

Biología

463

T.D

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAT DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y GENÉTICA
DE DOS ENZIMAS IMPLICADOS EN EL METABOLISMO DE LAS PTERINAS
EN *DROSOPHILA MELANOGASTER*:
SEPIAPTERINA REDUCTASA Y FENILALANINA HIDROXILASA.**

Memoria presentada por
PILAR RUIZ VÁZQUEZ
para optar al grado de
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Valencia, Diciembre de 1996

UMI Number: U603057

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 U603057

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

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTECA CIÈNCIES

Nº Registre 10072

DATA 24-3-97

SIGNATURA BIOLOGICAS

Nº LIBIS: j20862295

Los Dres. Juan Ferré Manzanero y Francisco J. Silva Moreno, Profesores Titulares del Departament de Genètica de la Facultat de Ciències Biològiques de la Universitat de València

CERTIFICAN: Que D^a Pilar Ruiz Vázquez, Licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo su dirección el trabajo que, con el título "Caracterización bioquímica y genética de dos enzimas implicados en el metabolismo de las pterinas en *Drosophila melanogaster*: sepiapterina reductasa y fenilalanina hidroxilasa", presenta para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas, y

AUTORIZAN: Su presentación en el Departament de Genètica de la Facultat de Ciències Biològiques de la Universitat de València para tal fin.

Para que conste, y en cumplimiento de la legislación vigente, firman el presente certificado en Burjassot, a 17 de Diciembre de 1996.



Fdo: Juan Ferré Manzanero



Fdo: Francisco J. Silva Moreno.

A
Vicente Ruiz Charles
In Memoriam

Como esas voces
que han existido ya
y que ahora suenan
y que no son sino temblor de algo
que ahora no existe ya
pero que suena.

Jaime Siles (Alegoría)

A mi madre, por su continuo sacrificio
y su apoyo incondicional.

A Paco, por permanecer a mi lado
en los momentos más difíciles.

INTRODUCCIÓN	1
1. LAS PTERINAS EN LOS SERES VIVOS	3
1.1. PRINCIPALES FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LAS PTERINAS	3
1.2. BIOSÍNTESIS DE PTERINAS	5
1.3. LAS PTERINAS EN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	9
2. EL ENZIMA SEPIAPTERINA REDUCTASA	12
2.1. FUNCIÓN FISIOLÓGICA DE LA SEPIAPTERINA REDUCTASA	12
2.2. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LA SEPIAPTERINA REDUCTASA	13
2.3. GENÉTICA MOLECULAR DE LA SEPIAPTERINA REDUCTASA	14
2.4. LA SEPIAPTERINA REDUCTASA DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	15
3. EL ENZIMA FENILALANINA HIDROXILASA	16
3.1. LAS HIDROXILASAS EN EL METABOLISMO DE LOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS	16
3.2. SISTEMA DE HIDROXILACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS	17
3.3. GENÉTICA MOLECULAR DE LAS HIDROXILASAS	18
3.4. RELACIÓN ESTRUCTURA/FUNCIÓN DE LAS HIDROXILASAS	20
3.5. REGULACIÓN DE LAS HIDROXILASAS	22
3.6. LA FENILALANINA HIDROXILASA DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	23
3.7. EL LOCUS <i>HENNA</i> DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	24
OBJETIVOS	27
MATERIAL Y MÉTODOS	31
1. MATERIAL BIOLÓGICO	33
1.1. ORGANISMO DE ESTUDIO: <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	33
1.2. CEPAS BACTERIANAS Y VÍRICAS	33
2. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD SEPIAPTERINA REDUCTASA DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	33
2.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO PROTEICO	33
2.2. ENSAYO ENZIMÁTICO	34
2.3. CROMATOENFOQUE	35
3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	35
3.1. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	35
3.1.1. Extracción de DNA genómico de <i>Drosophila melanogaster</i>	35
3.1.2. Extracción de DNA plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	35
3.1.3. Extracción de DNA de fago λ	36
3.1.4. Cuantificación de DNA	36
3.1.5. Extracción de RNA de <i>Drosophila melanogaster</i>	36
3.1.6. Cuantificación de RNA	36
3.2. DIGESTIÓN DE DNA CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	37
3.3. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	37
3.3.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	37
3.3.2. Electroforesis de DNA en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (PAGE)	37
3.3.3. Electroforesis de RNA en geles desnaturalizantes de agarosa	37
3.3.4. Recuperación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa	38
3.4. TRANSFERENCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS A FILTROS	38
3.4.1. Transferencia de DNA mediante <i>Southern blot</i>	38
3.4.2. Transferencia de RNA mediante <i>Northern blot</i>	38
3.4.3. Transferencia de DNA de placas de lisis	39
3.5. TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN	39
3.5.1. Sondas utilizadas	39
3.5.2. Hibridación de DNA	40
3.5.3. Hibridación de RNA	40
3.5.4. Inmunodetección	41
3.6. IDENTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE CLONES FÁGICOS	41

3.7. CLONACIÓN EN VECTORES PLASMÍDICOS	42
3.7.1. Vector utilizado	42
3.7.2. Ligación	42
3.7.3. Transformación y selección de recombinantes.....	42
3.8. AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	43
3.8.1. Material utilizado	43
3.8.2. Condiciones de amplificación de DNA	43
3.8.3. Amplificación de RNA mediante PCR acoplada a Transcripción Reversa (RT-PCR)	44
3.9. SECUENCIACIÓN DE DNA	45
RESULTADOS	47
1. ESTUDIO DEL ENZIMA SEPIAPTERINA REDUCTASA DE <i>DROSOPHILA</i> <i>MELANOGASTER</i>	49
1.1. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA ACTIVIDAD SEPIAPTERINA REDUCTASA EN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	49
1.2. ANÁLISIS DE INHIBICIÓN DE LA SEPIAPTERINA REDUCTASA	51
1.3. DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELÉCTRICO DE LA SEPIAPTERINA REDUCTASA	54
1.4. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD SEPIAPTERINA REDUCTASA EN MUTANTES	54
1.4.1. Variación de la actividad sepiapterina reductasa a lo largo del desarrollo	54
1.4.2. Actividad sepiapterina reductasa en diferentes mutantes de color de ojos	55
1.4.3. Experiencias de dosis génica	56
2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN ESTRUCTURAL DEL ENZIMA FENILALANINA HIDROXILASA DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	57
2.1. ESTRUCTURA DEL GEN DE LA FENILALANINA HIDROXILASA DE <i>DROSOPHILA</i> <i>MELANOGASTER</i>	57
2.2. ANÁLISIS DE TRANSCRIPCIÓN DEL GEN DE LA FENILALANINA HIDROXILASA DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	61
3. IDENTIFICACIÓN DEL LOCUS <i>HENNA</i> CON EL GEN ESTRUCTURAL DE LA FENILALANINA HIDROXILASA EN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	66
3.1. ANÁLISIS DE HIBRIDACIÓN DEL GEN DE LA FENILALANINA HIDROXILASA EN EL MUTANTE <i>HENNA-RECESSIVE</i> ³	66
3.2. ESTUDIO DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN DE LA FENILALANINA HIDROXILASA EN LA CEPA MUTANTE <i>HENNA-RECESSIVE</i> ³	69
3.3. IDENTIFICACIÓN DE LA INSERCIÓN PRESENTE EN EL GEN DE LA FENILALANINA HIDROXILASA EN LA CEPA <i>HENNA-RECESSIVE</i> ³	73
DISCUSIÓN	77
1. LA SEPIAPTERINA REDUCTASA DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	79
2. ESTRUCTURA DEL GEN DE LA FENILALANINA HIDROXILASA DE <i>DROSOPHILA</i> <i>MELANOGASTER</i>: RELACIONES EVOLUTIVAS	81
3. FUNCIONES DEL LOCUS <i>HENNA</i> DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	84
4. PAPEL DE LOS ELEMENTOS TRANSPONIBLES EN LA DIVERSIFICACIÓN GÉNICA .	87
CONCLUSIONES	91
BIBLIOGRAFÍA	95

INTRODUCCIÓN

1. LAS PTERINAS EN LOS SERES VIVOS.

Las pteridinas constituyen un conjunto de compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza donde desempeñan diversas funciones biológicas. Su base estructural la constituye el anillo pteridínico, pirazino-(2,3-*d*)-pirimidina, que aparece en sus diferentes estados de oxidación (Fig. 1). Aquellos compuestos que presentan la estructura 2-amino-4-oxo-pteridina son conocidos como pterinas, mientras que aquellos con la estructura 2,4-dioxo-pteridina se denominan lumazinas. Dentro de la pterinas se distinguen dos grupos. Las pteridinas conjugadas presentan un sustituyente *para*-aminobenzoato y glutamato en el anillo pteridínico incluyendo al ácido fólico y sus derivados; las pterinas no conjugadas, materia de estudio del presente trabajo, presentan cortas cadenas laterales alifáticas como sustituyentes. La mayoría de las pterinas naturales presentan dicho sustituyente en posición 6 aunque se ha descrito la presencia de 7-pterinas como pigmentos en insectos y como productos de degradación de las primeras en orina humana. En la figura 1 se presenta la estructura de algunas de las pterinas más significativas.

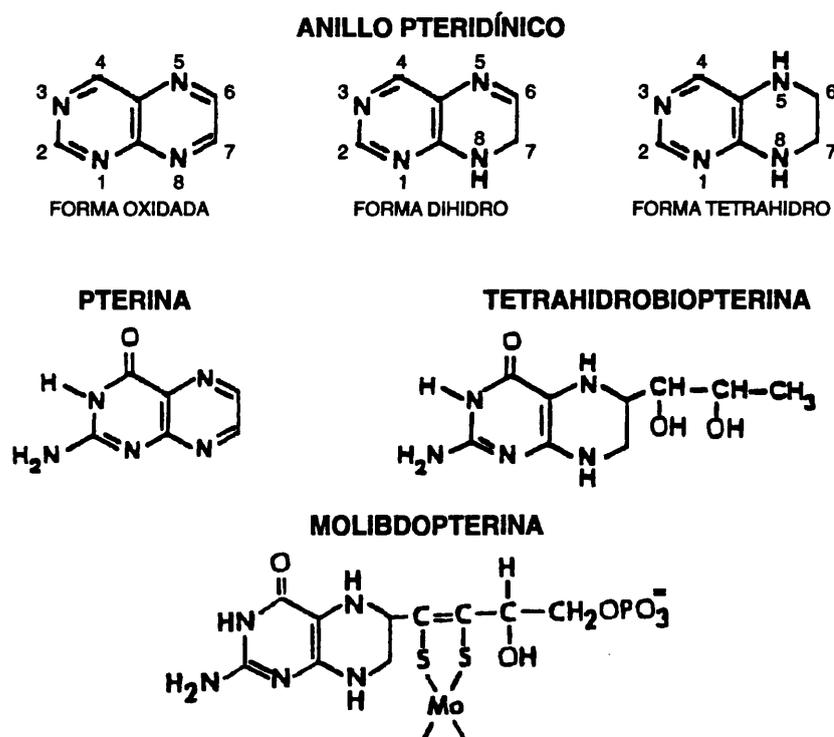


Figura 1. Estructura química de las pterinas. Se presenta la base estructural (anillo pteridínico) en sus tres estados de oxidación y la estructura de algunas pterinas naturales.

1.1. PRINCIPALES FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LAS PTERINAS.

Las pterinas no conjugadas, referidas a partir de este momento abreviadamente como pterinas, se caracterizan por su ubicuidad, estando presentes en todos aquellos organismos donde se han analizado, desde procariotas a eucariotas superiores (Nixon, 1985). Este hecho se relaciona con la gran cantidad de funciones biológicas que estos compuestos desempeñan

(revisado en Nichol *et al.*, 1985; Duch y Smith, 1991; Kaufman, 1993). Las primeras investigaciones pronto establecieron el papel de las pterinas como pigmentos, bien de coloración externa en lepidópteros, anfibios y peces, bien como pigmentos oculares, caso de insectos. A partir de ese momento, y de forma paralela a los avances en las técnicas analíticas, se ha demostrado el papel de las pterinas en importantes procesos biológicos, desde su función como cofactores enzimáticos hasta su intervención en la activación del sistema inmune.

El primer papel metabólico asignado a las pterinas es la intervención de la 6-(L-eritro-1,2-dihidroxiopropil)-5,6,7,8-tetrahidropterina, conocida por el nombre común de tetrahidrobiopterina (H₄Bip), como cofactor del enzima fenilalanina hidroxilasa (PAH) de mamíferos (Kaufman, 1963). Por tanto esta tetrahidropterina es fundamental en los procesos fisiológicos implicados en la degradación de la fenilalanina. Esta función, derivada de su capacidad de reaccionar con el oxígeno molecular, se amplía a los sistemas enzimáticos de hidroxilación de la tirosina y el triptófano (Kaufman y Fischer, 1974). Dado que los productos finales de las reacciones catalizadas por estos enzimas son los neurotransmisores catecolamínicos e indolamínicos respectivamente, se evidencia el papel esencial de las pterinas en el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso. Recientemente se ha descrito una nueva actividad de la H₄Bip como agente liberador de neurotransmisores, independiente de su función como cofactor (Koshimura *et al.*, 1990; Wolf *et al.*, 1991).

Relacionadas con esta función en la hidroxilación de los aminoácidos aromáticos se encuentran las enfermedades congénitas humanas conocidas como hiperfenilalaninemias atípicas (revisado en Blau, 1988; Scriver *et al.*, 1989; Blau *et al.*, 1996). Éstas se originan por deficiencias en el metabolismo de las pterinas que producen graves anomalías neurológicas debido a un efecto pleiotrópico sobre la síntesis de neurotransmisores y el catabolismo de la fenilalanina (revisado en Kaufman, 1987b).

La función de la H₄Bip como cofactor de las hidroxilasas de los aminoácidos aromáticos de mamíferos se extiende a todos los organismos donde se han caracterizado, incluyendo procariotas (Carr y Benkovic, 1993) e invertebrados (Bel *et al.*, 1992b). La H₄Bip también interviene como coenzima esencial en el sistema que cataliza la oxidación enzimática de alquilgliceroles a alcoholes (Tietz *et al.*, 1964; Kaufman *et al.*, 1990).

Otro compuesto pterínico que desempeña una función de cofactor enzimático es la molibdopterina (como revisión ver Rajagopalan y Johnson, 1992). Este compuesto actúa como cofactor de los llamados molibdeno-enzimas entre los que se encuentra la xantina deshidrogenasa y la sulfito oxidasa de eucariotas y la nitrato reductasa de bacterias. Su ruta de biosíntesis no ha sido establecida aunque se desliga de la del resto de pterinas naturales en los primeros pasos de su síntesis. Se ha comprobado que, en humanos, una deficiencia en la síntesis de la molibdopterina produce graves deficiencias enzimáticas pleiotrópicas (Johnson *et al.*, 1980).

En mamíferos, la presencia de H₄Bip en células no implicadas en la hidroxilación de los aminoácidos aromáticos así como la relación de niveles alterados de estos compuestos con distintos estados patológicos ha estimulado el interés del estudio de posibles nuevas funciones de las pterinas (Watcher *et al.*, 1989). En los últimos años se han publicado numerosos trabajos que relacionan el metabolismo de las pterinas con la activación del sistema inmune. Esta relación se fundamenta en el hecho de que la H₄Bip actúa como un regulador positivo en la proliferación y diferenciación celular inducida por citoquinas durante los procesos de hematopoyesis y de expansión clonal de las células T (Ziegler, 1985; Tanaka *et al.*, 1989; Ziegler *et al.*, 1990; Schott *et al.*, 1992). Sin embargo el mecanismo de esta regulación no ha sido elucidado. Los estudios realizados sugieren que pueda estar relacionada con el requerimiento de H₄Bip

para la actividad del enzima óxido nítrico sintasa (NOS) (Tayeh y Marletta, 1989; Gross y Levi, 1993). El óxido nítrico (NO), producto de la reacción catalizada por este enzima, es mediador en diversos procesos biológicos incluyendo su intervención en la respuesta inmune donde actúa como inhibidor del crecimiento tumoral y de diferentes procesos infecciosos (revisado en Jaffrey y Solomon, 1995). El papel concreto de la H₄Bip en el mecanismo de la NOS no ha sido totalmente establecido aunque, más que como cofactor catalítico, parece actuar como activador alostérico del enzima (Giovanelli *et al.*, 1991; Marletta, 1993; Cho *et al.*, 1995).

Por último, otras pterinas presentes en fluidos biológicos, como neopterina, biopterina, sepiapterina, pterina e isoxantopterina, se han relacionado con el catabolismo de estos compuestos (revisado en Rembold, 1985). En mamíferos, estos catabolitos son destinados a su excreción, proceso que desempeña un importante papel regulador manteniendo los niveles intracelulares del cofactor H₄Bip (Watcher *et al.*, 1989). En el caso de invertebrados, algunos de estos compuestos actúan como pigmentos y su presencia también se ha relacionado con procesos de almacenamiento y eliminación de nitrógeno (Ziegler y Harmsen, 1969).

En cuanto a la presencia de pterinas en plantas y hongos, donde no se requieren las funciones hasta ahora citadas, se ha propuesto su papel en los procesos de fotorrecepción (Galland y Senger, 1988). En el caso concreto de género *Dictyostelium*, perteneciente al grupo de los hongos mucosos, se ha sugerido la función de una pterina, la dictiopterina, como señal celular que induce la agregación y diferenciación de este organismo (Tillinghast y Newell, 1987; Ziegler y Gütlich, 1996).

1.2. BIOSÍNTESIS DE PTERINAS.

La ruta de biosíntesis de las pterinas es similar en todos aquellos organismos donde se ha caracterizado, implicando intermediarios y enzimas equivalentes (como revisión ver Brown, 1985; Nichol *et al.*, 1985; Duch y Smith, 1991). En la figura 2 se muestra la ruta de síntesis de H₄Bip actualmente aceptada, cuya determinación se ha realizado principalmente a partir de su estudio en mamíferos, bacterias y el invertebrado *Drosophila melanogaster*. Muy recientemente se ha propuesto que en plantas y hongos, organismos donde los conocimientos acerca de la biología de las pterinas son muy limitados, su biosíntesis transcurre de forma similar (Maier y Ninnemann, 1995).

Todas las pterinas hasta hoy caracterizadas tienen como precursor común el nucleótido guanosina trifosfato (GTP) que mediante la acción del enzima GTP ciclohidrolasa es transformado al primer derivado pteridínico, la dihidroneopterina trifosfato (H₂Nep-P₃) (Fukushima *et al.*, 1975). El mecanismo de la reacción producida es altamente complejo y ninguno de los intermediarios propuestos ha podido ser aislado. En aquellos organismos que pueden sintetizar folatos, esta reacción también constituye el inicio en su síntesis (Burg y Brown, 1966).

El siguiente paso de la ruta biosintética, específico de las pterinas no conjugadas, consiste en la transformación de la H₂Nep-P₃ en el derivado totalmente reducido 6-piruvil-tetrahidropterina (H₄Pyp) mediante el enzima H₄Pyp sintasa (Switchenko *et al.*, 1984; Milstien y Kaufman, 1985; Switchenko y Brown, 1985). Esta reacción supone la reducción del anillo pteridínico junto con la eliminación del trifosfato y no requiere la participación de agentes reductores externos, tan sólo la presencia de iones magnesio como cofactor. A partir de este intermediario, altamente inestable, se produce la ramificación de la ruta para originar las diferentes pterinas.

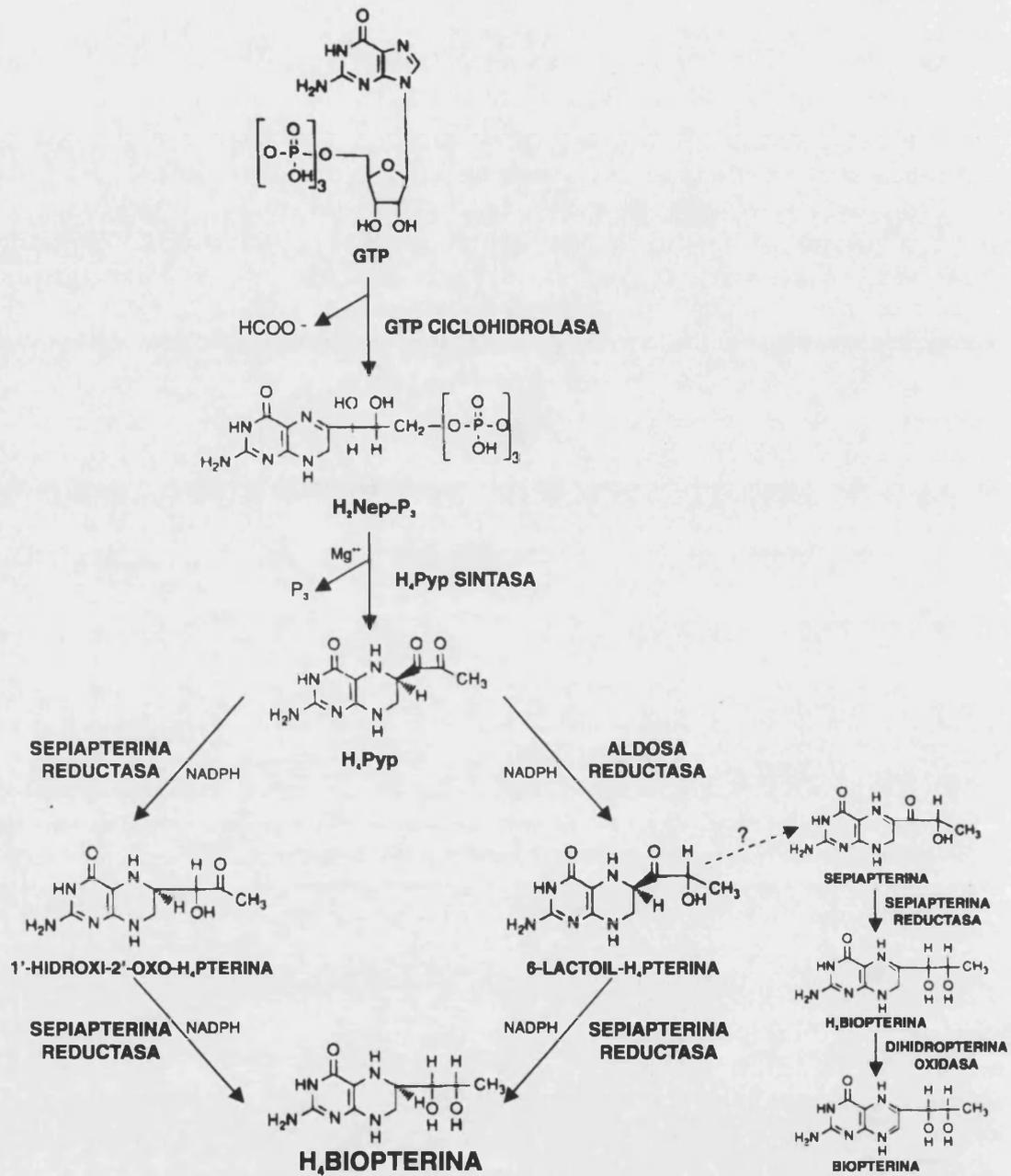


Figura 2. Ruta de biosíntesis de la tetrahidrobiopterina en mamíferos (Nichol *et al.*, 1985; Duch y Smith, 1991). Se presenta la estructura química de los intermediarios participantes indicando los enzimas implicados en los distintos pasos metabólicos. Se ha propuesto que el paso señalado con "?" se produce de forma espontánea. Abreviaturas empleadas: GTP, guanosina trifosfato; H₂Nep-P₃, dihidroneopterina trifosfato; H₄Pyp, 6-piruvil-tetrahidropterina.

La primera vía biosintética establecida fue la que da origen a las dihidropterinas 6-lactoil-dihidropterina, conocida como sepiapterina, y dihidrobiopterina (H₂Bip). A partir de la H₄Pyp se produce 6-lactoil-tetrahidropterina por acción del enzima aldosa reductasa (Milstien y Kaufman, 1983; Milstien y Kaufman, 1989a). La oxidación espontánea de este compuesto produce su derivado dihidropterínico sepiapterina, no habiéndose descrito ninguna actividad enzimática que catalice esta oxidación. La sepiapterina formada es reducida por la acción del enzima sepiapterina reductasa (SR) a H₂Bip, requiriendo la participación de NADPH como cofactor (Matsubara *et al.*, 1966; Fan y Brown, 1979). La actividad dihidropterina oxidasa transforma la H₂Bip en el producto metabólico final biopterina (Bip) (Fan y Brown, 1979; Unnasch y Brown, 1982).

En un principio se consideró que la síntesis del cofactor H₄Bip transcurría a través de intermediarios dihidropterínicos mediante la reducción de H₂Bip a H₄Bip por el enzima dihidrofolato reductasa (Fukushima *et al.*, 1975). Sin embargo, en los años ochenta se demostró que *in vivo* ésta se producía a través de intermediarios tetrahidropterínicos estableciéndose la denominada ruta de biosíntesis *de novo* de H₄Bip, frente a la anteriormente descrita (Smith y Nichol, 1984; Switchenko *et al.*, 1984; Smith y Nichol, 1986; Milstien y Kaufman, 1989b). Esta última fue denominada ruta de recuperación aunque se ha demostrado que *in vivo* no participa en la síntesis de H₄Bip residiendo su función en el mantenimiento de los niveles intracelulares de pterinas como un paso catabólico final (Watcher *et al.*, 1989).

La formación *de novo* de H₄Bip a partir de H₄Pyp implica la reducción NADPH-dependiente de ambos grupos ceto de la cadena lateral. Mediante análisis realizados *in vitro* se ha demostrado que esta doble reducción puede transcurrir a través de dos intermediarios diferentes: la 1'-hidroxi-2'-oxo-tetrahidropterina, cuya síntesis es catalizada por el enzima SR (Smith, 1987), y la 6-lactoil-tetrahidropterina, producida por la acción del enzima aldosa reductasa (Milstien y Kaufman, 1989a; Milstien y Kaufman, 1989b). Ambos productos son posteriormente reducidos por acción del enzima SR para producir H₄Bip.

No existe certeza acerca de cual de estas dos rutas potenciales es la responsable de la síntesis *in vivo* del cofactor pterínico. La caracterización cinética de los enzimas implicados sugiere que la 6-lactoil-tetrahidropterina producida por la aldosa reductasa sea el intermediario más probable (Milstien y Kaufman, 1989b; Primus y Brown, 1994). Sin embargo, los estudios de inhibición realizados en mamíferos demuestran que ambas rutas son funcionales y que la secuencia de reducción puede ser dependiente de tejido (Smith, 1987; Milstien y Kaufman, 1989a). Recientemente se ha propuesto una tercera ruta alternativa, independiente del enzima sepiapterina reductasa. Los enzimas carbonilo reductasa y aldosa reductasa de humanos son capaces de catalizar *in vitro* la reducción completa de H₄Pyp a H₄Bip aunque su participación en la síntesis *in vivo* no ha sido demostrada (Park *et al.*, 1991).

Como se ha indicado anteriormente, otras pterinas presentes en fluidos biológicos como xantopterina, isoxantopterina y pterina son productos catabólicos finales. El primer paso en el proceso catabólico lo constituye la eliminación de la cadena lateral del anillo pteridínico. Los intermediarios de dicha eliminación así como las posibles actividades enzimáticas implicadas no han sido determinadas. Se ha propuesto que en mamíferos ésta transcurra de forma no enzimática a partir del intermedio H₂Bip quinonoidea (q-H₂Bip) produciendo dihidropterina (H₂Ptr) (Blau, 1988). La q-H₂Bip es el producto de la oxidación de la H₄Bip durante la hidroxilación de los aminoácidos aromáticos. Esta propuesta se fundamenta en estudios realizados *in vitro* sobre extractos de hígado de rata (Rembold, 1985) así como en el análisis químico de la autoxidación no enzimática de la H₄Bip (Armarego *et al.*, 1983; Davis *et al.*, 1988). Sin embargo

su funcionalidad fisiológica no ha sido evidenciada. Como más adelante se expondrá, en el caso del invertebrado *Drosophila melanogaster* se ha propuesto que la eliminación de la cadena lateral se produzca a partir de H₄Pyp mediante su transformación en H₂Ptr a través del intermediario altamente inestable tetrahidropterina (H₄Ptr) (Ferré *et al.*, 1986; Guillamón y Ferré, 1988).

La formación del resto de catabolitos a partir de H₂Ptr ha sido completamente determinada, tanto en mamíferos como invertebrados (revisado en Rembold, 1985). En este proceso intervienen los enzimas dihidropterina oxidasa y xantina deshidrogenasa. En los organismos donde se detectan lumazinas, las pterinas formadas son modificadas por la acción de diferentes oxigenasas y desaminasas para producir, como catabolitos finales, las lumazinas correspondientes.

Los genes que codifican para los enzimas implicados en la síntesis de pterinas han sido estudiados en diversos organismos. Así, se han aislado los mensajeros de la GTP ciclohidrolasa en mamíferos (Hatakeyama *et al.*, 1991; Gütlich *et al.*, 1994), invertebrados (McLean *et al.*, 1993) y procariotas (Katzenmeier *et al.*, 1991). Las secuencias obtenidas exhiben un elevado grado de similitud lo que sugiere que la evolución de este enzima ha transcurrido de forma conservativa. También se han identificado los transcritos del gen de la H₄Pyp sintasa de mamíferos (Inoue *et al.*, 1991) y *Drosophila melanogaster* (Kim *et al.*, 1996) y, como más adelante se expondrá, del gen de la SR en diferentes mamíferos. En humanos se han identificado mutaciones en los genes de la GTP ciclohidrolasa y la H₄Pyp sintasa, las cuales provocan diferentes formas de hiperfenilalaninemias (revisado en Blau *et al.*, 1996).

En lo que hace referencia a la regulación de la biosíntesis de pterinas, los estudios realizados se centran en el control de la síntesis de H₄Bip en mamíferos. Se ha demostrado que los niveles intracelulares de H₄Bip están sometidos a una importante regulación a través de la tasa de biosíntesis *de novo* (revisado en Duch y Smith, 1991). Los datos disponibles indican que el enzima GTP ciclohidrolasa constituye el paso limitante en la ruta.

En aquellos tejidos activos en la hidroxilación de los aminoácidos aromáticos, se ha descrito la existencia de un mecanismo de regulación recíproco entre los niveles de precursores aminoacídicos y el nivel de cofactor (revisado en Levine y Galloway, 1987; Nichol *et al.*, 1987). Los aminoácidos tirosina y fenilalanina resultan activadores de la ruta de síntesis de pterinas, mientras que la propia H₄Bip actúa como un potente retroinhibidor. Se ha demostrado que el control sobre los niveles de H₄Bip se produce a través del enzima GTP ciclohidrolasa, cuya actividad es regulada a nivel transcripcional y post-traduccional en función de la disponibilidad del sustrato GTP y de los niveles de H₄Bip (Viveros *et al.*, 1981; Shen *et al.*, 1988; Hatakeyama *et al.*, 1989). En el caso concreto de la hidroxilación de la fenilalanina, se ha demostrado que el efecto inductor de dicho aminoácido sobre esta actividad es mediado por una proteína reguladora que también es la responsable de la retroinhibición por el producto final H₄Bip (Haradama *et al.*, 1993). En los tejidos activos en la síntesis de neurotransmisores se ha observado una regulación de la biosíntesis del cofactor que responde a los niveles de indolaminas y catecolaminas, existiendo un importante control hormonal de la misma (Nichol *et al.*, 1987).

La regulación de la biosíntesis de H₄Bip en los tipos celulares implicados en la respuesta inmune responde a la presencia de citoquinas. Se ha demostrado que en monocitos y células T, el tratamiento con interferón- γ induce la biosíntesis de H₄Bip mediante un aumento de la actividad GTP ciclohidrolasa (Ziegler *et al.*, 1990). Esta inducción se produce a nivel transcripcional, dando lugar a un aumento en los niveles del mensajero correspondiente

seguido de una inhibición mediante modificación post-traducciona l de la proteína que permite la recuperación de los niveles normales de actividad (Schott *et al.*, 1993). También se ha descrito el papel inductor del interferón- γ sobre la síntesis de H₄Bip en células productoras de NO (Werner-Felmayer *et al.*, 1993; Gross y Levi, 1993).

1.3. LAS PTERINAS EN *DROSOPHILA MELANOGASTER*.

Existen numerosas razones que hacen de *Drosophila melanogaster* un excelente modelo experimental para el estudio de la genética y la bioquímica de las pterinas. Además de las ventajas experimentales intrínsecas a este organismo, el factor más importante lo constituye el hecho de que este insecto presenta elevadas concentraciones de pterinas en los ojos, donde estos compuestos actúan como pigmentos. Esta circunstancia ha llevado a la identificación de un elevado número de mutantes de color de ojos, cuyo estudio ha permitido profundizar en el conocimiento de la biosíntesis de pterinas y de los genes que la controlan.

Los ojos de *Drosophila melanogaster* contienen dos tipos mayoritarios de pigmentos: los pigmentos marrones, denominados omocromos, y las pterinas, que incluyen los pigmentos rojos, conocidos en su conjunto como drosopterinas, y el pigmento amarillo sepiapterina. Estos compuestos actúan como pigmentos de contraste estando depositados en los gránulos pigmentarios de las células accesorias del omatidio (revisado en Summers *et al.*, 1982).

Las drosopterinas constituyen un grupo de compuestos bicíclicos de estructura compleja que se ha dividido en dos familias (revisado en Brown, 1985). Los componentes de cada una de éstas comparten la misma fórmula empírica siendo estereoisómeros que se originan por reordenaciones no enzimáticas. El grupo mejor caracterizado es el constituido por drosopterina, isodrosopterina y neodrosopterina. La estructura propuesta para la drosopterina consiste en un anillo pteridínico y un anillo diazepínico unidos por un átomo de carbono (Theobald y Pfeleiderer, 1978) (Fig. 3). La isodrosopterina y la neodrosopterina son isómeros posicionales de la anterior. Las aurdrosopterinas parecen ser una mezcla racémica de compuestos relacionados estructuralmente con la drosopterina (Dorsett *et al.*, 1979). Probablemente difieran de ésta en la cadena lateral que se extiende a partir del carbono puente entre los dos anillos. Aparte de *Drosophila*, estos compuestos tan sólo han sido aislados en algunas especies de anfibios donde actúan como pigmentos de coloración externa (Nixon, 1985).

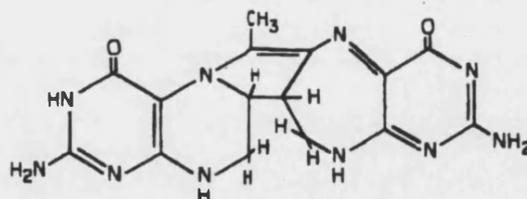


Figura 3. Estructura química propuesta para la drosopterina (Theobald y Pfeleiderer, 1978).

Además de su función en el sistema visual, las pterinas desempeñan en *Drosophila*, al igual que en mamíferos, un importante papel en la hidroxilación de los aminoácidos aromáticos. Se ha demostrado que la H₄Bip es el cofactor del enzima PAH (Bel *et al.*, 1992b), proteína que en este organismo también desempeña, como más adelante se expondrá, la función

triptófano hidroxilasa (TPH). Por otra parte se ha sugerido que sea una tetrahidropterina el coenzima necesario para la hidroxilación de la tirosina, aunque en este caso no existen datos concluyentes acerca de su identidad (Neckameyer y Quinn, 1989).

En la figura 4 se presenta de forma esquemática la ruta de biosíntesis de las pterinas propuesta en *Drosophila melanogaster* (Guillamón *et al.*, 1988). La vía correspondiente a la síntesis del cofactor H₄Bip es similar a la descrita en mamíferos. Sin embargo algunos pasos metabólicos todavía no han sido totalmente caracterizados.

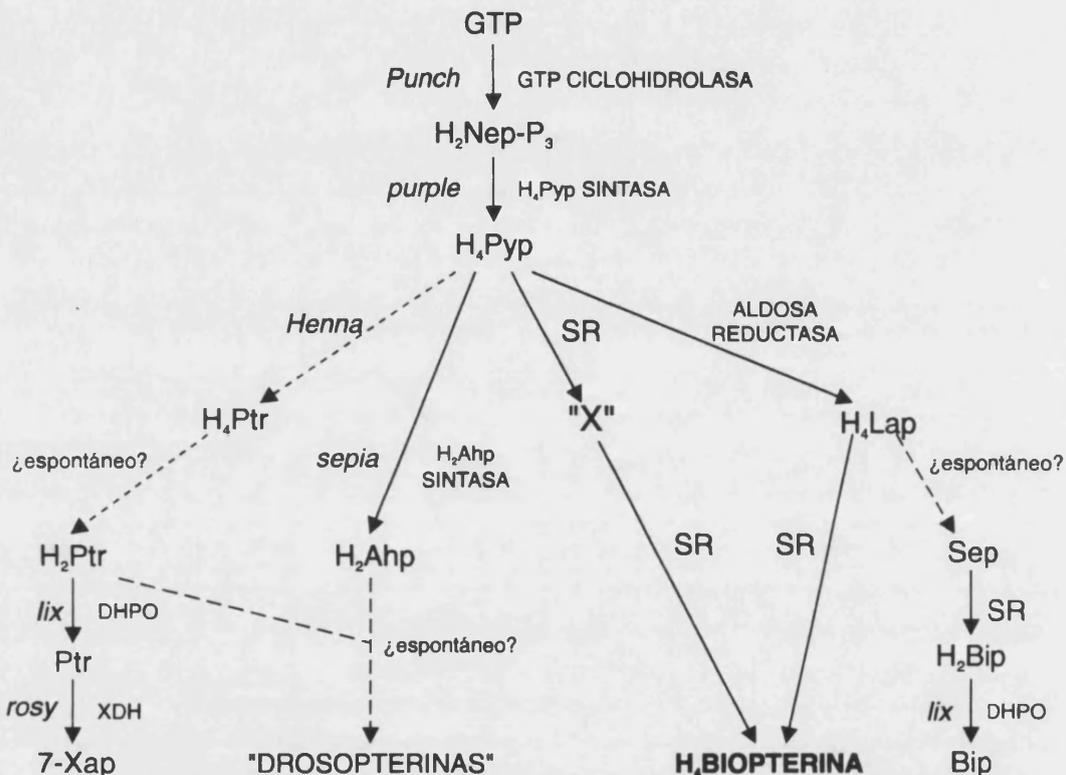


Figura 4. Ruta de biosíntesis de pterinas propuesta en *Drosophila melanogaster* (Guillamón *et al.*, 1989). Se presentan los intermediarios y enzimas participantes así como los loci génicos implicados. Aunque el compuesto "X" no ha sido aislado en *Drosophila*, en mamíferos ha sido identificado como 1'-hidroxi-2'-oxo-tetrahidropterina (Smith, 1987). Abreviaturas utilizadas: GTP, guanosina trifosfato; H₂Nep-P₃, dihidroneopterina trifosfato; H₄Pyp, 6-piruviloil-tetrahidropterina; H₄Ptr, tetrahidropterina; H₂Ptr, dihidropterina; Ptr, pterina; 7-Xap, isoxantopterina; H₂Ahp, acetildihidrohomopterina; H₄Lap, 6-lactoiloil-tetrahidropterina; H₄Biopterina, tetrahidrobiopterina; Sep, sepiapterina; H₂Bip, dihidrobiopterina; Bip, biopterina; SR, sepiapterina reductasa; DHPO, dihidropterina oxidasa; XDH, xantina deshidrogenasa; *lix*, *little isoxanthopterin*.

A través del estudio de mutantes de color de ojos se han identificado los loci génicos que controlan algunos de los enzimas implicados. Se ha demostrado que el locus *Punch* codifica para el enzima GTP ciclohidrolasa (Mackay y O'Donnell, 1983; McLean *et al.*, 1993). Asimismo se ha demostrado que *purple* es el gen estructural de la H₄Pyp sintasa (Yim y

Jacobson, 1977; Kim *et al.*, 1996) y que el enzima xantina deshidrogenasa es codificado por el locus *rosy* (Keith *et al.*, 1987). Aunque no existen evidencias moleculares, se ha propuesto que el locus *little isoxanthopterin* sea el gen estructural de la dihidropterina oxidasa (Silva *et al.*, 1991). Otros mutantes se han relacionado con genes reguladores que modulan la actividad de los enzimas implicados en la ruta, presentando muchos de ellos un efecto pleiotrópico ya que afectan tanto a la síntesis de pterinas como de omocromos (Summers *et al.*, 1982; Ferré *et al.*, 1986). También se ha identificado distintos loci que afectan a los mecanismos de deposición y transporte de estos pigmentos como es el caso de los mutantes *white* y *brown* (Dreesen *et al.*, 1988).

