw_red, bw_ca, bw_cd, cho_bw, rb_bw y bw_pr, no detectándose en ellas ninguna pteridina, y únicamente algunas pequeñas cantidades de ácido xanturénico (metabolito de la ruta de síntesis de la xantomatina). Ver tabla 10.

Como se observa, el mutante brown es epistático sobre el resto de los genes mutantes de color de ojos analizados.

Grupo_VI: Cepas dobles mutantes de red Malpighian tubules.

Cuando se combina la mutación red con otra mutación de color de ojos, el patrón de pteridinas de la cepa doble

mutante es habitualmente diferente del que cabría esperar, en base a los patrones de pteridinas de estos mutantes simples por separado. En la tabla 11 pueden observarse los patrones de pteridinas de los dobles mutantes de red. En la tabla 12 se presenta el valor total de los pigmentos rojos o drosópterininas de algunas de estas cepas. Si comparamos los patrones de pteridinas de los mutantes simples de color de ojos con el de sus respectivos dobles mutantes, se aprecia que el drástico efecto del mutante red (reducción de la cantidad de drosópterininas y acúmulo de la de biopterina) parece estar inhibido parcialmente por la presencia de las otras mutaciones de color de ojos.

Estas interacciones se producen, incluso, aunque la mutación que acompaña a red en la cepa doble mutante no afecta a la ruta de síntesis de las pteridinas como ocurre con cn, y o cd. Centrándonos en las drosópterininas o pigmentos rojos y en la biopterina, que son las sustancias en las que estas interacciones resultan más evidentes, podemos observar que la mayor parte de los dobles mutantes acumulan una cantidad de drosópterininas mayor que la esperada, mientras que son varias las cepas en las que la cantidad de biopterina pasa desde el 400% (de la del tipo salvaje), en el mutante red, hasta alrededor de un 200% (cn red, y red, ltd red, cm red y rb red). Estas interacciones resultan bastante sorprendentes si tenemos en cuenta que las mutaciones cn o y no afectan a la síntesis de pteridinas y las mutaciones cm, ltd o rb producen por sí solas una

disminución de drosópteras y un aumento de bióptera cercano a ese 200% que presenta la cepa doble mutante.

En algunas cepas como, por ejemplo, cm_red, el patrón de pteridinas es casi el mismo que el de la cepa cm (ver tabla 5) indicando que el efecto de la mutación red ha quedado prácticamente inhibido en el doble mutante.

En las cepas pn_red y pr_red la cantidad de drosópteras es similar a la esperada, mientras que las cantidades de BP, SP y H₂BP son más bajas de lo esperado. La cepa cho_red presenta también valores similares de drosópteras, mientras que la cantidad de BP es similar a la de red, a pesar de que el mutante cho acumula en gran cantidad esta sustancia.

La cepa cl_red presenta un patrón de pteridinas muy diferente del esperado en el que, probablemente, a la interacción que produce el mutante red se suma el tipo de interacción producido por el mutante clot (ver grupo II).

La única cepa que presenta un patrón de pteridinas similar al esperado es la cepa dke_red.

3.5. Estudio de la interacción producida por el mutante red

Los datos sobre los dobles mutantes de red presentados en el apartado anterior parecen indicar que las interacciones que se observan entre red y otros mutantes de color de ojos son debidas a la presencia o ausencia de alguno de los compuestos intermediarios de la ruta de

Tabla 11.- Cuantificación de pteridinas en dobles mutantes de color de ojos (VI)

Cepas dobles mutantes de red Malpighian tubules.

Cepa	NDP	DP	IDP	ADP	SP	ADHP	IXP	PTE	H ₂ BP	BP
(1) cd red	16 7	13 5	12 7	29 22	132 91	195 119	36 40	55 32	125 90	407 391
(2) cl red	23 2	22 3	21 3	17 2	1420 1400	ND ND	73 61	495 212	680 451	406 1092
(3) cm red	46 2	28 2	27 2	53 12	161 200	254 102	24 10	26 14	104 64	197 756
(4) cn red	63 7	35 4	32 6	82 20	95 100	200 71	30 32	53 38	76 77	210 344
(5) cho red	TR TR	TR TR	TR TR	TR 3	39 110	33 TR	35 29	25 19	61 125	320 (\$)
(6) dke red	4 2	5 3	6 4	12 19	88 130	84 94	22 34	21 15	71 59	410 504
(7) ltd red	15 3	11 2	10 2	34 14	89 200	160 170	17 17	19 10	73 91	188 714
(8) pn red	5 2	3 2	2 2	4 4	30 160	TR 74	50 45	16 14	46 91	178 588
(9) pr red	7 4	5 2	2 3	7 4	19 69	20 30	38 44	22 16	30 56	125 462

Tabla 11 (continuación)

Cepa	NDP	DP	IDP	ADP	SP	ADHP	IXP	PTE	H ₂ BP	BP
(10) rb red	28 3	16 1	15 3	31 12	128 169	130 80	26 15	17 15	75 48	236 630
(11) v red	17 7	9 4	10 6	42 20	47 150	169 94	23 56	36 40	78 96	183 420

Tabla 12.- Cuantificación conjunta de las drosópteras en las cepas mutantes de red

Los valores se expresan en porcentajes sobre la cantidad de drosópteras de la cepa Oregon-R.

Cepa	Drosópteras
red	8.5 ± 0.7
cd red	14.9 ± 1.1
cn red	42.2 ± 0.4
v red	16.0 ± 0.3
ltd red	18.0 ± 1.0
cm red	24.6 ± 2.0
rb red	13.2 ± 0.5
cl red	24.5 ± 0.5
cho red	1.5 ± 0.1
v cn red	45.3 ± 2.3

síntesis del pigmento marrón.

La observación de los patrones de pteridinas de los dobles mutantes de red (tabla 11) indica que estas interacciones parecen bastante complejas caracterizándose, sobre todo, por un incremento en la cantidad de drosopterinas y una disminución de la cantidad de biopterina frente a los valores esperados.

Estudiando las cantidades de estas dos pteridinas en los dobles mutantes de red, se observa que aquellas cepas que además de la mutación red son portadoras de una mutación que afecta específicamente a la ruta de síntesis de las pteridinas, presentan un patrón de pteridinas similar al esperado (teniendo en cuenta una aditividad de los efectos de las dos mutaciones). Sin embargo, los mutantes que afectan específicamente a la ruta de síntesis del pigmento marrón o que afectan a las dos rutas de síntesis producen al combinarse con red una interacción en las cepas dobles mutantes.

Centrándonos en aquellos mutantes cuyo efecto sobre la ruta de síntesis del pigmento marrón está bien caracterizado, se puede observar que los mutantes cinnabar y lightoid que impiden la síntesis de 3-hidroxiquinurenina presentan una clara interacción en las cepas dobles mutantes. Por el contrario, el mutante cardinal que acumula esta sustancia al no poder transformarla totalmente en pigmento marrón, presenta una cantidad de biopterina similar a la del mutante red y algunas variaciones en el resto de

las pteridinas, sobre todo drosopterinas y sepiapterina.

Estos resultados nos llevaron a pensar que era, precisamente, la 3-hidroxiquinurenina el metabolito que producía con su ausencia el cambio en el patrón de pteridinas. Sin embargo, lo que no parecía estar muy claro era la razón por la cual la cepa y_red presentaba una cantidad de drosopterinas solo ligeramente superior a la de red y no similar a la de cn_red como habría sido lógico esperar, si tenemos en cuenta que el mutante y produce un defecto enzimático anterior al del mutante cn y, por tanto, a la síntesis de 3-hidroxiquinurenina.

Para comprobar que la falta de 3-hidroxiquinurenina era la causa de que la cepa cn_red presentara un patrón de pteridinas tan diferente del de red, realizamos una experiencia de suplementación de la dieta con esta sustancia. Los resultados obtenidos con las cepas red y cn_red se presentan en la tabla 13. Estos resultados indican que cuando la cepa cn_red crece en un medio suplementado con 3-hidroxiquinurenina, la cantidad de drosopterinas disminuye hasta valores cercanos a los de la cepa red, mientras que la biopterina aumenta llegando a alcanzar casi los valores del mutante red. Por el contrario, se observa una extraña interacción ya que la cantidad de sepiapterina aumenta ligeramente en la cepa cn_red suplementada, mientras los valores de las cepas sin suplementar y el de la cepa red suplementada son similares.

Aunque la experiencia de suplementación indica que la

Tabla 13.- Patrones de pteridinas de las cepas cn red y red crecidas en medio normal o en medio suplementado con 3-hidroxiquinurenina (HQ).

Los valores se expresan en forma de unidades de fluorescencia (4 repeticiones por cepa), excepto para el compuesto ADHP, para el cual los valores representan el área de la mancha sobre la placa (mm²).

Sustancia	red	red (HQ)	cn red	cn red (HQ)
NDP	6.8 ± 0.9	6.4 ± 0.5	26.4 ± 1.6	11.7 ± 0.7
DP	20.4 ± 5.6	14.8 ± 2.4	70.1 ± 9.6	31.3 ± 3.0
IDP	5.7 ± 0.5	5.8 ± 0.4	19.7 ± 1.4	9.9 ± 1.0
ADP	9.0 ± 0.2	6.9 ± 0.3	22.0 ± 3.8	13.7 ± 1.3
SP	90.4 ± 15.9	115.6 ± 5.4	93.5 ± 16.4	143.1 ± 9.5
ADHP	72.3 ± 8.1	73.5 ± 9.2	108.0 ± 20.9	86.4 ± 7.2
H ₂ BP	2.8 ± 0.2	3.3 ± 0.4	3.5 ± 0.1	3.5 ± 0.2
BP	19.3 ± 1.8	19.7 ± 0.9	9.1 ± 1.2	17.8 ± 1.5
PTE	2.2 ± 0.4	2.8 ± 0.5	3.1 ± 0.5	2.8 ± 0.4

3-hidroxiquinurenina tiene un efecto inhibitor sobre la síntesis de drosópteras y activador de la de biopterina, parece que estos efectos están reducidos a aquellas cepas mutantes que presentan la mutación red, ya que cepas mutantes simples como cinnabar o vermilion presentan cantidades de drosópteras y biopterina similares a las de la cepa tipo salvaje (ver tabla 5). La comprobación de que la presencia de 3-hidroxiquinurenina altera el patrón de pteridinas en los dobles mutantes de red, nos llevó a cuantificar las cantidades de 3-hidroxiquinurenina presentes en la cepa red y en varias cepas dobles mutantes (tabla 14).

Para detectar la causa enzimática de estas alteraciones del patrón de pteridinas, se optó por estudiar las actividades de la enzima GTP ciclohidrolasa, al ser red uno de los mutantes de *Drosophila melanogaster* que presenta una actividad disminuida de la enzima (Mackay y O'Donnell, 1983). Las actividades enzimáticas encontradas en los dobles mutantes pueden observarse en la tabla 15. Si se comparan estas actividades con las cantidades de 3-hidroxiquinurenina de cada cepa puede observarse una buena correlación negativa (figura 22). Sin embargo, esta correlación se reduce a las cepas dobles mutantes de red, ya que la cepa Oregon R (tipo salvaje) presenta una actividad enzimática muy superior a la que cabría esperar si el compuesto 3-hidroxiquinurenina afectara a su actividad. De la misma forma, las actividades de la enzima GTP ciclohidrolasa de las cepas de mutantes simples cn, y y cd (tabla 15) resultaron similares a la de

Tabla 14.- Cuantificación de 3-hidroxiquinurenina

Valores de absorbancia (400 nm) usados para estimar la cantidad de 3-hidroxiquinurenina.

Cepa	Absorbancia	% Oregon R
Oregon R	0.364	100 ± 2
cho red	0.239	66 ± 1
red	0.201	55 ± 8
cd red	0.188	52 ± 1
cm red	0.124	34 ± 5
rb red	0.088	24 ± 1
ltd red	0.035	10 ± 5
v red	0.017	5 ± 3
cn red	0.013	4 ± 3

Tabla 15.- Actividades de la enzima GTP ciclohidrolasa.

Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que produce un nmol de dihidroneopterina trifosfato en una hora de reacción. El n^o de repeticioones de cada cepa está entre paréntesis.

