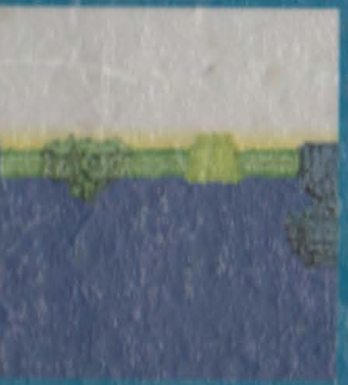
odish • Berk • Matsudaira • Kaiser • Krieger • Scott •
pursky • Darnell

Biología Celular y Molecular



5ª EDICIÓN

Lodish
Berk
Matsudaira
Kaiser
Krieger
Scott
Zipursky
Darnell

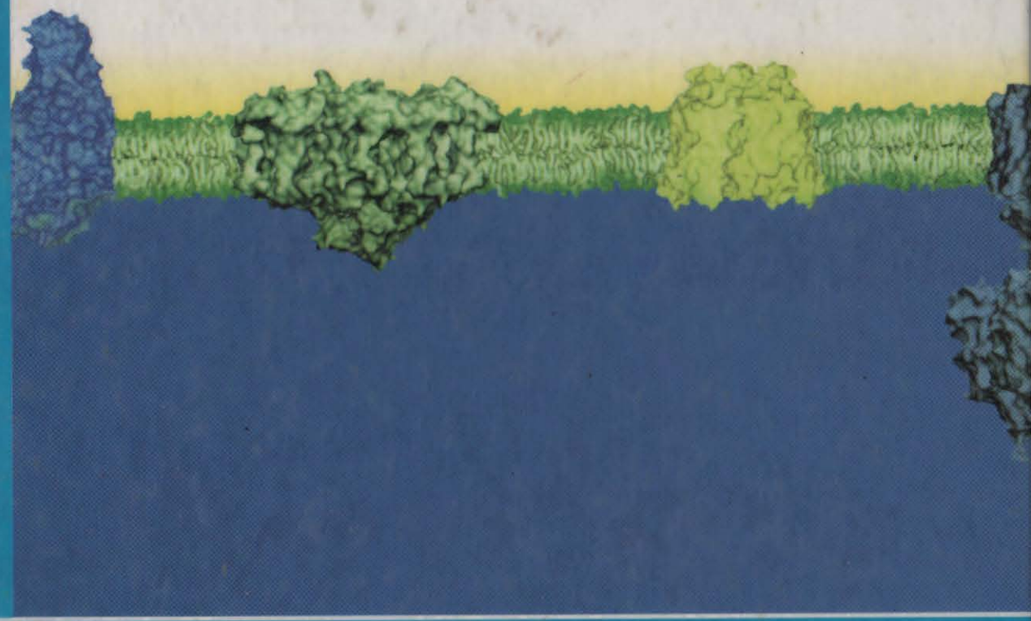
Biología Celular y Molecular

5ª EDICIÓN

Lodish • Berk • Matsudaira • Kaiser
Krieger • Scott • Zipursky • Darnell

Biología Celular y Molecular

5ª EDICIÓN



EDITORIAL MEDICA panamericana

EDITORIAL MEDICA panamericana

Lodish • Berk • Matsudaira • Kaiser • Krieger • Scott • Zipursky • Darnell



Biología Celular y Molecular

5ª EDICIÓN

Desde la publicación de la cuarta edición se produjeron avances espectaculares en muchas áreas de la biología celular y molecular. La comprensión de los mecanismos internos y externos de las células, en especial la de las funciones de diversos tipos de proteínas y lípidos sintetizados por cada célula eucarionte y de cómo las células interactúan con su ambiente, ha permitido conectar conocimientos antes disgregados y entenderlos como sistemas integrados. Esta quinta edición presenta estos nuevos conceptos en forma clara, a la vez que proporciona información experimental esencial. Todos los contenidos se han reorganizado y se han incluido varios capítulos nuevos e información detallada sobre:

- Cómo se utiliza la espectrometría de masa para identificar los componentes de grandes complejos multiproteicos.
- Estructura de las proteínas de los canales iónicos, sus propiedades de regulación de apertura y cierre y su papel en la conducción de los potenciales de acción por las células nerviosas.
- Uso experimental del RNA de interferencia (RNAi) para bloquear la expresión de genes específicos.
- Uso de perfiles transcripcionales mediante las micromatrices de DNA (*chips* de DNA).
- Función de la estructura de la cromatina en el control de la transcripción y técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) para analizar proteínas asociadas con genes específicos in vivo.
- Corte proteolítico intermembrana en varias vías de señalización.
- Mecanismos de condensación cromosómica y segregación en la mitosis, la regulación de la activación de origen en la fase S y las modificaciones del ciclo celular en la meiosis.
- Uso de la genética evolutiva para develar nuevas proteínas esenciales para la función de las células madre (stem cells) y la determinación del linaje celular.
- Un sitio web: www.whfreeman.com/lodish con más de cien animaciones y videos relacionados con los temas del libro.

Cada capítulo incluye además:

- Preguntas finales para que los estudiantes respondan un problema de investigación observando datos experimentales reales.
- Referencias actualizadas de los estudios más destacados y una revisión amplia de artículos para orientar a los estudiantes y profesores hacia una mayor información adicional.

Los cambios en la organización, el énfasis en las bases experimentales del conocimiento vigente y la descripción de los nuevos y excitantes descubrimientos harán de esta quinta edición una herramienta útil para transmitir la complejidad de los sistemas biológicos y la deslumbrante belleza de la biología celular y molecular.

ISBN: 950-06-1374-3
84-7903-913-2

9 789500 613743

EDITORIAL MEDICA panamericana

Lodish
Berk
Matsudaira
Kaiser
Krieger
Scott
Zipursky
Darnell

Biología Celular y Molecular

5ª EDICIÓN

Lodish • Berk • Matsudaira • Kaiser
Krieger • Scott • Zipursky • Darnell

Biología Cel y Molecular

5ª EDICIÓN

ACERCA DE LOS AUTORES



HARVEY LODISH es Profesor de Biología en el Massachussets Institute of Technology y miembro del Whitehead Institute for Biomedical Research. También es miembro de la National Academy of Sciences y de la American Academy of Arts and Sciences y presidente (2004) de la American Society for Cell Biology. Es reconocido por su trabajo acerca de la fisiología de la membrana celular, particularmente la biosíntesis de muchas proteínas de la superficie celular, y sobre la clonación y el análisis funcionales de diferentes proteínas receptoras de la superficie celular, como los receptores de eritropoyetina y TGFβ, además de proteínas transportadoras, incluidas las de la glucosa y los ácidos grasos. El doctor Lodish dicta cursos de biología celular para estudiantes universitarios y graduados.



CHRIS A. KAISER es un Biólogo Celular y Genetista que ha hecho contribuciones fundamentales para entender el proceso básico del plegamiento de las proteínas intracelulares y el tránsito de las proteínas de membrana. Su laboratorio en el Massachussets Institute of Technology, donde es Profesor de Biología, estudia cómo las proteínas secretadas y de membrana recién sintetizadas son plegadas y clasificadas en los compartimientos de la vía secretoria. El doctor Kaiser enseña genética a los estudiantes universitarios y graduados en el MIT.



ARNOL BERK es Profesor de Microbiología, Inmunología y Genética Molecular y miembro del Molecular Biology Institute en la University of California, Los Ángeles. También es miembro de la American Academy of Arts and Sciences. Es uno de los descubridores originales del proceso de corte y empalme del RNA y de los mecanismos para el control génico en los virus. Su laboratorio estudia las interacciones moleculares que regulan la iniciación de la transcripción en células de mamíferos, con especial atención en los factores de transcripción codificados por oncogenes y supresores de tumores. Dicta cursos introductorios en biología molecular y virología y cursos avanzados en biología celular del núcleo.



MONTY KRIEGER es Profesor Thomas D. y Virginia W. Cabot en el Departamento de Biología del Massachussets Institute of Technology. Ha recibido merecidos premios por su enseñanza innovadora a estudiantes universitarios de biología y fisiología humana, así como por sus cursos de biología celular a graduados. Su laboratorio ha hecho contribuciones importantes a nuestro conocimiento del tránsito de membranas a través del aparato de Golgi y ha clonado y caracterizado proteínas receptoras esenciales para el movimiento del colesterol hacia adentro y afuera de las células.



PAUL MATSUDAIRA es Miembro del Whitehead Institute for Biomedical Research, profesor de Biología y Bioingeniería en el Massachussets Institute y director del WI/MIT Bio-Imaging Center. Su laboratorio estudia los mecanismos y la bioquímica de la motilidad celular y la adhesión, y ha desarrollado métodos de análisis de DNA de alta velocidad basados en chips microfabricados. Ha organizado el primer curso de biología requerido para todos los estudiantes universitarios del MIT, donde dicta cursos de biología para estudiantes universitarios y bioingeniería para graduados.



MATTHEW P. SCOTT es Profesor de Biología del Desarrollo y Genética en la Stanford University School of Medicine e Investigador en el Howard Hughes Medical Institute. Es miembro de la National Academy of Sciences y de la American Academy of Arts and Sciences y presidente, en el pasado, de la Society of Developmental Biology. Es conocido por su trabajo en biología del desarrollo y genética, sobre todo en áreas de señalización intercelular y genes homeobox y por el descubrimiento de las funciones de los reguladores del desarrollo en el cáncer. El doctor Scout enseña desarrollo y mecanismos de enfermedades a estudiantes de medicina, y biología del desarrollo a estudiantes graduados en la Stanford University.

Biología Celular y Molecular

5ª EDICIÓN

Harvey Lodish
Arnold Berk
Paul Matsudaira
Chris A. Kaiser
Monty Krieger
Matthew P. Scott
S. Lawrence Zipursky
James Darnell

Supervisión de la traducción a cargo de

Norma B. Sterin de Speziale
Profesora Titular Regular de Biología Celular
Cátedra de Biología Celular, Facultad de Farmacia y Bioquímica,
Universidad de Buenos Aires

Norberto A. Vidal
Profesor Asociado Regular de Biología Celular
Cátedra de Biología Celular, Facultad de Farmacia y Bioquímica,
Universidad de Buenos Aires

EDITORIAL MEDICA panamericana

BUENOS AIRES - BOGOTÁ - CARACAS - MADRID - MÉXICO - SÃO PAULO
e-mail: info@medicapanamericana.com
www.medicapanamericana.com

Título del original en inglés
MOLECULAR CELL BIOLOGY, 5th edition
Publicada en Estados Unidos por W.H. FREEMAN AND COMPANY, New York, New York y Basingstoke
© 1986, 1990, 1995, 2000, 2004 por W. H. Freeman and Company. Todos los derechos reservados

First published in the United States by W.H. FREEMAN AND COMPANY, New York, New York and Basingstoke
© 1986, 1990, 1995, 2000, 2004 por W. H. Freeman and Company. All Rights Reserved
© Libermed Verlag, S.A. Montevideo, Uruguay

Traducción de
EDITORIAL MÉDICA PANAMERICANA S.A.
efectuada por los doctores Octavio Giovanniello, Andrea Méndez, Silvia Rondinone

Los editores han hecho todos los esfuerzos para localizar a los poseedores del copyright del material fuente utilizado. Si inadvertidamente hubieran omitido alguno, con gusto harán los arreglos necesarios en la primera oportunidad que se les presente para tal fin.

Gracias por comprar el original. Este libro es producto del esfuerzo de profesionales como usted, o de sus profesores, si usted es estudiante. Tenga en cuenta que fotocopiarlo es una falta de respeto hacia ellos y un robo de sus derechos intelectuales.

La medicina es una ciencia en permanente cambio. A medida que las nuevas investigaciones y la experiencia clínica amplían nuestro conocimiento, se requieren modificaciones en las modalidades terapéuticas y en los tratamientos farmacológicos. Los autores de esta obra han verificado toda la información con fuentes confiables para asegurarse de que ésta sea completa y acorde con los estándares aceptados en el momento de la publicación. Sin embargo, en vista de la posibilidad de un error humano o de cambios en las ciencias médicas, ni los autores, ni la editorial o cualquier otra persona implicada en la preparación o la publicación de este trabajo, garantizan que la totalidad de la información aquí contenida sea exacta o completa y no se responsabilizan por errores u omisiones o por los resultados obtenidos del uso de esta información. Se aconseja a los lectores confirmarla con otras fuentes. Por ejemplo, y en particular, se recomienda a los lectores revisar el prospecto de cada fármaco que planean administrar para cerciorarse de que la información contenida en este libro sea correcta y que no se hayan producido cambios en las dosis sugeridas o en las contraindicaciones para su administración. Esta recomendación cobra especial importancia con relación a fármacos nuevos o de uso infrecuente.

EDITORIAL MEDICA panamericana

Visite nuestra página web:
http://www.medicapanamericana.com

ARGENTINA
Marcelo T. de Alvear 2145 (C1122AAG) - Buenos Aires, Argentina
Tel.: (54-11) 4821-5520 / 2066 / Fax (54-11) 4821-1214
e-mail: info@medicapanamericana.com

COLOMBIA
Carrera 7a A Nº 69-19 - Santa Fe de Bogotá DC.
Tel.: (57-1) 235-4068 / Fax: (57-1) 345-0019
e-mail: infomp@medicapanamericana.com.co

ESPAÑA
Alberto Alcocer 24 (28036) - Madrid, España
Tel.: (34)91 1317800 / Fax: (34)91 1317805
e-mail: info@medicapanamericana.es

MÉXICO
Calzada de Tlalpan Nº 5022 entre Tezoquipa y Michoacán
Colonia La Joya - Delegación Tlalpan - 14090 - México D.F.
Tel.: (52-55) 5573-2300 / Fax: (52-55) 5655-0381
e-mail: infomp@medicapanamericana.com.mx

VENEZUELA
Edificio Polar, Torre Oeste, Piso 6, Of. 6-C
Plaza Venezuela, Urbanización Los Caobos,
Parroquia El Recreo, Municipio Libertador - Caracas
Depto. Capital
Tel.: (58-212) 793-2857/6906/5985/1666 Fax: (58-212) 793-5885
e-mail: info@medicapanamericana.com.ve

ISBN 950-06-1374-3
84-7903-913-2

Harvey, Lodish
Biología celular y molecular / Lodish Harvey...[et.al.] - 5a ed. -
Buenos Aires: Médica Panamericana, 2005.
1088 p. 28x22 cm

Traducido por: Andrea Méndez, Silvia Rondinone y Octavio Giovanniello

ISBN 950-06-1374-3

1. Biología Celular y Molecular I. Méndez, Andrea, trad. II. Rondinone, Silvia, trad. III. Giovanniello, Octavio, trad. IV. Título
CDD 611.018 1

Acerca de la tapa: la ilustración describe una disposición variada de proteínas integrales y periféricas de membrana. La bicapa fosfolipídica deriva de un modelo dinámico molecular. Las estructuras proteicas (determinadas por cristalografía de rayos X), de izquierda a derecha, son: centro de reacción fotosintético (bacteriano; 1prc), fotosistema I (bacteriano; 1jb0), acuaporina (1j4n), ATP sintasa (compuesto bovino [1e79] y bacteriano [1c17]). (Modelo dinámico molecular de H. Heller, M. Schaefer y K. Schulten, 1993, Simulación dinámica molecular de 200 lípidos en la fase de gel y de cristal líquido, *Phys. Chem.* 97:8343; H. Heller, 1993, *Simulation einer Lipidmembran auf einem Parallelrechner*, Ph. D. diss., University of Munich, Alemania.)

Hecho el depósito que dispone la ley 11.723.
Todos los derechos reservados.
Este libro o cualquiera de sus partes
no podrán ser reproducidos ni archivados en sistemas recuperables, ni transmitidos en ninguna forma o por ningún medio, ya sean mecánicos o electrónicos, fotocopiadoras, grabaciones o cualquier otro, sin el permiso previo de Editorial Médica Panamericana S.A.

© 2005. EDITORIAL MÉDICA PANAMERICANA S.A.
Marcelo T. de Alvear 2145 - Buenos Aires - Argentina
EDITORIAL MÉDICA PANAMERICANA S.A.
Alberto Alcocer 24 - Madrid - España

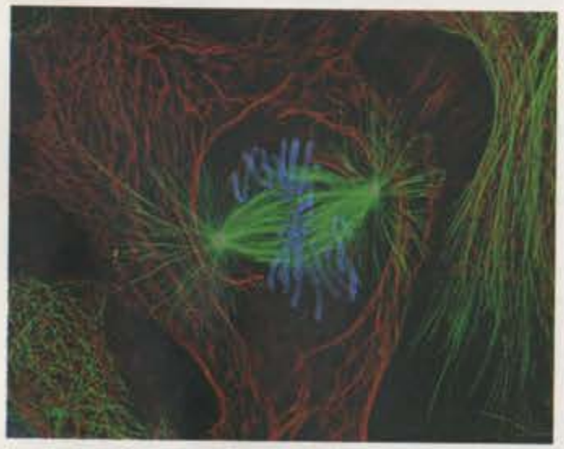
IMPRESO EN COLOMBIA
Por Panamericana Formas e Impresos S.A.
Quien sólo actúa como impresor.

A nuestros estudiantes y maestros,
de quienes seguimos aprendiendo,
y a nuestras familias, por su apoyo,
ánimo y amor

PREFACIO

Desde la publicación de la cuarta edición se produjeron avances espectaculares en muchas áreas de la biología celular y molecular que contribuyen a nuestra creciente comprensión de la belleza y la maravilla de este campo. La secuencia completa de los genomas del gusano, el ser humano, la rata, el arroz, la mosca y otros condujo a una nueva concepción de la evolución de las formas de vida, la regulación de la expresión génica y las funciones de los miembros individuales de familias multiproteicas. Ahora es posible analizar la expresión simultánea de miles de genes mediante el uso de la tecnología de micromatrices de DNA (*chip de DNA*) recién creada, que amplifica el conocimiento sobre el control génico durante el desarrollo y los estados patológicos. Las aplicaciones abundan, tanto las realizadas como las posibles, para la ciencia médica y para la ciencia animal y vegetal.

Estas aplicaciones dependen del conocimiento de los mecanismos internos y externos de las células, en especial el de las funciones de los muy diversos tipos de proteínas y lípidos sintetizados por cada célula eucarionte y de cómo las células interactúan con su ambiente. Comprender estos temas complejos les ha permitido a los biólogos moleculares conectar conocimientos antes disgregados y entenderlos como sistemas integrados. Dada esta integración, es posible comprender la biología en nuevos niveles de complejidad, como los grandes complejos de señalización multiproteicos en las células y los mecanismos por medio de los cuales las células interactúan entre sí.



▲ Huso mitótico en una célula en división

Nuevo equipo de autores



▲ De izquierda a derecha: Matt Scott, Chris Kaiser, Paul Matsudaira, Harvey Lodish, Arnie Berk y Monty Krieger

En la quinta edición, tres nuevos autores han sido los encargados de dirigir el libro hacia estos nuevos y excitantes descubrimientos:

Chris A. Kaiser es un biólogo celular y genetista que ha realizado contribuciones fundamentales para nuestra comprensión de los procesos básicos del plegamiento de proteínas intracelulares y el tráfico de proteínas de membrana.

Monty Krieger aportó conocimientos trascendentales acerca de la organización y el funcionamiento del aparato de Golgi; clonó y caracterizó proteínas de receptores "scavenger" y de receptores de HDL importantes para el movimiento del colesterol hacia el interior y el exterior de las células y por su influencia en la enfermedad coronaria.

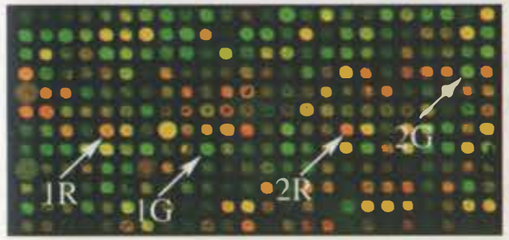
Matthew P. Scout es conocido por su trabajo en biología evolutiva y genética, sobre todo en áreas de señalización intercelular y genes homeobox, y por el descubrimiento de las funciones de los reguladores del desarrollo en el cáncer.

Agradecemos a Jim Darnell, Larry Zipursky y David Baltimore sus contribuciones excepcionales a las ediciones anteriores de *Biología celular y molecular*. Su visión y conocimientos se aprecian en numerosas partes de este libro.

Nuevos descubrimientos, nuevas metodologías

Biología celular y molecular proporciona una introducción clara a las técnicas y experimentos de científicos del pasado y del presente y demuestra cómo los descubrimientos importantes llevaron a la formación de los conceptos clave de este campo. Se utilizan numerosos organismos experimentales, desde levaduras hasta gusanos y ratones, para que los estudiantes puedan ver cómo los descubrimientos que surgen de esa experimentación ayudan a profundizar el conocimiento acerca de la biología y las enfermedades humanas. La siguiente lista incluye sólo algunos de los nuevos métodos experimentales y de los conceptos incluidos en esta edición:

- Explicación de cómo se utiliza la espectrometría de masa para identificar los componentes de grandes complejos multiproteicos (cap. 3).
- Material nuevo sobre la estructura de las proteínas de canales iónicos, que explica su selectividad iónica, sus propiedades de regulación de apertura y cierre y su papel en la conducción de los potenciales de acción por las células nerviosas (cap. 7).



▲ Análisis de micromatrices de DNA

- Uso experimental del RNA de interferencia (RNAi) para bloquear la expresión de genes específicos en muchos tipos de células eucariontes y de organismos (cap. 9).
- Uso de perfiles transcripcionales mediante las micromatrices de DNA (chips de DNA) para descubrir patrones de control génico en diversos sistemas y para diferenciar tipos de cánceres humanos que de otra forma parecerían similares (caps. 9, 11 y 23).
- Nuevos descubrimientos que conciernen a la función de la estructura de la cromatina en el control de la transcripción y la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) para analizar proteínas asociadas con genes específicos in vivo (cap. 11).
- Nuevos descubrimientos sobre el papel del RNA de 21-23 bases que se presentan en forma natural en el control de la expresión génica (cap. 12).
- Uso de transferencia de energía fluorescente para monitorizar las interacciones entre proteínas en las células vivas (cap. 13).
- Nueva información acerca del corte proteolítico intermembrana en varias vías de señalización (caps. 14 y 18).
- Abordaje de una vía recién identificada para la formación de brotes vesiculares desde el citosol utilizada también por los virus con envoltura lipídica, como el HIV (cap. 17).
- Tratamiento de fuerzas producidas por polimerización y proteínas motoras durante el movimiento celular (cap. 19).
- Descripción de cómo la microscopia macular revela el flujo de subunidades de tubulina hacia los polos del huso en la metafase (cap. 20).
- Conocimientos nuevos acerca de los mecanismos de condensación cromosómica y segregación en la mitosis, la regulación de la activación de origen en la fase S y las modificaciones del ciclo celular en la meiosis (cap. 21).
- Nuevo material acerca del papel de la división celular asimétrica al comienzo del desarrollo y la participación de complejos proteicos (cap. 22).
- Uso de la genética evolutiva para develar nuevas proteínas esenciales para la función de las células madre y la determinación del linaje celular (cap. 22).

Enfoque en principios fundamentales

Desde la publicación de la cuarta edición emergieron principios fundamentales a partir de nuestro conocimiento acerca de la biología celular y molecular. Esta quinta edición intenta presentar estos principios en forma clara a la vez que proporciona información experimental esencial. Estos cambios dieron como resultado un cuadro de contenidos reorganizado, incluidos varios capítulos nuevos y la reorganización de los temas dentro de los capítulos. Los cambios en el contenido en la quinta edición son los siguientes:

- Capítulo 1 nuevo, "La vida comienza con las células", proporciona una visión general conceptual del texto.
- La cobertura de los conceptos químicos básicos en el capítulo 2, "Fundamentos químicos", se centra en los más relevantes para la biología celular y molecular; además, se agregó una nueva sección que describe las unidades estructurales químicas celulares (aminoácidos, nucleótidos, carbohidratos, ácidos grasos y fosfolípidos).



▲ Modelo del complejo de Golgi y vesículas de transporte

• Desarrollo temático anticipado de las maquinarias proteicas y proteínas motoras en el capítulo 3 y el citoesqueleto en el capítulo 5.

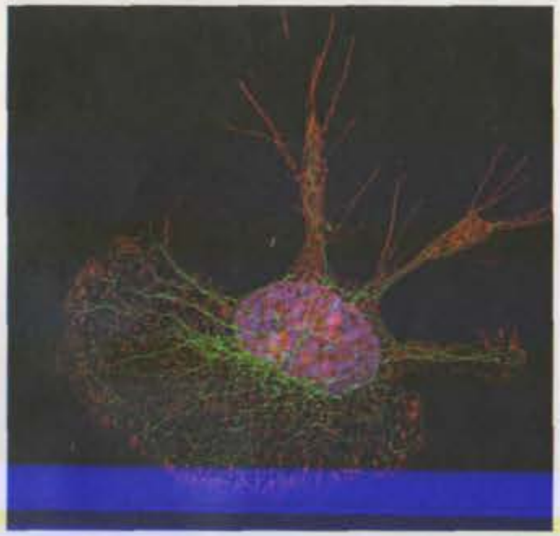
• El capítulo 4, "Mecanismos genéticos moleculares básicos", se restructuró para describir los mecanismos básicos de transcripción, traducción y replicación del DNA y las máquinas moleculares que llevan a cabo estos pr cesos. Se introduce el concepto de control transcripcional y se brinda una breve explicación del control génico en las bacterias.

• El tratamiento temprano, reorganizado y ampliado de las interacciones célula-célula y célula-matriz en el capítulo 6, "Integración de células en tejidos", que se centra en la adhesión al igual que en la señalización de afuera hacia adentro y de adentro hacia afuera, prepara a los estudiantes para reflexionar acerca de cómo las células se relacionan entre sí y con sus alrededores inmediatos.

• Descripción temprana del transporte a través de las membranas celulares y la energética celular, ahora en los capítulos 7 y 8.

• La explicación de las técnicas de genética y DNA recombinante se reorganizó y facilitó en el nuevo capítulo 9, "Técnicas de genética molecular y genómica". Aquí, y a lo largo del libro, se brindan varios ejemplos de micromatices de DNA para determinar los patrones de expresión de amplitud genética.

• Los capítulos 11 y 12, "Control transcripcional de la expresión génica" y "Control postranscripcional y transporte nuclear", analizan en su totalidad las células eucariontes. La descripción del control génico procarionte se desplazó al capítulo 4.



▲ Macrófago visualizado mediante microscopia de fluorescencia por desconvolución

• Desarrollo más amplio de las vías de transducción de señales y su integración dentro de la célula y del organismo en los capítulos 13 a 15, "Señalización en la superficie celular", "Vías de señalización que controlan la actividad génica" e "Integración de señales y controles génicos". Estos capítulos contienen abundante información proveniente de análisis genéticos y moleculares del desarrollo de numerosos organismos.

• El tratamiento de la clasificación de proteínas se reescribió en su totalidad y se separó en dos capítulos: 16 y 17, "Movimiento de proteínas en las membranas y los orgánulos" "Tránsito vesicular, secreción y endocitosis".

• Un nuevo capítulo, el 18, "Metabolismo y movimiento de los lípidos", se ocupa de esta clase de moléculas a veces pasadas por alto y analiza un interesante caso de estudio de la interacción bidireccional entre la biología celular y molecular básica y la medicina.

• Otro nuevo capítulo, el 22, "Nacimiento, linaje y muerte de la célula" incluye una discusión acerca de las células madre y el linaje celular, una nueva cobertura del linaje celular de *C. elegans*, una sección acerca de la importancia y regulación de la apoptosis (muerte celular programada) en el desarrollo, y las descripciones de la especificación del tipo celular en las levaduras y los músculos.

• La explicación de los mecanismos de la replicación del DNA y la recombinación se redujo, y el material acerca del daño y la reparación del DNA ahora se trata en el capítulo 23, "Cáncer".

• En el programa de ilustración, se realzan las leyendas para las figuras experimentales y se destaca el resultado experimental en el título.

• Se añaden preguntas de final del capítulo tituladas "Análisis de los datos", con la intención de que los estudiantes respondan un problema de investigación observando datos experimentales reales. La información incluida en la pregunta se ha tomado de un experimento tratado en el capítulo.

• Cada capítulo incluye una lista de referencias actualizada de los estudios más destacados y una revisión comprensiva de artículos que orienta a los estudiantes y profesores hacia una mayor información adicional.

Esperamos que estos cambios en la organización, el énfasis en las bases experimentales del conocimiento vigente, y la descripción de los nuevos y excitantes descubrimientos harán de esta quinta edición una herramienta útil para transmitir la complejidad de los sistemas biológicos y la deslumbrante belleza de la biología celular y molecular.

Nuevas formas de ver la biología celular y molecular

Cada ilustración ha sido inspeccionada, revisada y en caso necesario, cambiada para asegurar la claridad y compatibilidad visual en todo el libro. Las formas y, en la medida de lo posible, los colores de las ilustraciones conservan su correspondencia. Además, se simplificaron muchas de ellas. La simplicidad les facilita a los estudiantes encontrar los puntos centrales. Nuevas figuras inauguran cada capítulo y proporcionan un panorama de los detalles por venir. Cuando fue posible, las ilustraciones se acompañaron por las imágenes experimentales correspondientes, como las microfotografías, para establecer un puente sobre las diferencias entre los modelos y la realidad.

▶ Al comienzo de cada capítulo se presenta un panorama general a través de nuevas figuras

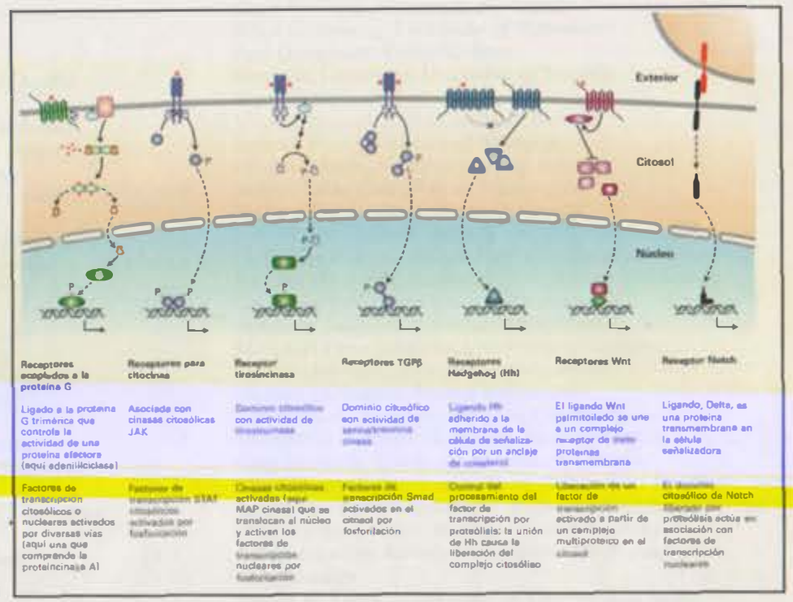
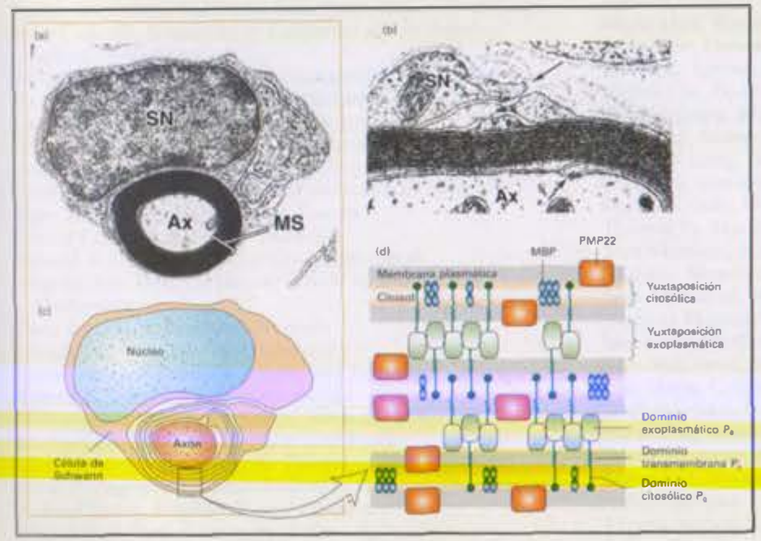


Figura 13-1



◀ Las ilustraciones se acompañan con imágenes experimentales

Figura 7-39

AGRADECIMIENTOS

No podríamos haber preparado esta edición sin la contribución de muchos colegas. Agradecemos a:

Susan M. Abmayr, *Pennsylvania State University*
Chris Akey, *Boston University*
Lizabeth Allison, *The College of William and Mary*
Marsha Altschuler, *Williams College*
Richard Anderson, University *of Texas Southwestern Medical Center*
Rosalie Anderson, *Tulane University*
Nigel S. Atkinson, *University of Texas at Austin*
Jnanankur Bag, *University of Guelph*
Robert Baker, *University of Southern California*
Lisa Banner, *California State University at Northridge*
Margarida Barroso, *University of Virginia*
Greg J. Beitel, *Northwestern University*
John D. Bell, *Brigham Young University*
Bill Bement, *University of Wisconsin at Madison*
Sanford Bernstein, *San Diego State University*
Stephen Blacklow, *Harvard Medical School*
Larry Blanton, *Texas Tech University*
Subharao Bondada, *University of Kentucky*
Roger Bradley, *Montana State University*
William S. Bradshaw, *Brigham Young University*
Gail Breen, *University of Texas at Austin*
Tony Bretscher, *Cornell University*
Robert J. Brooker, *University of Minnesota*
Michael S. Brown, *University of Texas Southwestern Medical Center*
Chris Burge, *Massachusetts Institute of Technology*
Peter Byres, *University of Washington*
Francisco Carrapico, *University of Lisbon*
Lynne Cassimeris, *Lehigh University*
T. Y. Chang, *Dartmouth University*
Randy W. Cohen, *California State University at Northridge*
John Colicelli, *University of California at Los Angeles, School of Medicine*
Nathan L. Collie, *Texas Tech University*
Kathleen Collins, *University of California at Berkeley*
Duane Compton, *Dartmouth University*
Reid Compton, *University of Maryland*
Andrew Conery, *University of California at Berkeley*
Scott Cooper, *University of Wisconsin at La Crosse*
Anne L. Cordon, *University of Toronto*
Gerald Crabtree, *Stanford University*
Donald B. DeFranco, *University of Pittsburgh*
Virginia Ann Dell, *Oklahoma School of Science and Mathematics*
Dave Denhardt, *Rutgers University*
Claude Deplan, *New York University*
Joyce Diwan, *Rensselaer Polytechnic Institute*
Robert S. Dotson, *Tulane University*
William Dowhan, *University of Texas at Houston*
Michael Edidin, *Johns Hopkins University*
Matt Elrod-Erickson, *Middle Tennessee State University*
Bevin P. Engelward, *Massachusetts Institute of Technology*
R. Paul Evans, *Brigham Young University*
Wayne Fagerberg, *University of New Hampshire*
Guy E. Farish, *Adams State College*
Richard Fehon, *Duke University*
Andrew Fire, *Carnegie Institute of Washington*
Michelle French, *University of Toronto*
Terrence G. Frey, *San Diego State University*
Marilyn Gist Farquhar, *University of California at San Diego*
David S. Goldfarb, *University of Rochester*
Elliot S. Goldstein, *Arizona State University*
Joseph Goldstein, *University of Texas Southwestern Medical Center*
Lawrence Goldstein, *University of San Diego*
Stephen Gould, *John Hopkins University*
Carla B. Green, *University of Virginia*
Bruce Greenberg, *University of Waterloo*
Paul Grenwood, *Colby College*
Barry M. Gumbiner, *University of Virginia*
Dipak Haldar, *St. John's University*
Vincent Hascall, *The Cleveland Clinic*
Jesse C. Hay, *University of Michigan*
Michele Heath, *University of Toronto*
Merrill Hille, *University of Washington*
Richard Holdeman, *Indiana University*
J. E. Honts, *Drake University*
H. Robert Horvitz, *Massachusetts Institute of Technology*
Richard Hynes, *Massachusetts Institute of Technology*
Carlos Jaramillo, *Los Andes University*
Margaret Johnson, *University of Arizona*
Margaret Dean Johnson, *University of Alabama*
Ross G. Johnson, *University of Minnesota*
Herbert M. Kagan, *Boston University*
The-hui Kao, *Pennsylvania State University*
Thomas C. S. Keller III, *Florida State University*
Greg M. Kelly, *University of Western Ontario*
Mike Klymkowsky, *University of Colorado at Boulder*
Jurgen Knohlich, *Institute for Molecular Pathology, Vienna*
Donna J. Koslowsky, *Michigan State University*
Balagurunathan Kuheran, *Massachusetts Institute of Technology*
Arthur D. Lander, *University of California at Irvine*
Torvard Laurent, *University of Uppsala*
David Leaf, *Western Washington University*
Jackie Lee, *University of Colorado*
Robert L. Levine. *McGill University*
Haifan Lin, *Duke University*
Troy Littleton, *Massachusetts Institute of Technology*
Xuan Liu, *University of California at Riverside*
Elizabeth Lord, *University of California at Riverside*
Ponzy Lu, *University of Pennsylvania*
Paula M. Lutz, *University of Missouri at Rolla*
Thomas H. MacRae, *Dalhousie University*
Tom Maniatis, *Harvard University*
Ruthann Mararacchia, *University of North Texas*
Joan Massagué, *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*
Andreas Matouschek, *Northwestern University*
Maryanne McClellan, *Reed College*
Sara McCowen, *Virginia Commonwealth University*
Jose Mejia, *California State University of Northbridge*
Stephanie Mel, *University of California at San Diego*
Hsiao-Ping Moore, *University of California at Berkeley*
James Moroney, *Louisiana State University*
Donald O. Natvig, *University of New Mexico at Albuquerque*
Martin Nemeroff, *Rutgers University*
Jeffrey Newman, *Lyconing College*
Alan Nighorn, *University of Arizona*

Laura J. Olsen, *University of Michigan*
Charlotte Omoto, *Washington State University*
Rekha Patel, *University of South Carolina*
Mark Peifer, *University of North Carolina at Chapel Hill*
Jacques Perrault, *San Diego State University*
Dorothy Pocock, *McGill University*
Tom Rapoport, *Harvard University*
Tal Raveh, *Stanford University*
Terrie Rife, *James Madison University*
Austen F. Riggs II, *University of Texas at Austin*
Peter J. Rizzo, *Texas A and M*
Daniel M. Roberts, *University of Tennessee*
Jane Rossant, *University of Toronto*
Robert D. Rosenberg, *Massachusetts Institute of Technology*
Gary Ruvkum, *Harvard University*
James Sellers, *National Institutes of Health*
Florence Schmieg, *University of Delaware*
Diane Shakes, *The College of William and Mary*
Ellen Shibuya, *University of Alberta at Edmonton*
Ke Shuai, *University of California at Los Angeles*
Roger Sloboda, *Dartmouth College*
Douglas Smith, *University of California at San Diego*
Walter D. Sotero-Esteva, *University of Central Florida*
Domenico Spadafora, *San Diego State College*
Philip Stanford, *Dartmouth College*
Jackie Stephens, *Louisiana State University*
Paul Sternberg, *California Institute of Technology*
Brian Storrie, *Virginia Polytechnic Institute and State University*
Jerome Strauss, *University of Pennsylvania*
Robert M. Stroud, *University of California, San Francisco*
Wes Sundquist, *University of Utah*
Markku Tammi, *University of Kuopio*
Robert M. Tombes, *Virginia Commonwealth University*
John L. Tymoczko, *Carleton College*
Elizabeth Vallen, *Swarthmore College*
Volker M. Vogt, *Cornell University*
Dennis R. Voelker, *National Jewish Medical Researcher Center*
Charles Walker, *University of New Hampshire*
Kenneth Walsh, *University of Washington*
Christopher Watters, *Middlebury College*
Steve Weiner, *Weizmann Institute of Science*
Patrick Weir, *Felician College*
Matt Welch, *University of California at Berkeley*
Beverly Wendland, *Johns Hopkins University*
Bruce Wightman, *Muhlenberg College*
David Worcester, *University of Missouri*
Michael Wormington, *University of Virginia*
Lijuan Zhang, *Washington University in St. Louis*
R. Andrew Zoeller, *Boston University*

Agradecemos a Kate Ahr, Tanya Awabdy, John Britch, Mary Louise Byrd, Marsha Cohen, Brian Donnelly, Patricia Marx, Melanie Mays, Joy Ohm, Bill O'Neal, Sara Tenney, Vicki Tomaselli, Jennifer Van Hove, Cecilia Varas, Susan Wein, Jennifer Zarr, Tobi Zausner y Patty Zimmerman por esta labor y por su buena voluntad para trabajar horas extras para producir un libro que se destaca en todo sentido.



Ruth Steyn

Sonia DiVittorio

En particular deseamos reconocer el talento y el compromiso de nuestras directoras de texto y de arte, Ruth Steyn y Sonia DiVittorio. Son directoras notables. Gracias a ambas por todo lo realizado en esta edición.

Gracias a nuestro propio equipo: Erica Beade of MBC Graphics (www.MBCGraphics.com) por su trabajo en el desarrollo del programa artístico, Sally Bittancourt, Mary Anne Donovan, Carol Eng, James Evans, George Kokkinogenis, Kathy Sweeney, Ketsada Syhakhom, Guicky Waller, Nicki Watson y Rob Welsh.
Por último, agradecemos especialmente a nuestras familias por inspirarnos y por cedernos el tiempo que se requiere para trabajar en un libro como éste.