Los datos referentes a la biosíntesis de drosopterinas son mucho más limitados (revisado en Brown, 1985). Se ha demostrado que la pirimidodiazepina acetildihidrohopterina (H_2Ahp) interviene como intermediario en la síntesis de drosopterina (Dorsett y Jacobson, 1982; Wiederrecht *et al.*, 1981). Este compuesto es sintetizado a partir de H_4Pyp por la acción del enzima H_2Ahp sintasa proponiéndose que el locus *sepia* codifique dicha actividad (Wiederrecht y Brown, 1984; Wiederrecht *et al.*, 1984). Los estudios realizados indican que la formación de drosopterina a partir de la H_2Ahp se produce por condensación de ésta con una pterina carente de cadena lateral. En base a estudios de síntesis química así como al análisis de diferentes mutantes se ha propuesto que esta pterina sea la H_2Ptr (Ferré *et al.*, 1986; Paton y Brown, 1986). El mecanismo de dicha condensación y las actividades enzimáticas implicadas no han sido caracterizados. Se ha sugerido que el resto de drosopterinas así como las aurodrosopterinas se producen por acción de diferentes actividades enzimáticas aunque éstas no han sido caracterizadas.

En lo que hace referencia a la eliminación de la cadena lateral del anillo pteridínico se ha propuesto que se produce a partir de la tetrahidropterina H_4Pyp que es transformada a H_2Ptr a través del intermediario altamente inestable H_4Ptr (Ferré *et al.*, 1986; Guillamón y Ferré, 1988). En base al análisis de los niveles de pterinas en distintos mutantes se ha propuesto que el locus *Henna* controle dicha reacción (Ferré *et al.*, 1986; Guillamón y Ferré, 1988). No existen datos concluyentes acerca de la naturaleza de la actividad enzimática implicada. Tan sólo se ha descrito la presencia en extractos de cabezas de moscas adultas de una actividad capaz de catalizar la eliminación de la cadena lateral de H_2Nep-P_3 para producir una dihidropterina no identificada, aunque el papel de este supuesto enzima en la síntesis de pterinas no ha sido demostrado (Yim *et al.*, 1981).

La información acerca de la regulación de la ruta de biosíntesis de pterinas en *Drosophila melanogaster* indica la existencia de un importante control de la misma a lo largo del desarrollo de los individuos. Se ha sugerido que el enzima GTP ciclohidrolasa sea, al igual que en mamíferos, el paso limitante de la ruta biosintética. Los análisis realizados indican la existencia de dos periodos de máxima actividad enzimática, concretamente en el momento de la pupación y en adultos jóvenes, donde la actividad se concentra en cabezas (O'Donnell *et al.*, 1989). El primer máximo se relaciona con el requerimiento del cofactor pteridínico para la hidroxilación de los aminoácidos aromáticos que, como más adelante se expondrá, interviene en los procesos de formación de cutícula. El segundo máximo se relaciona claramente con la formación de pterinas durante la pigmentación ocular. Estos aumentos en la actividad se corresponden con un incremento en los niveles de transcripción del gen de la GTP ciclohidrolasa, habiéndose identificado dos transcritos alternativos expresados de forma diferencial a lo largo del desarrollo (McLean *et al.*, 1993). Ambos codifican para un mismo producto proteico y se ha sugerido que su origen se deba al uso de promotores alternativos.

Asimismo se ha descrito la regulación de la actividad H₄Pyp sintasa a lo largo del desarrollo. Ésta responde a un patrón similar al descrito para la GTP ciclohrolasa habiéndose caracterizado dos transcritos alternativos del gen que codifica este enzima (Kim *et al.*, 1996). Su origen se debe al uso de promotores alternativos, uno de ellos constitutivo, mientras que el segundo se expresa específicamente en cabezas de adultos jóvenes. También se ha descrito una variación de la actividad SR mostrando un aumento de la actividad en pupas maduras y adultos recién emergidos (Fan y Brown, 1979). En este caso no se dispone de información acerca de los niveles de transcripción ya que no se ha aislado el gen correspondiente.

2. EL ENZIMA SEPIAPTERINA REDUCTASA.

El enzima sepiapterina reductasa (SR; 7,8-dihidrobioterina:NADP⁺ oxido-reductasa, E.C. 1.1.1.153) cataliza la reducción NADPH-dependiente del grupo ceto de diversos compuestos entre los que se incluyen tanto derivados pteridínicos como otras cetonas no relacionadas. Así, este enzima pertenece al grupo de las aldo-ceto reductasas (Sueoka y Katoh, 1985; Smith, 1987). Además de la actividad reductasa, este enzima actúa como una isomerasa, catalizando el intercambio entre grupos ceto e hidroxilo adyacentes, actividad que se produce en ausencia de cofactor (Katoh y Sueoka, 1987; Katoh y Sueoka, 1989).

2.1. FUNCIÓN FISIOLÓGICA DE LA SEPIAPTERINA REDUCTASA.

Como anteriormente se ha descrito, la SR juega un papel importante en el metabolismo de pterinas, resultando esencial en la biosíntesis del cofactor H₄Bip. Este enzima cataliza uno o ambos pasos de las dos reducciones necesarias para la conversión de H₄Pyp en H₄Bip (Fig. 5). Además, la SR es responsable de la reducción de la sepiapterina a H₂Bip. Se ha propuesto que la actividad isomerasa desempeñe un papel en la biosíntesis de H₄Bip catalizando la transformación de la 6-lactoil-tetrahydropterina a 1'-hidroxi-2'-oxo-tetrahydropterina (Katoh y Sueoka, 1987). Sin embargo los estudios cinéticos realizados indican que la actividad isomerasa no es competente frente a la de reducción (Katoh y Sueoka, 1989).

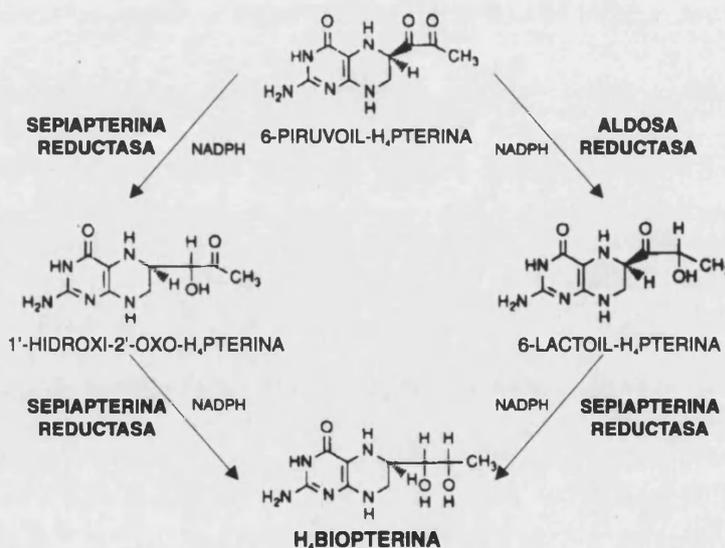


Figura 5. Papel de la sepiapterina reductasa en la biosíntesis de tetrahidrobioterina.

La amplia especificidad de sustrato presentada por este enzima sugiere que pueda desempeñar otras funciones fisiológicas no relacionadas con el metabolismo de las pterinas. Esta propuesta se ve apoyada por la amplia distribución de la SR que, en el caso concreto de mamíferos, aparece tanto en tejidos activos en la síntesis de pterinas como en otros en los que no se detectan estos compuestos (Nichol *et al.*, 1985). En el caso de *Drosophila melanogaster*, la actividad SR presenta un nivel basal elevado durante todo el desarrollo, no correspondiéndose estrictamente con el perfil de síntesis de pterinas (Fan y Brown, 1979).

En humanos, se ha descrito la existencia de isoenzimas de la SR (Park *et al.*, 1991). La proteína carbonilo reductasa es capaz de catalizar la reducción de la sepiapterina con una eficacia similar a la exhibida por la SR, contribuyendo a la actividad total presente en extractos de cerebro en un 30%. Este enzima, contrariamente a lo que ocurre con la SR, apenas es inhibido por la N-acetilserotonina. Asimismo, la carbonilo reductasa actúa *in vitro* sobre el sustrato H₄Pyp catalizando su reducción a 6-lactoil-tetrahydropterina y 1'-hidroxi-2'-oxo-tetrahydropterina. Por otra parte, la aldosa reductasa, además de su función demostrada en la reducción de H₄Pyp, es capaz de reducir *in vitro* al intermediario 1'-hidroxi-2'-oxo-tetrahydropterina a H₄Bip. En base a estas observaciones, se ha propuesto la existencia de una tercera ruta de biosíntesis de H₄Bip independiente del enzima SR (Fig. 6). Su funcionalidad biológica no ha sido demostrada, aunque los estudios cinéticos indican una baja eficacia frente a las dos rutas ya establecidas.

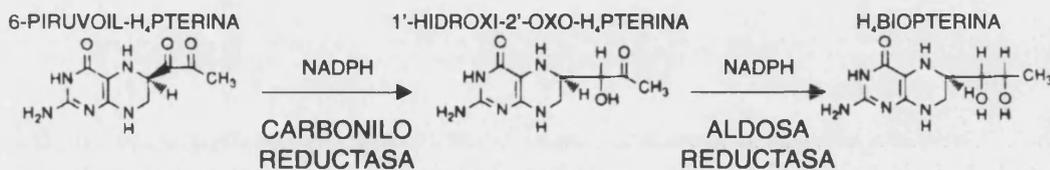


Figura 6. Ruta alternativa de síntesis de tetrahydrobiopterina independiente del enzima sepiapterina reductasa (Park *et al.*, 1991).

2.2. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LA SEPIAPTERINA REDUCTASA.

La SR ha sido purificada a partir de diversos organismos y tejidos, como hígado de caballo (Katoh, 1971), eritrocitos de rata (Sueoka y Katoh, 1982), el gusano de la seda *Bombyx mori* (Iino *et al.*, 1992) y, muy recientemente, en el invertebrado *Drosophila melanogaster* (Yoon *et al.*, 1993; Primus y Brown, 1994), apareciendo en todos los casos como un enzima dimérico. En eritrocitos de rata y *Bombyx mori*, la SR está formada por dos subunidades idénticas de unos 27.500 y 29.000 Da, respectivamente. Sin embargo, en *Drosophila* aparece como un heterodímero con subunidades de 36.000 y 39.000 Da, respectivamente. No se ha establecido la relación entre la dimerización y la capacidad catalítica del enzima.

Las propiedades cinéticas de la SR han sido ampliamente estudiadas (revisado en Nichol *et al.*, 1985; Duch y Smith, 1991). En la Tabla I se presentan los datos publicados acerca de la afinidad del enzima por los distintos sustratos (Smith, 1987; Sueoka y Katoh, 1982; Sueoka y Katoh, 1985; Ferré y Naylor, 1988; Smith *et al.*, 1990; Iino *et al.*, 1992; Primus y Brown, 1994). Dada la inestabilidad de los compuestos tetrahydropterínicos, el sustrato más utilizado en estos estudios ha sido la sepiapterina.

Tabla I. Afinidad del enzima SR de diversos organismos por distintos sustratos pterínicos.

ORGANISMO	K_m (μ M)			
	Sepiapterina	H ₄ Pyp	1'hidroxi-2'oxo-H ₄ pterina	6-lactoil-H ₄ pterina
Eritrocito de rata	5-14	2	7	8
Células humanas	20-22	-	-	-
Médula adrenal bovina	6	2	-	-
<i>Drosophila melanogaster</i>	63-75	-	-	50
<i>Bombyx mori</i>	10	-	-	-

En mamíferos, distintas aminas biogénicas como N-acetildopamina, N-acetil-*m*-tiramina y N-acetilserotonina y sus derivados sintéticos resultan potentes inhibidores de la SR (Katoh *et al.*, 1982; Smith *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1992). El uso de estos inhibidores ha sido crucial para la determinación de la ruta biosintética de la H₄Bip (Smith, 1987) así como para el estudio de nuevas funciones de esta pterina (Tanaka *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1992). En base a los estudios cinéticos realizados, se ha propuesto un modelo molecular de inhibición competitiva según el cual los anillos fenólicos de estos compuestos se unen al enzima en el sitio activo de unión del anillo pterínico; los grupos acetilo parecen mimetizar las cadenas laterales del sustrato (Smith *et al.*, 1992). En invertebrados los estudios realizados al respecto son muy limitados. Se ha demostrado el efecto inhibitorio de la N-acetilserotonina sobre la SR de *Bombyx mori* (Iino *et al.*, 1992) y de *Drosophila melanogaster* (Yoon *et al.*, 1993) aunque éste no ha sido cinéticamente caracterizado.

Dado que las aminas biogénicas requieren para su síntesis la participación de H₄Bip como cofactor de las hidroxilasas de los aminoácidos aromáticos tirosina y triptófano (Kaufman y Fisher, 1974), la inhibición observada se ha relacionado con un posible papel regulador de estos compuestos sobre los niveles de cofactor. Sin embargo, los estudios realizados en mamíferos han demostrado que las cantidades requeridas de estos compuestos para producir una descenso en la tasa de síntesis de H₄Bip son muy superiores a las fisiológicas, cuestionando la funcionalidad de dicha inhibición (Smith *et al.*, 1990).

2.3. GENÉTICA MOLECULAR DE LA SEPIAPTERINA REDUCTASA.

El conocimiento acerca del gen codificante de la actividad SR es muy limitado. Tan sólo se ha aislado el cDNA correspondiente al enzima de hígado de rata (Citron *et al.*, 1990), de humanos (Ichinose *et al.*, 1991) y, muy recientemente, de ratón (Ota *et al.*, 1995). En rata, la pauta de lectura descrita codifica para una proteína de 262 aminoácidos. En humanos y ratón el producto proteico codificado resulta de 261 residuos.

La comparación de las secuencias proteicas deducidas indica la existencia de un 74% de identidad entre humanos y rata o ratón, y un 88% entre estos dos últimos organismos. Este valor resulta bajo si se compara con el obtenido para otros enzimas de la ruta. Así, por ejemplo la GTP ciclohidrolasa de rata y humanos exhibe una identidad superior la 90% (Hatakeyama *et al.*, 1991; Togari *et al.*, 1992), similitud que se extiende al enzima de organismos evolutivamente alejados como el invertebrado *Drosophila melanogaster* (McLean *et al.*, 1993) y la bacteria *Bacillus subtilis* (Babitke *et al.*, 1992). Estos presentan una identidad con el enzima de mamíferos del 60% y 50%, respectivamente.

Una característica importante de las secuencias proteicas es la presencia de posibles sitios de unión del cofactor NADPH, así como de un sitio putativo de unión del sustrato pteridínico, presente en las hidroxilasas de los aminoácidos aromáticos y en otros enzimas que unen pterinas (Citron *et al.*, 1990; Ichinose *et al.*, 1991). Ambos motivos se sitúan en el extremo N-terminal de la proteína.

Hasta el momento, no se ha descrito la existencia de mutantes que afecten al gen estructural de la SR. Tan sólo se ha propuesto que el mutante *lemon* del invertebrado *Bombyx mori*, pueda presentar una deficiencia en el gen de la SR, aunque no existen evidencias moleculares que apoyen este hecho (Iino *et al.*, 1992). El hecho de que ninguna de las patologías humanas asociadas a deficiencias en la biosíntesis de pterinas se deba a un defecto genético de la SR se ha relacionado con la existencia de los isoenzimas anteriormente citados, cuya actividad ocultaría su manifestación fenotípica (Park *et al.*, 1991).

2.4. LA SEPIAPTERINA REDUCTASA DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*.

Los estudios realizados sobre la actividad SR de *Drosophila melanogaster* son escasos. Como anteriormente se ha indicado, se ha descrito el aislamiento parcial de este enzima que resulta formado por dos subunidades de unos 36 y 39 kDa, respectivamente (Yoon *et al.*, 1993; Primus y Brown, 1994). Esta situación contrasta con la encontrada en mamíferos donde la SR aparece como una proteína homodimérica. Los estudios cinéticos indican que la afinidad de la SR de *Drosophila* por los distintos sustratos pteridínicos es inferior a la observada por el enzima de otros organismos, como se desprende de los valores de K_m descritos (ver Tabla I).

Como en mamíferos, la SR de *Drosophila* resulta esencial en la síntesis *de novo* de H_4Bip (Switchenko *et al.*, 1984). De las dos rutas alternativas propuestas, los estudios cinéticos sugieren que esta síntesis transcurre a través de la 6-lactoil-tetrahydropterina producida por la acción del enzima aldosa reductasa sobre el sustrato H_4Pyp (Primus y Brown, 1994). En *Drosophila*, el intermediario generado por la acción de la SR sobre la H_4Pyp no ha sido aislado, aunque por paralelismo con otros organismos se asume su identidad como 1'-hidroxi-2'-oxo-tetrahydropterina. En ambas rutas, la SR cataliza la reducción final para formar H_4Bip .

El estudio de la actividad SR a lo largo del desarrollo de *Drosophila* muestra un aumento de la actividad en pupas maduras y adultos recién emergidos, periodo donde la síntesis de pigmentos es máxima (Fan y Brown, 1979). Este aumento se corresponde con la presencia de elevados niveles de H_4Bip reflejando la intervención de este enzima en su síntesis (Bel *et al.* 1992b). Sin embargo, la presencia de elevados niveles basales en todos los estadios sugiere un posible papel de la SR en otros procesos metabólicos.

Las indolaminas N-acetilserotonina y melatonina ejercen *in vitro* un efecto inhibitor sobre la actividad SR de *Drosophila* aunque éste no ha sido caracterizado cinéticamente (Yoon *et al.*, 1993; Primus y Brown, 1994). Respecto al posible papel fisiológico de esta inhibición, tan sólo se ha observado que la suplementación de la dieta con N-acetilserotonina produce una acumulación de fenilalanina en pupas, hecho que se ha relacionado con una disminución en la síntesis de cofactor del enzima PAH (Bel *et al.*, 1992b).

El gen codificante de la SR de *Drosophila melanogaster* no ha sido caracterizado. El estudio genético de esta actividad se limita al análisis del patrón de pterinas en distintos mutantes de color de ojos que sugiere la posible participación de distintos loci génicos en el control de su actividad, si bien no existen datos concluyentes al respecto (Ferré *et al.*, 1986).

3. EL ENZIMA FENILALANINA HIDROXILASA.

La fenilalanina hidroxilasa (PAH; EC 1.14.16.1), enzima que cataliza la hidroxilación pterin-dependiente del aminoácido fenilalanina, constituye junto con la tirosina hidroxilasa (TH; EC 1.14.16.2) y la triptófano hidroxilasa (TPH; EC 1.14.16.4) el grupo enzimático de las hidroxilasas de los aminoácidos aromáticos. Estos enzimas comparten numerosas propiedades físicas, estructurales y catalíticas en todos los organismos donde se han estudiado. En base a estas similitudes así como a la elevada identidad que presentan los genes que los codifican se ha propuesto que estos enzimas constituyen una familia génica con un origen evolutivo común a partir de la duplicación de un único gen ancestral (Ledley *et al.*, 1985; Grenett *et al.*, 1987).

Las características generales de estos enzimas se han establecido principalmente a partir de su estudio en mamíferos y, muy especialmente, del análisis de la PAH hepática. En los últimos años el interés se ha extendido a las hidroxilasas de invertebrados y procariontes ya que su elevado grado de similitud con los enzimas de vertebrados hace de estos organismos sistemas modelo ideales para el análisis de estas actividades y de los genes que las codifican. Así, aunque el objeto de este trabajo se centra en el estudio del gen de la PAH de *Drosophila melanogaster* que, como más tarde se expondrá, en este organismo también codifica para la actividad TPH, la presente introducción se realiza considerando las tres hidroxilasas como un grupo con características comunes (revisado en Kaufman, 1987a; Hufton *et al.*, 1995).

3.1. LAS HIDROXILASAS EN EL METABOLISMO DE LOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS.

Antes de proceder al análisis del sistema enzimático de las hidroxilasas y al estudio de los genes que lo controlan es importante localizar su papel dentro del contexto del metabolismo de los aminoácidos aromáticos.

En mamíferos, la conversión de fenilalanina en tirosina catalizada por la PAH desempeña un doble propósito. En primer lugar, proporciona una fuente endógena de tirosina, convirtiendo a este aminoácido en no esencial. Así en humanos se ha demostrado la función de la PAH en el proceso de melanogénesis proporcionando un aporte endógeno de tirosina (Schallreuter *et al.*, 1994). Por otra parte este enzima constituye el paso limitante en la única ruta que cataboliza totalmente la fenilalanina a dióxido de carbono y agua (revisado en Shiman, 1985; Kaufman, 1987a). Asociada a esta función del enzima se encuentra la enfermedad congénita humana de la fenilcetonuria, debida a un defecto en el gen que lo codifica (revisado en Einsensmith y Woo, 1991). Una deficiencia en el enzima PAH produce un exceso de fenilalanina y sus derivados fenilcetonúricos en sangre ocasionando graves daños en el sistema nervioso. Se han descrito numerosas mutaciones del gen de la PAH asociadas a esta enfermedad (revisado en Hoang *et al.*, 1996).

Los enzimas TH y TPH resultan esenciales en la síntesis de neurotransmisores. La TH cataliza la hidroxilación de tirosina a 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), paso limitante en la biosíntesis de catecolaminas (revisado en Nagatsu, 1991). La TPH cataliza la hidroxilación del triptófano a 5-hidroxitriptófano, paso limitante de la ruta de biosíntesis del neurotransmisor 5-hidroxitriptamina (serotonina) y de la melatonina (Kaufman, 1987b). Por tanto queda patente la importancia de estos enzimas en el funcionamiento del sistema nervioso. Diversas enfermedades neurológicas, como depresión, esquizofrenia o el síndrome de Parkinson, aparecen relacionadas con bajos niveles de estas actividades (Kaufman, 1987b) aunque no se han podido asociar con mutaciones en los genes correspondientes. Tan sólo muy recientemente se

ha descrito la relación de una de estas patologías, en concreto del síndrome de Segawa, con una mutación puntual en el gen de la TH (Bartholomé y Lüdecke, 1995). Como anteriormente se ha expuesto, existen formas atípicas de hiperfenilalaninemia debidas a deficiencias en el metabolismo del cofactor pteridínico, las cuales se ven agravadas frente a la fenilcetonuria por un efecto pleiotrópico sobre la síntesis de neurotransmisores asociada a las actividades TH y TPH (revisado en Kaufman, 1987b; Blau, 1988; Scriver *et al.*, 1989).

En el caso de invertebrados, la función fisiológica de los sistemas de hidroxilación de los aminoácidos aromáticos no ha sido tan profusamente estudiada. Los datos existentes indican que desempeñan funciones equivalentes a las descritas en mamíferos, interviniendo tanto en la síntesis de neurotransmisores como en el catabolismo de la fenilalanina. Además en estos organismos se ha descrito la función del enzima TH en los procesos de endurecimiento y pigmentación de la cutícula (Hopkins, 1982; Budnik y White, 1987).

3.2. SISTEMA DE HIDROXILACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS.

El sistema de hidroxilación de los aminoácidos aromáticos está constituido por tres actividades enzimáticas (revisado en Kaufman, 1987). Junto a las hidroxilasas participan los enzimas pterina-4a-carbinolamina deshidratasa y dihidropterina reductasa, implicados en la regeneración del cofactor pteridínico (Fig. 7). Así, a las hiperfenilalaninemias debidas a defectos en la síntesis de cofactor, se añaden las producidas por una deficiencia en los enzimas implicados en su regeneración (Blau, 1988; Citron *et al.*, 1993; Smooker *et al.*, 1993).

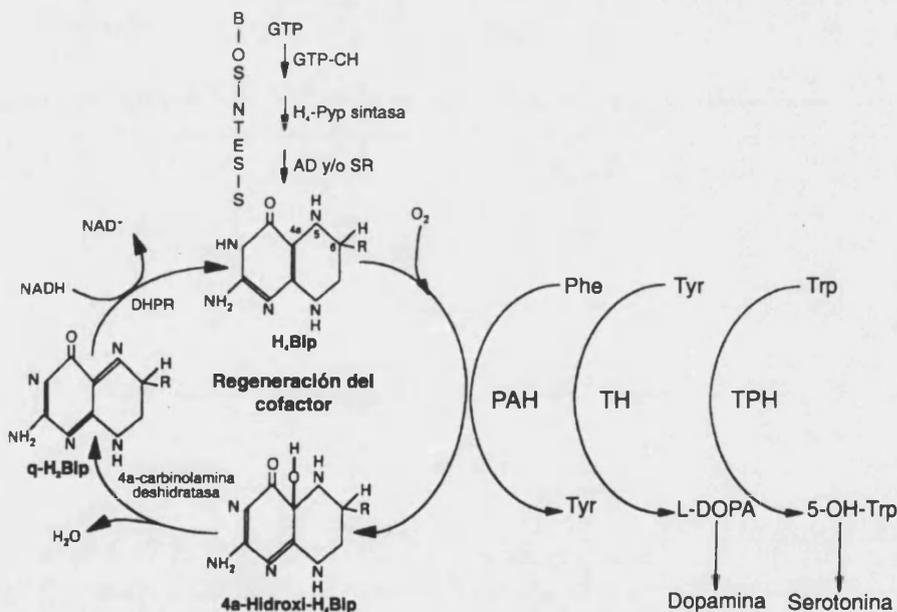


Figura 7. Enzimas implicados en la hidroxilación de los aminoácidos aromáticos (adaptado de Hufton *et al.*, 1995). Se muestran los enzimas e intermediarios participantes en la regeneración del cofactor pteridínico y en su ruta de biosíntesis. Abreviaturas utilizadas: GTP, guanosina trifosfato; H₄Pyp, 6-piruviloil-tetrahydropterina; H₄Bip, tetrahydrobiopterina; q-H₂Bip, dihydrobiopterina quinonoidea; 4a-Hidroxi-H₄Bip, 4a-hidroxi-tetrahydrobiopterina; GTP-CH, GTP ciclohidrolasa; AD, aldosa reductasa; SR, sepiapterina reductasa; DHPR, dihydropterina reductasa; PAH, fenilalanina hidroxilasa; TH, tirosina hidroxilasa; TPH, triptófano hidroxilasa; Phe, fenilalanina; Tyr, tirosina; Trp, triptófano; L-DOPA, 3,4-dihidroxifenilalanina; 5-OH-Trp, 5'-hidroxitriptófano.

La H₄Bip interviene en la reacción como activador del oxígeno molecular que es incorporado al aminoácido en forma de grupo hidroxilo. El átomo de oxígeno restante pasa al cofactor que es así transformado al intermediario carbinolamínico altamente inestable 4a-hidroxi-tetrahidrobiopterina. Este compuesto es espontáneamente oxidado para dar la forma quinonoidea q-H₂Bip con la producción de una molécula de agua. Recientemente se ha descrito la participación del enzima pterina-4a-carbinolamina deshidratasa en esta reacción. Esta proteína resulta tener una doble función, ya que actúa como agente dimerizador del factor de transcripción 1 α (Citron *et al.*, 1992). El ciclo es completado por la acción de la dihidropterina reductasa, que cataliza la reducción NADH-dependiente de la q-H₂Bip a H₄Bip, permitiendo así la regeneración del cofactor. Además de la participación del cofactor pterínico, la reacción de hidroxilación requiere la presencia de iones hierro.

El mecanismo de las reacciones de hidroxilación así como la naturaleza de las especies intermedias no ha sido determinado, siendo el caso de la PAH de rata el mejor caracterizado. Los modelos postulados sugieren la participación de un intermediario oxigenado altamente reactivo, formado por la unión del enzima con el oxígeno a través del centro metálico (Dix y Benkovic, 1988; Siegmund, H.-U. y Kaufman, 1991; Davis y Kaufman, 1993; Shiman *et al.*, 1994a). El papel atribuido al ion hierro es el mantenimiento del enzima en estado catalíticamente activo. Es interesante destacar que el enzima homólogo a la PAH en la bacteria *Chromobacterium violaceum* contiene cobre en lugar de hierro, no siendo éste necesario para la catálisis (Carr *et al.*, 1993). Las implicaciones de esta reacción de hidroxilación metal-independiente en el mecanismo del enzima de mamíferos permanece desconocida.

Los estudios encaminados a la determinación de los intermediarios participantes en la reacción de hidroxilación han llevado al descubrimiento de que la PAH actúa, al menos *in vitro*, como una tetrahidropterina oxidasa, catalizando la oxidación de diferentes tetrahidropterinas sin que se produzca la hidroxilación acoplada del aminoácido (Davis y Kaufman, 1989). Esta reacción no acoplada, produce la formación de la 4a-carbinolamin-tetrahidropterina correspondiente. Se ha sugerido que esta capacidad potencial pueda tener algún significado biológico, aunque no existen datos concluyentes al respecto.

3.3. GENÉTICA MOLECULAR DE LAS HIDROXILASAS.

El interés en la caracterización molecular de la enfermedad humana de la fenilcetonuria llevó en 1982 al aislamiento del primer transcrito de la PAH (Woo *et al.*, 1983). Desde entonces han sido caracterizados los genes que codifican las hidroxilasas de los aminoácidos aromáticos de numerosos organismos, apareciendo en todos los casos como genes de copia única (revisado en Hufton *et al.*, 1995).

La comparación de sus secuencias, tanto a nivel nucleotídico como de la proteína deducida, ha demostrado que los tres enzimas exhiben una elevada identidad que se presenta incluso entre organismos tan alejados evolutivamente como mamíferos e invertebrados (Tabla II). Esta identidad no es uniforme a lo largo de toda la secuencia, concentrándose en los dos últimos tercios del extremo C-terminal. En base a esta observación se ha sugerido que estos enzimas presentan una estructura en dominios (Ledley *et al.*, 1985; Grenett *et al.*, 1987). La región C-terminal, más conservada, se asocia con la función catalítica común a las tres hidroxilasas, mientras que el extremo N-terminal, con un bajo grado de similitud, se relaciona con las propiedades específicas de cada enzima como la regulación de la actividad.

Tabla II. Identidad de secuencia entre las hidroxilasas de diversos organismos.

	PAH humana	TH humana	TPH conejo	PAH <i>Drosophila</i>	TH <i>Drosophila</i>	PAH <i>Chromobact.</i>
PAH humana	-	48	53	58	46	24
TH humana	60	-	48	42	50	11
TPH conejo	60	60	-	50	44	11
PAH <i>Drosophila</i>	x	x	x	-	46	x
TH <i>Drosophila</i>	77	75	x	x	-	x
PAH <i>Chromobact.</i>	35	x	x	x	x	-

Valores de identidad aminoacídica obtenidos al comparar las secuencias completas (sobre diagonal) y de los dos últimos tercios de las mismas (bajo diagonal). Referencias: Grenett *et al.*, 1987; Neckameyer y Quinn, 1989; Nagatsu e Ichinose, 1991; Onishi *et al.*, 1991; Neckameyer y White, 1992.

Por otra parte, este elevado grado de identidad ha llevado a la hipótesis, ampliamente aceptada, de que estos tres genes han evolucionado por duplicación y posterior divergencia a partir de un gen ancestral común (Ledley *et al.*, 1985; Grenett *et al.*, 1987). A partir del cálculo de las tasas de divergencia de estos genes en diversos organismos se ha construido el correspondiente árbol evolutivo (Fig. 8). Según éste, una duplicación inicial habría originado la especialización, de forma paralela al desarrollo del sistema nervioso, de las actividades PAH y TH mientras que una segunda duplicación del gen de la PAH habría producido la aparición de la actividad TPH. Dado que la tasa de sustituciones no es constante a lo largo de la secuencia de estas moléculas, no se descarta la concurrencia de otros mecanismos evolutivos. En este sentido se ha propuesto que el dominio regulador N-terminal, de baja similitud, puede haber evolucionado a partir de la incorporación posterior a la duplicación de nuevos exones con propiedades reguladoras específicas (DiLella *et al.*, 1986; Birman *et al.*, 1994).

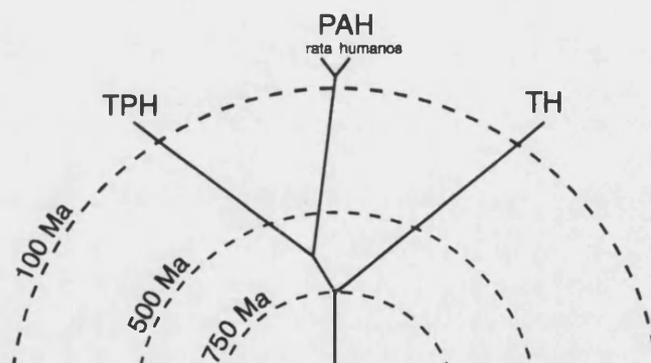


Figura 8. Árbol evolutivo esquemático de la familia génica de las hidroxilasas de los aminoácidos aromáticos (adaptado de Grenett *et al.*, 1987).

Esta teoría se ve apoyada por el hecho de que en *Drosophila melanogaster*, y muy probablemente en el resto de los invertebrados, sólo existen dos genes de las hidroxilasas; uno codifica para la TH mientras que un segundo locus lo hace para las actividades PAH y TPH (Neckameyer y White, 1992; Alcañiz y Silva, 1996). Dicho locus exhibe una mayor similitud con la PAH de mamíferos por lo que se ha sugerido que el gen ancestral codificaría para una proteína más parecida en estructura y función a la PAH actual. Según el árbol calculado, la distancia evolutiva estimada entre la PAH y la TPH es de unos 600 Ma, coincidiendo con la existente entre invertebrados y vertebrados (Grenett *et al.*, 1987).

La similitud existente entre los genes de las hidroxilasas se extiende a su estructura genómica (Stoll y Goldman, 1991) (Fig. 9). Pese al diferente tamaño de estos genes así como a la diferencia en el número de exones, la posición de las uniones exón/intrón de la región C-terminal es comparable. Estos datos de nuevo apoyan la idea de que las hidroxilasas de los aminoácidos aromáticos constituyen una familia génica con un origen evolutivo común y que la divergencia evolutiva se centra en la región reguladora N-terminal.

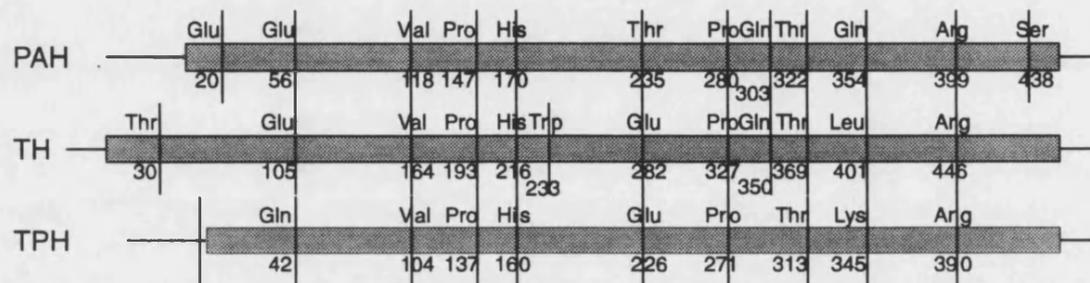


Figura 9. Conservación de las uniones intrón/exón entre los genes de las hidroxilasas de los aminoácidos aromáticos (adaptado de Stoll y Goldman, 1991). Se presenta el alineamiento de los cDNAs de la fenilalanina hidroxilasa (PAH) de humanos, la tirosina hidroxilasa (TH) de rata y la triptófano hidroxilasa (TPH) de ratón.

3.4. RELACIÓN ESTRUCTURA/FUNCIÓN DE LAS HIDROXILASAS.

Dada la falta de éxito en los intentos de obtención de cristales puros de estas proteínas, poco se conoce acerca de su estructura tridimensional y de la conformación de los sitios activos. Los datos disponibles proceden de la aplicación de métodos indirectos tales como la utilización de análogos marcados de los distintos sustratos, modificación química selectiva, mutagénesis dirigida o proteólisis parcial, en conjunción con los datos obtenidos a partir de la comparación de sus secuencias proteicas (revisado en Hufton *et al.*, 1995).

Como anteriormente se ha descrito, se ha postulado la organización de las hidroxilasas de los aminoácidos aromáticos en dominios funcionales: un dominio catalítico limitado a la porción C-terminal, y un dominio regulador correspondiente a la zona N-terminal (Fig. 10). La localización del sitio catalítico en la porción C-terminal no sólo se apoya en la comparación de secuencias sino que diferentes tratamientos proteolíticos han demostrado la ubicación de la capacidad catalítica de las hidroxilasas en esta región. Este dominio presenta cinco residuos de cisteína, altamente conservados entre las hidroxilasas de distintas especies, que podrían desempeñar un papel esencial en la función enzimática como responsables de la estructura tridimensional del sitio de hidroxilación (Grenett *et al.*, 1987).

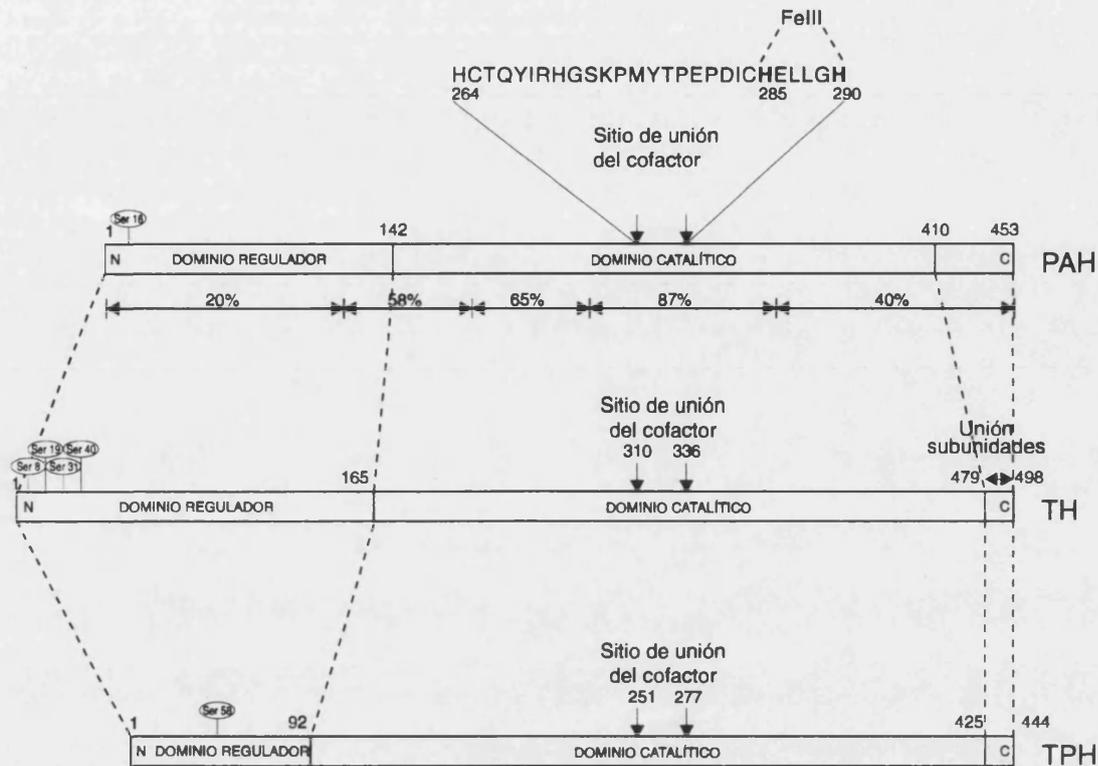


Figura 10. Similitudes estructurales entre las hidroxilasas de los aminoácidos aromáticos (adaptado de Hufton *et al.*, 1995). Los datos presentados corresponden a la fenilalanina hidroxilasa (PAH) y la tirosina hidroxilasa (TH) de rata, y la triptófano hidroxilasa (TPH) de humanos. Los dominios regulador y catalítico han sido definidos a partir de la comparación de las secuencias aminoacídicas así como de estudios de mutagénesis y proteólisis. Se muestra la secuencia propuesta para el sitio de unión del cofactor pteridínico y para el átomo de hierro (FeIII). También se indica el posible sitio de unión entre subunidades (Unión subunidades) y los residuos de serina (Ser) propuestos como sitios de fosforilación. A modo ilustrativo se presentan los valores de identidad (%) entre la PAH y la TH para resaltar la correlación entre la conservación de características estructurales y la identidad de secuencia. La numeración de las secuencias incluye la meteonina inicial.