Cepa	Unidades enzimáticas	% Oregon R
Oregon R (7)	5.17 ± 0.37	100 ± 6
cho red (4)	3.06 ± 0.33	66 ± 5
red (6)	3.11 ± 0.28	67 ± 5
cd red (4)	3.47 ± 0.64	73 ± 10
cm red (5)	4.73 ± 0.33	93 ± 5
rb red (4)	7.06 ± 0.63	131 ± 10
ltd red (4)	6.45 ± 0.69	121 ± 11
v red (6)	4.04 ± 0.58	82 ± 9
cn red (5)	6.40 ± 0.31	120 ± 5
pn red (4)	0.75 ± 0.18	25 ± 4
pr red (2)	3.27 ± 0.02	72 ± 0
v cn red (6)	4.43 ± 0.30	89 ± 4
v (2)	4.81 ± 0.01	95 ± 0
cn (2)	4.77 ± 0.10	94 ± 2
cd (2)	5.03 ± 0.22	98 ± 3

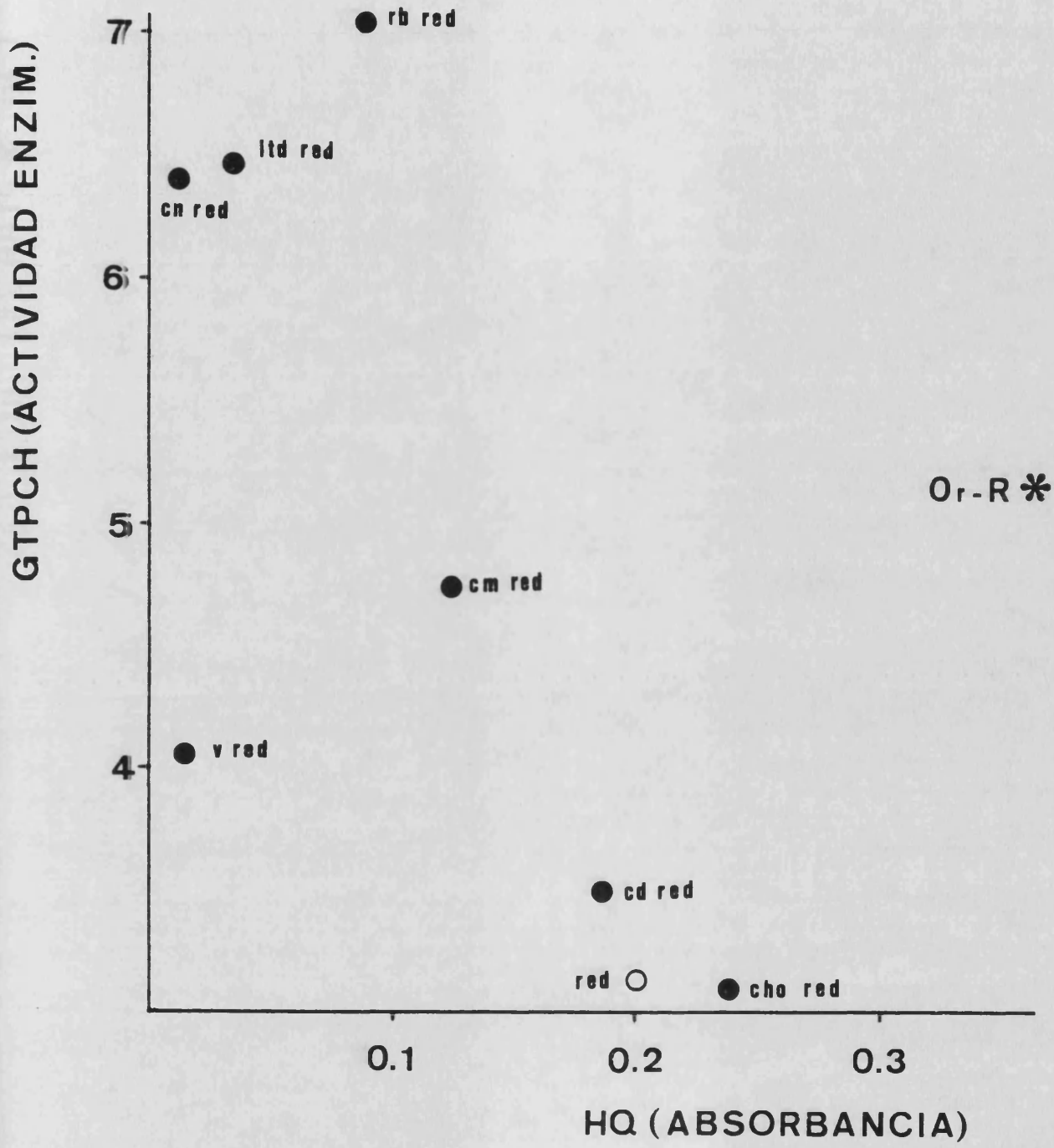


Figura 22.- Correlación entre la actividad enzimática GTP ciclohidrolasa y la cantidad de 3-hidroxiquinurenina.

la cepa Oregon R, indicando que la presencia o ausencia de 3-hidroxiquinurenina en ellas no afecta esta actividad enzimática, y que, por tanto, el defecto genético provocado por la mutación red es necesario para que esta sustancia afecte a la síntesis de pteridinas.

Para comprobar el efecto de la 3-hidroxiquinurenina sobre la actividad GTP ciclohidrolasa se volvió a realizar una experiencia de suplementación con este metabolito en la cepa cn_red, encontrándose que cuanto más grande era la cantidad suplementada menor era la actividad de la enzima GTPCH (tabla 16).

En la figura 22 aparecen dos excepciones a la correlación inversa entre las cantidades de 3-hidroxiquinurenina (HQ) y la actividad GTPCH. Son las cepas rb_red y v_red. La segunda es la que parece tener más importancia, pues dado su nivel de 3-hidroxiquinurenina debería tener una actividad GTPCH similar a la de cn_red. Para explicar esta excepción intentamos comprobar alguna de las siguientes hipótesis: 1) el alelo mutante vermilion con el que sintetizamos la cepa v_red es capaz de sintetizar una pequeña cantidad de HQ, la cual es suficiente para inhibir la actividad GTPCH hasta el valor de la cepa v_red, y 2) el triptófano que se acumula en la cepa v_red, por acción de la mutación vermilion, es el responsable de la actividad GTPCH inferior a la esperada.

La primera hipótesis no resulta muy plausible, pues la cantidad de HQ que se correspondería con la actividad GTPCH

Tabla 16 .- Actividad de la enzima GTP ciclohidrolasa en las cepas cn red y red crecidas en medio normal o en medio suplementado con 1 y 2 mg. de HQ.

La asimilación de HQ fue detectada por la cantidad de pigmento marrón sintetizada.

La actividad GTPCH fue medida en extractos obtenidos con la mitad del nº de moscas habitual.

Cepa	<u>GTPCH</u>	<u>Pigmento marrón</u>	
	Unid. enzimáticas	Absorbancia	% Or-R
cn red	3.11 ± 0.03	0.0068	4.5
cn red (HQ-1 mg)	2.36 ± 0.04	0.0155	11.0
cn red (HQ-2 mg)	1.78 ± 0.02	0.0415	28.0
red	1.28 ± 0.02	0.0455	31.0

de y__red sería del orden de un 40% de la de Oregon R. Intentamos, sin embargo, detectar alguna traza de esta sustancia por cromatografía en papel y revelado con p-nitranilina (Ikemoto, 1981). El resultado obtenido fue que la cantidad de HQ presente en la cepa y__red era inferior a un 2-3%, ya que este porcentaje de HQ podía ser detectado en un extracto de Oregon R usado como blanco.

Para poder verificar el posible efecto del triptófano sobre la síntesis de drosopterinas y la actividad GTPCH realizamos una experiencia de suplementación de la dieta con triptófano en la cepa y__red. Elegimos esta cepa al estar seguros que el triptófano que asimilara el organismo no podría ser metabolizado a otras sustancias de la ruta de síntesis del pigmento marrón, perdiéndose así su efecto. Esta experiencia tenía, sin embargo, el inconveniente de que la cepa tomada como testigo (y__red sin suplementar) ya acumulaba triptófano por el defecto metabólico de vermilion, con lo que sólo detectaríamos si una mayor acumulación de triptófano producía un mayor efecto sobre el patrón de pteridinas.

En la tabla 17 puede observarse el efecto del triptófano sobre las cantidades de drosopterinas y biopterina en la cepa y__red. Ambas sustancias se encuentran ligeramente disminuidas en la cepa suplementada frente a la no suplementada. Se midió, también, la actividad GTPCH en la cepa suplementada observándose una ligera disminución de ésta. Por otro lado, la cepa y__red suplementada con

Tabla 17.- Cuantificación de biopterina, drosopterinas y actividad de la enzima GTP ciclohidrolasa en las cepas v red y red crecidas en medio normal o en medio suplementado con 0.1 y 0.2 gr. de triptófano.

trp-1 suplementación con 0.1 gr. de triptófano y trp-2 suplementación con 0.2 gr.

Cepa	<u>Biopterina</u>		<u>Drosopterinas</u>		<u>GTPCH</u>	
	Fluorescencia	% Or-R	Absorbancia	% Or-R	Unid. enzimáticas	
v red	22.0 ± 1.2	258 ± 16	0.127 ± 0.002	13	2.46 ± 0.04	
v red trp-1	21.0 ± 2.3	245 ± 31	0.121 ± 0.004	12.5	2.10 ± 0.24	
v red trp-2	19.2 ± 0.1	218 ± 2	0.095 ± 0.004	10	-- --	
red	34.0 ± 1.3	450 ± 17	0.059 ± 0.003	6.5	1.28 ± 0.02	
Or-R (300%)	24.6 ± 0.8	300 ± 11	-- --	--	-- --	
Or-R (100%)	11.5 ± 0.3	100 ± 4	-- --	--	-- --	
Or-R (40%)	-- --	-- --	0.368 ± 0.001	40	-- --	
Or-R (20%)	-- --	-- --	0.214	20	-- --	

triptófano presentó una drástica disminución de viabilidad (7% de supervivientes con 0.2 mg de triptófano y alrededor de un 0% con 0.3 mg o más). Esto contrasta con los valores observados para la cepa vermilion suplementada con 0.3 g, donde la disminución de la viabilidad (37% de supervivientes) es mucho menos drástica.

La síntesis de una cepa portadora de las mutaciones v, cn y red pareció indicar que la acumulación de triptófano en la cepa v__red no era la causa de que su actividad GTPCH fuera distinta de la de la cepa cn__red. La cepa v_cn_red presentaba un fenotipo de color de ojos similar al de cn_red. Se comprobó que este fenotipo era debido a que ambas cepas presentaban una cantidad de drosopterinas casi idéntica (ver tabla 12).

El análisis de la actividad enzimática GTPCH de la cepa v__cn__red nos reportó la sorpresa de encontrar una actividad del 89% (tabla 15), valor que se encuentra mucho más cerca del de v_red que del de cn_red, y que no concuerda con el valor de drosopterinas encontrado en la cepa v__cn_red.

Como el fenotipo de color de ojos de la cepa v_cn_red era sorprendentemente diferente del de v_red, especulamos con la posibilidad de que aunque la cepa v_red no poseyera HQ, si fuera capaz de producir un compuesto erróneo en el paso enzimático bloqueado por el gen vermilion (triptófano oxigenasa), el cual pudiera metabolizarse a algún compuesto capaz de producir un efecto similar al de la HQ. En

presencia de la mutación cn, este compuesto no se produciría con lo que la síntesis de pigmentos rojos sería similar a la de cn_red.

Utilizamos el método de Ehrlich para la detección de aminos. Tras el revelado de los cromatogramas de las cepas y bw, y_red y y_cn_red no pudimos detectar ninguna diferencia, siendo una mancha de color violeta, que correspondía al triptófano, la única que aparecía en cantidades apreciables.

Los resultados presentados hasta este momento indican que cuando la síntesis de HQ está interrumpida la actividad de la enzima GTP ciclohidrolasa es inferior a la del individuo normal, y que esta inhibición sólo se produce cuando la mutación red está presente. Para poder determinar cual era el tipo de inhibición se recurrió a realizar una experiencia de inhibición directa del enzima por el compuesto HQ, utilizando para ello la cepa cn_red que no presenta esta sustancia. Como testigo se utilizó la cepa Oregon R, ya que in vivo no se produce en ella ninguna inhibición.

En la figura 23 se observa un experimento consistente en incubar extractos de Oregon R y cn_red a distintas concentraciones y con la presencia o ausencia de HQ. Como se puede observar, estos datos parecían indicar que tanto el enzima GTPCH de Oregon R como el de cn_red eran inhibidos por la HQ. Como in vivo no se había observado ninguna inhibición de la actividad enzimática en la cepa Or-R se optó por confirmar esta inhibición mediante la adición de HQ

a una solución de pterina.