CONTENIDOS ABREVIADOS

I Fundamentos químicos y moleculares

1. La vida comienza con las células 1
2. Fundamentos químicos 29
3. Estructura y función de las proteínas 59
4. Mecanismos genéticos moleculares básicos 101

II Organización celular y bioquímica

5. Biomembranas y arquitectura celular 147
6. Integración de células en tejidos 197
7. Transporte de iones y moléculas pequeñas a través de las membranas celulares 245
8. Energética celular 301

III Genética y biología molecular

9. Técnicas de genética molecular y genómica 351
10. Estructura molecular de genes y cromosomas 405
11. Control transcripcional de la expresión génica 447
12. Control génico postranscripcional y transporte nuclear 493

IV Señalización celular

13. Señalización en la superficie celular 533
14. Vías de señalización que controlan la actividad génica 571
15. Integración de señales y controles génicos 611

V Tránsito de membrana

16. Movimiento de proteínas en las membranas y en los orgánulos 657
17. Tránsito vesicular, secreción y endocitosis 701
18. Metabolismo y movimiento de los lípidos 743

VI Citoesqueleto

19. Microfilamentos y filamentos intermedios 779
20. Microtúbulos 817

VII Ciclo celular y control de la proliferación celular

21. Regulación del ciclo celular eucarionte 853
22. Nacimiento, linaje y muerte de la célula 899
23. Cáncer 935

ÍNDICE

1 Fundamentos químicos y moleculares

1 La vida comienza con las células 1

1.1 Diversidad y concordancia de las células 1

Todas las células son procariontes o eucariontes 2
Los organismos unicelulares nos ayudan y nos perjudican 4
Incluso las células pueden aparearse 6
Los virus son los parásitos primarios 6
Nos desarrollamos a partir de una sola célula 7
Las células madre, la clonación y las técnicas relacionadas ofrecen posibilidades excitantes pero surgen algunas preocupaciones 8

1.2 Las moléculas de la célula 8

Moléculas pequeñas que trasportan energía, transmiten señales y se unen en macromoléculas 8
Las proteínas otorgan estructura a las células y realizan la mayoría de las tareas celulares 9
Los ácidos nucleicos portan información codificada para realizar proteínas en el momento y lugar correctos 10
El genoma está condensado en cromosomas y se replica durante la división celular 11
Las mutaciones pueden ser buenas, malas o indiferentes 12

1.3 El trabajo de las células 13

Las células construyen y degradan numerosas moléculas y estructuras 14
Las células animales producen su ambiente externo y sus adhesivos propios 15
Las células cambian de forma y se mueven 15
Las células reciben y envían información 16
Las células regulan su expresión génica para satisfacer las necesidades cambiantes 16
Las células crecen y se dividen 17
Las células se mueren por una lesión agravada o por una programación interna 18

1.4 Investigación de las células y sus partes 19

La biología celular revela la forma, el tamaño y la localización de los componentes de la célula 20
La bioquímica revela la estructura molecular y la química de los componentes celulares purificados 21
La genética revela las consecuencias de los genes dañados 21
La genómica revela diferencias en la estructura y expresión de genomas enteros 22
La biología del desarrollo revela cambios en las propiedades de las células mientras se especializan 23
Elección del organismo experimental apropiado para el trabajo 24

1.5 Una perspectiva genómica sobre la evolución 26

Las proteínas metabólicas, el código genético y las estructuras de los orgánulos son casi universales 26
Muchos genes que controlan el desarrollo son muy similares en los seres humanos y en otros animales 26
Las ideas de Darwin respecto de la evolución de todos los animales son relevantes para los genes 27
La medicina obtiene información de investigaciones en otros organismos 28

2 Fundamentos químicos 29

2.1 Enlaces atómicos e interacciones moleculares 30

Cada átomo tiene un número y una geometría definidas de enlaces covalentes 30
En los enlaces covalentes polares los electrones se comparten de manera desigual 32
Los enlaces covalentes son mucho más fuertes y más estables que las interacciones no covalentes 32
Las interacciones iónicas son atracciones entre iones de carga opuesta 33
Los enlaces de hidrógeno determinan la solubilidad en agua de moléculas sin carga 33
Las interacciones de van der Waals se originan en dipolos transitorios 34
El efecto hidrófobo hace que las moléculas no polares se adhieran entre sí 35
La complementariedad molecular permite la unión estrecha y altamente específica de moléculas biológicas 36

2.2 Las unidades estructurales químicas de las células 37

Los aminoácidos que componen las proteínas difieren sólo en sus cadenas laterales 38
Para construir los ácidos nucleicos se utilizan cinco nucleótidos diferentes 40

Los monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos forman polisacáridos lineales y ramificados 41
Los ácidos grasos son precursores de muchos lípidos celulares 43
Los fosfolípidos se asocian en forma no covalente para constituir la bicapa, la estructura básica de las biomembranas 44

2.3 Equilibrio químico 46
Las constantes de equilibrio reflejan el grado de una reacción química 46
Las reacciones químicas en las células están en estado estacionario 46
Las constantes de disociación para reacciones de unión reflejan la afinidad de las moléculas que interaccionan 47
Los líquidos biológicos tienen valores de pH característicos 47
Los ácidos liberan iones hidrógenos y las bases los captan 48
Los amortiguadores (buffers) mantienen el pH de los líquidos intracelulares y extracelulares 48

2.4 Energética bioquímica 50
Para los sistemas biológicos son importantes varias formas de energía 50
Las células pueden transformar un tipo de energía en otro 50
La variación de la energía libre determina la dirección de una reacción química 51
La $\Delta G^{\circ\prime}$ de una reacción puede calcularse a partir de su K_{eq} 52
Una reacción química desfavorable puede producirse si se acopla con una reacción energéticamente favorable 52
La hidrólisis del ATP libera una cantidad sustancial de energía y conduce muchos procesos celulares 52
El ATP es generado durante la fotosíntesis y la respiración 53
El NAD^+ y el FAD acoplan muchas reacciones biológicas de oxidorreducción 54

3 Estructura y función de las proteínas 59

3.1 Estructura jerárquica de las proteínas 60
La estructura primaria de una proteína es su disposición lineal de aminoácidos 60
Las estructuras secundarias son los elementos cruciales de la arquitectura de las proteínas 61
El plegamiento global de una cadena polipeptídica proporciona su estructura terciaria 62
Los motivos son combinaciones regulares de estructuras secundarias 63
Los dominios estructurales y funcionales son módulos de estructura terciaria 64
Las proteínas se asocian en estructuras multiméricas y agrupaciones macromoleculares 66
Los miembros de las familias de proteínas tienen un antepasado evolutivo en común 67

3.2 Plegamiento, modificación y degradación de las proteínas 68
La información para el plegamiento de las proteínas está codificada en la secuencia 68
El plegamiento de proteínas in vivo es promovido por las chaperonas 69
Muchas proteínas experimentan modificaciones químicas de los residuos de aminoácidos 70
Diversos segmentos peptídicos de algunas proteínas son eliminados luego de la síntesis 70
La ubicuitina marca a las proteínas citosólicas para su degradación en los proteasomas 71
Las proteasas digestivas degradan a las proteínas dietarias 72
Las proteínas alternativamente plegadas están implicadas en enfermedades de evolución lenta 72

3.3 Las enzimas y el trabajo químico de las células 73
La especificidad y la afinidad de las uniones entre proteína y ligando dependen de la complementariedad molecular 73
Las enzimas son catalizadores altamente eficientes y específicos 74
El sitio activo de una enzima se une a sustratos y realiza la catálisis 75
La $V_{máx}$ y la K_m caracterizan una reacción enzimática 76
Las enzimas en una vía en común a menudo se asocian físicamente entre sí 76

3.4 Los motores moleculares y el trabajo mecánico de las células 79
Los motores moleculares convierten energía en movimiento 79
Todas las miosinas tienen dominios cabeza, cuello y cola, con funciones diferenciadas 81
Los cambios conformacionales en la cabeza de la miosina se acoplan a la hidrólisis del ATP para producir el movimiento 81

3.5 Mecanismos generales para la regulación de la función de las proteínas 82
La unión cooperativa aumenta la respuesta de una proteína a variaciones pequeñas de la concentración del ligando 83
La unión de un ligando puede inducir una liberación alostérica de las subunidades catalíticas o la transición hacia un estado con actividad diferente 83
El calcio y el GTP son muy utilizados para modular la actividad proteica 84
La fosforilación y la desfosforilación cíclica de proteínas regulan muchas funciones celulares 85
La escisión proteolítica activa o inactiva irreversiblemente algunas proteínas 85

Un nivel superior de regulación incluye el control de la localización proteica y su concentración 86

3.6 Purificación, detección y caracterización de las proteínas 86
La centrifugación puede separar partículas y moléculas que difieren en masa o densidad 86
La electroforesis separa moléculas según su relación carga:masa 87
La cromatografía en fase líquida separa proteínas por su masa, carga o afinidad de unión 90
Los ensayos de anticuerpos o de enzimas altamente específicas pueden detectar proteínas indviduales 92
Los radioisótopos son herramientas indispensables para detectar moléculas biológicas 93
La espectrometría de masa mide la masa de las proteínas y de los péptidos 94
La estructura primaria de las proteínas puede determinarse por métodos químicos y a partir de secuencias génicas 95
Los péptidos con una secuencia definida pueden sintetizarse químicamente 95
La conformación proteica se determina mediante métodos físicos sofisticados 95

4 Mecanismos genéticos moleculares básicos 101

4.1 Estructura de los ácidos nucleicos 102
Una hebra de ácidos nucleicos es un polímero lineal con direccionalidad de un extremo a otro 103
El DNA nativo es una doble hélice de hebras complementarias y antiparalelas 103
Las hebras del DNA pueden separarse de manera reversible 105
Muchas moléculas de DNA son circulares 106
Los diferentes tipos de RNA exhiben diversas conformaciones relacionadas con sus funciones 107

4.2 Transcripción de genes codificadores de proteínas y formación de mRNA funcional 108
La RNA polimerasa transcribe una hebra molde de DNA para formar una hebra complementaria de RNA 109
La organización de los genes es diferente en el DNA de procariontes y eucariontes 111
Los precursores de mRNA de los eucariontes son procesados para formar los mRNA funcionales 112
El corte y empalme alternativo del RNA incrementa el número de proteínas expresadas a partir de un gen eucarionte único 113

4.3 Control de la expresión génica en los procariontes 115
Se puede reprimir o activar la iniciación de la transcripción del operón *lac* 115
Moléculas pequeñas regulan la expresión de muchos genes bacterianos a través de los represores de unión al DNA 116
La transcripción por RNA polimerasa σ^{54} es controlada por activadores que se unen lejos del promotor 116
Muchas respuestas bacterianas son controladas por sistemas reguladores de dos componentes 117

4.4 Las tres funciones del RNA en la traducción 119
El RNA mensajero exporta información del DNA en un código genético de tres letras 119
La estructura plegada de tRNA promueve sus funciones decodificadoras 121
A menudo se produce un apareamiento no estándar de bases entre codones y anticodones 122
La aminoacil-tRNA sintetasa activa los aminoácidos al unirlos mediante enlaces covalentes a los tRNA 123
Los ribosomas son estructuras sintetizadoras de proteínas 123

4.5 Pasos de la síntesis de proteínas sobre los ribosomas 125
El codón de iniciación AUG es reconocido por el metionil-$tRNA_i^{Met}$ 125
La iniciación de la traducción suele ocurrir cerca del primer AUG más próximo al extremo 5' de un mRNA 126
Durante la elongación de la cadena cada aminoacil-tRNA entrante se mueve a través de tres sitios ribosómicos 127
La traducción es finalizada por factores de liberación una vez que se alcanza un codón de terminación 129
Los polisomas y el reciclaje rápido de los ribosomas aumentan la eficiencia de la traducción 130

4.6 Replicación del DNA 131
La DNA polimerasa requiere un cebador para iniciar la replicación 132
El DNA bicatenario se desenrolla y las hebras hijas se forman en la horquilla de replicación del DNA 133
La helicasa, la primasa, la DNA polimerasa y otras proteínas participan en la replicación del DNA 133
La replicación del DNA suele ocurrir de manera bidireccional a partir de cada origen 135

4.7 Virus: parásitos del sistema genético celular 137
El rango de huéspedes de los virus es restringido 137
Las cápsides virales son disposiciones regulares de uno o algunos tipos de proteína 137
Los virus pueden ser clonados y contados por ensayos en placa 138
Los ciclos líticos de crecimiento virales conducen a la muerte de las células huéspedes 139
El DNA viral se integra al genoma de la célula huésped en algunos ciclos de crecimiento viral no líticos 141

II Organización celular y bioquímica

5 Biomembranas y arquitectura celular 147

5.1 Biomembranas: composición lipídica y organización estructural 149

Se pueden encontrar tres clases de lípidos en las biomembranas 150
La mayoría de los lípidos y muchas proteínas tienen movilidad lateral en las biomembranas 152
La composición lipídica influye en las propiedades físicas de las membranas 153
Los lípidos de la membrana suelen distribuirse de manera desigual entre las hojuelas exoplasmática y citosólica 155
El colesterol y los esfingolípidos se agrupan con proteínas específicas en microdominios de membrana 156

5.2 Biomembranas: componentes proteicos y funciones básicas 157

Las proteínas interactúan con las membranas de tres maneras diferentes 157
Las hélices α inmersas en la membrana son las principales estructuras secundarias de la mayoría de las proteínas transmembrana 158
En las porinas múltiples cadenas β forman "barriles" que atraviesan la membrana 160
Las cadenas hidrocarbonadas unidas en forma covalente anclan algunas proteínas a las membranas 160
Todas las proteínas transmembrana y los glucolípidos están orientados asimétricamente en la bicapa 161
Las interacciones con el citoesqueleto impiden la movilidad de las proteínas integrales de membrana 162
Los motivos de unión a lípidos ayudan a dirigir las proteínas periféricas a la membrana 162
La membrana plasmática cumple muchas funciones comunes en todas las células 164

5.3 Orgánulos de la célula eucarionte 165

Los endosomas toman macromoléculas solubles del exterior de la célula 165
Los lisosomas son orgánulos acídicos que contienen una batería de enzimas degradativas 165
Los peroxisomas degradan ácidos grasos y compuestos tóxicos 168
El retículo endoplasmático es una red de membranas internas interconectadas 168
El complejo de Golgi procesa y clasifica las proteínas secretadas y de membrana 169
Las vacuolas vegetales almacenan moléculas pequeñas y le permiten a una célula alargarse con rapidez 170
El núcleo contiene el genoma de DNA, el aparato sintetizador de RNA y una matriz fibrosa 171
Las mitocondrias son los sitios principales de producción de ATP en las células aeróbicas 171
Los cloroplastos contienen compartimientos internos en los cuales tiene lugar la fotosíntesis 172

5.4 El citoesqueleto: componentes y funciones estructurales 173

Tres tipos de filamentos componen el citoesqueleto 174
Los filamentos del citoesqueleto están organizados en haces y retículos 176
Los microfilamentos y las proteínas de unión a la membrana forman un esqueleto subyacente a la membrana plasmática 176
Los filamentos intermedios sostienen la membrana nuclear y ayudan a conectar las células para formar tejidos 177
Los microtúbulos se extienden desde los centrosomas y organizan ciertas estructuras subcelulares 177

5.5 Purificación de las células y de sus partes 178

La citometría de flujo separa distintos tipos celulares 178
La ruptura de las células libera sus orgánulos y demás elementos celulares 180
La centrifugación puede separar muchos tipos de orgánulos 181
Los anticuerpos específicos de orgánulos son útiles para preparar orgánulos altamente purificados 181
Las proteínas pueden ser extraídas de las membranas por la acción de detergentes o soluciones salinas concentradas 182

5.6 Visualización de la arquitectura celular 184

Un microscopio detecta, magnifica y discrimina objetos pequeños 184
Las muestras para un microscopio se deben fijar, seccionar y teñir para obtener imágenes de detalles subcelulares 185
La microscopia de contraste de fase y la de contraste de interferencia diferencial visualizan células vivas no teñidas 186
El microscopio de fluorescencia puede localizar y cuantificar moléculas específicas en células vivas y fijadas 187
La microscopia de barrido confocal y la de desconvulsión proveen imágenes más nítidas de objetos tridimensionales 189
La resolución del microscopio electrónico de transmisión es muy superior a la del microscopio óptico 190
La microscopia electrónica de muestras recubiertas con metales puede revelar rasgos superficiales de las células y de sus componentes 192
Se pueden construir modelos tridimensionales a partir de imágenes del microscopio 192

6 Integración de células en tejidos 197

6.1 Adhesión entre células y entre célula y matriz: una visión general 199

Las moléculas de adhesión celular se unen entre sí y con las proteínas intracelulares 199
La matriz extracelular participa en la adhesión y en otras funciones 201
La diversidad de los tejidos animales depende de la evolución de moléculas de adhesión con diversas propiedades 201

6.2 Tejidos epiteliales laminares: uniones y moléculas de adhesión 201

Las uniones especializadas ayudan a definir la estructura y función de las células epiteliales 202
Las adhesiones homófilas dependientes del Ca^{2+} entre células, en las uniones adhesivas y en los desmosomas son mediadas por las cadherinas 204
Las uniones estrechas sellan las cavidades corporales y restringen la difusión de los componentes de la membrana 206
Las diferencias en la permeabilidad de las uniones estrechas pueden controlar el pasaje de moléculas pequeñas a través del epitelio 208
Muchas interacciones entre célula y matriz y algunas entre células son mediadas por integrinas 208

6.3 La matriz extracelular de las láminas epiteliales 209

La lámina basal proporciona un soporte para las láminas epiteliales 210
El colágeno tipo IV que forma láminas es el componente estructural principal de la lámina basal 211
La lamimina, una proteína multiadhesiva de la matriz, ayuda a establecer enlaces cruzados entre los componentes de la lámina basal 212
Los proteoglucanos secretados y los de la superficie celular son expresados por muchos tipos de célula 213
Las modificaciones en las cadenas de glucosamino-glucanos (GAG) pueden determinar las funciones de los proteoglucanos 215

6.4 La matriz extracelular de los tejidos no epiteliales 216

Los colágenos fibrilares son las principales proteínas fibrosas de la matriz extracelular del tejido conectivo 217
La formación de las fibrillas de colágeno comienza en el retículo endoplasmático y se completa fuera de la célula 217
Los colágenos tipos I y II forman diversas estructuras y se asocian con distintos colágenos no fibrilares 218
El hialuronano resiste la compresión y facilita la migración celular 219
La asociación de hialuronano y proteoglucanos forma agregados complejos grandes 219
Las fibronectinas conectan muchas células a colágenos fibrosos y otros componentes matriciales 220

6.5 Interacciones adhesivas y células no epiteliales 223

Las estructuras adhesivas que contienen integrina conectan física y funcionalmente la matriz extracelular y el citoesqueleto en las células no epiteliales 223
La diversidad de las interacciones entre integrina y ligando contribuye a numerosos procesos biológicos 225
La adhesión entre célula y matriz es modulada por variaciones en la actividad de unión y por la cantidad de integrinas 225
Las conexiones moleculares entre la matriz extracelular y el citoesqueleto son defectuosas en la distrofia muscular 226
La adhesión entre células independiente de Ca^{2+} en los tejidos neuronales y en otros tejidos es mediada por CAM de la superfamilia de inmunoglobulinas 227
El movimiento de los leucocitos hacia el interior de los tejidos depende de una secuencia precisa de diversas combinaciones de interacciones adhesivas 227
Las umones de hendidura compuestas de conexinas les permiten a las moléculas pequeñas pasar entre las células adyacentes 229

6.6 Tejidos vegetales 231

La pared de la célula vegetal es un laminado de fibrillas de celulosa en una matriz de glucoproteínas 232
La pérdida de rigidez de la pared celular permite la elongación de las células vegetales 232
Los plasmodesmos conectan directamente el citosol de células adyacentes en las plantas superiores 233
Sólo unas pocas moléculas adhesivas han sido identificadas en las plantas 234

6.7 Crecimiento y uso de los cultivos celulares 235

El cultivo de células animales requiere medios ricos en nutrientes y superficies sólidas especiales 235
Los cultivos celulares primarios y las cepas celulares tienen un período de vida limitado 236
Las células transformadas proliferan indefinidamente en un cultivo 236
Las células híbridas denominadas hibridomas producen abundantes anticuerpos monoclonales 237
El medio HAT suele utilizarse para aislar células híbridas 239

7 Transporte de iones y moléculas pequeñas a través de las membranas celulares 245

7.1 Panorama general del transporte de membrana 246

Algunas moléculas atraviesan las membranas por difusión pasiva 246
Las proteínas de membrana median el transporte de la mayoría de las moléculas y de todos los iones a través de las biomembranas 246
Varias características distinguen el transporte uniporte de la difusión pasiva 248
El uniportador GLUT1 transporta glucosa hacia el interior de la mayoría de las células de mamíferos 249
El genoma humano codifica una familia de proteínas GLUT exportadoras de azúcar 250
Las proteínas exportadoras pueden estar enriquecidas dentro de células y membranas artificiales 250

7.2 Bombas impulsadas por ATP y el ambiente iónico intracelular 252

Distintas clases de bombas exhiben propiedades estructurales y funcionales características 252
Las bombas iónicas impulsadas por ATP generan los gradientes iónicos a través de las membranas celulares y los mantienen 253
La Ca^{2+}-ATPasa de los músculos bombea iones desde el citosol hacia el interior del retículo sarcoplasmático 254
La activación mediada por calmodulina de la Ca^{2+}-ATPasa de la membrana plasmática conduce a la salida rápida de Ca^{2+} 256
La Na^+/K^+-ATPasa mantiene las concentraciones intracelulares de Na^+ y K^+ en las células animales 256
Las H^+ ATPasas de clase V bombean protones a través de las membranas lisosómicas y vacuolares 257
Las permeasas bacterianas son proteínas ABC que introducen diversos nutrientes desde el medio ambiente 258
Se conocen alrededor de 50 bombas ABC de moléculas pequeñas en los mamíferos 258
Las proteínas ABC que exportan sustratos solubles en lípidos podrían operar por un mecanismo de flipasas 259

7.3 Canales iónicos no regulados y potencial de membrana en reposo 260

El movimiento selectivo de iones crea una diferencia de potencial eléctrico transmembrana 261
El potencial de membrana en las células animales depende en gran medida de los canales del K^+ en reposo 262
Los canales iónicos contienen un filtro selectivo formado a partir de hélices α transmembrana y segmentos P conservados 263
La técnica del pinzamiento zonal de membrana *(patch clamp)* permite la medición de los movimientos iónicos a través de canales individuales 265
Los canales iónicos nuevos pueden ser caracterizados por una combinación de expresión de ovocitos y la técnica del patch clamp 266
La entrada de Na^+ en las células de mamíferos tiene una variación de la energía libre (ΔG) negativa 267

7.4 Cotransporte mediante simportadores y antiportadores 268

Los simportadores ligados al Na^+ transportan aminoácidos y glucosa hacia el interior de las células animales en contra de gradientes altos de concentración 268
El antiportador ligado al Na^+ exporta Ca^{2+} desde las células del músculo cardíaco 269
Varios cotransportadores regulan el pH citosólico 269
Numerosas proteínas transportadoras permiten que las vacuolas vegetales acumulen metabolitos y iones 270

7.5 Movimientos del agua 271

La presión osmótica causa el movimiento del agua a través de las membranas 271
Diferentes células tienen diversos mecanismos para controlar su volumen 272
Las acuaporinas aumentan la permeabilidad del agua de la membrana celular 273

7.6 Transporte transepitelial 274

Se requieren múltiples proteínas transportadoras para mover glucosa y aminoácidos a través del epitelio 274
La terapia de rehidratación simple depende del gradiente osmótico creado por la absorción de glucosa y Na^+ 275
Las células parietales acidifican el contenido gástrico mientras mantienen un pH citosólico neutro 275

7.7 Canales iónicos regulados por voltaje y propagación de potenciales de acción en las células nerviosas 276

Regiones especializadas de las neuronas llevan a cabo diferentes funciones 276
La magnitud del potencial de acción es cercana al E_{Na} 278
La apertura y el cierre secuencial de los canales del Na^+ y del K^+ regulados por voltaje generan potenciales de acción 279
Los potenciales de acción se propagan unidireccionalmente sin disminución 281
Las células nerviosas pueden conducir muchos potenciales de acción en ausencia de ATP 282
Todos los canales iónicos regulados por voltaje tienen estructuras similares 282
Las hélices α S4 sensoras de voltaje se mueven en respuesta a la despolarización de la membrana 283
El movimiento del segmento inactivador del canal hacia el interior del poro abierto bloquea el flujo de iones 284
La mielinización incrementa la velocidad de conducción del impulso 284
Los potenciales de acción "saltan" de nodo a nodo en los axones mielinizados 286

7.8 Neurotransmisores receptores y proteínas transportadoras en la transmisión de señales en las sinapsis 287

Los neurotransmisores son transportados en vesículas sinápticas por proteínas antiportadoras ligadas a H^+ 287
La entrada de Ca^{2+} a través de los canales del Ca^{2+} regulados por voltaje desencadena la liberación de neurotransmisores 288
La señalización en las sinapsis es usualmente terminada por degradación o recaptación de los neurotransmisores 290
La apertura de los canales de cationes regulados por acetilcolina conduce a la contracción muscular 290
Las cinco subunidades en el receptor nicotínico de acetilcolina contribuyen al canal iónico 291
Las células nerviosas toman una decisión de todo o nada para generar un potencial de acción 293
El sistema nervioso utiliza circuitos de señalización compuestos de múltiples neuronas 294

8 Energética celular 301

8.1 Oxidación de la glucosa y de los ácidos grasos a CO^2 304

Las enzimas citosólicas convierten la glucosa en piruvato durante la glucólisis 304
El metabolismo anaerobio de cada molécula de glucosa produce sólo dos moléculas de ATP 305
Las mitocondrias poseen dos membranas distintas desde el punto de vista estructural y funcional 307
El acetil CoA derivado del piruvato es oxidado para producir CO_2 y coenzimas reducidas en la mitocondria 309
Los transportadores de la membrana mitocondrial interna permiten la incorporación de electrones a partir del NADH citosólico 311
La oxidación mitocondrial de los ácidos grasos está acoplada a la formación de ATP 312
La oxidación peroxisómica de ácidos grasos no genera ATP 313
La velocidad de oxidación de la glucosa se ajusta para satisfacer las necesidades de ATP de la célula 313

8.2 Transporte de electrones y generación de la fuerza protón-motriz 315

La fuerza protón-motriz en la mitocondria se debe principalmente a un gradiente de voltaje a través de la membrana interna 317
El transporte de electrones en la mitocondria está acoplado a la translocación de protones 317
Los electrones fluyen desde el $FADH_2$ y el NADH al O_2 a través de una serie de cuatro complejos multiproteicos 318
Los potenciales de reducción de los transportadores de electrones favorecen el flujo de electrones desde el NADH hacia el O_2 321
La CoQ y tres complejos transportadores de electrones bombean protones hacia afuera de la matriz mitocondrial 322
El ciclo Q incrementa el número de protones translocados a medida que los electrones fluyen a través del complejo $CoQH_2$-citocromo *c* reductasa 323

8.3 Generación de la fuerza protón-motriz para procesos que requieren energía 325

Algunas proteínas de la membrana plasmática bacteriana catalizan el transporte de electrones y la síntesis acoplada de ATP 326
La ATP sintasa comprende dos complejos multiproteicos denominados F_0 y F_1 326
La rotación de la subunidad γ de F_1, conducida por los movimientos de protones a través de F_0, impulsa la síntesis de ATP 327
El intercambio de ATP-ADP a través de la membrana mitocondrial interna es impulsado por la fuerza protón-motriz 329
La velocidad de oxidación mitocondrial suele depender de los niveles de ADP 330
La mitocondria de la grasa parda contiene un desacoplante de la fosforilación oxidativa 330

8.4 Etapas de la fotosíntesis y pigmentos que absorben luz 331

La fotosíntesis en las plantas se lleva a cabo en las membranas tilacoides 331
Tres de las cuatro etapas de la fotosíntesis se producen sólo durante la iluminación 332
Cada fotón de luz tiene una cantidad definida de energía 333
Los fotosistemas comprenden un centro de reacción y complejos asociados de recolección de luz 333
El transporte fotoelectrónico desde el centro de reacción energizado de la clorofila *a* produce una separación de cargas 334
Los complejos de recolección de luz incrementan la eficiencia de la fotosíntesis 335

8.5 Análisis molecular de los fotosistemas 336

El único fotosistema de las bacterias violetas genera una fuerza protón-motriz pero no O_2 336
Los cloroplastos contienen dos fotosistemas funcional y espacialmente distintos 338
El flujo lineal de electrones a través de ambos fotosistemas de las plantas, PSII y PSI, genera una fuerza protón-motriz, O_2 y NADPH 339
Un complejo productor de oxígeno se localiza sobre la superficie luminal del centro de reacción PSII 339

El flujo cíclico de electrones a través del PSI genera una fuerza protón-motriz, pero no NADP ni O_2 340
La actividad relativa de los fotosistemas I y II está regulada 340

8.6 Metabolismo del CO^2 durante la fotosíntesis 342

La fijación del CO_2 se produce en la estroma de los cloroplastos 342
La síntesis de sacarosa por incorporación del CO_2 fijado se completa en el citosol 344
La luz y la rubisco activasa estimulan la fijación de CO_2 344
La fotorrespiración, que compite con la fotosíntesis, está reducida en las plantas que fijan el CO_2 por la vía C_4 345
La sacarosa es transportada desde las hojas a través del floema a todos los tejidos vegetales 347

III Genética y biología molecular

9 Técnicas de genética molecular y genómica 351

9.1 Análisis genético de mutaciones para identificar y estudiar genes 352

Los alelos mutantes recesivos y dominantes por lo general tienen efectos opuestos en la función del gen 353
La segregación de mutaciones en experimentos de cruzas de cepas revela si son dominantes o recesivas 354
Las mutaciones condicionales pueden utilizarse para estudiar genes esenciales en la levadura 356
Las mutaciones letales recesivas en diploides pueden identificarse por endogamia y mantenerse en los heterocigotos 357
Los análisis de complementación determinan si distintas mutaciones recesivas se encuentran en el mismo gen 357
Los mutantes dobles son útiles para la valoración del orden en el cual funcionan las proteínas 358
La supresión genética y la letalidad sintética pueden revelar proteínas interactuantes o redundantes 359

9.2 Clonación del DNA mediante métodos de DNA recombinante 361

Las enzimas de restricción y las DNA ligasas permiten la inserción de los fragmentos de DNA en los vectores de clonación 361
Los plásmidos de *E. coli* son vectores apropiados para la clonación de fragmentos aislados de DNA 363
Los bacteriófagos λ son vectores que permiten la construcción eficiente de grandes genotecas de DNA 364
Los cDNA preparados por transcripción inversa de los mRNA celulares pueden ser clonados para preparar genotecas de cDNA 365
Las genotecas pueden analizarse mediante hibridación a sondas de oligonucleótidos 367
Las sondas de oligonucleótidos se diseñan tomando como base secuencias proteicas parciales 368
Las genotecas de levadura pueden construirse con vectores lanzaderas (*shuttle*) y detectarse por complementación funcional 369

9.3 Caracterización y uso de fragmentos clonados de DNA 371

La electroforesis en gel permite la separación del DNA del vector de los fragmentos clonados 371
Las moléculas de DNA clonado son secuenciadas con rapidez mediante el método de terminación de cadena o método didesoxi 372
La reacción en cadena de la polimerasa amplifica una secuencia específica de DNA a partir de una mezcla compleja 375
Las técnicas de inmunotransferencia permiten la detección de fragmentos de DNA y mRNA específicos con sondas de DNA 376
Los sistemas de expresión de *E. coli* pueden producir grandes cantidades de proteínas a partir de genes clonados 377
Los vectores de expresión plasmídicos pueden diseñarse para utilizarlos en células animales 378

9.4 Genómica: análisis amplio del genoma, de la estructura de genes y de la expresión 380

Las secuencias almacenadas sugieren funciones de genes y proteínas de identificación reciente 380
La comparación de secuencias relacionadas de especies diferentes puede otorgar claves acerca del parentesco evolutivo entre proteínas 382
Los genes pueden identificarse dentro de secuencias del DNA genómico 383
El tamaño del genoma de un organismo no está directamente relacionado con su complejidad biológica 384
Las micromatrices de DNA pueden utilizarse para evaluar la expresión de muchos genes de una vez 385
El análisis de grupos *(clusters)* de experimentos de expresión múltiple identifica genes corregulados 386

9.5 Inactivación de la función de genes específicos en los eucariontes 387

Los genes de levaduras normales pueden ser reemplazados con alelos mutantes mediante recombinación homóloga 387
La transcripción de genes ligados a un promotor regulable puede controlarse experimentalmente 388
Se pueden inactivar permanentemente genes específicos en la línea germinal de ratones 389
La recombinación de células somáticas puede inactivar genes en tejidos específicos 390

Los alelos dominantes negativos pueden inhibir funcionalmente algunos genes 391
Las moléculas de RNA de hebra doble pueden interferir en la función génica al seleccionar el mRNA para su destrucción 393

9.6 Identificación y localización de genes de enfermedades humanas 394

Muchas enfermedades hereditarias muestran uno de los tres patrones principales de herencia 395
El análisis de recombinación puede posicionar genes sobre un cromosoma 396
Los polimorfismos del DNA se utilizan en el mapeo de ligamiento de mutaciones humanas 396
Los estudios de ligamiento pueden mapear genes de enfermedades con una resolución de alrededor de 1 centimorgan 397
Se necesita un análisis posterior para localizar el gen de una enfermedad en el DNA clonado 398
Muchas enfermedades hereditarias son el resultado de múltiples defectos genéticos 398

10 Estructura molecular de genes y cromosomas 405

10.1 Definición molecular de gen 406

La mayoría de los genes eucariontes producen mRNA monocistrónicos y contienen intrones largos 406
En los genomas eucariontes se encuentran unidades de transcripción simples y complejas 407

10.2 Organización cromosómica de los genes y del DNA no codificador 408

Los genomas de numerosos organismos contienen mucho DNA no funcional 408
Los genes codificadores de proteínas pueden ser solitarios o pertenecer a una familia de genes 409
Los genes repetidos en tándem codifican rRNA, tRNA e histonas 411
La mayoría de los DNA de secuencia simple se concentra en localizaciones cromosómicas específicas 412
El *fingerprinting* del DNA depende de las diferencias en la longitud de los DNA de secuencia simple 413

10.3 DNA móvil 414

El movimiento de elementos móviles involucra al DNA o a un intermediario del RNA 414
Los elementos móviles que se mueven como DNA están presentes en los procariontes y en los eucariontes 415
Algunos retrotransposones contienen LTR y se comportan como retrovirus intracelulares 417
Los retrotransposones que carecen de LTR se mueven por un mecanismo distinto 420
Es probable que los elementos de DNA móviles hayan tenido una influencia significativa sobre la evolución 422

10.4 Organización estructural de los cromosomas eucariontes 424

El DNA nuclear de los eucariontes se asocia con proteínas histonas para formar cromatina 424
La cromatina existe en las formas condensada y extendida 424
La modificación de las colas de histona controla la condensación de la cromatina 426
Las proteínas no histonas proporcionan un armazón estructural para los bucles largos de cromatina 427
La cromatina contiene pequeñas cantidades de otras proteínas además de las histonas y de las proteínas del armazón 429
Los cromosomas eucariontes contienen una molécula lineal de DNA 429

10.5 Morfología y elementos funcionales de los cromosomas eucariontes 430

El número, el tamaño y la forma de los cromosomas en metafase son específicos de especie 430
Durante la metafase, los cromosomas pueden distinguirse por los patrones de bandas y la coloración 431
Los cromosomas politénicos en interfase surgen por amplificación del DNA 433
La heterocromatina consiste en regiones cromosómicas que no se desenrollan 433
Se requieren tres elementos funcionales para la replicación y la herencia estable de cromosomas 433
Las secuencias de los centrómeros varían enormemente en longitud 435
La adición de secuencias teloméricas por la telomerasa evita el acortamiento de los cromosomas 435
Los cromosomas artificiales de levadura se pueden utilizar para clonar fragmentos de DNA de megabases de longitud 437

10.6 DNA de los orgánulos 438

La mitocondria contiene múltiples moléculas de mtDNA 438
El mtDNA es heredado en forma citoplasmática y codifica rRNA, tRNA y algunas proteínas mitocondriales 438
El tamaño y la capacidad de codificación del mtDNA varían considerablemente en los diferentes organismos 439
Los productos de los genes mitocondriales no son exportados 440
Los códigos genéticos mitocondriales difieren del código nuclear estándar 441
Las mutaciones en el DNA mitocondrial causan varias enfermedades genéticas en los seres humanos 441
Los cloroplastos contienen DNA circulares grandes que codifican más de cien proteínas 442

11 Control transcripcional de la expresión génica 447

11.1 Panorama general del control génico en los eucariontes y las RNA polimerasas 448

La mayoría de los genes de los eucariontes superiores se regulan mediante el control de su transcripción 448
Los elementos reguladores del DNA en los eucariontes a menudo se encuentran a kilobases de los sitios de inicio 449
Tres polimerasas catalizan la formación de RNA diferentes en los eucariontes 450
La subunidad más grande de la RNA polimerasa II tiene una repetición carboxilo terminal esencial 452
La RNA polimerasa II inicia la transcripción en las secuencias de DNA correspondientes al casquete 5' de los mRNA 453

11.2 Secuencias reguladoras en los genes codificantes de proteínas 454

La caja TATA, los iniciadores y las islas CpG funcionan como promotores en el DNA eucarionte 454
Los elementos proximales del promotor ayudan a regular los genes eucariontes 455
Los amplificadores distantes a menudo estimulan la transcripción por RNA polimerasa II 456
La mayoría de los genes eucariontes están regulados por múltiples elementos de control transcripcional 457

11.3 Activadores y represores de la transcripción 458

Los ensayos de huellas de DNA *(footprinting)* de retardo en gel (*gel shift*) detectan las interacciones entre las proteínas y el DNA 458
Los activadores son proteínas modulares compuestas de dominios funcionales diferentes 461
Los represores son la inversa funcional de los activadores 462
Los dominios de unión al DNA pueden clasificarse en varios tipos estructurales 463
Las interacciones del factor de transcripción incrementan las opciones del control génico 465
Dominios de activación y represión estructuralmente diversos regulan la transcripción 467
Los complejos multiproteicos se forman sobre los amplificadores 468

11.4 Iniciación de la transcripción por la RNA polimerasa II 469

Los factores generales de transcripción ubican las RNA polimerasas II en los sitios de inicio y asisten en la iniciación 469
El ensamblaje secuencial de proteínas forma el complejo de preiniciación de la transcripción de la Pol II in vitro 469
La iniciación de la transcripción in vivo mediante la polimerasa II requiere proteínas adicionales 470

11.5 Mecanismos moleculares de la activación y represión de la transcripción 471

La formación de la heterocromatina silencia la expresión génica en los telómeros, cerca de los centrómeros y en otras regiones 471
Los represores pueden dirigir la desacetilación de las histonas en genes específicos 474
Los activadores pueden dirigir la acetilación de las histonas en genes específicos 475
Las modificaciones de residuos específicos en las colas de histonas controlan la condensación de la cromatina 476
Los factores de remodelación de la cromatina ayudan a activar o reprimir algunos genes 476
El complejo mediador forma un puente molecular entre los dominios de activación y la Pol II 477
La transcripción de muchos genes requiere la unión ordenada de activadores y la acción de coactivadores 478
El sistema de dos híbridos de las levaduras aprovecha la flexibilidad del activador para detectar cDNA que codifican proteínas en interacción 480

11.6 Regulación de la actividad de los factores de transcripción 481

Todos los receptores nucleares comparten una estructura dominio en común 482
Los elementos de respuesta de los receptores nucleares contienen repeticiones invertidas o directas 483
La unión de la hormona a un receptor nuclear regula su actividad como factor de transcripción 483

11.7 Elongación regulada y terminación de la transcripción 485

La transcripción del genoma del HIV está regulada por un mecanismo de antiterminación 485
En algunos genes de inducción rápida se produce una pausa proximal al promotor de la RNA polimerasa II 486

11.8 Otros sistemas de transcripción en los eucariontes 486

La iniciación de la transcripción por Pol I y Pol III es análoga a la de la Pol II 486
El DNA mitocondrial y el de los cloroplastos son transcriptos por RNA polimerasas específicas de los orgánulos 488

12 Control génico postranscripcional y transporte nuclear 493

12.1 Procesamiento del pre-mRNA eucarionte 493

El casquete 5' se añade a los RNA nacientes poco después de la iniciación por la RNA polimerasa II 493
Los pre-mRNA se asocian con proteínas hnRNP que contienen dominios de unión al RNA conservados 494
El corte y la poliadenilación 3' de los pre-mRNA están estrechamente acoplados 496
El corte y empalme se produce en secuencias conservadas cortas de los pre-mRNA mediante dos reacciones de transesterificación 497
Los snRNA se aparean con los pre-mRNA y entre sí durante el corte y empalme del RNA 499
Los empalmosomas, ensamblados a partir de los snRNP y un pre-mRNA, llevan a cabo el corte y empalme 499
La elongación de la cadena por la RNA polimerasa II está acoplada a la presencia de factores de procesamiento del RNA 501
Las proteínas SR contribuyen a la definición de exones en los pre-mRNA largos 501
Los intrones del grupo II que sufren autoprocesamiento proporcionan pistas acerca de la evolución de los snRNA 502
La mayor parte de la transcripción y del procesamiento del RNA tiene lugar en un número limitado de dominios del núcleo celular de los mamíferos 503
Las exonucleasas nucleares degradan el RNA que es eliminado de los pre-mRNA 504

12.2 Regulación del procesamiento del pre-mRNA 504

El corte y empalme alternativo del RNA es el principal mecanismo para regular el procesamiento del mRNA 505
Una cascada de procesamiento del RNA regulado controla la diferenciación sexual de *Drosophila* 505
Represores y activadores del corte y empalme del RNA controlan este procesamiento en sitios alternativos 507
La edición del RNA altera las secuencias del pre-mRNA 508

12.3 Transporte de macromoléculas a través de la envoltura nuclear 509

Las moléculas grandes y pequeñas ingresan y abandonan el núcleo a través de los complejos del poro nuclear 509
Las importinas transportan hacia el núcleo proteínas que contienen señales de localización nuclear 510
Las exportinas transportan proteínas que contienen señales para la salida del núcleo 512
El control de algunos genes se logra regulando el transporte de los factores de transcripción 513
La mayoría de las mRNP salen del núcleo con la ayuda de un exportador de mRNA 514
Los pre-mRNA en los empalmosomas no salen del núcleo 515
La proteína Rev HIV regula el transporte de los mRNA virales no procesados 515

12.4 Mecanismos citoplasmáticos de control postranscripcional 518

Los micro RNA reprimen la traducción de mRNA específicos 518
La interferencia del RNA induce la degradación de los mRNA con secuencias complementarias a los RNA de hebra doble 518
La poliadenilación citoplasmática promueve la traducción de algunos mRNA 519
Los mRNA son degradados en el citoplasma mediante varios mecanismos 521
Una proteína de unión al RNA sensible al hierro regula la traducción y degradación del mRNA 522
La degradación mediada por mutaciones sin sentido y otros mecanismos de vigilancia del mRNA evitan la traducción de los mRNA procesados inadecuadamente 523
La localización de los mRNA permite la producción de proteínas en regiones específicas dentro del citoplasma 523

12.5 Procesamiento del rRNA y del tRNA 525

Los genes de pre-rRNA son similares en todos los eucariontes y funcionan como organizadores nucleolares 525
Los RNA nucleolares pequeños colaboran en el procesamiento de los pre-rRNA y en el ensamblaje de las subunidades ribosómicas 526
Los intrones autoprocesados del grupo I fueron los primeros ejemplos de RNA catalítico 527
En los pre-tRNA se producen escisiones, modificaciones de bases y, a veces, corte y empalme catalizado por proteínas 528

IV Señalización celular

13 Señalización en la superficie celular 533

13.1 Moléculas de señalización y receptores de la superficie celular 534

Las moléculas de señalizacion en los animales operan en distancias diversas 535
Los receptores activan una cantidad limitada de vías de señalización 535

Las proteínas receptoras muestran especificidad de unión del ligando y de efector 536
La respuesta celular máxima para una molécula de señalización puede no requerir la activación de todos los receptores 537
La sensibilidad de una célula a las señales externas está determinada por la cantidad de receptores de superficie 538
Los ensayos de fijación se utilizan para detectar receptores y determinar sus valores de K_d 538
Los receptores pueden ser purificados por técnicas de afinidad o expresados a partir de genes clonados 539

13.2 Transducción intracelular de la señal 541

Los segundos mensajeros transportan señales provenientes de muchos receptores 541
Muchas proteínas intracelulares conservadas funcionan en la transducción de señales 542
Algunos receptores y proteínas de transducción de señales están localizados 543
Las respuestas celulares adecuadas dependen de la interacción y la regulación de las vías de señalización 544

13.3 Receptores acoplados a la proteína G que activan o inhiben a la adenililciclasa 545

La subunidad G_α de la proteína G alterna entre las formas activa e inactiva 546
La adrenalina se une a varios receptores diferentes acoplados a la proteína G 547
Se identificaron dominios funcionales fundamentales en los receptores y proteínas G acopladas 548
La adenililciclasa es estimulada e inhibida por complejos receptor-ligando diferentes 549
La proteincinasa A activada por cAMP media varias respuestas en diferentes células 550
El metabolismo del glucógeno es regulado por activación de proteincinasa A inducida por hormona 550
La amplificación de la señal por lo común se produce corriente abajo de los receptores de la superficie celular 552
Varios mecanismos regulan la señalización de los receptores acoplados a la proteína G 553
Las proteínas de anclaje localizan los efectos de cAMP en regiones subcelulares específicas 554

13.4 Receptores acoplados a la proteína G que regulan a los canales iónicos 555

Los receptores cardíacos muscarínicos para acetilcolina activan una proteína G que abre los canales del K^+ 556
Los receptores acoplados a G_t son activados por la luz 556
La activación de la rodopsina induce el cierre de los canales catiónicos regulados por cGMP 558
Los bastones se adaptan a niveles variados de luz en el ambiente 560

13.5 Receptores acoplados a la proteína G que activan a la fosfolipasa C 561

El inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) activa la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático 562
El diacilglicerol (DAG) activa la proteincinasa C, que regula muchas otras proteínas 563
El complejo Ca^{2+} /calmodulina media muchas respuestas celulares para señales externas 563
La relajación del músculo liso vascular inducida por señales está mediada por proteincinasa G activada por cGMP 564

13.6 Activación de la transcripción génica por receptores acoplados a la proteína G 565

El factor de transcripción Tubby es liberado por la activación de la fosfolipasa C 565
CREB liga las señales del cAMP a la transcripción 567
La arrestina unida a GPCR activa diversas cascadas de cinasas que controlan la expresión génica 567

14 Vías de señalización que controlan la actividad génica 571

14.1 Receptores del TGFβ y activación directa de Smad 574

El TGFβ se forma por el corte de un precursor inactivo secretado 574
Los receptores de señalización del TGFβ tienen actividad de serina o treonina cinasa 575
Los receptores para TGFβ tipo I activados fosforilan a los factores de transcripción Smad 575
Las oncoproteínas y las I-Smad regulan la señalización Smad mediante mecanismos de retroalimentación negativa 577
La pérdida de la señalización TGFβ contribuye a la proliferación celular anormal y a la formación de tumores 577

14.2 Receptores para citocinas y vía JAK-STAT 578

Los receptores para citocinas y los receptores tirosincinasas comparten muchas características de señalización 578
Las citocinas influyen en el desarrollo de muchos tipos celulares 580
Todas las citocinas y sus receptores tienen estructuras similares y activan vías de señalización similares 581
La genética de las células somáticas reveló que JAK y STAT son proteínas esenciales en la transducción de señales 582
Las JAK cinasas asociadas al receptor activan factores de transcripción STAT unidos a un receptor para citosina 583

Los dominios SH2 y PTB se fijan a secuencias específicas que rodean a los residuos fosfotirosina 584
La señalización proveniente de los receptores para citocinas es modulada por señales negativas 585
El receptor mutante de eritropoyetina que no puede ser regulado negativamente conduce a un aumento del hematocrito 586

14.3 Receptores de tirosincinasas y activación de Ras 587

La fijación del ligando conduce a la transfosforilación de los receptores tirosincinasas 587
La proteína Ras, una GTPasa interruptora, cicla entre los estados activo e inactivo 588
Una proteína adaptadora y el factor intercambiador de nucleótido de guanina unen el receptor tirosincinasa activado a la Ras 589
Los estudios genéticos en *Drosophila* identificaron proteínas de transducción de señales fundamentales corriente abajo del receptor con actividad de tirosincinasas 590
La fijación de la proteína Sos a la Ras inactiva causa un cambio conformacional que activa a la proteína Ras 591

14.4 Vías MAP cinasas 592

Las señales pasan desde una Ras activada a una cascada de proteincinasas 593
MAP cinasa regula la actividad de muchos factores de transcripción que controlan a los genes de respuesta temprana 595
Los receptores acoplados a la proteína G transmiten señales a la MAP cinasa en las vías de apareamiento de las levaduras 596
Las proteínas plataforma (*scaffold*) aíslan múltiples vías de MAP cinasa en células eucariontes 597

14.5 Fosfoinosítidos como transductores de señales 598

La fosfolipasa C_γ es activada por algunos RTK y receptores para citocina 598
El reclutamiento de PI-3 cinasa en los receptores estimulados por hormona conduce a la activación de la proteincinasa B 598
El receptor para insulina actúa a través de la vía PI-3 cinasa en concentraciones bajas de glucemia 600
La proteincinasa B activada estimula la supervivencia de las células mediante varias vías 600
La PTEN fosfatasa termina la señalización por medio de la vía PI-3 cinasa 600
El receptor para un factor de crecimiento particular a menudo está relacionado con múltiples vías de señalización 601

14.6 Vías que involucran la degradación de la proteína inducida por la señal 601

La degradación inducida por señales de una proteína inhibidora citosólica activa al factor de transcripción NF-κB 602
La proteólisis intramembrana regulada catalizada por la presenilina 1 activa el receptor Notch 603

14.7 Modulación negativa de receptores de señalización 605

La endocitosis de los receptores de la superficie celular desensibiliza a las células frente a diversas hormonas 605
Los receptores señuelo segregados se fijan a la hormona y evitan la activación del receptor 606

15 Integración de señales y controles génicos 611

15.1 Enfoques experimentales para formar una visión integral de las respuestas inducidas por señales 612

Los análisis genómicos muestran conservación evolutiva y proliferación de genes que codifican señales y reguladores 613
La hibridación in situ puede detectar cambios en la transcripción en tejidos intactos y embriones permeabilizados 614
El análisis de las micromatrices de DNA *(microarrays)* puede evaluar la expresión de genes múltiples en forma simultánea 614
Las micromatrices de proteínas son herramientas promisorias para monitorizar las respuestas celulares que incluyen cambios en los patrones de fijación a las proteínas 615
Inactivación génica sistemática mediante RNA de interferencia 615

15.2 Respuestas de las células frente a influencias ambientales 617

La integración de múltiples segundos mensajeros regula la glucogenólisis 617
La insulina y el glucagón actúan juntos para mantener el nivel estable de la glucemia 618
La falta de oxígeno induce un programa de respuestas celulares 619

15.3 Control de los destinos celulares por cantidades graduadas de reguladores 621

La señalización inductiva opera por mecanismos de gradiente y de retransmisión 623
Los morfógenos controlan los destinos celulares en el desarrollo temprano de *Drosophila* 624
La señalización recíproca entre las células del ovocito y del folículo establece el modelado inicial en *Drosophila* 627
Dorsal nuclear y Decapentaplegic, una señal secretada, especifican los destinos celulares dorsales y ventrales 628
El control transcripcional por la proteína Bicoid derivada de la madre especifica la parte anterior del embrión 629

Los inhibidores de la traducción derivados de la madre refuerzan el modelado anteroposterior mediado por Bicoid 630
La señalización tipo Toll activa un sistema de defensa ancestral en los vegetales y en los animales 632

15.4 Creación de límites por combinaciones diferentes de los factores de transcripción 632

Los genes gap (de hendidura) de *Drosophila* se transcriben en bandas amplias de células y se regulan entre sí 633
Combinaciones de proteínas gap (de hendidura) dirigen la transcripción de genes de regla par *(pair-rule)* en franjas 634
Las proteínas de segmentación maternas y cigóticas regulan la expresión de genes homeóticos (Hox) 636
El desarrollo de la flor también requiere la producción de factores de transcripción regulada de forma espacial 637

15.5 Creación de límites por señales extracelulares 639

Dos señales secretadas, Wingless y Hedgehog, crean límites adicionales dentro de los segmentos de embriones celulares de la mosca 639
La señalización Hedgehog, que requiere dos proteínas transmembrana, libera la represión de genes diana 640
Las señales Wnt inducen el desensamblaje de un complejo intracelular y liberación de un factor de transcripción 642
Los gradientes de Hedgehog y el factor de crecimiento transformador β especifican los tipos celulares en el tubo neural 643
Los proteoglucanos de la superficie celular influyen en la señalización por algunas vías 644

15.6 Inducción recíproca e inhibición lateral 644

Los ligandos y los receptores para efrina de la superficie celular median la inducción recíproca durante la angiogénesis 644
La vía de señalización Notch conservada media la inhibición lateral 646

15.7 Integración y control de las señales 648

La competencia depende de las propiedades de las células que les permiten responder a señales inductivas 648
Algunas señales pueden inducir respuestas celulares diversas 649
El desarrollo de los miembros depende de la integración de gradientes de señales extracelulares múltiples 650
Las señales están amortiguadas por antagonistas intracelulares y extracelulares 651

V Tránsito de membrana

16 Movimiento de proteínas en las membranas y en los orgánulos 657

16.1 Translocación de proteínas secretorias a través de la membrana del RE 659

Una secuencia de señalización N-terminal hidrófoba dirige las proteínas secretorias nacientes hacia el RE 660
La translocación cotraduccional es iniciada por dos proteínas que hidrolizan GTP 661
El pasaje de los polipéptidos nacientes a través del translocón es impulsado por la energía liberada durante la traducción 662
La hidrólisis del ATP impulsa la translocación postraduccional de algunas proteínas secretorias en las levaduras 665