Se ha propuesto la localización del posible sitio de unión del cofactor pterínico en el dominio catalítico (Jenning *et al.*, 1991). Su secuencia aparece altamente conservada entre las hidroxilasas de diversos organismos, extendiéndose dicha identidad a otros enzimas pterin-dependientes (Citron *et al.*, 1990; Ichinose *et al.*, 1991; Cho *et al.*, 1995). En cuanto a la situación del sitio de unión del ion hierro se ha sugerido la intervención de dos residuos de histidina localizados en el supuesto sitio de unión del cofactor.

Los datos referentes al sitio de unión del aminoácido son muy limitados y su interpretación resulta altamente compleja ya que el sustrato actúa como activador alostérico de estos enzimas. Así, en el caso de la PAH, se ha propuesto la existencia de dos sitios de unión de la fenilalanina, uno con propiedades reguladoras o alostéricas diferente del sitio catalítico (Shiman *et al.*, 1994b). Los estudios realizados indican que el sitio catalítico se sitúa en el dominio

C-terminal del enzima mientras que el sitio alostérico se localiza en el dominio regulador N-terminal, aunque no se ha descrito la participación de residuos concretos en la unión de los aminoácidos (Hufton *et al.*, 1995).

En aquellos organismos donde estos enzimas se han purificado, se ha puesto de manifiesto su existencia en forma de multímeros constituidos por la asociación de subunidades idénticas, aunque esta multimerización no es necesaria para la funcionalidad *in vitro* del enzima. La naturaleza de las interacciones entre las subunidades así como la importancia fisiológica de esta multimerización permanece desconocida. El análisis de las secuencias primarias de las hidroxilasas ha mostrado la existencia de regiones altamente conservadas que poseen características estructurales que pueden ser asociadas al mantenimiento de la estructura cuaternaria de estos enzimas como son los motivos de dedos de leucina y hélice superenrollada (Liu y Vrana, 1991; Lohse y Fitzpatrick, 1993).

3.5. REGULACIÓN DE LAS HIDROXILASAS.

La función fisiológica de la PAH reside principalmente en su intervención en el catabolismo de la fenilalanina mientras que la TH y la TPH juegan un papel anabólico interviniendo en la síntesis de neurotransmisores. Esta diferencia tiene su reflejo en la diferente regulación fisiológica que sufren estos enzimas. Así, en el caso de la PAH, la disponibilidad de sustrato resulta esencial en la regulación de su actividad. Por el contrario, las actividades TH y TPH se ven reguladas en función de los requerimientos del sistema nervioso (revisado en Hufton *et al.*, 1995).

La regulación fisiológica de la PAH de mamíferos ha sido objeto de numerosos estudios los cuales indican que dicha regulación responde a un efecto sinérgico entre los niveles de fosforilación del enzima y su activación por el sustrato fenilalanina (Tipper y Kaufman, 1992). La fenilalanina resulta un potente activador alostérico de la PAH. Se ha propuesto que dicha activación sea consecuencia del aumento en el grado de fosforilación de la proteína inducido por los cambios conformacionales provocados por la unión del aminoácido al sitio alostérico. El sitio de fosforilación ha sido localizado en el residuo Ser¹⁶, el cual se encuentra rodeado por una secuencia altamente homóloga a la diana de la protein-quinasa A.

Además de su función como cofactor en la reacción de hidroxilación, los niveles de H₄Bip tienen un importante papel en la regulación de estas actividades. La H₄Bip resulta un potente inhibidor de la PAH, ya que produce la formación de un complejo enzima-cofactor inactivo (Xia *et al.*, 1994). Esta inactivación reside en un bloqueo en la activación por fenilalanina. Además se ha propuesto que la formación de este complejo inactivo controla la disponibilidad metabólica de cofactor de forma que la concentración libre de H₄Bip es menor que la cantidad intracelular total (Shiman *et al.*, 1994b).

En el caso de la TH y TPH de mamíferos también se ha demostrado el papel de la fosforilación en la regulación de su actividad (revisado en Kaufman, 1987a; Hufton *et al.*, 1995). Sin embargo, el efecto de los respectivos sustratos sobre estos enzimas difiere del descrito para la PAH, resultando potentes inhibidores de estas actividades. Asimismo se ha demostrado el papel de las catecolaminas como retroinhibidores, actuando de forma competitiva respecto al cofactor pteridínico.

Los estudios referentes a la regulación transcripcional de las hidroxilasas de los aminoácidos aromáticos son muy escasos. No se ha descrito la existencia de isoenzimas de la PAH diferentes a los producidos por modificaciones post-traduccionales (i.e. fosforilación). El

reciente aislamiento de las secuencias promotoras del gen de la PAH en humanos ha revelado la existencia de una única región promotora carente de caja TATA pero que presenta posibles secuencias reguladoras requeridas para la interacción de diversos factores de transcripción (Wang *et al.*, 1994). Ninguno de ellos es específico de tejido lo que sugiere que la expresión diferencial de la PAH no responde a un control de su transcripción sino a otros factores, posiblemente relacionados con la regulación enzimática.

Se han identificado diferentes isoformas de la TH de primates superiores producidas por procesado alternativo dependiente de tejido de un único transcrito primario (Grima *et al.*, 1987; Kobayashi *et al.*, 1988; Ichikawa *et al.*, 1990). Todas ellas difieren en el extremo N-terminal del enzima, correspondiente al dominio regulador. En el caso de humanos se han detectado cuatro mensajeros diferentes, producidos por procesado alternativo, que codifican para cuatro isoformas proteicas. Éstas presentan diferentes propiedades cinéticas y reguladoras frente al cofactor pteridínico (Narsin *et al.*, 1994). Esta expresión alternativa, que se creía exclusiva de primates superiores, ha sido también descrita en el invertebrado *Drosophila melanogaster* donde, mediante procesado alternativo del transcrito primario del gen de la TH, se producen hasta tres mensajeros diferentes que codificarían dos isoenzimas de forma dependiente de tejido (Birman *et al.*, 1994). De nuevo, la diferencia se ve limitada al dominio regulador lo que sugiere la existencia de diferencias en la regulación de las isoformas codificadas.

En el caso de la TPH, los datos existentes son todavía más limitados. Se ha descrito que la TPH de rata presenta propiedades bioquímicas diferentes según los órganos donde se analiza. Sin embargo éstas se han atribuido a modificaciones post-traduccionales ya que tan sólo se ha identificado un único mensajero (Hufton *et al.*, 1995).

3.6. LA FENILALANINA HIDROXILASA DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*.

En contraste con la situación presentada en mamíferos, existen pocos estudios acerca las hidroxilasas de los aminoácidos aromáticos de insectos, siendo *Drosophila melanogaster* el organismo donde mejor se ha caracterizado.

Los estudios cinéticos realizados han demostrado que las hidroxilasas de *Drosophila* comparte las principales características de los enzimas de organismos superiores (Bel *et al.*, 1992a). Entre ellas se encuentra el requerimiento de una tetrahidropterina como cofactor enzimático que, en el caso concreto de la PAH, ha sido identificada como la H₄Bip (Bel *et al.*, 1992b).

En este organismo la actividad PAH desempeña una función fisiológica equivalente a la descrita en mamíferos interviniendo en el catabolismo de la fenilalanina, aminoácido cuya acumulación resulta altamente nocivo para este insecto (Bel y Ferré, 1989). Además se ha propuesto su participación en el proceso de formación de la cutícula aportando una fuente endógena de tirosina (Piedrafita *et al.*, 1994). La TH se ha relacionado con la síntesis de dopamina requerida tanto en la producción de neurotransmisores como en los procesos de esclerotización y melanización durante la formación de la cutícula (Budnik y White, 1987; Neckameyer y White, 1993; Piedrafita *et al.*, 1994). La actividad TPH resulta necesaria para la síntesis de neurotransmisores indolámnicos (Neckameyer y White, 1992).

El estudio de los genes que codifican las hidroxilasas de los aminoácidos aromáticos en *Drosophila melanogaster* ha llevado a la propuesta, anteriormente descrita, de que en este organismo las actividades PAH y TPH son codificadas por un mismo locus génico

(Neckameyer y White, 1992). Esta afirmación se basa en diferentes evidencias. En este organismo se ha aislado un único cDNA, homólogo tanto a la PAH como a la TPH de mamíferos, cuya expresión produce una proteína que exhibe ambas actividades enzimáticas (Morales *et al.*, 1990; Neckameyer y White, 1992). La distribución tisular de este mensajero así como del producto proteico correspondiente confirma su doble función fisiológica ya que estos se detectan tanto en tejidos activos en el catabolismo de la fenilalanina como en neuronas serotoninérgicas (Neckameyer y White, 1992). Un segundo locus codifica para la actividad TH (Neckameyer y Quinn, 1989). Esta situación apoya la teoría de la duplicación a partir de un gen ancestral común como origen evolutivo de la familia génica de las hidroxilasas (Grenett *et al.*, 1987).

Los conocimientos acerca del gen de la PAH en *Drosophila melanogaster* se restringen a la caracterización del cDNA correspondiente careciéndose de información acerca de su estructura genómica. El análisis de dicho cDNA ha revelado la existencia de una pauta de lectura que codifica para una proteína de 453 residuos con un peso molecular estimado de unos 50 kDa (Morales *et al.*, 1990; Neckameyer y White, 1992). Este dato coincide con el obtenido mediante inmunodetección del enzima (Silva *et al.*, 1992). En base a la comparación de la secuencia proteica deducida con la correspondiente a los enzimas de mamíferos se ha podido comprobar la existencia de una elevada similitud estructural y probablemente funcional entre éstas. Así se ha identificado una secuencia con elevado grado de consenso con la propuesta región de unión al cofactor pteridínico así como un posible sitio de fosforilación, aunque la funcionalidad de este último no ha sido evidenciada. Asimismo se ha determinado la localización cromosómica de este locus, resultando ubicado en la región 66A del brazo izquierdo del cromosoma 3 (Neckameyer y White, 1992).

No se ha descrito la existencia de isoenzimas codificados por el locus de la PAH de *Drosophila*. El comportamiento de la actividad PAH frente al cofactor natural H₄Bip y el observado utilizando análogos de este compuesto sugiere la existencia de dos formas enzimáticas con diferentes propiedades cinéticas (Bel *et al.*, 1992a). Los estudios de inmunodetección indican la existencia en embriones jóvenes de una proteína de tamaño inferior a la presente en otros estadios (45 kDa vs. 50 kDa) (Neckameyer y White, 1992). Sin embargo, el análisis de mensajeros en distintos estadios y tejidos revela la presencia de un único transcrito del gen por lo que estas diferencias se atribuyen a posibles modificaciones post-traduccionales (Neckameyer y White, 1992). Como anteriormente se ha expuesto, el gen de la TH de *Drosophila* codifica para al menos tres transcritos producidos por procesado alternativo que se corresponden con dos formas proteicas con diferente patrón de expresión (Birman *et al.*, 1994).

3.7. EL LOCUS HENNA DE DROSOPHILA MELANOGASTER.

Mientras que el locus *pale* ha sido identificado como el gen estructural del enzima TH de *Drosophila melanogaster* (Neckameyer y White, 1993), no han sido caracterizados mutantes que afecten al gen de la PAH. Tan sólo recientemente y en base a diferentes estudios bioquímicos se ha propuesto que sea el locus *Henna* el gen codificante de esta actividad (Silva *et al.*, 1992).

Las observaciones que sugieren la identidad del locus *Henna* con el gen de la PAH se basan en el análisis fenotípico de distintos mutantes de dicho locus. Los estudios de inmunodetección de la PAH indican que estas cepas presentan niveles reducidos de proteína que pueden ser relacionados con una disminución de la actividad enzimática respecto a la cepa

salvaje (Silva *et al.*, 1992). Esta disminución es extrema en el mutante natural *Henna recessive*³ (*Hn*³) en el que no se detecta proteína PAH, siendo la actividad enzimática del 10% respecto a la cepa normal. Además, esta cepa presenta elevados niveles de fenilalanina y su viabilidad se ve drásticamente reducida cuando la dieta se suplementa con este aminoácido (Bel y Ferré, 1989). Otra evidencia indirecta que apoya esta hipótesis la constituye el hecho de que en *Hn*³ se observan niveles disminuidos de serotonina, lo que se puede relacionar con una deficiencia en la función TPH (Alcañiz y Silva, 1996). Por último, señalar la localización cromosómica coincidente del locus *Henna*, determinada mediante mapeo por deleciones (Lindsley y Zimm, 1992), y del gen de la PAH, localizado mediante hibridación *in situ* (Neckameyer y White, 1992).

Ante estas evidencias acerca de la identidad del locus *Henna* como el gen de la PAH se contraponen los estudios previos que indican su intervención en la síntesis de drosopterinas, concretamente en la formación de H₂Ptr a partir de H₄Pyp (Ferré *et al.*, 1986; Guillamón y Ferré, 1988). Este hecho ha llevado a la propuesta de un posible papel del enzima PAH en la síntesis de pterinas, independiente de su función de hidroxilación de la fenilalanina y el triptófano (Silva *et al.*, 1992). Esta hipótesis se ve apoyada por los estudios que indican que la PAH de rata presenta la capacidad de oxidar *in vitro* diferentes tetrahydropterinas de forma no acoplada a la hidroxilación del aminoácido (Davis y Kaufman, 1989). Por tanto, la demostración de la identidad del gen de la PAH con este locus no sólo proporcionaría mutantes para el estudio de la función de hidroxilación en *Drosophila melanogaster*, sino que aportaría una prueba *in vivo* de la función tetrahydropterina oxidasa observada *in vitro* en el caso de mamíferos.

OBJETIVOS

La tesis presentada se enmarca dentro de una línea de investigación encaminada al estudio de la ruta metabólica de las pterinas y de su interacción con el metabolismo de los aminoácidos aromáticos en el invertebrado *Drosophila melanogaster*. En este contexto, el objetivo del trabajo se centró en el estudio, a nivel bioquímico y genético, de dos de los enzimas implicados en estos procesos metabólicos: la sepiapterina reductasa, cuya intervención en la ruta biosintética de las pterinas ha sido ampliamente demostrada, y la fenilalanina hidroxilasa, con la finalidad, en este último caso, de establecer una posible función de este enzima en dicha ruta. Al mismo tiempo se planteó la identificación de mutantes que proporcionaran un modelo para el estudio de la función y regulación de los genes correspondientes.

Los objetivos concretos abordados en este trabajo fueron:

- 1) Estudio de la actividad enzimática sepiapterina reductasa en *Drosophila melanogaster*: caracterización bioquímica del enzima y análisis de su actividad en diferentes mutantes con deficiencias en el metabolismo de las pterinas.
- 2) Caracterización molecular del gen de la fenilalanina hidroxilasa: determinación de su estructura genómica, análisis de su expresión y establecimiento de las relaciones evolutivas con los genes de las hidroxilasas de los aminoácidos aromáticos de otros organismos.
- 3) Demostración de la identidad del locus *Henna* con el gen estructural de la fenilalanina hidroxilasa: análisis molecular del gen en distintas cepas mutantes y estudio de su expresión.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO.

1.1. ORGANISMO DE ESTUDIO: *DROSOPHILA MELANOGASTER*.

El organismo objeto del presente estudio es el invertebrado *Drosophila melanogaster*. Como cepa normal se utilizó *Oregon-R (Or-R)*, procedente de la colección de Bowling Green, Ohio (EE.UU.). Las distintas cepas mutantes utilizadas se listan a continuación (descritas en Lindsley y Zimm, 1992). Todas ellas presentan mutaciones en loci génicos implicados en la pigmentación ocular produciendo alteraciones fenotípicas en el patrón de pterinas (descritas en Ferré *et al.*, 1986). El cultivo de las cepas se realizó a 25°C en medio estándar siguiendo los procedimientos habituales.

CEPAS MUTANTES UTILIZADAS

- brown (*bw*)
- clot (*cl*)
- Deficiencia(2L) *clot*^{h4} (Df(2L) *cl*^{h4})
- Henna-recessive (*Hn*^r)
- Henna-recessive³ (*Hn*^{r3})
- Henna-recessive^{r63bo} (*Hn*^{r63bo})
- Henna-recessive^{r28bp} (*Hn*^{r28bp})
- Henna-recessive⁷⁹ⁱ (*Hn*^{r79i})
- Henna-recessive^{20vp} (*Hn*^{r20vp})
- red Malpighian tubules (*red*)
- garnet (*g*)
- pink (*p*)
- sepia (*se*)

1.2. CEPAS BACTERIANAS Y VÍRICAS.

En las distintas técnicas de Biología Molecular se utilizaron las cepas comerciales de la bacteria *Escherichia coli* DH5α y NM519, cultivadas y tratadas para los fines concretos de transformación y crecimiento de fagos respectivamente, siguiendo los protocolos habituales (Ausubel *et al.*, 1988; Sambrook *et al.*, 1989). La genoteca analizada en el presente trabajo estaba construida en el fago derivado de lambda EMBL4 que fue sometido a crecimiento según los protocolos recomendados (Ausubel *et al.*, 1988; Sambrook *et al.*, 1989).

2. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD SEPIAPTERINA REDUCTASA EN *DROSOPHILA MELANOGASTER*.

2.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO PROTEICO.

Los extractos proteicos destinados a la determinación de la actividad sepiapterina reductasa se obtuvieron a partir de individuos adultos de *Drosophila* previamente recogidos y conservados a -80°C durante un tiempo no superior a una semana. Las muestras fueron homogeneizadas en tampón fosfato pH 6'4 (20°C) en una proporción aproximada de 40 cabezas o 10 individuos enteros por 100 µl. Tras su centrifugación a 10.000 g, el sobrenadante era sometido a cromatografía de exclusión en Shepadex G-25 (0'5-1'0 ml de lecho) con la finalidad de eliminar las moléculas pequeñas presentes en el extracto, como pterinas y NADPH, que

podieran interferir en la medida de la actividad. Las proteínas totales presentes en los extractos se determinaron por el método de Bradford (Bradford, 1976), resultando en el rango de 0.5 a 1.5 mg por ml de extracto. Los extractos obtenidos eran destinados inmediatamente a su cuantificación enzimática. Todas las operaciones se realizaron a 4°C.

2.2. ENSAYO ENZIMÁTICO.

La determinación de la actividad sepiapterina reductasa presente en los extractos se realizó utilizando el sustrato sepiapterina en presencia del cofactor NADPH. La H₂Bip formada fue oxidada en presencia de iodo para producir el derivado más estable: biopterina, que posteriormente era cuantificado. Así la actividad enzimática se definió como Bip formada por unidad de tiempo (nmoles Bip/h). La actividad específica se determinó en relación a la cantidad total de proteína en el extracto como Bip formada por unidad de tiempo y miligramo de proteína (nmoles Bip/h/mg).

La cuantificación de la biopterina formada se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (rp-HPLC) utilizando detección fluorimétrica (Ferré y Naylor, 1987). Dos alícuotas de cada muestra (10-15 µl) eran sometidas a separación a través de una columna del tipo C₁₈ (matriz de sílice con grupos alcano de 18 átomos de carbono) utilizando metanol al 3% en tampón fosfato 10 mM pH 3.2 (20°C) como eluyente. La detección fluorimétrica se realizó a una longitud de onda de excitación de 360 nm y de emisión de 435 nm. La cuantificación se realizó por comparación de los cromatogramas obtenidos con un patrón de biopterina de concentración conocida.

Las condiciones del ensayo se basaron en las publicadas por Fan y Brown (1979). La mezcla de reacción estándar contenía, en un volumen final de 50 µl, los siguientes componentes: sepiapterina 100 µM, NADPH 600 µM, un volumen de extracto crudo equivalente a 10-20 µg de proteína, tampón fosfato pH 6.4 (20°C) 100 mM. Tras su incubación a 44°C durante 20 min, la reacción era detenida mediante la adición de 20 µl de iodo 1% y yoduro potásico 2% en HCl 1M. Tras 20 min a temperatura ambiente, las proteínas precipitadas eran eliminadas mediante centrifugación a 12.000 g durante 4 min. El exceso de iodo en el sobrenadante era neutralizado por la adición de 6 µl de ácido ascórbico al 2%. Todas las operaciones se realizaron con luz roja para evitar la degradación de los reactivos, altamente fotosensibles.

El análisis de inhibición se realizó utilizando los compuestos N-acetilserotonina, N-acetildopamina y N-metoxiacetilserotonina como potenciales inhibidores. Los ensayos se realizaron en condiciones estándar sobre extractos crudos de individuos adultos de 0 a 12 horas. Se utilizaron diferentes concentraciones de inhibidor (hasta el orden de mM) en presencia de diferentes cantidades no saturantes del sustrato sepiapterina.

En todos los ensayos se realizaron controles negativos eliminando alguno de los componentes de la reacción (NADPH, sepiapterina o extracto enzimático). La actividad en dichos controles nunca superó el 1% respecto al ensayo completo. Se realizaron dos réplicas por cada ensayo. En el caso de la determinación de las constantes cinéticas, cada experiencia fue realizada por duplicado, utilizando en cada una de ellas el mismo extracto enzimático. En el análisis de la actividad en los distintos mutantes se realizaron diversas repeticiones (2 a 4 por cepa) utilizando distintos extractos proteicos procedentes de individuos adultos de 0 a 12 horas.

2.3. CROMATOENFOQUE.

El cromatoenfoco, técnica que permite la separación de las proteínas de una muestra en función de su punto isoeléctrico, se realizó usando el equipo de cromatografía FPLC de Pharmacia con una columna Mono P HR 5/5 siguiendo las instrucciones del fabricante. El gradiente de pH se obtuvo equilibrando la columna con bis-Tris 0'025 M pH 7'1 (20°C) (ajustado con ácido iminodiacético) como tampón inicial y aplicando como tampón de elución Polybuffer™ 74, diluido 1:10, pH 4'0 (20°C) (ajustado con ácido iminodiacético) del proveedor Pharmacia. Se mantuvo un flujo constante de 1 ml/min, siendo el volumen total de eluyente necesario para completar el gradiente de unos 25 ml. Se recogieron fracciones de 0'5 ml que se destinaron inmediatamente a la determinación de la actividad enzimática. El desarrollo de la elución proteica se siguió mediante la medida de absorbancia a 280 nm. La experiencia se repitió con dos extractos diferentes (cabezas y cuerpos), obteniéndose resultados idénticos.

3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

3.1. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

3.1.1. Extracción de DNA genómico de *Drosophila melanogaster*.

La extracción de DNA genómico de *Drosophila melanogaster* se realizó siguiendo el método de Junakovic *et al.* (1984) con algunas modificaciones. Así los individuos adultos fueron homogeneizados en tampón Tris-HCl 100 mM; pH 9'0 (20°C), EDTA 100 mM, en proporción de 1 ml por 100 individuos. El homogeneizado era incubado a 65°C en presencia de SDS al 1% y posteriormente enfriado en hielo en presencia de acetato potásico a una concentración final de 1 M. Los restos celulares eran eliminados mediante centrifugación. El DNA del sobrenadante era precipitado con isopropanol y redisoluto en tampón TE (Tris-HCl 10 mM; pH 8'0 (20°C), EDTA 1 mM) siendo sometido a tratamiento con RNasa (100 µg/ml) para eliminar el RNA coprecipitado. Tras fenolización y precipitación con etanol en presencia de acetato amónico, el DNA era resuspendido en TE y guardado a 4°C hasta su utilización. El rendimiento medio obtenido con este método es de 1-2 µg de DNA por individuo.

Para la realización de las experiencias de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de fragmentos largos, el protocolo se modificó eliminando la incubación a 65°C, el tratamiento con RNasa y la fenolización con el objeto de evitar en lo posible la rotura del DNA.

3.1.2. Extracción de DNA plasmídico de *Escherichia coli*.

La extracción de DNA plasmídico de los distintos clones de *Escherichia coli* se realizó siguiendo el método convencional para extracción a pequeña escala (Sambrook *et al.*, 1989). A partir de cultivos líquidos sometidos a lisis alcalina, se procedía a la precipitación selectiva del DNA genómico utilizando acetato potásico. El DNA plasmídico era recuperado del sobrenadante mediante precipitación con etanol en presencia de NaCl. El RNA de la muestra era eliminado por tratamiento con RNasa. Cuando se requería una mayor pureza de la muestra, el DNA plasmídico era posteriormente sometido a fenolización y precipitación con etanol en presencia de sales. El rendimiento medio obtenido por este método es de 3-5 µg por ml de cultivo.

En el caso de utilizar la muestra para su secuenciación automática, el DNA plasmídico era purificado por precipitación con polietilenglicol (PEG) siguiendo las instrucciones recomendadas para dicho método de secuenciación (Perkin Elmer, 1995).

3.1.3. Extracción de DNA de fago λ .

La extracción a partir de lisados líquidos obtenidos por la infección de cultivos de la cepa de *Escherichia coli* NM519 con una suspensión de fagos se realizó siguiendo los protocolos habituales (Ausubel *et al.*, 1988). La estrategia consistía en la precipitación de las partículas fágicas de los cultivos líquidos previamente tratados con DNasa y RNasa para destruir los ácidos nucleicos del huésped bacteriano. El sedimento era resuspendido en tampón de suspensión de fagos (Tris-HCl 10 mM; pH 7.5 (20°C), sulfato magnésico 10 mM) y sometido a fenolización con la finalidad de desnaturalizar las cápsidas víricas y liberar el DNA. Una vez eliminadas las proteínas, el DNA era recuperado por precipitación con etanol en presencia de acetato sódico.

La extracción a pequeña escala se realizó según el protocolo descrito en Sambrook *et al.* (1989). En este caso se partía de cultivos en placa a los que se añadió 4 ml del tampón de resuspensión de fagos (Tris-HCl 10 mM; pH 7.5 (20°C), sulfato magnésico 10 mM). Tras 16 horas de agitación a 4°C, los fagos eran recuperados por precipitación con PEG a partir de la fase líquida. A partir de este precipitado se procedía como en el caso anterior.

3.1.4. Cuantificación de DNA.

La concentración de DNA en las diferentes muestras se determinó por comparación visual de la fluorescencia con bromuro de etidio de diferentes diluciones de las muestras sometidas a electroforesis en agarosa con la producida por una cantidad conocida de marcador de pesos moleculares.

3.1.5. Extracción de RNA de *Drosophila melanogaster*.

La extracción de RNA se realizó mediante el sistema comercial *RNA Extraction Kit* del proveedor Pharmacia (Cat. Nº. XL-016-00-01) siguiendo las instrucciones suministradas. El método está basado en la purificación mediante centrifugación en gradiente de tetrakisacetato de cesio (CsTFA) utilizando un tampón de extracción que contiene tiocianato de guanidinio (GTC), agente caotrópico que proporciona un alto grado de protección frente a las actividades RNasa. Como material de partida se utilizaron cabezas de individuos adultos de 0-12 horas, obteniéndose un rendimiento aproximado de unos 500 μ g de RNA total por 250 mg de tejido.

Cuando la cantidad de RNA necesaria para los análisis era reducida se utilizó el sistema comercial *Microscale-total RNA Separation Kit* de Clontech (Cat. Nº. 1044) obteniéndose un rendimiento aproximado de 1 μ g de RNA total por mg de tejido.

La purificación de RNA poli(A)⁺ a partir de las muestras de RNA total se realizó mediante cromatografía de afinidad utilizando el sistema comercial *Dynabeads® mRNA Purification Kit* del proveedor Dynal (Cat. Nº. 610.01). El método se basa en la utilización de un lecho cromatográfico constituido por partículas magnéticas inertes que presentan en su superficie residuos oligo(dT)₂₅ covalentemente unidos. Como muestra de partida se utilizaron 75 μ g de RNA total en un volumen de lecho de 100 μ l. En todo el trabajo realizado con muestras de RNA se utilizaron disoluciones y material libre de RNasas (Ausubel *et al.*, 1988).

3.1.6. Cuantificación de RNA.

La determinación de la cantidad y la pureza del RNA total extraído se realizó espectrofotométricamente mediante la medida de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. En cuanto al rendimiento obtenido en la extracción de RNA poli(A)⁺ y dada la poca cantidad de muestra disponible sólo se estimó considerando que del RNA total de una muestra el 1-5% corresponde a RNA poli(A)⁺.

3.2. DIGESTIÓN DE DNA CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

Las digestiones del DNA con endonucleasa de restricción se realizó con enzimas del proveedor Boehringer Mannheim, utilizando los tampones y las instrucciones recomendadas por el fabricante. En el caso de las digestiones dobles se utilizó el tampón que proporcionaba la máxima actividad posible con ambos enzimas. En caso de incompatibilidad se procedió a la digestión con el enzima que funcionaba con el tampón de menor fuerza iónica. Tras la precipitación del DNA con etanol y su resuspensión en tampón TE, se realizaba la digestión con la segunda endonucleasa.

3.3. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

3.3.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

La electroforesis de desarrollo horizontal en geles de agarosa no desnaturizantes se realizó siguiendo los protocolos convencionales (Sambrook *et al.*, 1989). Como solución electroforética se utilizó TBE 0'5X (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM) al que se añadió bromuro de etidio en una concentración de 0'5 µg/ml para la posterior visualización de los fragmentos de DNA por irradiación con luz ultravioleta. La concentración de agarosa en el gel se adecuó al tamaño de los fragmentos a separar. Como tampón de cargado se utilizó glicerol al 5%, EDTA 1 mM, azul de bromofenol al 0'05%. Para determinar el tamaño de los fragmentos separados se utilizaron tanto el marcador de pesos moleculares λ /Hind III como el marcador comercial VI (Boehringer Mannheim, Cat. Nº. 1062 590) consistente en una mezcla de fragmentos pBR328/Bgl I y pBR328/Hinf I.

3.3.2. Electroforesis de DNA en geles desnaturizantes de poliacrilamida (PAGE).

Esta técnica de separación se utilizó en la resolución de las fragmentos de DNA de cadena sencilla generados mediante las reacciones de secuenciación. La preparación de los geles se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor Pharmacia (Cat. Nº. 27-0985-01) con algunas modificaciones (Paricio, 1993). Los geles de desarrollo vertical presentaban una concentración de acrilamida del 8% utilizando bis-acrilamida como agente de entrecruzamiento en proporción 1:19. Como polimerizador se utilizó N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y persulfato amónico. Como agente desnaturizante se utilizó urea en una concentración final de 1'4 M. Los geles utilizados tenían un grosor constante de 0'2 mm o bien un gradiente de grosor de 0'2 a 0'4 mm. En el primer caso se sometieron a un voltaje constante de 1.500 V y en el segundo de 2.500 V. La temperatura a lo largo de la electroforesis se mantuvo constante a 55 °C mediante el uso de placas termostatazadas. El solvente utilizado fue TBE 1X (Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM) utilizándose como tampón de cargado el suministrado por el proveedor.

3.3.3. Electroforesis de RNA en geles desnaturizantes de agarosa.

La electroforesis de RNA previa al análisis de hibridación mediante *Northern blot* se realizó en condiciones desnaturizantes utilizando geles horizontales de agarosa al 1% en tampón MOPS en presencia de formaldehído según el método descrito en Sambrook *et al.* (1989). Como tampón de cargado se utilizó glicerol al 5%, EDTA 1 mM, azul de bromofenol al 0'05%. Como marcador de pesos moleculares se utilizó una mezcla comercial de RNAs (Boehringer Mannheim Cat. Nº. 1062 620). La electroforesis se realizó en ausencia de bromuro de etidio siendo posteriormente teñida la carrera correspondiente al marcador.

3.3.4. Recuperación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.

La recuperación de fragmentos de DNA separados mediante electroforesis en agarosa se realizó mediante escisión de la porción de gel que contenía la banda de interés y posterior electroelución en membranas de diálisis utilizando TBE 0'5X como tampón siguiendo el método descrito en Sambrook *et al.* (1989). Tras la recuperación del dializado, el DNA era purificado por fenolización y posterior precipitación con etanol en presencia de acetato amónico.

Cuando el destino del fragmento a purificar así lo permitía, como era el caso de su posterior ligación a vectores plasmídicos se utilizó agarosa de bajo punto de fusión (Boehringer Mannheim Cat. Nº. 1062 620). Su uso permite mantener las porciones recuperadas del gel en estado líquido a la temperatura de 37°C por lo que pueden usarse directamente en posteriores ensayos.

Si la cantidad de DNA a recuperar no era muy elevada, su separación de la porción de gel escindida se realizó mediante filtración utilizando el sistema comercial *Micropure Inserts* del proveedor Amicon. Este método fue utilizado en el aislamiento de productos de PCR. Cuando el tamaño similar de los fragmentos coamplificados hacía imposible su separación mediante este procedimiento, los fragmentos se resolvieron en un gel de agarosa de bajo punto de fusión y como alternativa a la escisión de la banda, una pequeña porción de la misma (unos 20 µl) era obtenida utilizando una pipeta pasteur. Ésta era fundida en 200 µl de tampón TE por incubación a 65°C durante 10 minutos y enfriada a temperatura ambiente. Posteriormente una alícuota de la muestra era sometida a reamplificación con los cebadores originales consiguiendo de esta forma cantidad suficiente del fragmento de interés.

3.4. TRANSFERENCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS A FILTROS.

3.4.1. Transferencia de DNA mediante *Southern blot*.

La transferencia de fragmentos de DNA desde geles de agarosa a filtros para su posterior hibridación se realizó según el método de *Southern blot* (Southern, 1975) siguiendo las instrucciones recomendadas para el método de marcaje con digoxigenina (Boehringer Mannheim, 1993). Los filtros empleados fueron membranas de nilón cargados positivamente (Boehringer Mannheim, Cat. Nº. 1417 240) o bien filtros de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell BA85).

Tras la realización de la electroforesis y la visualización de los fragmentos separados, los geles fueron sometidos a tratamiento opcional con HCl 0'25 M con la finalidad de aumentar la eficacia de transferencia. A continuación se procedía a la desnaturalización del DNA mediante tratamiento con solución desnaturalizante (NaOH 0'5 M, NaCl 1'5 M) siendo posteriormente neutralizada con la solución Tris-HCl 1 M; pH 7'4 (20°C), NaCl 1'5 M. Todos los tratamientos se realizaron a temperatura ambiente con agitación. La transferencia se llevaba a cabo mediante el paso por capilaridad del solvente SSC 10x (citrato sódico 0'15 M; pH 7'0 (20°C), NaCl 1'5 M) a través del gel en contacto con el filtro. El sistema se desarrollaba durante un máximo de 16 horas. Una vez concluida la transferencia se procedía a la fijación del DNA a la membrana por irradiación de luz ultravioleta en el caso de emplear filtros nilón, o por horneado a 80°C en el caso de la nitrocelulosa.

3.4.2. Transferencia de RNA mediante *Northern blot*.

La transferencia de RNA poli(A)⁺ desde geles de agarosa a filtros de nilón se realizó mediante el método conocido como *Northern blot*, siguiendo las instrucciones recomendadas para la posterior hibridación con sondas marcadas con digoxigenina (Boehringer Mannheim,

1993). Tras la electroforesis en presencia de formaldehído, el gel era equilibrado con SSC 20x. A continuación se procedía a la transferencia por capilaridad (ver apartado 3.4.1), tras la cual se realizaba la fijación del RNA mediante irradiación con luz ultravioleta. Todas las soluciones y material utilizados habían sido sometido a tratamiento contra RNasas.

3.4.3. Transferencia de DNA de placas de lisis.

El método utilizado para la transferencia del DNA de fagos desde las placas de cultivo a los filtros se basó en el descrito por Benton y Davis (1977) con algunas modificaciones (Sambrook *et al.*, 1989). De forma resumida, el protocolo consistió en la transferencia del DNA a partir de las calvas de lisis desarrolladas en un césped bacteriano mediante contacto con la superficie del cultivo de un primer filtro durante 30 segundos seguido de segundo filtro durante 1 minuto. A continuación el DNA era fijado a los filtros y sometido a desnaturalización y neutralización según se describe en el apartado 3.4.1 con la diferencia de realizar los lavados sobre papel de filtro humedecido en las correspondientes soluciones.

3.5. TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN.

3.5.1. Sondas utilizadas.

Las sondas de cDNA utilizadas en este trabajo procedían del clon pDmPAH amablemente cedido por el Dr. Carlos Alonso (Universidad Autónoma de Madrid). Este contiene en su totalidad la región codificante del gen de la PAH de *Drosophila melanogaster* en el vector pUC18 (Morales *et al.*, 1990). Así, mediante digestión del clon con enzimas de restricción y posterior separación electroforética y electroelución de los fragmentos obtenidos, se construyeron las siguientes sondas a partir del clon original (Fig. 11):

- *DcPah*: que contiene la región codificante completa del gen de la PAH de *Drosophila melanogaster* (1525 pb).
- *5'DcPah*: consistente en los primeros 760 pb del extremo 5' del cDNA. Esta región codifica para la zona reguladora del enzima presentando una baja homología con la secuencia de la TH de *Drosophila melanogaster* por lo que su utilización minimiza la hibridación heteróloga con dicho gen.
- *CDcPah*: comprende 411 pb de la región central.
- *3'DcPah*: consistente en los 354 pb finales del cDNA.

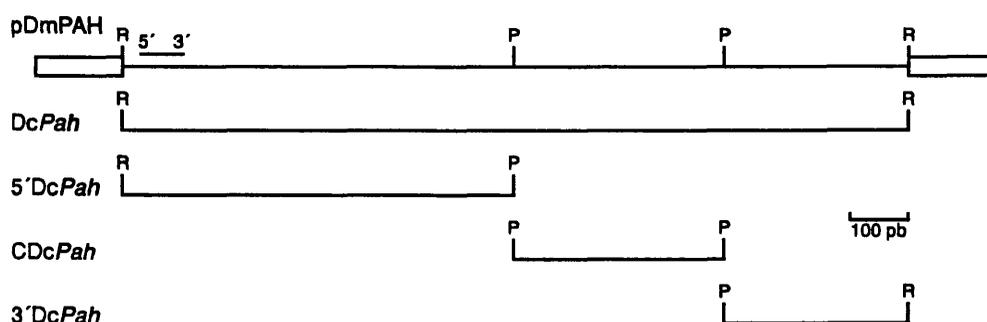


Figura 11. Estrategia de construcción de sondas a partir del clon de cDNA de la PAH de *Drosophila melanogaster* pDmPAH. Las cajas representan el sitio de clonación del plásmido. Las abreviaturas de los enzimas de restricción son: R, *EcoRI*; P, *PvuII*.

Además de las sondas del cDNA de la PAH, se construyó una sonda de DNA genómico a partir del clon λ DgPah, aislado en el presente trabajo. La digestión de dicho clon con la endonucleasa *Bfr*I producía un fragmento de una 3'5 kb, que contenía en su totalidad la región genómica correspondiente al gen de la PAH, a partir del que se construyó la sonda denominada DgPah.

Como control en los experimentos de hibridación de RNA poli(A)⁺ mediante *Northern blot* se utilizó la sonda Hd19 amablemente cedida por la Dra. Nuria Paricio (Universitat de València). Esta consiste en un fragmento de 1'8 kb clonado en pBluescript+DK que contiene parte del gen de la actina de *Drosophila melanogaster*.

El marcaje de las sondas se realizó por el método no radiactivo *DIG System* del proveedor Boehringer Mannheim (Cat. Nº. 117 5033). Este método se basa en la incorporación de digoxigenina, un hapteno esteroide, al DNA sintetizado. Tras la hibridación, la sonda es inmunodetectada mediante un anticuerpo-antidigoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina pudiendo así ser visualizada mediante reacción con sustratos quimioluminiscentes o colorimétricos. Así siguiendo las instrucciones del fabricante, las sondas fueron marcadas con digoxigenina-11-dUTP, un análogo del dTTP, por la técnica de marcaje de "cebado al azar" (*random primed labeling*).

3.5.2. Hibridación de DNA.

Una vez fijado el DNA a los filtros se procedió a su hibridación con la sonda marcada con digoxigenina siguiendo las instrucciones del fabricante. Dado que las secuencias a detectar eran homólogas a las sondas utilizadas, las condiciones de hibridación y lavado utilizadas en todas las experiencias fueron de máxima estringencia, esto es, se aplicó una temperatura de hibridación de 65°C en solución de baja fuerza iónica realizando el lavado en las mismas condiciones.