Como se observa en la figura 24 la fluorescencia de la solución de pterina decrece con la adición de HQ de forma proporcional a la concentración de pterina. Estos resultados indicaron que la supuesta inhibición observada en la figura 23 era un artefacto, debido probablemente a un efecto secuestrador de la fluorescencia por parte de la HQ.

Con el fin de comprobar si una parte de esta disminución podía ser debida realmente a la inhibición de la enzima, se realizó una experiencia en la que la mitad de los extractos fueron incubados con HQ y la otra mitad sin ella. Antes de la medición de la fluorescencia se añadió HQ a los extractos que no la poseían y se pasó a medirlos comparándolos con los que habían tenido HQ durante toda la incubación. Los resultados obtenidos (figura 25) mostraron unas ligeras diferencias. El hecho de que éstas se produjeran no solo en la cepa cn_red, sino también en la cepa tipo salvaje, en la cual no se observa inhibición in vivo, indicó que probablemente eran debidas a que la HQ incubada a 42° tuviera una mayor facilidad de secuestrar la fluorescencia.

Un segundo efecto de la HQ sobre la síntesis de pteridinas consiste en el aumento de la cantidad de biopterina (ver tabla 13). Este aumento es contradictorio con el hecho de que la HQ produzca una disminución de la actividad de la enzima GTPCH, ya que ésta es la primera enzima de la ruta de síntesis y, por tanto, una actividad

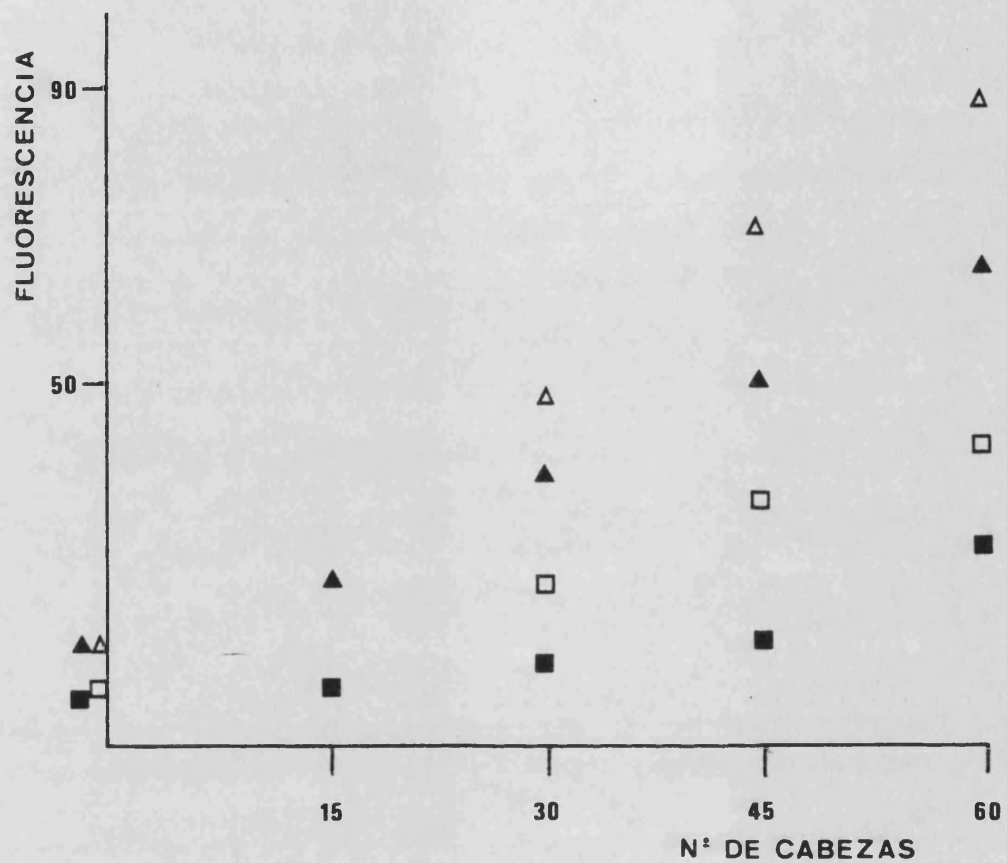


Figura 23.- Comparación de los ensayos enzimáticos GTPCH incubados con o sin 3-hidroxiquinurena.

Los símbolos que corresponden a cada tipo de ensayo son: cn red sin HQ (Δ), cn red con HQ (□), Or-R sin HQ (▲) y Or-R con HQ (■).

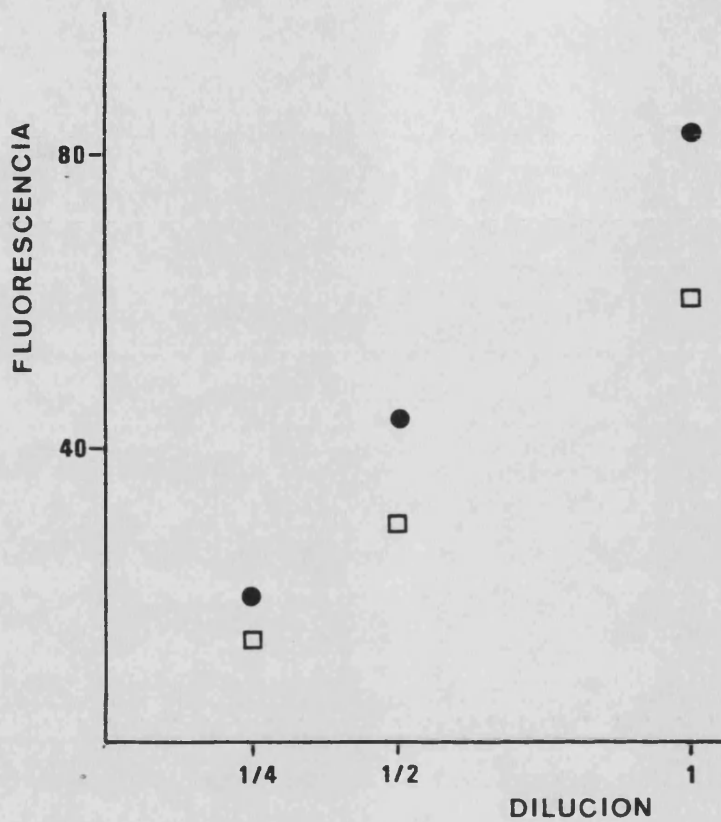


Figura 24.- Efecto de la 3-hidroxiquinurenina sobre la fluorescencia de una solución de pterina.

Fluorescencia de las soluciones de pterina (●) y de las soluciones de pterina con HQ (□).

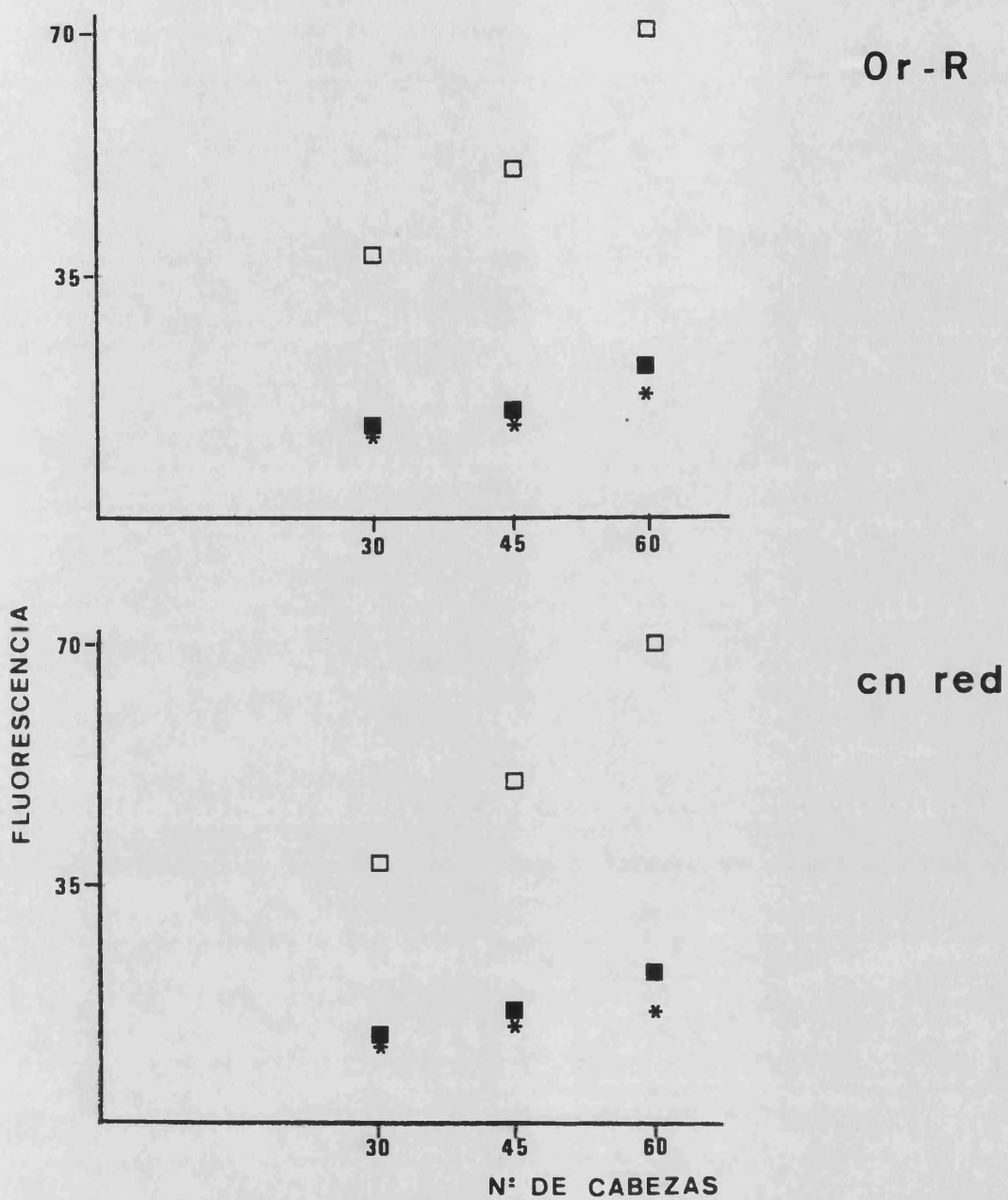


Figura 25.- Ensayo enzimático GTPCH.

Fluorescencia de los extractos incubados con HQ (■), sin HQ (□) y de aquellos incubados sin HQ, a los que se añadió esta sustancia inmediatamente antes de su medición (*).

menor conduciría a una disminución de las cantidades de todas las pteridinas.

Para explicar este hecho contradictorio se intentó, en primer lugar, comparar la cantidad de biopterina y la actividad GTPCH en el mismo momento del desarrollo, ya que la primera se media a los nueve días (se ha producido la total deposición de los pigmentos oculares) y la segunda en moscas recién nacidas (máximo pico de actividad enzimática). Se realizó una cuantificación de la biopterina en moscas recién nacidas de las cepas cn_red, red y Or-R (tabla 18). Los valores relativos obtenidos para las cepas cn_red y red eran similares a los que se detecta a los 9 días de edad. Sin embargo, las cantidades absolutas de biopterina eran, como cabía esperar, mucho más bajas que a los nueve días.

Para detectar si este aumento de biopterina era producido por un efecto activador de la HQ sobre alguna de las enzimas que actúan en la ruta que conduce a la síntesis de biopterina (figura 3), se optó por estudiar algunas de estas enzimas. Las enzimas elegidas fueron la biopterina sintasa o sepiapterina reductasa y la dihidropterin oxidasa. Se eligieron ambas al haber sido descrito un método para la medición conjunta de sus actividades (Ferré y Jacobson, 1985).

En la tabla 19 se presentan los datos de actividad enzimática de las cepas Or-R, cn_red y red. Las cepas cn_red y red presentan actividades de la enzima dihidropterin oxidasa inferiores a las de Or-R. Por el contrario, los

valores de actividad de la enzima biopterina sintasa de las cepas mutantes no son significativamente diferentes del valor de la misma en Qr-R.

Tabla 18.- Cuantificación de biópterina en moscas de un día de edad

Cepa	Fluorescencia	% Oregon R
red	4.0 ± 0.4	410
cn red	1.6 ± 0.3	165
Or-R (400%)	3.9 ± 0.2	-
Or-R (200%)	1.9 ± 0.0	-
Or-R (100%)	1.2 ± 0.0	-

Tabla 19.- Actividades enzimáticas biópterina sintasa y dihidropterina oxidasa

Los resultados se expresan en nanomoles de sepiapterina metabolizados.