16.2 Inserción de proteínas en la membrana del RE 666

En el RE se sintetizan varias clases topológicas de proteínas integrales de membrana 666
Secuencias internas de detención de transferencia y de señalización de anclaje determinan la topología de las proteínas de un solo pasaje 667
Las proteínas de pasaje múltiple tienen secuencias topogénicas internas múltiples 669
Un ancla de fosfolípido mantiene algunas proteínas de la superficie celular unidas a la membrana 670
A menudo puede inferirse la topología de una proteína de membrana a partir de su secuencia 671

16.3 Modificaciones, plegado y control de calidad de las proteínas en el RE 673

Un oligosacárido *N*-ligado preformado se agrega a muchas proteínas en el RE rugoso 673
Las cadenas laterales del oligosacárido pueden estimular el plegado y la estabilidad de las glucoproteínas 674
Los puentes disulfuro son formados y reordenados por proteínas de la luz del RE 675
Las chaperonas y otras proteínas del RE facilitan el plegado y el ensamblaje de las proteínas 677
Las proteínas con plegado inadecuado presentes en el RE inducen la expresión de catalizadores del plegado de proteínas 678
A menudo las proteínas no ensambladas o mal plegadas presentes en el RE son transportadas al citosol para su degradación 679

16.4 Salida de proteínas bacterianas 680

La ATPasa citosólica SecA empuja los polipéptidos bacterianos a través de los translocones hacia el espacio periplasmático 680
Varios mecanismos translocan las proteínas bacterianas hacia el espacio extracelular 681
Las bacterias patógenas pueden inyectar proteínas en las células animales por medio del aparato de secreción tipo III 681

16.5 Direccionamiento de proteínas a mitocondrias y cloroplastos 683

El *N*-terminal anfipático de las secuencias de señalización dirige las proteínas hacia la matriz mitocondrial 684
La incorporación mitocondrial de proteínas requiere receptores en la membrana externa y translocones en ambas membranas 684
Estudios con proteínas quiméricas demuestran características importantes de la entrada en las mitocondrias 686
Se necesita un triple aporte de energía para incorporar proteínas a la mitocondria 686
Múltiples señales y vías dirigen las proteínas hacia los compartimientos submitocondriales 687
El direccionamiento de las proteínas a la estroma del cloroplasto es similar al de las proteínas hacia la matriz mitocondrial 691
Las proteínas son direccionadas a los tilacoides por mecanismos relacionados con la translocación a través de la membrana de las bacterias 691

16.6 Direccionamiento de las proteínas peroxisómicas 693

Un receptor citosólico dirige las proteínas con una secuencia SKL en el C-terminal hacia la matriz del peroxisoma 693
Las proteínas de la membrana y de la matriz del peroxisoma se incorporan por vías diferentes 694

17 Tránsito vesicular, secreción y endocitosis 701

17.1 Técnicas para el estudio de la vía secretoria 703

El transporte de proteínas a través de la vía secretoria puede estudiarse en las células vivas 703
Los mutantes de las levaduras definen las etapas principales y muchos componentes del transporte vesicular 705
Los ensayos de transporte en sistemas libres de células permiten la disección de los pasos individuales del transporte vesicular 706

17.2 Mecanismos moleculares del tránsito vesicular 707

El ensamblaje de una cubierta de proteínas conduce a la formación de vesículas y a la selección de moléculas carga 708
Un grupo conservado de proteínas GTPasa interruptoras controla el ensamblaje de diferentes cubiertas vesiculares 709
Las secuencias de señalización sobre las proteínas carga hacen contactos moleculares específicos con las proteínas de la cubierta 710
Las GTPasas Rab controlan la ubicación de vesículas sobre las membranas diana 711
Conjuntos apareados de proteínas SNARE median la fusión de vesículas con las membranas diana 712
La disociación de los complejos SNARE después de la fusión de la membrana es conducida por la hidrólisis de ATP 713
Los cambios conformacionales en proteínas de cubierta viral desencadenan la fusión de la membrana 713

17.3 Tránsito vesicular en las etapas iniciales de la vía secretoria 715

Las vesículas COPII median el transporte desde el RE hacia el Golgi 716
Las vesículas COPI median el transporte retrógrado dentro del Golgi y desde el Golgi hacia el RE 716
El transporte anterógrado a través del Golgi se produce mediante progresión cisternal 718

17.4 Clasificación y procesamiento de proteínas en las etapas finales de la vía secretoria 719

Las vesículas recubiertas de clatrina, de proteínas adaptadoras o de ambas median varios pasos del transporte 720
La dinamina es necesaria para el desprendimiento de las vesículas de clatrina 721
Los residuos de manosa 6-fosfato dirigen las proteínas solubles a los lisosomas 721
El estudio de las enfermedades de almacenamiento lisosómico reveló componentes clave de la vía de clasificación lisosómica 723
La agregación de proteínas en el *trans*-Golgi puede funcionar para clasificar proteínas en las vesículas de secreción regulada 724
Algunas proteínas experimentan un procesamiento proteolítico después de dejar la red *trans*-Golgi 724
Diversas vías distribuyen las proteínas de membrana hacia la región apical o basolateral de las células polarizadas 726

17.5 Endocitosis mediada por receptor y clasificación de las proteínas internalizadas 727

Los receptores de lipoproteínas de baja densidad y otros ligandos contienen señales de clasificación que los marcan para la endocitosis 729

El pH acídico de los endosomas tardíos hace que la mayoría de los complejos receptor-ligando se disocien 730
La vía endocítica distribuye el hierro a las células sin disociar del complejo receptor-transferrina en los endosomas 731
Vesículas especializadas entregan componentes celulares a los lisosomas para su degradación 732
Los retrovirus brotan desde la membrana plasmática mediante un proceso similar a la formación de endosomas multivesiculares 733
La transcitosis moviliza algunos ligandos endocitados a través de una capa de células epiteliales. 735

17.6 Formación y función de las vesículas sinápticas 735

Las vesículas sinápticas cargadas con neurotransmisores se localizan cerca de la membrana plasmática 736
Una proteína de unión al calcio regula la fusión de vesículas sinápticas con la membrana plasmática 736
Las moscas mutantes que carecen de dinamina no pueden reciclar las vesículas sinápticas 738

18 Metabolismo y movimiento de los lípidos 743

18.1 Fosfolípidos y esfingolípidos: síntesis y movimiento intracelular 745

Los ácidos grasos son precursores de los fosfolípidos y otros componentes de la membrana 745
Los ácidos grasos no esterificados se mueven dentro de las células unidos a proteínas citosólicas pequeñas 746
La incorporación de ácidos grasos a los lípidos de membrana tiene lugar sobre las membranas de los orgánulos 747
Las flipasas mueven fosfolípidos desde una hojuela de la membrana a la hojuela opuesta 748

18.2 Colesterol: un lípido de membrana multifuncional 750

El colesterol es sintetizado por enzimas en el citosol y en la membrana del RE 751
Numerosas moléculas bioactivas se producen a partir del colesterol y de sus precursores biosintéticos 752
El colesterol y los fosfolípidos son transportados entre los orgánulos mediante mecanismos independientes del Golgi 752

18.3 Movimiento lipídico hacia adentro y hacia afuera de las células 754

Los transportadores de la superficie celular ayudan a movilizar ácidos grasos a través de la membrana plasmática 755
Las proteínas ABC median la salida celular de fosfolípidos y colesterol 755
Los lípidos pueden salir o ingresar en grandes complejos lipoproteicos bien definidos 757
Las lipoproteínas se producen en el RE, salen por la vía secretoria y se remodelan en la circulación 758
Las células utilizan diversos mecanismos mediados por proteínas para incorporar lípidos asociados a proteínas 759
El análisis de la hipercolesterolemia familiar reveló la vía para la endocitosis mediada por receptor de partículas LDL 760
Los ésteres de colesterol en las lipoproteínas pueden ser incorporados selectivamente por el receptor SR-BI 762

18.4 Regulación por retroalimentación del metabolismo lipídico celular 763

El transporte del RE al Golgi y la activación proteolítica controlan la actividad de los factores de transcripción SREBP 764
Múltiples SREBP regulan la expresión de numerosas proteínas metabolizadoras de lípidos 765
Los miembros de la superfamilia de receptores nucleares contribuyen a la regulación de los lípidos en las células y en el cuerpo como un todo 766

18.5 Biología celular de la aterosclerosis, el infarto de miocardio y el accidente cerebrovascular 767

La inflamación arterial y la incorporación celular de colesterol marcan las etapas iniciales de la aterosclerosis 768
Las placas ateroscleróticas pueden impedir el flujo sanguíneo y conducir a infarto de miocardio y accidente cerebrovascular 769
La captación de LDL (colesterol malo) independiente de LDLR lleva a la formación de células espumosas 770
El transporte inverso del colesterol mediante la HDL (colesterol bueno) protege contra la aterosclerosis 770
Dos tratamientos para la aterosclerosis se basan en el metabolismo del colesterol celular regulado por SREBP 771

VI Citoesqueleto

19 Microfilamentos y filamentos intermedios 779

19.1 Estructuras de actina 780

La actina es antigua, abundante y está muy conservada 780
Los monómeros de actina G se ensamblan para formar largos polímeros helicoidales de actina F 781

La actina F presenta polaridad estructural y funcional 782
Los dominios CH y otras proteínas organizan los microfilamentos en haces y retículos 782

19.2 Dinámica del ensamblaje de actina 784

La polimerización de actina in vitro se efectúa en tres pasos 784
Los filamentos de actina crecen con mayor rapidez en el extremo (+) que en el extremo (-) 785
Toxinas que alteran el equilibrio entre los monómeros de actina 786
La polimerización de actina está regulada por proteínas que se unen a la actina G 786
Las proteínas seccionadoras se unen a los filamentos y crean nuevos extremos de actina 787
Las proteínas que recubren la actina estabilizan la actina F 788
Las proteínas Arp2/3 ensamblan filamentos ramificados 788
Los movimientos intracelulares y los cambios en la forma celular son dirigidos por la polimerización de la actina 789

19.3 Movimientos celulares impulsados por miosina 791

Las miosinas son una gran superfamilia de proteínas motoras mecanoquímicas 791
Las cabezas de miosina caminan sobre los filamentos de actina con pasos discretos 793
Las vesículas unidas a miosina son transportadas sobre filamentos de actina 794
La actina y la miosina II forman haces contráctiles en las células no musculares 796
En el músculo esquelético los filamentos gruesos y delgados están ordenados y se deslizan unos sobre otros durante la contracción 797
La contracción el músculo esquelético está regulada por Ca^{2+} y por proteínas que se unen a la actina 798
Los mecanismos dependientes de miosina controlan la contracción en el músculo liso y en las células no musculares 799

19.4 Locomoción celular 800

El movimiento celular coordina la generación de fuerza y la adhesión de la célula 801
En el movimiento ameboide intervienen transiciones gel-sol reversibles de los retículos de actina 803
La migración de las células es coordinada por señales externas y vías de transducción de señales 803

19.5 Filamentos intermedios 805

Los filamentos intermedios difieren de otras fibras citoesqueléticas en estabilidad, tamaño y estructura 806
Las proteínas de los filamentos intermedios se clasifican de acuerdo con su distribución en tejidos específicos 806
Todas las proteínas de los filamentos intermedios tienen un dominio central conservado y se organizan de modo similar 808
Los filamentos intermedios son dinámicos 809
Diversas proteínas establecen enlaces cruzados entre los filamentos intermedios y otras estructuras celulares 810
Los retículos de FI forman varias estructuras de soporte y se conectan a las membranas celulares 810
La alteración de las redes de queratina produce ampollas 811

20 Microtúbulos 817

20.1 Organización y dinámica de los microtúbulos 818

Subunidades heterodiméricas de tubulina componen la pared de los microtúbulos 819
El ensamblaje y el desarmado de los microtúbulos tiene lugar en mayor medida en el extremo (+) 820
La inestabilidad dinámica es una propiedad intrínseca de los microtúbulos 822
Numerosas proteínas regulan la dinámica de los microtúbulos y su unión cruzada a otras estructuras 823
La colchicina y otros fármacos alteran la dinámica de los microtúbulos 825
Los MTOC orientan la mayor parte de los microtúbulos y determinan la polaridad celular 825
El complejo en anillo de γ-tubulina nuclea la polimerización de las subunidades de tubulina 827
Los microtúbulos organizan los orgánulos y las vesículas citoplasmáticas 828

20.2 Movimientos impulsados por cinesina y dineína 829

El transporte axónico a lo largo de los microtúbulos tiene lugar en ambas direcciones 829
La cinesina I impulsa el transporte anterógrado de vesículas en los axones 831
La mayor parte de las cinesinas son proteínas motoras que se desplazan hacia el extremo (+) 832
Las dineínas citosólicas son proteínas motoras dirigidas al extremo (-) que se unen a su carga a través de la dinactina 833
Varias proteínas motoras a veces transportan la misma carga 834
Los cilios y los flagelos de los eucariontes contienen un centro formado por un doblete de microtúbulos tachonado con dineínas axonémicas 835
El movimiento rítmico de cilios y flagelos se produce por el deslizamiento controlado de los dobletes de microtúbulos externos 837

20.3 Dinámica de los microtúbulos y proteínas motoras en la mitosis 838

El aparato mitótico es una máquina de microtúbulos para separar los cromosomas 839

El cinetocoro es un complejo proteico del centrómero que captura y colabora en el transporte de los cromosomas 841
Los centrosomas duplicados se alinean y comienzan a separarse en la profase 841
La formación del huso mitótico de la metafase requiere proteínas motoras y microtúbulos dinámicos 843
En la anafase los cromosomas se separan y el huso se elonga 845
Los microtúbulos y los microfilamentos trabajan en cooperación durante la citocinesis 847
Las células vegetales reorganizan sus microtúbulos y construyen una nueva pared celular durante la mitosis 848

VII Ciclo celular y control de la proliferación celular

21 Regulación del ciclo celular eucarionte 853

21.1 Panorama general del ciclo celular y su control 854
El ciclo celular es una serie ordenada de acontecimientos que conducen a la replicación celular 854
La fosforilación y la degradación regulada de las proteínas controla el pasaje a través del ciclo celular 855
Se usaron diversos sistemas experimentales para identificar y aislar las proteínas de control del ciclo celular 856

21.2 Estudios bioquímicos con ovocitos, huevos y embriones tempranos 858
El factor promotor de la maduración (MPF) estimula la maduración meiótica de los ovocitos y la mitosis de las células somáticas 859
La ciclina mitótica se identificó primero en embriones tempranos de erizo de mar 860
Los niveles de ciclina B y la actividad cinasa del factor promotor de la mitosis (MPF) cambian juntos en extractos de huevos de *Xenopus* en ciclo 861
El complejo promotor de la anafase (APC) controla la degradación de las ciclinas mitóticas y la salida de la mitosis 862

21.3 Estudios genéticos con *S. pombe* 864
Un complejo muy conservado similar al MPF controla la entrada en la mitosis en *S. pombe* 865
La fosforilación de la subunidad CDK regula la actividad cinasa del MPF 865
Los cambios de conformación inducidos por la unión y la fosforilación de la ciclina aumentan la actividad del MPF 866
Otros mecanismos también controlan la entrada en la mitosis regulando la actividad del MPF 867

21.4 Mecanismos moleculares de regulación de los eventos mitóticos 868
La fosforilación de laminas nucleares y otras proteínas promueve los eventos mitóticos tempranos 868
La separación de las cromátidas hermanas inicia la anafase 870
El reensamblaje de la envoltura nuclear y la citocinesis dependen de la actividad sin oposición de una fosfatasa constitutiva 873

21.6 Estudios genéticos con *S. cerevisiae* 874
Una cinasa dependiente de ciclina (CDK) es fundamental para la entrada en fase S de *S. cerevisiae* 874
Tres ciclinas de G_1 se asocian con la CDK de *S. cerevisiae* para formar factores promotores de fase S 875
La degradación del inhibidor de fase S desencadena la replicación del DNA 878
Múltiples ciclinas dirigen la actividad cinasa de la CDK de *S. cerevisiae* durante diferentes fases del ciclo celular 878
La fosfatasa Cdc14 promueve la salida de la mitosis 879
La replicación en cada origen comienza solo una vez durante el ciclo celular 879

21.6 Control del ciclo celular en las células de mamífero 881
El punto de restricción de los mamíferos es análogo al START de las células de levadura 882
Numerosas CDK y ciclinas regulan el pasaje de células de mamífero por el ciclo celular 883
La expresión regulada de dos clases de genes hace retornar las células de mamífero en G_0 al ciclo celular 883
El pasaje a través del punto de restricción depende de la fosforilación de la proteína Rb supresora de tumores 884
La ciclina A es necesaria para la síntesis de DNA y la CDK1 para la entrada en la mitosis 885
Dos tipos de inhibidores de los complejos ciclina-CDK contribuyen al control del ciclo celular en los mamíferos 886

21.7 Puntos de control en la regulación del ciclo celular 886
La presencia de DNA no replicado impide la entrada en la mitosis 888
El ensamblaje madecuado del huso mitótico impide la iniciación de la anafase 888
La red de salida de la mitosis controla la separación apropiada de los cromosomas hijos 888
La detención del ciclo celular en células con DNA dañado depende de supresores tumorales 889

21.8 Meiosis: un tipo especial de división celular 890
La represión de las ciclinas de G_1 y de la Ime2 específica de meiosis impide la replicación del DNA en la meiosis II 890
El entrecruzamiento y el Rec8 específico de meiosis son necesarios para la separación especializada de los cromosomas durante la meiosis I 891

22 Nacimiento, linaje y muerte de la célula 899

22.1 El nacimiento de las células 900
Las células madre generan otras células madre y células diferenciadas 900
Las células madre embrionarias cultivadas pueden diferenciarse en diversos tipos celulares 901
Los tejidos son mantenidos por poblaciones asociadas de células madre 902
Los destinos celulares se restringen progresivamente durante el desarrollo 906
Se conoce el linaje celular completo de *C. elegans* 907
Los mutantes heterocrónicos proporcionan claves acerca del control del linaje celular 908

22.2 Especificación del tipo de célula en las levaduras 910
Los factores de transcripción codificados en el locus *MAT* actúan en forma concertada con MCM1 para especificar el tipo de célula 910
Los complejos MCM1 y α1-MCM1 activan la transcripción génica 911
Los complejos α2-MCM1 y α2-a1 reprimen la transcripción 912
Las feromonas inducen el apareamiento de las células α y a para generar un tercer tipo de célula 912

22.3 Especificación y diferenciación del músculo 913
Las somitas embrionarias dan origen a los mioblastos, los precursores de las células musculares esqueléticas 914
Los genes miogénicos se identificaron por primera vez en estudios con fibroblastos en cultivo 914
Los factores reguladores musculares (MRF) y los factores amplificadores de miocitos (MEF) actúan en forma concentrada para conferir especificidad miogénica 915
La diferenciación terminal de los mioblastos se encuentra bajo control positivo y negativo 916
Las señales entre célula y célula son cruciales para la determinación del destino de las células musculares y la migración de los mioblastos 917
Las proteínas reguladoras bHLH actúan en la creación de otros tejidos 918

22.4 Regulación de la división celular asimétrica 919
La conversión del tipo de apareamiento de las levaduras depende de la división celular asimétrica 920
En los extremos opuestos de los neuroblastos en división en *Drosophila* se localizan proteínas críticas reguladoras de la asimetría 921
La orientación del huso mitótico está vinculada a los factores de asimetría celular citoplasmática 923

22.5 Muerte celular y su regulación 924
La muerte celular programada tiene lugar por apoptosis 924
Las neurotrofinas estimulan la supervivencia de las neuronas 925
Una cascada de proteínas caspasas actúan en una vía apoptótica 927
Los reguladores proapoptóticos permiten la activación de caspasa en ausencia de factores tróficos 928
Algunos factores tróficos inducen la desactivación de un regulador proapoptótico 929
El factor de necrosis tumoral y las señales de muerte relacionadas estimulan la muerte celular al activar a caspasas 930

23 Cáncer 935

23.1 Células tumorales e inicio del cáncer 936
Las células tumorales metastásicas son invasoras y pueden diseminarse 936
Los cánceres suelen originarse en células en proliferación 937
El crecimiento tumoral requiere la formación de nuevos vasos sanguíneos 938
Las células cultivadas pueden ser transformadas en células tumorales 939
El modelo de incidencias múltiples de inducción de cáncer está sustentado por varias líneas de evidencia 940
Las mutaciones oncogénicas sucesivas pueden rastrearse en el cáncer de colon 941

23.2 Bases genéticas del cáncer 943
Las mutaciones con ganancia de función convierten protooncogenes en oncogenes 944
Los virus causantes de cáncer contienen oncogenes o activan protooncogenes celulares 945
Las mutaciones con pérdida de función en genes supresores de tumores son oncogénicas 946
Las mutaciones hereditarias en los genes supresores de tumores incrementan el riesgo de cáncer 946
Las aberraciones en las vías de señalización que controlan el desarrollo están asociadas con muchos cánceres 948

El análisis de los patrones de expresión con micromatrices de DNA puede revelar diferencias sutiles entre las células tumorales 950

23.3 Mutaciones oncogénicas en las proteínas que promueven la proliferación celular 951

Los receptores oncogénicos pueden promover la proliferación en ausencia de factores de crecimiento externos 951
Los activadores virales de los receptores del factor de crecimiento actúan como oncoproteínas 953
Muchos oncogenes codifican proteínas transductoras de señales activas constitutivamente 953
La producción inapropiada de factores nucleares de transcripción puede inducir la transformación 955

23.4 Mutaciones que provocan pérdida de inhibición del crecimiento y controles del ciclo celular 956

Las mutaciones que producen el pasaje desregulado desde la fase G_1 a la S son oncogénicas 957
Las mutaciones con pérdida de función que afectan a las proteínas remodeladoras de la cromatina contribuyen a los tumores 958
La pérdida de p53 anula el punto de control del DNA dañado 958
Los genes apoptóticos pueden funcionar como protooncogenes o genes supresores de tumores 960
La falla del punto de control del ciclo celular también puede conducir a la aneuploidía en las células tumorales 961

23.5 Papel de los carcinógenos y reparación del DNA en el cáncer 961

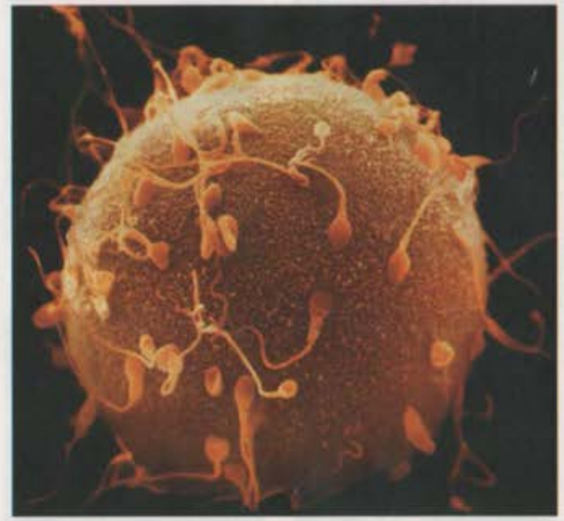
La DNA polimerasa introduce errores de copiado y también los corrige 962
El daño químico al DNA puede conducir a las mutaciones 963
Algunos carcinógenos están asociados con cánceres específicos 963
La pérdida de sistemas de escisión-reparación del DNA de alta fidelidad puede conducir al cáncer 964
La escisión de bases se utiliza para reparar bases dañadas y apareamientos incorrectos de una sola base 965
La pérdida de reparación por escisión del apareamiento incorrecto conduce a cáncer de colon y otros 965
La reparación por escisión de nucleótidos se dilucidó mediante el estudio de la xerodermia pigmentosa, una predisposición hereditaria a los cánceres de piel 966
Dos sistemas reparan las roturas de doble hélice en el DNA 967
La expresión de la telomerasa contribuye a la inmortalización de las células cancerosas 969

Glosario G1

Índice analítico I-1

1

LA VIDA COMIENZA CON LAS CÉLULAS



Una sola célula de ~200 micrómetros (μm), el óvulo humano, con espermatozoides, los cuales también son células únicas. De la unión de un óvulo y un espermatozoide surgirán los 10 trillones de células de un cuerpo humano.
[Photo Researchers, Inc.]

Al igual que nosotros, cada célula que forma nuestro cuerpo puede crecer, reproducirse, procesar información, responder a estímulos y llevar a cabo una asombrosa variedad de reacciones químicas. Estas habilidades definen la vida. Nosotros y otros organismos multicelulares contenemos miles de millones o billones de células organizadas en estructuras complejas, pero muchos organismos sólo son una simple célula. Aun los organismos unicelulares exhiben todas las propiedades que distinguen lo viviente, lo que indica que la célula es la unidad fundamental de la vida. En los albores del siglo XXI enfrentamos una explosión de nuevos datos acerca de los componentes de las células, de las estructuras que contienen, cómo ellas se contactan y se influyen entre sí. No obstante, resta mucho por aprender, sobre todo acerca de cómo la información circula a través de las células y cómo ellas deciden el camino más apropiado para responder.

La biología celular y molecular es una ciencia rica, integradora, que reúne las siguientes disciplinas: bioquímica, biofísica, biología molecular, microscopia, genética, fisiología, computación y biología del desarrollo. Cada uno de estos campos tiene su propio interés y estilo de experimentación. En los siguientes capítulos, describiremos ideas y propuestas experimentales delineadas desde estas perspectivas y contaremos la historia del nacimiento, la vida y la muerte celular. Comenzamos aquí con la diversidad de las células, sus constituyentes básicos y funciones críticas, y qué podemos aprender a partir de las distintas maneras de estudiarlas.

1.1 Diversidad y concordancia de las células

Las células presentan una sorprendente variedad de tamaños y formas (fig. 1-1). Algunas se mueven con rapidez y tienen estructuras que cambian también rápidamente, como podemos observar en las filmaciones de amebas y rotíferos. Otras son en gran manera estacionarias y estructuralmente estables. El oxígeno mata algunas células, pero es un requerimiento absoluto para otras. En los organismos multicelulares la mayoría de las células están íntimamente involucradas con otras células. Si bien algunos organismos unicelulares viven en aislamiento, otros forman colonias o viven en estrecha asociación con otros tipos de organismos, como la bacteria que ayuda a las plantas a extraer el nitrógeno del aire o la que vive en el intestino y ayuda en la digestión de los alimentos.

CONTENIDO

1.1 Diversidad y concordancia de las células
1.2 Las moléculas de la célula
1.3 El trabajo de las células
1.4 Investigación de las células y sus partes
1.5 Una perspectiva genómica sobre la evolución



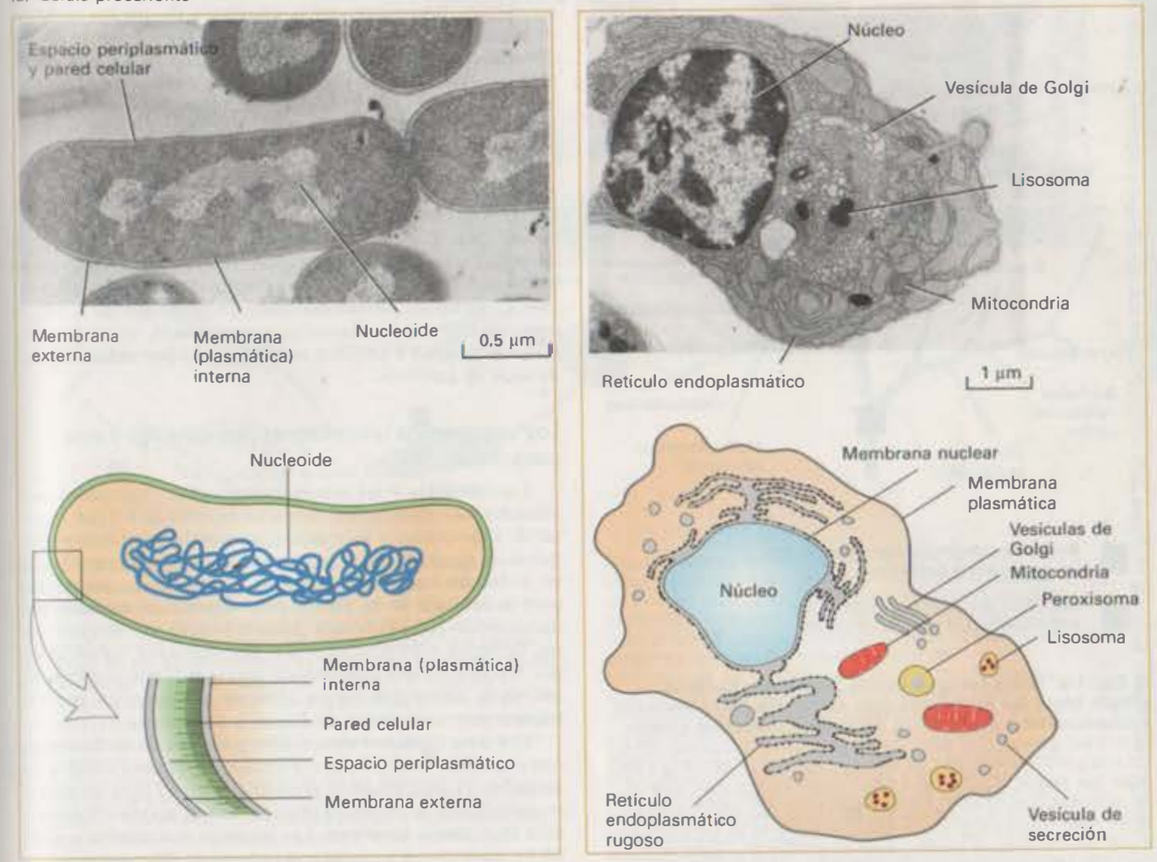
▲ Fig. 1-1. Las células exhiben una variedad asombrosa de formas y tamaños. Algunas de las variedades morfológicas de las células se ilustran en estas fotografías. Además de la morfología, las células difieren en su capacidad para moverse, su organización interna (células procariontes o eucariontes) y su actividad metabólica. (a) Eubacteria; nótense las células en división. Estas son *Lactococcus lactis*, utilizadas para producir quesos como el Roquefort, el Brie y el Camembert. (b) Una masa de arqueobacteria (*Methanosarcina*) que produce su energía convirtiendo dióxido de carbono y gas hidrógeno en metano. Algunas especies que viven en el rumen del ganado dan lugar a más de 150 litros de gas metano por día. (c) Células sanguíneas mostradas en color falso. Los glóbulos rojos son eritrocitos que portan oxígeno, los glóbulos blancos (leucocitos) son parte del sistema inmune y combaten infecciones, y las células verdes son plaquetas que proporcionan sustancias para coagular la sangre en una herida. (d) Grandes células únicas: huevos de dinosaurio fosilizados. (e) Colonia de algas verdes unicelulares, *Volvox aureus*. Las esferas grandes están formadas por muchas células individuales, visibles como puntos verdes o azules. Las masas amarillas de adentro son colonias hijas, cada una formada por numerosas células. (f) Una neurona de Purkinje del cerebelo, la cual puede formar más de cientos de miles de conexiones con otras células a través de la red ramificada de dendritas. La célula fue visualizada por introducción de una proteína fluorescente; el cuerpo celular es el bulbo de la parte inferior. (g) Las células pueden formar una capa epitelial, como en el corte fino de intestino mostrado aquí. Cada torre de células parecida a un dedo, una vellosidad, contiene muchas células en capas continuas. Los nutrientes se transfieren desde el alimento digerido a través de la capa epitelial hacia la sangre para ser transportados hacia otras partes del cuerpo. Se forman nuevas células continuamente cerca de la base de las vellosidades, y las células viejas son mudadas a la parte superior. (h) Las células vegetales están fijadas firmemente en el lugar en las plantas vasculares, sostenidas por un esqueleto celuloide rígido. Los espacios entre las células son conectados en tubos para transportar el agua y los alimentos. (Parte a) Gary Gaugler/Photo Researchers, Inc. Parte b) Ralph Robinson/Visuals Unlimited, Inc. Parte c) NIH/Photo Researchers, Inc. Parte d) John D. Cunningham/Visuals Unlimited, Inc. Parte e) Carolina Biological/Visuals Unlimited, Inc. Parte f) Helen M. Blau, Stanford University. Parte g) Jeff Gordon, Washington University School of Medicine. Parte h) Richard Kessel y C. Shih/Visuals Unlimited, Inc.)

A pesar de estas y de otras numerosas diferencias, todas las células comparten ciertas características estructurales y realizan muchos procesos complicados básicamente de la misma manera. A medida que desarrollemos en este texto los procesos celulares, nos centraremos en las bases moleculares de las diferencias y semejanzas en la estructura y función de diversas células.

Todas las células son procariontes o eucariontes

El universo biológico se compone de dos tipos de células: procariontes y eucariontes. Las células procariontes constan de un único compartimiento cerrado rodeado por la membrana plasmática, carecen de un núcleo definido y tienen una organización interna bastante sencilla (fig. 1-2a). Todos los procariontes poseen células de este tipo. Las bacterias, los procariontes más numerosos, son organismos unicelulares; las cianobacterias o algas verdeazuladas pueden ser unicelulares o cadenas filamentosas de células. Aunque las células bacterianas no tienen compartimientos rodeados por membrana, muchas proteínas están localizadas en el interior acuoso o citosol, lo que indica la presencia de una organización interna. Una sola bacteria de *Escherichia coli* tiene un peso seco de alrededor de 25×10^{-14} g. Se estima que 1-1,5 kg del peso promedio de un ser humano se debe a las bacterias. El número estimado de bacterias en la Tierra es de 5×10^{30}, con un peso aproximado de 10^{12} kg. Se han encontrado células procariontes a 11 kilómetros de profundidad en el océano y a 65 kilómetros por encima en la atmósfera; como se ve, son bastante adaptables. El carbono almacenado en las bacterias es casi tanto como el almacenado en las plantas.

A diferencia de las procariontes, las células eucariontes contienen un núcleo definido rodeado por una membrana y otros compartimientos internos, los orgánulos, rodeados por membranas extensas (fig. 1-2b). La región de la célula que se extiende entre la membrana plasmática y el núcleo es el citoplasma, que está compuesto del citosol (fase acuosa) y los orgánulos. Los eucariontes comprenden todos los miembros de los reinos animal y vegetal, incluidos los hongos, los cuales existen tanto en formas multicelulares (mohos) como en formas unicelulares (levaduras), y los protozoos (*proto*, primitivo; *zoos*, animal), que son exclusivamente unicelulares. Las células eucariontes miden unos 10-100 µm de longitud, por lo general son mucho más grandes que las bacterias. Un fibroblasto humano típico, un tipo de célula del tejido conectivo, podría medir cerca de 15 µm con un volumen y



▲ Fig. 1-2. Las células procariontes poseen una organización interna más simple que las células eucariontes. (a) Microfotografía electrónica de un corte delgado de *Escherichia coli*, una bacteria intestinal común. El nucleoide, que consiste en el DNA bacteriano, no se encuentra rodeado por una membrana. *E. coli* y algunas otras bacterias están rodeadas por dos membranas separadas por un espacio periplasmático. La pared celular delgada es adyacente a la membrana interna (b) Microfotografía electrónica de una célula plasmática, un tipo de célula del sistema inmune que secreta anticuerpos. Una sola membrana rodea la célula (la membrana plasmática), pero el interior contiene varios compartimientos limitados por membranas, los orgánulos. La característica que determina a una célula eucarionte es la segregación del DNA celular dentro de un núcleo definido, delimitado por una doble membrana. La membrana nuclear externa se continúa con el retículo endoplasmático rugoso, una fábrica para ensamblar proteínas. Las vesículas del Golgi procesan y modifican proteínas, la mitocondria genera energía, los lisosomas digieren materiales celulares para luego reciclarlos, los peroxisomas procesan moléculas de oxígeno y las vesículas secretoras transportan materiales celulares a la superficie para luego liberarlos. (Parte a) cortesía de I. D. J. Burdett y R. G. E. Murray. Parte b) de P. C. Cross y K. L. Mercer, 1993, *Cell and Tissue Ultrastructure: A Functional Perspective*, W. H. Freeman and Company.)



▲ Fig. 1-3. Todos los organismos, desde una bacteria simple hasta los mamíferos más complejos probablemente evolucionaron a partir de un progenitor unicelular común. Este árbol genealógico describe las relaciones evolutivas entre los tres principales linajes de los organismos. La estructura del árbol fue ideada al principio a partir de un criterio morfológico: las criaturas que se asemejaban fueron puestas cerca unas de otras. Más recientemente las secuencias de DNA y de las proteínas han sido utilizadas como un criterio de información más rico para la asignación de relaciones. Se cree que a mayor similitud en estas secuencias macromoleculares, los organismos están más relacionados. El árbol basado en comparaciones morfológicas y el registro fósil suelen concordar bien con los basados en datos moleculares. A pesar de que todos los organismos en los linajes de eubacteria y de archaea son procariontes, estos últimos son más similares a los eucariontes que a las eubacterias (bacterias "verdaderas") en algunos aspectos. Por ejemplo, los genomas de las arqueobacterias y de los eucariontes codifican proteínas histonas homólogas, las cuales se asocian con el DNA; por el contrario, las bacterias no tienen histonas. Asimismo, el RNA y los componentes proteicos de los ribosomas de las arqueobacterias son más semejantes a los eucariontes que a las bacterias verdaderas o eubacterias.

peso seco algunos cientos de veces más que una célula bacteriana de *E. coli*. Una ameba, un protozoo, puede tener más de 0,5 mm de largo. Un huevo de avestruz, que es una sola célula, es aún más grande y fácilmente visible para el ojo humano.

Se piensa que todas las células provienen de un progenitor común porque sus estructuras y moléculas tienen demasiadas similitudes. En los últimos años, un análisis detallado de las secuencias de DNA de diversos organismos procariontes ha revelado dos tipos distintos: la bacteria "verdadera" o eubacteria y archaea (también denominada arqueobacterias o archaeans). Basándonos en la suposición de que los organismos con genes más similares evolucionaron a partir de un progenitor común más recientemente que aquellos con genes más disímiles, los investigadores han ideado el árbol genealógico que se muestra en la figura 1-3. Según este árbol, se considera que archaea y eucariontes se separaron de las bacterias antes de separarse entre sí.

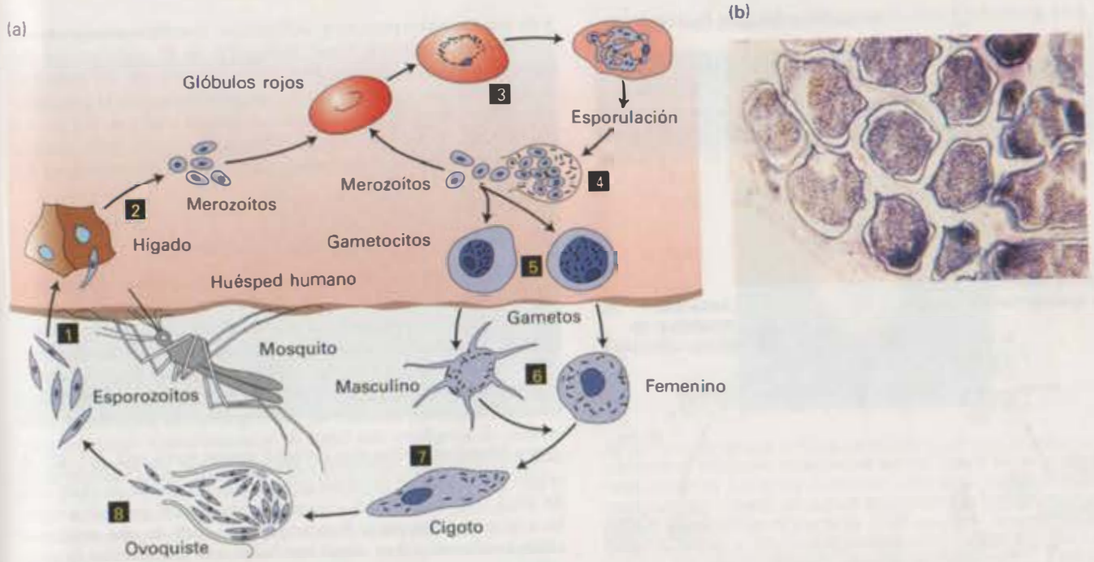
Muchas arqueobacterias se desarrollan en medioambientes inusuales y a menudo extremos, que pueden asemejarse a las condiciones ancestrales cuando la primera vida apareció en la Tierra. Por ejemplo, las halófilas ("amantes de la sal") necesitan altas concentraciones de sal para sobrevivir, y las termoacidófilas proliferan en manantiales de agua caliente (80 °C) sulfurosa, donde es común un pH menor de 2. Otras arqueobacterias, las llamadas metanógenas, viven en medios sin oxígeno y generan metano (CH_4) por reducción del dióxido de carbono.

Los organismos unicelulares nos ayudan y nos perjudican

Las bacterias y las arqueobacterias, los organismos unicelulares más abundantes, tienen un tamaño de 1-2 µm. A pesar de su pequeñez y su arquitectura simple, son fábricas bioquímicas notables, que convierten moléculas químicas simples en moléculas biológicas complejas. Las bacterias son críticas para la ecología de la Tierra, pero algunas causan enfermedades serias: peste bubónica (Muerte Negra) por *Yersinia pestis*, faringitis estreptocócica por *Streptococcus*, tuberculosis por *Mycobacterium tuberculosis*, ántrax maligno por *Bacillus anthracis*, cólera por *Vibrio cholerae*, intoxicación por alimentos por ciertos tipos de *E. coli* y *Salmonella*.

Los seres humanos somos albergues móviles de bacterias, como también lo son en cierta medida las plantas y todos los animales. Proporcionamos alimento y refugio para un número asombroso de microorganismos, con la mayor concentración en nuestros intestinos. Las bacterias nos ayudan a digerir los alimentos y a su vez son capaces de reproducirse. Una bacteria común de los intestinos, *E. coli* es también el microorganismo experimental favorito. En respuesta a señales provenientes de bacterias como *E. coli*, las células intestinales adquieren formas adecuadas para proporcionar un nido donde la bacteria pueda vivir, facilitando así una digestión apropiada debido al esfuerzo combinado de las células bacterianas e intestinales. A la inversa, la exposición a células intestinales cambia las propiedades de la bacteria de manera tal que éstas participan más eficazmente en la digestión. Tal comunicación y respuesta es una característica común de las células.

Algunas veces, el normal y pacífico mutualismo de seres humanos y bacterias es violado por una o por ambas partes. Cuando las bacterias comienzan a crecer en lugarers donde se tornan peligrosas (p. ej., en la circulación sanguínea o en una herida), las células de nuestro sistema inmune neutralizan o devoran a los intrusos. Las potentes medicinas antibióticas que selectivamente envenenan a las células procariontes, proveen una rápida asistencia al desarrollo lento de nuestra respuesta inmune. El conocimiento de la biología molecular de las células bacterianas nos permite comprender cómo las bacterias son envenenadas por los antibióticos, cómo comienzan a ser resistentes a ellos y qué procesos o estructuras presentes en las bacterias pero no en las células humanas podrían ser blancos útiles para nuevas drogas.



▲ Fig. 1-4 Los *Plasmodium*, parásitos que producen paludismo, son protozoos unicelulares con un ciclo de vida singular. Se conocen muchas especies de *Plasmodium* y pueden infectar diversos animales, ciclando entre insectos y vertebrados como huéspedes. Las cuatro especies que causan paludismo en los seres humanos experimentan transformaciones extraordinarias dentro de huéspedes humanos y mosquitos. (a) Diagrama del ciclo de vida. Los esporozoítos entran en el huésped humano cuando un mosquito *Anopheles* infectado pica a una persona **1**. Migran al hígado donde se desarrollan como merozoítos, los cuales son liberados a la sangre **2**. Los merozoítos difieren sustancialmente de los esporozoítos, de manera tal que estas transformaciones son una metamorfosis (del griego, "transformar" o "muchas formas"). Los merozoítos circulantes invaden los glóbulos rojos (GR) y se reproducen dentro de éstos **3**. Las proteínas producidas por algunas especies de *Plasmodium* se dirigen hacia la superficie de los GR infectados, provocando que las células se adhieran a las paredes de los vasos sanguíneos. Esto impide la circulación de células GR infectados al bazo donde las células de sistema inmune destruirían a los GR y a los organismos que ellas contienen. Después de desarrollarse y reproducirse en los GR por un período característico de cada especie *Plasmodium*, los merozoítos son liberados de manera sincrónica debido a la ruptura de un gran número de células infectadas **4**. Estos eventos provocan los síntomas bien conocidos del paludismo, como la fiebre y los escalofríos. Algunos de estos merozoítos liberados infectan GR adicionales, creando un ciclo de producción e infección. Por último, algunos merozoítos se desarrollan en gametocitos femeninos y masculinos **5**, otra metamorfosis. Estas células, que contienen la mitad del número normal de cromosomas, no pueden sobrevivir por mucho tiempo a no ser que sean transferidas dentro de la sangre a un mosquito *Anopheles*. En el estómago del mosquito, los gametocitos son transformados a gametos (masculinos y femeninos), otra metamorfosis marcada por el desarrollo de flagelos largos, parecidos a un pelo, sobre los gametos masculinos **6**. La fusión de los gametos genera cigotos **7** los cuales se implantan en las células de la pared estomacal y se convierten en ovoquistes, esencialmente fábricas para producir esporozoítos. La ruptura de un ovoquiste libera miles de esporozoítos **8**; éstos migran a las glándulas salivales, fijando la etapa para la infección de otro huésped humano. (b) Microfotografía electrónica de un ovoquiste maduro y de los esporozoítos que emergen. Los ovoquistes lindan con la superficie externa de las células del estómago y son encajonados dentro de una membrana que los protege del sistema inmune del huésped.
(Parte b) cortesía de R. E. Sinden.)

Al igual que las bacterias, los protozoos suelen ser miembros beneficiosos para la cadena alimentaria. Cumplen papeles clave en la fertilidad del suelo, ya que controlan las poblaciones bacterianas y excretan compuestos nitrogenados y fosfatos; también son clave en los sistemas de tratamientos de desechos, tanto de los naturales como de los producidos por el hombre. Además, estos eucariontes unicelulares son partes críticas de los ecosistemas marinos, al consumir grandes cantidades de fitoplancton y dar refugio a las algas fotosintéticas, las cuales utilizan la luz solar para producir formas de energía biológicamente útiles y moléculas pequeñas de combustible.

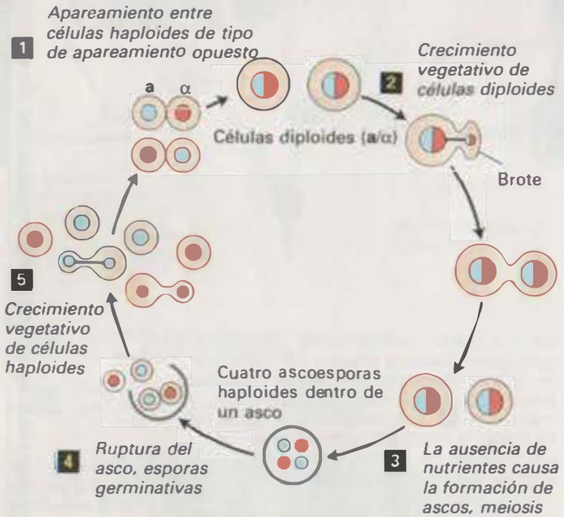
Sin embargo, algunos protozoos nos causan molestias: *Entamoeba histolytica* provoca disentería; *Trichomonas vaginalis*, vaginitis y *Trypanosoma brucei*, enfermedad del sueño. Cada año, el peor de los protozoos, *Plasmodium falciparum* y las especies relacionadas, causan más de 300 millones de nuevos casos de paludismo, una enfermedad que mata a 1,5 a 3 millones de personas cada año. Estos protozoos habitan en animales y mosquitos alternativamente, y cambian su morfología y su comportamiento en respuesta a las señales del ambiente. También reconocen receptores sobre la superficie de las células que infectan. El complejo ciclo de vida de *Plasmodium* ilustra con claridad cómo una célula simple puede adaptarse a cada nuevo desafío que encuentra (fig. 1-4). Todas las transformaciones en la célula que ocurren durante el ciclo de vida de *Plasmodium* están regidas por instrucciones codificadas en el material genéti-

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Entrada y salida de los esporozoítos *Plasmodium* de una célula del hígado

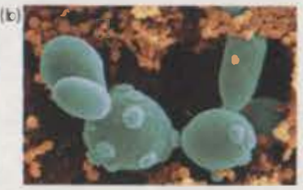
co de este parásito y son desencadenadas por factores ambientales.