El protocolo se puede esquematizar como sigue:

- prehibridación de los filtros mediante incubación con la solución de hibridación (SDS 0'02%, SSC 5x, N-laurilsacarosina 0'1%, agente bloqueante (Boehringer Mannheim Cat. Nº. 1096 176) al 1%) en un horno giratorio a 65 °C durante un tiempo mínimo de una hora. El objetivo de este tratamiento es bloquear los sitios de unión no específicos presentes en el filtro.
- hibridación con la sonda marcada (5-25 ng de sonda por mililitro de solución de hibridación) previamente desnaturalizada por calentamiento a 95°C. Se realizó en horno giratorio a 65°C durante 16 horas.
- eliminación de la sonda unida inespecíficamente mediante tratamiento con una disolución SSC 2x, SDS 0'1% a temperatura ambiente y con agitación (dos lavados de 5 minutos) seguido de los lavados de estringencia realizados con una disolución SSC 0'5x, SDS 0'1% a 65°C en baño con agitación (dos lavados de 15 minutos).

3.5.3. Hibridación de RNA.

La hibridación del RNA fijado a los filtros mediante *Northern blot* se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor aplicando condiciones de máxima estringencia. El procedimiento seguido es similar al de hibridación de DNA (ver apartado anterior) salvo por la presencia de formamida en la solución de hibridación (SDS 7%, formamida 50%, tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7'0 (20°C), agente bloqueante 2%, RNA total de levadura 50 µg/ml, SSC 5x, laurilsarcosina 0'1%), por lo que la temperatura se redujo a 50°C.

3.5.4. Inmunodetección.

Una vez concluido el proceso, se pasó a la inmunodetección de la sonda mediante incubación con el anticuerpo-antidigoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim Cat. Nº. 1093274). Para ello se siguieron las instrucciones del fabricante que a continuación se presentan de forma resumida:

- tratamiento del filtro con la solución bloqueante (ácido maleico 100 mM; pH 7'5 (20°C), NaCl 150 mM, agente bloqueante (Boehringer Mannheim Cat. Nº. 1096 176) al 1%) durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. El objetivo de este tratamiento es el bloqueo de los sitios de unión inespecíficos.
- incubación con el anticuerpo-antidigoxigenina en solución bloqueante durante 30 minutos a temperatura ambiente y con agitación suave.
- eliminación del exceso de anticuerpo mediante tratamiento con solución de lavado (ácido maléico 100 mM; pH 7'5 (20°C), NaCl 150 mM) a la que en el caso de la detección quimioluminiscente se le añade Tween[®]20 al 0'3% (dos lavados de 15 minutos).
- detección mediante reacción con los sustratos de la fosfatasa alcalina en el tampón Tris-HCl 100 mM; pH 9'5 (20°C), NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM. El sustrato utilizado para la reacción quimioluminiscente es el reactivo CSPD[®] (Boehringer Mannheim Cat. Nº. 1363 514). Una vez el filtro incubado en el reactivo, la detección se realiza mediante su exposición a una película de rayos X. En la reacción colorimétrica se utilizan los sustratos cloruro de nitroblue tetrazolio (NBT; Boehringer Mannheim Cat. Nº. 1383 213) y 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (X-fosfato; Boehringer Mannheim Cat. Nº. 1383 221). En este caso la señal es detectada en forma de precipitado coloreado sobre el filtro.

En el caso de realizar la detección por el método quimioluminiscente, los filtros pudieron ser hibridados de nuevo dada la facilidad de eliminación de reactivos y sonda. Esta eliminación se realizó mediante lavado con una solución de NaOH 0'2M, SDS 0'1% a 60°C en agitación vigorosa durante 15 minutos. Los filtros enjuagados con SSC 2x quedaban listos para una nueva hibridación.

3.6. IDENTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE CLONES FÁGICOS.

El aislamiento del gen estructural de la PAH de *Drosophila melanogaster* se realizó a partir de una genoteca de DNA genómico de la cepa *Canton S* construida en el vector de clonación derivado del fago λ EMBL4 (*Sau3A I/BamH I*) amablemente cedida por el Dr. Pérez-Alonso (Universitat de València). Esta genoteca había sido sometida al menos a un ciclo de amplificación. La cepa huésped utilizada para el crecimiento de los fagos fue la cepa de *Escherichia coli* NM519. Su preparación para la infección así como el plaqueado de los fagos se realizó siguiendo el protocolo descrito en Sambrook *et al.* (1989).

El rastreo inicial se realizó sobre un total de 4×10^4 placas de lisis distribuidas en 10 placas de cultivo siguiendo el método de hibridación *in situ* (Benton y Davis, 1977) tal como se describe en el apartado 3.4.3, utilizando las sondas de cDNA de la PAH. Una vez identificados los clones positivos, se procedió a su aislamiento mediante dos rastreos sucesivos utilizando un menor número de virus por placa de cultivo (100-200).

3.7. CLONACIÓN EN VECTORES PLASMÍDICOS.

3.7.1. Vector utilizado.

El vector utilizado en la clonación de fragmentos de DNA fue el plásmido sintético pUC18 de la bacteria *Escherichia coli* suministrado por el proveedor comercial Boehringer Mannheim. Este plásmido presenta un sitio de clonación múltiple localizado en la región que codifica para el fragmento N-terminal de la β -galactosidasa. Por tanto, los recombinantes pierden la capacidad de α -complementación con la bacteria huésped DH5 α que codifica una forma defectiva del enzima. De esta forma, utilizando un medio indicador compuesto por el inductor isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) y el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (X-gal), los recombinantes pueden ser identificados histoquímicamente por su incapacidad de metabolizar el sustrato, ya que producen colonias blancas frente a las no recombinantes, de color azulado. Por otra parte, este vector confiere a la bacteria resistencia al antibiótico ampicilina, lo que se utiliza como marcador selectivo para los transformantes.

3.7.2. Ligación.

Para la clonación de fragmentos de DNA de doble cadena se utilizaron las estrategias convencionales de ligación mediante el uso de la ligasa del fago T4 suministrada por el proveedor Boehringer Mannheim (Sambrook *et al.*, 1989). El vector se preparó mediante linealización por digestión con las endonucleasas elegidas y, en el caso de que los extremos generados fueran cohesivos, posterior desfosforilación por tratamiento con fosfatasa alcalina.

En cuanto a la preparación de las muestras de DNA a clonar, se siguieron varias estrategias. En el caso de la subclonación de fragmentos originados por restricción, se utilizó la técnica conocida como "shot-gun". Tras la digestión de la muestra con las endonucleasas escogidas y la posterior inactivación de las mismas, se procedía a la ligación con el vector. Una vez realizada la transformación, los clones con los fragmentos de interés eran seleccionados mediante análisis de restricción. Cuando el objetivo se centraba en la clonación de un fragmento concreto, éste era aislado mediante electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión. La ligación con el plásmido se realizó directamente en la porción de agarosa fundida que contenía el fragmento de interés.

La clonación de fragmentos de DNA producidos por amplificación mediante PCR se realizó utilizando el sistema comercial *SureClone*TM *Ligation Kit* del proveedor Pharmacia (Cat. Nº 27-9300-01). Mediante este sistema los productos de PCR son preparados para la ligación utilizando la actividad 3'-5' exonucleasa del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I. Este enzima elimina los residuos dATP añadidos por la *Taq* polimerasa a los extremos 3' durante la amplificación. De forma concomitante, la polinucleótido quinasa del fago T4 fosforila los extremos. Las muestras así tratadas son purificadas mediante fenolización y cromatografía de exclusión y sometidas a ligación en el vector proporcionado (pUC18/*Sma* I desfosforilado). Todos los protocolos se realizaron según las instrucciones del fabricante.

3.7.3. Transformación y selección de recombinantes.

Una vez realizada la ligación de los fragmentos de interés al vector plasmídico, se procedió a la transformación de la cepa bacteriana. Como huésped se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5 α preparada para la transformación mediante tratamiento con cloruro cálcico (Sambrook *et al.*, 1989). La introducción del DNA plasmídico en las células se realizó mediante el método de choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989). La selección de transformantes se realizó mediante crecimiento en un medio con ampicilina y en presencia del indicador IPTG/X-gal. Los recombinantes fueron así identificados por formar colonias blancas.

3.8. AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

3.8.1. Material utilizado.

Los oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo fueron sintetizados por los proveedores comerciales Pharmacia y Real. Su diseño se realizó con el apoyo computacional del programa *Primer* (Lincoln *et al.*, 1991) en base a la secuencia del gen de la PAH de *Drosophila melanogaster* obtenida en el presente trabajo y a la publicada para el retroelemento B104 de *Drosophila* (Scherer *et al.*, 1982).

A continuación se presenta el listado de oligonucleótidos empleados:

5' → 3'		
E1	GAATCTTGTGGAATTCTACCAGCGG	exón 1 del gen <i>Pah</i> , directo
I1	GATTTGGTGATAGACATTGC	intrón 1 del gen <i>Pah</i> , directo
E2	ACTGCTCCTTCACATCCTC	exón 2 del gen <i>Pah</i> , reverso
E2a	CATCCTGGTTTTACSGATCC	exón 2 del gen <i>Pah</i> , directo
E2b	AGCTGCAGGATGTGTCCAAC	exón 2 del gen <i>Pah</i> , directo
E23	GTGAAACCTGTGCAATCCC	unión exón 2-3 del gen <i>Pah</i> , reverso
E4	TAATGGATCCTTGGTGACGC	exón 4 del gen <i>Pah</i> , reverso
E5	TCTAGAACCTCAACTCTG	exón 5 del gen <i>Pah</i> , reverso
B1	TAAAGTAAATGGCCTACGCAG	3'LTR del elemento B104, reverso
B2	ATGTAAATGAATCGAGAGCG	5'LTR del elemento B104, directo

Nota: directo y reverso hace referencia a la orientación del cebador respecto a la dirección transcripcional.

La DNA polimerasa utilizada fue la de la bacteria *Thermus aquaticus* (*Taq* polimerasa) suministrada por los proveedores Boehringer Mannheim (Cat. Nº. 1146165) y Pharmacia (Cat. Nº. 27-0799). Como tampón de reacción se utilizó el recomendado por el fabricante.

Como termociclador se utilizó el modelo GeneAmp® PCR System 2400 del fabricante Perkin Elmer. Este termociclador permite el desarrollo de la amplificación sin la adición de aceite a las muestras facilitando así su posterior utilización.

3.8.2. Condiciones de amplificación de DNA.

Las reacciones de amplificación sobre DNA genómico de *Drosophila melanogaster* se realizaron siguiendo los protocolos habituales (Innis *et al.*, 1990). Los ensayos se realizaron en un volumen final de 50 µl en presencia de desoxinucleótidos (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) 200 µM, cebadores directo y reverso 200 nM y 0'5 a 1'0 unidades de *Taq* polimerasa en el tampón suministrado. La cantidad de DNA genómico utilizado como molde varió entre los 50 y 200 ng. Con la finalidad de uniformizar las condiciones de las distintas muestras, la mezcla de reacción se realizó, si el ensayo así lo permitía, conjuntamente para todas ellas siendo posteriormente dosificada. Para evitar la unión inespecífica de los cebadores, la dosificación se realizó cuando el termociclador había alcanzado los 80°C mediante el proceso conocido como "*manual hot-start*" (Chou *et al.*, 1992).

En todos los casos se realizaron controles negativos carentes de muestra con la finalidad de detectar posibles contaminaciones. Como control positivo se utilizó el DNA del clon λ DgPah aislado en el presente trabajo, que contiene en el gen estructural de la PAH de *Drosophila*.

En cuanto a las condiciones de amplificación se realizaron de 25 a 30 ciclos usando el siguiente perfil de temperaturas precedido por un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto: 94°C durante 20 segundos (desnaturalización), 55°C durante 30 segundos (apareamiento), 72°C durante un tiempo dependiente de la longitud del fragmento a amplificar (aproximadamente 10 s por cada 100 nt) (extensión). Para concluir, se realizó un paso final de extensión de 5 minutos a 72°C. Tras éste, las muestras eran enfriadas rápidamente a 4°C con lo que la reacción era detenida.

Para la amplificación de fragmentos largos de DNA (más de 3 kb) estos protocolos fueron modificados en base a la bibliografía (Barnes, 1994; Cheng *et al.*, 1994) utilizando los sistemas comerciales *Taq Extender™ PCR Additive* (Stratagene Cat. Nº. 600148) y *Expand™ Long Template PCR System* (Boehringer Mannheim Cat. Nº. 1681 834). Las principales variaciones respecto a las condiciones estándar residen en la utilización de una mezcla enzimática de *Taq* polimerasa y actividades 3'-5' exonucleasa (prueba de lectura). Otros parámetros modificados fueron la composición de los tampones de reacción (pH alcalino, presencia de detergentes, presencia de glicerol y dimetilsulfóxido), eliminación del paso de desnaturalización previa, disminución de la temperatura de desnaturalización hasta 90°C, unificación de los pasos de apareamiento de cebadores y extensión a una única temperatura (68°C) durante tiempos elevados (hasta 20 minutos). Especial atención fue dada a la calidad del DNA genómico utilizado como molde.

3.8.3. Amplificación de RNA por PCR acoplada a Transcripción Reversa (RT-PCR).

La síntesis de la cadena complementaria de cDNA a partir del RNA total extraído de *Drosophila melanogaster* se realizó mediante la utilización del sistema comercial *First-Strand cDNA Synthesis Kit* del proveedor Pharmacia (Cat. Nº. XY-028-00-10) basado en el uso de la transcriptasa reversa del virus Moloney Murine Leukemia (M-MuLV). Tras la optimización de las condiciones y siguiendo las instrucciones del fabricante, la reacción se llevó a cabo sobre una cantidad de RNA total de 1 µg, en el caso de la cepa salvaje, y 5 µg en el mutante *Hn³*, en un volumen final de 15 µl usando como cebadores para la transcriptasa reversa tanto los suministrados por el fabricante (una mezcla de pd(N)₆ o el oligonucleótido *Not I-d(T)*) como oligonucleótidos específicos del gen analizado.

Tras la puesta a punto de los protocolos, las reacciones de PCR se realizaron en las mismas condiciones utilizadas en la amplificación a partir de DNA genómico. La cantidad de muestra utilizada como molde dependió de cada caso concreto variando entre 0'5 y 2 µl del producto de las reacciones de síntesis de cDNA. En todos los casos se realizaron controles negativos, utilizando directamente el RNA total como molde para la amplificación. De esta forma se pudo comprobar la contaminación debida a la presencia de DNA genómico en las muestras. Como control positivo se utilizó el plásmido pDmPAH. La reamplificación de los productos obtenidos se realizó siguiendo las mismas condiciones sobre un volumen de producto de 10 µl.

3.9. SECUENCIACIÓN DE DNA.

Para la determinación de las secuencias nucleotídicas se utilizó el método de Sanger de terminación mediada por dideoxynucleótidos (Sanger *et al.*, 1977). El proceso se realizó bien de forma manual con marcaje radiactivo, o utilizando un secuenciador automático con marcaje fluorescente.

La secuenciación manual se realizó mediante el sistema comercial *T7 Sequencing Kit* del proveedor Pharmacia (Cat. Nº. 27-0985-01) basado en el uso de la DNA polimerasa del fago T7. Para el marcaje se empleó el análogo radiactivo α -³⁵S-dATP (Amersham Cat. Nº. SJ 1304). Tanto las reacciones de polimerización como la separación electroforética en gel desnaturizante de poliacrilamida y la detección por autorradiografía se realizaron siguiendo los protocolos habituales (Sambrook *et al.*, 1989).

La secuenciación automática fue realizada a través del Servicio de Secuenciación del Servei Central de Soport a la Investigació Experimental (S. C. S. I. E.) de la Universitat de València utilizando el equipo 373A *Automated Sequencer* de Perkin Elmer. El sistema empleado se basa en la utilización de análogos de los dideoxynucleótidos marcados con diferentes fluoróforos que son incorporados al DNA sintetizado por la *Taq* polimerasa. Así la detección de los fragmentos separados electroforéticamente se realiza mediante fluorometría.

Como molde para las reacciones de secuenciación se utilizó DNA de doble cadena tanto clonado en el vector pUC18 como directamente producido mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En el primer caso se utilizaron los cebadores universales directo y reverso. En el caso de la secuenciación de fragmentos clonados de longitud mayor de 400 pb se utilizaron cebadores internos diseñados a partir de la secuencia del inserto o bien se recurrió a la obtención de delecciones seriadas. Para ello se utilizó el sistema comercial *Double-stranded Nested Deletion Kit* de Pharmacia (Cat. Nº. 27-1691-01) basado en el uso de la exonucleasa III y la nucleasa S1.

En el caso de la secuenciación directa de productos de PCR, se procedió a la eliminación de los cebadores, desoxynucleótidos y otros reactivos mediante la ultrafiltración de las muestras con membranas de *Microcon™-10* del proveedor Amicon siguiendo las instrucciones del fabricante (Cat. Nº. 42406). Los productos purificados fueron secuenciados usando tanto los mismos cebadores empleados en la amplificación como cebadores internos.

Todas las muestras fueron secuenciadas sobre las dos cadenas y, en el caso de los productos de PCR, las reacciones se realizaron por duplicado sobre muestras procedentes de amplificaciones diferentes.

El análisis computacional de secuencias se realizó mediante el paquete de programas GCG (Genetics Computer Group) de la Universidad de Wisconsin proporcionado por el Servei de Bioinformàtica de la Universitat de València.

RESULTADOS

1. ESTUDIO DEL ENZIMA SEPIAPTERINA REDUCTASA DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*.

Drosophila melanogaster resulta un organismo modelo idóneo para el estudio de la ruta de biosíntesis de pterinas y su regulación. En este trabajo se presenta el estudio cinético del enzima sepiapterina reductasa (SR) y el estudio comparativo de su actividad en diferentes mutantes de color de ojos, formando parte de un proyecto global encaminado a la identificación del gen estructural de dicho enzima.

1.1. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA ACTIVIDAD SEPIAPTERINA REDUCTASA EN *DROSOPHILA MELANOGASTER*.

La caracterización cinética de la actividad SR se realizó a partir de la medida de la actividad en extractos crudos obtenidos a partir de moscas adultas. Este estadio se eligió por presentar una actividad SR máxima (Fan y Brown, 1979). En el análisis se utilizó como sustrato la sepiapterina por su mayor estabilidad frente a los sustratos tetrahidropterínicos. Así, la actividad se determinó a partir de la cuantificación de la biopterina (Bip) obtenida por oxidación del producto de la reacción enzimática dihidrobiopterina (H₂Bip).

En un estudio preliminar, se analizó la distribución de la actividad SR en moscas adultas. De la actividad total de un individuo, aproximadamente el 20% se localizaba en cabezas y el 80 % restante en cuerpos (tórax-abdomen). Sin embargo, la actividad específica referida a la cantidad de proteína total resultó mayor en cabezas que en cuerpos ($28'7 \pm 1'7$ vs. $15'9 \pm 1'3$ nmol Bip/mg/h en individuos recién nacidos, respectivamente). Asimismo se estudió la existencia de posibles diferencias entre machos y hembras. La actividad específica medida en individuos recién nacidos resultó ligeramente superior en hembras ($22'2 \pm 1'1$ nmol Bip/mg/h) que en machos ($16'3 \pm 0'9$ nmol Bip/mg/h). Esta diferencia se vio acentuada al considerar la actividad por individuo debido al mayor contenido proteico por individuo de las hembras (480 ± 24 pmol Bip/individuo/h en hembras vs. 240 ± 21 pmol Bip/individuo/h en machos). Posteriormente se comprobó que el comportamiento cinético de la SR era similar tanto en cabezas como en cuerpos de machos y hembras.

A continuación se procedió a analizar el efecto de las distintas variables del ensayo sobre la actividad enzimática. La SR presentó un amplio rango de temperatura óptima, desde 40°C a 46°C. En los ensayos estándar, se observó un incremento lineal de la actividad al aumentar el tiempo de incubación (Fig. 12A). En cuanto al efecto de la concentración de enzima, la formación de producto resultó lineal respecto a la cantidad de proteína total a lo largo de todo el rango utilizado en los ensayos (Fig. 12B). Se comprobó que tras 20 min de tratamiento con iodo la oxidación de H₂Bip a Bip era completa.

Una vez determinadas las condiciones de ensayo se procedió a analizar el efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática. El enzima exhibió un comportamiento Michaelis-Menten típico (Fig. 13). Usando la representación de Dobles Recíprocos (Lineweaver-Burk), se determinó la K_m aparente para la sepiapterina que resultó de 153 μ M. El mismo valor fue obtenido tanto en extractos procedentes de cabezas como de individuos enteros. Este valor contrasta con los publicados (60 μ M: Fan y Brown, 1979; 75 μ M: Yim *et al.*, 1991) aunque se encuentra en el mismo orden de magnitud. La utilización de extractos crudos pudo ser la causa de tal diferencia.

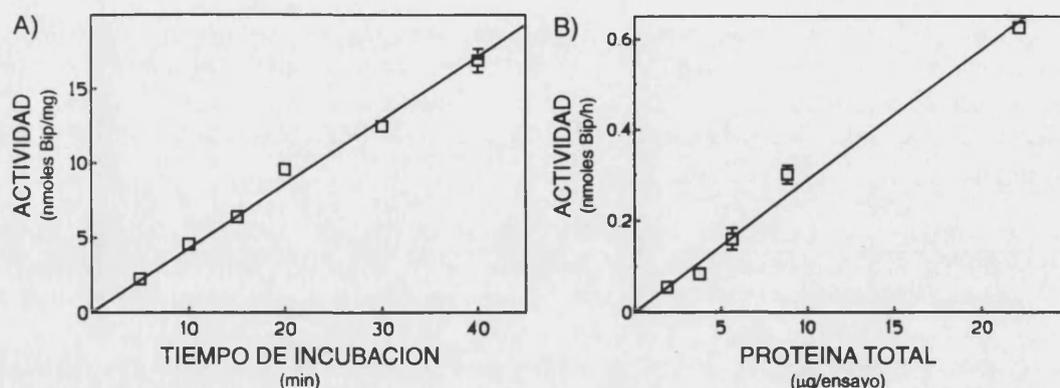


Figura 12. Efecto de las condiciones de ensayo sobre la actividad sepiapterina reductasa de *Drosophila melanogaster*. A) Efecto del tiempo de incubación. B) Efecto de la concentración de enzima. Los ensayos enzimáticos fueron realizados sobre extractos crudos de cabezas de individuos adultos (0 a 12 horas), aplicando las condiciones estándar descritas en Material y Métodos. Los datos representan la media \pm SD de dos experimentos independientes.

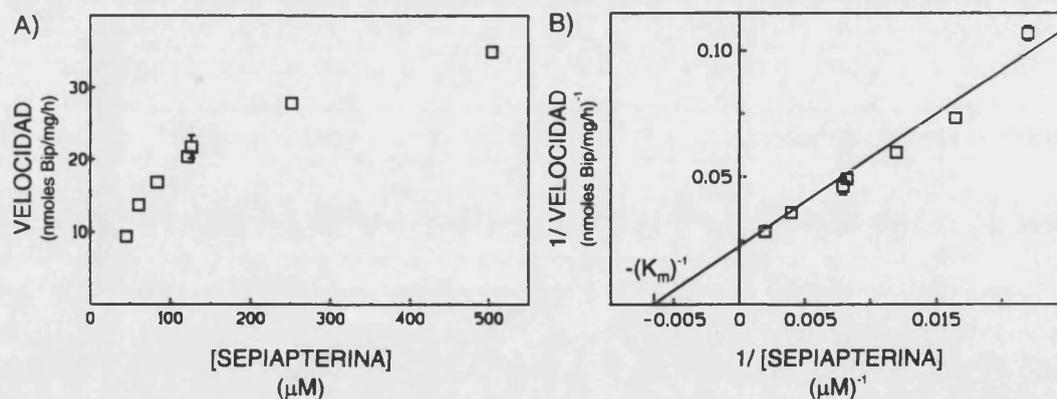


Figura 13. Efecto de la concentración de sepiapterina sobre la actividad sepiapterina reductasa de *Drosophila melanogaster*. A) Velocidad de reacción frente a la concentración de sustrato. B) Representación de Dobles Recíprocos (Lineweaver-Burk). Los ensayos enzimáticos fueron realizados sobre extractos crudos de individuos adultos (0 a 12 horas). Se aplicaron las condiciones estándar descritas en Material y Métodos, variando la concentración de sepiapterina en el ensayo entre 30'4 µM y 504 µM en presencia de concentraciones saturantes del cofactor NADPH (600 µM). Los datos representan la media \pm SD de dos experimentos independientes.

1.2. ANÁLISIS DE INHIBICIÓN DE LA SEPIAPTERINA REDUCTASA.

A continuación se procedió a determinar el efecto que sobre la actividad SR de *Drosophila melanogaster* producen los neurotransmisores N-acetildopamina, N-acetilserotonina y el derivado sintético N-metoxiacetilserotonina, potentes inhibidores de la SR de mamíferos (Smith *et al.*, 1991).

Los estudios realizados indicaron que la actividad enzimática era inhibida por los tres compuestos analizados aunque en ninguno de los casos se obtuvo una inhibición total, aún aplicando concentraciones del orden de mM (Figs. 14, 15 y 16). Para la caracterización cinética de la inhibición producida se determinó la actividad enzimática en presencia de concentraciones no saturantes del sustrato sepiapterina y diferentes concentraciones de estos compuestos (ver Material y Métodos). Los datos resultantes fueron analizados mediante las representaciones de Dobles Recíprocos y de Dixon obteniéndose unos valores para la constante de inhibición K_i de 127 μM para la N-acetilserotonina, 40 μM para la N-acetildopamina, y 87 μM para la N-metoxiacetilserotonina, respectivamente. Los tres compuestos presentaron un comportamiento de inhibidores no competitivos.

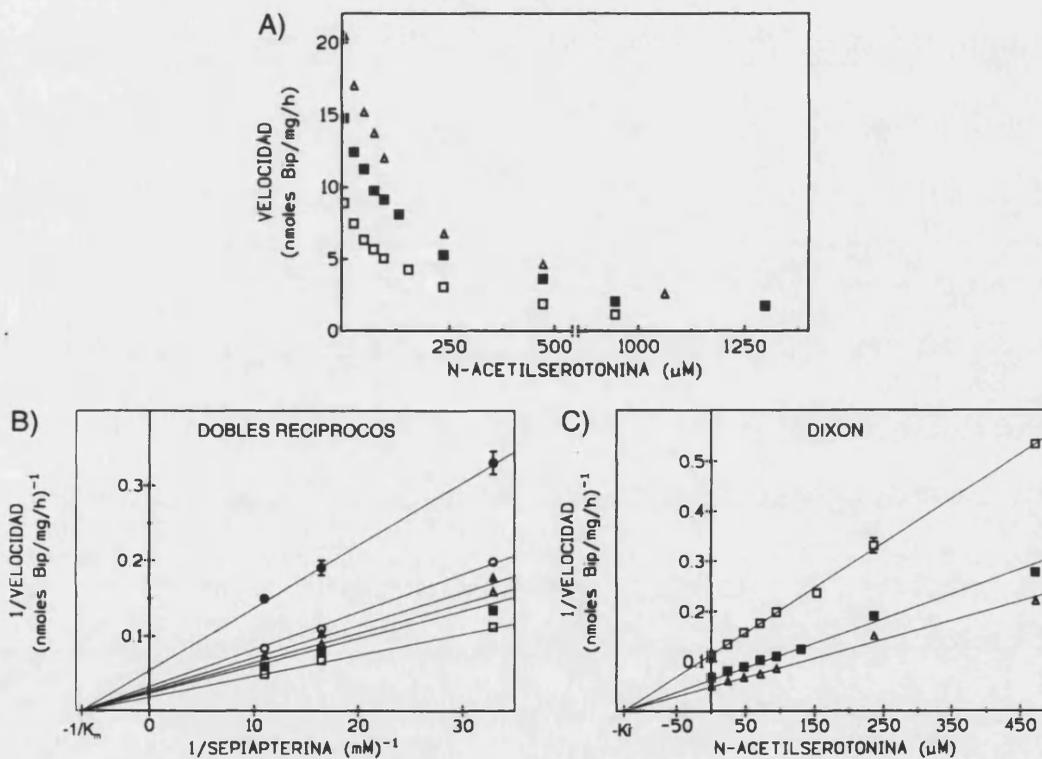


Figura 14. Inhibición de la actividad sepiapterina reductasa de *Drosophila melanogaster* por N-acetilserotonina. A) Representación de la velocidad enzimática presente en extractos proteicos de individuos adultos (0-12 horas) en presencia de diferentes concentraciones de inhibidor [concentración de sepiapterina: (\square) 30'4 μM , (\blacksquare) 60'8 μM , (\triangle) 91'2 μM]. B) Representación de Dobles Recíprocos (Lineweaver-Burk) [concentración de N-acetilserotonina: (\square) 0 μM , (\blacksquare) 23'6 μM , (\triangle) 47'2 μM (\blacktriangle) 70'8 μM , (\circ) 94'4 μM , (\bullet) 236 μM]. C) Representación de Dixon [concentración de sepiapterina: (\square) 30'4 μM , (\blacksquare) 60'8 μM , (\triangle) 91'2 μM]. Los datos representan la media \pm SD de dos experimentos independientes.

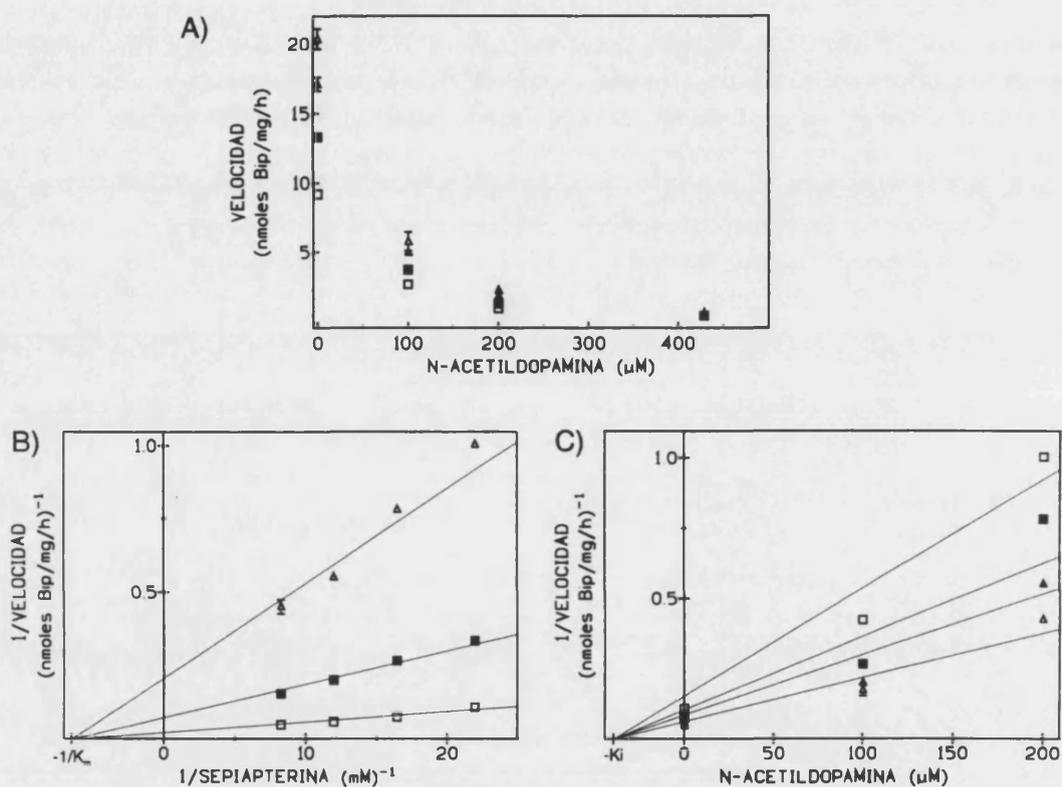


Figura 15. Inhibición de la actividad sepiapterina reductasa de *Drosophila* por N-acetildopamina. A) Representación de la velocidad enzimática en extractos proteicos de individuos adultos (0-12 horas) con diferentes concentraciones de inhibidor [concentración de sepiapterina: (\square) 45'6 μM , (\blacksquare) 60'8 μM , (\blacktriangle) 83'6 μM , (\triangle) 121'6 μM]. B) Representación de Dobles Recíprocos [concentración de N-acetildopamina: (\square) 0 μM , (\blacksquare) 100'1 μM , (\blacktriangle) 200'2 μM]. C) Representación de Dixon [concentración de sepiapterina: (\square) 45'6 μM , (\blacksquare) 60'8 μM , (\blacktriangle) 83'6 μM , (\triangle) 121'6 μM]. Los datos representan la media \pm SD de dos experimentos.

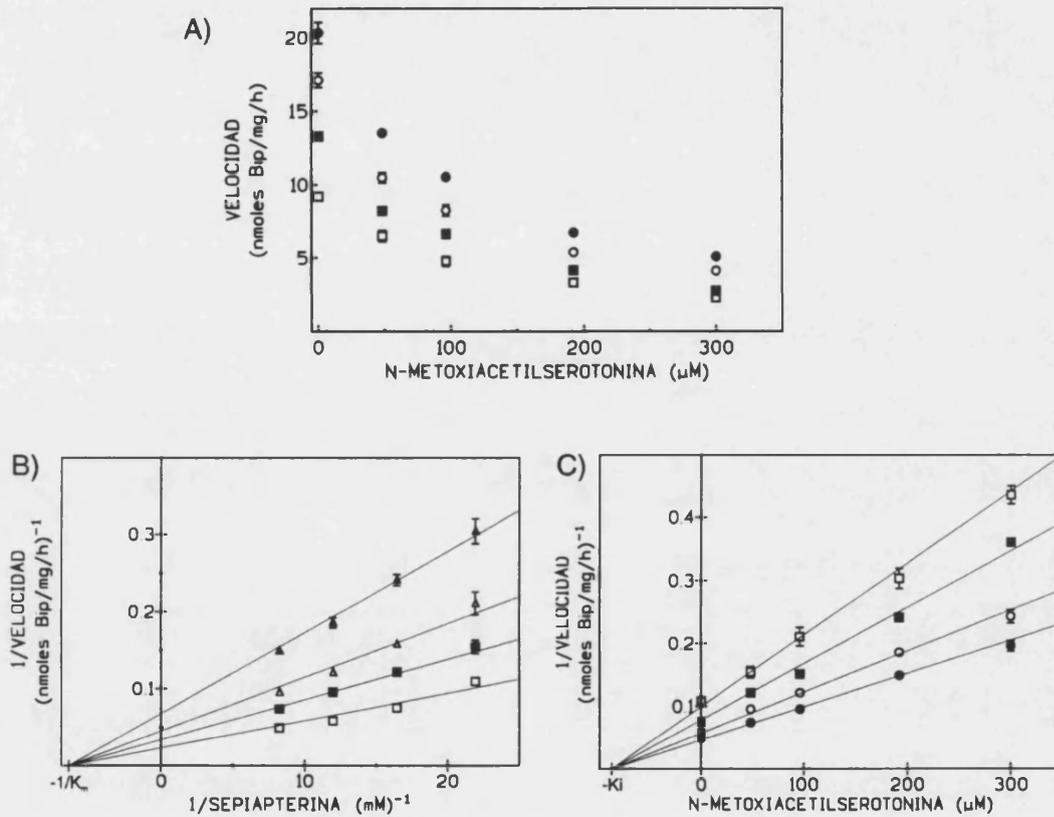


Figura 16. Inhibición de la actividad sepiapterina reductasa de *Drosophila* por N-metoxiacetilserotonina. A) Representación de la velocidad enzimática en extractos proteicos de individuos adultos (0-12 horas) con diferentes concentraciones de inhibidor [concentración de sepiapterina: (□) 45'6 μM, (■) 60'8 μM, (○) 83'6 μM, (●) 121'6 μM]. B) Representación de Dobles Recíprocos [concentración de N-metoxiacetilserotonina: (□) 0 μM, (■) 48 μM, (Δ) 96 μM, (▲) 192 μM]. C) Representación de Dixon [concentración de sepiapterina: (□) 45'6 μM, (■) 60'8 μM, (○) 83'6 μM, (●) 121'6 μM]. Los datos representan media ± SD de dos experimentos.

1.3. DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELÉCTRICO DE LA SEPIAPTERINA REDUCTASA.

Con el objetivo de detectar posibles isoenzimas de la actividad SR se procedió a la separación de las proteínas presentes en extractos crudos en función de su punto isoeléctrico mediante la técnica de cromatoenfoco. La experiencia se realizó por duplicado, utilizando extractos procedentes tanto de cabezas como de individuos adultos enteros de 2 días de edad, momento de máxima actividad SR. En ambos casos se obtuvieron resultados similares. Dichos resultados (Fig. 17) indicaron la existencia de una sola fracción con actividad SR, correspondiente a un punto isoeléctrico de 6'0 (5'9-6'1). La recuperación de actividad respecto al total aplicado resultó de tan sólo el 20%.

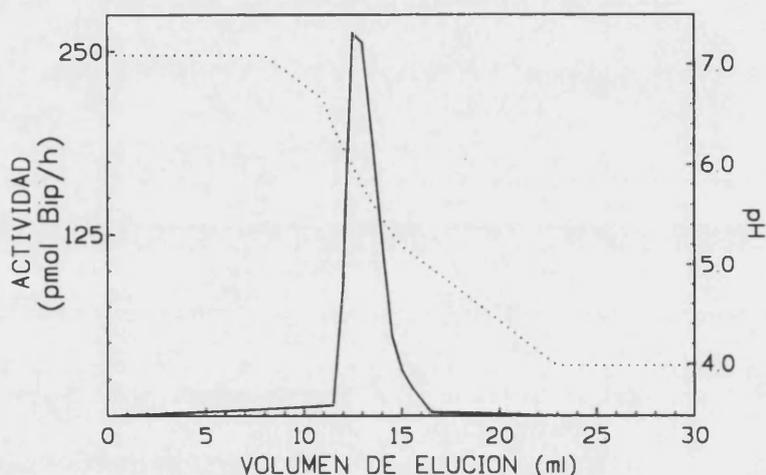


Figura 17. Perfil de elución de la actividad sepiapterina reductasa tras cromatoenfoco realizado sobre extractos crudos de individuos adultos de *Drosophila melanogaster*. (—) Actividad SR en las diferentes fracciones proteicas, medida en alícuotas de 25 μ l de un total de 0'5 ml; (...) Perfil de pH durante la cromatografía.

1.4. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD SEPIAPTERINA REDUCTASA EN MUTANTES.

1.4.1. Variación de la actividad sepiapterina reductasa a lo largo del desarrollo.

Con la finalidad de minimizar diferencias debidas a una posible desincronización en la recolección de las muestras, se procedió a la determinación de la actividad presente en moscas adultas de la cepa salvaje *Or-R* recogidas en intervalos de dos horas. En la figura 18 se muestran los resultados procedentes del análisis en cabezas de adultos. El mismo perfil fue obtenido a partir de extractos de individuos completos. Se pudo observar que la actividad SR permanecía constante durante las primeras 17 horas tras la emergencia del adulto, apareciendo un pico de máxima actividad a las 56 horas. De acuerdo con estos resultados, el análisis de mutantes se realizó utilizando extractos procedentes de individuos de 0 a 2 horas.

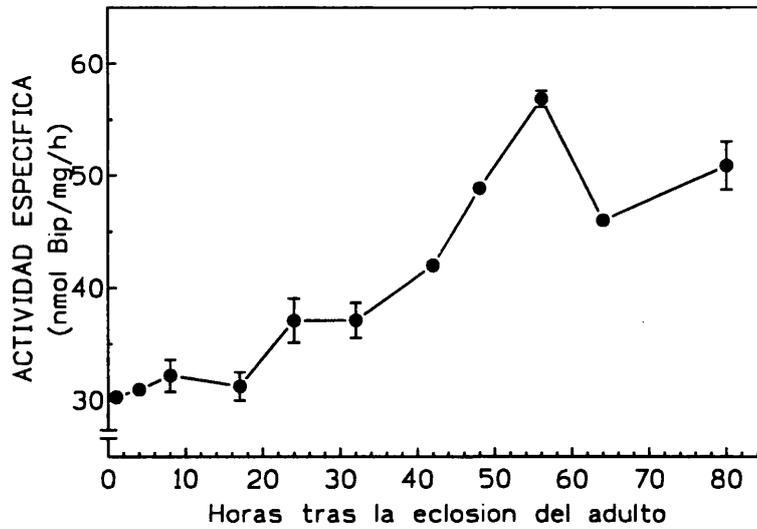


Figura 18. Actividad sepiapterina reductasa a lo largo del desarrollo de individuos adultos de *Drosophila melanogaster*. La actividad fue medida en extractos de cabezas de individuos adultos. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes.