Cepa	H ₂ PTE oxidasa	BP sintasa
Or-R	nmoles 13.31 ± 0.37	2.11 ± 0.34
	(% Or-R) 100 ± 3	100 ± 16
red	nmoles 10.23 ± 0.10	2.07 ± 0.92
	(% Or-R) 77 ± 1	98 ± 44
cn red	nmoles 9.21 ± 0.24	2.48 ± 0.41
	(% Or-R) 69 ± 2	118 ± 19

4. DISCUSSION

Una parte de los métodos utilizados durante la realización de este trabajo, han sido mejorados sustancialmente respecto a los descritos en la bibliografía. El método utilizado para la cuantificación de las pteridinas está basado en los descritos por Wilson y Jacobson (1977a) y Ferré et al. (1986). El método consistía en separar las pteridinas en cromatogramas bidimensionales, realizando posteriormente su cuantificación mediante la emisión fluorescente de las manchas del cromatograma.

La primera variación introducida a este método consistió en separar en dos extractos diferentes los cuerpos y las cabezas de las moscas. En los cuerpos de las moscas se acumulan varias pteridinas, siendo la isoxantopterina la que lo hace en cantidades mayores. En cabezas, por el contrario, esta sustancia apenas se detecta. Puesto que la isoxantopterina que íbamos a cuantificar estaba mayoritariamente presente en los cuerpos, realizamos un extracto independiente con ellos y cuantificamos la sustancia por fluorescencia en cromatogramas unidimensionales realizados en el solvente isopropanol/2% acetato amónico (1:1). De esta forma conseguimos que la mancha de IXP no viera afectada su forma y, por tanto, su concentración por la presencia de las otras pteridinas. Al mismo tiempo, se obtuvo una mayor resolución de los cromatogramas realizados con extractos de cabezas, al eliminar las sustancias corporales, que habitualmente afectaban al desarrollo de los cromatogramas.

La segunda variación del método consistió en disminuir la cantidad de líquido depositado sobre el cromatograma en cada toque (aproximadamente 0.5 microlitros), manteniendo el mismo volumen de muestra por cromatograma. Esta variación era muy importante, puesto que la ventana (o rendija) del accesorio del espectrofluorímetro, utilizada para medir las placas de cromatografía, era siempre menor que las manchas que se medían, con lo que a igualdad en la cantidad de sustancia los resultados podían ser muy diferentes si variaba el área de la mancha.

Fue, por esta razón, por lo que se planteó la realización de barridos sobre las manchas cromatográficas, método que ya había sido descrito en numerosos trabajos sobre cuantificación por fluorescencia de manchas cromatográficas. Aunque probamos a aplicar el método a todas las manchas cromatográficas, y observamos que los errores obtenidos eran siempre menores que si se cuantificaba solo el máximo de fluorescencia de cada mancha, nos encontramos con que el tiempo necesario para realizar estos barridos era siempre muy elevado, con lo que presentaba la desventaja de requerir mucho tiempo para cuantificar cada placa. Por dicha razón, limitamos la utilización de los barridos a las manchas de sepiapterina y drosopterina, ya que estaban entre las manchas de mayor tamaño que aparecían en los cromatogramas y tenían, además, bastante importancia en la ruta de síntesis de las pteridinas.

Una variación introducida en este método fue la de

restar de los máximos fluorescentes la fluorescencia que presentaba la celulosa en cada placa. En el caso de las sustancias de fluorescencia roja o amarilla, la fluorescencia de la celulosa era muy baja y apenas afectaba, pero para las sustancias de fluorescencia azulada, la intensidad fluorescente de la celulosa era, proporcionalmente, bastante alta frente a las sustancias que se cuantificaban.

La acetildihidrohomopterinina, cuya mancha en los cromatogramas fue descubierta por Wilson y Jacobson (1977a), siendo bautizada como "quench spot" por su capacidad de secuestrar la fluorescencia emitida por la celulosa, presentaba el inconveniente de tener que ser medida únicamente por la superficie del área de su mancha sobre el cromatograma (Ferré et al., 1986). Wilson y Jacobson (1977a) habían descrito que esta sustancia se volvía fluorescente cuando era cromatografiada en solventes alcohólicos a bajo pH, atribuyéndolo al hecho de que las pteridinas al hidratarse perdían su aromaticidad y, por tanto, su fluorescencia.

Las pruebas llevadas a cabo por Ferré et al. (1986) con solventes alcohólicos no permitieron la detección de fluorescencia en la ADHP, al menos a las 24 horas de secado de los cromatogramas. Sin embargo, nosotros pudimos observar que cuando las placas de cromatografía eran dejadas secar durante algún tiempo en la oscuridad, podía observarse una cierta fluorescencia verde oliva en la mancha, la cual,

tras realizar su espectro de emisión, se situaba sobre los 512 nm. Como las condiciones de secado eran difíciles de controlar, se optó por utilizar este tipo de cuantificación únicamente entre placas que habían sido dejadas secar al mismo tiempo. La cuantificación se realizó por barrido de fluorescencia, dado que, en cualquier caso, la fluorescencia de la sustancia no era muy alta.

Por último, hemos podido desarrollar un nuevo método de cuantificación de la isoxantopterina, sin realizar la separación de la sustancia por cromatografía, que resulta mucho más rápido y preciso. Con este método, se obtiene un extracto bruto, con todas las pteridinas, en el cual se cuantifica la IXP en base a sus máximos de excitación y emisión fluorescentes. Para determinar el efecto de las otras pteridinas sobre la cuantificación de la IXP se llevó a cabo un experimento en el que se comparó la fluorescencia de extractos de cuerpos de machos y de hembras en la cepa tipo salvaje y en el mutante marron-like, al que no se le ha detectado IXP por otros métodos. Los resultados obtenidos indicaron que el efecto de las otras pteridinas del extracto era inferior al 1%.

Se ha desarrollado un nuevo método para la medición de la actividad GTP ciclohidrolasa en *Drosophila*. Este método está basado en las técnicas descritas por Fan y Brown (1976) en *Drosophila*, utilizando isótopos radiactivos y por Fukushima *et al.* (1977) en aves, detectando la actividad en

base a la fluorescencia del producto de reacción. El nuevo método, descrito en este trabajo, utiliza la emisión fluorescente del producto de reacción como método de cuantificación de la actividad enzimática. Para que esta cuantificación fuera correcta era necesario eliminar totalmente las pteridinas presentes en los extractos de *Drosophila*, a diferencia de lo que ocurría en los extractos de tejidos de aves en los que las pteridinas eran muy poco abundantes. Se utilizó la técnica de Neal y Florini (1973) con la cual las proteínas quedaban separadas de los compuestos de bajo peso molecular. Tras la incubación a 42 grados durante una hora, se utilizó la misma técnica empleada por Fukushima *et al.* (1977) para oxidar la dihidroneopterina trifosfato formada, ya que el compuesto oxidado era mucho más fluorescente.

Se ha descrito la presencia de un gran número de pteridinas en *Drosophila melanogaster*. La existencia de esta gran variedad se debe a que, en este insecto, las pteridinas presentan un gran número de funciones, y al hecho de que se acumulen en gran cantidad en los ojos en forma de pigmento. El bloqueo de la síntesis de algunas pteridinas por parte de ciertas mutaciones, produce la acumulación de otras pteridinas que habitualmente no podrían detectarse en la cepa tipo salvaje, por estar en muy baja cantidad.

Schwinck y Mancini (1973) observaron la existencia de cinco tipos de pteridinas de color rojo (drosopterinas) en

los cromatogramas de varias cepas de D. melanogaster: la neodrosópterinina, la drosópterinina, la isodrosópterinina, la aurodrosópterinina y la fracción "e".

Theobald y Pfleiderer (1978) determinaron la estructura de la drosópterinina e isodrosópterinina como dos estereoisómeros de la misma molécula. Rokos y Pfleiderer (1975) determinaron parcialmente las estructuras de la neodrosópterinina y aurodrosópterinina, la primera de las cuales era un isómero cis-trans de la drosópterinina e isodrosópterinina. Estos mismos autores detectaron dos formas racémicas de la aurodrosópterinina, pero estas dos formas no habían sido detectadas en cromatogramas de extractos de moscas. Con las mejoras introducidas a la técnica de cromatografía en capa fina, hemos podido detectar la presencia de estas dos formas racémicas, no habiendo sido detectadas con anterioridad debido al fuerte solapamiento de las dos sustancias (figura 20).

Respecto a las otras sustancias que componen las drosópterininas, se pueden también observar, en los solventes que utilizamos habitualmente, la neodrosópterinina, la drosópterinina y la isodrosópterinina.

La fracción "e" fue descrita por Schwinck y Mancini (1973) como una sustancia de fluorescencia y color rojo (como la neodrosópterinina). Esta sustancia se detectaba en cromatografía bidimensional con los solventes ácido acético 1M y propanol-2% acetato amónico (2:1). Utilizando unos solventes similares pudimos detectar esta sustancia,

encontrándonos con que, al igual que ocurría con la aurodrosopterina, estaba formada por la superposición de dos manchas, probablemente formas racémicas. En los solventes utilizados habitualmente para revelar nuestros cromatogramas, esta sustancia se sitúa en una posición muy cercana a la que ocupa la neodrosopterina, por lo que es muy difícil de distinguir.

El ácido dihidropterín carboxílico (mancha nº 18) aparece en varias cepas mutantes que acumulan grandes cantidades de pteridinas, al tener interrumpida la síntesis de drosopterina. El hecho de que esta pteridina esté formada por un anillo de dihidropterina y una cadena lateral en posición 6, formada por un único carbono, nos llevó a plantearnos la pregunta de si podía tratarse de una sustancia intermediaria en insectos entre las pterinas con cadenas laterales de 3 carbonos y la dihidropterina, de forma similar a lo que ocurre en esta vía en *E. coli*, donde el producto intermediario que se forma es la 6-hidroximetildihidropterina (Brown, 1971). En las cepas $Or-R$ y Hn^{ra} no se detectó la sustancia, mientras que en la cepa se_Hn^{ra} se encontró una cantidad similar a la de la cepa se . Dado que la mutación Hn^{ra} es, probablemente, la que controla el primer paso enzimático entre la PH_4PTE y la H_2PTE (Ferré et al., 1986), no parece que esta sustancia pueda ser considerada un intermediario en esta ruta de síntesis, sino más bien un producto de degradación producido por la acumulación de grandes cantidades de pteridinas en

los mutantes se y se_Hn^{ra}.

La dihidroformilpterina (mancha nº 8) es otro compuesto sin localizar en la ruta de síntesis de las pteridinas, el cual había sido detectado en D. melanogaster por Ferré (1984). El análisis del patrón de pteridinas de la cepa cn-pr^{ca}/pr^{mb}se nos permitió observar, en primer lugar, que la mancha nº 8 estaba formada por la superposición de dos sustancias y, en segundo lugar, que su acumulación estaba ligada a la disminución de la actividad de la enzima piruvoiltetrahydropterina sintasa (o sepiapterina sintasa A). Esto era algo similar a lo encontrado para la neopterina (mancha nº 15), la cual se acumula preferentemente en aquellas cepas que son portadoras de una mutación de dicha enzima (mutación purple). Puesto que un defecto en dicha enzima produce la acumulación de dihidroneopterina trifosfato, es evidente que estas dos sustancias provienen de dicho compuesto, quedando en el aire si son productos de existencia real in vivo o solo productos de degradación de la dihidroneopterina trifosfato, producidos durante la extracción de las pteridinas.

Se han descrito dos nuevas manchas (nº 29 y 30, figura 20), de las cuales la primera corresponde por su Rf en el segundo solvente y fluorescencia a la formilpterina, mientras que la segunda posee unos máximos de fluorescencia similares a los encontrados para el ácido dihidropterín carboxílico. Ambas sustancias son, probablemente, productos de degradación. En el caso de la formilpterina, esta sería

el producto de oxidación de la dihidroformilpterina producido durante el secado entre los dos solventes de cromatografía.

La formación de cepas con dos mutaciones de color de ojos suele provocar, en algunos casos, patrones de pteridinas que no coinciden exactamente con lo que cabría esperar si se produjera la simple adición de los efectos de cada mutación. Para facilitar la discusión, las cepas dobles mutantes han sido agrupadas en base al tipo de interacción que producen.