El otro grupo de eucariontes unicelulares, las levaduras, también tienen sus aspectos buenos y malos, como sus primos multicelulares, los mohos. Levaduras y mohos, que en conjunto constituyen los hongos, cumplen papeles ecológicos importantes en la descomposición de los restos de las plantas y de los animales para su reutilización. También producen numerosos antibióticos y son utilizados en la elaboración del pan, el vino y los quesos. No tan benévolas son las enfermedades fúngicas, que van desde las infecciones de la piel relativamente inocuas, como el pie de atleta y el prurito de los jockeys, hasta las que amenazan la vida, como la neumonía por *Pneumocystis carinii*, una causa común de muerte en los pacientes con SIDA.

(a)



(b)



Brotación (*S. cerevisiae*)

▲ Fig. 1-5. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* se reproduce de manera sexual y asexual. (a) Dos células que difieren en el tipo de apareamiento, denominadas **a** y α, pueden aparearse para formar una célula **a**/α **1**. Las células **a** y α son haploides, lo que significa que contienen una copia simple de cada cromosoma de la levadura, la mitad del número habitual. El apareamiento da como resultado una célula diploide **a**/α que contiene dos copias de cada cromosoma. Durante el crecimiento vegetativo, las células diploides se multiplican por brotación mitótica, un proceso asexual **2**. En condiciones de ausencia de nutrientes, las células diploides realizan meiosis, un tipo especial de división celular, para formar ascoesporas haploides **3**. La ruptura de un asco libera cuatro esporas haploides, las cuales pueden germinar para convertirse en células haploides **4**. Éstas también pueden multiplicarse asexualmente **5**. (b) Microfotografía electrónica de la brotación de células de levadura. Después de que cada brote se separa, queda una cicatriz a la izquierda del sitio de brotación, de manera que puede contarse el número de brotes previos. Las células anaranjadas son bacterias. (Parte b) M. Abbey/Visuals Unlimited, Inc.)

Incluso las células pueden aparearse

La levadura comúnmente utilizada para hacer el pan y la cerveza, *Saccharomyces cerevisiae*, aparece a menudo en este libro porque ha probado ser un excelente organismo experimental. Al igual que muchos otros organismos unicelulares, las levaduras tienen dos tipos de apareamientos que conceptualmente son como los gametos femeninos y masculinos (óvulo y espermatozoide) de los organismos superiores. Dos células de levadura con tipos de apareamientos opuestos pueden fusionarse, o aparearse, para producir un tercer tipo de célula que contiene material genético proveniente de cada una de ellas (fig. 1-5). Tales ciclos de vida sexual permiten cambios más rápidos en la herencia genética de lo que sería posible sin el sexo y dan como resultado una adaptación de gran valor, a la vez que se eliminan rápidamente mutaciones perjudiciales. Quizás ésta es la razón de por qué, y no sólo en Hollywood, el sexo es tan ubicuo.

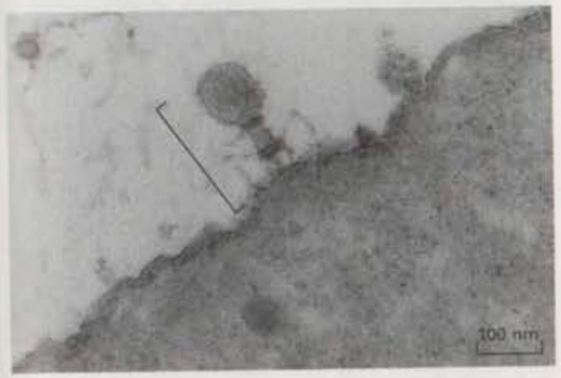
Los virus son los parásitos primarios

Las enfermedades causadas por virus son numerosas y todas muy familiares: varicela, gripe, algunos tipos de neumonía, poliomielitis, rabia, hepatitis, resfrío común, sarampión y muchas otras. La viruela, alguna vez plaga mundial, fue erradicada gracias a un gran esfuerzo de inmunización global que duró diez años y que comenzó a mediados de la década de 1960. Las infecciones en plantas (p. ej., el virus del mosaico enano del maíz) tienen un impacto económico importante sobre la producción de la cosecha. Plantar variedades resistentes a virus, desarrolladas por métodos tradicionales de cultivo y más recientemente por técnicas de ingeniería genética, puede reducir pérdidas significativas de las cosechas. La mayoría de los virus tienen una variedad de huéspedes bastante limitada e infectan ciertas bacterias, plantas o animales (fig. 1-6).

Debido a que los virus no pueden crecer o reproducirse por sí mismos, no se los considera seres vivos. Para sobrevivir, un virus debe infectar a una célula huésped y asumir el mando de su maquinaria interna para sintetizar proteínas virales, y en algunos casos, para replicar el material genético viral. Una vez que los nuevos virus son liberados, el ciclo comienza nuevamente. Los virus son mucho más pequeños que las células, del orden de 100 nanómetros (nm) de diámetro; en comparación, las células bacterianas suelen medir > 1000 nm (1 nm = 10^{-9} m). Un virus típico está compuesto de una cubierta proteica que encierra un centro que contiene el material genético, el cual lleva la información para producir más virus (cap. 4). La cubierta protege al virus del medioambiente y le permite adherirse a células huéspedes específicas o entrar en ellas. En algunos virus, la cubierta proteica está rodeada por una membrana externa.

La capacidad del virus para transportar su material genético dentro de las células y tejidos representa una amenaza médica y por otro lado también una "oportunidad médica". Las infecciones virales pueden ser devastadoramente destructivas y hacer que las células se rompan y los tejidos se deshagan. Sin embargo, muchos métodos de manipulación de células dependen del uso de virus para transportar material genético dentro de ellas. Para hacerlo, la porción del material genético viral potencialmente dañino es reemplazada con otro material genético, incluidos genes humanos. Estos virus alterados, o vectores, también pueden entrar en las células y llevar los genes introducidos con ellos (cap. 9). Algún día, las enfermedades causadas por genes defectuosos podrán tratarse mediante el uso de vectores virales para introducir una copia normal de un gen defectuoso en los pacientes. La investigación actual está dedicada a superar los considerables obstáculos que hay en este tipo de desarrollo, como hacer que los genes introducidos funcionen en los momentos y lugares que corresponden.

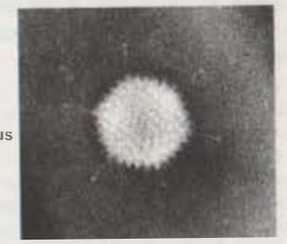
(a) Bacteriofago T4



(b) Virus del mosaico de tabaco



(c) Adenovirus

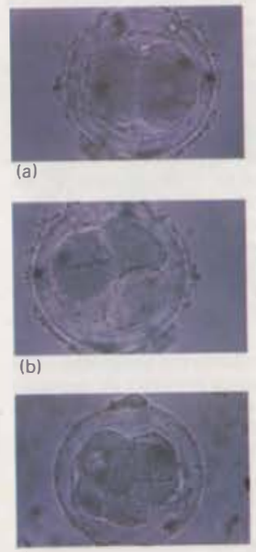


▲ Fig. 1-6. Los virus deben infectar una célula huésped para desarrollarse y reproducirse. Esta microfotografía electrónica ilustra algunas de las variedades estructurales exhibidas por los virus. (a) El bactenófago T4 (corchete) se adhiere a la célula bacteriana a través de la estructura de la cola. Los virus que infectan bacterias se llaman bacteriófagos, o simplemente fagos. (b) El virus del mosaico de tabaco causa un moteado en las hojas de plantas de tabaco infectadas y atrofia su crecimiento. c) Los adenovirus producen infecciones en los ojos y en el aparato respiratorio de los seres humanos. Este virus posee una cubierta membranosa a partir de la cual sobresalen largas glucoproteínas en forma de puntas. (Parte a) de A. Levine, 1991, *Viruses*, Scientific American Library, p. 20. Parte b) cortesía de R. C. Valentine. Parte c) cortesía de Robley C. Williams, University of California)

Nos desarrollamos a partir de una sola célula

En 1827, el médico alemán Karl von Baer descubrió que los animales crecen a partir de ovocitos provenientes de los ovarios de la madre. La fecundación de un ovocito por células del esperma produce un cigoto, una célula visualmente insignificante de 200 µm de diámetro. Todo ser humano comienza como un cigoto, el cual posee las instrucciones necesarias para construir el cuerpo humano que contiene alrededor de 100 billones (10^{14}) de células, una proeza asombrosa. El desarrollo comienza con la división del óvulo fecundado en dos, cuatro y luego ocho células, que forman el embrión de fase muy temprana (fig. 1-7). La continua proliferación celular y luego la diferenciación en distintos tipos de células dan lugar a cada tejido de nuestro cuerpo. Una célula inicial, el óvulo fecundado (cigoto), genera cientos de diferentes clases de células que difieren en contenido, forma, tamaño, color, movilidad y composición de la superficie. Continuaremos viendo cómo los genes y las señales controlan la diversificación celular en los capítulos 15 y 22.

Pero hacer diferentes clases de células –musculares, dérmicas, óseas, neuronas, glóbulos rojos– no es suficiente para producir un cuerpo humano. Las células deben organizarse en tejidos, órganos y miembros. Nuestras dos manos poseen la misma clase de células; incluso sus diferentes ordenamientos –en imagen especular– son críticos para la función. Además, muchas células exhiben distinta funcionalidad o asimetrías estructurales, una propiedad denominada polaridad. A partir



◀ Fig. 1-7. Las primeras divisiones celulares de un ovocito fertilizado establecen el escenario para todos los desarrollos subsecuentes. El desarrollo de un embrión de ratón se muestra en (a) estadio de dos células, (b) estadio de cuatro células y (c) estadio de ocho células. El embrión está rodeado por membranas que lo contienen. Las etapas correspondientes en el desarrollo del ser humano ocurren durante los primeros dias después de la fertilización. (Claude Edelmann/Photo Researchers, Inc.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Desarrollo embrionario temprano

de estas células polarizadas surgen los tejidos polarizados asimétricos, como las paredes interiores de los intestinos, y estructuras como las manos y los ventrículos del corazón. En capítulos posteriores se describirán las características que hacen que algunas células estén polarizadas, y cómo surgen éstas.

Las células madre, la clonación y las técnicas relacionadas ofrecen posibilidades excitantes pero surgen algunas preocupaciones

Los gemelos se originan de manera natural cuando la masa de células que componen el embrión de fase temprana se divide en dos partes, cada una de las cuales se desarrolla y se convierte en un animal individual. Cada célula en un embrión de ratón en el estadio de ocho células puede dar lugar a cualquier parte del cuerpo entero del animal. A las células con esta capacidad se las llama *células madre embrionarias (embryonic stem* [ES] *cells*). En el capítulo 22 aprenderemos cómo las células ES pueden obtenerse en el laboratorio (cultivarse) para luego desarrollarse en varios tipos de células diferenciadas en condiciones apropiadas.

La capacidad para hacer y manipular embriones de animales en el laboratorio ha conducido a nuevas oportunidades médicas como así también a varias preocupaciones éticas y sociales. La fecundación in vitro, por ejemplo, ha permitido tener hijos a muchas parejas estériles. Esta técnica nueva involucra la extracción del núcleo de un espermatozoide defectuoso incapaz de fecundar normalmente a un óvulo, la inyección de este núcleo en el óvulo y la implantación posterior del óvulo fecundado en la madre.

En los últimos años, se ha utilizado el núcleo proveniente de células de animales adultos para producir nuevos animales. En este procedimiento, se extrae el núcleo de una célula del cuerpo (p. ej., de la piel o de la sangre) de un animal donante y se lo introduce en un óvulo no fecundado de un mamífero al que previamente se le eliminó su propio núcleo. Este óvulo manipulado, que es equivalente a un óvulo fecundado, es implantado luego en una madre adoptiva. La capacidad del núcleo donante para dirigir el desarrollo de un animal, sugiere que toda la información requerida para la vida está contenida en el núcleo de algunas células adultas. Dado que en un animal producido de esta forma todas las células tienen sólo los genes de la célula donante original, el nuevo animal es un clon del donante (fig. 1-8). Repitiendo el proceso es posible obtener muchos clones. Sin embargo, hasta ahora la mayoría de los embriones producidos por esta técnica de *clonación* (transferencia nuclear) no sobrevivieron debido a defectos de nacimiento. Aun los animales que nacen vivos han mostrado anormalidades, incluido un envejecimiento acelerado. En contraste, la reproducción de las plantas por medio de gajos es un tipo de clonación logrado rápidamente por jardineros, granjeros y técnicos de laboratorios.

Las dificultades técnicas y posiblemente peligrosas de la clonación no han disuadido a algunas personas de perseguir la meta de clonar a un ser humano. Sin embargo, esta clonación tiene *per se* un interés científico muy limitado y la mayoría de los científicos se opone debido a los altos riesgos. El mayor interés científico y médico es la capacidad de generar tipos de células específicos a partir de células madre adultas o embrionarias. El interés científico proviene del aprendizaje de las señales que pueden desatar el potencial de los genes para formar un cierto tipo de célula. El interés médico surge de la posibilidad de tratar numerosas enfermedades en las que



▲ Fig. 1-8. Cinco ovejas clonadas genéticamente idénticas. Un embrión de oveja en fase temprana fue dividido en cinco grupos de células y cada uno fue implantado separadamente en una madre adoptiva, al igual que el proceso natural de gemelos. En una etapa temprana las células son capaces de adaptarse y formar un animal completo; más tarde en el desarrollo las células se convierten progresivamente en restrictivas y no pueden continuar haciéndolo. Una forma alternativa para clonar animales es reemplazar el núcleo de múltiples embriones de una célula, con el núcleo donante de células de una oveja adulta. Cada embrión será genéticamente idéntico al adulto a partir del cual se obtuvo el núcleo. Bajos porcentajes de embriones sobreviven a este procedimiento para dar animales saludables; todavía no se conoce el impacto total de esta técnica sobre los animales.
(Geoff Tompkinson/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.)

se han perdido o dañado tipos particulares de células y de reparar heridas por completo.

1.2 Las moléculas de la célula

Los biólogos celulares y moleculares exploran cómo todas las propiedades características de la célula surgen a partir de eventos moleculares esenciales: el ensamblaje de moléculas grandes, la unión de grandes moléculas, los efectos catalíticos que promueven reacciones químicas particulares y el despliegue de información transportada por moléculas gigantes. Aquí examinaremos las clases de moléculas más importantes que constituyen los fundamentos químicos de la estructura y función celular.

Moléculas pequeñas que transportan energía, transmiten señales y se unen en macromoléculas

Gran parte del contenido celular es una sopa acuosa sazonada con moléculas pequeñas (p. ej., azúcares simples, aminoácidos, vitaminas) y con iones (p. ej., sodio, cloruro, iones calcio). La localización y concentración de iones y moléculas pequeñas dentro de la célula están controladas por numerosas proteínas insertadas en la membrana celular. Estas bombas transportadoras y canales de iones mueven casi todos los iones y moléculas pequeñas dentro y fuera de la célula y sus orgánulos (cap. 7).

Almacena? (NO)
Enlace rico en energía
??

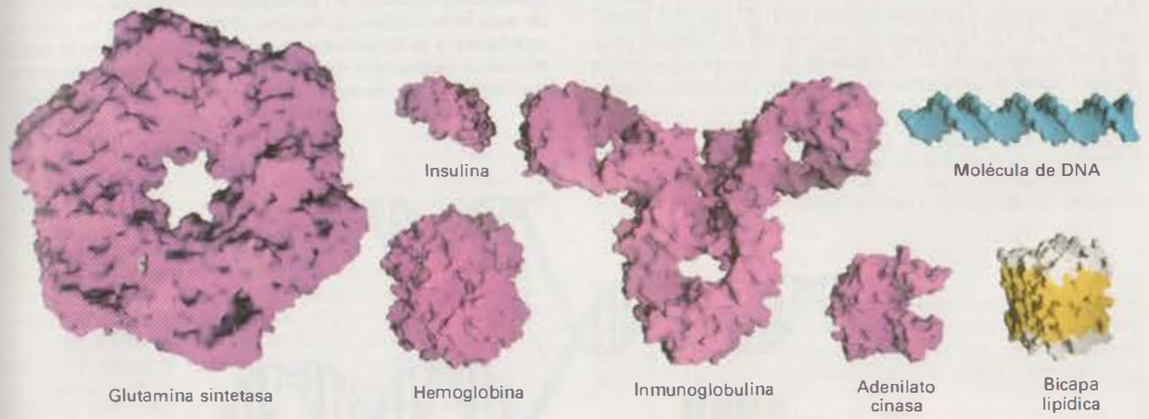
Una de las moléculas pequeñas mejor conocidas es el adenosintrifosfato (ATP), que almacena rápidamente la energía química disponible en dos de sus enlaces químicos (véase fig. 2-24). Cuando las células escinden estos enlaces ricos en energía del ATP, la energía liberada puede ser aprovechada para impulsar un proceso que requiere energía, como la contracción muscular o la biosíntesis de proteína. Para obtener energía para hacer ATP, las células descomponen moléculas de alimentos. Por ejemplo, cuando el azúcar es degradado a dióxido de carbono y agua, la energía almacenada en el enlace químico original se libera y gran parte de ésta puede ser "capturada" en forma de ATP (cap. 8). Todas las células, ya sean vegetales, animales o bacterias pueden fabricar ATP mediante este proceso. A su vez, las plantas y algunos otros organismos también pueden obtener la energía de la luz solar para formar ATP en la fotosíntesis.

Otras moléculas pequeñas pueden actuar como señales dentro de las células y entre ellas. Tales señales dirigen numerosas actividades celulares (caps. 13-15). El potente efecto que un suceso escalofriante provoca sobre nuestro cuerpo proviene de la inundación instantánea del cuerpo con una pequeña molécula hormonal, la adrenalina, que moviliza una respuesta de "lucha o huida". Los movimientos necesarios para huir o luchar son desencadenados por un impulso nervioso que fluye desde el cerebro hacia los músculos con la ayuda de neurotransmisores, otro tipo de pequeñas moléculas de señalización que examinamos en el capítulo 7.

Ciertas moléculas pequeñas (los monómeros) de la sopa celular pueden unirse para formar polímeros a través de la repetición de un único tipo de reacción de enlace químico (véase fig. 2-11). Las células producen tres tipos de polímeros grandes, comúnmente llamados macromoléculas: polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. Los azúcares, por ejemplo, son los monómeros utilizados para formar polisacáridos. Estas macromoléculas son componentes estructurales críticos para la pared celular de las plantas y para el esqueleto de los insectos. Un polisacárido típico es una cadena lineal o ramificada de repeticiones de unidades idénticas de azúcar. Tal cadena lleva información: el número de unidades. Sin embargo, si las unidades *no* son idénticas, el orden y el tipo de unidades llevan información adicional. Como veremos en el capítulo 6, algunos de los polisacáridos exhiben la mayor complejidad informativa asociada con un código lineal constituido mediante diferentes unidades ensambladas en un orden particular. No obstante, esta propiedad es más típica de los otros dos tipos de macromoléculas biológicas: las proteínas y los ácidos nucleicos.

Las proteínas otorgan estructura a las células y realizan la mayoría de las tareas celulares

La estructura variada e intrincada de las proteínas les permite llevar a cabo numerosas funciones. Las células forman proteínas mediante el enlace lineal de 20 aminoácidos diferentes (véase fig. 2-13). Las proteínas comúnmente tienen una longitud de entre 100 a 1.000 aminoácidos, pero algunas son mucho más cortas y otras mucho más largas. Nosotros obtenemos aminoácidos ya sea sintetizándolos, a partir de otras moléculas o descomponiendo las proteínas que ingerimos. Desde el punto de vista dietario los aminoácidos "esenciales", son los ocho que no podemos sintetizar y debemos obtener de los alimentos. Los frijoles y el maíz juntos tienen los ocho, por lo que esta combinación es particularmente nutritiva. Una vez formada la cadena de aminoácidos, se pliega de manera compleja y adquiere así una estructura tridimensional y una función distintiva para cada proteína (fig. 1-9).



▲ Fig. 1-9. Las proteínas varían enormemente en tamaño, forma y función. Estos modelos de la superficie accesible al agua de algunas proteínas representativas son dibujos en una escala común y revelan las numerosas proyecciones y grietas sobre la superficie. Cada proteína tiene una forma tridimensional definida que está estabilizada por numerosas interacciones químicas analizadas en los capítulos 2 y 3. Entre las proteínas ilustradas aparecen enzimas (glutamina sintetasa y adenilato cinasa), un anticuerpo (inmunoglobulina), una hormona (insulina) y el transportador de oxígeno de los glóbulos rojos (hemoglobina). Los modelos de un segmento de ácido nucleico (DNA) y de una pequeña porción de la bicapa lipídica que forma las membranas celulares (véase sección 1.3) demuestran el grosor relativo de estas estructuras en comparación con las proteínas típicas
(Cortesía de Gareth White.)

Algunas proteínas son similares a otras, y por lo tanto, pueden ser consideradas miembros de una familia de proteínas. Se han identificado pocos cientos de esas familias. Muchas proteínas son diseñadas para trabajar en lugares particulares dentro de una célula o para ser liberadas al espacio extracelular (*extra*, "afuera"). Existen elaborados caminos celulares para asegurar que las proteínas sean transportadas a sus localizaciones intracelulares apropiadas (*intra*, dentro) (caps. 16 y 17).

Las proteínas pueden servir como componentes estructurales de una célula; por ejemplo, formando un esqueleto interno (caps. 5, 19 y 20). Pueden ser sensores que se transforman con la temperatura, con la concentración de iones u otras propiedades de cambio celular. Pueden importar y exportar sustancias a través de la membrana plasmática (cap. 7). Pueden ser enzimas que aceleran reacciones químicas para que éstas ocurran mucho más rápido de lo que podrían hacerlo sin la adición de estas proteínas catalíticas (cap. 3). Pueden unirse a genes específicos, activándolos o desactivándolos (caps. 13-15). Pueden ser motores que mueven otras proteínas alrededor, al quemar energía química (ATP) (caps. 19 y 20).

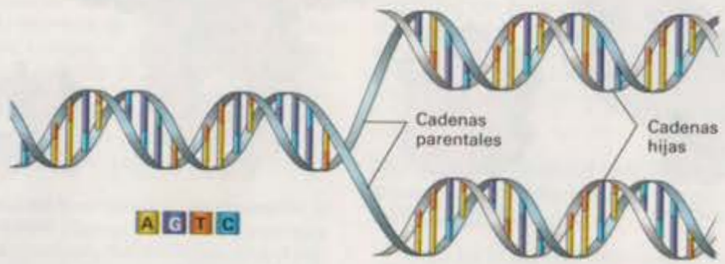
¿Cómo pueden 20 aminoácidos formar todas las diferentes proteínas necesarias para realizar estas tareas diversas? A primera vista parece imposible. Pero si una proteína "típica" está compuesta de 400 aminoácidos, hay 20^{400} posibles proteínas diferentes. Aun aceptando que muchas de ellas serían funcionalmente equivalentes, inestables o descartables, el número de proteínas posibles tiende a infinito.

Podríamos preguntarnos entonces cuántas moléculas de proteína necesita una célula para funcionar y mantenerse. Para estimar este número, tomemos una célula eucarionte típica, como un hepatocito (célula del hígado). Esta célula, aproximadamente un cubo de 15 µm (0,0015 cm) de lado, tiene un volumen de $3{,}4 \times 10^{-9}$ cm^3 (o mililitros). Si se presupone que la densidad celular es de 1,03 g/mL, la célula pesaría $3{,}5 \times 10^{-9}$ g. Como se considera que el 20% del peso de una célula corresponde a proteína, el peso total de proteína celular es de 7×10^{-10} g. En promedio, la proteína de levadura tiene un peso molecular de 52.700 (g/mol). Si se acepta que éste es el valor típico de las proteínas eucariontes, podemos calcular el número total de moléculas proteicas por célula hepática en alrededor de $7{,}9 \times 10^{9}$ a partir del peso total de las proteínas y el número de Avogadro ($6{,}02 \times 10^{23}$), que es la cantidad de moléculas por mol de cualquier compuesto químico. Para llevar este cálculo un paso más adelante, considérese que una célula hepática contiene unas 10.000 proteínas diferentes; así una célula posee en promedio cerca de un millón de moléculas de cada tipo de proteína. No obstante, la cantidad de las diferentes proteínas varía ampliamente, desde la proteína receptora que une la insulina, bastante rara (20.000 moléculas) hasta la abundante proteína estructural, la actina (5×10^{8} moléculas).

Los ácidos nucleicos portan información codificada para realizar proteínas en el momento y lugar correctos

La información acerca de cómo, cuándo y dónde se produce cada clase de proteína es llevada en el material genético, un polímero llamado ácido desoxirribonucleico (DNA). La estructura tridimensional del DNA está formada por dos largas hebras helicoidales enrolladas alrededor de un eje común, que forman una doble hélice. Las hebras de DNA están compuestas de monómeros llamados nucleótidos; éstos a menudo son referidos como *bases* porque sus estructuras contienen bases orgánicas cíclicas (cap. 4).

Cuatro nucleótidos diferentes, en forma abreviada A, T, C y G, son unidos a lo largo en una hebra de DNA, con las partes de las bases proyectadas hacia afuera de la columna helicoidal de la hebra. Cada doble hélice de DNA tiene una construcción simple: donde sea que haya una A en una hebra, hay una T en la otra y cada C se aparea con una G (fig. 1-10). Este apareamiento complementario de las dos hebras es tan fuerte que si se separan hebras complementarias, éstas se reaparean espontáneamente en condicionaes de sal y temperatura apropiadas. Tal hibridación es muy útil para detectar una hebra utilizando la otra. Por ejemplo, si se purifica una hebra y se la adhiere a un papel, embebiendo el papel con una solución que contiene la otra hebra complementaria tenderán a unirse como el cierre de una cremallera, incluso si



▲ Fig. 1-10. El DNA se compone de dos hebras complementarias que se enrollan entre sí para formar una doble hélice. *(Izquierda)* La doble hélice está estabilizada por enlaces de hidrógeno débiles entre las bases A y T y entre las bases C y G. *(Derecha)* Durante la replicación, las dos hebras son desenrolladas y utilizadas como moldes para producir las hebras complementarias. El resultado son dos copias de la doble hélice original, cada una de las cuales contiene una de las hebras originales y una hebra hija nueva (complementaria).

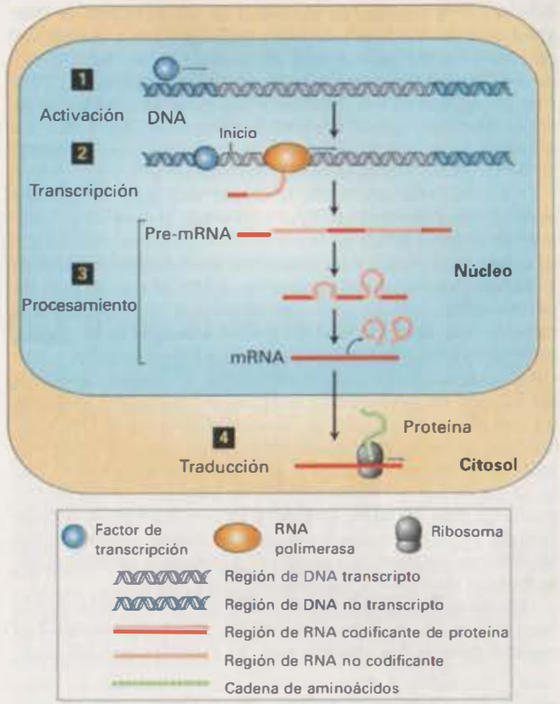
la solución también contiene muchas otras hebras de DNA que no se aparean.

La información genética llevada por el DNA reside en su secuencia, es decir el ordenamiento lineal de los nucleótidos a lo largo de la hebra. La porción de DNA que contiene información se divide en unidades funcionales diferenciadas, los genes, los cuales tienen entre 5.000 a 100.000 nucleótidos de largo. La mayoría de las bacterias tiene unos pocos cientos de genes; los seres humanos, cerca de 40.000. Los genes que llevan instrucciones para elaborar proteínas, suelen contener dos partes: una *región codificante*, que especifica la secuencia de aminoácidos de una proteína y una *región regulatoria*, que controla cuándo y en cuáles células se produce la proteína.

Las células utilizan dos procesos en serie para convertir la información codificada en el DNA en proteínas (fig. 1-11). En el primero, denominado **transcripción**, la región codificante de un gen de la doble hélice de DNA es copiada en una versión de hebra simple de ácido ribonucleico (RNA). Un enzima grande, la **RNA polimerasa**, cataliza el enlace de nucleótidos en una cadena de RNA utilizando DNA como molde. En las células eucariontes, el producto inicial de RNA se procesa en una molécula más pequeña de **RNA mensajero (mRNA)**, la cual se mueve hacia el citoplasma. Aquí el **ribosoma**, una enorme y compleja maquinaria molecular compuesta tanto por proteínas como por RNA, lleva a cabo el segundo proceso, llamado **traducción**. Durante la traducción, el ribosoma se ensambla y enlaza aminoácidos en el orden preciso dictado por la secuencia de mRNA de acuerdo con el código genético universal. Examinaremos en sus detalles los componentes celulares que llevan a cabo la transcripción y la traducción en el capítulo 4.

Todos los organismos poseen formas de controlar cuándo y dónde se pueden transcribir sus genes. Por ejemplo, casi todas las células de nuestro cuerpo contienen un juego completo de genes, pero en cada tipo de célula algunos de estos genes están activos o encendidos y se utilizan para hacer proteínas. Por esta razón las células del hígado producen algunas proteínas que no producen las células del riñón y viceversa. Más aún, muchas células pueden responder a señales externas o a cambios de las condiciones externas activando o reprimiendo genes específicos, y por lo tanto adaptando su repertorio de proteínas para responder a las necesidades del momento. Tal control génico depende de las proteínas de unión al DNA, denominadas factores de transcripción, los cuales se unen al DNA y actúan como interruptores, activando o reprimiendo la transcripción de genes particulares (cap. 11).

Los factores de transcripción adquieren formas tan precisas que son capaces de unirse de manera preferencial a regiones regulatorias de sólo algunos de los cientos de genes presentes en el DNA de una célula. Típicamente, una proteína de unión al DNA reconocerá una corta secuencia de DNA de entre 6-12 pares de bases de longitud. Un segmento de DNA que contiene 10 pares de bases puede tener 4^{10} secuencias posibles (1.048.576), ya que cada posición puede ser ocupada por cualquiera de los cuatro nucleótidos. En el DNA de una célula sólo existen algunas pocas copias de tales secuencias, lo que asegura la especificidad de la activación y represión de genes. Múltiples copias de un tipo de factor de transcripción pueden regular coordinadamente un grupo de genes si los sitios de unión para ese factor existen cerca de cada gen del grupo. A menudo, los factores de transcripción trabajan como complejos multiproteicos, con más de una proteína que aporta su propia especificidad de unión al DNA para seleccionar los genes por regular. En los organismos complejos se utilizan cientos de factores de transcripción diferentes para formar un sistema de control exquisito que activa los genes correctos en el tiempo correcto y en la célula correcta.



▲ Fig. 1-11. La información codificada en el DNA es convertida en la secuencia de aminoácidos de proteínas mediante un proceso de múltiples pasos. Paso 1: Los factores de transcripción se unen a regiones regulatorias de genes específicos para controlarlos y activarlos. Paso 2: El paso siguiente es el ensamblaje de un complejo de iniciación multiproteico que se une al DNA, la RNA polimerasa comienza la transcripción de un gen activado en un punto específico, el sitio de inicio. La polimerasa se mueve a lo largo del DNA uniendo nucleótidos en una simple hebra de pre-mRNA transcripto, utilizando una de las hebras de DNA como molde. Paso 3: El transcripto es procesado para eliminar las secuencias no codificantes. Paso 4: En una célula eucarionte, el RNA mensajero maduro (mRNA) se mueve hacia el citoplasma, donde es unido por los ribosomas que leen su secuencia y forman una proteína mediante enlaces químicos de aminoácidos en una cadena lineal.

El genoma está condensado en cromosomas y se replica durante la división celular

La mayoría del DNA de las células eucariontes se localiza en el núcleo y está intensamente plegado en estructuras familiares denominadas cromosomas (cap. 10). Cada cromosoma contiene una sola molécula de DNA lineal asociada con ciertas proteínas. En las células procariontes la mayoría o toda la información genérica se encuentra en una única molé-

cula de DNA circular, de alrededor de un milímetro de longitud; esta molécula se extiende y repliega sobre sí misma varias veces en la región central de la célula (véase fig. 1-2). El genoma de un organismo comprende la totalidad de su DNA. Con excepción de los ovocitos y los espermatozoides, cada célula humana normal tiene 46 cromosomas (fig. 1-12). La mitad de éstos, y por lo tanto la mitad de los genes, proviene de la madre y la otra mitad, del padre.

Cada vez que una célula se divide, una gran maquinaria multiproteica de replicación, el replisoma, separa las dos hebras de la doble hélice de DNA en el cromosoma y utiliza cada hebra como molde para ensamblar nucleótidos en una nueva hebra complementaria (véase fig. 1-10). El resultado es un par de dobles hélices, cada una idéntica a la original. En el capítulo 4 se describe la DNA polimerasa, que es la responsable de la unión de nucleótidos en una hebra de DNA y muchos otros componentes del replisoma. El diseño molecular del DNA y las propiedades notables del replisoma aseguran un copiado rápido y exacto. Muchas moléculas de DNA polimerasa trabajan concertadamente, cada una copiando una parte del cromosoma. Todo el genoma de la mosca de la fruta, cerca de $1{,}2 \times 10^8$ nucleótidos de longitud, puede ser copiado en ¡tres minutos! Debido a la exactitud de la replicación del DNA casi todas las células de nuestro cuerpo portan las mismas instrucciones genéticas y podemos heredar el pelo marrón de mamá y los ojos azules de papá.

Un ejemplo bastante espectacular del control génico es la inactivación de un cromosoma en las células femeninas. Las mujeres poseen dos cromosomas X, mientras que los hombres poseen un cromosoma X y un cromosoma Y, el cual tiene genes diferentes que el cromosoma X. Aún más, los genes sobre el cromosoma X deben ser igualmente activos en células femeninas (XX) y en células masculinas (XY). Para lograr este balance, uno de los cromosomas de las células femeninas está modificado químicamente y condensado en una masa muy pequeña denominada cuerpo de Barr, el cual se encuentra inactivo y nunca se transcribe.

Sorprendentemente, nosotros heredamos una cantidad pequeña de material genético completamente y sólo de nuestra madre. Este es un DNA circular presente en la mitocondria, el orgánulo de las células eucariontes que sintetiza ATP utilizando la energía liberada por la degradación de los nutrientes. La mitocondria contiene múltiples copias de su propio genoma de DNA, el cual codifica algunas proteínas mitocondriales (cap. 10). Debido a que cada ser humano hereda el DNA mitocondrial sólo de su madre (viene con el óvulo y no con el espermatozoide), la característica distintiva de un DNA mitocondrial particular, puede utilizarse para describir la historia materna. Los cloroplastos, los orgánulos que llevan a cabo la fotosíntesis en las plantas, también poseen su propio genoma circular.

Las mutaciones pueden ser buenas, malas o indiferentes

Durante la replicación de DNA ocurren errores espontáneos que causan cambios en la secuencia de nucleótidos. Tales cambios, o mutaciones, también pueden surgir de la radiación que causa daño a la cadena de nucleótidos, o de venenos químicos, como los presentes en el humo del cigarrillo, lo que lleva a errores durante el proceso de copiado del DNA (cap. 23). Las mutaciones se producen en varias formas: un simple cambio de un nucleótido por otro; la deleción, la inserción o la inversión de uno a millones de nucleótidos en el DNA de un cromosoma, y la translocación de una extensión de DNA desde un cromosoma a otro.



▲ Fig. 1-12. Se pueden "pintar" los cromosomas para facilitar su identificación. Un ser humano normal posee 23 pares de cromosomas morfológicamente distintos; un miembro de cada par es heredado del padre y el otro de la madre. (*Izquierda*) Cromosomas esparcidos en una célula del cuerpo humano a mitad del proceso de mitosis, cuando los cromosomas están totalmente condensados. Esta preparación fue tratada con reactivos de tinción marcados fluorescentemente que permiten que cada uno de los 22 pares de cromosomas más el X y el Y se vean de un color diferente en el microscopio fluorescente. Esta técnica de hibridación in situ fluorescente múltiple (M-FISH: multiplex fluorescence in situ hybridization) es denominada a veces coloración de cromosomas (cap. 10). (*Derecha*) Los cromosomas de la preparación de la izquierda se disponen de a pares en orden de tamaño descendiente, disposición denominada cariotipo. La presencia de los cromosomas X e Y identifica el sexo de un individuo como masculino. (Cortesía de M. R. Speicher.)

En los animales que se reproducen sexualmente como nosotros, las mutaciones pueden heredarse sólo si están presentes en las células que pueden contribuir a la formación de la descendencia. Estas células de la línea germinal incluyen los óvulos, los espermatozoides y sus células precursoras. Las células del cuerpo que no contribuyen a la descendencia se denominan células somáticas. Las mutaciones que ocurren en estas células nunca son heredadas, aunque pueden contribuir al inicio del cáncer. Las plantas tienen una división menos distintiva entre células somáticas y de la línea germinal debido a que muchas de ellas pueden funcionar con ambas capacidades.

Los genes mutados que codifican proteínas alteradas o que no pueden ser controladas apropiadamente causan numerosas enfermedades hereditarias. Por ejemplo, la anemia falciforme es atribuible a la sustitución de un solo nucleótido en el gen de la hemoglobina, el cual codifica la proteína que transporta oxígeno en los glóbulos rojos. El cambio de sólo un aminoácido causado por la mutación de la anemia falciforme reduce la habilidad de los glóbulos rojos para transportar oxígeno desde los pulmones hacia los tejidos. Recientes avances en la detección de mutaciones causantes de enfermedades y el conocimiento acerca de cómo éstas afectan las funciones celulares ofrecen grandes posibilidades para reducir sus efectos a menudo devastadores.

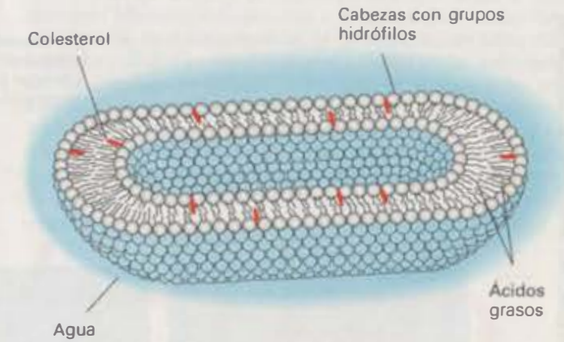
La secuenciación del genoma humano ha mostrado que una gran proporción de nuestro DNA no codifica para ningún RNA o cumple alguna función regulatoria discernible, un hallazgo bastante inesperado. Las mutaciones en estas regiones casi nunca producen efectos inmediatos, ya sean buenos o malos. Sin embargo, tales mutaciones "indiferentes" en el DNA no funcional pueden haber tenido un papel primordial en la evolución, conduciendo a la creación de nuevos genes o nuevas secuencias regulatorias para controlar genes ya existentes. Por ejemplo, siendo que los sitios de unión para los factores de transcripción típicamente son de sólo 10-12 nucleótidos de longitud, algunas mutaciones de sólo un nucleótido pueden convertir un fragmento de DNA en un sitio regulatorio funcional de unión a proteína.

Tanto en eucariontes como en procariontes mucho del DNA no esencial consiste en secuencias altamente repetitivas que pueden moverse desde un lugar a otro del genoma. Estos elementos móviles de DNA pueden saltar (transponer) en genes, comúnmente dañándolos, aunque algunas veces activándolos. Los saltos generalmente son bastante escasos como para no poner en peligro al organismo huésped. Los elementos móviles, descubiertos primero en plantas, son responsables de la diversidad del color de la hoja, y de los diferentes y hermosos patrones de colores de los granos del maíz indio. Saltando dentro y fuera de los genes que controlan la pigmentación mientras la planta se desarrolla, los elementos móviles dan lugar al elaborado patrón coloreado. Más tarde estos elementos fueron hallados en bacterias en las cuales a menudo transportan y, lamentablemente, diseminan genes de resistencia a los antibióticos.

Ahora podemos entender que los elementos móviles se hayan multiplicado y acumulado lentamente en los genomas durante el tiempo evolutivo y se volvieran una propiedad de los genomas en los organismos actuales. Estos son los responsables de un asombroso 45% del genoma humano. Algunos de nuestros propios elementos de DNA móviles son copias –a menudo muy mutadas o dañadas– de genomas de virus que pasaron parte de su ciclo de vida como segmentos de DNA insertos en el DNA de la célula huésped. Debido a esto llevamos en los cromosomas los residuos genéticos de infecciones adquiridas por nuestros antepasados. Vistos alguna vez sólo como moléculas parásitas, ahora se cree que los elementos móviles han contribuido significativamente a la evolución de los organismos superiores (cap. 10).

1.3 El trabajo de las células

En esencia, cualquier célula es simplemente un compartimiento con un interior acuoso separado del ambiente externo por una membrana (la membrana plasmática) que previene el flujo libre de moléculas dentro y fuera de ella. Además, las células eucariontes contienen abundantes membranas internas que subdividen a la célula en varios compartimientos específicos, los orgánulos. La membrana plasmática y otras membranas celulares están compuestas principalmente de dos capas de moléculas de fosfolípidos. Estas moléculas bipartitas tienen un extremo que "ama el agua" (hidrófilo) y otro extremo que "odia el agua" (hidrófobo). Las dos capas fosfolipídicas están orientadas con todos los extremos hidrófilos en dirección a las superficies internas y externas y los extremos hidrófobos están enterrados en el interior (fig. 1-13). Menores cantidades de otros lípidos, como el colesterol y muchas clases de proteínas se encuentran insertas en la bicapa



▲ Fig. 1-13. El interior acuoso de las células está rodeado por la membrana plasmática, una doble capa de fosfolípidos. Las moléculas de fosfolípidos están orientadas con sus cadenas de ácidos grasos (líneas negras ondulantes) mirando hacia adentro y sus cabezas con grupos hidrófilos (esferas blancas) mirando hacia afuera. Por lo tanto, ambas caras de la membrana están revestidas por cabezas polares, principalmente grupos fosfatos cargados, adyacentes a los espacios acuosos que están dentro y fuera de la célula. Todas las membranas biológicas tienen la misma estructura básica de bicapa lipídica. El colesterol (rojo) y diversas proteínas (no se muestran) están embebidas en la bicapa. En realidad, el espacio interno es mucho más grande en relación con el volumen de la membrana plasmática representada aquí.

fosfolipídica. Las moléculas de lípidos y algunas proteínas pueden deslizarse en el plano de la membrana, otorgándole un carácter fluido. Esta fluidez de la membrana le permite a las células cambiar la forma e incluso moverse. Sin embargo, la adhesión de algunas proteínas de la membrana a otras moléculas dentro o fuera de la célula restringe sus movimientos laterales. Conoceremos más respecto de las membranas y de cómo las moléculas las atraviesan en los capítulos 5 y 7.

El citosol y los espacios internos de los orgánulos difieren unos de otros y del exterior celular en acidez, composición iónica y contenido de proteínas. Por ejemplo, la composición de sales en el interior de la célula es a menudo drásticamente diferente de lo que es afuera. Debido a este "microclima" diferente, cada compartimiento celular tiene sus propias tareas asignadas en el trabajo total de la célula (cap. 5). Las funciones únicas y los microclimas de los distintos compartimientos celulares se deben principalmente a las proteínas que residen en sus membranas o en su interior.

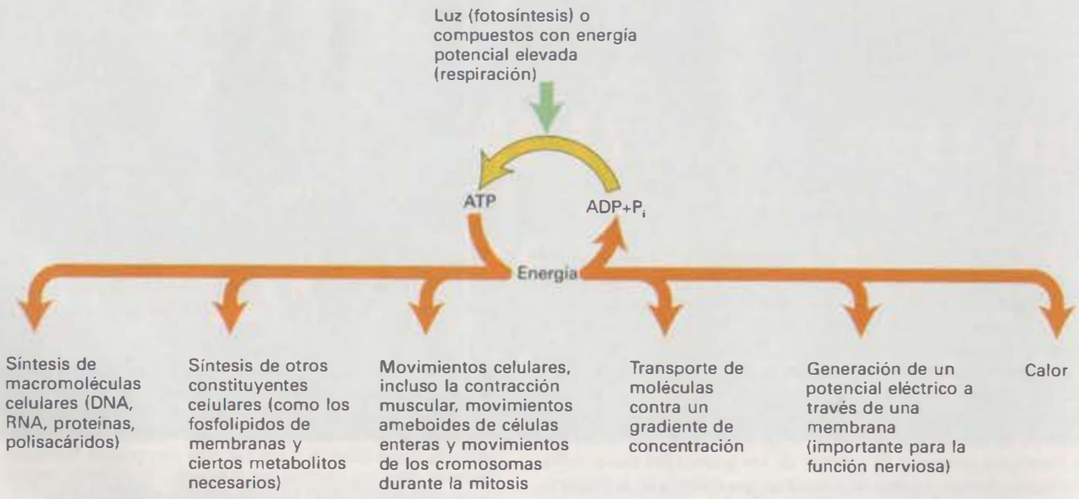
Podemos pensar que todo el compartimiento celular es como una fábrica dedicada al sostén del bienestar de la célula. Gran parte del trabajo celular lo realizan las maquinarias moleculares, que se encuentran en el citosol y en varios orgánulos. Aquí repasaremos las principales tareas que las células efectúan en su búsqueda de la buena vida.

Las células construyen y degradan numerosas moléculas y estructuras

Como fábricas químicas, las células producen un número enorme de moléculas complejas a partir de componentes químicos simples. Este trabajo de síntesis es impulsado por energía química extraída principalmente de azúcares, grasas o luz solar en el caso de las células vegetales y almacenada principalmente en forma de ATP, la "moneda" universal de la energía química (fig. 1-14). En las células de las plantas y animales, la mayoría del ATP es producido por grandes "maquinarias" moleculares localizadas en dos orgánulos, la mitocondria y los cloroplastos. En las células bacterianas hay elementos similares para la generación de ATP que están localizados en la membrana plasmática. Se piensa que las mitocondrias y los cloroplastos de los eucariontes, se originaron como bacterias que se establecieron dentro de células eucariontes y que luego se convirtieron en colaboradores bienvenidos (cap. 8). De manera directa o indirecta, toda nuestra comida es creada por células vegetales que utilizan la luz solar para construir macromoléculas complejas durante la fotosíntesis. Incluso las fuentes de petróleo subterráneas provienen de la descomposición de material vegetal.

Las células necesitan degradar partes desgastadas u obsoletas en moléculas pequeñas que pueden ser descartadas o recicladas. Esta tarea doméstica es asignada en mayor medida a los lisosomas, orgánulos atiborrados de enzimas degradativas. El interior de los lisosomas tiene un pH de alrededor de 5,0 más o menos cien veces más ácido que el citosol que lo rodea. Esto ayuda a las enzimas lisosómicas, las cuales están especialmente diseñadas para funcionar en pH bajo, a degradar los materiales. Para crear este ambiente de pH bajo, las proteínas localizadas en la membrana lisosómica bombean iones hidrógeno al lisosoma utilizando la energía suministrada a partir del ATP (cap. 7). Los lisosomas son asistidos en el trabajo de limpieza de la célula por los peroxisomas. Estos orgánulos pequeños están especializados en la degradación de componentes lipídicos de las membranas y en convertir varias toxinas inofensivas.