1.4.2. Actividad sepiapterina reductasa en diferentes mutantes de color de ojos.

La selección de mutantes a analizar se realizó en función de su patrón de pterinas escogiéndose aquellos cuyo fenotipo coincidiese con el esperado para un defecto en la actividad SR (Ferré *et al.*, 1986). Aunque ninguno mostró una disminución extrema en la actividad, *clot* (*cl*), *garnet* (*g*), *red Malpighian tubules* (*red*) y *sepia* (*se*) presentaron niveles disminuidos respecto a la cepa salvaje *Or-R* (Tabla III). De ellos, el locus *clot* resultaba el mejor candidato del gen estructural de la SR ya que dicha mutación afecta de forma específica al patrón de pterinas sin alterar el correspondiente a los pigmentos marrones. Además este mutante presenta una gran acumulación de sepiapterina como cabría esperar ante un defecto en el enzima SR.

Tabla III. Actividad sepiapterina reductasa en mutantes de color de ojos de *Drosophila*.

Cepa	<i>Or-R</i>	<i>bo</i>	<i>cl</i>	<i>g</i>	<i>Hn³</i>	<i>p</i>	<i>red</i>	<i>se</i>
Actividad media	100'0	105'3	51'6	64'6	89'0	100'0	49'2	78'0
SD	(3'8)	(2'0)	(1'2)	(2'5)	(2'5)	(2'3)	(0'9)	(3'1)

La actividad se expresa como el porcentaje de actividad específica respecto a la cepa salvaje *Or-R*. Los datos corresponden a la media y (SD) de tres ensayos realizados en condiciones estándar sobre diferentes extractos de cabezas de individuos adultos recién nacidos.

1.4.3. Experiencias de dosis génica.

Con la finalidad de comprobar la hipótesis de que el locus *clot* correspondiese al gen estructural de la SR, se procedió a la realización de pruebas de dosis génica. Para ello se usó la cepa *Df(2L) cl^{h4}*, que contiene una deficiencia en la región cromosómica donde el locus *clot* se localiza. Los resultados (Tabla IV) indicaron la ausencia de correlación entre el número de copias *clot*⁺ y la actividad SR. Aunque los heterocigotos para la mutación mostraron una actividad intermedia a la obtenida en los homocigotos, los genotipos que combinaban los alelos mutante y normal con una deficiencia presentaron valores diferentes de los esperados en el caso de que el locus *clot* fuese el gen estructural. Por tanto se concluyó que, aunque la actividad SR se ve afectada por distintos loci génicos, ninguna de las cepas analizadas presentaba una mutación en el gen de la SR.

Tabla IV. Niveles de actividad sepiapterina reductasa en individuos con diferentes copias normales (*cl*⁺) o mutantes (*cl*) del gen *clot*.

Genotipo	Fenotipo ^a	Actividad SR ^b	copias <i>cl</i> ⁺	copias <i>cl</i>
<i>cl</i> ⁺ / <i>cl</i> ⁺	ts	100	2	0
<i>cl</i> / <i>cl</i>	mo	54	0	2
<i>cl</i> ⁺ / <i>cl</i>	ts	75	1	1
<i>Df(2L) cl^{h4}</i> / <i>cl</i> ⁺	ts	82	1	0
<i>Df(2L) cl^{h4}</i> / <i>cl</i>	mo	89	0	1

^a Referido al color de ojos como tipo salvaje (ts) y marrón oscuro (mo). ^b Actividad específica expresada como porcentaje respecto a la cepa salvaje. Los datos son medias de dos ensayos realizados en condiciones estándar sobre distintos extractos obtenidos a partir de cabezas de individuos adultos recién nacidos.

2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN ESTRUCTURAL DEL ENZIMA FENILALANINA HIDROXILASA DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*.

El gen de la PAH presenta una elevada similitud, tanto a nivel de secuencia como a nivel estructural, entre las diversas especies donde se ha caracterizado. El objetivo del presente apartado es la determinación de su estructura en el invertebrado *Drosophila melanogaster*. Asimismo se aborda el estudio de su expresión a través del análisis de los transcritos correspondientes.

2.1. ESTRUCTURA DEL GEN DE LA FENILALANINA HIDROXILASA DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*.

Para identificar el gen codificante de la PAH en *Drosophila melanogaster* se procedió al rastreo de una genoteca de DNA genómico de la cepa *Canton S* construida en λ EMBL4 utilizando la sonda *DcPah* correspondiente al cDNA completo del gen (ver apartado 3.5 de Material y Métodos). De un total de 4×10^4 recombinantes analizados se obtuvieron tres clones positivos que fueron purificados mediante dos posteriores rastreos, esta vez usando la sonda 5'*DcPah* para evitar posibles falsos positivos debidos a hibridación cruzada con el gen de la tirosina hidroxilasa. La caracterización de estos clones mediante su análisis de restricción demostró que los tres contenían un mismo inserto de unas 14'5 kb. Por tanto se pudo concluir que procedían de un mismo recombinante al que se denominó λ Dg*Pah*.

La identificación de la secuencia genómica homóloga al cDNA del gen contenida en el clon aislado se realizó mediante el análisis de hibridación por *Southern blot* del DNA digerido con diversas endonucleasas con las sondas derivadas de pDmPAH. A partir de los resultados obtenidos se elaboró el correspondiente mapa de restricción (Fig. 19). Su comparación con el obtenido al analizar la secuencia de cDNA (Neckameyer y White, 1992) demostró que λ Dg*Pah* contenía en su totalidad la región genómica correspondiente al gen de la PAH, poniéndose de manifiesto la existencia de diversas regiones intrónicas así como de posible sitios polimórficos.

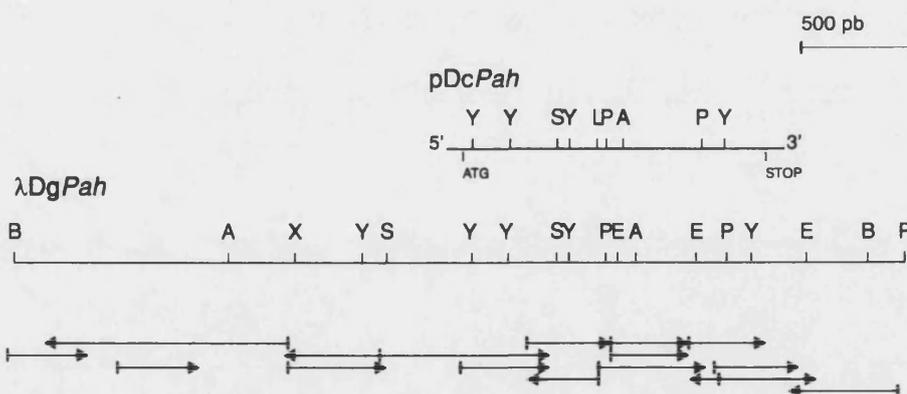


Figura 19. Mapa de restricción de gen estructural de la fenilalanina hidroxilasa de *Drosophila melanogaster*. El mapa ha sido deducido a partir del análisis del clon genómico λ Dg*Pah*. En la parte superior se presenta el correspondiente al clon de cDNA deducido mediante el análisis de su secuencia nucleotídica (Neckameyer y White, 1992). En la parte inferior se indica la estrategia de secuenciación utilizada (flechas). Abreviaturas empleadas: A, *Ava* I; B, *Bfr* I; E, *Eco*R I; L, *Sal* I; P, *Pvu* II; S, *Sca* I; Y, *Sty* I; X, *Xba* I.

Con la finalidad de confirmar dicho mapa se procedió al análisis de hibridación del clon λ DgPah utilizando una sonda de DNA genómico construida a partir del fragmento Bfr I de 3'5 kb de dicho clon. Los resultados producidos coincidieron con los obtenidos utilizando las sondas derivadas de pDmPAH, descartando así la posible existencia de fragmentos de restricción intrónicos. Asimismo este mapa, como se ilustrará más adelante, coincidió con el obtenido como resultado del análisis de hibridación realizado sobre DNA genómico de la cepa salvaje Or-R. Ese mismo análisis confirmó la existencia de una única copia del gen por genoma.

Una vez caracterizado el clon genómico, se procedió a la determinación de la secuencia nucleotídica de la región homóloga al cDNA de la PAH siguiendo la estrategia mostrada en la figura 19. La secuencia obtenida se presenta en la figura 20, habiendo sido remitida a la base de datos EMBL (número de acceso X98116).

aattcgagct	cggtaccg	aaagcgtatt	accattttaa	agacaaaatc	cgacaaaaag	-872	
ttcgggtgag	tgtaacgatt	ggactaattg	attccagtc	atctgatgtg	gaccgcaagt	-812	
ataaaaaaaaa	accaagagta	gcgcgtgcca	ggcccacttg	gagctattca	ctactgaaat	-752	
aattgccctg	aaatgccgtt	gaactcgttt	ggttagaacc	tgtcattaga	aaaacacagc	-692	
ccagattatt	cagtatgatt	ttttgcaaaa	caaagcaaat	ctaaaactag	ctgaaataat	-632	
gttttggttaa	tttggacccc	agcagagggg	cgagtcttag	ctgataatat	ttccaaaata	-572	
cagtggaaaca	tgcgaaaagg	aagtgccttg	ggttcttcaa	aagtaagaaa	acattgttta	-512	
cgatattata	ttttatctat	agaaaactgt	gcctaagttc	caggaacaca	gatcyataac	-452	
attccaaact	ggtttttcga	atcaggcgtt	cctttttttc	gtattttgaa	ttatggatgc	-392	
tagctgtatt	taagcctcca	acatttagat	ttgatcggct	agacgacggc	ttctgtaatg	-332	
aagctgaata	ctgaaatggg	attttaggcc	catcgagaca	ctgggactg	ataacccggc	-272	
agccgcagag	ccatagccgc	gattggatcg	catgtggatg	ccgttccaag	atcatttact	-212	
cgcccagattg	cccgcgatat	tatttgatt	atttactggt	ttcagttcgg	attgattttc	-152	
gtttgggctc	agctatgggg	sctatcgaaa	agtc <u>tattta</u>	agcgcgcgat	tcacagagaa	-92	
attaaat	*CAG. TTTTAATT	CG TGTGCTGAGC	GGATCGTTTCG	CCATCGGTTT	TATTGTA	ACTT -32	
ATCAGTGGAG	AAACCCGAGA	ATCTTGTGAA	AATGTACCAG	CGGCAGGTCT	CCTTTGATAA	29	
			M Y Q	R Q V S	F D K	10	
Ggtttgttgc	ttcggcgaga	gtcctctgtg	caccgggtat	agaaagtgat	ccgtaaaata	30	
gctaataaat	taaaaaaat	aacaagttaa	ttattctgcg	ttctcagcat	gaacttgtcc		
aacctttgag	gaaaaaaaa	tcaataaaa	tataatttta	ttattttgat	tgaaatgaga		
atgcccgatct	ataatgtata	aaacctgtca	tggaaattggg	ttagttcgca	atagttctag		
acaaaggaaa	acagagtggg	gtctgggact	cctagtgggt	tattttattt	tcgctcctaa		
acaagtagtt	tattaatgtg	ttttgtagag	taaaacctga	attaagacgt	caggcgcata		
tattggaagt	agaaacagta	cagcttaata	agatgtcata	taaatacatt	aagaacaaat		
aattcagccc	tgtagagga	cctgttatg	gctcaagatc	ttgcaaagta	tactacttgg		
gagaccttcc	cacagataca	gcacaccaag	ttctaggccg	agtccttggc	aatatgcgct		
gattgccatt	ggggtcggac	ctaaaccttc	aatatggggg	ttcaagccaa	aacacaaaca		
atctcaatga	tgcagatctg	aggcaagtac	tacaattaca	gttcgttggc	tcataataagg		
cttcgggttaa	atgattatgc	gatttgggcc	ctggtagcct	ctgtaatagg	agatttgctg	11	
atagacattg	catagtcata	agagcagaga	aatattatct	gtattaata	gtttggcttg		
actgctcggt	tagcccaggt	cactcggagt	caatctgtca	aatttccaat	gatgcaatgg		
ctgttttccc	aaacagcaaa	aatataaacc	gtaaataattt	tttaaattac	caatgaattt		
attacagCCA	ACGCGCGTAG	AGGATTCGGC	TTACATAGTC	GAGGGTGTAG	ATATTAAGGA	83	
	P T R V E	D S A	Y I V	E G V D	I K E	28	
GGCCAGAAC	ACCTGTCTTC	TGTTTTCGCC	CAAGGATTTCG	TCGTTGTCCA	GCGGAGCTTT	143	
A R N	T C L L	F S P	K D S	S L S S	G A L	48	
GGCCAACATT	TTGGCCATCT	TCAAGAAGCA	TGACATAAAC	CTGGTGCATA	TTGAGTCGCG	203	
A N I	L A I F	K K H	D I N	L V H I	E S R	68	
TTCCTCGCTG	CGTGTTC	CGG	GTTATGAGTT	TTCGTGGAG	GCCGATGGAA	AATCGGGAGC	263
S S L	R V P G	Y E F	E2 F V E	A D G K	S G A	88	
CTTGGGAAAA	GCCATCGAGG	ATGTGAAGGA	GCAGTGTAGC	TACTTTAACA	TCATTTGCGG	323	
L G K	A I E D	V K E	Q C S	Y F N I	I S R	108	
TGACTACAAG	GATAATGCCA	CGGCTGTGCC	CTGGTTCCCG	CGGCGTATAC	GCGATCTGGA	383	
D Y K	D N A T	A V P	W F P R	R I R	D L D	128	

TCGTTTCGCC	AATCAGATTC	TGAGCTACGG	ATCGGAGCTG	GATGCCGATC	ATCCTGGTTT	443
R F A	^{E2a} N Q I L	S Y G	S E L	D A D H	P G F	148
TACCGATCCG	GAATACCGCA	AGCGTCGCAA	GTA [→] CTTCGCC	GACATTGCCT	ACA [→] ACTACAA	503
T D P	E Y R K	R R K	Y F A	D I A Y	N Y K	168
GCATGGCGAG	CCCTTGCCCC	ATGTGGATTA	CACCAAGGAG	GAGATCGAGA	CCTGGGGCAT	563
H G E	P L P H	V D Y	T K E	E I E T	W G I	188
TATCTTCAGG	AATCTTACGA	AGCTGTATAA	GACACATGCC	TGTCGCGAGT	ACAACCACGT	623
I F R	N L T K	L Y K	T H A	C R E Y	N H V	208
CTTCCCTTG	CTGGTGGACA	ACTGTGGATT	CCGAGAGGAT	AACATTCCCC	AGCTGGAGGA	683
F P L	^{E2b} L V D N	^{E23} C G F	R E D	N I P Q	L E D	228
TGTGTTCCAAC	TTTTTGGAGG	g [←] ttagt [←] ttcga	ttactg [←] ccca	ttagat [←] agaa	ttcgt [←] aacat	703
V S N	F L R D					235
taaattgctg	cacttcag [↑] AT	TGCACAGGTT	TCACTCTGCG	TCCAGTGGCT	GGACTACTCA	745
		C T G F	T L R	P V A	G L L S	249
GCTCTCGGGA	TTTCTGGCT	GGACTGGCCT	TCCGCGTCTT	CCACTCCACT	CAGTATATCC	805
S R D	F L A	G L A F	R V F	H S T	Q Y I R	269
GACATCCCAG	CAAGCCCATG	TACACACCGG	AACCAGATGT	CTGCCACGAG	CTGATGGGCC	865
H P S	K P M	Y T P E	P D V	C H E	L M G H	289
ACGTGCCGCT	TTTTGCAGAT	CCAGCTTTTG	CCCAATTCAG	TCAGGAGATC	GGGCTAGCTT	925
V P L	F A D	P A F A	Q F S	Q E I	G L A S	309
CCCTGGGAGC	ACCCGATGAT	TACATTGAGA	AATTGTCCAC	Cgtaagtggc	tctttgctct	966
L G A	P D D	Y I E K	L S T			322
aggctaacaa	aggataactg	tgtgatgcgt	gaattctttc	tttcag [↑] ATCT	TCTGGTTCAC	980
				I F	W F T	327
TGTTGAGTAC	GGCGTGTGCC	GCCAGGAGGG	TGAGTTGAAG	GCGTACGGAG	CTGGTCTGCT	1040
V E Y	G V C R	Q E G	E L K	A Y G A	G L L	347
GTCCTCCTAC	GGAGAACTGG	AGTATTGCCT	CACGGACAAG	CCGCAGCTGA	AGGACTTTGA	1100
S S Y	G E L E	Y C L	^{E4} T D K	P Q L K	D F E	367
GCCGGAGGTC	ACTGGCGTCA	CCAAGTATCC	CATTACTCAG	TTCCAGCCTC	TGTACTATGT	1160
P E V	T G V T	K Y P	I T Q	F Q P L	Y Y V	387
GGCCGATAGT	TTCGAAACCG	CCAAGGAGAA	GACCATgtaa	g [←] ttactaggc	ctaaacatat	1196
A D S	F E T A	K E K	T I			399
ctaacgaaag	tg [←] ttaaataa	cttgaattac	tttttagTAAA	TTTGC [←] GA [←] ACT	CGATTCCCCG	1219
			^{E5} K	F A N S	I P R	407
ACCCTTTGGT	GTTTCGCTACA	ATGCCTATAC	TCAGATGTT	GAGGTTCTCG	ACTCGAAGCC	1279
P F G	V R Y N	A Y T	Q S V	E V L D	S K P	427
CCAGATTTTCG	AATCTGATGG	ACAACATTAA	CTCCGAGTTC	CAGATTCTTC	AGAATGCCGT	1339
Q I S	N L M D	N I N	S E F	Q I L Q	N A V	447
TGCCAAGCTG	CGCGTCTGAG	TAGAATTCAT	ATACATTTTT	TACTCCCTCT	CTTTACTTAC	1399
A K L	R V *					452
TATTAAGAAT	GAATCAAATA	ATAAATAACA	TGCAATTATG	TAagntnntg	taactgtggt	1441
g [←] ttgtg [←] ttgc	g [←] ttatg [←] acaa	c [←] ctgtat [←] cg	ataatg [←] ttct	g [←] tttttttt	tggkktg [←] ggt	
agcatgttca	attacatttt	g [←] ttgtta [←] agc	tcttttg [←] aaa	aacatataaa	cagttatgta	
caaaatgggt	ctacattatc	ctcatcgtat	ttacaggc [←] tt	aagcaag [←] ttc	taacgactcg	
tcctataggt	atgtacaaat	cttaa [←] acatt	gagcta [←] acta	aaattatt [←] aa	ggtagttgta	
g [←] ttgag [←] ttta	agatag [←] tttg	tttccatt [←] ta	caag [←] ttctaa	g [←] tttaa [←] agcm	y [←] ttgg [←] ctctt	
tatcag						

Figura 20. Secuencia nucleotídica del gen de la fenilalanina hidroxilasa de *Drosophila melanogaster*. Las mayúsculas y minúsculas representan exones e intrones, respectivamente. La primera base del codón de inicio es tomada como posición +1 (intrones no incluidos). Los asteriscos indican el inicio de los cDNA caracterizados (Morales *et al.*, 1990; Neckameyer y White, 1992). Se indican la supuesta caja TATA detectada (subrayado doble), el posible inicio de transcripción (punteado) y la señal de poliadenilación (subrayado). Los oligonucleótidos utilizados se indica mediante flechas horizontales. La cabeza de flecha indica el nucleótido adicional respecto a la secuencia de cDNA (Neckameyer y White, 1992).

La determinación de la estructura del gen de la PAH de *Drosophila melanogaster* se realizó mediante la comparación de la secuencia obtenida con la correspondiente al cDNA previamente publicada (Morales *et al.*, 1990; Neckameyer y White, 1992). Esta comparación indicó que la región de DNA genómico caracterizada contenía en su totalidad la región codificante del gen interrumpida por un total de cuatro intrones (Fig. 21).

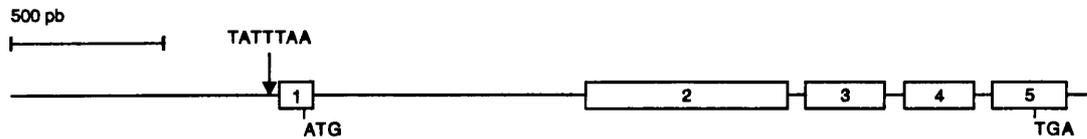


Figura 21. Estructura del gen de la fenilalanina hidroxilasa en *Drosophila melanogaster*. La estructura ha sido deducida por comparación de la secuencia del clon genómico con la del cDNA previamente publicada (Morales *et al.*, 1990; Neckameyer y White, 1992). Los exones e intrones se representan mediante cajas vacías y líneas continuas, respectivamente. Se indica la posición de los codones de inicio (ATG) y parada (TGA) de traducción. La supuesta caja TATA identificada en la zona 5' no transcrita del gen se indica mediante una flecha.

La pauta abierta de lectura (ORF) coincidió con la deducida a partir del cDNA excepto por la presencia de 17 sustituciones dispersas de las cuales 16 resultaron silenciosas. Dos de ellas ocasionaban cambios en el patrón de restricción confirmado la presencia de sitios polimórficos. Tan sólo se observó un cambio conservativo en el aminoácido 332 (Leu→Val). Además de estos polimorfismos, la secuencia obtenida presentaba una base adicional en la posición 1346 respecto a la publicada por Neckameyer y White (1992). Esta base producía un cambio de pauta que afectaba a los 5 últimos aminoácidos del extremo C-terminal, introduciendo un nuevo codón de parada, de forma que la proteína deducida resultó compuesta por 452 residuos frente a los 453 descritos. Dado que también se encontraba en la secuencia publicada por Morales y colaboradores (1990), su presencia se consideró confirmada.

Los sitios de unión exón/intrón (Fig. 22) presentaron una elevada homología con las secuencias consenso de los sitios de eliminación de intrones 5' [(A/C)AG/GT(A/G)AGT(A/T)] y 3' [CAG/(A/G)T] descritas para los genes de *Drosophila melanogaster*, apareciendo en todos los casos los dinucleótidos obligatorios GT...AG (Mount *et al.*, 1992). También se pudieron identificar posibles secuencias de punto de ramificación (*branch-point*). El contenido en AT de los intrones resultó significativamente superior al presentado por los exones, circunstancia característica de los genes de *Drosophila* (Mount *et al.*, 1992). En lo que hace referencia a la región 3' no traducida (409 nt secuenciados), no se encontró ninguna posible señal de poliadenilación aparte de la secuencia AATAAA previamente descrita, localizada a 120 pb del codón de parada (Morales *et al.*, 1990; Neckameyer y White, 1992).

La búsqueda de posibles secuencias promotoras se realizó en los 931 pb secuenciados en dirección 5' respecto al punto de inicio de traducción (Fig. 20). Se localizó una posible caja TATA, rodeada de la característica región rica en GC, en posición -34 respecto al más largo de los cDNAs identificados (Morales *et al.*, 1990). Esta secuencia TATTTAA coincidía exactamente con la correspondiente al promotor propuesto para el gen de la tirosina hidroxilasa en *Drosophila* (Birman *et al.*, 1994) así como al promotor de la alcohol deshidrogenasa activo durante el estadio adulto (Benyajati y Dray, 1984). Además se pudo identificar la

secuencia ATCAGTT, a 32 pb de la supuesta caja TATA, idéntica al consenso del sitio de adición del capucha ATCA(G/T)T(C/T) en genes de *Drosophila* (Hultmark *et al.*, 1986). Todos estos datos sugerían que éste pudiera ser el sitio de inicio de transcripción controlado por la secuencia TATA detectada.

EXÓN	%AT	Sitio dador	INTRÓN	%AT	Sitio aceptor
1 (114/39)*	55	F D K CTTTGATAAG/gtttgttgct 30	1 (906)	63	P T R V tattattacag/CCAACGCGCG 31
2 (673)	48	F L R D TTTTTGAGGG/gtttagttcga 702	2 (59)	64	C T G tgcacttcag/ATTGCACAGG 703
3 (263)	45	L S T ATTGTCCACC/gtaagtggt 966	3 (65)	58	I F W F tttctttcag/ATCTTCTGGT 967
4 (230)	45	K T I AGAAGACCAT/gtaagttact 1196	4 (60)	72	K F A ttacttttag/TAAATTTGCG 1197
5 (245)	60	TTACTTACTATTAAGAATGAATCAAATAATAAAATAACATGCAATTATGTAag 1441			

Figura 22. Secuencia nucleotídica de las uniones exón/intrón del gen de la fenilalanina hidroxilasa de *Drosophila melanogaster*. Los exones se representan por letras mayúsculas y los intrones por minúsculas, numerados de acuerdo con la figura 20. El tamaño de exones e intrones viene indicado entre paréntesis (pb). El asterisco en el exón 1 indica el tamaño según la secuencia de cDNA publicada por Morales *et al.* (1990) y por Neckameyer y White (1992), respectivamente. Asimismo se presenta el porcentaje de A+T. La supuesta señal de poliadenilación aparece subrayada. El sitio de adición de la cola poli(A) se indica mediante una flecha.

2.2. ANÁLISIS DE TRANSCRIPCIÓN DEL GEN DE LA FENILALANINA HIDROXILASA DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*.

La presencia de intrones largos en *Drosophila melanogaster* se ha relacionado con la existencia de elementos funcionales diferentes a los requeridos para su propia escisión. Dado que el tamaño del intrón 1 del gen de la PAH resultó mayor que la longitud media de los intrones de *Drosophila* (Mount *et al.*, 1992) se procedió a la realización de análisis encaminados a la búsqueda de este tipo de elementos.

Ninguna secuencia previamente descrita presentó homología significativa con la correspondiente a este intrón. Tampoco se encontraron repeticiones que pudieran relacionarse con alguna función para dicha secuencia. Sin embargo, al analizar la presencia de posibles elementos promotores, se pudieron encontrar varias regiones ricas en A+T (Fig. 23). Además, en posición 892, a 15 pb de la unión con el exón 2, se localizó un triplete ATG en pauta con el resto de la secuencia proteica. Estas observaciones llevaron a plantear la posible existencia de un transcrito alternativo del gen iniciado en el intrón 1.

```

                                     +1
                                     ATGTACCAG CGGCAGGTCT CCTTTGATAA 29
                                     M Y Q R Q V S F D K 10

Ggtttgttgc ttcgggcgaga gtcctctgtg caccgggtat agaaagtgat ccgtaaaata 30
gctaataaat taaaaacaat aacaagtta ttattctgcg ttctcagcat gaacttgctc
aacctttgag gaaaaaaaaat tcaataaaaa tataatttta ttattttgat tgaatgaga
atgcggatct ataatgtata aaacctgtca tgggaattggg ttagttcgca atagttctag
acaaggaaa acagagtggg gtctgggact cctagtggtt tttttattt tcgctcctaa
acaagtagtt tattaatgtg tttgtagag taaaacctga attaagacgt caggcgcata
tattggaagt agaaacagta cagcttaata agatgtcata taaatacatt aagaacaaat
aattcagccc tgttagagga cttgttatg gctcaagatc ttgcaaagta tactacttgg
gagaccttc cacagatata gcacaccaag ttctaggccg agtccttggc aatatgcgct
gattgccatt gcggtcggac ctaaacctc aatatggggg ttcaagcaa aacacaaaca
atctcaatga tgcagatctg aggcaagtac tacaattaca gttcgttggc tcatataagg
cttcggttaa atgattatgc gatttgggcc ctggtagcct ctgtaatagg agatttgctg I1
atagacattg →catagtcata agagcagaga aatattatct gtattaaata gtttggcttg
actgctcgtt tagcccaggt cactcggagt caatctgtca aattccaat gatgcaatgg
ctgttttccc aaacagcaaa aatataaacc gtaaatattt ttaaattac ca ATGaattt
                                     M N L
attacagCCA ACGCGCGTAG AGGATTCGGC TTACATAGTC GAGGGTGTAG ATATTAAGGA 83
L Q P T R V E D S A Y I V E G V D I K E 28

```

Figura 23. Secuencia nucleotídica del intrón 1 del gen de la fenilalanina hidroxilasa de *Drosophila melanogaster*. La secuencia intrónica se representa mediante letras minúsculas y los exones adyacentes mediante mayúsculas, numerados de acuerdo con la figura 20. Se indica el supuesto codón de inicio (ATG) localizado en la secuencia del intrón así como la pauta de lectura resultante (encuadrada). La flecha indica la posición del oligonucleótido I1.

Para comprobar dicha hipótesis, y en colaboración con la Dra. M. Moulard, se procedió al análisis de mensajeros mediante la técnica conocida como PCR acoplada a retrotranscripción (RT-PCR). La estrategia seguida consistió en la utilización de cebadores que amplificaran de forma específica el supuesto transcrito. Así se diseñaron los oligonucleótidos I1, localizado en el intrón 1, y E5, localizado en el exón 5 (Fig. 24A). Como molde se utilizó el cDNA obtenido mediante retrotranscripción cebada por oligo(dT) de RNA total de cabezas de adultos de la cepa *Or-R*. Como resultado de dicha amplificación se obtuvo un único fragmento, de aproximadamente 1300 nt, que hibridó de forma específica con la sonda *DcPah* (Fig. 24B). La determinación de su secuencia nucleotídica confirmó su identidad como un nuevo mRNA de la PAH que contenía parte de la secuencia del intrón 1. El resto de los intrones había sido eliminados según el patrón esperado. Este nuevo mensajero, cuya estructura se presenta en la figura 25, se denominó *Pah* mRNA tipo II frente al anteriormente descrito, referido como *Pah* mRNA tipo I. La secuencia proteica codificada por el transcrito tipo II, de 447 aminoácidos, sólo difería de la correspondiente al mRNA tipo I, de 452 aminoácidos, en los primeros residuos del extremo N-terminal, en el dominio regulador del enzima PAH (Fig. 23).

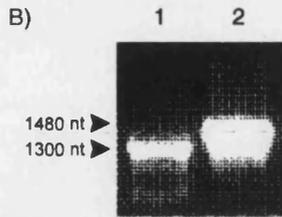
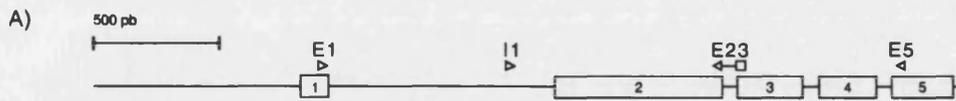


Figura 24. Detección de transcritos del gen de la PAH de *Drosophila melanogaster* mediante RT-PCR. A) Estructura del gen mostrando la localización de los cebadores utilizados. B) Separación electroforética de los productos obtenidos: línea 1, producto de la amplificación del cDNA (retrotranscripción cebada por oligo(dT)) utilizando los oligonucleótidos I1 y E5; línea 2, control con DNA genómico como molde de la amplificación.

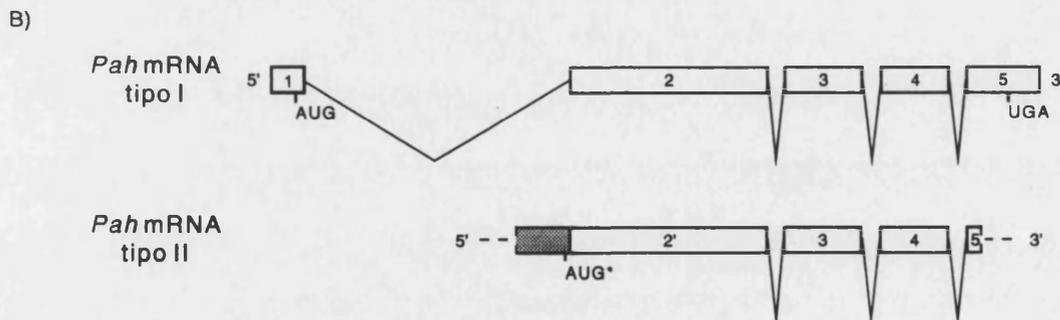
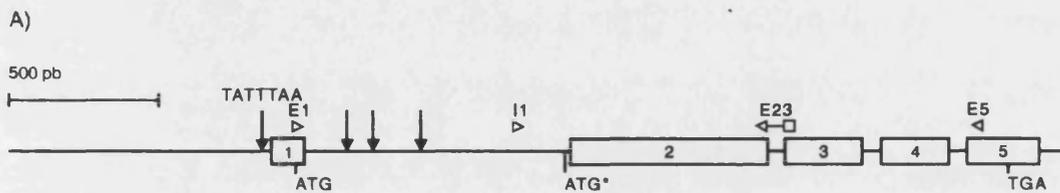


Figura 25. Estructura de los transcritos del gen de la fenilalanina hidroxilasa detectados en cabezas de adultos. A) Estructura genómica determinada por comparación de la secuencia del clon genómico con el cDNA publicado (Morales *et al.*, 1990; Neckameyer y White, 1992). Exones e intrones son representados mediante cajas vacías y líneas continuas, respectivamente. Las flechas verticales indican la posición de la supuesta caja TATA (TATTTAA) identificada en la región 5' no transcrita del gen así como las diferentes zonas ricas en AT localizadas en el intrón 1. Los codones de inicio (ATG) y parada (TGA) de traducción son indicados, así como el supuesto codón de inicio detectado en el intrón 1 (ATG*). Las cabezas de flechas muestran la posición de los oligonucleótidos utilizados en el análisis de RT-PCR. B) Estructura de los transcritos detectados. La correspondiente al mRNA tipo II ha sido deducida a partir del análisis de los productos de RT-PCR obtenidos con la combinación de cebadores I1 y E5, por los que su extensión total no ha podido ser determinada. La caja gris representa la secuencia del intrón 1 presente en este transcrito (exón 2').

Como estudio preliminar encaminado a determinar el posible significado fisiológico de la existencia de estos transcritos, se analizó su presencia a lo largo del desarrollo de *Drosophila*. Para ello se procedió a su amplificación mediante RT-PCR a partir de RNA total extraído en diferentes estadios. Como cebador de la reacción de retrotranscripción se utilizó el oligonucleótido E23, correspondiente a la secuencia de la unión entre el exón 2 y 3. La amplificación se realizó utilizando E23 como cebador reverso, lo que evitó la amplificación iniciada en DNA genómico contaminante, en combinación con los cebadores directos E1, específico para el mRNA tipo I, o I1, específico para tipo II. Mientras que el *Pah* mRNA tipo I aparecía en todos los estadios analizados, en pupas de dos y tres días no se detectó mRNA tipo II. Además la señal correspondiente a los estadios larvarios iniciales apenas era detectable (Fig. 26). Estos resultados sugerían la existencia de una regulación de la expresión del gen de la PAH a lo largo del desarrollo. La interpretación precisa de estas observaciones está siendo objeto de estudios adicionales (i.e. análisis cuantitativo).

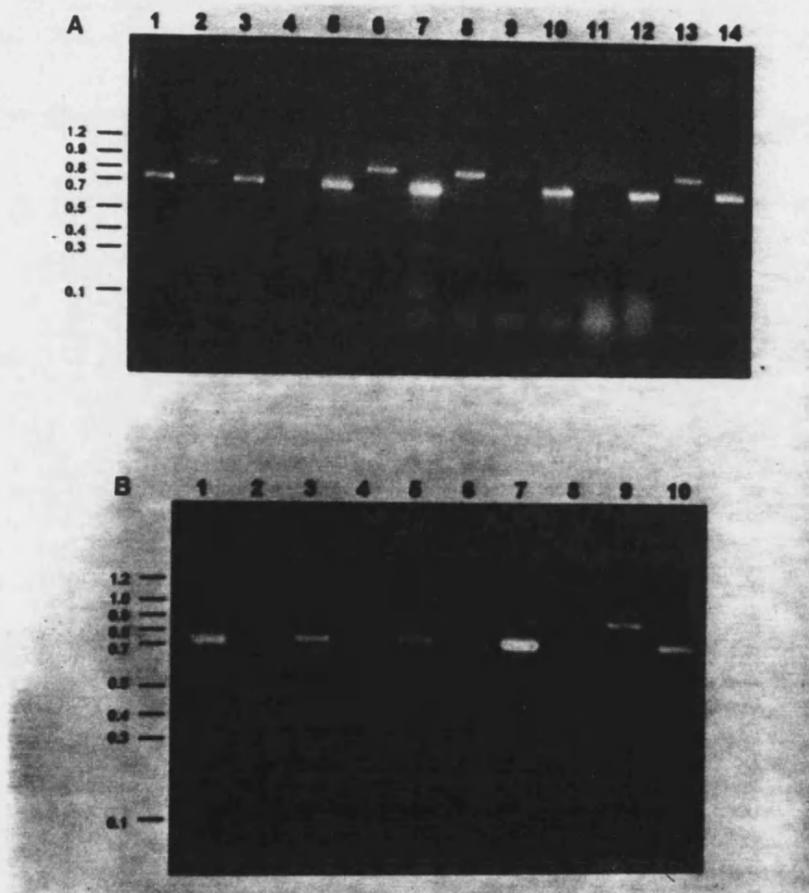


Figura 26. Análisis de los transcritos del gen de la fenilalanina hidroxilasa a lo largo del desarrollo de *Drosophila*. Se presenta la separación electroforética en agarosa al 1'5% de los productos generados por RT-PCR con los cebadores E1 y E23 (A: carreras 1, 3, 5, 7, 10, 12 y 14; B: carreras 1, 3, 5, 7 y 10) o I1 y E23 (A: carreras 2, 4, 6, 8, 11 y 13; B: carreras 2, 4, 6, 8 y 9). Estadios analizados: A) 1, 2: embriones de 0 a 6 h; 3,4: embriones de 6 a 12 h; 5, 6: embriones de 12 a 18 horas; 7, 8: embriones de 18 a 24 horas; 9, 10: primer estadio larvario; 11, 12: segundo estadio larvario; 13, 14: tercer estadio larvario. B) 1,2: pupa blanca; 3, 4: pupa de 2 días; 5, 6: pupa de 3 días; 7,8: pupa de 4 días; 9, 10: cabezas de adultos de 0 a 48 h.

Como conclusión del análisis de transcripción realizado se pudo afirmar que en *Drosophila melanogaster* se producen al menos dos mensajeros diferentes del gen de la PAH, cuyos productos proteicos se diferencian tan sólo en los primeros aminoácidos del extremo regulador N-terminal. Su estructura sugiere que su origen reside en el uso de promotores alternativos.

Actualmente el estudio se está ampliando mediante la determinación de los puntos de inicio de transcripción y el análisis de la distribución de estos mensajeros con el objeto de confirmar el supuesto origen y establecer el significado fisiológico de esta expresión diferencial. Los resultados hasta ahora obtenidos sugieren la existencia de un tercer transcrito, denominado *Pah* mRNA tipo III, aunque su caracterización no ha sido concluida. Éste contendría secuencias localizadas a más de 450 nt en dirección 5' del ATG correspondiente al transcrito tipo I, presentando un nuevo patrón de procesado (Fig. 27). Su pauta de lectura, de 455 residuos, se diferenciaría de la de los otros dos transcritos en los primeros aminoácidos del extremo N-terminal.