Uno de los tipos de interacciones más fuertes que se producen al combinar mutaciones de color de ojos en *Drosophila melanogaster* está representado por las cepas del grupo I. Las cepas dobles mutantes que llevan dos de las mutaciones garnet, lightoid, ruby y rose², presentan una cantidad de pteridinas muy inferior a la esperada. Estas mismas mutaciones suelen presentar interacciones con la mayor parte del resto de mutantes de color de ojos. De esta forma, las cepas dobles mutantes que llevan una de las mutaciones citadas anteriormente, suelen presentar patrones de pteridinas diferentes de lo esperado. Generalmente, este tipo de cepas producen cantidades de pteridinas inferiores a las esperadas; sin embargo, se observa que la biopterina suele ser la pteridina que está menos disminuida, o incluso aumentada en algunas cepas.

Por último, hay una serie de cepas cuyos patrones de

pteridinas no siguen la pauta descrita anteriormente. En ellas, las drosópteras suelen estar ligeramente aumentadas, mientras que el resto de las pteridinas están disminuidas, incluyendo la biopterina. Dentro de este grupo, están las cepas ras_ltd y pn_ltd, que presentan patrones de pteridinas más cercanos a los que presentan los mutantes ras y pn que a los esperados al combinarse con ltd. Este tipo de epistasia parcial es una característica observada habitualmente en las cepas dobles mutantes que presentan las mutaciones pn, ras y, en menor medida, pr.

Como ocurre con la mayor parte de mutaciones de color de ojos, se desconoce cuáles son los defectos genéticos provocados por las mutaciones ltd, g, rs^m y rb, aunque se ha demostrado que ltd y g presentan defectos en el transporte de precursores del pigmento marrón (Sullivan y Sullivan, 1975; Howells et al., 1977). Estos dos mutantes han sido propuestos por el grupo de Sullivan entre aquellos que podrían alterar el sistema de transporte de precursores de los dos tipos de pigmentos oculares (pteridinas y omocromos). Si esto fuera así, los patrones de pteridinas de las cepas dobles mutantes g_ltd y rb_ltd, con casi total ausencia de pteridinas en los ojos, podrían interpretarse como una consecuencia de la fuerte alteración del transporte de precursores al que estarían afectando estas dos mutaciones.

En las cepas dobles mutantes de clot (grupo II) se han

detectado patrones de pteridinas que no coinciden con los esperados. Estos patrones de pteridinas no esperados se limitan a aquellas cepas en las que la mutación que acompaña a clot afecta a la síntesis de pteridinas. Dentro de las mutaciones que afectan a la síntesis de pteridinas cabe hacer dos subgrupos. En el primero estarían las cepas pn-cl, ras-cl, cl-pr y cl-se, en las que las mutaciones pn, ras, pr y se producen una cierta epistasia parcial sobre el patrón de pteridinas. En el segundo están las cepas cl-red, cho-cl, cm-cl, cl-ca, cl-p y g-cl, que presentan patrones de pteridinas no esperados, en los que las cantidades de drosopterinas están aumentadas frente a lo esperado, mientras que en el resto de las pteridinas predominan los valores similares. Este aumento de drosopterinas ya había sido encontrado en la cepa cl-ca por Taira (1961a), aunque no lo consideró importante. Este mismo autor también encontró valores de drosopterinas similares a los nuestros en la cepa v-cl.

Un caso especial es la cepa cl-Hn^{ra}, en la que se produce una cierta cantidad de pterina, cuando en el mutante Hn^{ra} no se detecta. Esto es similar a lo que ocurre con la cepa se-Hn^{ra}, y una posible explicación sería que se produjera por degradación de algunas de las pteridinas que se presentan en grandes cantidades en estas cepas. Sin embargo, también podría ser sintetizado in vivo, ya que el mutante Hn^{ra} sintetiza algo de dihidropterina, que parece destinada casi totalmente a la síntesis de drosopterinas,

pero que, al menos en la cepa se_Hn^{ra}, podría transformarse en pterina al bloquearse totalmente la síntesis de drosopterinas. Esta presencia de pterina en la cepa se_Hn^{ra} ya había sido observada anteriormente por Wilson y Jacobson (1977b).

En el grupo III de dobles mutantes se presenta un misceláneo de las cepas cuyos patrones de pteridinas difieren de lo esperado, y que no han sido situadas en ningún otro grupo.

La cepa en_ry presenta un patrón de pteridinas en el que las cantidades de drosopterinas están muy disminuidas, mientras que se acumulan las sustancias SP, ADHP y PTE. Este tipo de interacción entre mutaciones, que afectan a la síntesis de omocromos y rosy (ry), fue encontrado también por Taira (1961a) en las cepas en_ry y v_ry. Este autor también considera que la cepa ca_ry presenta esta interacción, pero las cantidades de drosopterinas que cita para las cepas ca_ry, ca y ry no parecen indicar que la diferencia sea significativa. El patrón de pteridinas de nuestra cepa rosy parece indicar que esta interacción podría deberse a una inhibición del paso enzimático en el que la H₂PTE se une a la ADHP para formar las drosopterinas.

Un mutante que presenta una interacción similar, con una mutación de la ruta de síntesis de los omocromos, es safranin (sf), siendo la cepa analizada sf_st. Este tipo de interacción se presenta también en la cepa v_sf, que posee

una cantidad de drosópteras muy baja. Esta cepa no aparece en tablas al haber sido cuantificadas solo las drosópteras.

Dentro del grupo III se situaron, también, un grupo de cepas dobles mutantes que llevaban por un lado las mutaciones pn, ras o pr, y por otro las mutaciones se o Hn^r. La única cepa que no se analizó fue pr₁se ya que presentó una viabilidad tan baja, tras su síntesis, que apenas pudo mantenerse un par de generaciones en el laboratorio. En estas cepas dobles mutantes, se observa una epistasia parcial por parte de las mutaciones pn, ras y pr. Este tipo de epistasia parece ser bastante habitual en estos mutantes.

Otras dos cepas que presentan, también, una cierta epistasia son Pu^ese y lt₁se, aunque al igual que pasaba con los anteriores dobles mutantes de sepia, la falta de drosópteras y ADHP producida por la mutación sepia, se mantiene invariable en las cepas dobles mutantes.

Las cepas v₁lt, car₁dke, cm₁dke, cm₁cd y cd₁p presentan patrones de pteridinas que al compararlos con los esperados, podrían interpretarse como procedentes de una interacción similar a la descrita en las cepas del grupo I, aunque no lleven ninguna de las mutaciones incluidas en la definición del grupo.

Por último, entre las cepas situadas en el grupo III están pr₁ca y pr₁p, las cuales presentan un patrón de pteridinas en el que las drosópteras están aumentadas

frente a lo esperado, mientras que otras pteridinas como la BP y la SP están disminuidas.

En el grupo IV se han situado toda una serie de cepas dobles mutantes cuyos patrones de pteridinas no difieren excesivamente de los esperados.

En el grupo V se presentan los datos de las cepas dobles mutantes de brown. Este mutante provoca la ausencia total de pteridinas oculares, así como la de isoxantopterina en el cuerpo. La única sustancia que aparece en ocasiones en los cromatogramas es el ácido xanturénico, una quinoleina que se forma como producto lateral durante la síntesis de xantomatina.

Aunque se desconoce la causa primera por la que la mutación red Malpighian tubules afecta al patrón de pteridinas, si que se puede deducir, de los resultados obtenidos con las cepas dobles mutantes de red, que el efecto básico de esta mutación, sobre la síntesis de pteridinas, estaría representado por el patrón que presenta la cepa cn_red, es decir, una cantidad de biopterina y ADHP del doble de la cantidad de la cepa tipo salvaje y una cantidad de, aproximadamente, la mitad de pterina, isoxantopterina y drosopterinas. Este efecto se ve incrementado por la presencia, en individuos portadores de la mutación red, de 3-hidroxiquinurenina o de alguna

sustancia sintetizada a partir de ella. Cuando esta sustancia se encuentra presente la cantidad de drosopterinas del organismo disminuye drásticamente, hasta valores cercanos al 10%, mientras que la cantidad de biopterina aumenta, llegando a valores superiores al 400%. Otras pteridinas que estaban afectadas, como la isoxantopterina y la pterina, mantienen aproximadamente sus porcentajes, mientras que la ADHP disminuye hasta valores similares a los de la cepa tipo salvaje.

Este efecto de un metabolito de la síntesis del pigmento marrón sobre el patrón de pteridinas, parece estar relegado en D. melanogaster a los individuos portadores de la mutación red, pues cepas mutantes como cn o y, que no poseen 3-hidroxiquinurenina, presentan patrones de pteridinas prácticamente equivalentes a los de la cepa tipo salvaje.

El efecto de la 3-hidroxiquinurenina (HQ) o un metabolito sintetizado a partir de ella, se pudo deducir en base a los patrones de pteridinas de las cepas dobles mutantes de red, y de la cantidad de HQ que presentaban estas cepas. Sin embargo, para confirmarlo se realizó una experiencia in vivo en la que se suplementó con HQ la dieta de la cepa cn__red (no sintetiza HQ). Los resultados permitieron comprobar que el patrón de pteridinas de los individuos de esta cepa, que habían ingerido HQ, se acercaba mucho al de la cepa red, lo cual indicaba que las diferencias, en el patrón de pteridinas, entre las cepas cn

red y red eran debidas mayoritariamente a la capacidad de síntesis de HQ por la segunda.

La razón por la que se ha dicho que el compuesto que producía este segundo efecto sobre la síntesis de pteridinas era la HQ, o una sustancia sintetizada a partir de ella, se debe a que no podemos asegurar que en la experiencia de suplementación, la HQ ingerida por el organismo no pueda ser metabolizada por este a otros compuestos. A esto se une, el no poseer mutaciones de D. melanogaster que impidan totalmente la transformación de HQ en otras sustancias. Sin embargo, sí disponemos de la mutación cardinal (cd), que impide que la mayor parte de HQ se transforme en xantomatina o pigmento marrón (se sintetiza únicamente un 12% de la cantidad del tipo salvaje).

La cepa cd_red presenta una cantidad de HQ similar a la de la cepa red, mientras que la cantidad de pigmento marrón, aunque no ha sido cuantificada, es claramente inferior. Si observamos el patrón de pteridinas podemos ver que ambas cepas presentan cantidades similares de BP, lo que indicaría que la xantomatina no es la responsable de esta acumulación; sin embargo, la cantidad de drosopterinas es ligeramente superior en la cepa cd_red, lo que indicaría, por el contrario, que hay un ligero efecto sobre la síntesis de drosopterinas por parte de la xantomatina.

Una vez descartado, casi totalmente, el efecto de la xantomatina, tenemos que recurrir al resto de sustancias que se originan a partir de la HQ, pero que en D. melanogaster

poseen mucha menor importancia. En primer lugar está el ácido xanturénico, sustancia que apenas se detecta en la cepa red y en sus cepas dobles mutantes, por lo que no parece que pueda tener excesiva importancia. En segundo lugar están los glucósidos de la 3-hidroxiquinurenina y del ácido xanturénico, sustancias que nunca han sido detectadas en las cepas mutantes de red. Por último, la cepa red presenta, de forma excepcional en *Drosophila*, un omocromo -la omina A- (Wessing y Bonse, 1966), que aunque tiene una amplia presencia en varios ordenes de insectos (Linzen, 1974), no se ha encontrado nunca en *D. melanogaster*, ni en el individuo tipo salvaje, ni en ninguna de las cepas mutantes conocidas a excepción de la cepa red. En este mutante, la omina se acumula en los túbulos de Malpighi, lo que es precisamente la causa del nombre de la mutación.

La omina A está formada, al menos, por dos moléculas de HQ, al igual que ocurría con la xantomatina, pero una de ellas lleva además otro compuesto no identificado, portador de un átomo de azufre (Linzen, 1967). La causa por la que esta sustancia se acumula en los túbulos de Malpighi del mutante red es desconocida, y solo hay referencia en la bibliografía a un fenómeno similar. Linzen (1974), en su revisión sobre los omocromos, cita la observación realizada por varios autores según la cual ciertas lesiones no específicas de los tejidos conducen a la formación de omocromos, como medio de excrección metabólica del triptófano producido al utilizar el organismo las reservas

de proteínas como fuente de energía. En *Drosophila*, concretamente, los túbulos de Malpighi se colorean de rojo (presumiblemente un omocromo) tras lesiones experimentales como irradiación ultravioleta o choques osmóticos.

El siguiente problema que surgía era la forma en que la HQ, o la mutación red, afectaban a la síntesis de pteridinas. Para resolver el problema decidimos estudiar las actividades de algunas de las enzimas que actúan en la ruta de biosíntesis de las pteridinas.