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación general: Interconversiones energéticas biológicas



▲ Fig. 1-14. El ATP es la principal molécula utilizada por las células para capturar y transferir energía. El ATP se forma a partir del ADP y un fosfato inorgánico (P_i) durante la fotosíntesis en las plantas y por la degradación de azúcares y grasas en la mayoría de las células. La energía liberada por la ruptura (hidrólisis) de un P_i a partir del ATP se utiliza para impulsar numerosos procesos celulares.

La mayoría de las propiedades estructurales y funcionales de una célula depende de las proteínas. Por esta razón para que las células trabajen en forma adecuada, las numerosas proteínas que componen los diversos compartimientos de trabajo deben ser transportadas desde donde son fabricadas a sus localizaciones apropiadas (caps. 16 y 17). Algunas proteínas se producen sobre los ribosomas que están libres en el citosol. Sin embargo, las proteína secretadas desde la célula y la mayoría de las proteínas de membrana son sintetizadas sobre los ribosomas asociados con el retículo endoplasmático (RE). Este orgánulo produce, procesa y envía afuera tanto proteínas como lípidos. Las cadenas de proteína producidas en el RE van hacia el aparato de Golgi, donde posteriormente son modificadas antes de ser dirigidas a sus destinos finales correspondientes. Las proteínas que viajan de esta manera contienen una secuencia corta de aminoácidos o cadenas de azúcares (oligosacáridos) que sirven como señales para dirigirlos a sus destinos correctos. Estas señales funcionan porque son reconocidas y unidas por otras proteínas que las clasifican y trasladan a diversos compartimientos celulares.

Las células animales producen su ambiente externo y sus adhesivos propios

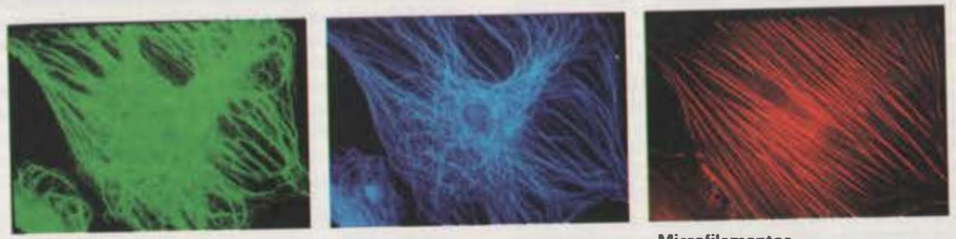
Los animales multicelulares más simples son células únicas incrustadas en una jalea de proteínas y polisacáridos denominada matriz extracelular. Las propias células producen y secretan estos materiales, creando así su entorno inmediato (cap. 6). El colágeno, la proteína más abundante del reino animal, es un componente principal de la matriz extracelular en la mayoría de los tejidos. En los animales, la matriz extracelular amortigua y lubrica las células. Una matriz especializada, y sobre todo resistente, la lámina basal, forma una superficie de soporte debajo de las capas planas de células y ayuda a impedir que las células se suelten.

Las células en los tejidos animales están "pegadas" unas con otras mediante **moléculas de adhesión celular (CAM)** encajadas en la superficie de sus membranas. Algunas CAM ligan unas células con otras; otros tipos ligan las células a la matriz extracelular y forman una unidad cohesiva. Las células de las plantas superiores contienen relativamente pocas moléculas de este tipo; en cambio, las células vegetales están rígidamente unidas por un entrelazamiento extenso de las paredes de células vecinas. Los citosoles de células animales o vegetales adyacentes a menudo están conectados por "puentes" funcionalmente similares pero estructuralmente diferentes, denominados uniones de hendidura en los animales y plasmodesmos en las plantas. Estas estructuras les permiten a las células intercambiar pequeñas moléculas incluidos nutrientes y señales, y facilitan el funcionamiento coordinado de las células en un tejido.

Las células cambian de forma y se mueven

A pesar de que las células a veces son esféricas, suelen tener formas más elaboradas debido a su esqueleto interno y a sus adhesiones externas. Tres tipos de proteínas filamentosas, organizadas en redes y racimos, forman el citoesqueleto dentro de las células animales (fig. 1-15). El citoesqueleto impide que la membrana plasmática de las células animales se relaje formando una esfera (cap. 5); también participa en la locomoción de la célula y en el transporte intracelular de vesículas, cromosomas y macromoléculas (caps. 19 y 20). El citoesqueleto puede estar unido, a través de la superficie celular, a la matriz extracelular o al citoesqueleto de otras células, ayudando así a formar tejidos (cap. 6).

Todos los filamentos del citoesqueleto son largos polímeros de subunidades proteicas. Elaborados sistemas regulan el ensamblaje y desensamblaje del citoesqueleto, controlando por lo tanto la forma de la célula. En algunas células el citoesqueleto es bastante estable, pero en otras cambia de forma continuamente. La merma del citoesqueleto en algunas partes de las células y el crecimiento en otras partes pueden producir cambios coordinados en la forma que se traduce en la locomoción de la célula. Por ejemplo, una célula puede enviar una extensión que se adhiere a una superficie o a otras células y después retrae el cuerpo de la célula desde el otro extremo. Mientras este proceso continúa debido a cambios coordinados en el citoesqueleto, la célula se mueve hacia adelante. Las células se pueden mover a razón de 20 µm/segundo. La locomoción celular es utilizada en el desarrollo embrionario de animales multicelulares para formar tejidos y durante la adultez como defensa contra infecciones, para transportar nutrientes y para cicatrizar heridas. Estos procesos no desempeñan ningún papel en el crecimiento y desarrollo de las plantas multicelulares, porque las nuevas células ve-



▲ Fig. 1-15. Los tres tipos de filamentos del citoesqueleto se distribuyen en forma específica dentro de las células. Tres vistas de la misma célula. Un fibroblasto cultivado fue tratado con tres preparaciones diferentes de anticuerpos. Cada anticuerpo se adhiere específicamente a los monómeros de la proteína formando un tipo de filamento y a la vez está químicamente unido a diferentes colorantes fluorescentes (verde, azul o rojo). La visualización de la célula teñida en un microscopio fluorescente revela la localización de filamentos adheridos a una preparación particular de anticuerpos teñidos. En este caso, los filamentos intermedios están teñidos de verde; los microtúbulos, de azul; y los microfilamentos, de rojo. Los tres sistemas de fibras contribuyen a la forma y el movimiento de las células. (Cortesía de V. Small.)

getales son generadas por la división de células existentes que comparten paredes celulares. Como resultado, el desarrollo de las plantas involucra el agrandamiento celular, pero no el movimiento de células de una posición a otra.

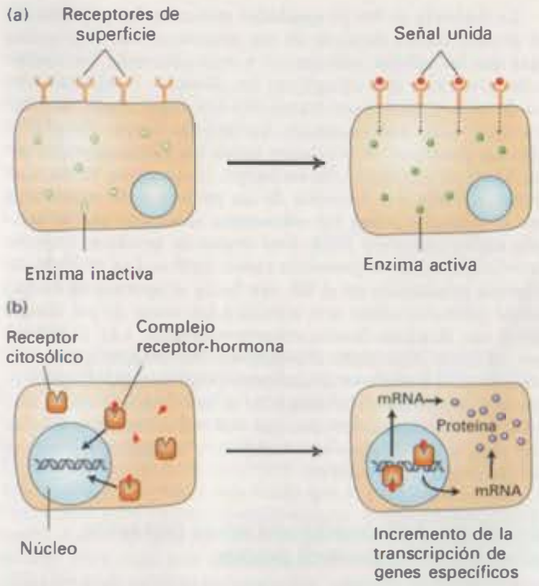
Las células reciben y envían información

Una célula viva controla continuamente su alrededor y, de acuerdo con éste, ajusta sus propias actividades y composición. Además las células también se comunican deliberadamente, enviando señales que pueden ser recibidas e interpretadas por otras células. Tales señales son comunes no sólo dentro de un organismo individual, sino también entre organismos. Por ejemplo, el olor de una pera detectado por nosotros y por otros animales señala una fuente de comida; el consumo de la pera por un animal ayuda a distribuir las semillas de la pera. ¡Todos se benefician! Las señales utilizadas por las células incluyen pequeños compuestos simples, gases, proteínas, luz y movimientos mecánicos. Las células poseen numerosas proteínas receptoras para detectar señales y elaborar vías para transmitirlas al interior y evocar una respuesta. En cualquier momento, una célula puede detectar sólo algunas de las señales a su alrededor y la forma en que responde puede cambiar con el tiempo. En algunos casos, recibir una señal informa a una célula cómo responder a una señal subsecuente diferente de un modo particular.

Tanto los cambios en el medioambiente (p. ej., el incremento o el descenso de un nutriente o el nivel de luz) como las señales recibidas por otras células representan información externa que la célula debe procesar. Las respuestas más rápidas a esas señales suelen representar cambios en la ubicación o en la actividad de proteínas preexistentes. Por ejemplo, poco tiempo después de que usted ingiere una comida rica en carbohidratos, la glucosa se vuelca dentro de la circulación sanguínea. La elevación de la glucosa de la sangre es percibida por las células β del páncreas, que responden liberando su producción acumulada de la hormona proteica insulina. Por la señal de la insulina circulante los transportadores de glucosa en el citoplasma de las células grasas y musculares se ubican en la superficie de la célula, donde comienzan a importar glucosa. Entretanto, las células del hígado también están tomando glucosa frenéticamente a través de un transportador de glucosa diferente. Tanto en las células del hígado como en las de los músculos, una vía intracelular de señalización disparada por la unión de la insulina a los receptores de la superficie de las células, activa una enzima clave necesaria para hacer glucógeno, un gran polímero de la glucosa (fig. 1-16a). El resultado neto de estas respuestas celulares es que el nivel de glucosa en la sangre desciende y la glucosa adicional se almacena como glucógeno, el cual puede ser utilizado por las células como fuente de glucosa cuando usted se saltea una de las comidas, porque está preparando un examen.

La capacidad de las células de enviar señales y responder a éstas es crucial para el desarrollo. Muchas señales importantes son proteínas secretadas, producidas por células específicas en momentos y lugares específicos en un organismo en desarrollo. A menudo, una célula receptora emplea múltiples señales para decidir cómo comportarse; por ejemplo, para diferenciar un tipo de tejido, para extender un proceso, para morir, para enviar de regreso una señal de confirmación (¡sí, estoy aquí!) o para migrar.

El funcionamiento de cerca de la mitad de las proteínas en los seres humanos, nematodos, levaduras y varios otros organismos eucariontes ha sido predicho basado en el análisis de secuencias de genomas (cap. 9). Tales análisis han revelado



▲ Fig. 1-16. Las señales externas suelen provocar un cambio en la actividad de las proteínas preexistentes o en las cantidades y tipos de proteínas que las células producen. (a) La unión de una hormona u otra molécula de señalización a su receptor específico puede disparar una vía intracelular para incrementar o disminuir la actividad de una proteína preexistente. Por ejemplo, la unión de la insulina a los receptores de la membrana plasmática de las células musculares y del hígado conduce a la activación de glucógeno sintasa una enzima clave en la síntesis del glucógeno a partir de la glucosa. (b) Los receptores para las hormonas esteroides se localizan en el interior de las células, no en su superficie. Los complejos receptor-hormona activan la transcripción de genes blanco específicos, lo que resulta en el incremento de la producción de proteínas codificadas. Muchas señales que se unen a los receptores en la superficie celular también actúan, a través de vías más complejas, para modular la expresión de los genes.

que al menos el 10–15% de las proteínas en los eucariontes funcionan como señales extracelulares secretadas, receptores de señales, o proteínas intracelulares o transductoras de señales, las cuales hacen pasar una señal a través de una serie de pasos para culminar en una respuesta celular en particular (p. ej., un incremento en la síntesis de glucógeno). Sin duda, la señalización y la transducción de señales son actividades primordiales de las células.

Las células regulan su expresión génica para satisfacer las necesidades cambiantes

Además de modular las actividades de las proteínas existentes, las células a menudo responden a las circunstancias cambiantes y a señales de otras células alterando la cantidad o tipos de proteínas que éstas contienen. La expresión génica, proceso global de lectura selectiva y utilización de la información genética, es generalmente controlada a nivel de la transcripción, el primer paso en la producción de una proteína. De este modo, las células pueden producir un mRNA particular sólo cuando la proteína codificada es necesaria y, por lo tanto,

reduciendo el desperdicio de energía. Sin embargo, la producción de un mRNA es el primero de los episodios de una cadena que determina en conjunto si un producto proteico activo es producido a partir de un gen particular.

El control transcripcional de la expresión génica fue demostrado primero en la respuesta de la bacteria intestinal *E. coli* hacia diferentes fuentes de azúcares. Las células de *E. coli* prefieren glucosa como fuente de azúcar, pero pueden sobrevivir sobre una pizca de lactosa. Estas bacterias utilizan proteínas de unión a DNA tanto *represoras* como *activadoras* para cambiar la velocidad de transcripción de los tres genes necesarios para metabolizar la lactosa según las cantidades relativas de glucosa y lactosa presentes (cap. 4). Este control dual positivo/negativo de la expresión génica pone a punto el equipo enzimático de la célula bacteriana para el trabajo actual.

Al igual que las células bacterianas, los eucariontes unicelulares pueden estar sujetos a diversas condiciones ambientales que requieren cambios extensos en las estructuras y funciones celulares. Por ejemplo, en condiciones de inanición las células de levadura detienen su crecimiento y forman esporas inactivas (véase fig. 1-4). Sin embargo, en los organismos multicelulares, el ambiente que rodea a las células es bastante constante. El propósito principal del control génico en nosotros y en otros organismos complejos es adaptar las propiedades de varios tipos de células para beneficio del animal o de la planta.

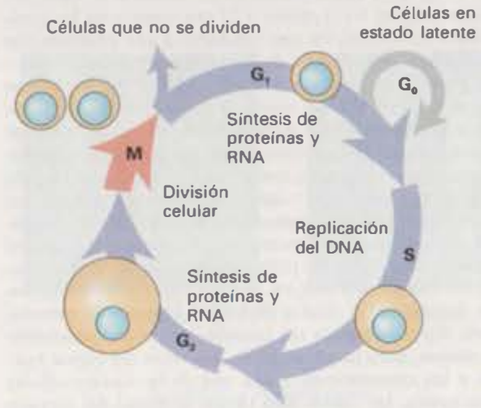
En las células eucariontes el control de la actividad génica suele involucrar un balance entre las acciones de los activadores y los represores transcripcionales. La unión de activadores a secuencias regulatorias específicas de DNA, denominadas amplificadores, activa la transcripción y la unión de represores en otras secuencias regulatorias denominadas silenciadoras inactiva la transcripción. En los capítulos 11 y 12 veremos más de cerca los activadores y represores transcripcionales, y cómo funcionan, así como también otros mecanismos para el control de la expresión génica. En un caso extremo, la expresión particular de un gen podría ocurrir sólo en una parte del cerebro, sólo durante las horas diurnas, sólo durante un cierto estadio del desarrollo, sólo después de una gran comida, etcétera, etcétera.

Muchas señales externas modifican la actividad de los activadores y represores transcripcionales que controlan genes específicos. Por ejemplo, las hormonas esteroides liposolubles, como estrógeno y testosterona, pueden difundirse a través de la membrana plasmática y unirse a sus receptores específicos localizados en el citoplasma o el núcleo (fig. 1-16b). La unión de la hormona cambia la forma del receptor de manera tal que éste puede unirse a secuencias amplificadoras específicas en el DNA, y, por lo tanto, el receptor se convierte en un activador transcripcional. Mediante esta simple vía de transducción de señales, las hormonas esteroides hacen que las células cambien cuáles genes deben transcribir (cap. 11). Como las hormonas esteroides pueden circular en el torrente sanguíneo, pueden afectar las propiedades de muchas o de todas las células de manera temporalmente coordinada. La unión de muchas otras hormonas y de los factores de crecimiento a receptores de la superficie celular desencadena diferentes vías de transducción de señales que también conducen a cambios en la transcripción de genes específicos (caps. 13-15). Aunque estas vías involucran múltiples componentes y son más complicadas que las señales de transducción de las señales de las hormonas esteroides, la idea general es la misma.

Las células crecen y se dividen

La característica principal de las células y de los organismos es la capacidad para reproducirse. La reproducción biológica, combinada con una selección evolutiva continua para un plan corporal sumamente funcional, explica por qué los cangrejos en herradura de hoy se parecen mucho a los de hace 300 millones de años, un lapso durante el cual han aparecido y desaparecido montañas enteras. Las montañas Teton en Wyoming, ahora de cerca de 4270 m de altura y aún creciendo, no existían hace 10 millones de años. Incluso los cangrejos en herradura, con una expectativa de vida de alrededor de 19 años, han reproducido fielmente sus formas antiguas más de medio millón de veces durante ese período. La idea de que la estructura biológica es transitoria y la estructura geológica es estable en verdad es exactamente opuesta. A pesar de la duración limitada de nuestras vidas individuales, la reproducción nos da una posibilidad de inmortalidad que una montaña o una roca no tiene.

El tipo de reproducción más simple implica la división de una célula "progenitora" en dos células "hijas". Esto ocurre como parte del ciclo celular, una serie de acontecimientos que preparan a la célula para dividirse seguido por el proceso real de división, denominado mitosis. El ciclo celular eucariontе suele representarse como cuatro etapas (fig. 1-17). El cromosoma y el DNA que contiene son copiados durante la fase S (síntesis). El cromosoma replicado se separa durante la fase M (mitosis), en que cada célula hija consigue una copia de cada cromosoma durante la división celular. Las fases M y S están separadas por dos etapas de pausa o latencia, la fase G_1 y la fase G_2, durante la cual los mRNA y las proteínas se sintetizan. En los organismos de una célula, a menudo (aunque no siempre) ambas células hijas



▲ Fig. 1-17. Durante el crecimiento, las células eucariontes progresan continuamente a través de cuatro fases del ciclo celular y generan nuevas células hijas. En la mayoría de las células proliferantes, las cuatro fases del ciclo celular ocurren en forma sucesiva, insumen de 10 a 20 horas, según el tipo de célula y el estadio de desarrollo. Durante la interfase, que comprende las fases G_1, S, y G_2, la célula, duplica aproximadamente su masa. La replicación del DNA durante la fase S deja a la célula con cuatro copias de cada tipo de cromosoma. En la fase mitótica (M), los cromosomas se dividen de manera igual en dos células hijas, y el citoplasma se divide aproximadamente a la mitad en la mayoría de los casos. En ciertas condiciones, como la inanición o cuando un tejido ha alcanzado su tamaño final, las células dejan de ciclar y entran en un estado de latencia denominado G_0. La mayoría de las células en G_0 pueden reingresar en el ciclo si cambian las condiciones.

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación general: Ciclo de vida de una célula

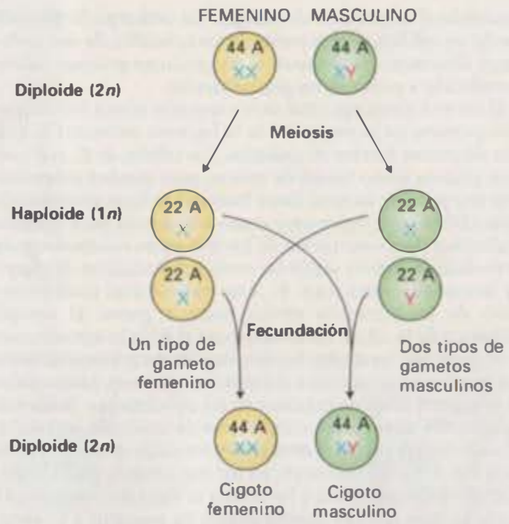
se parecen a la célula progenitora. En los organismos multicelulares, las células madre pueden dar origen a dos células diferentes, una que se asemeja a la célula progenitora y la otra no. Tal división celular asimétrica es crítica para la generación de diferentes tipos de células corporales (cap. 22).

Durante el crecimiento el ciclo celular opera de manera continua; las nuevas células hijas formadas se embarcan de inmediato en su propio camino hacia la mitosis. En condiciones óptimas, las bacterias pueden dividirse una vez cada 30 minutos para formar dos células hijas. A esta velocidad, en una hora una célula se convierte en cuatro; en un día, se convierte en 10^{14}, que tendría con peso seco de alrededor de 25 gramos. Sin embargo, en circunstancias normales el crecimiento no puede continuar a esta velocidad porque el suministro de alimentos comienza a ser limitante.

A la mayoría de las células eucariontes crecer y dividirse les toma un tiempo más considerable que a las bacterias. Más aún, el ciclo celular en plantas y animales adultos suele estar muy regulado (cap. 21). Este control ajustado previene el desequilibrio, el crecimiento excesivo de los tejidos, mientras que asegura que las células desgastadas o dañadas sean reemplazadas y que se formen células adicionales en respuesta a circunstancias nuevas o a necesidades del desarrollo. Por ejemplo, la proliferación de glóbulos rojos se incrementa sustancialmente cuando una persona asciende a una mayor altitud y necesita más capacidad para capturar oxígeno. Algunas células muy especializadas en los animales adultos, como las células nerviosas y las células estriadas del músculo, rara vez se dividen, si es que lo hacen. El defecto fundamental del cáncer es la pérdida de la capacidad de controlar el crecimiento y la división celular. En el capítulo 23 examinaremos los eventos celulares y moleculares que conducen a una proliferación descontrolada e inapropiada de las células.

La mitosis es un proceso *asexual* debido a que las células hijas tienen exactamente la misma información genética que la célula progenitora. En la reproducción *sexual*, la fusión de dos células produce una tercera célula que contiene información genética proveniente de cada célula progenitora. Debido a que tal fusión causaría un número de cromosomas cada vez mayor, los ciclos sexuales reproductivos emplean un tipo especial de división celular, denominada meiosis, que reduce el número de cromosomas en preparativos para la fusión (véase fig. 9-3). Las células con un juego completo de cromosomas son denominadas células diploides. Durante la meiosis, una célula diploide replica sus cromosomas como usualmente en la mitosis, pero luego se divide dos veces sin copiar nuevamente a los cromosomas. Cada una de las cuatro células hijas resultantes, las cuales sólo tienen la mitad del número total de cromosomas, se dice que son haploides.

La reproducción sexual ocurre en animales y plantas, e incluso en organismos unicelulares, como las levaduras (véase fig. 1-5). Los animales gastan energía y un tiempo considerable en generar óvulos y espermatozoides, las células haploides, denominadas gametos, que son utilizadas para la reproducción sexual. Una mujer producirá alrededor de medio millón de ovocitos en una vida, todas estas células se forman antes del nacimiento; un varón joven producirá cerca de 100 millones de espermatozoides diarios. Los gametos son formados a partir de células precursoras diploides de la línea germinal, que en los seres humanos contienen 46 cromosomas. En los seres humanos los cromosomas X e Y son denominados cromosomas sexuales, porque determinan si un individuo es mujer o varón. En las células humanas diploides, los 44 cromosomas remanentes, denominados autosomas, se encuentran formando 22 pares de clases diferentes. A través de la meiosis, un hombre produce espermatozoides que tienen 22 cromosomas más uno X o uno Y, y una mujer produce óvulos (ovocitos no fertilizados) con 22 cromosomas más uno X. La fusión de un óvulo con un espermatozoide (fecundación) produce un óvulo fecundado, el cigoto, con 46 cromosomas, un par de cada una de las 22 clases y un par de X en las mujeres y un X y un Y en los hombres (fig. 1-18). Los errores producidos durante la meiosis pueden conducir a trastornos debido al número anormal de cromosomas. Éstos incluyen el síndrome de Down, causado por un cromosoma 21 extra, y el síndrome de Klinefelter, causado por un cromosoma X extra.



▲ Fig. 1-18. Papá te hizo varón o mujer. En los animales, la meiosis de células precursoras diploides forma ovocitos y espermatozoides (gametos). El padre produce dos tipos de espermatozoides y determina el sexo del cigoto. En los seres humanos, como se muestra aquí, X e Y son los cromosomas sexuales; el cigoto debe recibir un cromosoma Y del padre para desarrollarse como varón. A: autosomas (cromosomas no sexuales).

Las células se mueren por una lesión agravada o por una programación interna

Cuando las células en un organismo multicelular están dañadas o infectadas con un virus, se mueren. La muerte celular resultante de tal evento traumático es desordenada y a menudo libera componentes celulares potencialmente tóxicos que pueden dañar las células circundantes. Las células también pueden morirse cuando fallan en recibir una señal de mantenimiento de vida o cuando reciben una señal de muerte. En este tipo de muerte celular programada, denominada apoptosis, una célula que se muere en realidad produce las proteínas necesarias para su autodestrucción. La muerte por apoptosis evita la liberación de componentes celulares potencialmente tóxicos (fig. 1-19).

La muerte celular programada es crítica para el desarrollo y funcionamiento apropiados de nuestro cuerpo (cap. 22). Durante la vida fetal, por ejemplo, nuestras manos inicialmente se desarrollan con una "membrana interdigital" entre los dedos; las células en esta membrana se mueren luego en un patrón preciso y ordenado que deja los dedos y el pulgar libres para tocar el piano. Las células nerviosas en el cerebro se mueren pronto si no tienen conexiones eléctricas adecuadas o útiles con otras células. Algunos linfocitos, las células del sistema inmune que intenta reconocer proteínas y polisacáridos extraños, tienen la capacidad de reaccionar contra nuestros propios tejidos. Estos linfocitos autorreactivos comienzan a programarse para morir antes de madurar por completo. Si estas células no son eliminadas antes de alcanzar su madurez, pueden causar enfermedades autoinmunes en las cuales nuestro propio sistema inmune destruye los tejidos que se supone debe proteger.

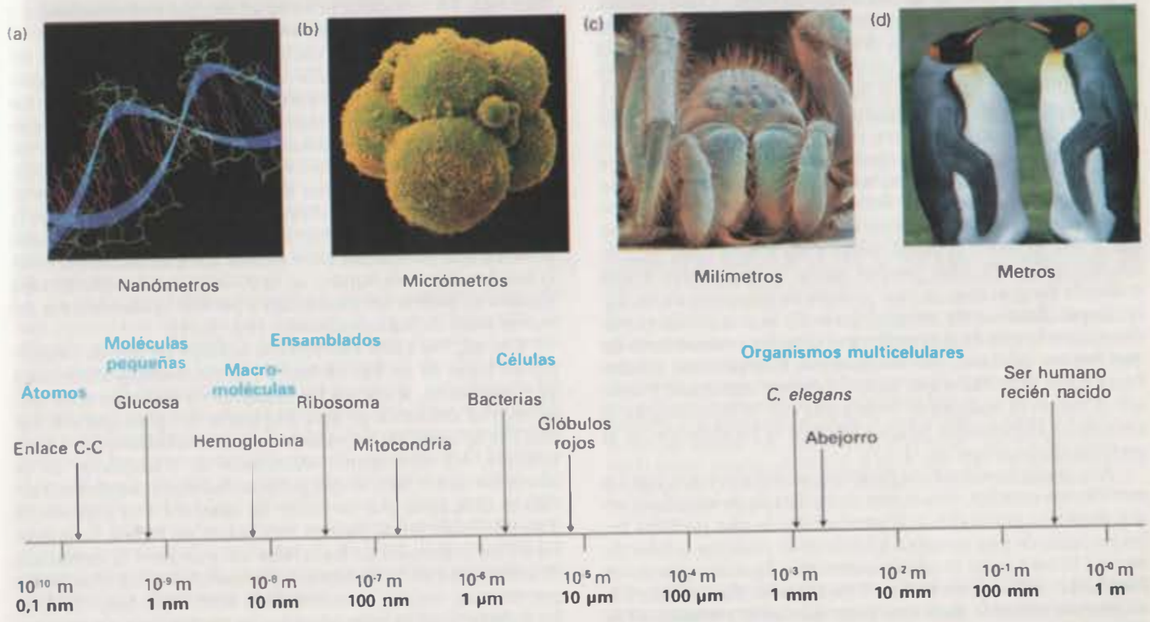


▲ Fig. 1-19. Las células apoptóticas se desintegran sin desparramar los constituyentes celulares que podrían dañar a las células vecinas. Los glóbulos blancos normalmente se ven como la célula de la izquierda. Las células en proceso de muerte celular programada (apoptosis), forman numerosas ampollas que eventualmente se liberan. La célula se muere porque carece de ciertas señales de crecimiento. La apoptosis es importante para eliminar células infectadas por virus o cuando no son requeridas (como las membranas interdigitales que desaparecen cuando los dedos se desarrollan), y para destruir células del sistema inmune que podrían reaccionar contra nuestros propios cuerpos. (Gopal Murti/Visuals Unlimited, Inc.)

1.4 Investigación de las células y sus partes

Integrar nuestra comprensión de cómo los diversos componentes moleculares que son la base de las funciones celulares trabajan juntos en una célula viviente, requiere varias perspectivas. Aquí veremos la forma cómo cinco disciplinas –biología celular, bioquímica, genética, genómica y biología del desarrollo– pueden contribuir a nuestro conocimiento de las estructuras y funciones de la célula.

Las aproximaciones experimentales de cada campo sondean de manera diferente los funcionamientos internos de la célula y nos permiten indagar acerca de las células y de lo que



▲ Fig. 1-20. Los biólogos se interesan en objetos que van desde el tamaño de las moléculas pequeñas hasta el de los árboles más altos. Muestreo de objetos biológicos alineados en una escala logarítimica. (a) La doble hélice del ADN tiene un diámetro de casi 2 nm. (b) Embrión humano en el estadio de ocho células, tres días después de la fecundación, de alrededor de 200 µm de largo. (c) Araña lobo, de alrededor de 15 mm de largo. (d) Los pingüinos emperadores tienen alrededor de un metro de altura. (Parte a) Will y Deni McIntyre. Parte b) Yorgas Nikas / Photo Researchers, Inc. Part c) Gary Gaugler/Visuals Unlimited, Inc. Parte d) Hugh S. Rose/Visuals Unlimited, Inc.)

ellas hacen. Las divisiones celulares proporcionan un buen ejemplo para ilustrar el papel de perspectivas diferentes en el análisis de los procesos celulares complejos.

En el reino de la biología las magnitudes se miden con escalas que varían más de mil millones de veces en sus dimensiones (fig. 1-20). Más allá de ellas, en términos "macro" se ubica la ecología y las ciencias relativas a la Tierra y, en términos "micro", la química y la física. Las plantas y los animales visibles que nos rodean son medidos en metros (10^0-10^2 m). Más de cerca, podemos ver un mundo biológico de milímetros (1 mm = 10^{-3} m) y aun de décimos de milímetros (10^{-4} m). Dejando a un lado rarezas como los huevos de pollos, la mayoría de las células son de 1-100 micrómetros (1 µm = 10^{-6} m) de longitud y por lo tanto claramente visibles sólo cuando son magnificadas. Para ver las estructuras dentro de las células, debemos ir hacia abajo en la escala de los 10-100 nanómetros (1 nm = 10^{-9} m).

La biología celular revela la forma, el tamaño y la localización de los componentes de la célula

La observación real de células esperó hasta el desarrollo de los primeros microscopios ordinarios a principios del siglo XVII. Un microscopio compuesto, el más útil de los microscopios de luz, tiene dos lentes. El aumento total es el producto del aumento de cada lente. A medida que los lentes se fueron perfeccionando, el poder de aumento y la capacidad para distinguir objetos situados muy cerca entre sí, la resolución, se incrementó en forma notable. Los modernos microscopios compuestos aumentaron la visión alrededor de miles de veces, de manera tal que una bacteria de 1 micrómetro (1 µm) parece como de un milímetro de largo. Con estos instrumentos se pueden distinguir objetos a partir de 0,2 µm.

El microscopio es más poderoso cuando los componentes de la célula son teñidos o marcados en forma específica, lo que posibilita visualizarlos y localizarlos con más facilidad. Un ejemplo simple es la tinción con colorantes que se unen específicamente al DNA para visualizar los cromosomas. Se pueden detectar proteínas específicas aprovechando la unión específica de los anticuerpos, las proteínas cuya tarea normal es ayudar a los animales a defenderse contra las infecciones y sustancias extrañas. En general, cada tipo de anticuerpo se une a una proteína o polisacárido y no a otro (cap. 3). Los anticuerpos purificados pueden unirse químicamente a una molécula fluorescente, la cual permite su detección en un microscopio fluorescente especial (cap. 5). Si una célula o tejido es tratado con un detergente que disuelve parcialmente las membranas celulares, los anticuerpos fluorescentes pueden llegar hasta la proteína que específicamente reconocen y unírsele. Cuando la muestra es visualizada con el microscopio, el anticuerpo fluorescente unido identifica la localización de la proteína diana (véase fig. 1-15).

Aun mejor es identificar proteínas en células vivas con las membranas intactas. Una forma de realizarlo es introducir un gen diseñado que codifica la producción de una proteína híbrida: parte de una proteína híbrida es la proteína celular de interés; la otra parte es una proteína que fluoresce cuando es iluminada con luz ultravioleta. Una proteína fluorescente comúnmente utilizada para este propósito es la *proteína verde fluorescente (green fluorescent protein GFP)*, una proteína natural que hace a algunas medusas muy vistosas y fluorescentes. La "marcación" de la GFP podría revelar, por ejemplo, que determinada proteína se elabora primero en el retículo endoplasmático y luego es desplazada por la célula hacia el lisosoma. En este caso, primero el retículo endoplasmático y luego el lisosoma brillarían en la oscuridad.



Fig. 1-21. Durante las etapas tardías de la mitosis, los microtúbulos (rojo) arrastran los cromosomas replicados (negro) hacia los límites de la célula en división. Esta célula vegetal está teñida con colorante de unión de DNA (etidio) para revelar cromosomas y con anticuerpos antitubulina con marcación fluorescente para revelar los microtúbulos. En esta fase de la mitosis, las dos copias de cada cromosoma replicado (llamadas cromátidas) se han separado y se distancian la una de la otra. (Cortesía de Andrew Bajer).

Los cromosomas son visibles a la luz del microscopio sólo durante la mitosis, cuando se condensan. El comportamiento extraordinario de los cromosomas durante la mitosis fue descubierto a finales del siglo XIX utilizando el microscopio compuesto mejorado. A mitad del proceso de la mitosis, los cromosomas replicados comienzan a apartarse. Los microtúbulos, uno de los tres tipos de filamentos del citoesqueleto, participan en este movimiento de los cromosomas durante la mitosis. El marcado fluorescente de la tubulina, la subunidad proteica que polimeriza para formar los microtúbulos, revela los detalles estructurales de la división celular que de otra manera no podría ser visualizada y permite la observación del movimiento de los cromosomas (fig. 1-21).

Los microscopios electrónicos utilizan un haz de electrones en lugar de un haz de luz. En la microscopia electrónica de transmisión, se cortan las muestras en secciones muy delgadas y se ubican en un área a la que se le aplica con alto vacío, por lo tanto no se pueden examinar células vivas. La resolución del microscopio electrónico de transmisión es de alrededor de 0,1 nm, lo que permite distinguir detalles estructurales delicados; por su poder de aumento una bacteria de 1 µm de largo puede parecer una pelota de fútbol. La mayoría de los orgánulos de las células eucariontes y la estructura de doble capa de la membrana plasmática fueron observadas por primera vez con el microscopio electrónico (cap. 5). Con las nuevas técnicas especializadas de microscopia electrónica, los modelos tridimensionales de orgánulos y de grandes complejos proteicos pueden construirse a partir de múltiples imágenes. Sin embargo, para obtener una mirada más detallada de las macromoléculas en el interior celular, debemos volver a las técnicas de la bioquímica.

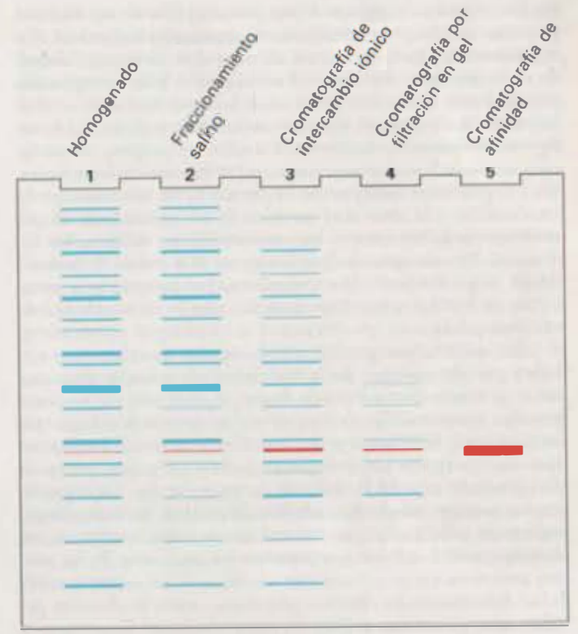
La bioquímica revela la estructura molecular y la química de los componentes celulares purificados

Los bioquímicos extraen el contenido de las células y separan los componentes según las diferencias de sus propiedades químicas o físicas, un proceso denominado *fraccionamiento*. Las proteínas son de interés particular, los caballos de fuerza de numerosos procesos celulares. Un esquema de fraccionamiento típico involucra el uso de varias técnicas de separación en un esquema secuencial. Estas técnicas de separación suelen basarse en las diferencias de tamaño de las moléculas o de las cargas eléctricas sobre su superficie (cap. 3). Para purificar una proteína de interés particular, el esquema de purificación se diseña de manera tal que se obtenga en cada paso una preparación con menos proteínas contaminantes, hasta que finalmente sólo queda la proteína de interés (fig. 1-22).

La purificación inicial de una proteína de interés a partir de un extracto celular suele ser una tarea tediosa que consume tiempo. Una vez obtenida una cantidad pequeña de la proteína purificada, se pueden producir anticuerpos contra ella mediante diversos métodos que se detallan en el capítulo 6. Para un bioquímico, los anticuerpos son las herramientas casi perfectas para aislar grandes cantidades de una proteína de interés para análisis posteriores. En efecto, los anticuerpos pueden "arrancar hacia afuera" la proteína que específicamente reconocen y unírsele a partir de una mezcla semipura que contiene numerosas proteínas diferentes. Una alternativa consiste en diseñar un gen que codifica una proteína de interés con una proteína pequeña adherida como "etiqueta", la cual puede utilizarse para separar la proteína del extracto celular total.

La purificación de una proteína es un preludio necesario para estudiar cómo cataliza una reacción química o lleva a cabo otras funciones y cómo se regula su actividad. Algunas enzimas se componen de múltiples cadenas de proteínas (subunidades) con una cadena que cataliza una reacción química y otras cadenas que regulan cuándo y dónde ocurre esta reacción. Las máquinas moleculares que realizan muchos procesos celulares críticos constituyen grandes ensamblajes de proteínas. Por ejemplo, la purificación y el estudio de la actividad de proteínas individuales que componen la maquinaria de replicación del DNA proporcionan indicios acerca de cómo trabajan juntas para replicar el DNA durante la división celular (cap. 4).

La estructura tridimensional, plegada, o conformación, de una proteína es vital para su función. A fin de comprender la relación entre la función y la forma de una proteína es necesario conocer tanto lo que ésta hace como el detalle de su estructura. El método más utilizado para determinar las estructuras complejas de las proteínas, del DNA y del RNA es la cristalografía de rayos X. El análisis asistido por computadora de los datos a menudo permite determinar la localización de cada átomo en una gran molécula compleja. La estructura de doble hélice del DNA, que es clave para su función en la herencia, fue primero propuesta basándose en estudios de cristalografía de rayos X. En este libro encontrará numerosos ejemplos de estructuras de proteínas mientras nos centramos en cómo éstas trabajan.



▲ Fig. 1-22. La purificación bioquímica de una proteína de un extracto celular suele requerir varias técnicas de separación. La purificación puede ser seguida por electroforesis en gel de la mezcla proteica original y de las fracciones obtenidas de cada paso de la purificación. En este procedimiento, una muestra se coloca en los carriles en la parte superior del gel y se le aplica un campo eléctrico. En presencia de concentraciones adecuadas de sales y detergente, las proteínas se mueven a través de los poros del gel hacia el ánodo; las proteínas más grandes se desplazan más lentamente que las pequeñas (véase fig. 3-32). Cuando se tiñe el gel, las proteínas separadas se visualizan como bandas distintas cuyas intensidades son aproximadamente proporcionales a la concentración proteica. Aquí se muestran las representaciones esquemáticas de geles para la mezcla de partida de proteínas (línea 1) y las muestras tomadas luego de cada uno de los distintos pasos de purificación. En el primer paso, el fraccionamiento salino, las proteínas que se precipitaron con una cierta cantidad de sal se redisolvieron; la electroforesis de esta muestra (línea 2) señala que contiene menos proteínas que la mezcla original. Luego la muestra fue sometida sucesivamente a tres tipos de cromatografía de columna que separan a las proteínas por la carga eléctrica, el tamaño o la afinidad de unión a una molécula pequeña en particular (véase fig. 3-34). La preparación final es bastante pura, como puede verse por la aparición de una sola banda de proteína en la línea 5. (De J. Berg et al., 2002, *Biochemistry*, W.H. Freeman and Company, p. 87)

La genética revela las consecuencias de los genes dañados

Los estudios bioquímicos y cristalográficos pueden decirnos mucho acerca de una proteína individual, pero no pueden probar que son requeridas para la división o cualquier otro proceso celular. La importancia de una proteína es demostrada con mayor firmeza si una mutación que previene su síntesis o la hace no funcional afecta adversamente el proceso en estudio.

Definimos el genotipo de un organismo como su composición de genes: el término también se utiliza en referen-

cia a versiones diferentes de un gen simple o de un número pequeño de genes de interés en un organismo individual. Un organismo diploide lleva casi siempre dos versiones (alelos) de cada gen, uno derivado de cada padre. Hay excepciones importantes, como los genes en los cromosomas X e Y en los machos de algunas especies incluida la nuestra. El fenotipo es el resultado visible de la acción de un gen, como los ojos azules o los ojos marrones, o las formas de las arvejas. En los primeros tiempos de la genética, se desconocían la localización y la identidad química de los genes; todo lo que pudo ser seguido fueron las características visibles, los fenotipos. El concepto de que los genes son como "cuentas" de un largo "collar", el cromosoma, fue propuesto a principios de 1900 en el trabajo genético con la mosca de la fruta *Drosophila*.

En los enfoques genéticos clásicos, los mutantes son aislados porque carecen de la habilidad para hacer algo que un organismo normal puede hacer. A menudo, se realizan grandes "rastreos" genéticos, observando muchos mutantes individuales diferentes (p. ej., moscas de la fruta, levaduras) que son incapaces de completar ciertos procesos, como la división celular o la formación de un músculo. En organismos experimentales o en cultivos de células, las mutaciones suelen ser producidas por tratamiento con un mutágeno, un agente químico o físico que promueve mutaciones. Pero, ¿cómo podemos aislar y mantener un organismo mutante o células defectuosas en algunos procesos, como la división celular, que es necesaria para la supervivencia? Una manera es buscar mutantes sensibles a la temperatura. Estos mutantes son capaces de crecer a una temperatura, la temperatura *permisiva*, pero no en otra, por lo general más elevada, la temperatura *no permisiva*. Las células normales pueden crecer en ambas temperaturas. En la mayoría de los casos, un mutante termosensible produce una proteína alterada que trabaja a la temperatura permisiva pero que se despliega y es no funcional a la temperatura no permisiva. La detección de mutantes sensibles a la temperatura se realiza rápidamente en virus, bacterias, levaduras, moscas de la fruta, lombriz intestinal.

Mediante el análisis de los efectos de numerosas y diferentes mutaciones sensibles a la temperatura que alteraban la división celular, los genetistas descubrieron todos los genes necesarios para la división celular sin saber, inicialmente, cuáles proteínas codifican estos genes o cómo estas proteínas participan en el proceso. El gran poder de la genética consiste en revelar la existencia y relevancia de proteínas sin conocimiento previo de su identidad bioquímica o función molecular. Finalmente estos genes con "mutaciones definidas" fueron aislados y replicados (clonados) con técnicas de DNA recombinante que se analizan en el capítulo 9. Una vez aislados los genes, las proteínas codificadas por ellos podrían ser producidas en un tubo o en una bacteria genéticamente modificada o en cultivos celulares. Luego, los bioquímicos podrán investigar si las proteínas se asocian con otras proteínas, o con el DNA, o catalizan reacciones químicas durante la división celular (cap. 21).

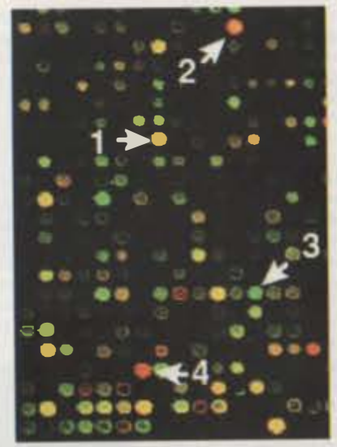
El análisis de las secuencias del genoma de varios organismos durante la década pasada ha identificado muchas regiones del DNA antes desconocidas, que probablemente codifiquen proteínas (es decir, genes que codifican proteínas). La función general de una proteína codificada por un gen cuya secuencia ha sido identificada puede ser deducida por analogía con proteínas conocidas de secuencias similares. A diferencia de los aislamientos al azar de mutaciones en genes nuevos, se dispone ahora de diversas técnicas para la inactivación específica de genes mediante mutaciones genéticamente diseñadas dentro de éstos (cap. 9). El efecto de tales mutaciones deliberadas en genes específicos, provee información acerca del papel de las proteínas codificadas en los organismos vivientes. Esta aplicación de técnicas genéticas comienza con la secuencia del gen/proteína y finaliza con la obtención de un fenotipo mutante; la genética tradicional comienza con un fenotipo mutante y finaliza con la obtención de la secuencia del gen/proteína.

La genómica revela diferencias en la estructura y expresión de genomas enteros

Generalmente, la bioquímica y la genética se centran, al mismo tiempo, en un gen y en la proteína que codifica. Si bien estas aproximaciones tradicionales son interesantes, no dan una visión exhaustiva de la estructura y la actividad del genoma de un organismo, es decir, la totalidad de los genes que éste organismo posee. El campo de la genómica sí lo hace, ya que abarca la caracterización molecular de los genomas completos y la determinación global de patrones de expresión de genes. La reciente finalización de la secuenciación del genoma de más de 80 especies de bacterias y varios eucariontes permite comparaciones de genomas completos de especies diferentes. El resultado provee una evidencia apabullante de la unidad molecular de la vida y de los procesos evolutivos que hicieron lo que somos (véase sección 1.5). Los métodos basados en la genómica para comparar cientos de fragmentos de DNA de individuos diferentes al mismo tiempo, están demostrando su utilidad en el trazado de la historia y migraciones de las plantas y de los animales, y en el seguimiento de la herencia de enfermedades en familias humanas.

Los nuevos métodos que utilizan micromatrices (microarrays) de DNA pueden detectar simultáneamente todos los mRNA presentes en una célula, por lo tanto indican cuáles genes están siendo transcriptos. Tales patrones globales de expresión de genes muestran que las células del hígado transcriben un grupo de genes bastante diferentes de las de los glóbulos blancos o las células de la piel. También se pueden monitorizar cambios en la expresión de genes durante un proceso de enfermedad en respuesta a drogas u otras señales externas y durante el desarrollo. Por ejemplo, la reciente identificación de todos los mRNA presentes en cultivos de fibroblastos antes, durante y después de que éstos se dividen nos ha proporcionado una visión total de los cambios transcripcionales que ocurren durante la división celular (fig. 1-23). El diagnóstico del cáncer está siendo transformado porque células cancerosas previamente indistinguibles tienen un patrón de expresión de genes y un pronóstico diferente (cap. 23). Estudios similares con diversos organismos y tipos de células revelan lo que es universal acerca de los genes involucrados en la división celular y lo que es específico de organismos particulares.

El contenido total de proteínas en una célula es el proteoma que es controlado en parte por cambios en la transcripción de los genes. La síntesis regulada, el procesamiento, la localización y la degradación de proteínas específicas también desempeñan papeles en la determinación del proteoma de una célula particular y la asociación de ciertas proteínas con otras es crítica para las habilidades funcionales de las células. Las nuevas técnicas para monitorizar la presencia y las interacciones de numerosas proteínas simultáneamente, se denominan en su conjunto proteómica, son una forma de reunir una visión amplia respecto de las proteínas y las maquinarias moleculares importantes para el funcionamiento celular. El campo de la proteómica avanzará de manera espectacular una vez que la cristalografía de rayos X de alto rendimiento, ahora, en desarrollo, permita a los investigadores determinar con rapidez las estructuras de cientos o de miles de proteínas.