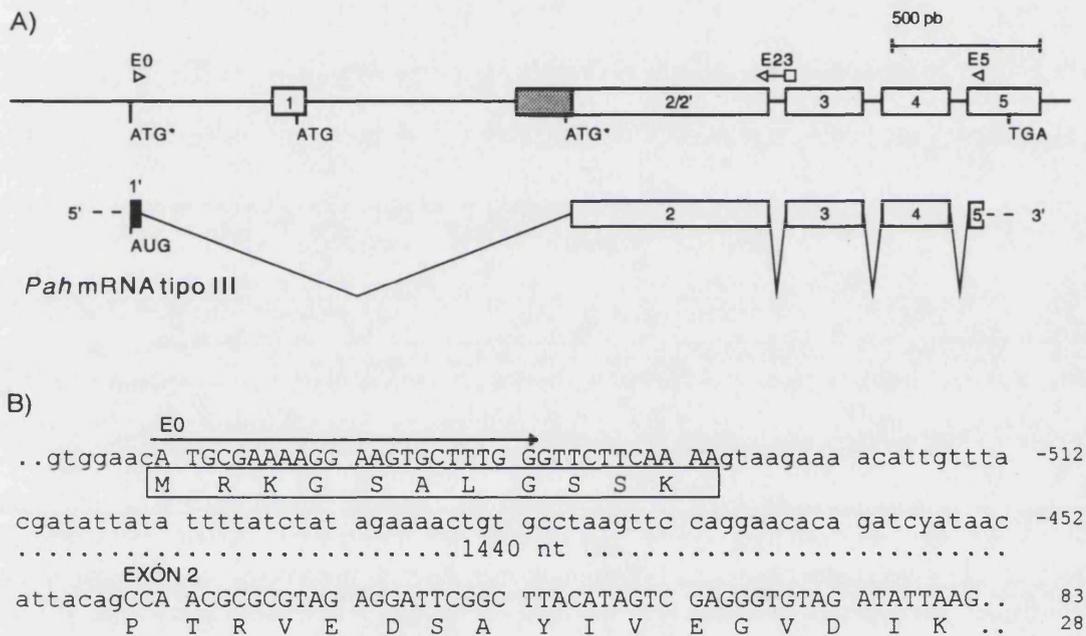


Figura 27. Estructura propuesta para el transcrito tipo III del gen de la fenilalanina hidroxilasa de *Drosophila melanogaster*. A) Representación esquemática de la estructura del mRNA tipo III. Se presenta la organización del gen de acuerdo con la figura 25. La caja negra indica la nueva secuencia exónica. B) Secuencia nucleotídica parcial deducida a partir del producto de amplificación del RNA de cabezas de adultos utilizando el oligonucleótido E0 en combinación con E23 y E5. Las mayúsculas indican la secuencia presente en el transcrito y las minúsculas representan las secuencias eliminadas durante el procesado (numeración según figura 20). Se indica el posible codón de inicio y la secuencia proteica deducida (encuadrada).

3. IDENTIFICACIÓN DEL LOCUS *HENNA* CON EL GEN ESTRUCTURAL DE LA FENILALANINA HIDROXILASA EN *DROSOPHILA MELANOGASTER*.

Como se ha expuesto en la introducción, el locus *Henna* ha sido relacionado con la síntesis de drosopterinas en *Drosophila melanogaster*. Sin embargo, distintas evidencias han sugerido la identidad de dicho locus con el gen estructural de la PAH. El objetivo planteado en este trabajo consiste en la demostración de esta hipótesis a través de la caracterización molecular de las mutaciones responsables del fenotipo *Henna*.

3.1. ANÁLISIS DE HIBRIDACIÓN DEL GEN DE LA FENILALANINA HIDROXILASA EN EL MUTANTE *HENNA-RECESSIVE*³.

En una primera aproximación a la identificación del locus *Henna* como el gen estructural de la PAH en *Drosophila melanogaster* se realizó su análisis de restricción en diversas cepas mutantes (*Hn*^{r28bp}, *Hn*^{r20vp}, *Hn*^{r63bo}, *Hn*^r, *Hn*^{r79i} y *Hn*^{r3}). Para ello se procedió a la hibridación mediante *Southern blot* del DNA genómico de dichas cepas digerido con diversos enzimas de restricción escogidos en base al mapa obtenido al analizar la secuencia del gen. En este análisis se utilizaron las sondas derivadas del clon de cDNA pDcPAH.

En la figura 28 se muestran los resultados de los experimentos de hibridación más significativos. Los fragmentos observados al analizar el DNA de la cepa salvaje *Or-R* coincidieron con el mapa deducido a partir de la secuencia del clon genómico (Fig. 29) indicando que el gen de la PAH está presente en una sola copia por genoma haploide de *Drosophila*. Tan sólo se observó la existencia de dos sitios polimórficos, previamente descritos al analizar la secuencia del clon genómico. Así, el sitio *Sal* I localizado en el exón 2 de los clones de cDNA (Morales *et al.*, 1990; Neckameyer y White, 1992) no apareció en la cepa salvaje. Además la población analizada presentó dos haplotipos que diferían en la presencia/ausencia de un sitio *EcoR* I localizado en el exón 5 del gen. Este hecho se puso de manifiesto al analizar la digestión doble *EcoR* I/*Bfr* I, donde se observaron las bandas de 0'7 kb y 0'5 kb correspondientes a cada uno de estos haplotipos respectivamente.

De las cepas analizadas sólo *Hn*^{r3} presentó cambios detectables en el patrón de restricción del gen respecto a la cepa salvaje *Or-R* por lo que el estudio se centró en este mutante. Los resultados obtenidos indicaron la existencia de fragmentos que no podían ser explicados por polimorfismos en sitios de restricción. Así, el fragmento *EcoR* I de 0'3 kb (carreras 1, 3) de la cepa salvaje resultó reemplazado por un fragmento de 1'5 kb (carreras 2, 4) en el mutante *Hn*^{r3}. El fragmento *Bfr* I de 3'5 kb (carrera 5), que contiene en su totalidad la región codificante del gen, no apareció al analizar el DNA procedente de *Hn*^{r3}, siendo sustituido por dos fragmentos de 4 y 2 kb, respectivamente (carrera 6). El fragmento *Pvu* II de 0'5 kb (carrera 9) de la cepa salvaje no apareció en *Hn*^{r3}, siendo reemplazado por dos fragmentos de 7'4 kb y 0'3 kb, respectivamente (carrera 10). El resto de las endonucleasas utilizadas también produjeron patrones alterados (carreras 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16 y otros no mostrados). Dado que el análisis de hibridación no excluía la posibilidad de que las alteraciones observadas en el patrón de restricción fueran debidas a la existencia de aberraciones cromosómicas, se realizó el examen citológico de los cromosomas politénicos en la cepa *Hn*^{r3}. Éste reveló la ausencia de alteraciones estructurales en la región del cromosoma 3 donde se localiza el gen de la PAH (datos no ilustrados). Este punto fue confirmado mediante el análisis de los cromosomas de los descendientes del cruce entre el mutante y la cepa salvaje *Or-R*. Por tanto, estos resultados indicaron que el gen de la PAH presenta una importante reordenación en la cepa mutante *Hn*^{r3}.

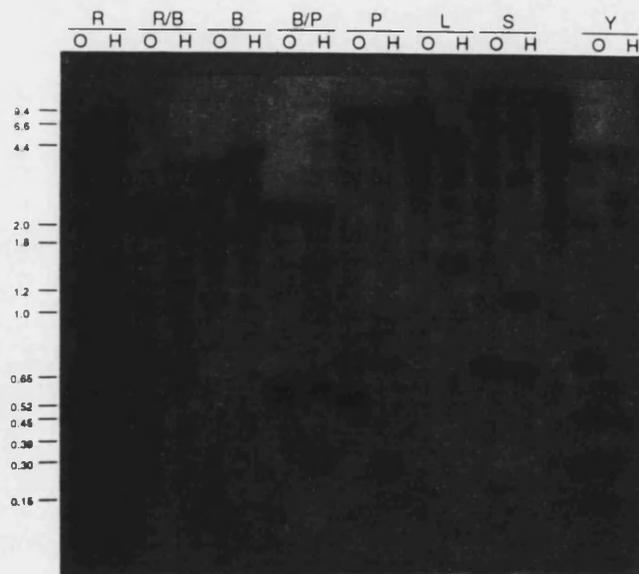


Figura 28. Análisis de hibridación del gen de la fenilalanina hidroxilasa en la cepa *Hn³*. Los DNAs genómicos (10 µg) procedente de la cepa salvaje *Or-R* (O) y *Hn³* (H) fueron digeridos con diferentes endonucleasas. Después de su separación electroforética en agarosa al 0'8% y transferencia a filtro, se procedió a la hibridación en condiciones de máxima estringencia usando la sonda *DcPah* derivada del clon pDcPAH marcada con digoxigenina. La detección se llevó a cabo por el método de quimioluminiscencia. Abreviaturas utilizadas para los enzimas de restricción: A, *Ava* I; B, *Bfr* I; R, *EcoR* I; G, *Bgl* II; P, *Pvu* II; L, *Sal* I; S, *Sca* I; Y, *Sty* I.

Además de esta reordenación, el patrón de restricción del gen de la PAH en *Hn^{r3}* presentó una segunda alteración que afectaba a su longitud. Los fragmentos *Sca* I de 0'7 kb y *Sty* I de 0'45 kb producidos en la cepa *Or-R* (carreras 13, 16) se mostraron reducidos en aproximadamente 20 pb cuando el DNA de *Hn^{r3}* fue analizado (carreras 14, 17). La misma reducción de tamaño se observó en otras digestiones.

En base a estos resultados, junto con datos procedentes de otros filtros no ilustrados, se construyó el mapa de restricción del gen de la PAH en la cepa *Hn^{r3}* (Fig. 29). Su comparación con el correspondiente a la cepa salvaje indicó la presencia de una inserción de DNA extraño (al menos 7'2 kb) entre los sitios *Ava* I del exón 3 y *EcoR* I del intrón 3. Asimismo se pudo deducir la existencia de una pequeña delección (unos 20 pb) localizada entre los sitios *Sca* I del intrón 1 y *Sty* I del exón 2.

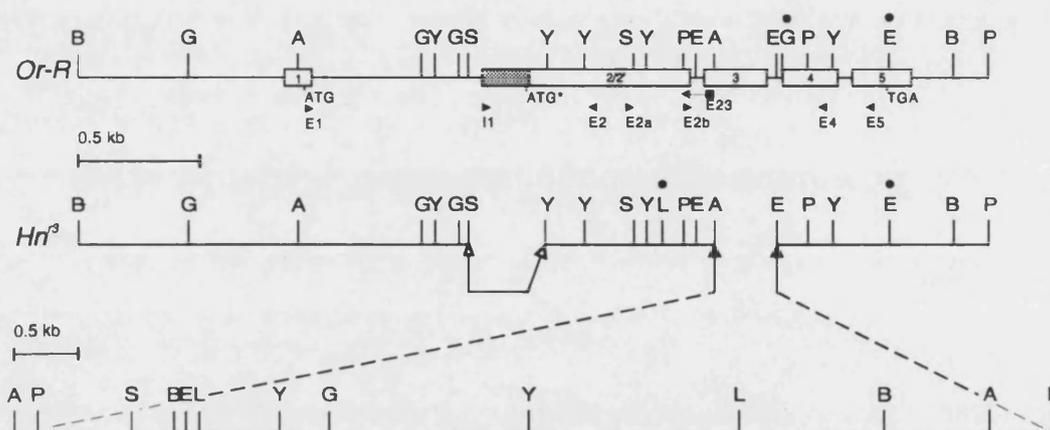


Figura 29. Mapa de restricción del gen de la fenilalanina hidroxilasa en la cepa *Hn^{r3}* comparado con el correspondiente a la cepa salvaje *Or-R*. La estructura genómica se representa de acuerdo con la figura 25: exones, cajas vacías; intrones, líneas continuas; secuencia del intrón 1 presente en el transcrito salvaje tipo II, caja gris; inicio de traducción, ATG; codón de parada, TGA; inicio de traducción del transcrito tipo II, ATG*. La inserción y la delección observadas en *Hn^{r3}* se localizan mediante flechas verticales llenas y vacías, respectivamente. Dadas las limitaciones del análisis de hibridación no se descarta la existencia de fragmentos de restricción internos en la inserción detectada. Los cebadores utilizados en las distintas experiencias de PCR se representan por cabezas de flecha. Las abreviaturas de los sitios de restricción son: A, *Ava* I; B, *Bfr* I; E, *EcoR* I; G, *Bgl* II; P, *Pvu* II; L, *Sal* I; S, *Sca* I; Y, *Sty* I. Los círculos señalan los sitios polimórficos detectados.

Con la finalidad de caracterizar estas alteraciones se realizaron diversas experiencias de amplificación mediante PCR sobre DNA genómico utilizando cebadores que las flanqueaban (mostrados en Fig. 29). La especificidad de los productos obtenidos se comprobó mediante hibridación por *Southern blot* usando la sonda *DcPah*. Cuando se utilizaron los cebadores I1 y E2, cuya secuencia diana comprende la zona en la que se localiza la delección detectada, el DNA genómico de la cepa *Or-R* produjo un único fragmento de la longitud esperada (464 pb). Al analizar el DNA procedente de *Hn^{r3}* se obtuvo un fragmento de menor tamaño (unos 440 pb) que hibridó de forma específica con la sonda *DcPah*. La secuenciación

de dichos fragmentos puso de manifiesto que la diferencia de tamaño era debida a la presencia de una deleción de 24 pb en el extremo 3' del intrón 1 del gen en la cepa *Hn³* respecto a la cepa salvaje (Fig. 30). El análisis de las secuencias flanqueantes a dicha deleción indicó que su origen podría deberse a un fenómeno de corrimiento (*slippage*) de la DNA polimerasa (Levison y Gutman, 1987). En la región del gen secuenciada se encontraron algunos polimorfismos silenciosos respecto a la secuencia del clon genómico.



Figura 30. Secuencia nucleotídica parcial del intrón 1 del gen de la fenilalanina hidroxilasa en la cepa *Hn³*. Se presenta la secuencia delecionada respecto a la cepa salvaje.

Para intentar amplificar la región del gen que incluía la inserción detectada se utilizaron los cebadores directos E2a y E2b, localizados en el exón 2, en combinación con los cebadores reversos E4 y E5, localizados en el exón 4 y 5, respectivamente (mostrados en Fig. 29). Dada la gran longitud de la secuencia diana (más de 7 kb), las condiciones de PCR se adecuaron a la amplificación de fragmentos grandes (ver apartado 3.8.2 de Material y Métodos). Mientras que la amplificación sobre el DNA genómico procedente de la cepa *Or-R* produjo los fragmentos esperados con todas las combinaciones de cebadores empleadas, no se detectó ningún producto al utilizar el DNA de *Hn³* como molde. Así, este resultado pudo interpretarse como una evidencia adicional de la presencia de una inserción de DNA extraño, cuya elevada longitud impedía la amplificación.

Como conclusión del análisis realizado se pudo afirmar que en *Hn³* el gen de la PAH presenta dos mutaciones detectables: una pequeña deleción en la secuencia del intrón 1 y una inserción sin identificar, de al menos 7'2 kb, situada en la región limitada por el exón 3 y el intrón 3. Las características fenotípicas de este mutante, en el que no se detecta proteína PAH siendo la actividad enzimática tan sólo del 10% respecto a la cepa salvaje (Silva *et al.*, 1992), sugerían que estas mutaciones pudieran ocasionar la disfunción del gen.

3.2. ESTUDIO DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN DE LA FENILALANINA HIDROXILASA EN LA CEPA MUTANTE *HENNA-RECESSIVE³*.

Para determinar el efecto de las mutaciones detectadas sobre la funcionalidad del gen de la PAH, se procedió a realizar el correspondiente análisis de transcripción. Para ello se utilizaron dos técnicas complementarias de detección de mensajeros: hibridación en filtro de RNA poli(A)⁺ mediante *Northern blot* y amplificación de RNA mediante RT-PCR. El estudio se realizó sobre el RNA extraído de cabezas de adultos ya que los datos publicados indican que en éstas se produce una acumulación de mensajeros de la PAH (Neckameyer y White, 1992). La elevada expresión del gen en cabezas de adultos se ve confirmada por los estudios de inmunodetección de la proteína realizados por Silva y colaboradores (1992). En cuanto al estadio de los

individuos analizados fue de 0 a 12 horas después de la emergencia del adulto ya que es en este periodo donde se ha detectado una mayor actividad enzimática (Bel *et al.* 1992a).

El análisis de hibridación mediante *Northern blot* se realizó sobre RNA poli(A)⁺ utilizando la sonda *DcPah* correspondiente al cDNA de la PAH. De acuerdo con los datos publicados (Morales *et al.*, 1990), en la cepa salvaje *Or-R* se detectó un único transcrito de aproximadamente 1500 nt (no ilustrado). La presencia de una sola banda sugería que los diferentes transcritos descritos en este trabajo presentaban un tamaño similar como se deducía de la estructura propuesta a partir de los análisis de RT-PCR. Sin embargo, este punto requerirá su confirmación a través de la determinación exacta de los sitios de inicio de transcripción. Al analizar el RNA poli(A)⁺ procedente del mutante *Hn³*, no se obtuvo señal alguna, aportando una primera evidencia acerca del efecto que las mutaciones descritas producía sobre la expresión del gen. Sin embargo, dado que el análisis de restricción de la cepa *Hn³* indicaba que el promotor del gen permanecía intacto, no se descartó la posible presencia de transcritos en niveles inferiores a los de detección mediante *Northern blot*, procediéndose a reexaminar la expresión del gen mediante la técnica conocida como RT-PCR, un método muy sensible para la detección de RNAs de poca abundancia.

El análisis de RT-PCR se realizó sobre el cDNA obtenido mediante retrotranscripción del RNA total utilizando una mezcla de hexanucleótidos como cebadores de la transcriptasa reversa. La amplificación se realizó utilizando las combinaciones de oligonucleótidos E2b-E4 y E2a-E5, que flanqueaban la inserción detectada (mostrados en Fig. 29). La especificidad de los productos obtenidos fue confirmada mediante hibridación por *Southern blot* con la sonda *DcPah*. Como cabría esperar de la amplificación iniciada en los transcritos de la PAH, en la cepa salvaje se produjo un único fragmento de 472 nt al utilizar los cebadores E2b-E4 (Fig. 31, carrera 1). El producto minoritario de 585 nt se correspondía con la amplificación del DNA genómico contaminante presente en la muestra, como así demostraron los controles realizados sin transcriptasa reversa. Al analizar el RNA procedente de la cepa *Hn³* (carrera 2), la amplificación con estos mismos cebadores resultó en un fragmento de unos 430 nt, que tan sólo fue detectado tras su hibridación con la sonda de cDNA. La reamplificación de la muestra produjo dos fragmentos adicionales, de unos 510 nt y 500 nt respectivamente (carrera 3). Los análisis posteriores evidenciaron que la banda de 500 nt consistía en una molécula heterodúplex formada por hibridación entre los otros dos fragmentos. Al utilizar la combinación de oligonucleótidos E2a-E5, se obtuvieron resultados similares. Mientras que en la cepa salvaje se obtuvo una única banda del tamaño esperado (carrera 5), la amplificación sobre el RNA de *Hn³* produjo un fragmento de tamaño inferior, unos 800 nt, sólo detectable tras hibridación (carrera 6). Su reamplificación resultó en dos fragmentos adicionales, de unos 870 y 880 nt, siendo el primero una molécula heterodúplex (carrera 7). Al utilizar los cebadores E2b y E4 en la reacción de reamplificación (carrera 4) se reprodujeron los resultados obtenidos anteriormente, pudiéndose relacionar los fragmentos de 430 y 500 nt, con los de 800 y 880 nt, respectivamente.

La determinación de la secuencia nucleotídica de estos productos confirmó que provenían de la amplificación de dos transcritos distintos del gen de la PAH, aunque ambos se diferenciaban sustancialmente de los mensajeros producidos en la cepa salvaje (Fig. 32). El transcrito correspondiente a los productos mayoritarios (430 y 800 nt), denominado *Hn³ Pah* mRNA tipo 1, presentó una inserción no identificada de 41 nt en el exón 3 del gen. Además se observaba la delección de los últimos 76 nt de dicho exón. El correspondiente a los fragmentos de 510 y 880 nt, denominado *Hn³ Pah* mRNA tipo 2, presentaba en la misma posición una inserción de 42 nt, 41 coincidentes con los observados en el mRNA tipo 1 más un nucleótido

adicional. El resto de la región secuenciada resultó idéntica, salvo por la presencia de algunas sustituciones silenciosas, al transcrito salvaje pudiéndose comprobar que la eliminación de los intrones 2 y 4 se había realizado de acuerdo con el patrón normal. La localización de la secuencia insertada en el exón 3 sugería su relación con la inserción detectada al analizar la estructura del gen.

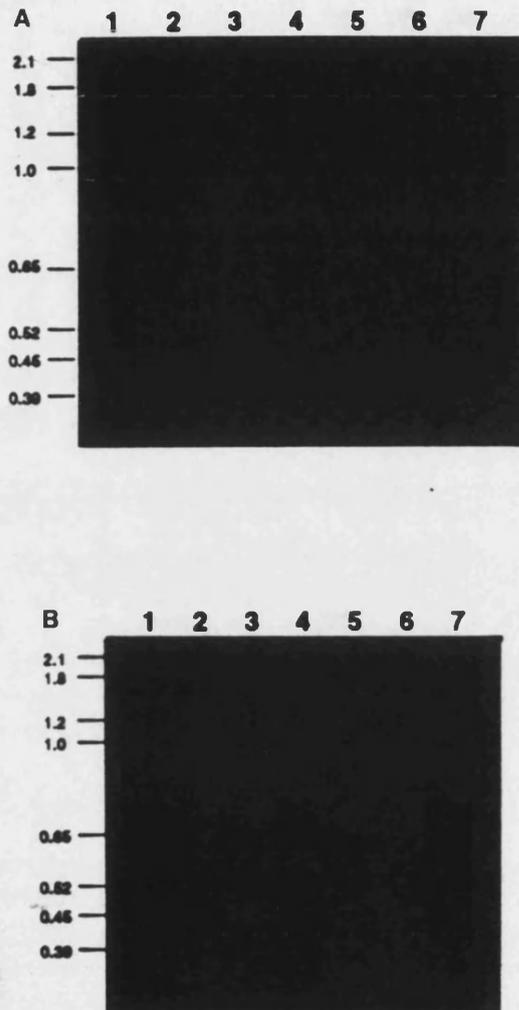


Figura 31. Análisis de los transcritos del gen de la fenilalanina hidroxilasa mediante RT-PCR. A) Separación electroforética de los productos de RT-PCR (agarosa al 1'5%). B) Hibridación con la sonda *DcPah*. El cDNA fue obtenido mediante retrotranscripción cebada con oligo(dT) a partir del RNA total de cabezas de adultos de *Or-R* (carreras 1 y 5) y *Hn^{r3}* (carreras 2 y 6). Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de amplificación fueron E2b y E4 (carreras 1 y 2) o E2a y E5 (carreras 5 y 6). Los productos obtenidos a partir del RNA de *Hn^{r3}* fueron sometidos a reamplificación: carrera 3, producto de reamplificación de carrera 2; carrera 7, producto de reamplificación de la carrera 6; carrera 4, producto de la carrera 6 reamplificado con los cebadores internos E2b y E4.

```

                exon 3
Or-R mRNA      .GATCCAGC-----
Hnr3 mRNA 1    .GATCCAGCTGTAAAGTCCCAAATGA
Hnr3 mRNA 2    .GATCCAGCTGTAAAGTCCCAAATGA

-----TTTGGCCAATT
GAAGACTTTACTCGTTGAGTTTTT-----
GAAGACTTTACTCGTTGAGTTTTTC-----TTTGGCCAATT

CAGTCAGGAGATCGGGCTAGCTTCCCTGGGAGCACCC
-----
CAGTCAGGAGATCGGGCTAGCTTCCCTGGGAGCACCC

                /exon 4
GATGATTACATTGAGAAATTGTCCACC/ATTCTCTG.
-----ATTTTCTG.
GATGATTACATTGAGAAACTGTCCACC/ATTTTCTG.
    
```

Figura 32. Secuencia nucleotídica parcial de los transcritos del gen de la fenilalanina hidroxilasa detectados en *Hn^{r3}* comparada con la correspondiente a los mensajeros de la cepa salvaje (región entre posiciones 880 a 980 según Fig. 20). La inserción detectada aparece subrayada. La secuencia del exón 3 delecionada en el mRNA tipo 1 aparece punteada.

El efecto de la deleción detectada en el intrón 1 se analizó utilizando los oligonucleótidos E1, en el exón 1, y E23, en la unión entre los exones 2 y 3 (mostrados en Fig. 29). Tanto la amplificación del RNA de *Or-R* como de *Hn^{r3}* produjo un único fragmento del tamaño esperado (732 nt) (datos no ilustrados). Sin embargo, el rendimiento a partir del RNA de *Hn^{r3}* resultó inferior, sólo detectándose el producto correspondiente tras hibridación. La secuenciación de estos fragmentos confirmó que ambos eran idénticos, procediendo de la amplificación de transcritos de la PAH donde el intrón 1 se había eliminado según el patrón del transcrito normal tipo I. Por tanto estos resultados pusieron de manifiesto que la deleción observada no afecta al procesado de dicho intrón. De forma similar se procedió a la amplificación del RNA utilizando los cebadores I1, específico del mRNA normal tipo II, y E23 (mostrados en Fig. 29). Esta combinación produjo en la cepa mutante una banda débil, sólo detectable tras hibridación, y de tamaño ligeramente inferior a la producida en la cepa salvaje *Or-R*. Su secuenciación confirmó que se trataba del producto de la amplificación del mRNA tipo II en *Hn^{r3}*, resultando idéntico al producido en *Or-R* salvo por la ausencia de los 24 nt correspondientes a la deleción.

Este estudio está siendo actualmente ampliado con el objeto de determinar la estructura completa de los transcritos producidos en *Hn^{r3}*. Cabe esperar que en esta cepa se produzcan al menos cuatro transcritos de la PAH, i.e. mRNA tipo I (1-2) y mRNA tipo II (1-2). Para confirmar esta propuesta se está procediendo a su amplificación utilizando los cebadores directos I1 y E1 en combinación con el cebador reverso E5 (mostrados en Fig. 29). Los resultados hasta ahora obtenidos indican la presencia de los cuatros transcritos aunque, dada su baja abundancia, los fragmentos producidos sólo han podido ser detectados mediante hibridación quedando pendiente la determinación de su secuencia nucleotídica.

Para estudiar el posible efecto de las alteraciones observadas en los transcritos del gen de la PAH en *Hn^{r3}* se procedió al análisis de las correspondientes pautas de lectura. La inserción observada en el mRNA tipo 1, junto con la deleción parcial del exón 3, producía un cambio de pauta introduciendo un nuevo codón de parada (Fig. 33). Por tanto este transcrito codificaría para un producto proteico truncado que carecería de la mayor parte de la secuencia que configura el domino catalítico del enzima PAH sugiriendo que, en caso de traducirse, la proteína producida fuese inactiva. La inserción presentada en el mRNA tipo 2, aunque no alteraba la pauta de lectura normal, introducía la inserción de 14 aminoácidos entre las posiciones 297 y 298 de la proteína. Por tanto esta inserción no afectaría a ninguna de las zonas del enzima descritas como esenciales para su actividad, no pudiéndose descartar su funciona-

lidad. Actualmente se están realizando estudios encaminados a determinar la capacidad catalítica del producto proteico codificado por este transcrito bajo la hipótesis de que pudiera estar relacionada con la actividad PAH residual (10% respecto a la cepa salvaje) observada en *Hn^{r3}*. La delección observada en el exón 2' del mRNA tipo II no afectaría a la región codificante aunque no se puede descartar un posible efecto sobre su traducción.

```

                exon 3
Or-R mRNA      .PSKPMYTPEPDVCHELMGHVPLFA
Hnr3 mRNA 1    .PSKPMYTPEPDVCHELMGHVPLFA
Hnr3 mRNA 2    .PSKPMYTPEPDVCHELMGHVPLFA

DPA-----FAQFSQEIGLASLGAPDDY.
DPAVKSQMRRLYSLSFYFLVHC*
DPAVKSQMRRLYSLSFSFAQFSQEIGLASLGAPDDY.
    
```

Figura 33. Secuencia proteica codificada por los transcritos detectados en *Hn^{r3}* comparada con la correspondiente al transcrito normal (posiciones 270 a 316 según Fig. 20). Se indica la inserción (encuadrada) así como el cambio de pauta en el mRNA tipo 1 (subrayada).

3.3. IDENTIFICACIÓN DE LA INSERCIÓN PRESENTE EN EL GEN DE LA FENILALANINA HIDROXILASA EN LA CEPA *HENNA-RECESSIVE²*.

La localización de la inserción observada en los transcritos del gen de la PAH producidos en *Hn^{r3}* sugería su relación con la inserción detectada al analizar la estructura del gen en esta cepa. Para determinar la identidad de dicha inserción se realizó una búsqueda de secuencias homólogas a las presentes en los transcritos en las bases de datos GenBank/EMBL. El resultado indicó que los 41 nt comunes a ambos mensajeros presentaban una identidad casi perfecta con la repetición terminal distal (3'LTR) del elemento transponible de *Drosophila melanogaster* B104 (Scherer *et al.*, 1982), también conocido como elemento *roo* (Meyerowitz y Hogness, 1982) (Fig. 34) lo que aportó una primera indicación de su naturaleza. La comparación del mapa de restricción del gen de la PAH obtenido en *Hn^{r3}* con el mapa propuesto para B104 (Scherer *et al.*, 1982) apoyó la identidad de la inserción como este tipo de retroelemento (Fig. 35). Dado que la longitud del elemento completo es de aproximadamente 9 kb, la comparación de los mapas sugería que el elemento presentaba una delección interna de unas 2 kb. Sin embargo, puesto que el análisis de hibridación realizado no excluía la existencia de fragmentos de restricción internos, la presencia del elemento completo no podía ser descartada. De acuerdo con la polaridad de transcripción propuesta para B104 (Scherer *et al.*, 1982), el elemento se sitúa en orientación opuesta a la correspondiente al gen.

```

                3' 5'
                ←
B104 3'LTR  TGAAAAATCCCAAATAAGAAGACTTTACTCGTTGAGTTTTTG
Hnr3 mRNA 1  TGAAAGTCCCAAATGAGAAGACTTTACTCGTTGAGTTTTT.
Hnr3 mRNA 2  TGAAAGTCCCAAATGAGAAGACTTTACTCGTTGAGTTTTTC
                →
                5' 3'
    
```

Figura 34. Alineamiento de la secuencia nucleotídica de la 3'LTR del elemento B104 en orientación transcripcional reversa (últimas 42 pb) con las inserciones detectadas en los transcritos del gen de la fenilalanina hidroxilasa en la cepa *Hn^{r3}*.

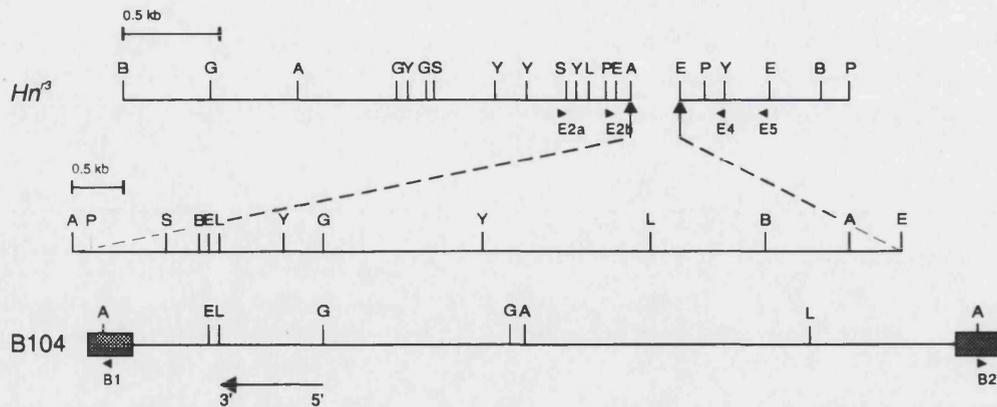


Figura. 35. Comparación del mapa de restricción del gen de la fenilalanina hidroxilasa en *Hn*^{r3} con el correspondiente al elemento B104 (Scherer *et al.*, 1982). Las abreviaturas de los sitios de restricción son: A, *Ava* I; B, *Bfr* I; E, *Eco*RI; G, *Bgl* II; P, *Pvu* II; L, *Sal* I; S, *Sca* I; Y, *Sty* I.

La caracterización precisa del punto de inserción se realizó mediante la amplificación por PCR del DNA genómico de la cepa *Hn*^{r3}. Para ello se utilizaron oligonucleótidos B1 y B2, diseñados a partir de la secuencia de las LTRs de B104 en combinación con cebadores específicos del gen (mostrados en la Fig. 35). Cabe señalar que las LTRs son la única parte del elemento de la que se ha publicado su secuencia nucleotídica (Scherer *et al.*, 1982). Cuando el oligonucleótido B1 se utilizó como cebador reverso en combinación con el cebador directo E2b, se obtuvo el fragmento esperado de 652 pb (datos no ilustrados). Lo mismo ocurrió con el cebador directo B2 que, en combinación con E4, produjo un fragmento de 636 pb. Ninguno de ellos aparecía cuando el DNA de *Or-R* era utilizado como molde. Al utilizar las combinaciones de cebadores E2a-B1 y B2-E5 se obtuvieron resultados similares. La determinación de la secuencia nucleotídica de estos productos permitió establecer el punto exacto de inserción en el exón 3 del gen (Fig. 36). Como cabría esperar de un fenómeno de retrotransposición, se observó la duplicación de 4 pb de la secuencia diana a ambos lados del elemento. Este resultado contrastaba con los precedentes publicados donde se describe una duplicación de 5 pb (Scherer *et al.*, 1982; O'Hare *et al.*, 1991).

La identificación de la inserción presente en el exón 3 del gen de la PAH permitió establecer que el origen de las alteraciones observadas en los transcritos detectados en la cepa *Hn*^{r3} reside en un procesado aberrante del transcrito primario provocado por la presencia del retroelemento (Fig. 37). La secuencia del transcrito tipo 1 indicaba la utilización durante el procesado del sitio aceptor 3' del intrón 3 del gen (A1), en combinación con un sitio dador 5' (D2), presente en la secuencia de la LTR izquierda de B104. El uso de este sitio críptico, que se encuentra en la cadena no transcrita del elemento, ha sido anteriormente descrito (Pret y Searles, 1991). Su secuencia exhibe una alta similitud con la secuencia consenso del sitio 5' de *splicing* de los genes de *Drosophila* (Mount *et al.*, 1992) (Fig. 36). El patrón de procesado exhibido por el transcrito tipo 2 implicaba la utilización de ese mismo sitio dador (D2) junto a un nuevo sitio aceptor (A2), cuya secuencia, idéntica a la consenso del sitio 3' de *splicing*, proviene de la duplicación distal originada por el proceso de transposición (Fig. 36). Por tanto no se puede considerar como un sitio críptico preexistente en la secuencia del gen o del elemento, siendo la primera vez que se describe este patrón de procesado. Su utilización

sugería la existencia de las señales requeridas para el reconocimiento del sitio aceptor en la 3'LTR del elemento pudiéndose identificar un posible punto de ramificación TTA \underline{AAA} situado a 219 nt en dirección 5'. El procesamiento de los intrones restantes se produce según el patrón de los transcritos normales.

```

                exon3/B104                                D2
...GCAGATCCAGC/tgtaaagtcccaaagtgagaagactttactcggtgagttttgtaa

                B104/ A2
ga.....B104(aprox.7 kb).....aaaaatattcgtgttcattgtgtgaaca/CAGCTTTT

GCCCAATTCAGTCAGGAGATCGGGCTAGCTTCCCTGGGAGCACCCGATGATTACATTGAG
                exon 3/D1
AAACTGTCCACC/gtaagtggctctttgctctagactaacaagataactctgtgatgcgtgaa
                intron 3/exon4
ttctttccag/ATTTTCTGGTTCACTGT...
                A1
    
```

Figura 36. Secuencia nucleotídica parcial del gen de la fenilalanina hidroxilasa de la cepa *Hn^{r3}*. Las mayúsculas y minúsculas indican secuencias exónicas e intrónicas, respectivamente, según el patrón de procesamiento de los transcritos del tipo salvaje. Se muestra la secuencia del elemento B104 detectado en el exón 3 del gen (subrayado). La duplicación observada en el punto de inserción aparece doblemente subrayada. Ds y As indican los sitios dadores y aceptores de *splicing*, respectivamente. Salvo por la presencia de la inserción, el resto de la secuencia genómica en *Hn^{r3}* coincidió con la del gen en la cepa salvaje. Tan sólo se observaron algunas sustituciones silenciosas y una delección de 3 pb en el intrón 3. Nota: la región del gen de la PAH secuenciada en *Hn^{r3}* ha sido remitida a la base de datos EMBL (número de acceso pendiente).

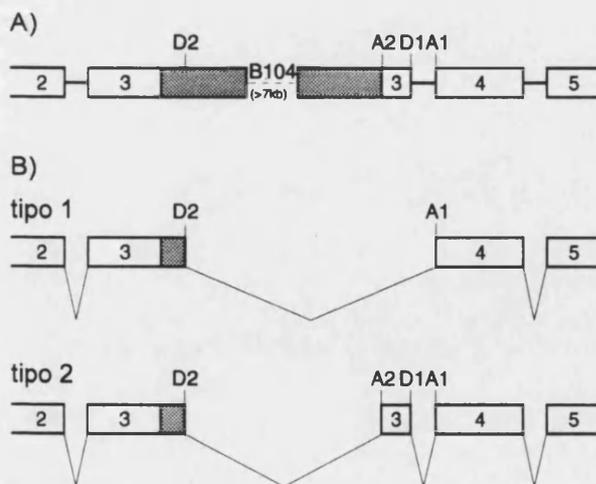


Figura 37. Representación esquemática del patrón de eliminación de intrones durante el procesamiento del transcrito primario del gen de la fenilalanina hidroxilasa en la cepa *Hn^{r3}*. A) Estructura del gen: exones, cajas blancas; intrones, líneas continuas; B104, cajas grises. Los sitios señalados con Ds y As representan sitios dadores 5' y aceptores 3', respectivamente. B) Estructura de los transcritos detectados. Las cajas grises representan las secuencias de B104 presentes en los transcritos maduros.

Por otra parte, como anteriormente se ha señalado, los niveles de mensajeros maduros detectados en *Hn³* son considerablemente inferiores a los producidos en la cepa salvaje. Esta disminución podría relacionarse con la inserción detectada ya que diversos estudios han demostrado que la presencia de elementos transponibles en la región codificante de los genes de *Drosophila* produce una disminución en la estabilidad de sus transcritos primarios y por lo tanto en los niveles de producción de mensajeros maduros (Fridell y Searles, 1994; Kim *et al.*, 1996).

Como conclusión del estudio realizado se puede afirmar que la inserción del elemento B104 presente en el exón 3 del gen de la PAH en la cepa *Hn³* altera su expresión génica provocando una disminución en los niveles de mensajeros maduros así como la producción de transcritos aberrantes que contienen parte de la secuencia del elemento interrumpiendo la región codificante. Este resultado evidencia que el defecto fenotípico en el enzima PAH observado en la cepa *Hn³* se debe a una mutación en el gen que lo codifica. Por tanto, este trabajo, demuestra la identidad del locus *Henna* como el gen estructural de la PAH en *Drosophila melanogaster*.

DISCUSIÓN

1. LA SEPIAPTERINA REDUCTASA DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*.

El estudio del enzima SR de *Drosophila melanogaster* presentado en este trabajo pone de manifiesto la existencia de considerables diferencias en las propiedades cinéticas de este enzima con su equivalente en otros organismos. Así, el valor obtenido para la constante aparente K_m , de 153 μM , contrasta con el publicado para la SR de mamíferos: 15'4 μM en eritrocitos de rata (Sueoka y Katoh, 1982), 21 μM en hígado de caballo (Katoh, 1971), 5 μM en médula adrenal de bovino (Smith *et al.*, 1990), y 20-25 μM en células de humanos (Ferré y Naylor, 1988; Smith *et al.*, 1992). Incluso en el insecto *Bombyx mori*, este valor (10 μM) resulta más próximo al de mamíferos (Iino *et al.*, 1992). Por tanto se puede afirmar que el enzima SR de *Drosophila melanogaster* presenta una menor afinidad por el sustrato sepiapterina. Los estudios realizados por Primus y Brown (1994) demuestran que esta menor afinidad se mantiene respecto a los sustratos tetrahidropterínicos del enzima (ver Tabla I).