La primera enzima que estudiamos fue la GTP ciclohidrolasa debido, en primer lugar, a que es la primera enzima de la ruta de síntesis y, por tanto, una enzima sobre la que fácilmente puede recaer la regulación de la ruta y, en segundo lugar por que Mackay y O'Donnell (1983) habían detectado en el mutante red una alteración de la actividad enzimática durante el desarrollo.

Las actividades enzimáticas obtenidas para las cepas mutantes pudieron ser correlacionadas fácilmente con las cantidades de HQ que presentaban dichas cepas. Dentro de esta correlación negativa, entre actividad GTPCH y cantidad de HQ (figura 22), se detectó, sin embargo, una clara excepción en la cepa y__red. Esta excepción también se observó cuando se compararon los patrones de pteridinas, ya que aunque la cepa y__red presenta una cantidad de BP similar a la de la cepa cn__red, la cantidad de drosopterinas era mucho más baja.

Basándonos en el doble efecto que hemos descrito para

el mutante red, nos encontraríamos con que esta mutación, por si misma, provocaría como máximo un ligero aumento de la actividad GTPCH (120%), mientras que la presencia de HQ sería la responsable de la disminución de actividad en las cepas mutantes. Esta disminución sería mayor cuanto más HQ poseyera la cepa, hasta llegar a la actividad de un 67% que presenta la cepa red. Este efecto, de la HQ sobre la actividad GTPCH, estaría reducido a cepas que fueran portadoras de la mutación red, ya que las cepas y y cn, que no presentan HQ tienen la misma actividad enzimática que las cepas Dr-R y cd, que si la presentan.

Para confirmar in vivo el efecto de la HQ sobre la actividad GTPCH, se suplementó la comida de la cepa cn_red con cantidades crecientes de esta sustancia, detectándose que la actividad GTPCH iba disminuyendo conforme aumentaba la cantidad de HQ suplementada.

Para interpretar esta disminución de la actividad GTPCH producida por la HQ pueden emitirse dos hipótesis. La primera, que creemos la más probable, sería debida a una disminución de la cantidad de la enzima producida por una inhibición transcripcional o postranscripcional. La segunda implicaría que la HQ actúa directamente sobre la cinética de la enzima, inhibiendo su actividad.

El propio método de medición de la actividad enzimática utilizado parece descartar esta segunda hipótesis, ya que los compuestos de bajo peso molecular son separados del extrato crudo antes de realizar los ensayos

enzimáticos. Solo en el caso de que la HQ estuviera covalentemente unida a la enzima podría separarse junto a las proteínas y, provocar luego la inhibición de la actividad enzimática en los ensayos.

Para determinar si esta inhibición directa de la actividad enzimática se producía realizamos una experiencia de cinética enzimática, que presentó el problema del efecto secuestrador de la fluorescencia de la HQ, con lo que los resultados quedaban enmascarados. Por dicha razón, realizamos una experiencia en la que comparamos la disminución de fluorescencia producida por el efecto "quencher" de la HQ con la producida por la suma de este efecto más la posible inhibición de la síntesis del producto fluorescente formado en la reacción. Los resultados obtenidos no parecen indicar que la HQ inhiba a la enzima GTPCH, aunque sería necesario realizar una medición de la actividad GTPCH por otros métodos en los que la HQ pudiera ser separada del producto de reacción.

Otras dos enzimas analizadas fueron la dihidropterín oxidasa y la biopterina sintasa. La primera cataliza la transformación de dihidropterina en pterina, aunque in vitro se ha detectado que también puede catalizar las reacciones entre la dihidrobiopterina y la biopterina, y entre la sepiapterina (lactoildihidropterina) y la sepiapterina oxidada (lactoilpterina). Sin embargo, la K_m y el tiempo de recambio de la enzima, para cada uno de los diferentes sustratos, parece indicar que la dihidropterina sería el

sustrato de mayor importancia in vivo (Unnasch y Brown, 1982).

La segunda enzima, la biopterina sintasa, cataliza la transformación de sepiapterina en dihidrobiopterina, aunque recientemente Switchenko et al. (1984) han detectado que es capaz de producir la transformación de PH₄PTE en H₄BP, cuestionando al mismo tiempo la existencia real de una ruta de síntesis para la H₄BP a partir de la SP y la H₂BP.

Para la enzima biopterina sintasa no se han encontrado diferencias entre las cepas analizadas (cn_red, red y Or-R). Estos datos, sin embargo, no incluyen la posibilidad de que exista algún inhibidor o activador in vivo, ya que en los extractos utilizados para los ensayos enzimáticos han sido eliminadas las sustancias de bajo peso molecular.

Se han encontrado diferencias en las actividades de la enzima dihidropterín oxidasa entre las cepas cn_red, red y Or-R. Las actividades de las dos primeras se encuentran disminuidas en algo menos de un tercio de la actividad de la cepa normal. Estos resultados concordarían con la disminución de pterina e isoxantopterina que presentan ambas cepas.

Los datos de actividades enzimáticas obtenidos para las enzimas GTPCH, H₂PTE oxidasa y BP sintasa permiten explicar, en parte, los patrones de pteridinas que presentan las cepas mutantes de red. Por un lado, la cantidad de drosopterinas de la cepa cn_red (42% de la del tipo salvaje) podría explicarse si la cantidad de H₂PTE estuviera

disminuida en la cepa cn_red, lo que produciría el descenso de la cantidad de drosopterinas y la acumulación del otro precursor de las drosopterinas, la ADHP. La H₂PTE no ha podido ser detectada en los cromatogramas, bien porque se oxida a pterina o bien porque se sitúa en la misma posición que otra mancha de fluorescencia azulada y queda enmascarada, al ser la H₂PTE mucho menos fluorescente que las pterinas oxidadas. Aunque esto nunca ha sido probado, creemos que la H₂PTE oxidasa podría ser una enzima funcional no solo en el paso entre H₂PTE y PTE sino también entre la PH₄PTE y la H₂PTE, ya que se ha comprobado que esta enzima puede utilizar como sustrato pterinas reducidas con cadenas laterales en posición 6, como la sepiapterina, la dihidroneopterinina y la dihidrobiopterina (Unnasch y Brown, 1982). Como para que la PH₄PTE se transforme en H₂PTE es necesario, por un lado, la eliminación de la cadena lateral y, por otro lado, la reducción de la forma tetrahidro- a la forma dihidro-, creemos que la enzima que lleva a cabo esta reducción podría ser la H₂PTE oxidasa. De esta forma, la cepa cn_red tendría las drosopterinas disminuidas como consecuencia de la baja actividad de esta enzima que conduciría a una disminución de su precursor H₂PTE.

Por otro lado, la cantidad de drosopterinas de la cepa red, que es mucho más baja que en cn_red, podría ser explicada, al menos en parte, por la disminución conjunta de las actividades de las enzimas GTPCH y H₂PTE oxidasa, lo que provocaría una cantidad bastante más baja de H₂PTE que en la

cepa cn_red.

La otra característica más sobresaliente de los patrones de pteridinas de las cepas mutantes de red es el aumento de la cantidad de biopterina, que en la cepa red es de aproximadamente un 400% de la del tipo salvaje, y en la cepa cn_red de un 200%. La GTPCH es la primera enzima de la ruta, y por tanto la que controla la cantidad de la primera pteridina que se forma, la dihidroneopterina trifosfato. A partir de esta sustancia se forman todas las demás pteridinas, incluyendo a la biopterina. Las cantidades de BP en las cepas red y cn_red no solo no pueden ser explicadas en base a las actividades GTPCH de estas cepas, sino que incluso estas serían contradictorias, ya que la cepa que presenta mayor cantidad de BP es la que posee menor actividad GTPCH y viceversa.

Una posible explicación sería que los patrones de pteridinas se cuantifican en moscas de 9 días de edad, en las que los pigmentos ya se han depositado, mientras que las actividades GTPCH se miden en moscas recién nacidas, que es el estadio en que se produce el pico de máxima actividad enzimática, ya que a partir de los dos días de la emergencia del adulto la actividad GTPCH prácticamente ha desaparecido. Por dicha razón, se cuantificó la BP en moscas de un día de edad, encontrándose que las cantidades de BP eran mucho más bajas que en adultos de 9 días, pero guardaban las mismas proporciones relativas frente a la cepa tipo salvaje que en los adultos de nueve días. Esto rechaza la posibilidad de

que la cantidad de BP en moscas recién nacidas fuera más baja y acorde con la actividad GTPCH. Por tanto, la elevada cantidad de BP, observada en adultos de 9 días, no puede ser explicada por la actividad GTPCH, sino que la misma causa que hace que en moscas recién nacidas la cantidad de BP esté aumentada, debe ser la que haga que se mantenga este aumento en adultos de 9 días.

La otra posibilidad consistiría en que alguna de las enzimas de la ruta que intervienen en la síntesis de biopterina pudiera estar activada. Esta activación podría ser debida a una mayor cantidad de enzima, a que el enzima de las cepas mutantes no fuera idéntico al de Or-R, o a que existiera algún compuesto activador.

Los resultados obtenidos al analizar la biopterina sintasa, una enzima que se describió primeramente para el paso entre la SP y la H₂BP, pero que luego ha sido cuestionada y parece que actúa entre la PH₄PTE y la H₄BP, no indican diferencias de actividad enzimática entre las cepas red, cn-red y Or-R. Aunque dado el método utilizado para los ensayos enzimáticos, podría ocurrir que estas cepas presentaran in vivo algún activador o inhibidor del enzima, perdido al pasar los extractos brutos por las columnas de Sephadex.

Los patrones de pteridinas de las otras cepas dobles mutantes de red no siempre han podido ser interpretados totalmente. Se ha encontrado una correlación negativa bastante buena entre las cantidades de HQ de las cepas

mutantes de red y sus actividades GTPCH. La única cepa que presentaba un resultado fuertemente discrepante fue la cepa y_red, que trataremos más adelante.

Respecto a la cantidad de drosopterinas totales, el valor de la cepa cd_red resulta excesivamente mayor que el de la cepa red, teniendo presente una actividad GTPCH solo ligeramente mayor.

Los valores de las cepas cn_red, ltd_red y rb_red son interpretables teniendo presente la actividad GTPCH, la cantidad de drosopterinas de las cepas cn, ltd y rb, y suponiendo que la actividad dihidropterín oxidasa de cn_red sea equivalente a la de las cepas ltd_red y rb_red. Por el contrario, la cantidad de drosopterinas de cm_red debería ser similar a la de rb_red y es, sin embargo, más alta.

La cantidad de drosopterinas de la cepa cl_red es mucho más alta de la esperada, aunque en esta cepa hay que tener en cuenta el efecto observado para la mutación clot en varias de sus cepas dobles mutantes.

Las cantidades de BP de las cepas red, cn_red, y_red y cd_red, en las que las mutaciones cn, y y cd afectan a la ruta de síntesis de la xantomatina, son interpretables según las hipótesis descritas anteriormente. Por el contrario, para interpretar las cantidades de biopterina del resto de las cepas habría que conocer si se produce algún otro tipo de interacción entre red y las otras mutaciones.

Como ya se ha dicho anteriormente, la excepción más importante a la hipótesis planteada se centra en la cepa y

red la cual, sin poseer HQ, presenta una actividad GTPCH y una cantidad de drosopterinas solo ligeramente mayores que las de la cepa red.

La interpretación más plausible de esta excepción consistiría en que la acumulación de triptófano que origina la mutación y afectara a la actividad GTPCH y a la síntesis de drosopterinas. Los resultados de una experiencia de suplementación con triptófano, en los que se determinó el efecto sobre la GTPCH, y las cantidades de drosopterinas y biopterina, no fueron muy concluyentes. La cepa y_red fue elegida para llevar a cabo esta experiencia al tener la seguridad de que el TRP ingerido por las moscas no podría ser metabolizado por la ruta de los omocromos. Sin embargo, como la cepa y_red, ya acumulaba TRP, lo único que podía detectarse era si una mayor acumulación de TRP podría producir una mayor disminución de drosopterinas y de la actividad GTPCH. Aunque, si se observó una ligera disminución, vino acompañada por un considerable aumento de la mortalidad, lo que podría indicar la existencia de un efecto general no específico sobre el metabolismo.