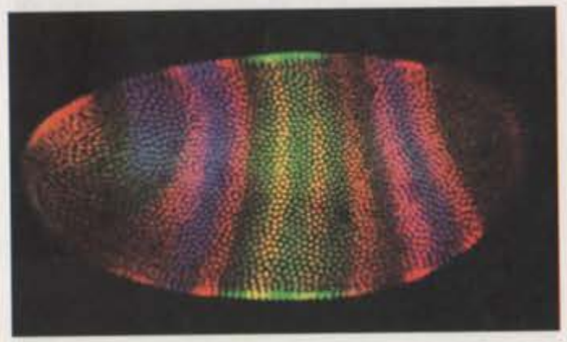


▲ Fig. 1-23. El análisis de micromatrices de DNA otorga una visión global de los cambios en la transcripción que siguen a la adición de suero a cultivos de células humanas. El suero contiene factores de crecimiento que estimulan a las células que no están en división a comenzar a crecer y a dividirse. El análisis de micromatrices (microarrays) de DNA puede detectar la transcripción relativa de genes en dos poblaciones celulares diferentes (véase fig. 9-35). Las micromatrices consisten en diminutas motas o puntos de DNA que son fijadas a un portaobjetos de microscopio. Cada mota contiene muchas copias de una secuencia de DNA de un gen humano único. Una preparación de RNA, que contiene todos los diferentes tipos de RNA sintetizados en células en cultivo sin suero que no están creciendo, se marca con moléculas verdes fluorescentes. Otra población de RNA de células en crecimiento, tratadas con suero, se marca con rojo. Las dos preparaciones son mezcladas e hibridadas en el portaobjetos, donde se unen a sus genes correspondientes como el "cierre de una cremallera". Por lo tanto, los puntos o motas verdes (p. ej., el punto 3) indican genes que son transcriptos en células que no se están dividiendo (pobre de suero); los puntos rojos (p. ej., el punto 4) indican genes que son transcriptos en células en división y los puntos amarillos (p. ej., los puntos 1 y 2) indican genes que son transcriptos de igual manera en células en división como en células que no se están dividiendo. (De V. R. Iyer et al., 1999, *Science* 283: 83.)

La biología del desarrollo revela cambios en las propiedades de las células mientras se especializan

Otra aproximación a la visión de la célula proviene del estudio de cómo éstas cambian durante el desarrollo de un organismo complejo. A menudo, pero no siempre, las bacterias, las algas y los eucariontes unicelulares (protozoos, levaduras) pueden trabajar solos. Las acciones concertadas de los billones de células que componen nuestro cuerpo requieren una cantidad enorme de comunicación y división del trabajo. Durante el desarrollo de los organismos multicelulares, los procesos de diferenciación forman cientos de clases de células, cada una especializada para una tarea particular: la transmisión de señales eléctricas por las neuronas, el transporte de oxígeno por los glóbulos rojos, la destrucción de una bacteria infectante por los macrófagos, la contracción por células del músculo, el procesamiento químico por células del hígado.

Muchas de las diferencias que hay entre "células diferenciadas" se deben a la producción de conjuntos específicos de proteínas necesarias para llevar a cabo las funciones únicas de cada tipo de célula. Es decir, sólo un subconjunto de los genes de un organismo se transcribe en cualquier célula dada o a cualquier tiempo dado. Tal expresión diferencial de genes en tiempos distintos o en tipos celulares diversos ocurre en bacterias, hongos, plantas, animales e incluso en virus. La expresión diferencial de genes es evidente en un embrión temprano de mosca en el cual todas las células parecen similares hasta que son teñidas para detectar las proteínas codificadas por genes particulares (fig. 1-24). La transcripción puede cambiar dentro de un tipo de célula en respuesta a una señal externa o en concordancia con el reloj biológico; algunos genes, por ejemplo, sufren un ciclo diario entre tasas de transcripción bajas y altas.



▲ Fig. 1-24. La expresión diferencial de genes puede detectarse en embriones de fase temprana de moscas antes de que las células sean morfológicamente diferentes. Un embrión de *Drosophila* en fase temprana posee alrededor de 6.000 células que cubren su superficie, la mayoría de las cuales son indistinguibles con un microscopio simple. Si el embrión se hace permeable a los anticuerpos con un detergente que disuelve parcialmente las membranas, los anticuerpos pueden encontrar las proteínas que reconocen. En este embrión pueden observarse anticuerpos marcados con una sonda fluorescente unidos a las proteínas que están en los núcleos; cada esfera pequeña corresponde a un núcleo. Se utilizaron tres anticuerpos diferentes, cada uno específico para diferentes proteínas y que da un color distinto (amarillo, verde o azul) en un microscopio fluorescente. El color rojo se adiciona para resaltar los solapamientos entre las manchas amarillas y azules. Las localizaciones de proteínas diferentes muestran que las células son de hecho diferentes desde un estadio temprano, con genes particulares activados en franjas específicas de células. Estos genes controlan la subdivisión del cuerpo en segmentos repetitivos, como los rayos negros y amarillos de un crispón. (Cortesía de Sean Carroll, University of Wisconsin.)

Producir diferentes clases de células no es suficiente para hacer un organismo, al igual que se necesita algo más que recolectar todas las partes de un camión para obtener un camión. Los distintos tipos de células deben estar organizados y ensamblados en todos los tejidos y órganos. Aún más, estas partes del cuerpo deben trabajar casi inmediatamente después de su formación y continuar trabajando durante el proceso de crecimiento. Por ejemplo, el corazón humano comienza a latir cuando tiene menos de 3 mm de longitud, cuando nosotros somos meros embriones de 23 días, y continúa latiendo hasta convertirse en un músculo del tamaño de un puño. De unos pocos cientos de células hasta miles de millones y continúa latiendo.

En los organismos en desarrollo, las células crecen y se dividen en algunos momentos y en otros no, se reúnen y se comunican, también previenen o reparan errores y coordinan cada tejido con los demás. En los organismos adultos, la división celular se detiene en muchos órganos. Si parte de un órgano como el hígado se daña o se eliminia, la división celular se reanuda hasta que el órgano se regenera. Cuenta la leyenda que Zeus castigó a Prometeo por haberle dado el fuego a los seres humanos; lo encadenó a una roca, donde un águila le devoraba el hígado, que se reproducía siempre. El castigo fue eterno porque, como los griegos sin duda sabían, el hígado se regenera.

Los estudios del desarrollo implican observar dónde, cuándo y cómo se forman las diferentes clases de células, descubrir qué señales se desencadenan, qué sucesos del desarrollo se coordinan y comprenden el diferente accionar de los genes, es decir la base de la diferenciación (caps. 15 y 22). Durante el desarrollo podemos observar los cambios celulares en su contexto normal con otras células. Para ello se utilizan abordajes de la biología celular, la bioquímica, la genética y la genómica.

Elección del organismo experimental apropiado para el trabajo

Nuestro conocimiento actual del funcionamiento molecular de las células proviene de estudios con virus, bacterias, levaduras, protozoos, mohos, plantas, ranas, gusanos, insectos, peces, pollos, ratones y seres humanos. Por diversas razones, algunos organismos son más apropiados que otros para responder a ciertas cuestiones. Debido a la conservación evolutiva de genes, proteínas, orgánulos y tipos celulares, los descubrimientos acerca de las estructuras biológicas y sus funciones obtenidas con un organismo experimental pueden ser aplicados a otros. Por esta razón, los investigadores suelen efectuar estudios con el organismo que permite contestar la pregunta planteada con mayor rapidez; ya que los resultados obtenidos en un organismo son ampliamente aplicables. La figura 1-25 resume las aplicaciones experimentales típicas de organismos cuyos genomas han sido secuenciados de modo parcial o completo. La disponibilidad de las secuencias de genomas para estos organismos los hace muy útiles para estudios genéticos o genómicos.

Las bacterias tienen varias ventajas como organismos experimentales: crecen con rapidez, poseen mecanismos elegantes para controlar la actividad génica y tienen una genética potente. Esta última propiedad se refiere al tamaño pequeño del genoma bacteriano, la facilidad para obtener mutantes, la disponibilidad de técnicas para la transferencia de genes a la bacteria, la enorme riqueza de conocimientos respecto del control de genes bacterianos y las funciones de las proteínas, y la relativa simplicidad para el mapeo de genes relacionados en el genoma. Las levaduras unicelulares no sólo poseen algunas de las ventajas de las bacterias, sino también una organización celular, caracterizada por la presencia de un núcleo y orgánulos, es decir características de todos los eucariontes.

Los estudios de células en tejidos especializados hacen uso de "modelos" de animales y plantas, esto es, organismos experimentales con atribuciones típicas de muchos otros. Por ejemplo, las células nerviosas y las células musculares, tradicionalmente fueron estudiadas en mamíferos o en criaturas con células accesibles o muy grandes, como las células neurales gigantes del calamar o el músculo de las alas de las aves. En los últimos años, el desarrollo de músculos y nervios ha sido muy estudiado en las moscas de la fruta (*Drosophila melanogaster*), en los nematodos intestinales (*Caenorhabditis elegans*) y en el pez cebra en los cuales se aislaron mutantes rápidamente. Los organismos con células embrionarias grandes que crecen fuera de la madre (p. ej., ranas, peces, erizos de mar, pollos) son muy útiles para localizar los destinos de las células a medida que éstas forman diferentes tejidos y para realizar extractos para estudios bioquímicos. Por ejemplo, una proteína clave en la regulación de la mitosis fue identificada primero en estudios con embriones de rana y erizo de mar y luego purificada a partir de extractos (cap. 21).

▶ Fig. 1-25. Cada organismo experimental utilizado en la biología celular tiene ventajas para ciertos tipos de estudios. (a) y (b) Los virus y las bacterias poseen genomas pequeños y dóciles para la disección genética. Muchos descubrimientos sobre el control génico provinieron inicialmente de estudios en estos microorganismos. (c) La levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene la organización celular de un eucarionte, pero es un organismo unicelular bastante simple, fácil de hacer crecer y de manipular genéticamente. (d) En el nematodo intestinal *Caenorhabditis elegans*, que tiene un pequeño número de ordenamientos celulares de manera casi idéntica en cada gusano, es posible seguir la formación de cada célula. (e) La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, utilizada primero para descubrir las propiedades de los cromosomas, ha sido especialmente valiosa en la identificación de genes que controlan el desarrollo embrionario. Muchos de estos genes están evolutivamente conservados en los seres humanos. (f) El pez cebra *Danio rerio* se utiliza para controles genéticos rápidos para identificar los genes que controlan el desarrollo y la organogénesis. (g) De los sistemas experimentales de animales, los ratones (*Mus musculus*) son los evolutivamente más cercanos a los seres humanos y han proporcionado modelos para el estudio de numerosas enfermedades genéticas e infecciosas. (h) La hierba *Arabidopsis thaliana*, perteneciente a la familia de la mostaza, descrita algunas veces como la "*Drosophila* del reino vegetal", ha sido utilizada en búsquedas genéticas para identificar genes involucrados en casi cada aspecto de la vida de la planta. Se ha completado la secuenciación de genomas de muchos virus y especies bacterianas, de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, del nematodo intestinal *C. elegans*, de la mosca de la fruta *D. melanogaster*, de los seres humanos y de la planta *Arabidopsis thaliana*. La secuenciación está casi completa para ratones y se encuentra en progreso para el pez cebra. Otros organismos, sobre todo ranas, erizos de mar, pollos y hongos mucosos, continúan siendo inmensamente valiosos para la investigación de la biología celular. Cada vez más se utiliza una gama más amplia de otras especies para los estudios de la evolución de las células y sus mecanismos. (Parte a) Visual Unlimited, Inc. Part b) Kari Lountmaa/Science Photo Library/ Photo Researchers, Inc. Part c) Scimat/Photo Researchers, Inc. Part d) Photo Researchers, Inc. Part e) Darwin Dale/Photo Researchers, Inc. Part f) Inge Spence/Visuals Unlimited, Inc. Part g) J. M. Labat/ Jancana/Visuals Unlimited, Inc. Part h) Darwin Dale/Photo Researchers, Inc.)

(a)



Virus

Proteínas involucradas en la síntesis de DNA, RNA y proteínas
Regulación génica
Cáncer y control de la proliferación celular
Transporte de proteínas y orgánulos dentro de las células
Infección e inmunidad
Posible via de acceso para terapia génica

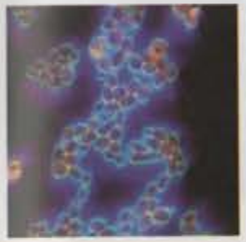
(b)



Bacterias

Proteínas involucradas en el metabolismo, síntesis de DNA, RNA y proteínas
Regulación génica
Diana para nuevos antibióticos
Ciclo celular
Señalización

(c)



Levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*)

Control del ciclo celular y de la división celular
Secreción de proteínas y biogénesis de la membrana
Función del citoesqueleto
Diferenciación celular
Envejecimiento
Regulación génica y estructura de los cromosomas

(d)



Nematodo intestinal (*Caenorhabditis elegans*)

Desarrollo del plan corporal
Linaje celular
Formación y función del sistema nervioso
Control de muerte celular programada
Proliferación celular y genes del cáncer
Envejecimiento
Comportamiento
Regulación génica y estructura de los cromosomas

(e)



Mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*)

Desarrollo del plan corporal
Generación de linajes celulares diferenciados
Formación del sistema nervioso, el corazón y la musculatura
Muerte celular programada
Control genético del comportamiento
Genes del cáncer y control de la proliferación celular
Control de la polarización celular
Efectos de drogas, alcohol y pesticidas

(f)



Pez cebra

Desarrollo de tejidos corporales de los vertebrados
Formación y función del cerebro y del sistema nervioso
Defectos congénitos
Cancer

(g)



Ratones, incluidos células cultivadas

Desarrollo de tejidos corporales
Función del sistema inmune de los mamíferos
Formación y función del cerebro y del sistema nervioso
Modelos de cánceres y de otras enfermedades humanas
Regulación génica y herencia
Enfermedades infecciosas

(h)



Plantas (*Arabidopsis thaliana*)

Desarrollo y patrón de tejidos
Genética de la biología celular
Aplicaciones en agricultura
Fisiología
Regulación génica
Inmunidad
Enfermedades infecciosas

Utilizando las técnicas de DNA recombinante los investigadores pueden diseñar genes específicos para que contengan mutaciones que inactiven o incrementen la producción de las proteínas codificadas. Tales genes pueden ser introducidos en los embriones de gusanos, moscas, ranas, erizos de mar, pollos, ratones, diversas plantas y otros organismos, lo que permite evaluar el efecto de la activación de un gen anormal o la inhibición de una función normal

de un gen mediante el uso de nuevas técnicas que específicamente inactivan genes. Este enfoque está siendo utilizado extensivamente para producir las versiones en ratón de enfermedades genéticas humanas. Mediante nuevas técnicas que específicamente inactivan genes particulares a través de la inyección de piezas cortas de RNA se están haciendo métodos rápidos para conocer posibles funciones de los genes en muchos organismos.

Los ratones tienen una gran ventaja respecto de otros organismos: están más cerca de los seres humanos que otros animales, por lo que puede haber importantes semejanzas genéticas. Las construcciones de genes de ratones portadores de mutaciones similares a las asociadas con una particular enfermedad hereditaria humana pueden ser introducidos en células madres embrionarias de ratón. Estas células pueden ser inyectadas en un embrión de fase temprana, el cual luego es implantado en un ratón hembra pseudopreñada (cap. 9). Si el ratón que se desarrolla a partir de las células madre embrionarias inyectadas exhibe enfermedades similares a la humana, la conexión entre la enfermedad y las mutaciones en uno o más genes particulares, queda demostrada. Una vez que se obtiene el modelo de ratón de una enfermedad humana es posible realizar estudios sobre los defectos moleculares que la causan y probar tratamientos nuevos, con lo que se reduce la exposición a tratamientos no probados.

Un chequeo genético continuo no planificado ha sido realizado en poblaciones humanas durante milenios. Se han identificado millares de rasgos hereditarios y más recientemente, se han mapeado las localizaciones en los cromosomas. Algunas de estas características son predisposiciones hereditarias para tener una enfermedad; otras son el color de los ojos u otros rasgos menores. Pueden encontrarse variaciones genéticas en cada aspecto de la biología celular en poblaciones humanas, lo que permite realizar estudios de los estados normales y de enfermedad, y de variantes celulares en cultivo.

Algunos organismos experimentales de uso menos frecuente ofrecen posibilidades para explorar características únicas o exóticas de las células y para estudiar propiedades estándares de las células que se exageran en una manera útil en un animal particular. Por ejemplo, los extremos de los cromosomas, los telómeros, están extremadamente diluidos en la mayoría de las células. Las células humanas típicas contienen 92 telómeros (46 cromosomas por dos extremos por cromosoma). En contraposición, algunos protozoos con cromosomas "fragmentados" inusuales contienen millones de telómeros por célula. Los descubrimientos recientes acerca de la estructura del telómero se han beneficiado enormemente con el uso de estas variaciones naturales como ventajas experimentales.

1.5 Una perspectiva genómica sobre la evolución

Los estudios exhaustivos de genes y proteínas de muchos organismos nos brindan una documentación extraordinaria acerca de la historia de la vida. Nosotros compartimos con otros eucariontes miles de proteínas individuales, cientos de maquinarias macromoleculares y la mayoría de nuestros orgánulos como resultado de nuestra historia evolutiva compartida. Las nuevas investigaciones de la biología celular y molecular que surgen a partir de la genómica nos conducen a una apreciación más acabada acerca de las elegantes maquinarias moleculares que surgieron durante miles de millones de años, de pequeños ajustes genéticos y de la selección evolutiva para los diseños más eficientes y precisos. A pesar de todo lo que conocemos hoy respecto de las células, muchas proteínas nuevas, nuevos ensamblajes macromoleculares y actividades nuevas aún deber ser descubiertas. Una vez que tengamos una descripción más completa de las células, estaremos mejor preparados para investigar el flujo dinámico de los sistemas vivientes.

Las proteínas metabólicas, el código genético y las estructuras de los orgánulos son casi universales

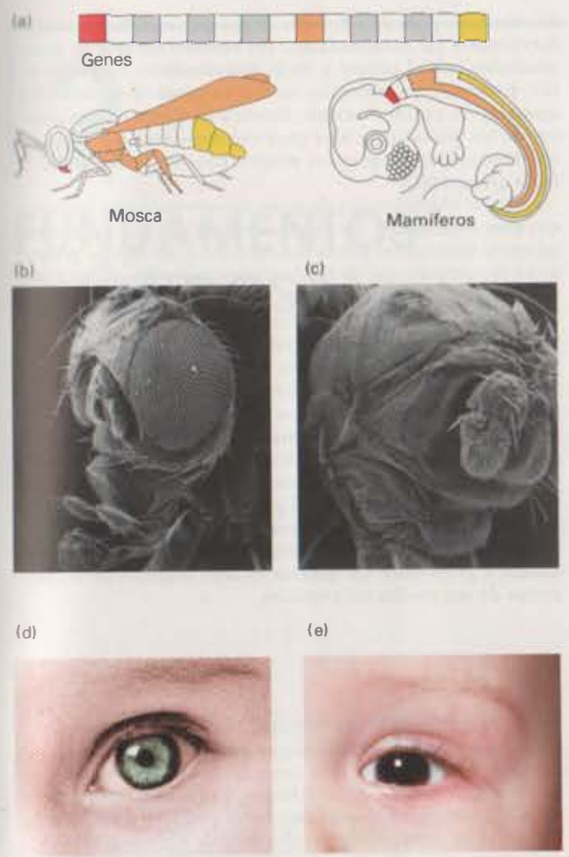
Incluso los organismos que parecen increíblemente diferentes comparten muchas propiedades bioquímicas. Por ejemplo, las enzimas que catalizan la degradación de los azúcares y muchas otras reacciones químicas simples en las células poseen estructuras y mecanismos similares en la mayoría de los seres vivos. El código genético por el cual las secuencias de nucleótidos del mRNA especifican la secuencia de aminoácidos de las proteínas puede ser leído tanto por una célula bacteriana como por una célula humana. Debido a la naturaleza universal del código genético, las "fábricas" bacterianas pueden ser diseñadas para fabricar factores de crecimiento, insulina, factores de la coagulación y otras proteínas humanas con fines terapéuticos. Las similitudes bioquímicas entre organismos también se extienden a los orgánulos encontrados en las células eucariontes. Las estructuras básicas y las funciones de estos componentes subcelulares están ampliamente conservadas en todos los eucariontes.

El análisis por computación de la secuencia de DNA, actualmente disponible para numerosas especies bacterianas y varios eucariontes, puede localizar genes que codifican proteínas dentro de los genomas. Con la ayuda del código genético, la secuencia de aminoácidos de las proteínas puede ser deducida a partir de las secuencias genéticas correspondientes. Aunque conceptualmente simple, la "búsqueda" de genes y la deducción de la secuencia de aminoácidos de sus proteínas codificadas es complicada en la práctica debido a la existencia de muchas regiones no codificantes en el DNA eucarionte (cap. 9). A pesar de estas dificultades y de las ambigüedades ocasionales en el análisis de las secuencias de DNA, las comparaciones de genomas de una amplia gama de organismos proporcionan una evidencia imponente y convincente para la conservación de los mecanismos moleculares que construyen y cambian organismos, y para la historia evolutiva común de todas las especies.

Muchos genes que controlan el desarrollo son muy similares en los seres humanos y en otros animales

Como seres humanos, tenemos un tendencioso y exagerado punto de vista de nuestro estatus en el reino animal. El orgullo por nuestra gran corteza cerebral y por sus capacidades mentales asociadas puede cegarnos a las capacidades notablemente sofisticadas de otras especies: la navegación de las aves, el sistema sonar de los murciélagos, el *homing* u orientación de retorno del salmón o el vuelo de las moscas.

A pesar de todas las evidencias para la unidad evolutiva en los niveles celulares y fisiológicos, cada uno contaba con



◀ Fig. 1-26. Genes similares, conservados durante la evolución, regulan muchos procesos del desarrollo en diversos animales. Se estima que los insectos y los mamíferos han tenido un ancestro común hace cerca de 500 millones de años. Ellos comparten genes que controlan procesos similares, como el desarrollo del corazón, los ojos y la organización del esquema corporal, lo que indica la conservación de la función desde tiempos lejanos. (a) Los genes *Hox*, que se encuentran en cúmulos en los cromosomas de la mayoría o de todos los animales, codifican proteínas relacionadas que controlan las actividades de otros genes. Además, dirigen el desarrollo de diferentes segmentos a lo largo del eje de cabeza-cola de muchos animales, como los indicados por los colores correspondientes. Cada gen es activado (transcripcionalmente) en una región específica a lo largo del eje cabeza-cola y controla el desarrollo de tejidos en ese lugar. Por ejemplo, los genes *Hox* en ratones son responsables de las formas distintivas de los vertebrados. Las mutaciones que afectan los genes *Hox* en las moscas causan que ciertas partes del cuerpo se formen en lugares erróneos, como las patas en lugar de las antenas en la cabeza. Estos genes proporcionan un sentido de cabeza a cola y sirven para dirigir la formación de las estructuras correctas en los lugares correctos. (b) El desarrollo de los grandes ojos compuestos en las moscas de la fruta requiere un gen denominado *eyeless* (llamado así por el fenotipo mutante). (c) Las moscas con los genes *eyeless* inactivados no tienen ojos. (d) Los ojos humanos normales requieren el gen humano, denominado *Pax6*, que corresponde al *eyeless*. (e) Las personas a las que les falta la función adecuada de *Pax6* tienen la enfermedad genética *aniridia*, una falta de iris en los ojos. *Pax6* y *eyeless* codifican proteínas altamente relacionadas que regulan las actividades de otros genes y descienden del mismo gen ancestral. (Partes a) y b) Andreas Hefti, Interdepartmental Electron Microscopy (IEM) Biocenter, University of Basel. Part d) © Simon Fraser/Photo Researchers, Inc.)

que los genes que regulan el desarrollo de los animales se diferenciarían mucho de un filo a otro. Después de todo, los insectos, los erizos de mar y los mamíferos parecen demasiado diferentes. ¿Debemos tener muchas proteínas únicas para crear un cerebro como el nuestro? Los frutos de investigaciones en el desarrollo genético durante las dos décadas pasadas revelan que los insectos y los mamíferos, que tienen un ancestro común desde hace cerca de quinientos millones de años, poseen muchos genes reguladores del desarrollo similares (fig. 1-26). Efectivamente, un gran número de estos genes parece estar conservado en muchos y tal vez en todos los animales. Notablemente, las funciones en el desarrollo de las proteínas codificadas por estos genes también están bastantes conservadas. Por ejemplo, ciertas proteínas involucradas en el desarrollo de los ojos en los insectos se relacionan con proteínas reguladoras del desarrollo de los ojos en los mamíferos. Lo mismo sucede con el desarrollo del corazón, intestinos, pulmones, capilares y para la ubicación de partes corporales a lo largo de los ejes cabeza-cola y espalda-frente (cap. 15).

Esto no significa que todos los genes o proteínas estén conservados evolutivamente. Existen muchos ejemplos contundentes de proteínas que, hasta donde sabemos, están ausentes por completo en ciertos linajes de animales. De manera no sorprendente, las plantas exhiben muchas de las diferencias de los animales después de mil millones de años de separación en su evolución. Aún ciertas proteínas de unión al DNA difieren entre los guisantes y las vacas en sólo dos de los ¡102 aminoácidos!

Las ideas de Darwin respecto de la evolución de todos los animales son relevantes para los genes

Darwin no conoció la existencia de los genes o cómo estos cambian, pero nosotros sí: la maquinaria de replicación del DNA comete errores, o un mutágeno causa el reemplazo de un nucleótido por otro o una ruptura de un cromosoma. Algunos cambios en el genoma son inocuos, otros medianamente dañinos y otros más mortales; sólo unos pocos son beneficiosos. Las mutaciones pueden cambiar la secuencia de un gen de manera tal que modifica la actividad de la proteína codificada o altera cuándo, dónde y en qué cantidades es producida en el cuerpo.

Los cambios dañinos en la secuencia de un gen se perderán a partir de una población porque los individuos afectados no pueden sobrevivir tan bien como sus parientes. Este proceso de selección es lo que Darwin describió sin conocer

los mecanismos subyacentes que causan que los organismos varíen. Por lo tanto, la selección de todos los organismos para la supervivencia es, en realidad, una selección de genes o, más precisamente, de un grupo de genes. Una población de organismos a menudo contiene muchas variantes que apenas están igualmente bien adaptadas a las condiciones predominantes. Cuando las condiciones cambian –un incendio, una inundación, la pérdida de los principales suplementos dietarios, el clima– las variantes que están mejor capacitadas para adaptarse sobrevivirán y aquellas menos favorecidas para las nuevas condiciones comenzarán a desaparecer. Así, la composición genética de una población de organismos puede cambiar con el tiempo.

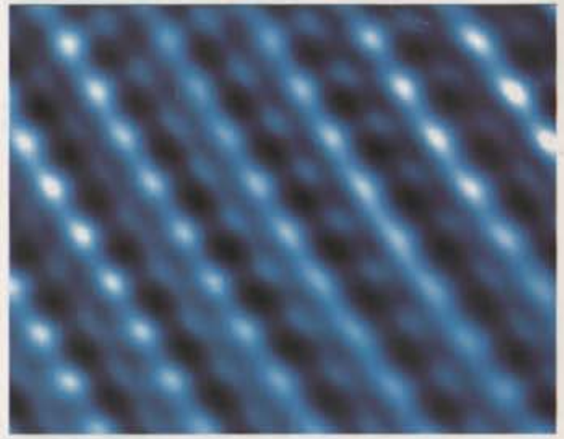
La medicina obtiene información de investigaciones en otros organismos

Las mutaciones que ocurren en ciertos genes durante el curso de nuestra vida contribuyen a la formación de varios cánceres humanos. Las formas normales de estos genes que "causan cáncer" codifican proteínas que ayudan a regular la proliferación celular o la muerte (cap. 23). Nosotros también podemos heredar de nuestros padres copias mutadas de genes que causan todas las clases de enfermedades genéticas, como la fibrosis quística, la distrofia muscular, la enfermedad de Huntington o la anemia falciforme. Por fortuna, también podemos heredar genes que nos hacen resistir fuertemente las enfermedades. Un número notable de genes asociados con el cáncer y otras enfermedades humanas están presentes en animales evolutivamente distantes. Por ejemplo, un estudio reciente muestra que más de tres cuartos de los genes conocidos para enfermedades humanas están relacionados con genes encontrados en la mosca de la fruta *Drosophila*.

Con la identificación de genes de enfermedades humanas en otros organismos, los estudios en organismos experimentalmente manejables deben conducirnos a un rápido progreso en la comprensión de las funciones normales de los genes relacionados a enfermedades, y qué ocurre cuando las cosas comienzan a salir mal. Por el contrario, los estados de enfermedades en sí mismo constituyen un análisis genético con fenotipos bien estudiados. Todos los genes que pueden ser alterados para causar ciertas enfermedades pueden codificar un grupo de proteínas funcionalmente relacionadas. Por lo tanto, los indicios sobre el funcionamiento celular normal de las proteínas provienen de las enfermedades humanas y pueden utilizarse para guiar investigaciones iniciales en los mecanismos. Por ejemplo, los genes al principio identificados debido a su relación con el cáncer humano pueden ser estudiados en el contexto del desarrollo normal en varios modelos de organismos y proporcionará indicios futuros respecto de las funciones de sus productos proteicos.

2

FUNDAMENTOS QUÍMICOS



Cadenas de polisacáridos de una superficie de celulosa visualizadas por medio de un microscopio atómico. (Cortesía de M. Miles de A. A. Baker et al., 2000, *Biophys J.* 79: 1139-1145.)

La vida de una célula depende de miles de interacciones químicas y reacciones exquisitamente coordinadas entre sí en el tiempo y en el espacio, y bajo la influencia de las instrucciones genéticas y su ambiente. ¿Cómo extrae la célula los nutrientes críticos y la información de su entorno? ¿Cómo convierte la energía almacenada en nutrientes en trabajo (movimiento, síntesis de componentes críticos)? ¿Cómo transforma los nutrientes en estructuras fundamentales requeridas para su supervivencia (pared celular, núcleo, ácidos nucleicos, proteínas, citoesqueleto)? ¿Cómo se vincula una célula con otra para constituir un tejido? ¿Cómo se comunican las células entre sí de manera tal que el organismo pueda funcionar como una totalidad? Uno de los objetivos de la biología molecular es contestar estas preguntas acerca de la estructura y función de las células, y los organismos en términos de las propiedades de las moléculas y de los iones individuales.

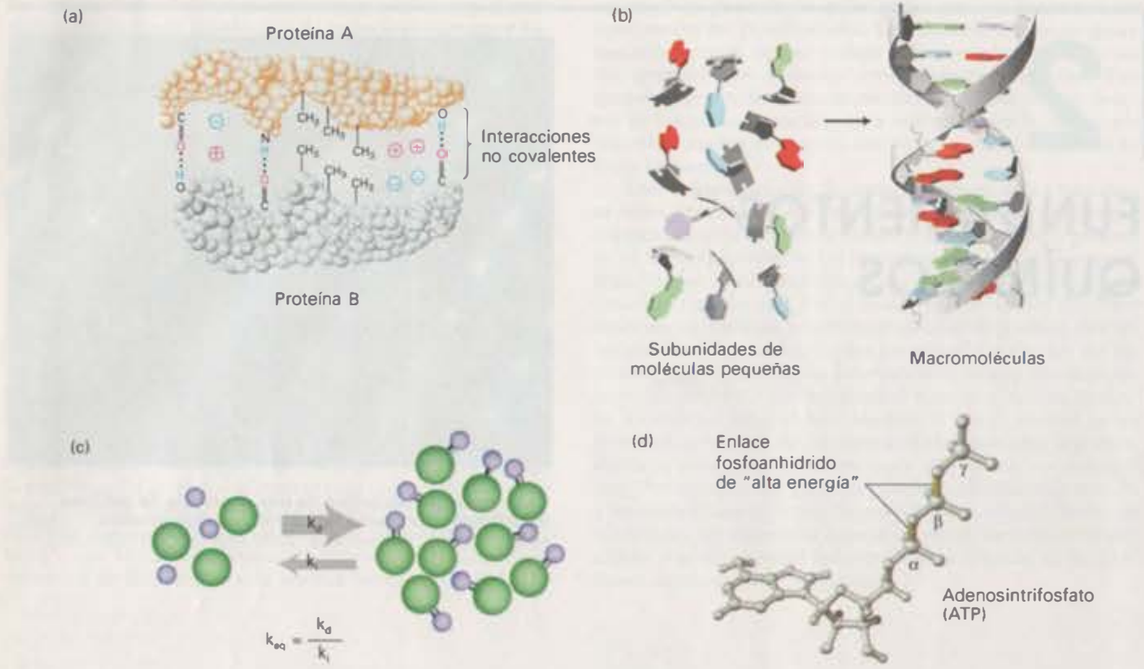
La vida surgió en un ambiente acuoso y las propiedades de esta sustancia ubicua tienen una profunda influencia en la química de la vida. El agua, que constituye el 70-80% del peso de la mayoría de las células, es la molécula más abundante en los sistemas biológicos. Alrededor del 7% del peso de la materia viva está compuesto de iones inorgánicos y moléculas pequeñas, como aminoácidos (los componentes estructurales que constituyen las proteínas), nucleótidos (los componentes estructurales del DNA y RNA), lípidos (los componentes estructurales que constituyen las biomembranas) y azúcares (los componentes estructurales que conforman los almidones y la celulosa); el resto son macromoléculas y agregados macromoleculares constituidos por estas unidades.

Muchas moléculas biológicas (p. ej., azúcares) se disuelven en el agua; estas moléculas afines al agua se denominan **hidrófilas**. Otras moléculas biológicas (p. ej., grasas como los triacilgliceroles) evitan el agua; son **hidrófobas** (le temen al agua). Aun otras biomoléculas (p. ej., fosfolípidos), a las que se conoce como **anfipáticas**, son un poco esquizofrénicas y tienen regiones hidrófilas e hidrófobas; se las suele utilizar para construir las membranas que rodean las células y sus orgánulos internos (cap. 5). El funcionamiento equilibrado de las células, tejidos y organismos depende de todas estas moléculas, desde las más pequeñas hasta las más grandes. En efecto, la química del protón simple (H^+) con una masa de 1 dalton (Da) puede ser tan importante para la supervivencia de una célula humana como la de cada gigantesca molécula de DNA con una masa tan grande como $8{,}6 \times 10^{10}$ Da (simple hebra de DNA del cromosoma humano 1).

Son pocos los principios y sucesos químicos esenciales para comprender los procesos celulares a nivel molecular (fig. 2-1). En este capítulo analizamos algunos de ellos, empezando con los enlaces covalentes que conectan los átomos en las moléculas y las fuerzas no covalentes que estabilizan grupos de átomos entre las moléculas y dentro de ellas. Consideramos también las propiedades clave de las unidades estructurales básicas de las células y analizamos los aspectos del equilibrio químico más relevantes para los sistemas biológicos. Finalizamos el capítulo

CONTENIDO

2.1 Enlaces atómicos e interacciones moleculares
2.2 Las unidades estructurales químicas de las células
2.3 Equilibrio químico
2.4 Energética bioquímica



▲ Fig. 2-1. La química de la vida: conceptos clave. (a) Las interacciones covalentes y no covalentes yacen en el corazón de todas las moléculas biológicas, como cuando dos proteínas con formas y propiedades químicas complementarias se juntan para formar un complejo fuertemente unido. Además del enlace covalente que mantiene unidos a los átomos de un aminoácido y conecta a los aminoácidos entre sí, las interacciones no covalentes ayudan a definir la estructura de cada proteína y sirve para ayudar a mantener unidas las estructuras complementarias. (b) Las moléculas pequeñas sirven como componentes químicos para las estructuras mayores. Por ejemplo, para generar la macromolécula portadora de información, el DNA, los cuatro componentes químicos: nucleótidos, desoxiadenilato (A), desoxitimidilato (T), desoxiguanilato (G), y desoxicitidilato (C) se conectan entre sí mediante enlaces covalentes formando largas cadenas (polímeros), que luego se dimerizan para formar la doble hélice. (c) Las reacciones químicas son reversibles, y la distribución de los compuestos químicos entre los componentes iniciales (*izquierda*) y los productos de las reacciones (*derecha*) dependen de las constantes de velocidad para las reacciones directas (k_d, flecha superior) e inversas (k_i, flecha inferior). En la reacción representada, la constante de velocidad para la reacción directa es más rápida que para la reacción inversa, lo que se indica con el grosor de las flechas. La relación de estas K_{eq} provee una medida informativa de la cantidad relativa de productos y reactivos que estarán presentes en el equilibrio. (d) En muchos casos, la fuente de energía para las reacciones químicas de las células es la hidrólisis de la molécula ATP. Esta energía es liberada cuando un enlace fosfoanhidrido de alta energía que conecta los fosfatos α y β o los fosfatos β y γ en la molécula de ATP (amarillo) se rompe por la adición de una molécula de agua. Las proteínas pueden transferir la energía de la hidrólisis del ATP a otros compuestos químicos, suministrando energía a otras reacciones químicas o a otras moléculas biológicas para realizar trabajo físico.

con los principios básicos de la energética bioquímica, incluidos el papel central del ATP (adenosintrifosfato) en la captura y transferencia de la energía en el metabolismo celular.

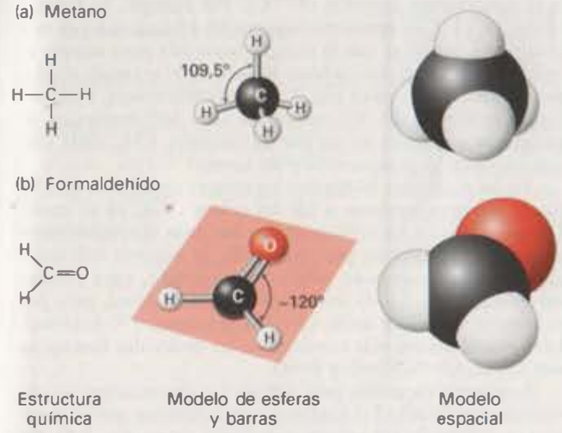
2.1 Enlaces atómicos e interacciones moleculares

Las fuerzas intensas y débiles de atracción interatómica son el "adhesivo" que mantiene a los átomos juntos en moléculas individuales y que permite las interacciones entre diferentes moléculas biológicas. Las fuerzas fuertes forman enlaces covalentes cuando dos átomos comparten un par de electrones (enlace "simple") o múltiples pares de electrones (enlace "doble", enlace "triple", etc.). Las fuerzas atractivas débiles de las interacciones no covalentes son igualmente importantes para determinar las propiedades y las funciones de moléculas biológicas como las proteínas, los ácidos nucleicos, los carbohidratos y los lípidos. Existen cuatro tipos principales de interacciones no covalentes: interacciones iónicas, enlaces o puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals y efecto hidrófobo.

Cada átomo tiene un número y una geometría definidas de enlaces covalentes

Hidrógeno, oxígeno, carbono, nitrógeno, fósforo y azufre son los elementos más abundantes de las moléculas biológicas. Estos átomos, que rara vez existen como entidades aisladas, forman fácilmente enlaces covalentes con otros átomos, usando los electrones que residen en los orbitales electrónicos más externos que rodean su núcleo. Como regla, cada tipo de átomo forma un número característico de enlaces covalentes con otros átomos, con una geometría bien definida, determinada por el tamaño del átomo y tanto por la distribución de electrones alrededor del núcleo como por el número de electrones que puede compartir. En algunos casos (p. ej., carbono), el número de enlaces covalentes estables formados es fijo; en otros casos (p. ej., azufre), son posibles diferentes números de enlaces covalentes estables.

Todos los componentes estructurales están organizados alrededor del átomo de carbono, que forma cuatro enlaces covalentes con otros dos a cuatro átomos. Como se ilustra con la molécula de metano (CH_4), cuando el carbono está unido a otros cuatro átomos, el ángulo entre cualquiera de los dos enlaces es de 109,5° y las posiciones de los átomos compartidos definen los cuatro puntos de un tetraedro (fig. 2-2a). Esta geometría ayuda a determinar la estructura de numerosas moléculas biológicas. Cuando un átomo de carbono (o cualquier otro) está enlazado a cuatro átomos disímiles o grupos en una configuración no planar se dice que es asimétrico. La orientación tetraédrica de los enlaces formados por un átomo de carbono asimétrico puede disponerse en el espacio tridimensional en dos formas diferentes y produce moléculas que son imágenes especulares, una propiedad denominada *quiralidad*. Tales moléculas se denominan *isómeros ópticos* o estereoisómeros. Muchas moléculas en las células contienen al menos un átomo de carbono asimétrico, a menudo llamado un átomo de carbono quiral. Los distintos estereoisómeros de una molécula suelen tener actividades biológicas diferentes porque la disposición de los átomos dentro de sus estructuras difiere, lo que resulta en sus capacidades únicas para interactuar y reaccionar químicamente con otras moléculas.



▲ Fig. 2-2. Geometría de los enlaces cuando el carbono está unido a otros cuatro o tres átomos por enlaces covalentes. (a) Si un átomo de carbono forma cuatro enlaces simples, como en el metano (CH_4), los átomos de los enlaces (en este caso todos H) se orientan en el espacio en forma de un tetraedro. La representación con letras, en la izquierda, indica con claridad la composición atómica de la molécula y el patrón de enlace. El modelo con esferas y barras, en el centro, ilustra la disposición geométrica de los átomos y los enlaces, pero los diámetros de las esferas que representan los átomos y sus electrones no compartidos son irreales, pues son demasiado pequeños en comparación con las longitudes de enlace. Los tamaños de la nube de electrones en el modelo espacial de la derecha representan en forma más precisa la estructura en tres dimensiones. (b) Un átomo de carbono también puede estar conectado a tres, en vez de a cuatro átomos, como en el formaldehído (CH_2O). En este caso, los electrones compartidos del carbono participan en dos enlaces simples y un enlace doble, que yacen sobre un mismo plano. A diferencia de los átomos unidos por un enlace simple que pueden generalmente rotar libremente sobre el eje de enlace, aquellos que están conectados por un enlace doble no pueden hacerlo.

CUADRO 2-1 Propiedades de enlace de los átomos más abundantes en las biomoléculas

Átomo y electrones externos	Número usual de enlaces covalentes	Geometría de enlace
H	1	H
·O·	2	O
·S·	2, 4 o 6	S
·N·	3 o 4	N
·P·	5	P
·C·	4	C

El carbono también puede unirse a otros tres átomos, caso en el cual todos los átomos se encuentran en un plano común. Aquí, el átomo de carbono forma dos enlaces simples típicos con dos átomos y un enlace doble (dos pares de electrones compartidos) con el tercer átomo (fig. 2-2b). En ausencia de otras fuerzas, los átomos unidos por un enlace simple pueden rotar libremente sobre el eje de enlace, mientras que los conectados por un enlace doble no pueden. La planaridad rígida impuesta por los enlaces dobles tiene un enorme significado para la forma y la flexibilidad de las moléculas biológicas grandes, como las proteínas y los ácidos nucleicos.

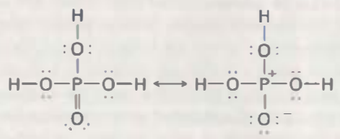
El número de enlaces covalentes formados por otros átomos comunes se muestra en el cuadro 2-1. Un átomo de hidrógeno forma sólo un enlace. Por lo general, un átomo de oxígeno forma sólo dos enlaces covalentes, pero tiene dos pares adicionales de electrones que pueden participar en interacciones no covalentes. El azufre forma dos enlaces covalentes en el sulfuro de hidrógeno (H_2S), pero también puede acomodar seis enlaces covalentes, como en el ácido sulfúrico (H_2SO_4) y los sulfatos derivados. El nitrógeno y el fósforo tienen cada uno cinco electrones para compartir. En el amoníaco (NH_3), el átomo de nitrógeno forma tres enlaces covalentes; el par de electrones alrededor del átomo no involucrado en un enlace covalente puede tomar parte en interacciones no covalentes. En el ion amonio (NH_4^+), el nitrógeno forma cuatro enlaces covalentes, que tienen una geometría tetraédrica. El fósforo suele formar cinco enlaces covalentes, como en el ácido fosfórico (H_3PO_4) y los fosfatos derivados, que forman la columna vertebral de los ácidos nucleicos. Los grupos fosfatos adheridos a las proteínas desempeñan un papel clave en la regulación de las actividades de muchas proteínas (cap. 3) y en la molécula central de la energía celular, el ATP, que contiene tres grupos fosfato (véase sección 2.4).

En los enlaces covalentes polares los electrones se comparten de manera desigual

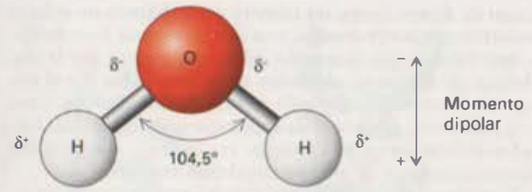
En muchas moléculas, los átomos unidos ejercen diferentes atracciones sobre los electrones del enlace covalente, por lo que éstos no se comparten en forma equitativa. La magnitud de la capacidad de un átomo para atraer un electrón se denomina electronegatividad. Se dice que un enlace entre átomos con idénticas o similares electronegatividades es no polar. En un enlace no polar, los electrones del enlace se comparten esencialmente en forma equitativa entre los dos átomos, como ocurre en la mayoría de los enlaces C—C y C—H. Sin embargo, si dos átomos difieren en su electronegatividad, se dice que el enlace entre ellos es polar.

Uno de los extremos de un enlace polar tiene una carga parcial negativa (δ^-) y el otro extremo tiene una carga parcial positiva (δ^+). Por ejemplo, en un enlace O—H, la mayor electronegatividad del átomo de oxígeno relativa a la del hidrógeno da como resultado que los electrones pasen más tiempo alrededor del átomo de oxígeno que del de hidrógeno. Por lo tanto, el enlace O—H posee un dipolo eléctrico, una carga positiva separada de una carga igual, pero negativa. Podemos pensar que el átomo de oxígeno del enlace O—H posee, en promedio, una carga equivalente al 25% de un electrón, y que el átomo de H tiene una carga positiva equivalente. Debido a sus dos enlaces O—H, las moléculas de agua (H_2O) son dipolos que forman interacciones electrostáticas no covalentes entre ellas y con otras moléculas (fig. 2-3). Estas interacciones desempeñan un papel crítico en casi todas las interacciones bioquímicas y, por ende, son fundamentales para la biología celular.

La polaridad del doble enlace O═P en el H_3PO_4 produce un "híbrido de resonancia", una estructura entre las dos formas que se muestran a continuación en las cuales los electrones que no forman enlaces se ilustran como pares de puntos:



En el híbrido de resonancia de la derecha, uno de los electrones del doble enlace P═O se ha acumulado alrededor del átomo de O, dándole una carga negativa y dejando el átomo de P con una carga positiva. Estas cargas son importantes en las interacciones no covalentes.



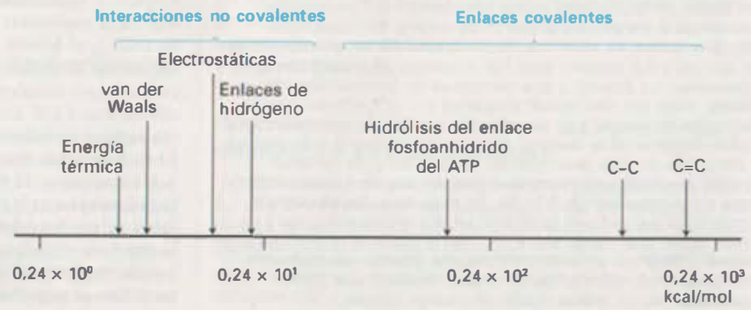
▲ **Fig. 2-3. Dipolo natural de una molécula de agua.** El símbolo δ representa una carga parcial (más débil que la de un electrón o un protón). Debido a la diferencia de electronegatividades entre el H y el O, cada uno de los enlaces polares H—O del agua tiene un momento dipolar. Los tamaños y direcciones de los momentos dipolares de cada enlace determinan el momento dipolar neto de la molécula.