Se ha descrito que la actividad SR de mamíferos es inhibida por diversas aminas biogénicas, proponiéndose un modelo competitivo en que estos inhibidores mimetizan la estructura del sustrato pteridínico uniéndose al sitio activo del enzima (Katoh *et al.*, 1982; Smith *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1992). En insectos, los estudios hasta ahora publicados son escasos. Recientemente se ha demostrado el efecto inhibitorio de la N-acetilserotonina sobre la SR de *Bombyx mori* (Iino *et al.*, 1992) y de *Drosophila* (Yoon *et al.*, 1993), aunque éste no ha sido caracterizado cinéticamente. En el presente trabajo se ha determinado que los neurotransmisores N-acetilserotonina, N-acetildopamina y el derivado sintético N-metoxiacetilserotonina actúan como inhibidores de la actividad SR de *Drosophila melanogaster*. A juzgar por las constantes K_i obtenidas, el grado de inhibición es considerablemente inferior al descrito para el enzima de mamíferos (Tabla V). Además, ésta exhibe un modelo cinético no competitivo, con un sitio de unión para el inhibidor distinto del sitio activo reconocido por el sustrato pteridínico. Sin embargo no se puede descartar un modelo mixto con dos sitios de unión, uno competitivo y otro no competitivo, con constantes de inhibición similares, ya que éste es cinéticamente indistinguible del modelo no competitivo puro.

Tabla V. Constantes de inhibición de la sepiapterina reductasa en diversos organismos.

INHIBIDOR	Células humanas ¹	Bovino ²	<i>Drosophila</i>
	K _i (μM)		
N-acetilserotonina	0'65-0'5	0'12	127
N-acetildopamina	-	0'3	40
N-metoxiacetilserotonina	0'048-0'049	0'008	87

¹ Smith *et al.*, 1992. ² Smith *et al.*, 1990.

Como se ha indicado a lo largo de la introducción, las aminas biogénicas requieren para su síntesis la participación de la H₄Bip como cofactor de las hidroxilasas de los aminoácidos aromáticos. Por tanto su efecto sobre la actividad SR, enzima implicado en la biosíntesis de la H₄Bip, sugiere un papel regulador de la inhibición observada. Sin embargo, se ha propuesto que en mamíferos dicha inhibición carece de relevancia biológica ya que los niveles

de estos compuestos requeridos para producir una disminución *in vivo* de la síntesis del cofactor superan considerablemente los niveles fisiológicos (Smith *et al.*, 1992). En el caso de *Drosophila melanogaster* se ha observado que la suplementación en dieta con N-acetilserotonina provoca un aumento en los niveles de fenilalanina (Bel *et al.*, 1992b). Asimismo, durante el proceso de formación de cutícula en adultos, se ha descrito un descenso drástico en los niveles de catecolaminas cuando la N-acetildopamina alcanza su máxima concentración (Piedrafita *et al.*, 1994). Estos datos sugieren que la inhibición observada *in vitro* desempeña una función reguladora sobre la síntesis del cofactor.

Tanto en humanos (Park *et al.*, 1991) como, muy recientemente, en el insecto *Bombyx mori* (Iino *et al.*, 1996) se ha descrito la existencia de isoenzimas de la SR. Éstos tan sólo resultan parcialmente inhibidos por las aminas biogénicas. El estudio aquí presentado sugiere que esta situación sea compartida por *Drosophila*. Aunque las experiencias de cromatofoco indican la existencia de una sola fracción proteica con actividad enzimática SR, la baja recuperación obtenida apunta la presencia de otros isoenzimas menos estables. Este sugerencia se ve apoyada por la imposibilidad de obtener una inhibición total de la actividad en extractos crudos con los inhibidores analizados.

El objetivo último de este trabajo consistía en la identificación del gen estructural de la SR de *Drosophila melanogaster*. Dicha identificación se abordó por parte del grupo de investigación de Genética Bioquímica y Molecular del Departamento de Genética de la Universitat de València a través de tres estrategias diferentes:

1. La disponibilidad de anticuerpos que reconozcan específicamente la proteína cuyo gen se desea caracterizar permite su aislamiento a partir de una genoteca de expresión. Con esta perspectiva, la Dra. Manuela Castillo realizó, como Tesis de Licenciatura, un estudio encaminado a la purificación de la SR de *Drosophila melanogaster*. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la dificultad de dicho proyecto, no consiguiéndose el objetivo marcado. Otra posibilidad viene dada por la disponibilidad de anticuerpos anti-SR de otros organismos que presenten reacción cruzada. Se ha podido comprobar que un anticuerpo monoclonal anti-SR de *Bombyx mori* (cedido por el Dr. Iino de la Universidad de Nihon, Japón) no reacciona con los extractos proteicos de *Drosophila*. Sin embargo, el anticuerpo monoclonal SR9 anti-SR de ratón (cedido por la Dra. Ziegler del Instituto de Biología Molecular de Munich, Alemania) ha permitido la detección en *Drosophila* de una proteína de tamaño similar a la detectada en extractos de diversas líneas celulares de mamíferos. En este sentido, y en colaboración con el laboratorio de la Dra. Ziegler, se están continuando las investigaciones.

2. Un elevado grado de similitud del gen objeto de estudio entre diferentes especies permite su aislamiento, bien a través del uso de una sonda heteróloga, bien de oligonucleótidos diseñados de acuerdo a la secuencia de zonas altamente conservadas. Los estudios de hibridación realizados sobre DNA genómico de *Drosophila melanogaster* utilizando una sonda de cDNA del gen de la SR de rata (cedida por los Dres. Kaufman y Citron del N.I.M.H. de Bethesda, EE.UU.) demostraron que el gen de la SR de *Drosophila melanogaster* no exhibía suficiente identidad con su homólogo en rata, no consiguiéndose ninguna señal positiva aún aplicando condiciones de mínima estringencia (datos no presentados). La posterior publicación de las secuencias de la SR de diversos mamíferos pone de manifiesto la elevada divergencia sufrida por este gen. Así la identidad entre rata y humanos, pese a la proximidad evolutiva de ambas especies, es tan sólo de un 70%. Sin embargo se pudieron identificar zonas con mayor grado de similitud, correspondientes a los motivos de unión del sustrato pterínico y del cofactor NADPH. En base a esta similitud, la Dra. Mirielle Moulard realizó un proyecto de diseño de

oligonucleótidos destinados a la amplificación mediante PCR del cDNA de la SR de *Drosophila*. Hasta el momento no se ha obtenido ningún resultado concluyente.

3. La identificación de un locus génico a través de la caracterización de mutantes permite el aislamiento del gen correspondiente mediante técnicas como el denominado paseo cromosómico. Además esta aproximación resulta de gran interés para el análisis de la función y regulación de la actividad en estudio, proporcionando un mutante con un defecto génico en la misma. Así, con el objetivo de detectar mutantes del gen estructural de la SR de *Drosophila melanogaster*, y en base a la determinación de su actividad enzimática, se desarrolló el presente trabajo.

De entre los mutantes analizados, el locus *clot* presentó niveles disminuidos de actividad SR frente a la cepa salvaje (ver Tabla III). Además este mutante exhibía un patrón de pigmentos concordante con el esperado (Ferré *et al.*, 1986), por lo que se consideró un candidato probable del gen estructural de la SR. Sin embargo los resultados obtenidos en las pruebas de dosis génica realizadas no apoyaron esta hipótesis (ver Tabla IV). El que de entre los diversos mutantes de pterinas de *Drosophila melanogaster* descritos ninguno presente las propiedades fenotípicas esperadas para un mutante del gen de la SR pudiera estar relacionado con la posible existencia de isoenzimas que enmascaren dicho fenotipo, tal como se ha propuesto que ocurra en humanos (Park *et al.*, 1991). De hecho no se ha descrito la existencia de mutantes que afecten al gen estructural de la sepiapterina reductasa en ninguno de los organismos donde se ha estudiado. Tan sólo, muy recientemente, se ha propuesto que el mutante *lemon* del invertebrado *Bombyx mori*, presenta una deficiencia en el gen de la SR, aunque no existen datos moleculares que apoyen este hecho (Iino *et al.*, 1992).

2. ESTRUCTURA DEL GEN DE LA FENILALANINA HIDROXILASA EN *DROSOPHILA MELANOGASTER*: RELACIONES EVOLUTIVAS.

La comparación de la estructura del gen de la PAH de *Drosophila melanogaster*, descrita en este trabajo, con la correspondiente a los genes de las hidroxilasas de los aminoácidos aromáticos de mamíferos demuestra que la identidad observada en la secuencia proteica de estas enzimas se extiende a su organización genómica, evidenciando la organización en dominios funcionales y el origen evolutivo común propuesto para esta familia génica (Ledley *et al.*, 1985; Grenett *et al.*, 1987).

Pese al tamaño similar de los productos proteicos, en *Drosophila* la secuencia codificante del gen de la PAH está comprendida en una región de unas 2'6 kb para el pre-mRNA tipo I y tipo II, y 4 kb para el tipo III, con un total de 4 intrones mientras que, en el caso de humanos, comprende unas 90 kb interrumpidas por un total de 12 intrones (DiLella *et al.*, 1986). No obstante se observa una conservación perfecta de los sitios de unión intrón/exón en el dominio catalítico C-terminal, coincidiendo con un mayor grado de identidad de los exones correspondientes (Figs. 38 y 39; Tabla VI). Así el exón 5 del gen de *Drosophila* es equivalente a los exones 12 y 13 de humanos; los exones 3 y 4 están completamente conservados, aunque en humanos su secuencia está contenida en tres y dos exones, respectivamente; los últimos dos tercios del exón 2 presentan una elevada identidad con los exones 4, 5 y 6 de humanos. A partir de esta región, en el N-terminal, la identidad disminuye, haciendo difícil asignar una correspondencia. Sin embargo se observa la existencia de pequeñas regiones conservadas: en los exones 1 (mRNA tipo I) y 1' (mRNA tipo III) se pueden identificar residuos senna cuyo contexto permite asociarlos con la Ser¹⁶ de la PAH de humanos, implicada en la regulación del enzima como sitio de fosforilación.

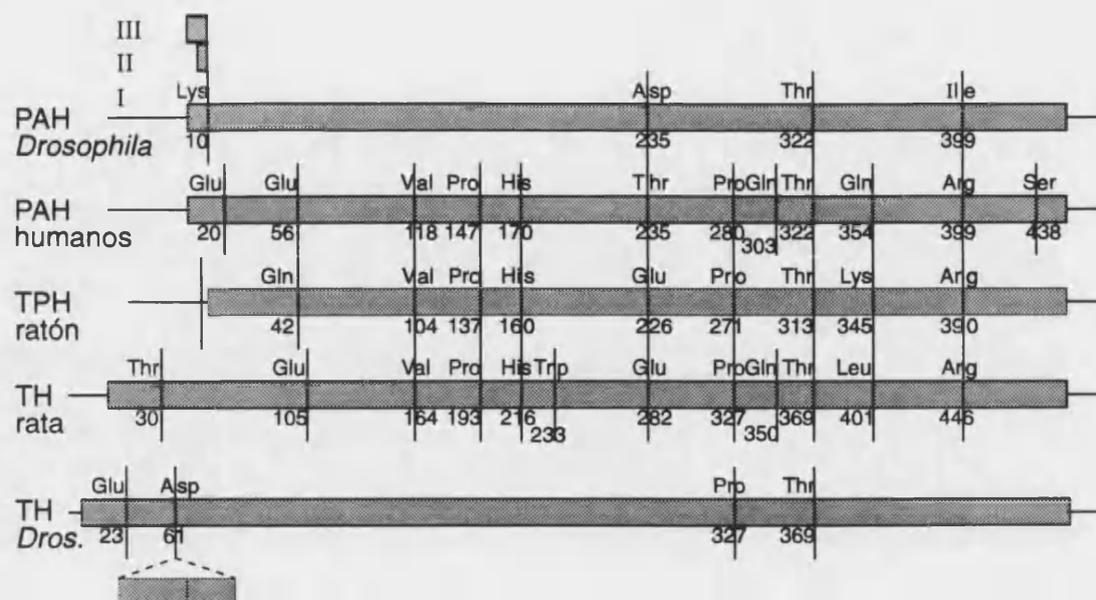


Figura 38. Conservación de las uniones intrón/exón entre el gen de la fenilalanina hidroxilasa de *Drosophila melanogaster* y los correspondientes a las hidroxilasas de los aminoácidos aromáticos de otros organismos. Se presenta el alineamiento de la secuencia proteica deducida a partir de los cDNAs de la fenilalanina hidroxilasa (PAH) de *Drosophila* con la PAH de humanos, la triptófano hidroxilasa (TPH) de ratón, la tirosina hidroxilasa (TH) de rata y la TH de *Drosophila*. En este último caso se indican los exones alternativos. Las barras verticales indican el sitio de inserción de los intrones sobre el aminoácido que resulta interrumpido.

Tabla VI. Comparación entre las secuencias aminoacídicas de la fenilalanina hidroxilasa de *Drosophila melanogaster* y de humanos.

<i>Drosophila</i>	Humanos	% identidad	% similitud
total	total	62	76
exón 1	exón 1	no significativo	no significativo
exón 2	exones 3-4-5-6	57	71
exón 3	exones 7-8-9	87	93
exón 4	exones 10-11	61	84
exón 5	exones 12-13	53	70

```

III      MRKGSALGSSK|
II       MNLLO
I        MYQRQVSFDK|PTRVEDSAYIVEGVDIKEARNTCLLFSPKDSSLSS
1  MSTAVLENPGLGRKLSDFGQETS|SYIEDNCNNGA..ISLIFSLKE...EV
46  GALANILAI|FKKHDINLVHIESRSS.LRVPGYEFFVEADGKS.GALGKAI
46  GALAKVLR|LFEENDVNLTHIESRPSRLKKDEYEFFTHLDRKRS|LPALTNI
94  EDVKEQCS.YFNII|SRDYKDNATAV|PWFPRRIRDLDRFANQILSYGSELD
96  KILRHDI|GATVHELSDRDKKD..TV|PWFPRRTIQELDRFANQILSYGAELD
143 ADHPGF|TDPEYRKR|RRKYFADI|AYNYKH|GEP|LPHVDY|TKEEI|ETWGI|IFRN
144 ADHPGF|KDPVYR|ARRKQFAD|IAYNYR|HGQPI|PRVEY|MEEEK|KTWGT|VFKT
193 LTKLYK|THACREY|NHVFP|LLVDN|CGFRE|DNIPO|LEDV|SNFLR|DCTG|FTLR
194 LKSLYK|THACREY|NHF|LLEK|YCGF|HEDNI|POLE|DVSQ|FLQT|CTGF|RLR
243 PVAGLL|SSRDFL|AGLAFR|VHSTOY|IRHPSK|PMTPE|PDVCH|ELMGH|VPL
244 PVAGLL|SSRDFL|GGLAFR|VHCTOY|IRHGSK|PMTPE|PDI|CHELL|GHVPL
293 FADPAF|AQSQF|SIEIGL|ASLGAP|DDYIE|KLSTI|FWFT|VEYGV|CROEG|ELKAY
294 FSDRSF|AQSQF|SIEIGL|ASLGAP|DEYIE|KLATI|YWFT|VEFGL|CKQGD|SIKAY
343 GAGLLS|SYGELE|YCLTD|KPOLK|DFEPE|VTGVT|KYPIT|QFOPL|YYVAD|SFE
344 GAGLLS|SFGELQ|YCLSE|KPKLL|PLELE|KTAIQ|NYTV|TEFQ|PLYV|VAESFN
393 TAKEK|TIK|FANSI|PRPF|GVRYN|AYTOS|VEVLD|SKPOI|SNLMD|NINSE|FOI
394 DAKEK|VRN|FAATI|PRPF|SVRYD|PYTOR|IEVLD|NTQOL|KILAD|SINS|EIGI
443 LQNAV|AKLRV*
444 LCSAL|QKIK*

```

Figura 39. Comparación de la secuencia aminoacídica de la fenilalanina hidroxilasa de *Drosophila melanogaster* (superior) con la del enzima de humanos (inferior). Se presenta la secuencia codificada por el transcrito tipo I y las diferencias en el extremo N-terminal de las correspondientes a los transcritos tipo II y III. Las líneas verticales interrumpiendo las secuencias proteicas muestran la posición de los intrones. La región sombreada representa el propuesto sitio de unión del cofactor pteridínico (Hufton *et al.*, 1995).

Como más adelante se discutirá, los resultados expuestos en el presente trabajo confirman la existencia en *Drosophila melanogaster* de un único locus génico que codifica tanto para la actividad PAH como TPH. Esta observación apoya la teoría de duplicación como origen evolutivo de la familia génica de las hidroxilasas de los aminoácidos aromáticos según la cual el gen ancestral común habría divergido, hace unos 750 Ma, para formar el gen de la TH y un gen codificante de las actividades PAH y TPH; la posterior duplicación de este último, datada en unos 600 Ma, habría producido la separación de estas dos funciones (Ledley *et al.*, 1985; Grenett *et al.*, 1987; Neckameyer y White, 1992). Los estudios filogenéticos realizados demuestran que el gen de la PAH de *Drosophila melanogaster* está evolutivamente más próximo a la PAH de otros organismos que a la TPH, apoyando la propuesta de que el gen ancestral sería más parecido en estructura y función a la actual PAH (Alcañiz y Silva, 1996). Cabe señalar que, en los procariontes donde se ha analizado, tan sólo se ha identificado un gen homólogo a las hidroxilasas con una mayor similitud con la PAH de eucariotas que con los otros dos miembros de la familia génica (Onishi *et al.*, 1991).

La comparación de la posición de las uniones intrón/exón de las hidroxilasas de los aminoácidos aromáticos plantea la polémica existente acerca del origen de los intrones nucleares de eucariotas. Como se puede observar, tan sólo la posición correspondiente al intrón 3 de la PAH de *Drosophila melanogaster* aparece conservada en todos los casos descritos (Fig. 38). El resto de los intrones del dominio C-terminal, aunque comunes a algunos de los genes, no aparecen en todos ellos. La teoría que supone que estas estructuras, actualmente exclusivas de eucariotas, estaban presentes antes de la divergencia entre procariotas y eucariotas ("intron early theory"; Doolittle, 1987) explicaría esta circunstancia aludiendo a la pérdida independiente de intrones posterior a la divergencia de estos genes. La denominada teoría de ganancia de intrones ("intron late theory") postula que los genes ancestrales carecían de intrones, siendo adquiridos por los genes eucariotas en diferentes momentos evolutivos (Cavalier-Smith, 1991). La conservación de posiciones se explicaría mediante la inserción independiente en sitios diana conservados (Stolzfus *et al.*, 1994).

Por otra parte la mayor divergencia, tanto a nivel de secuencia como de organización genómica, presentada en la región N-terminal de las hidroxilasa ha llevado a la propuesta de que en su evolución han participado diferentes mecanismos, tales como la adquisición de nuevos exones, posteriormente al proceso de divergencia (DiLella *et al.*, 1986; Birman *et al.*, 1994). El mayor tamaño de los intrones del dominio N-terminal, observado en todos los casos descritos, se ha relacionado con un vestigio de una posible reorganización genética (DiLella *et al.*, 1986).

Drosophila melanogaster es el primer organismo donde se describe la existencia de una expresión diferencial del gen de la PAH. Así en este trabajo se demuestra la producción de transcritos alternativos que codifican para diferentes isoformas proteicas. Tan sólo los genes de la TH de primates (Grima *et al.*, 1987; Kobayashi *et al.*, 1988; Ichikawa *et al.*, 1990) y de *Drosophila melanogaster* (Birman *et al.*, 1994) presentan una patrón similar que, como en el caso aquí presentado, implica la aparición de cambios en el dominio N-terminal del enzima. Como más adelante se discutirá, este hecho apoya el papel regulador propuesto para esta región sugiriendo que estos cambios confieren a las isoformas producidas diferentes propiedades enzimáticas. Asimismo, el hecho de que los patrones de expresión diferencial descritos se restringen a la zona N-terminal del gen se ha presentado como una evidencia del diverso origen evolutivo de esta región (Birman *et al.*, 1994).

3. FUNCIONES DEL LOCUS HENNA DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*.

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman la hipótesis anteriormente planteada acerca de la identidad del locus Henna como el gen estructural de la PAH en *Drosophila melanogaster* (Silva *et al.*, 1992).

En este estudio se demuestra que la cepa mutante *Hn³* presenta la inserción del elemento transponible B104 en la región codificante del gen de la PAH. Esta inserción ocasiona un efecto drástico en la expresión del gen, provocando la producción de transcritos aberrantes que contienen parte de la secuencia del retroelemento interrumpiendo su región codificante. Además los niveles de estos transcritos aparecen muy disminuidos respecto a los observados en la cepa salvaje. Por tanto, el análisis molecular del gen de la PAH realizado en la cepa *Hn³* permite relacionar de forma directa la ausencia de proteína PAH y la elevada disminución en la actividad observadas en este mutante respecto a la cepa salvaje (Silva *et al.*, 1992) con una mutación en este gen.

Cabría la posibilidad de que en esta cepa concurren dos mutaciones independientes, una en el gen de la PAH y otra en el locus *Henna*. Sin embargo ésta queda descartada ya que en otros alelos *Henna* analizados también se han descrito deficiencias en el enzima PAH (Bel, 1991; Silva *et al.*, 1992). A esta evidencia se une la localización cromosómica coincidente del gen de la PAH, identificado mediante hibridación *in situ* en la región 66A del cromosoma 3 (Neckameyer y White, 1992), y del locus *Henna*, localizado físicamente en la misma región (Lindsley y Zimm, 1992). Por tanto se puede concluir que, en *Drosophila melanogaster*, el enzima PAH es codificado por dicho locus génico.

Esta demostración constituye un importante avance en la determinación de las funciones del gen de la PAH de *Drosophila melanogaster*, permitiendo su estudio a través del análisis fenotípico de las cepas *Henna*. Como se ha expuesto en la introducción, las mutaciones en el locus *Henna* provocan un efecto pleiotrópico, afectando tanto al metabolismo de la fenilalanina (Bel y Ferré, 1989; Silva *et al.*, 1992; Piedrafita *et al.*, 1994) y del triptófano (Alcañiz y Silva, 1996) como a la biosíntesis de pterinas (Ferré *et al.*, 1986; Guillamón y Ferré, 1988; Guillamón *et al.*, 1989; Escriche y Silva, 1992).

Así, la primera función asignada al producto proteico codificado por el gen de la PAH, como responsable de la hidroxilación de la fenilalanina, queda evidenciada ante las deficiencias en la actividad PAH observadas en las cepas *Henna* (Bel, 1991; Silva *et al.*, 1992). Estas deficiencias tienen su reflejo fisiológico en la alteración del catabolismo de la fenilalanina, como demuestra la baja viabilidad de la cepa *Hn³* frente a la suplementación de la dieta con este aminoácido (Bel y Ferré, 1989). Además esta cepa también presenta alteraciones en el proceso de formación de cutícula, donde la PAH interviene como una fuente endógena de tirosina, mostrando niveles disminuidos de catecolaminas (Piedrafita *et al.*, 1994).

Asimismo se ha propuesto que, en *Drosophila melanogaster*, el gen de la PAH también codifique para la actividad TPH (Neckameyer y White, 1992) apoyando la teoría de la duplicación como origen de la familia génica de las hidroxilasas de los aminoácidos aromáticos. La presencia en la cepa mutante *Hn³* de niveles disminuidos de serotonina, neurotransmisor en cuya síntesis interviene el enzima TPH, proporciona una prueba adicional de esta doble función, relacionando un defecto en el gen de la PAH con una deficiencia en el metabolismo del triptófano (Alcañiz y Silva, 1996).

Finalmente, la demostración de que el gen de la PAH es codificado por el locus *Henna* establece una relación directa entre su defecto génico y la deficiencia en el patrón de pterinas exhibida por los mutantes *Henna* (Ferré *et al.*, 1986; Guillamón y Ferré, 1989; Escriche y Silva, 1992). Esta relación apoya la propuesta previamente planteada que asigna una tercera función para este enzima, participando en la biosíntesis de estos compuestos (Silva *et al.*, 1992).

Dado que el metabolismo de las pterinas está relacionado con el sistema de hidroxilación de los aminoácidos aromáticos a través del requerimiento del cofactor H₄Bip, cabría la posibilidad de que las alteraciones fenotípicas observadas se debieran a una regulación en su síntesis provocada por un aumento en la demanda de cofactor. Sin embargo, esta posibilidad queda descartada ya que los estudios realizados indican el bloqueo específico de la síntesis de dihidropterina (H₂Ptr), bloqueo que produce, como efecto indirecto, la acumulación de las pterinas sintetizadas a partir de otras ramificaciones (Ferré *et al.*, 1986).

En base a todos estos datos se plantea una nueva ruta de biosíntesis de pterinas en *Drosophila melanogaster*, en la que el producto proteico codificado por el gen de la PAH actuaría, de forma independiente a la hidroxilación, como una tetrahidropterina oxidasa catalizando la formación de H₂Ptr (Fig. 40). La tetrahidropterina (H₄Ptr) no sería un intermediario en la

síntesis de H₂Ptr sino el producto de su reducción, proponiendo que ésta sea catalizada por una dihidropterina reductasa. Esta nueva función de la PAH se ve apoyada por la relación existente entre los periodos de máxima acumulación de drosopterinas, compuestos en cuya síntesis interviene como precursor la H₂Ptr, y el aumento en los niveles de PAH observados en la cepa salvaje (Alcañiz y Silva, 1996).

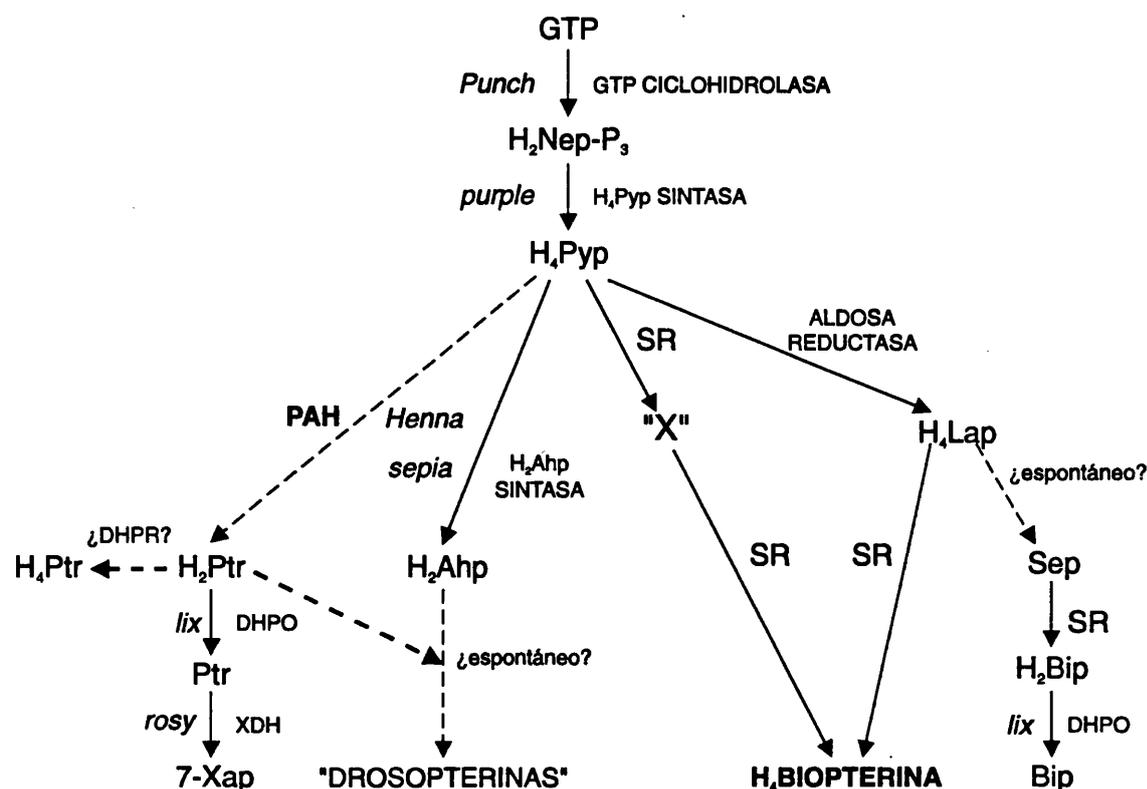


Figura 40. Ruta alternativa de biosíntesis de pterinas en *Drosophila melanogaster*. Se presentan los intermediarios y enzimas participantes así como los loci génicos implicados. Aunque el compuesto "X" no ha sido aislado en *Drosophila*, en mamíferos ha sido identificado como 1'-hidroxi-2'-oxo-tetrahidropterina (Smith, 1987). Abreviaturas utilizadas: GTP, guanósina trifosfato; H₂Nep-P₃, dihidroneopterina trifosfato; H₄Pyp, 6-piruviloil-tetrahidropterina; H₄Ptr, tetrahidropterina; H₂Ptr, dihidropterina; Ptr, pterina; 7-Xap, isoxantopterina; H₂Ahp, acetildihidrohomopterina; H₄Lap, 6-lactoiloil-tetrahidropterina; H₄Biopterina, tetrahidrobiopterina; Sep, sepiapterina; H₂Bip, dihidrobiopterina; Bip, biopterina; PAH, fenilalanina hidroxilasa; DHPR, dihidropterina reductasa; SR, sepiapterina reductasa; DHPO, dihidropterina oxidasa; XDH, xantina deshidrogenasa; lix, little isoxanthopterin.

Aunque no existen estudios enzimáticos que demuestren la actividad tetrahidropterina oxidasa propuesta para la PAH de *Drosophila melanogaster*, se ha demostrado que el enzima homólogo de mamíferos es capaz de catalizar *in vitro* la oxidación de diversas tetrahidropterinas, de manera no acoplada a la hidroxilación de sustrato aminoacídico (Davis y Kaufman, 1989; Davis *et al.*, 1988; Davis y Kaufman, 1993). Como resultado de dicha reacción se produ-

cen las formas quinonoideas correspondientes, cuya autooxidación ocasiona la eliminación de la cadena lateral del anillo pteridínico produciendo una mezcla de H₂P_{tr} y la dihidropterina correspondiente. Dada la similitud en sus características catalíticas y estructurales, cabe esperar que el enzima de *Drosophila* comparta esta actividad. En la actualidad se están realizando estudios al respecto.

La concurrencia de las tres funciones descritas para el gen de la PAH de *Drosophila melanogaster* — (i) hidroxilación de la fenilalanina, (ii) hidroxilación del triptófano, (iii) oxidación de tetrahidropterinas — evidencia la necesidad de mecanismos de regulación que controlen esta multiplicidad en respuesta a los requerimientos metabólicos de cada tejido. Así la intervención de la actividad TPH como paso limitante en la síntesis de serotonina implica la existencia en el tejido nervioso de un control preciso de dicha actividad para responder a la demanda de neurotransmisores. En contraste, durante la formación de cutícula, en la hipodermis del insecto, se requiere un aumento puntual de la actividad PAH mientras que durante la pigmentación ocular se produce una importante demanda de actividad tetrahidropterina oxidasa en un corto espacio de tiempo. Los resultados presentados en este trabajo sugieren que las funciones del gen de la PAH son reguladas a través de su expresión diferencial mediante la producción de transcritos alternativos, probablemente originados por el uso de distintos promotores. Estos transcritos codifican para tres isoformas proteicas que se diferencian en los primeros aminoácidos del dominio regulador N-terminal, lo que permite prever que dichas isoformas poseen diferentes propiedades enzimáticas.

Aunque en *Drosophila* no se ha determinado el papel de la fosforilación en la regulación de la PAH, su elevada similitud con el enzima de mamíferos permite predecir que esta modificación post-traducciona constituya una vía de regulación enzimática. Así, las isoformas codificadas por los transcritos tipo I y III presentan residuos serina que podrían constituir potenciales sitios de fosforilación equivalentes a la Ser¹⁶ de la PAH de humanos. Como soporte a esta propuesta cabe señalar que el análisis del comportamiento de la actividad PAH de *Drosophila* frente a distintos cofactores pteridínicos indica la existencia de dos isoenzimas con diferentes propiedades cinéticas (Bel *et al.*, 1992b). Asimismo se ha descrito la presencia en embriones de una forma del enzima PAH de menor peso molecular que la encontrada en otros estadios, relacionándose con posibles modificaciones post-traduccionales (Neckameyer y White, 1992). En el caso del gen de la TH de *Drosophila* se ha descrito una situación similar, proponiendo la producción de isoformas proteicas con diferencias en el dominio N-terminal como un mecanismo de regulación diferencial (Birman *et al.*, 1994).

4. PAPEL DE LOS ELEMENTOS TRANSPONIBLES EN LA DIVERSIFICACIÓN GÉNICA.

Los elementos transponibles son considerados un importante factor en la configuración de los genomas, constituyendo un 10% del genoma total de *Drosophila melanogaster* (como revisión ver Sherrat, 1995). Frente a la teoría que considera a estos elementos como parásitos genómicos (Doolittle y Sapienza, 1980; Orgel y Crick, 1980), cada vez son más las evidencias que apoyan su posible contribución en los procesos evolutivos de adaptación y especiación como una fuente de variabilidad genética (Finnegan, 1989; von Stenberg *et al.*, 1992; McDonald, 1995). Los estudios de genética molecular más reciente proporcionan posibles mecanismos por los que los elementos transponibles aportarían esta variabilidad.

El resultado presentado en este trabajo acerca del procesado aberrante del elemento B104 en el gen de la PAH de la cepa *Hn³* de *Drosophila melanogaster* se suma al reciente descubrimiento de la eliminación de los retroelementos del transcrito primario del gen huésped mediante la utilización de sitios crípticos, presentes tanto en el elemento y en el gen como generados por la duplicación del punto de inserción (como revisión ver Purugganan y Wessler, 1992; Purugganan, 1993).

Aunque la mayoría de las mutaciones provocadas por este proceso producen la pérdida parcial o total de la función del gen afectado, en algunos casos se ha observado una expresión normal (Purugganan, 1993). Estos casos han llevado a considerar que la frecuencia de este fenómeno está infravalorada ya que los alelos con fenotipo normal no serían detectados mediante los estudios genéticos habituales. Así se ha propuesto que este proceso molecular represente un mecanismo evolutivo por el cual el efecto deletéreo de la inserción es minimizado, asegurando la supervivencia del elemento (Purugganan y Wessler, 1992; Purugganan, 1993). Apoyando esta hipótesis existen diversas evidencias que sugieren que las señales crípticas presentes en los elementos han evolucionado para permitir su eliminación del transcrito del gen huésped, incrementando la probabilidad de que se conserve, al menos parcialmente, la función génica. En primer lugar estas señales, así como las necesarias para activar los sitios crípticos presentes en el gen u originados por la duplicación, se localizan en los extremos del elemento, de forma que se asegura la eliminación del mensajero maduro de la mayor parte de la secuencia insertada. Además, esta capacidad es compartida por elementos de familias alejadas. Incluso dentro de familias heterogéneas, como es el grupo de los *Ds* de maíz, se observa la conservación de estas señales crípticas, sugiriendo su importancia para la biología del elemento (Wessler, 1989).

Por otra parte, este mecanismo molecular proporciona un modelo mutacional de la contribución de los elementos transponibles a la diversificación evolutiva de los genes (Wessler, 1988; Purugganan y Wessler, 1992; Purugganan, 1993). Se ha propuesto que la eliminación de los elementos transponibles de los transcritos primarios del gen mutado suponga una fuente potencial de nuevas formas proteicas, introduciendo modificaciones en los productos génicos a través de la alteración de los patrones de procesado. Esta potencialidad queda evidenciada por la descripción de un alelo mutante del gen de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa de *Drosophila melanogaster* (Wilanowsky *et al.*, 1995). En dicho alelo, la inserción del retroelemento *blood* induce, a través de su eliminación parcial del pre-mRNA, la producción de una isoforma funcional con parte de su secuencia codificada por el elemento. El caso ilustrado en el presente trabajo aporta un nuevo ejemplo de cómo la inserción de un elemento puede introducir una variación en la secuencia aminoacídica del producto génico sin alterar drásticamente su estructura, conservando la pauta de lectura original. Aunque la posible funcionalidad de la proteína codificada por el transcrito tipo 2 del gen de la PAH en *Hn³* no ha sido demostrada, la presencia de actividad enzimática residual en esta cepa sugiere que esta isoforma pueda ser activa. En la actualidad se están realizando experimentos encaminados a demostrar su funcionalidad.

Todos los casos hasta ahora referidos se pueden considerar como ejemplos contemporáneos de la potencialidad evolutiva de los elementos transponibles. La detección de un retrotransposón formando parte constitutiva de la región codificante del gen de la transaldolasa de humanos supone una prueba de que algunas mutaciones inducidas por la inserción de un elemento transponible pueden haber sido ventajosas siendo mantenidas en la población (Banki *et al.*, 1994).

El origen de los intrones de los genes nucleares de eucariotas es una cuestión que todavía no ha sido esclarecida. Frente a la hipótesis de pérdida de intrones, los estudios filogenéticos hasta ahora realizados apoyan la teoría de ganancia, según la cual los genes ancestrales carecerían de estas estructuras que habrían sido adquiridas por eucariotas en diferentes momentos de la evolución (Cavalier-Smith, 1991). Esta teoría propone que, si bien el origen de los intrones nucleares lo constituyen elementos similares a los intrones actuales del grupo II, otros mecanismos, tales como la reorganización de exones, han contribuido a su expansión. El descubrimiento de la eliminación de los elementos transponibles mediante procesamiento del transcrito primario del gen huésped se ha considerado como un mecanismo adicional de adquisición de nuevos intrones (Purugganan y Wessler, 1992; Purugganan, 1993).

Tan sólo se ha observado la escisión precisa en el caso de un elemento *Ds* insertado en el gen *Sh2* de maíz, circunstancia que ha llevado a considerarlo como un ejemplo contemporáneo de adquisición de un nuevo intrón (Giroux *et al.*, 1994). Sin embargo, esta situación no es generalizada conservándose, en el resto de los casos descritos, parte de la secuencia del elemento en el mensajero maduro. Este hecho, añadido a la falta de similitud estructural entre los actuales intrones y los elementos transponibles, ha llevado a plantear que sólo una pequeña fracción de los intrones nucleares tienen su origen en la inserción de uno de estos elementos. Más bien son los elementos transponibles los habrían evolucionado para aprovechar la maquinaria de procesamiento preexistente como un mecanismo de protección contra la selección fenotípica negativa.

Así pues, el proceso de eliminación de los elementos transponibles de los transcritos del gen en el que se han insertado se considera un mecanismo evolutivo que establece un balance entre la eficacia del elemento, disminuyendo el efecto deletéreo de la inserción, y la del genoma huésped, aportando una fuente de variabilidad genética (Charlesworth y Langley, 1989; Purugganan, 1993).

CONCLUSIONES

1. El estudio presentado en este trabajo pone de manifiesto la existencia de considerables diferencias en las propiedades cinéticas del enzima sepiapterina reductasa de *Drosophila melanogaster* con su equivalente en otros organismos. Éste presenta una menor afinidad por el sustrato sepiapterina. Los compuestos N-acetilserotonina, N-acetildopamina y N-metoxiacetilserotonina resultan inhibidores no competitivos del enzima, presentando un grado de inhibición inferior al observado en la sepiapterina reductasa de otros organismos.
2. De entre los mutantes de color de ojos analizados, *clot* exhibía las propiedades fenotípicas esperadas para una deficiencia en el gen estructural de la sepiapterina reductasa. Sin embargo, las pruebas de dosis génica realizadas descartaron dicha hipótesis. La falta de éxito en la identificación de un mutante del gen estructural de este enzima mediante el análisis fenotípico se puede asociar con la posible presencia de isoenzimas, como así sugiere el análisis de inhibición realizado.
3. El gen de la fenilalanina hidroxilasa de *Drosophila melanogaster* está comprendido en una región genómica de unas 4 kb. Su región codificante está interrumpida por un total de 4 intrones. Aunque este número resulta inferior al presentado por los genes de las hidroxilasas de los aminoácidos aromáticos en mamíferos, la posición de los tres últimos intrones aparece perfectamente conservada, presentando los exones correspondientes una alta identidad con la fenilalanina hidroxilasa de mamíferos. Estas observaciones evidencian el origen evolutivo común propuesto para la familia génica de las hidroxilasas.
4. *Drosophila melanogaster* es el primer organismo donde se describe una expresión diferencial del gen de la fenilalanina hidroxilasa. Se han detectado tres transcritos alternativos del gen, cuyo origen parece residir en el uso de distintos promotores y que se expresan diferencialmente a lo largo del desarrollo. Éstos codifican para tres isoformas proteicas que tan sólo se diferencian en los primeros aminoácidos del dominio regulador N-terminal.
5. La cepa mutante *Henna-recessive*³ de *Drosophila melanogaster* presenta la inserción del retroelemento B104 en el exón 3 del gen de la fenilalanina hidroxilasa. Esta inserción provoca la producción de transcritos aberrantes que contienen parte de la secuencia del elemento interrumpiendo su región codificante. Además se produce una disminución en los niveles de mensajero maduro respecto a la cepa salvaje.
6. Estos transcritos aberrantes son originados por la utilización de sitios crípticos durante el proceso de eliminación de intrones del transcrito primario. El transcrito mayoritario, denominado tipo 1, se origina por la utilización de un sitio dador críptico, codificado por la repetición terminal (LTR) del elemento, y del sitio aceptor del intrón 3 del gen. El transcrito minoritario, tipo 2, se produce por la utilización de ese mismo sitio críptico, en combinación con un sitio aceptor generado por la duplicación de la secuencia diana producida por la retrotransposición. Su uso sugiere la existencia en la LTR de B104 de las secuencias requeridas para su reconocimiento por la maquinaria de procesado. Es la primera vez que se describe este patrón de eliminación.