Esta experiencia no descartaba que el TRP pudiera tener un efecto inhibitor de la GTPCH y de la síntesis de drosopterinas, pero para poder demostrarlo habría que haber hecho crecer a la cepa y_red en un medio donde la cantidad de TRP fuera baja y, por tanto, controlada. Si en este medio, la cepa y_red presentara un patrón de pteridinas similar al de la cepa cn_red, podríamos estar seguros de que

el triptófano era el causante de esta inhibición. Desgraciadamente, la obtención en *Drosophila* de medios sintéticos, donde las cantidades de cada uno de los aminoácidos esenciales estén controladas, es bastante complicado, al desarrollarse las larvas mucho peor que cuando los aminoácidos son suministrados en forma de proteínas.

Un último resultado que ha contribuido a dificultar más la explicación de esta excepción, ha sido el valor de la actividad GTPCH y la cantidad de drosopterinas encontrados en la cepa v_cn_red. El primero resultó ser similar al de la cepa v__red, como cabía esperar, mientras que el segundo resultó mucho más alto que la cepa v_red, y similar al de la cepa cn_red. Esto pone de manifiesto la complejidad de las interacciones génicas y la dificultad que supone interpretarlas.

5. CONCLUSIONES

- 1.- Se han mejorado los métodos de cuantificación de pteridinas por cromatografía en capa fina.
- 2.- Se ha desarrollado un nuevo método de cuantificación de isoxantopterina, que resulta mucho más rápido y preciso.
- 3.- Se ha desarrollado un nuevo método de medición de la actividad GTP ciclohidrolasa en *Drosophila*. Este método detecta la actividad enzimática en base a la fluorescencia del producto de la reacción, y permite eliminar la mayor parte de compuestos fluorescentes antes de que se lleven a cabo los ensayos enzimáticos.
- 4.- Se han detectado dos nuevas manchas en los cromatogramas de cepas mutantes de *Drosophila melanogaster*. Ambas son, presumiblemente, productos de degradación de otras pteridinas presentes en los extractos. Una de ellas ha sido parcialmente caracterizada por sus Rfs como 6-formilpterina, mientras que la otra presenta unos máximos de fluorescencia idénticos a los del ácido dihidropterín carboxílico.
- 5.- Se han detectado, en las placas de cromatografía, las dos formas racémicas de la aurodrosopterina descubiertas por Rokos y Pflleiderer (1975).

- 6.- La mancha nº 18 (dihidroformilpterina) está formada por la superposición de dos manchas, que podrían ser formas racémicas, al igual que ocurre con otras pteridinas.
- 7.- La dihidroformilpterina y la neopterina se acumulan, preferentemente, en cepas que llevan la mutación purple. Esto indica que su síntesis se produce a partir de la dihidroneopterina trifosfato, por una ruta diferente de la ruta por la que se sintetizan el resto de las pteridinas.
- 8.- El ácido dihidropterín carboxílico no es un intermediario en la ruta de síntesis que desde la piruvoiltetrahydropterina conduce a la dihidropterina.
- 9.- Los loci garnet, lightoid, rose y ruby parecen actuar de manera similar durante la síntesis de pteridinas. Por dicha razón, las combinaciones de dos alelos mutantes de estos loci producen cantidades de pteridinas muy inferiores frente a las esperados. Estas mismas sustancias interaccionan con otras de color de ojos, produciendo patrones de pteridinas no esperados, en los que la mayor parte de las pteridinas están disminuidas, frente a lo esperado, siendo la biopterina la que suele estarlo en menor proporción, estando incluso aumentada en algunas ocasiones.

10.- La mutación clot interacciona con varias mutaciones que afectan a la síntesis de pteridinas, produciendo en las cepas dobles mutantes patrones de pteridinas en los que la cantidad de drosópteras es muy superior a la esperada.

11.- La mutación rosy interacciona con las mutaciones que afectan a la síntesis de xantomatina, produciendo en las cepas dobles mutantes patrones de pteridinas en los que las drosópteras están disminuidas, mientras que la sepiapterina, la acetildihidrohomopterinina y la pterina están aumentadas. Este tipo de interacción parece indicar que el paso enzimático afectado sería el de la unión de la dihidropterina con la acetildihidrohomopterinina.

12.- La mutación safranin presenta una interacción, similar a la anterior, con las mutaciones que afectan a la síntesis de omocromos.

13.- Las mutaciones prune, raspberry y purple presentan una epistasia parcial con las mutaciones que producen grandes acumulos de pteridinas, como sepia o Henna recessive 3.

14.- No se ha detectado síntesis de pteridinas en ninguna

cepa doble mutante portadora de la mutación brown.

15.- La enzima dihidropterín oxidasa, que in vivo parece actuar en el paso enzimático entre la dihidropterina y la pterina, podría actuar también en uno de los pasos enzimáticos entre la piruvoiltétrahidropterina y la dihidropterina.

16.- La mutación red Malpighian tubules afecta a la síntesis de pteridinas, disminuyendo la actividad de la enzima dihidropterín oxidasa. Esta disminución explicaría las bajas cantidades de drosopterinas, pterina e isoxantopterina, y el aumento de las cantidades de acetildihidrohomopterina y biopterina.

17.- La presencia de 3-hidroxiquinurenina, o un metabolito sintetizado a partir de ella, produce en las cepas portadoras de la mutación red una disminución de la actividad GTP ciclohidrolasa. En estas cepas se ha detectado una correlación negativa entre la actividad de dicha enzima y la cantidad de 3-hidroxiquinurenina.

18.- El efecto inhibitor de la 3-hidroxiquinurenina sobre la actividad GTPCH no parece ser debido a una inhibición directa sobre la enzima, sino que probablemente las diferentes actividades enzimáticas se deben a diferencias en la cantidad de enzima.

19.- El aumento de la cantidad de biopterina producido por la presencia de 3-hidroxiquinurenina no puede ser explicado, únicamente, por la disminución de las actividades de las enzimas GTPCH y H₂PTE oxidasa. Este aumento, tampoco ha podido correlacionarse con un aumento de la actividad biopterina sintasa.

20.- La cepa v__red es una excepción a la correlación negativa entre cantidad de HQ y actividad GTPCH. Esta excepción puede ser debida a la acumulación de triptófano en esta cepa.

21.- La suplementación de la dieta de la cepa v__red con triptófano, produce una pequeña disminución de la actividad GTPCH de la cepa. Esta disminución es, sin embargo, debida probablemente a un efecto metabólico general o no específico.

6. BIBLIOGRAFIA

- BAGLIONI, C. (1959). Genetic control of tryptophan peroxidase-oxidase in Drosophila melanogaster. **Nature** **184**: 1084-1085.
- BEADLE, G. W. y EPHRUSSI, B. (1936). The differentiation of eye pigments in Drosophila as studied by transplantation. **Genetics** **21**: 225-247.
- BECKER, E. (1942). Über eigenschaften, verbreitung und die genetischentwick lungshysiologische bedeutung der pigmente der ommatin und ommingruppe (ommochrome) bei den arthropoden. **Z. Vererblehre** **80**: 157-204.
- BOGAART, A. H. y BERNINI, L. F. (1981). The molybdoenzyme system of Drosophila melanogaster. I. Sulfite oxidase: identification and properties. Expression of the enzyme in marron-like (mal), low-xanthine dehydrogenase (lx_d) and cinnamon (cin) flies. **Biochem. Genet.** **19**: 929-946.
- BRENNEMAN, A. R. y KAUFMAN, S. (1964). The role of tetrahydropteridine in the enzymatic conversion of tyrosine to 3,4-dihydroxyphenylalanine. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** **17**: 177-183.
- BROWN, G. M. (1971). The biosynthesis of pteridines. **Adv. Enzymol.** **35**: 35-77.
- BÜCKMAN, D. (1965). Das redoxverhalten von ommochrom in vivo. Untersuchungen Cerura vinula L. **J. Insect Physiol.** **11**: 1427-1462.
- BURG, A. W. y BROWN, G. M. (1968). The biosynthesis of folic acid. VIII. Purification and properties of the enzyme that catalyzes the production of formate from

- carbon atome 8 of guanosine triphosphate. **J. Biol. Chem.** **243**: 2347-2358.
- BURNET, B., CONNOLLY, K. y BECK, J. (1968). Phenogenetic studies on visual acuity in Drosophila melanogaster. **J. Insect Physiol.** **14**: 855-866.
- BUTENANDT, A., WEIDEL, W. y BECKER, E. (1940). Kynurenine als augenpigmentbildung auslösendes agens bei insekten. **Naturwissenschaften** **28**: 63-64.
- BUTENANDT, A., WEIDEL, W. y SCHLOSSBERGER, H. (1949). 3-oxykynurenine als cn^+ -gen-abbägiges glied im intermediaren tryptophan-stoffwechsel. **Z. Naturforsch.** **4b**: 242-244.
- CURTIUS, H. CH., NIEDERWIESER, A., VISCONTINI, M., OTTEN, A., SCHAUB, J., SCHEIBENREITER, S. y SCHIMDT, H. (1979). Atypical phenylketonuria due to tetrahydrobiopterin deficiency, diagnosis and treatment with tetrahydrobiopterin, dihydrobiopterin and sepiapterin. **Clin. Chim. Acta** **93**: 252-262.
- EVANS, B. A. y HOWELLS, A. J. (1978). Control of drosoppterin synthesis in Drosophila melanogaster: mutants showing an altered pattern of GTP cyclohydrolase activity during development. **Biochem. Genet.** **16**: 13-26.
- FAN, C. L. y BROWN, G. M. (1976). Partial purificaton and properties of guanosine triphosphate cyclohydrolase from Drosophila melanogaster. **Biochem. Genet.** **14**: 259-270.

- FAN, C. L. y BROWN, G. M. (1979). Partial purification and some properties of bipterin synthase and dihydropterin oxidase from Drosophila melanogaster. **Biochem. Genet.** 17: 351-369.
- FAN, C. L., KRIVI, G. C. y BROWN, G. M. (1975). The conversion of dihydroneopterin triphosphate to sepiapterin by an enzyme system from Drossophila melanogaster. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 67: 1047-1054.
- FAN, C. L., HALL, L. M., SKRINSKA, A. J. y BROWN, G. M. (1976). Correlation of guanosine triphosphate cyclohydrolase activity and the synthesis of pterins in Drosophila melanogaster. **Biochem. Genet.** 14: 271-280.
- FERRE, J. (1984). Estudio de las pteridinas y quinoleinas de los ojos de Drosophila melanogaster. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.
- FERRE, J. y JACOBSON, K. B. (1985). The use of reversed-phase C₁₈ SEP-PAK cartridges for the purification and concentration of sepiapterin and other pteridines. **J. Chromatogr.** 350: 389-398.
- FERRE, J. SILVA, F. J., REAL, M. D. y MENSUA, J. L. (1983). Comparative study of the eye-colour mutants of Drosophila melanogaster: quantification of the eye-pigment and related metabolites. In **Chemistry and Biology of Pteridines** (Blair, J. A., ed.): 669-673. Walter de Gruyter, Berlin-New York.
- FERRE, J., REAL, M.D., MENSUA, J.L. y JACOBSON, K. B.

- (1985). Xanthurenic acid 8-O- β -D-glucoside, a novel tryptophan metabolite in eye-color mutants of *Drosophila melanogaster*. **J. Biol. Chem.** **260**: 7509-7514.
- FERRE, J., SILVA, F. J., REAL, M. D. y MENSUA, J. L. (1986). Pigment patterns in mutants affecting the biosynthesis of pteridines and xanthommatin in *Drosophila melanogaster*. **Biochem. Genet.** **24**: (en prensa).
- FORREST, H. S., GLASSMAN, E. y MITCHELL, H. K. (1956). Conversion of 2-amino-4-hydroxypteridine to isoxanthopterin in *D. melanogaster*. **Science** **124**: 725-726.
- FUGE, H. (1967). Die pigmenbildung im auge von *Drosophila melanogaster* und ihre beeinflussung durch den white⁺-locus. **Z. Zellforsch.** **83**: 468-507.
- FUKUSHIMA, K., RITCHER Jr., W. E. y SHIOTA, T. (1977). Partial purification of 6-(D-erythro-1',2',3'-trihydroxypropyl) 7,8-dihydropterin triphosphate synthetase from chicken liver. **J. Biol. Chem.** **252**: 5750-5755.
- GELBART, W., McCARRON, M., COLLINS, P. y CHOVNICK, A. (1974). Characterization of XDH structural mutants within the *cy* locus in *Drosophila melanogaster*. **Genetics** **77**: s24-s25.
- GHOSH, D. y FORREST, H. S. (1967a). Enzymatic studies on the hydroxylation of kynurenine in *Drosophila melanogaster*. **Genetics** **55**: 423-431.