Los enlaces covalentes son mucho más fuertes y más estables que las interacciones no covalentes

Los enlaces covalentes son muy estables porque las energías requeridas para romperlos son mucho más grandes que la energía térmica disponible a temperatura ambiente (25 °C) o la temperatura corporal (37 °C). Por ejemplo, la energía térmica a 25 °C es aproximadamente 0,6 kilocalorías por mol (kcal/mol), mientras que la energía requerida para romper el enlace simple carbono-carbono (C—C) en el etano es alrededor de 140 veces mayor (fig. 2-4). En consecuencia, a temperatura ambiente (25 °C), menos de 1 en 10^{12} moléculas de etano son separadas en un par de radicales $\cdot CH_3$, cada uno con un electrón desapareado y no unido.

En las moléculas biológicas los enlaces covalentes simples tienen energías similares a las del enlace C—C en el etano. Debido a que en los enlaces dobles hay más electrones compartidos entre átomos, para romperlos se requiere más energía que para los enlaces simples. Por ejemplo, para romper un enlace simple C—O son necesarias 84 kcal/mol, pero para romper un enlace doble C═O se requieren 170 kcal/mol. Los enlaces dobles más comunes en las moléculas biológicas son C═O, C═N, C═C y P═O.

La energía requerida para romper las interacciones no covalentes son de sólo 1-5 kcal/mol, mucho menos que las energías de enlace de los enlaces covalentes (véase fig. 2-4). En efecto, las interacciones no covalentes son lo suficientemente débiles para formarse y romperse constantemente a temperatura ambiente. Aunque estas interacciones son débiles y tienen una existencia transitoria a temperaturas fisiológicas (25-37 °C), múltiples interacciones no covalentes pueden actuar juntas para producir asociaciones altamente estables y específicas entre diferentes partes de una gran molécula o entre diferentes macromoléculas. Primero analizaremos los cuatro principales tipos de interacciones no covalentes y luego consideraremos su papel en la unión entre moléculas biológicas y con otras moléculas.

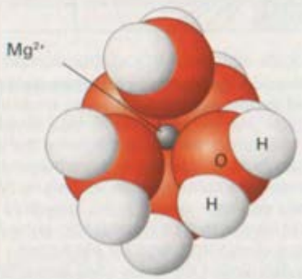


▶ **Fig. 2-4. Energías relativas de los enlaces covalentes y las interacciones no covalentes.** Las energías de enlace son determinadas como la energía requerida para romper un tipo particular de enlace. Los enlaces covalentes son dos órdenes de magnitud más fuertes que las interacciones no covalentes. Estas últimas son algo más grandes que la energía térmica del entorno a temperatura ambiente (25 °C). Muchos procesos biológicos están acoplados a la energía liberada durante la hidrólisis de un enlace fosfoanhidrido en el ATP.

Las interacciones iónicas son atracciones entre iones de carga opuesta

Las interacciones iónicas son el resultado de la atracción de un ion cargado positivamente –un **catión**– por un ion cargado negativamente –un anión. En el cloruro de sodio (NaCl), por ejemplo, el electrón de enlace aportado por el átomo de sodio es transferido completamente al átomo de cloro. A diferencia de los enlaces covalentes, las interacciones iónicas no tienen una orientación geométrica fija o específica, porque el campo electrostático alrededor de un ion –su atracción por una carga opuesta– es uniforme en todas las direcciones.

En las soluciones acuosas, los iones simples de importancia biológica, como Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} y Cl^- no existen como entidades libres aisladas. En cambio, cada uno está hidratado, rodeado por una cubierta estable de moléculas de agua, las cuales son mantenidas en su lugar por interacciones iónicas entre el ion central y el extremo del dipolo de agua con carga opuesta (fig. 2-5). La mayoría de los compuestos iónicos se disuelven rápidamente en agua porque la energía de hidratación, la energía liberada cuando los iones se unen con fuerza a moléculas de agua, es mayor que la energía del enrejado que estabiliza la estructura cristalina. Parte o la totalidad de la cubierta de hidratación acuosa debe ser eliminada de los iones cuando éstos interactúan con proteínas. Por ejemplo, el agua de hidratación se pierde cuando los iones pasan a través de los poros formados por proteínas de la membrana celular durante la conducción nerviosa (cap. 7).



▲ **Fig. 2-5. Interacciones electrostáticas entre el agua y el ion magnesio (Mg^{2+}).** Las moléculas de agua son mantenidas en su lugar por interacciones electrostáticas entre las dos cargas positivas del ion y la carga parcialmente negativa del oxígeno de cada molécula de agua. En las soluciones acuosas, todos los iones están rodeados por una cubierta de hidratación similar.

La fuerza relativa de las interacciones entre dos iones, A^- y C^+, depende de la concentración de otros iones en la solución. Mientras más alta sea la concentración de otros iones (p. ej., Na^+ y Cl^-), más oportunidades tienen A^- y C^+ de interactuar en forma iónica con estos otros iones y, por lo tanto, la energía que se requiere para romper las interacciones entre A^- y C^+ es menor. Como resultado, el incremento de la concentración de sales como NaCl en una solución de moléculas biológicas puede debilitar y hasta perturbar las interacciones iónicas que las mantienen juntas.

Los enlaces de hidrógeno determinan la solubilidad en agua de moléculas sin carga

Un enlace de hidrógeno es la interacción de un átomo de hidrógeno parcialmente cargado positivamente en un dipolo molecular (p. ej., el agua) con electrones no apareados de otro átomo, ya sea en la misma molécula (intramolecular) o en una diferente (intermolecular). Normalmente, un átomo de hidrógeno forma un enlace covalente con un solo átomo diferente. Sin embargo, un átomo de hidrógeno unido en forma covalente con un átomo electronegativo donador D puede formar una asociación débil adicional, el enlace hidrógeno, con un átomo "aceptor" A, el cual debe tener un par de electrones no compartidos disponibles para la interacción:

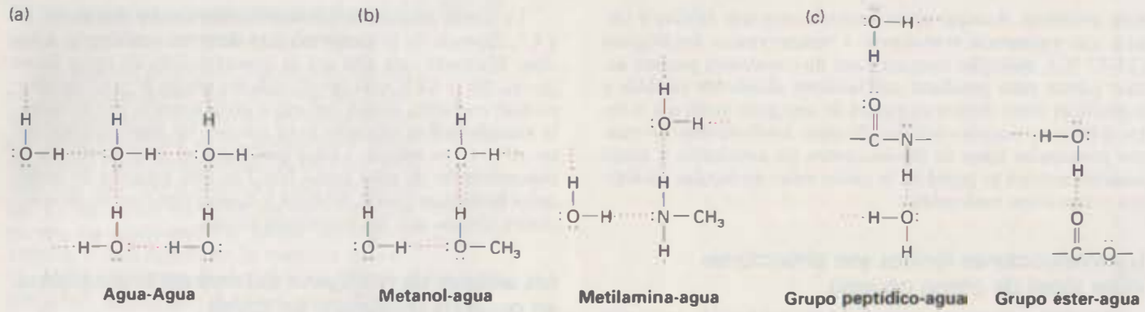
$$D^{\delta-}—H^{\delta+} + :A^{\delta-} \rightleftharpoons D^{\delta-}—H^{\delta+}\cdots\cdots:A^{\delta-}$$

Enlace hidrógeno

La longitud del enlace covalente D—H es algo mayor de lo que sería si no hubiera un enlace de hidrógeno porque el aceptor "tira" el hidrógeno alejándolo del donador. Una característica importante de todos los enlaces de hidrógeno es la direccionalidad. En los enlaces de hidrógeno más fuertes, el átomo donador, el átomo de hidrógeno y el átomo aceptor se encuentran en línea recta. Los enlaces de hidrógeno no lineales son más débiles que los lineales; aún así, los múltiples enlaces de hidrógeno no lineales contribuyen a estabilizar las estructuras tridimensionales de muchas proteínas.

Los enlaces de hidrógeno son más largos y más débiles que los enlaces covalentes entre los mismos átomos. En el agua, por ejemplo, la distancia entre los núcleos de los átomos de hidrógeno y oxígeno de moléculas adyacentes con enlaces de hidrógeno es de alrededor de 0,27 nm, aproximadamente el doble que la longitud de los enlaces covalentes O–H dentro de una molécula de agua solitaria (fig. 2-6a). La fuerza de un enlace de hidrógeno entre moléculas de agua (aproximadamente 5 kcal/mol) es mucho más débil que la de un enlace covalente O–H (aproximadamente 110 kcal/mol), aunque es mayor que la de muchos otros enlaces de hidrógeno en moléculas biológicas (1–2 kcal/mol). El extenso enlace de hidrógeno entre moléculas de agua da cuenta de muchas de las propiedades clave de este compuesto, entre los que se incluyen su altísimo punto de ebullición y fusión y su capacidad para interactuar con otras numerosas moléculas.

La solubilidad de sustancias sin carga en un ambiente acuoso depende mayormente de su capacidad para formar enlaces de hidrógeno con el agua. Por ejemplo, el grupo hidroxilo (–OH) en el metanol (CH_3OH) y el grupo amino ($–NH_2$) en la metilamina (CH_3NH_2) pueden formar varios enlaces de hidrógeno con el agua, permitiéndoles a estas moléculas



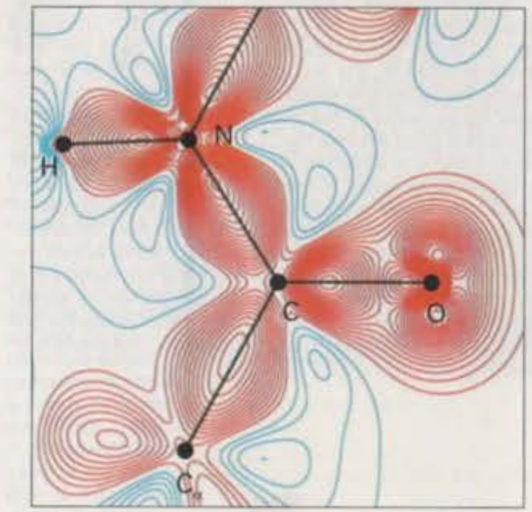
▲ Fig. 2-6. Enlaces de hidrógeno entre molé ulas de agua y con otros compuestos. Cada par de electrones no compartidos de la capa externa de un átomo de oxígeno o de nitrógeno puede aceptar un átomo de hidrógeno en un enlace de hidrógeno. Los grupos hidroxilo y amino también pueden formar enlaces de hidrógeno con el agua. (a) En agua líquida, cada molécula de agua aparentemente forma enlaces de hidrógeno transitorios con varias otras, creando una red dinámica de moléculas unidas por enlaces de hidrógeno. (b) El agua también puede formar enlaces de hidrógeno con metanol y metilamina, lo que explica la alta solubilidad de estos compuestos. (c) El grupo peptídico y el grupo éster, presentes en muchas moléculas biológicas, suelen participar en los enlaces hidrógeno con el agua o con grupos polares en otras moléculas.

disolverse en agua hasta lograr concentraciones elevadas (fig. 2-6b). Por lo general, las moléculas con enlaces polares que forman, con facilidad, enlaces de hidrógeno con el agua pueden disolverse fácilmente en ella; es decir, son hidrófilas. Muchas moléculas biológicas contienen, además de los grupos hidroxilo y amino, péptidos y grupos éster, los cuales forman enlaces de hidrógeno con el agua (fig. 2-6c). La cristalografía por rayos X combinada con el análisis computarizado permiten una representación precisa de la distribución de los electrones en los enlaces covalentes y de los electrones no compartidos de los átomos que se encuentran más alejados, como se ilustra en la figura 2-7. Estos electrones no compartidos pueden formar enlaces de hidrógeno con donadores de hidrógeno.

Las interacciones de van der Waals se originan en dipolos transitorios

Cuando dos átomos cualesquiera se acercan mucho el uno al otro crean una fuerza débil de atracción inespecífica denominada interacción de van der Waals. Estas interacciones inespecíficas son resultado de las fluctuaciones aleatorias momentáneas en la distribución de los electrones de cualquier átomo, lo cual da origen a una distribución transitoria no equitativa de los electrones. Si dos átomos unidos en forma no covalente están lo suficientemente cerca, los electrones de un átomo perturbarán los electrones del otro. Esta perturbación generará un dipolo transitorio en el segundo átomo, y los dos dipolos se atraerán débilmente entre sí (fig. 2-8). Asimismo, un enlace covalente polar en una molécula atraerá un dipolo de orientación opuesta en otra.

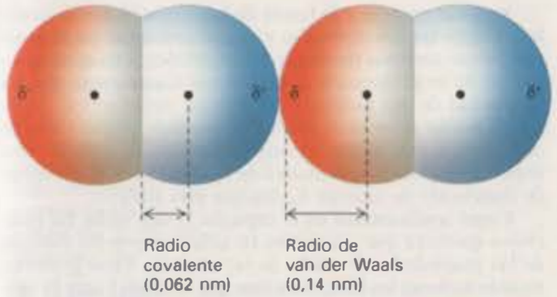
Las interacciones de van der Waals, en las que intervienen dipolos eléctricos inducidos, en forma transitoria o permanente, tienen lugar en todo tipo de moléculas, tanto polares como no polares. En particular, estas interacciones son responsables de la cohesión entre moléculas de líquidos y sólidos no polares, como el heptano, CH_3–$(CH_2)_5$–CH_3, incapaces de formar enlaces de hidrógeno o interacciones iónicas con otras moléculas. La fuerza de las interacciones de van der Waals disminuye rápidamente a medida que se incrementa la distancia; en consecuencia estos enlaces no covalentes sólo se forman cuando los átomos están muy cercanos entre sí. No obstante, si los átomos se acercan demasiado se repelen por las cargas negativas de sus electrones. Cuando la atracción de van der Waals entre dos átomos equilibra exactamente la repulsión entre las dos nubes electrónicas, se dice que los átomos están en contacto de van der Waals. La fuerza de la interacción de van der Waals es de alrededor de 1 kcal/mol, más débil que la típica del enlace de hidrógeno y sólo levemente superior a la energía térmica promedio de las moléculas a 25 °C. En consecuencia, se requieren múltiples interacciones de van der Waals o una interacción de van der Waals en conjunción con otras interacciones no covalentes, o ambas, para influir significativamente en los contactos intermoleculares.



▲ Fig. 2-7. Distribución de electrones compartidos y no compartidos en el grupo peptídico. Aquí se muestra un aminoácido dentro de una proteína denominada crambina. Las líneas negras representan en forma de diagrama los enlaces covalentes entre los átomos. Las líneas rojas (negativas) y azules (positivas) representan los contornos de las cargas. Mientras mayor es el número de líneas de contorno, mayor es la carga. La alta densidad de las líneas de contorno rojo entre los átomos representa el enlace covalente (pares de electrones compartidos). Los dos juegos de líneas rojas que emanan del oxígeno (O) y que no caen en un enlace covalente (línea negra) representan los dos pares de electrones no compartidos en el oxígeno que están disponibles para participar en enlaces de hidrógeno. La alta densidad de las líneas azules cerca del hidrógeno (H) unido al nitrógeno (N) representa una carga parcial positiva, lo que indica que este hidrógeno puede actuar como un donador en el enlace de hidrógeno. (De C. Jelsch et al., 2000, Proc Nat l Acad Sci USA 97:3171. Cortesía de M.M. Teeter.)

El efecto hidrófobo hace que las moléculas no polares se adhieran entre sí

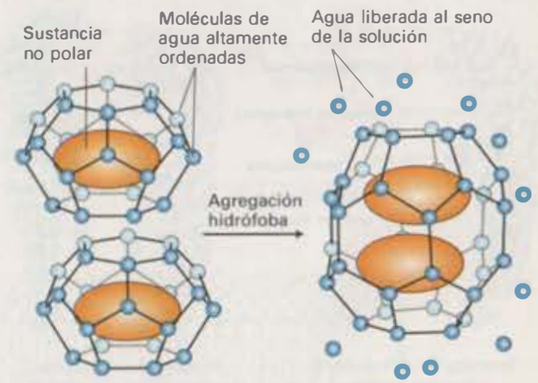
Debido a que las moléculas no polares no contienen grupos cargados, no poseen momento dipolar ni se hidratan, son insolubles o casi insolubles en agua; es decir, son hidrófobas. Los enlaces covalentes entre dos átomos de carbono y entre átomos de carbono e hidrógeno son los enlaces no polares más comunes en los sistemas biológicos. Los **hidrocarburos** –moléculas formadas sólo por carbono e hidrógeno– son virtualmente insolubles en agua. Los triacilgliceroles (o triglicéridos) grandes que comprenden las grasas animales y los aceites vegetales, son también insolubles en agua. Como veremos más adelante, la porción principal de estas moléculas está formada por largas cadenas hidrocarbonadas. Luego de ser agitados en agua, los triacilgliceroles forman una fase separada. Un ejemplo familiar es la separación entre el aceite y el vinagre con base acuosa en un condimento para ensaladas.



▲ Fig. 2-8. Dos moléculas de oxígeno en contacto de van der Waals. En este modelo espacial, el rojo indica carga negativa y el azul, carga positiva. Los dipolos transitorios en las nubes electrónicas de todos los átomos dan origen a fuerzas atractivas débiles, denominadas *interacciones de van der Waals*. Cada tipo de átomo tiene un radio de van der Waals característico, para el cual son óptimas las interacciones de van der Waals con otros átomos. Dado que los átomos se repelen entre sí cuando están lo suficientemente cerca como para que se superpongan sus capas electrónicas externas, el radio de van der Waals mide el tamaño de la nube electrónica que rodea un átomo. El radio covalente indicado aquí corresponde al doble enlace O=O; el radio de enlace covalente simple del oxígeno es levemente mayor.

Las moléculas no polares o las porciones no polares de las moléculas tienden a agregarse en agua debido a un fenómeno denominado efecto hidrófobo. Las moléculas de agua no pueden formar enlaces de hidrógeno con sustancias no polares, por lo tanto esos enlaces tienden a formar estructuras pentagonales y hexagonales *relativamente* rígidas alrededor de las moléculas no polares (fig. 2-9, *izquierda*). Este estado es energéticamente desfavorable porque disminuye la aleatoriedad (entropía) de la población de moléculas de agua. (El papel de la entropía en los sistemas químicos se analizará en una sección posterior.) Si las moléculas no polares en un ambiente acuoso se agregan con sus superficies hidrófobas enfrentadas, hay una reducción en la superficie hidrófoba expuesta al agua (fig. 2-9, *derecha*). Como consecuencia, se requiere menos agua para formar las estructuras que rodean a las moléculas no polares y la entropía se incrementa (un estado energéticamente más favorable) en relación con el estado no agregado. Por lo tanto, en cierto sentido, el agua aprieta las moléculas no polares formando agregados espontáneamente. En lugar de constituir una fuerza atractiva como la de los enlaces de hidrógeno, el efecto hidrófobo es el resultado de una evasión de un estado inestable (amplias cubiertas acuosas alrededor de moléculas no polares individuales).

Las moléculas no polares también pueden asociarse, aunque débilmente, a través de las interacciones de van der Waals. El resultado neto de las interacciones hidrófobas y de van der Waals es una tendencia muy poderosa de las moléculas hidrófobas a interactuar entre sí, en lugar de hacerlo con el agua. Para simplificar, *los similares disuelven a los similares*. Las moléculas polares se disuelven en solventes polares, como el agua; mientras que las moléculas no polares lo hacen en solventes no polares, como el hexano.

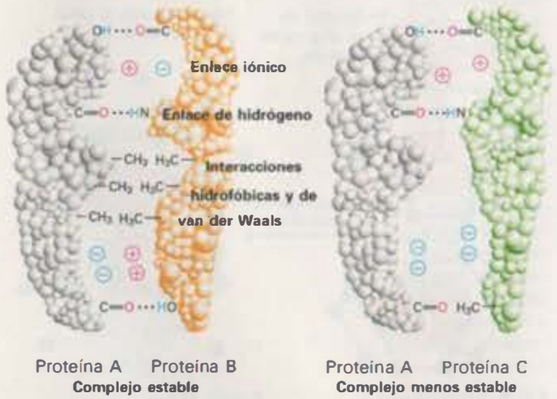


▲ Fig. 2-9. Representación esquemática del efecto hidrófobo. La cubierta de moléculas de agua que se forma alrededor de moléculas no polares en solución es más ordenada que las moléculas de agua en la gran masa del líquido circundante. La agregación de moléculas no polares reduce el número de moléculas de agua involucradas en las cubiertas altamente ordenadas, dando como resultado una mayor entropía, un estado energéticamente más favorable (*derecha*) comparado con el estado desagregado (*izquierda*).

La complementariedad molecular permite la unión estrecha y altamente específica de moléculas biológicas

Tanto dentro como fuera de las células, los iones y las moléculas chocan constantemente entre sí. Cuanto mayor sea el número de copias de cualquiera de los dos tipos de moléculas por unidad de volumen (es decir, cuanto mayor sea su concentración), es más probable que una se encuentre con otra. Cuando dos moléculas se chocan, es más probable que simplemente reboten y se distancien, ya que las interacciones no covalentes que podrían unirlas son débiles y tienen una existencia transitoria a temperaturas fisiológicas. Sin embargo, las moléculas que exhiben complementariedad molecular, un ajuste del tipo llave y cerradura entre sus formas, entre sus cargas u otras propiedades físicas, pueden formar múltiples interacciones no covalentes de corto alcance. Cuando dos de tales moléculas estructuralmente complementarias chocan entre sí, pueden unirse (pegarse) una a la otra.

La figura 2-10 ilustra cómo múltiples enlaces débiles diferentes pueden unir dos proteínas entre sí. Casi ninguna otra disposición de los mismos grupos sobre las dos superficies permitiría que las moléculas tuvieran una unión tan estrecha. Estas múltiples interacciones específicas entre regiones complementarias dentro de una molécula permiten que ésta se pliegue en una conformación tridimensional única (cap. 3) y mantienen unidas las dos cadenas de DNA en una doble hélice (cap. 4). Interacciones similares subyacen a la asociación de grupos de más de dos moléculas en múltiples complejos moleculares, dando lugar a la formación de fibras musculares, a las asociaciones de tipo adhesivo entre las células de los tejidos sólidos y a otras numerosas estructuras celulares.



▲ Fig. 2-10. Complementariedad molecular y unión de proteínas a través de múltiples interacciones no covalentes. Las formas complementarias, las cargas, la polaridad y la hidrofobicidad de dos superficies proteicas permiten múltiples interacciones débiles, que en combinación producen una interacción fuerte y una unión estrecha. Puesto que las desviaciones de la complementariedad molecular debilitan sustancialmente la unión, cualquier molécula biológica puede unir fuertemente a solo una o a un número muy limitado de otras moléculas. La complementariedad de las dos moléculas proteicas de la izquierda les permite unirse con una fuerza mucho mayor que las dos proteínas no complementarias de la derecha.

Según el número y la fuerza de las interacciones no covalentes entre las dos moléculas y con su ambiente, sus uniones pueden ser estrechas (fuertes) o laxas (débiles) y, en consecuencia, ser de larga duración o transitorias. Cuanto más alta sea la afinidad de una molécula por la otra, mejor será el "ajuste" molecular entre ellas, pueden formar más interacciones no covalentes y más ajustadamente pueden unirse entre sí. Una importante medida cuantitativa de la afinidad es la constante de disociación de uniones K_d descrita más adelante.

Como analizaremos en el capítulo 3, casi todas las reacciones químicas que ocurren en las células dependen también de las propiedades de unión de las enzimas. Estas proteínas no sólo aceleran las reacciones sino que también hacen lo mismo con un alto grado de especificidad, un reflejo de su capacidad para unirse fuertemente solo a una o a algunas moléculas relacionadas. En efecto, la especificidad de unión de las grandes moléculas biológicas, sobre todo las proteínas y los ácidos nucleicos, es uno de los rasgos distintivos que diferencian la bioquímica de la química de las soluciones habituales. Claramente, la complementariedad molecular y las interacciones no covalentes subyacen a las estructuras de moléculas biológicas y a muchos procesos críticos para la vida.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 2.1

Enlaces atómicos e interacciones moleculares

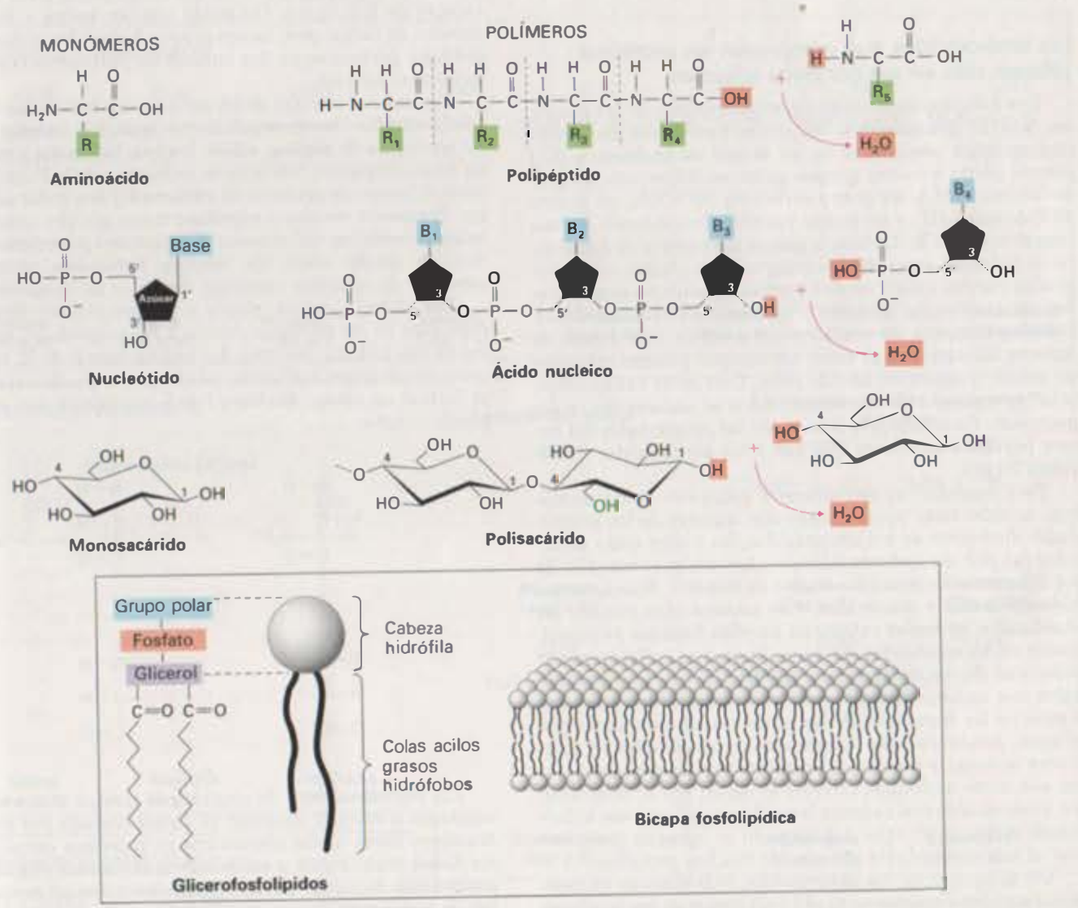
- Los enlaces covalentes, que unen los átomos constituyendo una molécula en una orientación fija, consisten en pares de electrones compartidos por dos átomos. Para romperlos se requieren energías relativamente altas (50–200 kcal/mol).
- En los enlaces polares, que conectan átomos que difieren en su electronegatividad, los electrones compartidos se distribuyen de manera desigual. Un extremo de un enlace polar tiene una carga parcial positiva y el otro extremo tiene una carga parcial negativa (véase fig. 2-3).
- Las interacciones no covalentes entre átomos son considerablemente más débiles que los enlaces covalentes, con energías de enlace que varían entre 1-5 kcal/mol (véase fig. 2-4).
- En los sistemas biológicos existen cuatro tipos de interacciones no covalentes: enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals e interacciones debidas al efecto hidrófobo.
- Los enlaces iónicos se producen por la atracción electrostática entre las cargas positivas y negativas de los iones. En soluciones acuosas todos los cationes y aniones están rodeados por una capa de moléculas de agua estrechamente unidas (véase fig. 2-5). El incremento de la concentración de sal (p. ej., NaCl) de una solución puede debilitar la fuerza relativa de los enlaces iónicos entre moléculas biológicas e incluso romperlos.
- En un enlace de hidrógeno, un átomo de hidrógeno unido por enlace covalente a un átomo electronegativo se asocia con un átomo aceptor cuyos electrones no compartidos atraen el hidrógeno (véase fig. 2-6).
- Las interacciones débiles y relativamente no específicas de van der Waals son creadas siempre que dos átomos cualesquiera se acercan mucho entre sí. Se producen por la atracción entre dipolos transitorios asociados con todas las moléculas (véase fig. 2-8).
- En un ambiente acuoso, las moléculas no polares o las porciones no polares de las grandes moléculas se acercan por el efecto hidrófobo, y reducen así la extensión de su contacto directo con las moléculas de agua (véase fig. 2-9).
- La complementariedad molecular es el ajuste tipo llave y cerradura entre moléculas cuyas formas, cargas y otras propiedades físicas son complementarias. Se pueden formar múltiples interacciones no covalentes entre moléculas complementarias, provocando que se unan con fuerza (véase fig. 2-10), pero no entre moléculas que no son complementarias.
- El alto grado de especificidad de unión que resulta de la complementariedad molecular es uno de los rasgos que distinguen la bioquímica de la química de soluciones típicas.

2.2 Las unidades estructurales químicas de las células

Las tres macromoléculas biológicas más abundantes –proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos– son polímeros compuestos de múltiples moléculas pequeñas idénticas o casi idénticas llamadas monómeros (fig. 2-11), unidos por enlaces covalentes. Los enlaces covalentes entre moléculas monómero generalmente están formados por reacciones de deshidratación en donde se pierde la molécula de agua:

$$H{-}X_1{-}OH + H{-}X_2{-}OH \rightarrow H{-}X_1{-}X_2{-}OH + H_2O$$

Las proteínas son polímeros lineales que contienen de diez a varios miles de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos.



▲ Fig. 2-11. Enlaces covalentes y no covalentes de monómeros para formar biopolímeros y membranas. Vista general de los bloques químicos de construcción de las células y de las macroestructuras que ellos forman. (*Arriba*) Los tres tipos principales de macromoléculas biológicas se ensamblan mediante la polimerización de múltiples moléculas pequeñas (monómeros) de un tipo particular: las proteínas a partir de aminoácidos (cap. 3), los ácidos nucleicos a partir de nucleótidos (cap. 4) y los polisacáridos a partir de monosacáridos (azúcares). Los monómeros forman polímeros al unirse en forma covalente mediante reacciones acopladas cuyo resultado neto es la condensación a través de la reacción de deshidratación mostrada. (*Abajo*) Por el contrario, los monómeros fosfolipídicos se ensamblan en forma no covalente para conformar una estructura de bicapa, la cual constituye la base de todas las membranas celulares (cap. 5).

Los ácidos nucleicos son polímeros lineales que contienen cientos de millones de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster. Los polisacáridos son polímeros lineales o ramificados de monosacáridos (azúcares), como la glucosa, unidos por enlaces glucosídicos.

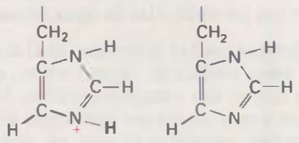
Un proceso similar es utilizado para formar diversas estructuras grandes en las cuales los componentes repetitivos se asocian a través de interacciones no covalentes. Por ejemplo, las fibras del citoesqueleto están compuestas de muchas moléculas repetitivas de proteína. Como analizaremos a continuación, los fosfolípidos se ensamblan de manera covalente para formar una estructura de dos capas (bicapa) que constituye la base de todas las membranas celulares. Por ello, la construcción de grandes moléculas y estructuras por asociación covalente o no covalente de muchas moléculas de menor tamaño, similares o idénticas, es un tema repetitivo en biología.

Los aminoácidos que componen las proteínas difieren sólo en sus cadenas laterales

Los componentes químicos monoméricos de las proteínas son 20 aminoácidos, los cuales tienen una estructura característica consistente en un átomo de carbono α (C_α) central unido a cuatro grupos químicos diferentes: un grupo amino (NH_2), un grupo carboxilo (COOH), un átomo de hidrógeno (H) y un grupo variable denominado cadena lateral o grupo **R**. Debido a que el carbono α es asimétrico en todos los aminoácidos excepto en la glicina, estas moléculas pueden existir en dos formas especulares denominadas por convención isómeros D (dextro) y L (levo) (fig. 2-12). Los dos isómeros no son interconvertibles (uno hecho de manera idéntica con el otro) sin romper y luego reformar un enlace químico en uno de ellos. Con raras excepciones, sólo las formas L de los aminoácidos se encuentran en las proteínas. En el capítulo 3 se verán las propiedades del enlace peptídico covalente que une a los aminoácidos en cadenas largas.

Para entender las estructuras y funciones de las proteínas, se debe estar familiarizado con algunas de las propiedades distintivas de los aminoácidos, las cuales están determinadas por sus cadenas laterales. Las cadenas laterales de los diferentes aminoácidos varían en tamaño, forma, carga, hidrofobicidad y reactividad. Los aminoácidos pueden ser clasificados en varias categorías amplias basadas principalmente en su solubilidad en agua, la cual es influida por la polaridad de sus cadenas laterales (fig. 2-13). Los aminoácidos con cadenas laterales polares son hidrófilos y tienden a estar en las superficies de las proteínas; al interactuar con el agua, posibilitan que las proteínas sean solubles en soluciones acuosas y puedan formar interacciones no covalentes con otras moléculas solubles en agua. Por el contrario, los aminoácidos con cadenas laterales no polares son hidrófobos; rechazan el agua y a menudo se agrupan para formar el núcleo insoluble en agua de muchas proteínas.

Un subgrupo de los aminoácidos hidrófilos se encuentran cargados (ionizados) al pH (≈7) típico de las condiciones fisiológicas (véase sección 2.3). **Arginina** y **lisina** están cargadas positivamente; los ácidos aspártico y glutámico están cargados negativamente (sus formas cargadas se llaman *aspartato* y *glutamato*). Estos cuatro aminoácidos son los principales contribuyentes de la carga global de una proteína. Un quinto aminoácido, **histidina**, tiene una cadena lateral imidazólica, que puede pasar de estar cargada positivamente a descargada con pequeños cambios en la acidez de su medio:

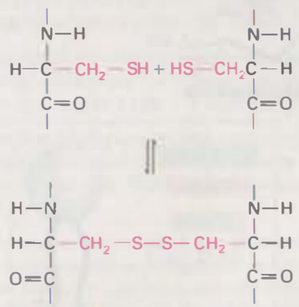


pH 5,8 pH 7,8

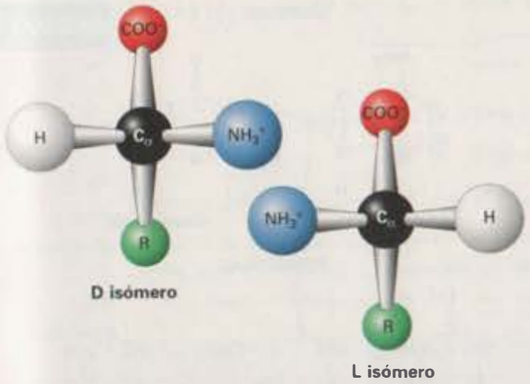
Las actividades de muchas proteínas son moduladas por cambios en la acidez del medio a través de la protonación de las cadenas laterales de la histidina. **Asparagina** y **glutamina** carecen de carga, pero tienen cadenas laterales polares que contienen grupos amido con gran capacidad para formar enlaces de hidrógeno. De modo similar, serina y treonina carecen de carga, pero tienen grupos hidroxilos polares que también participan en los enlaces de hidrógeno con otras moléculas polares.

Las cadenas laterales de los aminoácidos hidrófobos son insolubles o sólo levemente solubles en agua. Las cadenas laterales no cíclicas de **alanina**, **valina**, **leucina**, **isoleucina** y **metionina** están compuestas enteramente de residuos de hidrocarbonos, salvo el átomo de azufre de la metionina y son todas no polares. **Fenilanina**, **tirosina** y **triptófano** tienen grandes cadenas laterales aromáticas voluminosas. En capítulos posteriores, veremos en detalle cómo los residuos hidrófobos revisten la *superficie* de proteínas insertadas dentro de las biomembranas.

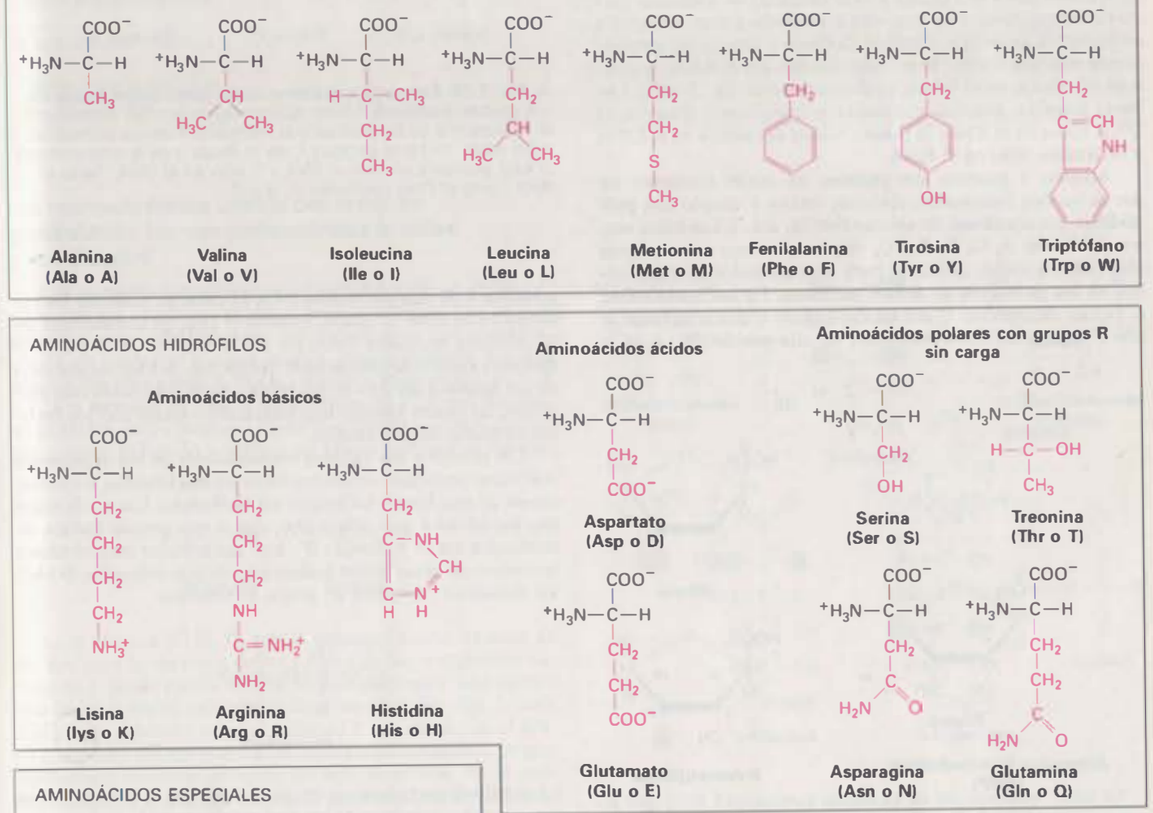
Por último, **cisteína**, **glicina** y **prolina** exhiben funciones especiales en las proteínas debido a las propiedades singulares de sus cadenas laterales. La cadena lateral de la cisteína contiene un grupo **sulfhidrilo** (–SH), que se puede oxidar para formar un enlace **disulfuro** (–S–S–) covalente con una segunda cisteína:



Las regiones dentro de una cadena poteica o en cadenas separadas a veces se conectan en forma cruzada por enlaces disulfuro. Éstos suelen encontrarse en proteínas extracelulares donde contribuyen a estabilizar la estructura plegada. El aminoácido de menor tamaño, la **glicina**, tiene un único átomo de hidrógeno como grupo R. Su pequeño tamaño le permite insertarse en espacios estrechos. A diferencia de los demás aminoácidos comunes, la cadena lateral de la prolina se dobla para formar un anillo al unirse mediante enlace covalente el átomo de nitrógeno (grupo amino) con el C_α. Como resultado, la prolina es muy fija y crea una angulación rígida en una cadena proteica, limitando la forma en que una proteína puede plegarse en la región de residuos de prolina.



◀ **Fig. 2-12. Estructura general de los aminoácidos.** El átomo de carbono (C_α) de cada aminoácido se une a cuatro grupos químicos. La cadena lateral, o grupo R, es única para cada tipo de aminoácido (véase fig. 2-13). Debido a que el C_α en todos los aminoácidos, a excepción de la glicina, es asimétrico, estas moléculas tienen dos formas especulares, designadas L y D. Aunque las propiedades de tales isómeros ópticos son idénticas, sus actividades biológicas son diferentes. Sólo los aminoácidos L se encuentran en las proteínas.



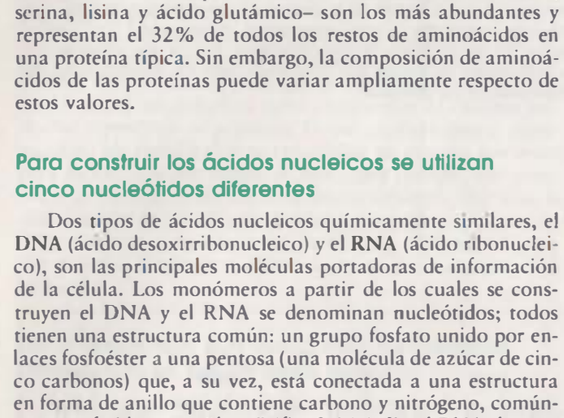
▲ **Fig. 2-13. Los 20 aminoácidos comunes que constituyen las proteínas.** Las cadenas laterales (grupo R; rojo) determinan las propiedades características de cada aminoácido y son la base para agrupar los aminoácidos en tres categorías principales: hidrófobos, hidrófilos y especiales. Se muestran las formas ionizadas que existen a pH (≈7) en el citosol. Entre paréntesis se presentan las abreviaturas de tres letras y de una letra para cada aminoácido.

Algunos aminoácidos son más abundantes en las proteínas que otros. Cisteína, triptófano y metionina son aminoácidos poco frecuentes; juntos constituyen un 5% de los aminoácidos de una proteína. Cuatro aminoácidos –leucina, serina, lisina y ácido glutámico– son los más abundantes y representan el 32% de todos los restos de aminoácidos en una proteína típica. Sin embargo, la composición de aminoácidos de las proteínas puede variar ampliamente respecto de estos valores.

Para construir los ácidos nucleicos se utilizan cinco nucleótidos diferentes

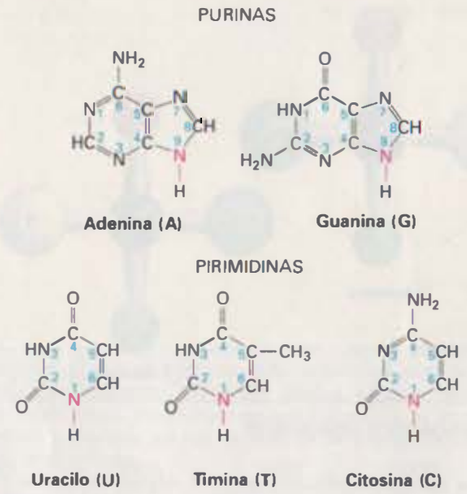
Dos tipos de ácidos nucleicos químicamente similares, el **DNA** (ácido desoxirribonucleico) y el **RNA** (ácido ribonucleico), son las principales moléculas portadoras de información de la célula. Los monómeros a partir de los cuales se construyen el DNA y el RNA se denominan nucleótidos; todos tienen una estructura común: un grupo fosfato unido por enlaces fosfoéster a una pentosa (una molécula de azúcar de cinco carbonos) que, a su vez, está conectada a una estructura en forma de anillo que contiene carbono y nitrógeno, comúnmente referida como "base" (fig. 2-14a). En el RNA, la pentosa es ribosa; en el DNA, es desoxirribosa (fig. 2-14b). Las bases adenina, guanina y citosina se encuentran tanto en el DNA como en el RNA; la timina sólo se encuentra en el DNA y el uracilo, sólo en el RNA.

Adenina y guanina son purinas, las cuales contienen un par de anillos fusionados; citosina, timina y uracilo son pirimidinas que contienen un solo anillo (fig. 2-15). Las bases suelen abreviarse A, G, C, T y U, respectivamente; estas mismas abreviaturas suelen utilizarse para denotar todos los nucleótidos en los polímeros de ácidos nucleicos. En los nucleótidos, el átomo de carbono 1' del azúcar (ribosa o desoxirribosa) se une al nitrógeno de la posición 9 de una purina (N_9) o en la posición 1 de una pirimidina (N_1). El carácter ácido de los nucleótidos se debe al grupo fosfato, el cual en condiciones intracelulares normales libera un ion hidrógeno (H^+) y deja al fosfato cargado negativamente (véase fig. 2-14a); la mayoría de los ácidos nucleicos en las células están asociados con proteínas, las cuales forman una interacción iónica con los fosfatos cargados negativamente.



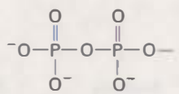
Adenosina 5'-monofosfato (AMP)

▲ Fig. 2-14. Estructura común de los nucleótidos. (a) Adenosina 5'-monofosfato (AMP), un nucleótido presente en el RNA. Por convención, los átomos de carbono del azúcar pentosa de los nucleótidos se numeran con primas. En los nucleótidos naturales, el carbono 1' se une por un enlace β a la base (en este caso adenina); tanto la base (azul) como el fosfato en el hidroxilo 5' (rojo) se ubican por encima del plano del anillo de furanosa. (b) Ribosa y desoxirribosa, las pentosas en el RNA y el DNA respectivamente.



▲ Fig. 2-15. Estructura química de las principales bases de los ácidos nucleicos. En los ácidos nucleicos y los nucleótidos, el nitrógeno 9 de las purinas y el nitrógeno 1 de las pirimidinas (rojo) están unidos al carbono 1' de la ribosa o de la desoxirribosa. U está presente sólo en el RNA y T, sólo en el DNA. Tanto el RNA como el DNA contienen A, G y C.

Las células y los líquidos extracelulares de los organismos contienen pequeñas concentraciones de nucleósidos, combinaciones de una base y un azúcar sin un fosfato. Los nucleótidos son nucleósidos que tienen uno, dos o tres grupos fosfato esterificados en el hidroxilo 5'. Los nucleósidos monofosfatos contienen un único grupo fosfato esterificado (véase fig. 2-14a), los difosfatos contienen un grupo pirofosfato:



Pirofosfato

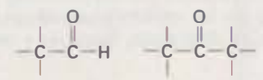
y los trifosfatos tienen un tercer fosfato. En el cuadro 2-2 se presentan los nombres de los nucleósidos y nucleótidos en los ácidos nucleicos y las distintas formas de los nucleósidos fosfatos. Como se verá en el capítulo 4, los nucleósidos trifosfatos se utilizan en la síntesis de ácidos nucleicos. Entre sus otras funciones en la célula, el GTP participa en el señalamiento intracelular y actúa como reservorio de energía, sobre todo en la síntesis de proteínas, y el ATP, analizado más adelante en este capítulo, es el portador de energía biológica más ampliamente utilizado.