7. El transcrito tipo 2 del gen de la fenilalanina hidroxilasa producido en *Henna-recessive*³ conserva la pauta de lectura normal, pese a la inserción de parte de la secuencia del retroelemento. Este transcrito codifica para un producto proteico que tan sólo difiere de la proteína normal en la presencia de una inserción de 14 aminoácidos, codificados por B104. La existencia de actividad fenilalanina hidroxilasa residual en esta cepa sugiere que este producto pueda ser activo.
8. La eliminación del elemento B104 del transcrito primario del gen de la fenilalanina hidroxilasa en *Henna-recessive*³ es un ejemplo de la potencialidad de los elementos transponibles como fuente de variabilidad genética mediante la introducción de nuevos patrones de procesado y de productos génicos modificados.
9. La caracterización molecular de la mutación presente en la cepa *Henna-recessive*³ demuestra la identidad del locus génico *Henna* como el gen estructural de la fenilalanina hidroxilasa en *Drosophila melanogaster*, estableciendo una relación directa entre un defecto génico y las deficiencias fenotípicas de los mutantes *Henna*.
10. Esta identificación pone de manifiesto la concurrencia de tres actividades enzimáticas codificadas por el locus *Henna*: fenilalanina hidroxilasa, triptófano hidroxilasa y tetrahidropterina oxidasa. Estas actividades están implicadas en tres procesos fisiológicos diferentes: metabolismo de la fenilalanina, síntesis de neurotransmisores serotoninérgicos y síntesis de pterinas.
11. El patrón diferencial de expresión del gen de la fenilalanina hidroxilasa observado en *Drosophila melanogaster* se puede relacionar con una regulación de las funciones desempeñadas por este gen. Los datos presentados sugieren que ésta se produce tanto a nivel transcripcional, mediante el uso de promotores alternativos, como mediante la producción de isoformas con diferentes propiedades reguladoras.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcañiz, S. y Silva, J.F. (1996) Phenylalanine hydroxylase participation in the synthesis of serotonin and pteridines in *Drosophila melanogaster*. *Comp. Biochem. Physiol.* (en prensa).
- Armarego, W-L-F., Randles, S. y Taguchi, H. (1983) Aerobic oxidation of 5,6,7,8-tetrahydropterin. *Eur. J. Biochem.* **135**, 393-403.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.-G., Smith, J.A. y Struhl, K. (1988) *Current protocols in molecular biology*. Wiley-Interscience.
- Babitke, P., Gollnick, P. y Yanofsky, C. (1992) The *mtrAB* operon of *Bacillus subtilis* encodes GTP cyclohydrolase I (MtrA), an enzyme involved in folic acid biosynthesis, and MtrB, a regulator of tryptophan biosynthesis. *J. Bacteriol.* **174**, 2059-2064.
- Banki, K., Halladay, D. y Perl, A. (1994) Cloning and expression of the human gene for transaldolase. *J. Biol. Chem.* **269**, 2847-2851.
- Barnes, W.M. (1994) PCR amplification of up to 35-kb ADN with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2216-2220.
- Bartholomé, K. y Lüdecke, B. (1995) Mutations of the human tyrosine hydroxylase gene. *Abstracts of the 8th International Conference of Pteridines and Related Biogenics Amines*. p. 41.
- Bel, Y. (1991) Las pteridinas en relación con la hidroxilación de la fenilalanina. Tesis Doctoral. Universitat de València.
- Bel, Y. y Ferré, J. (1989) Regulation of pteridine biosynthesis and aromatic amino acid hydroxylation in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.* **27**, 59-76.
- Bel, Y., Jacobson, K.B. y Ferré, J. (1992a) A comparative study of *Drosophila* phenylalanine hydroxylase with a natural and a synthetic tetrahydropterin as cofactor. *Comp. Biochem. Physiol.* **103B**, 557-562.
- Bel, Y., Jacobson, K.B., Silva, F.J. y Ferré, J. (1992b) Developmental and biochemical studies on the phenylalanine hydroxylation system in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **22**, 633-638.
- Benton, W.D. y Davis, R.W. (1977) Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science* **196**, 180.
- Benyajati, Ch. y Dray, J.F. (1984) Cloned *Drosophila* alcohol dehydrogenase genes are correctly expressed after transfection into *Drosophila* cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 1701-1705.
- Birman, S., Morgan, B., Anzivino, M. y Hirsh, J. (1994) A novel and major isoform of tyrosine hydroxylase in *Drosophila* is generated by alternative RNA processing. *J. Biol. Chem.* **269**, 26559-26567.
- Blau, N. (1988) Inborn errors of pterin metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **8**, 185-209.
- Blau, N., Barnes, I. y Dhondt, J.L. (1996) International database of tetrahydrobiopterin deficiencies. *J. Inher. Metab. Dis.* **19**, 8-14.
- Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica. (1993) *The Dig System User's Guide for Filter Hybridization*. Germany.
- Brown, G.M. (1985) Biosynthesis of pterins. En *Folates and Pterins* (Brakley, R.J. y Benkovic, S.J., eds), vol. 2, pp. 115-154. John Wiley & Sons Ltd., New York.
- Brown, G.M., Primus, J.P. y Switchenko, A.C. (1986) Biosynthesis of tetrahydrobiopterin and related compounds in *Drosophila melanogaster*. En *Chemistry and Biology of Pteridines* (Cooper, B.A. y Whitehead, V.M., eds), pp. 125-139. Walter de Gruyter, Berlin-New York.
- Budnick, V. y White, K. (1987) Genetic dissection of dopamine and serotonin synthesis in the nervous system of *Drosophila melanogaster*. *J. Neurogenet.* **4**, 309-314.
- Burg, A.W. y Brown, G.M. (1966) The biosynthesis of folic acid. VI. Enzymatic conversion of carbon 8 of guanosine triphosphate to formic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **117**, 275.
- Carr, R.T. y Benkovic, S.J. (1993) An examination of the copper requirement of phenylalanine hydroxylase from *Chromobacterium violaceum*. *Biochemistry* **32**, 14132-14138.
- Cavalier-Smith, T. (1991) Intron phylogeny: A new hypothesis. *Trends Genet.* **7**, 145-148.

- Citron, B. A., Kaufman, S., Milstien, S., Naylor, E.W., Greene, C.L. y Davis, M.D. (1993) Mutation of 4 α -carbinolamine dehydratase gene leads to mild hyperphenylalaninemia with defective cofactor metabolism. *Am. J. Hum. Genet.* **53**, 768-774.
- Citron, B.A., Davis, M.D., Milstien, S., Gutierrez, J., Mendel, D.B., Crabtree, G.R. y Kaufman, S. (1992) Identity of 4 α -carbinolamine dehydratase, a component of the phenylalanine hydroxylation system, and DCoH, a transregulator of homeodomain proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 11891-11894.
- Citron, B.A., Milstien, S., Gutierrez, J.C., Levine, R.A., Yanak, B.L. y Kaufman, S. (1990) Isolation and expression of rat liver sepiapterin reductase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 6436-6440.
- Charlesworth, B. y Langley, C.H. (1989) The population genetics of *Drosophila* transposable elements. *Annu. Rev. Genet.* **23**, 251-287.
- Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W.M. y Higuchi, R. (1994) Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic ADN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5695-5699.
- Cho, H. J., Martin, E., Xie, Q.-W., Sassa, S. y Nathan, C. (1995) Inducible nitric oxide synthase: Identification of amino acid residues esencial for dimerization and binding of tetrahydrobiopterin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 11514-11518.
- Chou, Q., Russell, M., Birch, D.E., Raymond, J.Y y Bloch, W. (1992) Prevention of pre-PCR mis-pairing and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res.* **20**, 1717-1723.
- Davis, M.D. y Kaufman, S. (1989) Evidence of the formation of the 4 α -carbinolamine during the tyrosine-dependent oxidation of tetrahydrobiopterin by rat liver phenylalanine hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **264**, 8585-8596.
- Davis, M.D. y Kaufman, S. (1993) Products of the tyrosine-dependent oxidation of tetrahydrobiopterin by rat liver phenylalanine hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* **304**, 9-16.
- Davis, M.D., Kaufman, S. y Milstien, S. (1988) The autoxidation of tetrahydrobiopterin. *Eur. J. Biochem.* **173**, 345-351.
- DiLella, A.G., Kwok, S.C.M., Ledley, F.D., Marvit, J. y Woo, S.L.C. (1986) Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry* **25**, 743-749.
- Dix, T.A. y Benkovic, S.J. (1988) Mechanism of oxygen activation by pteridin-dependent monooxygenases. *Acc. Chem. Res.* **21**, 101-107.
- Doolittle, W.F. (1987) The origin and function of intervening sequences in DNA: A review. *Am. Nat.* **130**, 915-928.
- Doolittle, W.F. y Sapienza, C. (1980) Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* **284**, 601-603.
- Dorsett, D. y Jacobson, K.B. (1982) Purification and biosynthesis of quench spot, a drosopterin precursor in *Drosophila melanogaster*. *Biochemistry* **21**, 1238-1243.
- Dorsett, D., Yim, J.J. y Jacobson, K.B. (1979) Biosynthesis of "drosopterins" by an enzyme system from *Drosophila melanogaster*. *Biochemistry* **18**, 2596-2600.
- Dreesen, T.D., Johnson, D.H. y Henikoff, S. (1988) The brown protein of *Drosophila melanogaster* is similar to the white protein and to components of active transport complexes. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 5206-5212.
- Duch, D.S., y Smith, G.K. (1991) Biosynthesis and function of tetrahydrobiopterin. *J. Nutr. Biochem.* **2**, 411-423.
- Eisensnith, R.C. y Woo, S.L.C. (1991) Phenylketonuria and the phenylalanine hydroxylase gene. *Mol. Biol. Med.* **8**, 3-18.
- Escrache, B. y Silva, F.J. (1992) An *in vitro* system for studying pteridine biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Pteridines* **3**, 171-176.
- Fan, C.L. y Brown, G.M. (1979) Partial purification and some properties of biopterin synthase and dihydropterin oxydase from *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.* **17**, 351-369.

- Ferré, J. y Naylor, E.W. (1988) Sepiapterin reductase in human amniotic and skin fibroblast, chorionic villi, and various blood fractions. *Clin. Chim. Acta* **271**, 271-282.
- Ferré, J., Silva, F.J., Real, M.D. y Ménsua, J.L. (1986) Pigment patterns in mutants affecting biosynthesis of pteridines and xanthommatin in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.* **24**, 545-569.
- Finnegan, D.J. (1989) Eukariotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genet.* **5**, 103-107.
- Fridell, R.A. y Searles, L.L. (1994) Evidence for a role of the *Drosophila melanogaster* suppressor of sable gene in the pre-mRNA splicing pathway. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 859-867.
- Fukushima, T., Eto, I., Mayumi, T., Richter, W., Goodson, S. y Shiota, T. (1975) Biosynthesis of pterins in mammalian system. En *Chemistry and Biology of Pteridines* (Pfleiderer, E., ed.), pp. 247-263. Walter de Gruyter, New York.
- Galland, P. y Senger, H. (1988) The role of pterins in the photoreception and metabolism of plants. *Photochem. Photobiol.* **48**, 811-820.
- Giovanelli, J., Campos, K.L. y Kaufman, S. (1991) Tetrahydrobiopterin, a cofactor for rat cerebellar nitric oxide synthase, does not function as a reactant in the oxygenation of arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 7091-7095.
- Giroux, M.J., Clancy, M., Baier, J., Ingham, L., McCarty, D. y Hannah, L.C. (1994) *De novo* synthesis of an intron by maize transposable element *Dissociation*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 12150-12154.
- Grenett, H.E., Ledley, F.D., Reed, L.L. y Woo, S.L.C. (1987) Full-length cDNA for rabbit tryptophan hydroxylase: Functional domains and evolution of aromatic amino acid hydroxylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 5530-5534.
- Grima, B., Lamouroux, A., Boni, C., Julien, J.-F., Javoy-Agid, F. y Mallet, J. (1987) A single human gene encoding multiple tyrosine hydroxylases with different predicted functional characteristics. *Nature*, **326**, 707-711.
- Gross, S.S. y Levi, R. (1993) Tetrahydrobiopterin synthesis: An absolute requirement for cytokine-induced nitric oxide generation by vascular smooth muscle. *J. Biol. Chem.* **267**, 25722-25729.
- Guillamón, J.J. y Ferré, J. (1988) Identification of 5,6,7,8-tetrahydropterin and 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **152**, 49-55.
- Guillamón, J.J., Bel, Y. y Ferré, J. (1989) Tetrahydropteridines in *Drosophila* and regulation of their biosynthesis by phenylalanine. In *Pteridines and Biogenics Amines in Neurophysiology, Pediatrics and Immunology*. (Levine, R.A., Milstien, S., Kuhn, D. y Curtius, H.-Ch., eds) pp. 175-182. Lakeshore Publishing Co., Grosse Point.
- Gütlich, M., Jaeger, E., Rücknagel, K.P., Werner, T., Rödl, W., Ziegler, I. y Bacher, A. (1994) Human GTP cyclohydrolase I: Only one out of three cDNA isoforms gives rise to the active enzyme. *Biochem. J.* **302**, 215-221.
- Harada, T., Kagamiyama, H. y Hatakeyama, K. (1993) Feedback regulation mechanisms for the control of GTP cyclohydrolase I activity. *Science* **260**, 1507-1509
- Hatakeyama, K., Harada, S., Suzuki, S., Watanabe, Y. y Kagamiyama, H. (1989) Purification and characterization of rat liver GTP cyclohydrolase I. Cooperative binding of GTP to the enzyme. *J. Biol. Chem.* **264**, 21660-21664.
- Hatakeyama, K., Inoue, Y., Harada, T. y Kagamiyama, H. (1991) Cloning and sequencing of cDNA encoding rat GTP cyclohydrolase I. The first enzyme of the tetrahydrobiopterin biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* **266**, 765-769.
- Hoang, L., Byck, S., Prevost, L. y Scriver, C.R. (1996) PAH mutation analysis consortium database: A database for disease-producing and other allelic variation at the human PAH locus. *Nucleic Acids Res.* **24**, 127-131.
- Hopkin, T.L. (1982) Tyrosine hydroxylase activity and tyrosine titers during cockroach metamorphosis. *Experientia* **38**, 235-236.
- Huften, S.E., Jennings, I.G. y Cotton, G.H. (1995) Structure and function of the aromatic amino acid hydroxylases. *Biochem. J.* **311**, 353-366.

- Hultmark, D., Klemenz, R. y Gehring, W.J. (1986) Translational and transcriptional control elements in the untranslated leader of the heat-shock gene *hsp22*. *Cell* **44**, 429-438.
- Ichikawa, S., Ichinose, H. y Nagatsu, T. (1990) Multiple mRNAs of monkey tyrosine hydroxylase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **173**, 1331-1336.
- Ichinose, H., Katoh, S., Sueoka, T., Titani, K., Fujita, K. y Nagatsu, T. (1991) Cloning and sequencing of cDNA encoding human sepiapterin reductase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **179**, 183-189.
- Iino, T., Dohke, K. y Tsusué, M. (1992) The purification and characterization of sepiapterin reductase from fat body from the silkworm *Bombyx mori*. *Zool. Sci.* **9**, 119-125.
- Iino, T., Sawada, H., Tsusué, M. y Takikawa, S.-I. (1996) Discovery of a new tetrahydrobiopterin-synthesizing enzyme in the *lemon* mutant of the silkworm *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta* **1297**, 191-199.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sminsky, J.J. y While, T.J. (1990) *PCR Protocols*. Academic Press Inc, California.
- Jaffrey, S.R. y Solomon, H.S. (1995) Nitric oxide: A neural messenger. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **11**, 417-440.
- Jennings, I.G., Kemp, B.E. y Cotton, R.G.H. (1991) Localization of cofactor binding site with monoclonal anti-idiotypic antibodies: Phenylalanine hydroxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 5724-5738.
- Johnson, J.L., Waud, W.R., Rajagopalan, K.V., Duran, M., Beemer, F.A. y Wadman, S.K. (1980) Inborn errors of molybdenum metabolism: Combined deficiencies of sulfite oxidase and xanthin dehydrogenase in a patient lacking the molybdenum cofactor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 3715-3719.
- Junakovic, N., Caneva, R. y Ballario, P. (1984) Genomic distribution of *copia-like* elements in laboratory stocks of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **90**, 378-382.
- Katoh, S. (1971) Sepiapterin reductase from horse liver: Purification and properties of the enzyme, *Arch. Biochem. Biophys.* **146**, 202-214.
- Katoh, S. y Sueoka, T. (1987) Isomerization of 6-lactoyl tetrahydropterin by sepiapterin reductase. *J. Biochem.* **101**, 275-278.
- Katoh, S. y Sueoka, T. (1989) Coenzyme stimulation of isomerase activity of sepiapterin reductase in the biosynthesis of tetrahydrobiopterin. *J. Biochem.* **103**, 286-289.
- Katoh, S., Sueoka, T. y Yamada, S. (1982) Direct inhibition of brain sepiapterin reductase by a catecholamine and an indoleamine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **105**, 75-81.
- Katzenmeier, G., Schmid, C., Kellermann, J., Lottspeich, F. y Bacher, A. (1991) Biosynthesis of tetrahydrofolate. Sequence of GTP cyclohydrolase I from *Escherichia coli*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **372**, 991-997.
- Kaufman, S. (1963) The structure of the phenylalanine hydroxylation cofactor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **50**, 1085-1093.
- Kaufman, S. (1987a) Aromatic amino acid hydroxylases. En *The Enzymes* (Boyer, P.D. y Krebs, E.G., eds), vol. 18, pp. 217-281. Academic Press, San Diego.
- Kaufman, S. (1987b) Tetrahydrobiopterin and hydroxylation system in health and disease. En *Unconjugated Pterins in Neurobiology: Basic and clinical aspects*. (Loverberg, W. y Levine, R.A., eds), pp. 1-28. Taylor & Francis, London.
- Kaufman, S. (1993) New tetrahydrobiopterin-dependent systems. *Ann. Rev. Nutr.* **13**, 261-286.
- Kaufman, S. y Fisher, D.B. (1974) Pterin-requiring aromatic amino acid hydroxylases. En *Molecular Mechanisms of Oxygen Activation* (Hayaishi, ed.), pp. 285-396. Academic Press, New York.
- Kaufman, S., Pollock, R.J., Summers, G.K., Das, A.K. y Hajra, A.K. (1990) Dependence of an alkyl glycol ether monooxygenase activity upon tetrahydropterins. *Biochem. Biophys. Acta* **1040**, 19-27.
- Keith, T.P., Riley, M.A., Kreitman, M., Lewontin, R.C., Cutis, D. y Chambers, G. (1987) Sequence of the structural gene for xanthine dehydrogenase (*rosy* locus) in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **116**, 67-73.

- Kim, N., Kim, H., Park, D., Rosen, C., Dorsett, D. y Yim, J. (1996) Structure and expression of wild-type and suppressible alleles of the *Drosophila purple* gene. *Genetics* **142**, 1157-1168.
- Kobayashi, K., Kaneda, N., Ichinose, H., Kishi, F., Nakazawa, H., Kurosawa, Y., Fujita, K. y Nagatsu, T. (1988) Structure of the human tyrosine hydroxylase gene: Alternative splicing from a single gene for generation of four mRNA types. *J. Biochem.* **103**, 907-912.
- Koshimura, K., Miwa, S., Lee, K., Fujiwara, M. y Watanabe, Y. (1990) Enhancement of dopamine release *in vivo* from the rat striatum by dialytic perfusion of 6R-L-*erithro*-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin. *J. Neurochem.* **54**, 1391-1397.
- Ledley, F.D., DiLella, A.G., Kwok, S.C.M. y Woo, S.L.C. (1985) Homology between phenylalanine and tyrosine hydroxylases reveals common structural and functional domains. *Biochemistry* **24**, 3389-3394.
- Levine, R.A. y Galloway, M.P. (1987) The regulation of biogenic amine synthesis and role of tetrahydrobiopterin. En *Unconjugated Pterins in Neurobiology: Basic and Clinical Aspects* (Lovenberg, W. y Levine, R.A., eds), pp. 119-132. Taylor & Francis, London.
- Levison, G. y Gutman, G.A. (1987) Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 203-211.
- Lincoln, S.E., Daly, M.J. y Lander, E.S. (1991) Primer: A Computer Program for Automatically Selecting PCR Primers. MIT Center for Genome Research and Whitehead Institute of Biomedical Research, Massachusetts, USA.
- Lindsley, D. L. y Zimm, G. (1992) *The genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego.
- Liu, X. y Vrana, K.E. (1991) Leucine zippers and coiled-coils in the aromatic amino acid hydroxylases. *Neurochem. Int.* **18**, 27-31.
- Lohse, D.L. y Fitzpatrick, P.F. (1993) Identification of the intersubunit binding region in rat tyrosine hydroxylase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **197**, 1543-1548.
- 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.
- Maier, J. y Ninnemann, H. (1995) Biosynthesis of pteridines in *Neurospora crassa*, *Phycomyces blakesleeanus* and *Euglena gracilis*: Detection and characterization of biosynthetic enzymes. *Photochem. Photobiol.* **61**, 43-53.
- Marletta, M.A. (1993) Nitric oxide synthase: Structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* **17**, 12231-12234.
- Matsubara, M., Katoh, S., Akino, M. y Kaufman, S. (1966) Sepiapterin reductase. *Biochim. Biophys. Acta* **122**, 202-212.
- McDonald, J.F. (1995) Transposable elements: Possible catalysts of organismic evolution. *Trends Ecol. Evol.* **10**, 123-126.
- McLean, J.R., Krishnakumar, S. y O'Donnell, J.M. (1993) Multiple mRNAs from the *Punch* locus of *Drosophila melanogaster* encode isoforms of GTP cyclohydrolase I with distinct N-terminal domains. *J. Biol. Chem.* **268**, 27191-27197.
- Milstien, S. y Kaufman, S. (1983) Tetrahydro-sepiapterin is an intermediate in tetrahydrobiopterin biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **115**, 888-893.
- Milstien, S. y Kaufman, S. (1985) Biosynthesis of tetrahydrobiopterin: Conversion of dihydroneopterin triphosphate to tetrahydropterin intermediates. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **128**, 1099-1107.
- Milstien, S. y Kaufman, S. (1989a) Immunological studies on the participation of 6-pyruvoyl tetrahydropterin (2'-oxo) reductase, an aldose reductase, in tetrahydrobiopterin biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **165**, 854-860.
- Milstien, S. y Kaufman, S. (1989b) The biosynthesis of tetrahydrobiopterin in rat brain. *J. Biol. Chem.* **264**, 8066-8093.
- Morales G., Requena, J. M., Jiménez-Ruiz, A., López, M. C., Ugarte, M. y Alonso, C. (1991) Sequence and expression of the *Drosophila* phenylalanine hydroxylase mRNA. *Gene* **93**, 213-219.

- Mount, S.M., Burks, C., Hertz, G., Stormo, G.D., White, O. y Fields, C. (1992). Splicing signals in *Drosophila*: Intron size, information content, and consensus sequences. *Nucleic Acids Res.* **20**, 4255-4262.
- Nagatsu, T. (1991) Genes for human catecholamine-synthesizing enzymes. *Neurosci. Res.* **12**, 315-345.
- Nagatsu, T. e Ichinose, H. (1991) Comparative studies of the structure of human tyrosine hydroxylase with those of the enzyme of various mammals. *Comp. Biochem. Physiol.* **98C**, 203-210.
- Nasrin, S., Ichinose, H., Hidaka, H. y Nagatsu, T. (1994) Recombinant human tyrosine hydroxylase types 1-4 show regulatory kinetic properties for the natural (6R)-tetrahydrobiopterin cofactor. *J. Biochem.* **116**, 393-398.
- Neckameyer, W.S. y Quinn, W.G. (1989) Isolation and characterization of the gene for *Drosophila* tyrosine hydroxylase. *Neuron* **2**, 1167-1175.
- Neckameyer, W.S. y White, K. (1992) A single locus encodes both phenylalanine hydroxylase and tryptophan hydroxylase activities in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* **267**, 4199-4206.
- Neckameyer, W.S. y White, K. (1993) *Drosophila* tyrosine hydroxylase is encoded by the *pale* locus. *J. Neurogenet.* **8**, 189-199.
- Nichol, C.A., Smith, G.K., Reinhard, J.F., Bigam, E.C., Abou-Donia, M., Viveros, O.H. y Duch, D.S. (1987) Regulation of tetrahydrobiopterin biosynthesis and cofactor replacement by tetrahydropterins. En *Unconjugated Pterins in Neurobiology: Basic and Clinical Aspects* (Lovenberg, W. y Levine, R.A., eds), pp. 81-106. Taylor & Francis, London.
- Nichol, Ch.A., Smith, G.K. y Duch, D.S. (1985) Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and molybdopterin. *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 729-764.
- Nixon, J.C. (1985) Naturally occurring pterins. En *Folates and Pterins* (Brakley, R.L. y Benkovic, S.J., eds), vol 2, pp. 1-42. John Wiley & Sons Ltd., New York.
- O'Donnell, J.M., McLean, J.R. y Reynolds, E.R. (1989) Molecular and developmental genetics of the *Punch* locus, a pterin biosynthesis gene in *Drosophila melanogaster*. *Develop. Genet.* **10**, 273-286.
- Onishi, A., Liotta, L.J. y Benkovic, S.J. (1991) Cloning and expression of *Chromobacterium violaceum* phenylalanine hydroxylase in *Escherichia coli* and comparison of amino acid sequence with mammalian aromatic amino acid hydroxylases. *J. Biol. Chem.* **266**, 18454-18459.
- Orgel, L.E. y Crick, F.H.C. (1980) Selfish DNA: The ultimate parasite. *Nature* **284**, 604-605.
- Ota, A., Ichinose, H. Nagatsu, T. (1995) Mouse sepiapterin reductase: An enzyme involved in the final step of tetrahydrobiopterin biosynthesis. Primary structure deduced from the cDNA sequence. *Biochem. Biophys. Acta* **1260**, 320-322.
- Paricio, N. (1993) Caracterización molecular de elementos transponibles P en *Drosophila subobscura*. Tesis Doctoral. Universitat de València.
- Park, Y.S., Heizmann, C.W., Wermuth, B., Levine, R.A., Steinerstauch, P., Guzman, J. y Blau, M. (1991) Human carbonyl and aldose reductases: New catalytic functions in tetrahydrobiopterin biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **175**, 738-744.
- Paton, D.R. y Brown, G.M. (1986) The nonenzymatic synthesis of drosopterin from dihydroneopterin and 2-amino-4-oxo-6-acetyl-3H,9H-7,8-dihydropyrimido [4,5b][1,4] diazepine. En *Chemistry and Biology of Pteridines* (Cooper, B.A. y Whitehead, eds), pp. 295-298. Walter de Gruyter, Berlin-New York.
- Perkin Elmer (1995). *AbiPrism™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Protocol*. Perkin Elmer Corporation, California.
- Piedrafita, A.C., Martínez-Ramírez, A.C. y Silva, F.J. (1994) A genetic analysis of the aromatic amino acid hydroxylases involvement in DOPA synthesis during *Drosophila* adult development. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **24**, 581-588.
- Pret, A.-M. y Searles, L.L. (1991) Splicing of retrotransposon insertions from the transcripts of the *Drosophila melanogaster vermilion* gene in a revertant. *Genetics* **129**, 1137-1145.

- Primus, J.P. y Brown, G.M. (1994) Sepiapterin reductase and the biosynthesis of tetrahydrobiopterin in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **24**, 907-918.
- Purugganan, M. y Wessler, S. (1992) The splicing of transposable elements and its role in intron evolution. *Genetica* **86**, 295-303.
- Purugganan, M.D. (1993) Transposable elements as introns: Evolutionary connections. *TREE* **8**, 239-243.
- Rajagopalan, K.V. y Johnson, J.L. (1992) The pterin molybdenum cofactors. *J. Biol. Chem.* **267**, 10199-10202.
- Rembold, H. (1985) Catabolism of pterins. En *Folates and Pterins* (Brakley, R.J. y Benkovic, S.J., eds), vol. 2, pp. 156-178. John Wiley & Sons Ltd., New York.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463-5467.
- Scriver, C.R., Kaufman, S. y Woo, S.L.C. (1989) The hyperphenylalaninemias. En *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., eds.), pp. 495-546. McGraw-Hill, New-York.
- Schallreuter, K.U., Wood, J.M., Pittelkow, M.R., Gütlich, M., Lemke, K.R., Rödl, W., Swanson, N.N., Hitzemann, K. y Ziegler, I. (1994) Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin. *Science* **263**, 1444-1446.
- Schott, K., Brand, K., Hatakeyama, K., Kagamiyama, H., Maier, J. Werner, T. y Ziegler, I. (1992) Control of cell-cycle associated tetrahydrobiopterin synthesis in rat thymocytes. *Exp. Cell Res.* **200**, 105-109.
- Schott, M., Gütlich, M. y Ziegler, I. (1993) Induction of GTP-cyclohydrolase I mRNA expression by lectin activation and interferon- γ treatment in human cells associated with the immune response. *J. Cell. Physiol.* **156**, 12-16.
- Shen, R.-S., Alam, A. y Zhang, Y. (1988) Inhibition of GTP cyclohydrolase I by pterins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **965**, 9-15.
- Sherrat, D.J., ed. (1995) *Mobile Genetic Elements*. Oxford University Press.
- Shiman, R. (1985) Phenylalanine hydroxylase and dihydropterin reductase. En *Folates and Pterins* (Blakley, R.L. y Benkovic, S.J., eds), vol. 2, pp. 179-249, John Wiley & Sons, New York.
- Shiman, R., Gray, D.W. y Hill, M.A. (1994a) Regulation of rat liver phenylalanine hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **269**, 24637-24646.
- Shiman, R., Xia, T., Hill, M.A. y Gray, D.W. (1994b) Regulation of rat liver phenylalanine hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **269**, 24647-24656.
- Siegmund, H.-U. y Kaufman, S. (1991) Hydroxylation of 4-methylphenylalanine by rat liver phenylalanine hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **266**, 2903-2910.
- Silva, F.J., Bel, Y., Botella, L.M., Cotton, R.G.H. y Ferré, J. (1992) Immunological detection of phenylalanine hydroxylase protein in *Drosophila melanogaster*. *Biochem J.* **287**, 85-89.
- Silva, F.J., Escriche, B., Ordoño, E. y Ferré, J. (1991) Genetic and biochemical characterization of *little isoxanthopterin (lix)*, a gene controlling dihydropterin oxydase activity in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* **230**, 97-103.
- Smith, G.K. (1987) On the role of sepiapterin reductase in the biosynthesis of tetrahydrobiopterin. *Arch. Biochem. Biophys.* **255**, 254-266.
- Smith, G.K. y Nichol, C.A. (1984) Two new tetrahydropterin intermediates in the bovine adrenal medullary *de novo* synthesis of tetrahydrobiopterin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **120**, 761-766.
- Smith, G.K. y Nichol, C.A. (1986) Synthesis, utilization and structures of the tetrahydropterin intermediates in the bovine adrenal medullary *de novo* synthesis of tetrahydrobiopterin. *J. Biol. Chem.* **216**, 2725-2737.

- Smith, G.K., Duch, D.S., Edelstein, M.P. y Bigman, E.C. (1990) Inhibitors of bovine adrenal medullary sepiapterin reductase. En *Chemistry and Biology of Pteridines* (Curtius, H.-Ch., Ghisla, S. y Blau, N., eds), pp. 320-323. Walter de Gruyter, Berlin-New York.
- Smith, G.K., Duch, D.S., Edelstein, M.P. y Bigman, E.C. (1992) New inhibitors of sepiapterin reductase. Lack of an effect of intracellular tetrahydrobiopterin depletion upon *in vitro* proliferation of two human cell lines. *J. Biol. Chem.* **267**, 5599-5607.
- Smooker, P.M., Howells, D.W. y Cotton, R.G.H. (1993) Identification and *in vitro* expression of mutations causing dihydropteridine reductase deficiency. *Biochemistry* **32**, 6443-6449.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Stoltzfus, A., Spencer, D.F., Zuker, M., Longsdon, J.M. y Doolittle, W.F. (1994) Testing the exon theory of genes: The evidence from protein structure. *Science* **265**, 202-207.
- Stoll, J. y Goldman, D. (1991) Isolation and structural characterization of the murine tryptophan hydroxylase gene. *J. Neurosci. Res.* **28**, 457-465.
- Sueoka, T. y Katoh, S. (1982) Purification and characterization of sepiapterin reductase from rat erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **717**, 265-271.
- Sueoka, T. y Katoh, S. (1985) Carbonyl reductase activity of sepiapterin reductase from rat erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **843**, 193-198.
- Summers, K.M., Howells, A.J. y Pylotis, N.A. (1982) Biology of eye pigmentation in insects. En *Advances in Insect Physiology* (Berridge, M.J., Treherne, J.E. y Wigglesworth, V.B., eds), vol. 16, pp. 119-166. Academic Press Inc., London-New York.
- Switchenko, A.C. y Brown, G.M.. (1985) The enzymatic conversion of dihydroneopterin triphosphate to tripolyphosphate and 6-pyruvoyl-tetrahydropterin, an intermediate in the biosynthesis of pterins in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **260**, 2945-2951.
- Switchenko, A.C., Primus, J.P. y Brown, G.M. (1984) Intermediates in the enzymatic synthesis of tetrahydrobiopterin in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **120**, 754-760.
- Tanaka, K., Kaufman, S. y Milstien, S. (1989) Tetrahydrobiopterin, the cofactor for aromatic amino acid hydroxylases, is synthesized by and regulates proliferation of erythroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 5864-5867.
- Tayeh, M.A. y Marletta, M.A. (1989) Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J. Biol. Chem.* **264**, 19654-19658.
- Theobald, N. y Pfeleiderer, W. (1978) Ein neuer strukturvorschlag für die roten augen pigment drosoplerin und isodrosoplerin gus *Drosophila melanogaster*. *Chem. Ber.* **111**, 3385-3402.
- Tietz, A., Lindberg M. y Kennedy E.P. (1964) A new pteridine-requiring enzyme system for the oxydation of glyceryl ethers. *J. Biol. Chem.* **239**, 4081-4090.
- Tillinghast, H.S. y Newell, P.C. (1987) Chemotaxis towards pteridines during development of *Dictyostelium*. *J. Cell. Sci.* **87**, 45-53.
- Tipper, J. y Kaufman, S. (1992) Phenylalanine-induced phosphorylation and activation of rat hepatic phenylalanine hydroxylase *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **267**, 889-896.
- Togari, A., Ichinose, H., Matsumoto, S., Fujita, K. y Nagatsu, T. (1992) Multiple mRNA forms of human GTP cyclohydrolase I. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **187**, 359-365.
- Unnasch, T.R. y Brown, G.M. (1982) Purification and properties of dihydropterin oxydase from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **257**, 14211-14216.
- Viveros, O.H., Lee, C.-L., Abou-Donia, M.M., Nixon, J.C. y Nichol, C.A. (1981) Biopterin cofactor biosynthesis: Independent regulation of GTP cyclohydrolase in adrenal medulla and cortex. *Science* **213**, 349-350.
- von Stemberg, R.M., Novick, G.E., Gao, G.-P. y Herrera, R.J. (1992) Genome canalization: The coevolution of transposable and interspersed repetitive elements with single copy DNA. *Genetica* **86**, 215-246.

- Wang, Y., Hahn, T.M., Tsai, S.Y. y Woo, S.L.C. (1994) Functional characterization of a unique liver gene promoter. *J. Biol. Chem.* **269**, 9137-9146.
- Watcher, H., Fuchs, D., Hausen, A., Reibnegger, G. y Werner, E.R. (1989) Neopterin as marker for activation of cellular immunity: Immunologic basis and clinical application. *Adv. Clin. Chem.* **27**, 81-141.
- Werner-Felmayer, G., Werner, E.R., Fuchs, D., Hausen, A., Reibnegger, G., Schmidt, K., Weiss, G. y Wachter, H. (1993) Pteridine biosynthesis in human endothelial cells: Impact of nitric oxide-mediated formation of cyclic GMP. *J. Biol. Chem.* **268**, 1842-1846.
- Wessler, S.G. (1988) Phenotypic diversity mediated by the maize transposable elements *Ac* and *Spm*. *Science* **242**, 399-405.
- Wessler, S.G. (1989) The splicing of maize transposable elements from pre-mRNA: A minireview. *Gene* **82**, 127-133.
- Wiederrecht, G.J. y Brown, G.M. (1984) Purification and properties of the enzymes from *Drosophila melanogaster* that catalyze the conversion of dihydroneopterin triphosphate to pyrimidoazepine precursor of drosopterins, *J. Biol. Chem.* **259**, 14121-14127.
- Wiederrecht, G.J., Paton, D.R. y Brown, G.M. (1981) The isolation and identification of an intermediate involved in biosynthesis of drosopterin in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **256**, 10399
- Wiederrecht, G.J., Paton, D.R. y Brown, G.M. (1984) Enzymatic conversion of dihydroneopterin triphosphate to the pyrimidoazepine intermediate involved in the biosynthesis of the drosopterins in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **259**, 2195-2200.
- Wilanowsky, T.M., Gibson, J.B. y Symonds, J.E. (1995) Retrotransposon insertion induces an isozyme of *sn*-glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 12065-12069.
- Wolf, A.W., Ziaja, E., Arthur, R.A., Anastasiadis, P.Z., Levine, R.A. y Kuhn, D.M. (1991) Effect of tetrahydrobiopterin on serotonin synthesis, release, and metabolism in superfused hippocampal slices. *J. Neurochem.* **57**, 1191-1197.
- Woo, S.L.C., Lidsky, A.S., Güttler, F., Chandra, T. y Robson, J.H. (1983) Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal and carrier detection of classical phenylketonuria. *Nature* **306**, 151-155.
- Xia, T., Gray, D.W. y Shiman, R. (1994) Regulation of rat liver phenylalanine hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **269**, 24657-24665.
- Yim, J.J. y Jacobson, K.B. (1977) Mechanism of suppression 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.
- Yoon, K.H., Cha, K.W., Park, S.I. y Yim, J.J. (1993) Isolation and characterization of sepiapterin reductase from *Drosophila melanogaster*. *Pteridines* **4**, 43-50.
- Ziegler, I. (1985) Synthesis and interferon- γ controlled release of pteridines during activation of human peripheral blood mononuclear cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **132**, 404-411.
- Ziegler, I. y Gütlich, M. (1996) Tetrahydropterins interfere with the G protein pathway in *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **221**, 369-373.
- Ziegler, I. y Harmsen, R. (1969) The biology of pterins in insects. *Adv. Insect Physiol.* **6**, 139-203.
- Ziegler, I., Schott, K., Lübbert, M., Herrmann, F., Schwuléra, U. y Bacher, A. (1990) Control of tetrahydrobiopterin synthesis in T lymphocytes by synergistic action of interferon- γ and interleukin-2. *J. Biol. Chem.* **265**, 17026-17030.

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de

D. PILAR RUIZ VAZQUEZ
la calificación de Apto "cum laude"

Valencia, a 27 de febrero de 1997

El Secretario,

El Presidente

Pae de la Trinitat