- GHOSH, D. y FORREST, H. S. (1967b). Inhibition of tryptophan pyrrolase by some naturally occurring pteridines. **Arch. Biochem. Biophys.** **120**: 578-582.
- HARMSSEN, R. (1966). The excretory role of pteridines in insects. **J. exp. Biol.** **45**: 1-13.
- HOWELLS, A. J., SUMMERS, K. M. y RYALL, R. L. (1977). Developmental patterns of 3-hydroxykynurenine accumulation in white and various other eye color mutants of *Drosophila melanogaster*. **Biochem. Genet.** **17**: 149-158.
- HUBBY, J. L. (1962). A mutant affecting pteridine metabolism in *Drosophila melanogaster*. **Genetics** **47**: 109-114.
- IKEMOTO, H. (1981). Tryptophan derivatives in the larval haemolymph of the larger pellucid hawk moth *Chephonodes hylas* L. **New Entomol.** **30(4)**: 5-8.
- INAGAMI, K. (1954). Chemical and genetical studies on the formation of the pigment in the silkworm. III. On the microanalysis of 3-hydroxykynurenine. **J. Sericult. Sci. Japan** **23**: 299-303.
- JACOBSON, K. B., DORSETT, D., PFLEIDERER, W., McCLOSKEY, J. A., SETHI, S. K., BUCHANAN, M. V. y RUBIN, I. B. (1982). A naturally occurring pyrimidodiazepine in *Drosophila*: chemical and spectral properties and relationship to drosopterin. **Biochemistry** **21**: 5700-5706.
- JEQUIR, E., ROBINSON, D.S., LOVENBERG, V. y SJOERDSMA, A.

- (1969). **Biochem. Pharmacol. 18: 1071-1081.**
- JOHNSON, J. L., HAINLINE, B. E. y RAJAGOLAPAN, K. V.
(1980). Characterization of the molybdenum cofactor of sulfite oxidase, xanthine oxidase and nitrite reductase. **J. Biol. Chem. 255: 1783-1786.**
- KATOH, S., SUEOKA, T. y YAMADA, S. (1980). Neopterin in the sepia mutant of adult Drosophila melanogaster. **Insect Biochem. 10: 119-123.**
- KAUFMAN, S. (1962). Studies of tryptophan pyrrolase in Drosophila melanogaster. **Genetics 47: 807-817.**
- KAUFMAN, S. (1963). The structure of the phenylalanine-hydroxylation cofactor. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA 50: 1085-1092.**
- KRIVI, G.G. y BROWN, G. M. (1979). Purification and properties of the enzymes from Drosophila melanogaster that catalyse the synthesis of sepiapterin from dihydroneopterin triphosphate. **Biochem. Genet. 17: 371-390.**
- KÜHN, A. (1956). Versuche zur Entwicklung eines modells der genwirkung. **Naturwissenschaften 43: 25-28.**
- LINDSLEY, D. L. y GRELL, E. H. (1968). **Genetic variations of Drosophila melanogaster**. Publication nº 627. Carnegie Institution of Washington.
- LINZEN, B. (1967). Zur -biochemie der ommochrome. Unterteilung, vorkommen, biosynthese und physiologische zusammenhauge. **Naturwissenschaften 54: 259-267.**
- LINZEN, B. (1974). The tryptophan ommochrome pathway in

- insects. **Adv. Insect Physiol.** **10:** 117-246.
- MACKAY, W. J. y O'DONNELL, J. M. (1983). A genetic analysis of the pteridine biosynthetic enzyme, guanosine triphosphate cyclohydrolase, in Drosophila melanogaster. **Genetics** **105:** 35-53.
- MATSUBARA, M. KATOH, S., AKINO, M. y KAUFMAN, S. (1966). Sepiapterin reductase. **Biochim. Biophys. Acta** **122:** 202-212.
- MERCK, E. (1975). **Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y papel.** Merck Publ., Darmstadt.
- MOORE, G. P. y SULLIVAN, D. T. (1978). Biochemical and genetic characterization of kynurenine formamidase from Drosophila melanogaster. **Biochem. Genet.** **16:** 619-634.
- MORCILLO, E y MENSUA, J. L. (1983). Two new spots on thin-layer chromatography plates of eye color mutants of Drosophila melanogaster. **Dros. Inform. Serv.** **105:** 35.
- NEAL, M. W. y FLORINI, J. R. (1973). A rapid method for desalting small volumes of solution. **Anal. Biochem.** **55:** 328-330.
- NICHOL, C. A., LEE, C. L., EDELSTEIN, M. P., CHAO, J. Y. y DUCH, D.S. (1983). Biosynthesis of tetrahydrobiopterin by the novo and salvage pathways in adrenal medulla extracts, mammalian cell cultures, and rat brain in vivo. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** **80:** 1546-1550.
- NICHOL, C. A., SMITH, G. K. y DUCH, D. S. (1985).

- Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and molybdopterin. **Ann. Rev. Biochem.** **54**: 729-764.
- NIEDERWIESER, A., CURTIURS, H. C., BETTONI, O., BIERI, J., SCHIRCKS, B., VISCONTINI, M. y SCHAUB, J. (1979). Atypical phenylketonuria caused by 7,8-dihydrobiopterin synthetase deficiency. **The Lancet** **1**: 131-137.
- NIEDERWIESER, A., CURTIUS, H. C., WANG, M. Y LEUPOLD, D. (1982). Atypical phenylketonuria with defective biopterin metabolism. Monotherapy with tetrahydrobiopterin or sepiapterin, screening and study of biosynthesis in man. **Eur. J. Pediatr.** **138**: 110-112.
- NIEDERWIESER, A., BLAU, N., WANG, M., JOLLER, P., ATARES, M. y CARDESA-GARCIA, J. (1984). GTP cyclohydrolase I deficiency, a new enzyme defect causing hyperphenilalaninemia with neopterin, biopterin, dopamine and serotonin deficiencies and muscular hypotonia. **Eur. J. Pediatr.** **141**: 208-214.
- NOLTE, D. J. (1952). The eye pigmentary system of *Drosophila*. III. The action of eye color genes. **J. Genet.** **51**: 142-186.
- PHILLIPS, J. P. y FORREST, H. S. (1980). Ommochromes and Pteridines. In **The Genetics and Biology of Drosophila** **2d**: 542-623. (Ashburner, M. y Wright, T. R. F., eds.). Academic Press, London.
- REAL, M. D., FERRE, J. y MENSUA, J. L. (1985). Methods for the quantitative estimation of the red and brown pigments of *Drosophila melanogaster*. **Dros. Inform.**

Serv. 61: 198-199.

REMBOLD, H. y GYURE, V. L. (1972). Biochemistry of the pteridines. **Angew. Chem. Int. Ed.** 11: 1061-1072.

ROKOS, K. y PFLEIDERER, W. (1975). Isolierung, physikalische eigenschaften und alkalischer abbau der augenpigmente neodrosopterin und aurodrosopterin aus Drosophila melanogaster. **Chem. Ber.** 108: 2728-2736.

ROKOS, H., ROKOS, K., FRISIUS, H. y KIRKSTAEDTERS, H. J. (1980). Altered urinary excretion of pteridines in neoplastic disease. Determination of biopterin, neopterin, xanthopterin and pterin. **Clin. Chim. Acta** 105 (2): 275-286.

RYALL, R. L. y HOWELLS, A. J. (1974). The ommochrome biosynthetic pathway in Drosophila melanogaster. Variations in the levels of enzyme activities and intermediates during adult development. **Insect Biochem.** 4: 47-61.

SCHWINCK, I. y MANCINI, M. (1973). The drosopterin pattern in various eye colour mutants of the fruitfly Drosophila melanogaster. **Arch. Genet.** 46: 41-52.

SHOUP, J. R. (1966). The development of pigment granules in the eyes of wild type and mutants Drosophila melanogaster. **J. Cell. Biol.** 29: 223-249.

SMITH, C. K. y NICHOL, C. A. (1984). Two new tetrahydropterin intermediates in the adrenal medullary de novo biosynthesis of tetrahydrobiopterin. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 120: 761-766.

- SULLIVAN, D. T. y SULLIVAN, M. C. (1975). Transport defects as the physiological basis for eye color mutants of Drosophila melanogaster. **Biochem. Genet.** **13**: 603-613.
- SULLIVAN, D. T., KITOS, R. J. y SULLIVAN, M. C. (1973). Developmental and Genetic studies on kynurenine hydroxylase from Drosophila melanogaster. **Genetics** **75**: 651-661.
- SULLIVAN, D. T., GRILLO, S. L. y KITOS, R. J. (1974). Subcellular localization of the first three enzymes of the ommochrome synthetic pathway in Drosophila melanogaster. **J. exp. Zool.** **188**: 225-233.
- SULLIVAN, D. T., BELL, L. A., PATON, D. R. y SULLIVAN, M. C. (1979). Purine transport by malpighian tubules of pteridine-deficient eye color mutants of Drosophila melanogaster. **Biochem. Genet.** **17**: 565-573.
- SWITCHENKO, A. G., PRIMUS, J. P. y BROWN, G. M. (1984). Intermediates in the enzymic synthesis of tetrahydrobiopterin in Drosophila melanogaster. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** **120**: 754-760.
- TAIRA, T. (1961a). Genetical and Biochemical studies on the red and yellow pigments of Drosophila melanogaster. **Jap. J. Genet.** **36**: 18-31.
- TAIRA, T. (1961b). Enzymatic reduction of the yellow pigment of Drosophila. **Nature** **189**: 231-232.
- THEOBALD, N. y PFLEIDERER, W. (1978). A new proposal for the structure of the red eye pigment drosopterin and isodrosopterin of Drosophila melanogaster. **Chem. Ber.**

111: 3385-3402.

UNNASCH, T. R. y BROWN, G. M. (1982). Purification and properties of dihydropterin oxidase from Drosophila melanogaster. **J. Biol. Chem.** **257** : 14211-14216.

WARNER, C. K. y FINNERTY, V. (1981). Molybdenum hydroxylases in Drosophila. II. Molybdenum cofactor in xanthine dehydrogenase, aldehyde oxidase and pyridoxal oxidase. **Mol. Gen. Genet.** **184**: 92-96.

WEISBERG, E. P. y O'DONNELL, J. M. (1986). Purification and characterization of GTP cyclohydrolase I from D. melanogaster. **J. Biol. Chem.** **261**: 1453-1458.

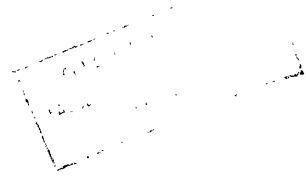
WESSING, A. y BONSE, A. (1966). Natur und bildung des roten farbstoffes in den nierentubuli der mutanten red von Drosophila melanogaster. **Z. Naturforsch.** **21b**: 1219-1223.

WIEDERRECHT, G. J., PATON, D. R. y BROWN, G. M. (1981). The isolation and identification of an intermediate involved in the biosynthesis of drosopterin in Drosophila melanogaster. **J. Biol. Chem.** **256**: 10399-10402.

WIEDERRECHT, G. J., PATON, D. R. y BROWN, G. M. (1984). Enzymatic conversion of dihydroneopterin triphosphate to the pyrimidodiazepine intermediate involved in the biosynthesis of the drosopterins in Drosophila melanogaster. **J. Biol. Chem.** **259**: 2195-2200.

WILSON, T. G. y JACOBSON, K. B. (1977a). Isolation and characterization of pteridines from heads of Drosophila

- melanogaster by a modified thin-layer chromatography procedure. **Biochem. Genet. 15:** 307-320.
- WILSON, T. G. y JACOBSON, K. B. (1977b). Mechanism of supression in *Drosophila*. V. Localization of the purple mutant of *Drosophila melanogaster* in the pteridine biosynthetic pathway. **Biochem. Genet. 15:** 321-332.
- YEN, T. T. T., y GLASSMAN, E. (1965). Electrophoretic variants of xanthine dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*. **Genetics 52:** 977-981.
- YIM, J. J., GRELL, E. H. y JACOBSON, K. B. (1977). Mechanism of supression in *Drosophila*. Control of sepiapterin synthase at the purple locus. **Science 198:** 1168-1170.
- YIM, J. J., JACOBSON, K. B. y CRUMMETT, D. C. (1981). Detection and some properties of an enzyme from *Drosophila melanogaster* that releases the side chain from dihydroneopterin triphosphate. **Insect Biochem. 11:** 363-370.



Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de
D. FRANCISCA SILVA MORENO

la calificación de APTO "CUM LAUDE"

Valencia, a 14 de Julio de 1986

El Secretario,

El Presidente

D. Moya

[Handwritten signature]