CUADRO 2-2 Terminología de los nucleósidos y nucleótidos

		Bases			
		Purinas		Pirimidinas	
		Adenina (A)	Guanina (G)	Citosina (C)	Uracilo (U) Timina (T)
Nucleósidos	en RNA	Adenosina	Guanosina	Citidina	Uridina
	en DNA	Desoxiadenosina	Desoxiguanosina	Desoxicitidina	Desoxitimidina
Nucleótidos	en RNA	Adenilato	Guanilato	Citidilato	Uridilato
	en DNA	Desoxiadenilato	Desoxiguanilato	Desoxicitidilato	Desoxitimidilato
Nucleósidos monofosfatos		AMP	GMP	CMP	UMP
Nucleósidos difosfatos		ADP	GDP	CDP	UDP
Nucleósidos trifosfatos		ATP	GTP	CTP	UTP
Desoxinucleósidos mono-, di-, y trifosfatos		dAMP, etc			

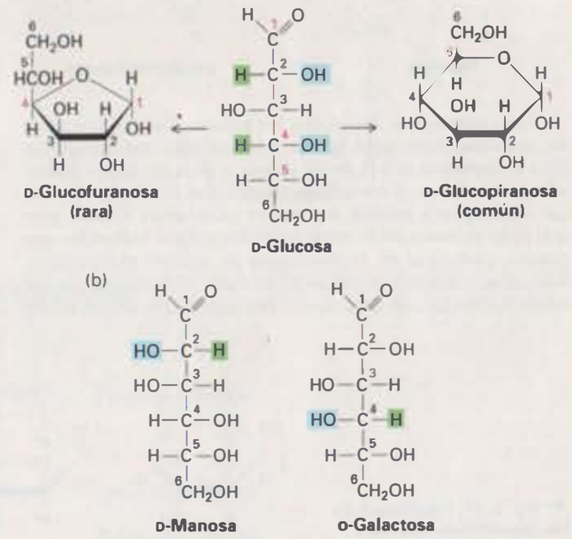
Los monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos forman polisacáridos lineales y ramificados

Los componentes químicos estructurales de los polisacáridos son los azúcares simples o monosacáridos. Los monosacáridos son carbohidratos, que literalmente son combinaciones de carbono y agua unidos covalentemente en una proporción uno a uno $(CH_2O)_n$, donde n es igual a 3, 4, 5, 6 o 7. Las hexosas ($n = 6$) y las pentosas ($n = 5$) son los monosacáridos más comunes. Todos los monosacáridos contienen grupos hidroxilo (–OH) y un grupo aldehído o cetona:



Aldehído Cetona

La D-glucosa ($C_6H_{12}O_6$) es la principal fuente externa de energía para la mayoría de las células de los organismos superiores y puede existir en tres formas diferentes: una estructura lineal y dos estructuras cíclicas hemiacetales (fig. 2-16a). Si el grupo aldehído sobre el carbono 1 reacciona con el grupo hidroxilo del carbono 5, el hemiacetal resultante, D-glucopiranosa, contiene un anillo de seis miembros. En el anómero α de la D-glucopiranosa, el grupo hidroxilo unido al carbono 1 apunta "hacia abajo" desde el anillo como se muestra en la figura 2-16a; en el anómero β, el hidroxilo apunta "hacia arriba". En las soluciones acuosas los anómeros α y β se interconvierten rápidamente en forma espontánea; en el equilibrio hay alrededor de un tercio de anómero α y dos tercios de β, con muy escasa cantidad de la forma de cadena abierta. Dado que las enzimas pueden distinguir entre los anómeros α y β de la D-glucosa, ambas formas tienen funciones biológicas diferentes. La condensación del grupo hidroxilo so-

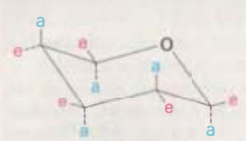


▲ Fig. 2-16. Estructuras químicas de las hexosas. Todas las hexosas tienen la misma fórmula química ($C_6H_{12}O_6$) y contienen un grupo aldehído o cetona. (a) Las formas cíclicas de D-glucosa se generan a partir de la molécula lineal por reacción del aldehído del carbono 1 con el hidroxilo de los carbonos 5 o 4. Las tres formas se interconvierten rápidamente, aunque la forma piranosa (*derecha*) predomina en los sistemas biológicos. (b) En la D-manosa y la D-galactosa, la configuración del enlace H (verde) y OH (celeste) unido a uno de los átomos de carbono difiere de la glucosa. Estos azúcares, como la glucosa, existen principalmente como piranosas.

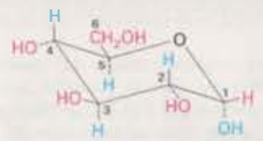
bre el carbono 4 de la glucosa lineal con su grupo aldehído da como resultado la formación de D-glucofuranosa, un hemiacetal que contiene un anillo de cinco miembros. Si bien en los sistemas biológicos existen las tres formas de D-glucosa la forma piranosa es, por mucho, la más abundante.

Muchos azúcares biológicamente importantes son azúcares de seis carbonos que están estructuralmente relacionados con la D-glucosa (fig. 2-16b). La manosa es idéntica a la glucosa, excepto que la orientación de los grupos unidos al carbono 2 es inversa. De manera similar, la galactosa, otra hexosa, difiere de la glucosa sólo en la orientación de los grupos unidos al carbono 4. La interconversión de glucosa y manosa o galactosa requiere la ruptura y formación de enlaces covalentes; tales reacciones se llevan a cabo por enzimas llamadas epimerasas.

El anillo de piranosa en la figura 2-16a es representado como planar. En realidad, debido a la geometría tetraédrica alrededor de los átomos de carbono, la conformación más estable de un anillo de piranosa es una forma no planar, similar a una silla. En esta conformación, cada enlace que va desde un carbono del anillo hasta un átomo fuera del anillo (p. ej., H u O) puede adoptar dos direcciones: casi perpendicular al anillo, referida como axial (a), o casi en el plano del anillo, referida como ecuatorial (e):

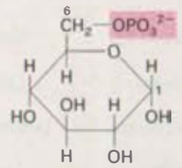


Piranosa

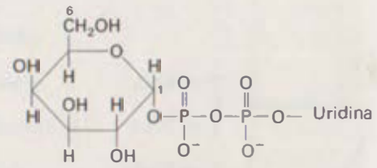


α-D-Glucopiranosa

Las enzimas que hacen que los enlaces glucosídicos unan los monosacáridos para formar polisacáridos son específicas para el anómero α o β de un azúcar y para un grupo hidroxilo particular en el otro. En principio, dos moléculas de azúcar cualesquiera pueden ser unidas en diversas formas porque cada monosacárido tiene múltiples grupos hidroxilos que pueden participar en la formación de enlaces glucosídicos. Más aún, cualquier monosacárido tiene el potencial de ser unido a más de dos monosacáridos, generando así un punto de ramificación y polímeros no lineales. Los enlaces glucosídicos suelen formarse entre un azúcar modificado covalentemente y la cadena polimérica creciente. Tales modificaciones incluyen un fosfato (p. ej., glucosa 6-fosfato) o un nucleótido (p. ej., UDP-galactosa):



Glucosa 6-fosfato

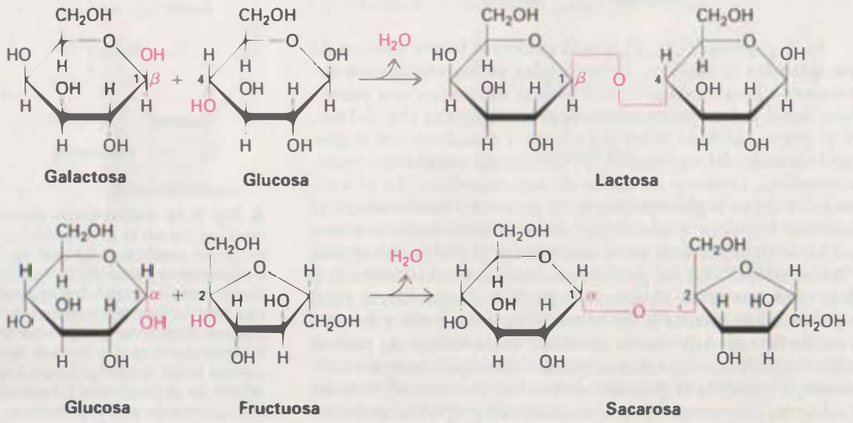


UDP-galactosa

Las enzimas epimerasas que interconvierten diferentes monosacáridos a menudo lo hacen utilizando los azúcares nucleótido más que los azúcares no sustituidos.

Los disacáridos, constituidos por dos monosacáridos, son los polisacáridos más simples. El disacárido lactosa, compuesto de galactosa y glucosa, es el principal azúcar de la leche; el disacárido sacarosa, compuesto de glucosa y fructosa, es el principal producto de la fotosíntesis vegetal y se refina para dar azúcar común de mesa (fig. 2-17).

Los polisacáridos más grandes, que contienen docenas a cientos de unidades de monosacáridos, pueden servir como reservorios de glucosa, como componentes estructurales o como adhesivos que ayudan a mantener unidas las células en los tejidos. El carbohidrato de reserva más común en las células animales es el glucógeno, un polímero de la glucosa muy largo y altamente ramificado. Hasta el 10% del peso del hígado puede ser glucógeno. El principal carbohidrato de reserva en las células vegetales es el almidón, también un polímero de la glucosa. Aparece en una forma no ramificada (amilosa) y una forma levemente ramificada (amilopectina). Tanto el glucógeno como el almidón están compuestos por el anómero α de la glucosa. Por el contrario, la celulosa, el principal constituyente de las paredes celulares de las plantas, es un polímero no ramificado del anómero β de la glucosa. Las enzimas digestivas humanas pueden hidrolizar los enlaces glucosídicos α, pero no los enlaces glucosídicos β de la celulosa. Muchas especies de plantas, bacterias y mohos producen



▶ **Fig. 2-17. Formación de los disacáridos lactosa y sacarosa.** En cualquier unión glucosídica, el carbono anomérico de una molécula de azúcar (en la conformación α o en la β) está unido al oxígeno de un hidroxilo de otra molécula de azúcar. Los enlaces son nombrados en concordancia: así, la lactosa contiene un enlace β (1 → 4) y la sacarosa contiene un enlace α (1 → 2).

enzimas capaces de degradar la celulosa. Las vacas y las termitas pueden descomponer la celulosa porque en su intestino albergan bacterias capaces de degradarla.

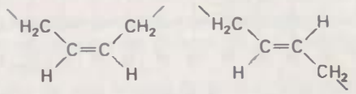
Muchos polisacáridos complejos contienen azúcares modificados que están unidos en forma covalente a varios grupos pequeños, particularmente amino, sulfato y acetilo. Tales modificaciones son abundantes en los glucosaminoglucanos, los componentes polisacáridos principales de la matriz extracelular que describimos en el capítulo 6.

Los ácidos grasos son precursores de muchos lípidos celulares

Antes de considerar los fosfolípidos y sus funciones en la estructura de las biomembranas, analizaremos brevemente las propiedades de los ácidos grasos. Al igual que la glucosa, los ácidos grasos son una fuente de energía importante para muchas células y son almacenados en forma de triacilgliceroles dentro del tejido adiposo (cap. 8). Los ácidos grasos también son precursores de los fosfolípidos y muchos otros lípidos con diversas funciones (cap. 18).

Los ácidos grasos están constituidos por una cadena hidrocarbonada unida a un grupo carboxilo (—COOH). Difieren en longitud, aunque los ácidos grasos predominantes en las células tienen un número par de átomos de carbono, generalmente 14, 16, 18 o 20. Los principales ácidos grasos en los fosfolípidos se indican en el cuadro 2–3. Los ácidos grasos a menudo son designados por la abreviatura Cx:y, donde "x" es el número de carbonos en la cadena e "y" es el número de enlaces dobles. Los ácidos grasos que contienen 12 o más átomos de carbono son casi insolubles en soluciones acuosas debido a sus largas cadenas hidrófobas de hidrocarburos.

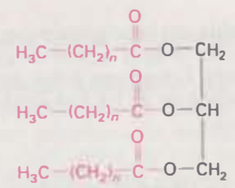
Los ácidos grasos sin dobles enlaces carbono-carbono se denominan saturados; aquellos con al menos un doble enlace son insaturados. Los ácidos grasos insaturados con más de un doble enlace carbono-carbono se denominan poliinsaturados. Dos ácidos grasos poliinsaturados "esenciales", el ácido linoleico (C18:2) y el ácido linolénico (C18:3), no pueden ser sintetizados por los mamíferos y deben ser suministrados en la dieta. Los mamíferos pueden sintetizar otros ácidos grasos comunes. Son posibles dos configuraciones estereoisoméricas, cis y trans, alrededor de cada doble enlace carbono-carbono:



Cis **Trans**

Un doble enlace cis introduce una angulación rígida en la cadena recta de un ácido graso que de no ser por ello sería flexible (fig. 2-18). En general, los ácidos grasos en los sistemas biológicos contienen sólo dobles enlaces cis.

Los ácidos grasos pueden unirse en forma covalente a otra molécula por un tipo de reacción de deshidratación llamada esterificación, en la cual se pierde el OH del grupo carboxilo del ácido graso y un H del grupo hidroxilo de la otra molécula. En la molécula combinada formada por esta reacción, la porción derivada del ácido graso se denomina *grupo* acilo, o *grupo acilo graso*. Esto se ilustra en los triacilgliceroles, que contienen tres grupos acilo esterificados con glicerol:

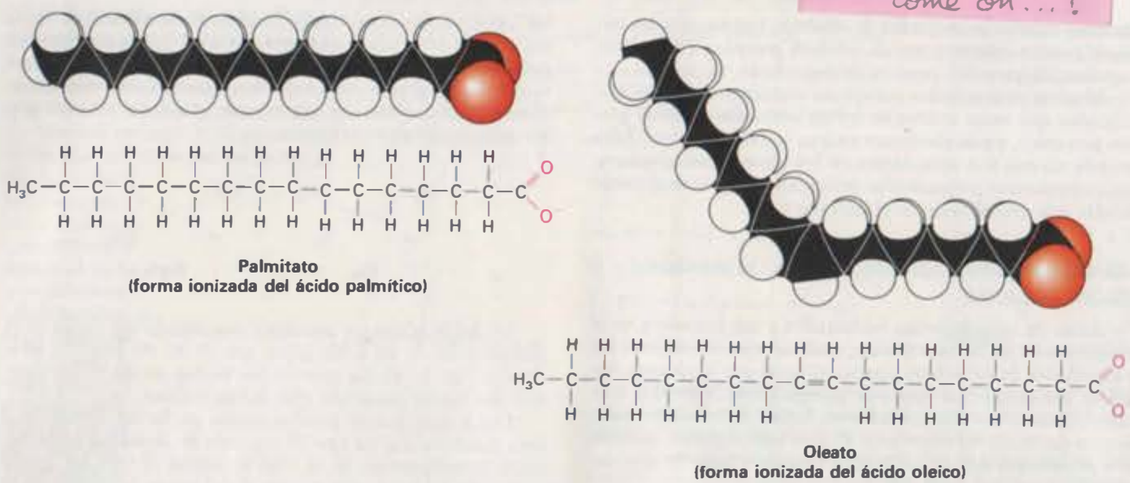


Triacilglicerol

CUADRO 2-3 Ácidos grasos que predominan en los fosfolípidos

Nombre común del ácido (Forma ionizada entre paréntesis)	Abreviatura	Fórmula química
ÁCIDOS GRASOS SATURADOS		
Mirístico (miristato)	C14:0	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$
Palmítico (palmitato)	C16:0	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$
Esteárico (esterato)	C18:0	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$
ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS		
Oleico (oleato)	C18:1	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$
Linoleico (linoleato)	C18:2	$CH_3(CH_2)_4CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7COOH$
Araquidónico (araquidonato)	C20:4	$CH_3(CH_2)_4(CH=CHCH_2)_3CH=CH(CH_2)_3COOH$

en H2O!? PL en bicapas fosfolípidocar!??!! laminares! come on...!



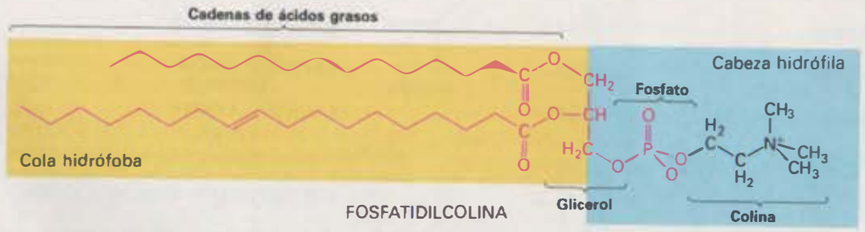
▲ Fig. 2-18. Efecto de un enlace doble en la forma de los ácidos grasos. Se muestran los modelos espaciales y las estructuras químicas de las formas ionizadas del ácido palmítico, un ácido graso saturado con 16 átomos de C, y del ácido oleico, un ácido graso insaturado con 18 átomos de C. En los ácidos grasos saturados, la cadena hidrocarbonada a menudo es lineal; el doble enlace cis en el oleato crea una angulación rígida en la cadena hidrocarbonada. (L. Stryer, 1994, *Biochemestry*, 4th ed., W. H. Freeman and Company, p. 265).

Si los grupos acilo son lo suficientemente largos, estas moléculas son insolubles en agua a pesar de que contengan tres enlaces éster polares. Los grupos acilos grasos también forman la porción hidrófoba de los fosfolípidos, que analizaremos a continuación.

Los fosfolípidos se asocian en forma no covalente para constituir la bicapa, la estructura básica de las biomembranas

Las biomembranas son largas láminas altamente flexibles que sirven como límites de la célula y de sus orgánulos intracelulares, y forman la superficie exterior de algunos virus. Las membranas definen qué es una célula (la membrana exterior y el contenido dentro de la membrana) y qué no lo es (el espacio extracelular fuera de la membrana). A diferencia de las proteínas, los ácidos nucleicos y los polisacáridos, las membranas son ensambladas mediante asociación *no covalente* de sus componentes estructurales. Los componentes extracelulares primarios de todas las biomembranas son los fosfolípidos, cuyas propiedades físicas son las responsables de la formación de la estructura laminar de las membranas.

Los fosfolípidos están constituidos por dos largas cadenas de grupos acilo grasos no polares unidas (casi siempre a través de un enlace éster) a pequeños grupos altamente polares, incluido un fosfato. En los fosfoglicéridos, la principal clase de fosfolípidos, las cadenas laterales de acilos grasos están esterificadas con dos de los tres grupos hidroxilo del glicerol. El tercer grupo hidroxilo está esterificado con fosfato. El fosfolípido más simple, el ácido fosfatídico, contiene sólo estos componentes. En la mayoría de los fosfolípidos encontrados en las membranas, el grupo fosfato está esterificado con un grupo hidroxilo de otro compuesto hidrófilo. En la fosfatidilcolina, por ejemplo, la colina está unida al fosfato (fig. 2-19). La carga negativa en el fosfato, así como los grupos cargados o polares esterificados con él, pueden interactuar fuertemente con el agua. El fosfato y su grupo esterificado asociado, la "cabeza" de un fosfolípido, es hidrófila, mientras que las cadenas de acilos grasos, las "colas", son hidrófobas.



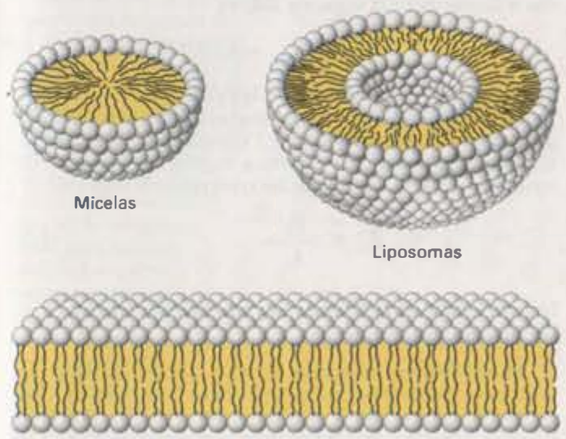
▲ Fig. 2-19. Fosfatidilcolina, un fosfoglicérido típico. Todos los fosfoglicéridos son anfipáticos, tienen una cola hidrófoba (amarillo) y una cabeza hidrófila (azul) en la cual el glicerol se une a través de un grupo fosfato a un alcohol. Una o ambas cadenas laterales de ácidos grasos en un fosfoglicérido pueden ser saturadas o insaturadas. En el ácido fosfatídico (rojo), el fosfolípido más simple, el fosfato no está unido a un alcohol.

enlace iónico seeee...

La naturaleza anfipática de los fosfolípidos, que gobierna sus interacciones, es crítica para la estructura de las biomembranas. Cuando una suspensión de fosfolípidos se dispersa mecánicamente en soluciones acuosas, los fosfolípidos se agregan en una de tres posibles formas: micelas y liposomas esféricos y bicapas fosfolipídicas laminares de dos moléculas de espesor (fig. 2-20). El tipo de estructura formada por un fosfolípido puro o una mezcla de fosfolípidos depende de varios factores, incluidos la longitud de las cadenas de acilos grasos, su grado de saturación y la temperatura. En las tres estructuras, el efecto hidrófobo hace que las cadenas de acilos grasos se agrupen y excluyan a las moléculas de agua del "núcleo". Rara vez se forman micelas a partir de fosfoglicéridos naturales, cuyas cadenas de acilos grasos suelen ser demasiado voluminosas para caber en el interior de una micela. Si se remueve mediante hidrólisis una de las dos cadenas de ácidos grasos con formación de un lisofosfolípido, el tipo predominante de agregados que se producen son micelas. Los detergentes y jabones comunes forman micelas en soluciones acuosas que se comportan como bolas de rodamiento minúsculas, dando así a las soluciones jabonosas su sensación resbaladiza y sus propiedades lubricantes.

En condiciones adecuadas, los fosfolípidos de la misma composición que la presente en las células forman espontáneamente bicapas fosfolípidas simétricas. Cada capa fosfolípida en esta estructura laminar se denomina hojuela. Las cadenas de acilos grasos en cada hojuela minimizan el contacto con el agua al alinearse estrechamente entre sí en el centro de la bicapa, para formar un núcleo hidrófobo de unos 3 nm de espesor (véase fig. 2-20). El estrecho agrupamiento de estas cadenas no polares se estabiliza mediante el efecto hidrófobo y las interacciones de van der Waals entre ellas. Los enlaces iónicos y de hidrógeno estabilizan la interacción de las cabezas polares de los fosfolípidos entre sí y con el agua.

El tamaño de una bicapa de fosfolípidos puede ser casi ilimitado –desde micrómetros (μm) hasta milímetros (mm) de longitud o ancho– y puede contener decenas de millones de moléculas de fosfolípidos. Debido a su núcleo hidrófobo, las bicapas son virtualmente impermeables a las sales, a los azúcares y a la mayoría de las demás moléculas hidrófilas pequeñas. La bicapa de fosfolípidos es la unidad estructural básica de casi todas las membranas biológicas; así, aunque contienen otras moléculas (p. ej., colesterol, glucolípidos, proteínas), las biomembranas tienen un núcleo hidrófobo que separa dos soluciones acuosas y actúa como una barrera de permeabilidad. En el capítulo 5 se describe la organización estructural de las biomembranas y las propiedades generales de las proteínas de membrana.



▲ Fig. 2-20. Cortes transversales de las tres estructuras formadas por los fosfolípidos en soluciones acuosas. Las esferas blancas representan las cabezas hidrófobas de los fosfolípidos y las líneas onduladas (en las regiones amarillas) representan las colas hidrófobas. Se muestra una micela esférica con un interior hidrófobo compuesto en su totalidad de cadenas acilos grasas; un liposoma esférico, que tiene dos capas fosfolipídicas y un centro acuoso; y una lámina de fosfolípidos de dos moléculas de espesor, o bicapa, la unidad estructural básica de las biomembranas.

R hidrófilos se dirigen a la superficie

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 2.2

Las unidades estructurales químicas de las células

- Los tres principales biopolímeros que se encuentran en las células son: las proteínas, constituidas por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos; los ácidos nucleicos, constituidos por nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster y los polisacáridos, constituidos por monosacáridos (azúcares) unidos por enlaces glucosídicos (véase fig. 2-11).
- Muchas moléculas en las células contienen al menos un átomo de carbono asimétrico, el cual está unido a cuatro átomos distintos. Tales moléculas pueden existir como isómeros ópticos (imágenes especulares), designadas D y L, con actividades biológicas diferentes. En los sistemas biológicos, casi todos los azúcares son isómeros D, mientras que casi todos los aminoácidos son isómeros L.
- Las propiedades químicas y estructurales de las proteínas están determinadas por las diferencias en el tamaño, forma, carga, hidrofobicidad y reactividad de las cadenas laterales de los aminoácidos (véase fig. 2-13).
- Los aminoácidos con cadenas laterales hidrófobas tienden a agruparse en el interior de las proteínas fuera del ambiente acuoso que las rodea; aquellos con cadenas laterales hidrófobas suelen dirigirse a la superficie.
- Las bases de los nucleótidos que componen el DNA y el RNA son anillos heterocíclicos unidos a un azúcar pentosa. Forman dos grupos: las purinas –adenina (A) y guanina (G)– y las pirimidinas –citosina (C), timina (T) y uracilo (U) (véase fig. 2-15). A, G, T y C se encuentran en el DNA y A, G, U y C, en el RNA.
- La glucosa y otras hexosas pueden existir en tres formas: una estructura lineal de cadena abierta, un anillo (piranosa) de seis miembros y un anillo (furanosa) de cinco miembros

(véase fig. 2-16). En los sistemas biológicos, predomina la forma piranosa de la D-glucosa.

- Los enlaces glucosídicos se forman entre cualquiera de los anómeros α o β de un azúcar y un grupo hidroxilo del otro azúcar, dando como resultado la formación de disacáridos y otros polisacáridos (véase fig. 2-17).
- La larga cadena hidrocarbonada de un ácido graso puede no contener dobles enlaces (saturados) o contener uno o más dobles enlaces (insaturados) que arquean la cadena.
- Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas con una cola hidrófoba (a menudo dos cadenas de acilos grasos) y una cabeza hidrófila (véase fig. 2-19).
- En solución acuosa, el efecto hidrófobo y las interacciones de van der Waals organizan y estabilizan los fosfolípidos en una de las tres estructuras: micela, liposomas o bicapa laminar (véase fig. 2-20).
- En una bicapa fosfolipídica, que constituye la estructura básica de todas las biomembranas, las cadenas de acilos grasos en cada hojuela se orientan unas con otras y forman un núcleo hidrófobo, y las cabezas polares se alinean en ambas superficies e interactúan directamente con la solución acuosa.

2.3 Equilibrio químico

Ahora se analizarán las reacciones químicas en las cuales se rompen los enlaces, sobre todo los enlaces covalentes de reactivos químicos, y se forman nuevos enlaces para generar productos de reacción. En cualquier momento ocurren, al mismo tiempo, varios cientos de clases de reacciones químicas en cada célula y, en principio, muchos compuestos químicos pueden sufrir múltiples reacciones químicas. Tanto el *grado* en el cual las reacciones pueden proceder como la *velocidad* a la que pueden ocurrir determinan la composición química de las células.

Cuando los reactivos se mezclan por primera vez –antes de que cualquier producto se haya formado– la velocidad de reacción está determinada en parte por las concentraciones iniciales. A medida que los productos de reacción se acumulan, la concentración de cada reactivo disminuye, al igual que la velocidad de reacción. Mientras tanto, algunas de las moléculas de producto comienzan a participar en la reacción inversa, la cual vuelve a formar los reactivos (reversibilidad microscópica). Esta reacción, lenta al principio, se acelera a medida que aumenta la concentración de producto. En un momento determinado, las velocidades de reacción directa e inversa se igualan, por lo que la concentración de reactivos y productos deja de cambiar. Se dice entonces que el sistema está en **equilibrio químico**.

En el equilibrio la relación entre productos y reactivos, llamada **constante de equilibrio**, es un valor fijado independiente de la velocidad a la cual ocurre la reacción. La velocidad de una reacción química puede ser incrementada por un catalizador, que acerca los reactivos unos con otros y acelera sus interacciones, pero no sufre modificaciones permanentes durante la reacción. En esta sección analizamos varios aspectos del equilibrio químico; en la sección siguiente, examinaremos los cambios de energía durante las reacciones y su relación con el equilibrio.

Las constantes de equilibrio reflejan el grado de una reacción química

La constante de equilibrio K_{eq} depende de la naturaleza de los reactivos y de los productos, de la temperatura y de la presión (particularmente en las reacciones que implican gases). En condiciones físicas estándares (25 °C y 1 atm de presión, para los sistemas biológicos), la K_{eq} siempre es la misma para una reacción dada, tanto si el catalizador está presente o no.

Para la reacción general

$$aA + bB + cC + \cdots \rightleftharpoons zZ + yY + xX + \cdots \qquad (2\text{-}1)$$

donde las letras mayúsculas representan moléculas o átomos particulares y las letras minúsculas representan el número de cada uno en la fórmula de reacción, la constante de equilibrio está dada por

$$K_{eq} = \frac{[X]^x [Y]^y [Z]^z}{[A]^a [B]^b [C]^c} \qquad (2\text{-}2)$$

donde los corchetes denotan las concentraciones de las moléculas. La velocidad de la reacción directa (de izquierda a derecha en la ecuación 2-1) es

$$\text{Velocidad}_{\text{directa}} = k_d [A]^a [B]^b [C]^c$$

donde k_d es la constante de velocidad para la reacción directa. Similarmente, la velocidad de la reacción inversa (de derecha a izquierda en la ecuación 2-1) es

$$\text{Velocidad}_{\text{inversa}} = k_i [X]^x [Y]^y [Z]^z$$

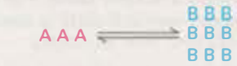
donde k_i es la constante de velocidad para la reacción inversa. En el equilibrio las velocidades directas e inversas son iguales, de manera tal que $\text{Velocidad}_{\text{directa}} / \text{Velocidad}_{\text{inversa}} = 1$. Reorganizando estas ecuaciones podemos expresar la constante de equilibrio como la relación de las constantes de velocidad

$$K_{eq} = \frac{k_d}{k_i} \qquad (2\text{-}3)$$

Las reacciones químicas en las células están en estado estacionario

En condiciones adecuadas y con el tiempo suficiente, las reacciones bioquímicas individuales llevadas a cabo en tubos de ensayos alcanzarán el equilibrio. Sin embargo, dentro de las células muchas reacciones están conectadas en vías en las cuales el producto de una reacción sirve como un reactante en otra o es sacado afuera de la célula. En esta situación más compleja, cuando la velocidad de formación de una sustancia es igual a la velocidad de su consumo, la concentración de la sustancia permanece constante, y el sistema de reacciones relacionadas para producir y consumir esa sustancia se dice que está en estado estacionario (fig. 2-21). Una consecuencia de tales reacciones conectadas es que éstas previenen la acumulación de exceso de intermediarios, protegiendo a las células de sus efectos nocivos que tienen el potencial de ser tóxicos en altas concentraciones.

(a) Concentraciones en equilibrio en un tubo de ensayo



(b) Concentraciones intracelulares en estado estacionario



▲ Fig. 2-21. Comparación de reacciones en equilibrio y en estado estacionario. (a) En el tubo de ensayo, una reacción bioquímica (A → B) alcanzará finalmente el equilibrio en el cual las velocidades de reacción directa e inversa son iguales (como lo indican las flechas de reacción de igual longitud). (b) En las vías metabólicas dentro de las células, el producto B comúnmente podría ser consumido, en este ejemplo por conversión en C. Una vía de reacciones conectadas es un estado estacionario cuando la velocidad de formación del intermediario (p. ej., B) es igual a la velocidad de su consumo. Como lo indican las longitudes desiguales de las flechas, las reacciones individuales reversibles que constituyen una vía metabólica no alcanzan el equilibrio. Más aún, las concentraciones de los intermediarios en el estado estacionario difieren de lo que éstas serían en el equilibrio.

Las constantes de disociación para reacciones de unión reflejan la afinidad de las moléculas que interaccionan

El concepto de equilibrio químico también se aplica para la unión de una molécula a otra. Muchos procesos celulares importantes dependen de tales "reacciones" de unión, las cuales implican la formación y escisión de varias interacciones no covalentes más que de los enlaces covalentes recién analizados. Un ejemplo común es la unión de un ligando (p. ej., las hormonas insulina o adrenalina) a su receptor sobre la superficie de una célula, lo que desencadena una respuesta biológica. Otro ejemplo es la unión de una proteína a una secuencia específica de pares de bases en una molécula de DNA, lo que suele producir la activación o desactivación de la expresión de un gen cercano (cap. 11). Si la constante de equilibrio para una reacción es conocida, se puede predecir la estabilidad estructural del complejo resultante. Para ilustrar la forma general de determinar la concentración de complejos asociados no covalentemente, calcularemos el grado de unión de una proteína al DNA en una célula.

Generalmente, las reacciones de unión se describen en términos de la constante de disociación K_D, la cual es la recíproca de la constante de equilibrio. Para la reacción de unión $P + D \rightleftharpoons PD$, donde PD es el complejo específico de una proteína (P) y el DNA (D), la constante de disociación está dada por

$$K_D = \frac{[P]\,[D]}{[PD]} \qquad (2\text{-}4)$$

Las reacciones típicas en las cuales una proteína se une a una secuencia específica de DNA tienen una K_D de 10^{-10} M, donde M simboliza la molaridad o moles por litro (mol/L). Para relacionar la magnitud de esta constante de disociación con la relación intracelular de DNA unido con no unido, consideraremos el ejemplo simple de una célula bacteriana que tiene un volumen de $1{,}5 \times 10^{-15}$ L y contiene *1 molécula* de DNA y *10 moléculas* de la proteína P de unión al DNA. En este caso, dada una K_D de 10^{-10} M, el 99% del tiempo esta secuencia específica de DNA tendrá una molécula de proteína unida, y el 1% del tiempo estará libre, aun cuando la célula contiene sólo *10 moléculas* de proteína. Claramente, P y D se unen muy fuerte (tienen una alta afinidad), como se refleja por el valor bajo de la constante de disociación para su reacción de unión.

El gran tamaño de las macromoléculas biológicas, como las proteínas, puede resultar en la disponibilidad de múltiples superficies para interacciones intermoleculares complementarias. Como una consecuencia, muchas macromoléculas tienen la capacidad de unir otras múltiples moléculas de manera simultánea. En algunos casos, estas reacciones son independientes, con sus propios valores distintivos de K_D que son constantes. En otros casos, la unión de una molécula a un sitio sobre una macromolécula puede cambiar la forma tridimensional de un sitio distante, alterando de esta manera las interacciones de unión en ese sitio distante. Éste es un mecanismo importante por el cual una molécula puede alterar (regular) la actividad de una segunda molécula (p. ej., una proteína) cambiando su capacidad de interaccionar con una tercera molécula. Analizaremos este mecanismo regulatorio con más detalle en el capítulo 3.

Los líquidos biológicos tienen valores de pH característicos

El solvente en el interior de las células y en todos los líquidos extracelulares es el agua. Una característica importante de cualquier solución acuosa es la concentración de iones hidrógeno cargados positivamente (H^+) y de iones hidroxilo cargados negativamente (OH^-). Dado que estos iones son los productos de disociación del H_2O, forman parte de todos los sistemas vivos y son liberados por muchas reacciones que tienen lugar entre las moléculas orgánicas dentro de las células.

Cuando una molécula de agua se disocia, se rompe uno de los enlaces polares H—O. El ion hidrógeno resultante, a menudo denominado protón, tiene una vida media corta como partícula libre y se combina rápidamente con una molécula de agua para formar un ion hidronio (H_3O^+). No obstante, la concentración de iones hidrógeno en una solución se expresa por conveniencia $[H^+]$, aun cuando en realidad representa la concentración de iones hidronio $[H_3O^+]$. La disociación del agua es una reacción reversible,

$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$$

A 25°C, $[H^+]\,[OH^-] = 10^{-14}$ M², de manera tal que en agua pura, $[H^+] = [OH^-] = 10^{-7}$ M.

Por convención, la concentración de iones hidrógeno en una solución se expresa como su **pH**, definido como el logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno. El pH del agua pura a 25 °C es 7:

$$\text{pH} = -\log[H^+] = \log \frac{1}{[H^+]} = \log \frac{1}{10^{-7}} = 7$$

Es importante tener en cuenta que una diferencia de 1 unidad en el pH representa una diferencia de diez veces en la

concentración de protones. En la escala de pH, 7 se considera neutro: los valores de pH inferiores a 7 indican soluciones ácidas (alta $[H^+]$) y los valores superiores a 7 indican soluciones básicas (alcalinas). Por ejemplo, el jugo gástrico, rico en ácido clorhídrico (HCl), tiene un pH cercano a 1. Su $[H^+]$ es alrededor de un millón de veces mayor que la del citoplasma, cuyo pH es cercano a 7.

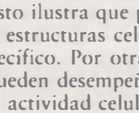
Aunque el citosol de las células suele tener un pH de alrededor de 7,2, en el interior de los lisosomas, un tipo de orgánulo de las células eucariontes, el pH es mucho más bajo (cerca de 4,5). Los lisosomas contienen muchas enzimas degradativas que funcionan óptimamente en un medio ácido, mientras su acción está inhibida en el medio casi neutro del citoplasma. Esto ilustra que para el funcionamiento adecuado de algunas estructuras celulares es indispensable mantener un pH específico. Por otra parte, cambios notables del pH celular pueden desempeñar un papel importante en el control de la actividad celular. Por ejemplo, el pH del citoplasma de un huevo no fertilizado de erizo de mar es de 6,6. Sin embargo, dentro del minuto posterior a la fecundación, el pH se eleva a 7,2; es decir, la concentración de H^+ disminuye hasta casi un cuarto del valor original, un cambio necesario para el desarrollo y la división subsiguientes del huevo.

Los ácidos liberan iones hidrógeno y las bases los captan

En general, un ácido es cualquier molécula, ion o grupo químico que tiende a liberar un ion hidógeno (H^+), como el ácido clorhídrico (HCl) y el grupo carboxilo (—COOH), el cual tiende a disociarse para formar un ion carboxilato cargado negativamente (—COO^-). De manera similar, una base es cualquier molécula, ion o grupo químico que rápidamente se combina con un H^+, como el ion hidroxilo (OH^-), el amoníaco (NH_3), el cual forma el ion amonio (NH_4^+) y el grupo amino (—NH_2).

Cuando se agrega un ácido a una solución acuosa, aumenta la $[H^+]$ (disminuye el pH). A la inversa, cuando se agrega una base a una solución, disminuye la $[H^+]$ (aumenta el pH). Debido a que $[H^+] \times [OH^-] = 10^{-14}\ M^2$, todo incremento de $[H^+]$ se acompañado por una disminución en $[OH^-]$ y viceversa.

Muchas moléculas biológicas contienen ambos grupos, ácidos y básicos. Por ejemplo, en soluciones neutras (pH = 7,0), los aminoácidos existen predominantemente en la forma doble ionizada en la cual el grupo carboxilo ha perdido un protón y el grupo amino ha aceptado uno:



donde R representa la cadena lateral. Esta molécula, que contiene igual número de iones positivos y negativos, se denomina ion dipolar (*zwitterion*, del alemán ion híbrido). Los iones dipolares no tienen carga neta, son neutros. A valores extremos de pH, sólo uno de estos dos grupos en un aminoácido estará cargado.

La reacción de disociación para un ácido (o el grupo ácido en una molécula grande) HA se puede escribir como $HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$. La constante de equilibrio para esta reacción, K_a (*a* por "ácido"), se define como $K_a = [H^+][A^-]/[HA]$. Si se aplica el logaritmo a ambos lados y se reorganiza, el resultado es una relación muy útil entre la constante de equilibrio y el pH:

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \qquad (2\text{-}5)$$

donde pK_a es igual a $-\log K_a$.

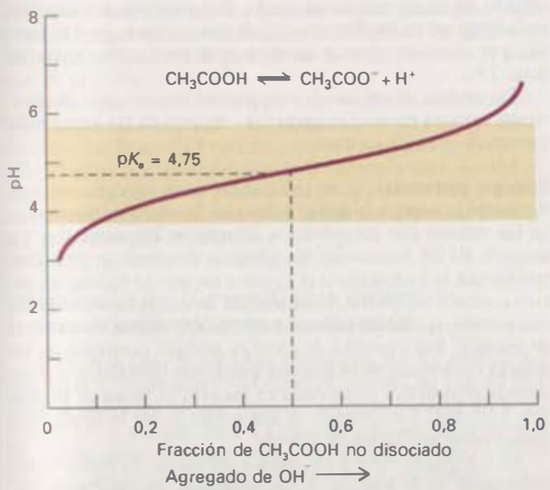
A partir de esta expresión, denominada ecuación de Henderson-Hasselbalch, se observa que el pK_a de cualquier ácido es igual al pH al cual la mitad de las moléculas están disociadas y la mitad están neutras (no disociadas). Esto es así porque cuando pK_a = pH, el log ($[A^-]/[HA]$) = 0, y por lo tanto $[A^-] = [HA]$. La ecuación de Henderson-Hasselbalch permite calcular el grado de disociación de un ácido si se conocen tanto el pH de la solución como el pK_a del ácido. Experimentalmente, midiendo las concentraciones de $[A^-]$ y de $[HA]$ como funciones del pH de la solución, es posible calcular el pK_a del ácido y por lo tanto la constante de equilibrio K_a para la reacción de disociación.

Los amortiguadores (buffers) mantienen el pH de los líquidos intracelulares y extracelulares

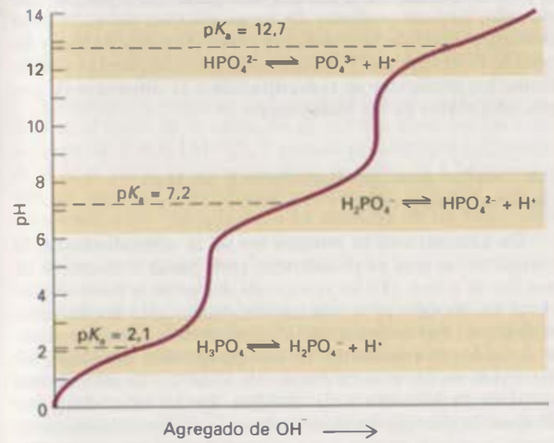
Una célula en crecimiento debe mantener en el citoplasma un pH constante cercano a 7,2-7,4, a pesar de la producción metabólica de numerosos ácidos, como el ácido láctico y el dióxido de carbono, que reacciona con agua para formar ácido carbónico (H_2CO_3). Las células tienen un reservorio de bases y ácidos débiles, denominados buffers, que aseguran que el pH celular se mantenga relativamente constante a pesar de las pequeñas fluctuaciones en las cantidades de H^+ o OH^- generadas por el metabolismo o por incorporación o secreción de moléculas y iones por parte de la célula. Los buffers hacen esto "absorbiendo" los H^+ o los OH^- en exceso cuando estos iones se agregan a la célula o son producidos por metabolismo.

Si se agrega ácido (o base) a una solución que contiene un buffer en su valor de pK_a (una mezcla 1:1 de HA y A^-), varía el pH de la solución, pero en menor grado que si no hubiera estado presente el buffer. Esto es así porque los protones liberados por el ácido agregado son captados por la forma (A^-) original del ácido; de modo similar, iones hidroxilo generados por la base agregada son neutralizados por protones liberados por el buffer no disociado (HA). La capacidad de una sustancia para liberar iones hidrógeno o captarlos depende, en parte, del grado con el cual la sustancia ya ha captado o liberado protones, lo que a su vez depende del pH de la solución. La capacidad de un buffer de disminuir al mínimo los cambios en el pH, o capacidad amortiguadora, depende de la relación entre los valores de pK_a y el pH, lo cual es expresado por la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

La curva de titulación del ácido acético, que se muestra en la figura 2-22, ilustra el efecto del pH sobre la fracción de moléculas en las formas ionizadas (A^-) y no ionizadas (HA). En una unidad de pH por debajo del pK_a de un ácido, el 91% de las moléculas está en la forma HA; en una unidad de pH por encima del pK_a, el 91% se encuentra en la forma A^-. En valores de pH de más de una unidad por encima o por debajo del pK_a, la capacidad amortiguadora de los ácidos y bases débiles declina con rapidez. En otras palabras, el agregado de la misma cantidad de moles del ácido a una solución que contiene una mezcla de HA y A^- que se encuentra a un pH cercano al pK_a, causará una variación de pH menor que si no estuvieran presentes HA y A^-, o si el pH estuviera más alejado del valor de pK_a.



▲ Fig. 2-22. Curva de titulación del ácido acético (CH_3COOH). El pK_a de disociación del ácido acético a iones hidrógenos y acetato es de 4,75. A este pH la mitad de las moléculas de ácido están disociadas. Dado que el pH se mide en una escala logarítmica, la solución varía del 91% de CH_3COOH a pH 3,75 al 9% de CH_3COOH a pH 5,75. El ácido tiene máxima capacidad amortiguadora en este rango de pH.



▲ Fig. 2-23. Curva de titulación del ácido fosfórico (H_3PO_4). Esta molécula biológica muy ubicua posee tres átomos de hidrógeno que se disocian a diferentes valores de pH; en consecuencia, el ácido fosfórico tiene tres valores de pK*a*, como se observa en el gráfico. Las zonas sombreadas denotan los rangos de pH -dentro de una unidad de pH de los tres valores de pK_a– donde la capacidad amortiguadora del ácido fosfórico es máxima. En estas regiones el agregado de ácido (o base) producirá cambios mínimos en el pH.

Todos los sistemas biológicos contienen uno o más buffers. Los iones fosfatos, las formas ionizadas del ácido fosfórico, están presentes en cantidades considerables en las células y son un factor importante en el mantenimiento o la amortiguación del pH del citoplasma. El ácido fosfórico (H_3PO_4) tiene tres protones capaces de disociarse, pero no lo hacen simultáneamente. La pérdida de cada protón puede describirse como una reacción diferenciada de disociación, con un pK_a como se observa en la figura 2-23. La curva de titulación para el ácido fosfórico muestra que el pK_a para la disociación del segundo protón es 7,2. Por lo tanto en el pH 7,2, cerca del 50% del fosfato celular es $H_2PO_4^-$ y cerca del 50% es HPO_4^{2-} de acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbalch. Por esta razón, el fosfato es un excelente buffer para valores cercanos a 7,2, aproximado al pH del citoplasma de las células y al pH 7,4, el de la sangre humana.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 2.3

Equilibrio químico

- Una reacción química está en equilibrio cuando la velocidad de la reacción directa es igual a la velocidad de la reacción inversa (sin cambios netos en la concentración de los reactivos o productos).
- La constante de equilibrio K_{eq} de una reacción refleja la relación entre productos y reactivos en el equilibrio, por lo que es una medida del grado de la reacción y de las estabilidades relativas de los reactivos y productos.
- La K_{eq} depende de la temperatura, la presión y las propiedades químicas de los reactivos y productos, pero es independiente de la velocidad de reacción y de las concentraciones iniciales de los reactivos y productos.
- Para cualquier reacción, la constante de equilibrio K_{eq} es igual a la relación entre la constante de velocidad directa y la constante de velocidad inversa (k_d/k_i).
- Dentro de las células, las reacciones conectadas en las vías metabólicas suelen encontrarse en estado estacionario, no de equilibrio, en el cual la velocidad de formación de los intermediarios es igual a su velocidad de consumo (véase fig. 2-21).
- La constante de disociación K_d para una reacción que involucra la unión no covalente de dos moléculas es una medida de la estabilidad del complejo formado entre las moléculas (p. ej., complejos ligando-receptor o proteína-DNA).
- El pH es el logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno (-log $[H^+]$). Normalmente el pH del citoplasma se encuentra entre 7,2-7,4, mientras que el interior de los lisosomas tiene un pH cercano a 4,5.

- Los ácidos liberan protones (H^+) y las bases los captan. En las moléculas biológicas, el grupo carboxilo y el grupo fosfato son los grupos ácidos más comunes; el grupo amino es el grupo básico más común.

- Los amortiguadores (buffers) son mezclas de un ácido débil (HA) y su correspondiente forma básica (A^-), los cuales minimizan el cambio en el pH de una solución cuando se adiciona ácido o base. Los sistemas biológicos utilizan distintos amortiguadores para mantener su pH dentro de un rango muy estrecho.

2.4 Energética bioquímica

La producción de energía, su almacenamiento y su utilización son fundamentales para la economía de la célula. La energía puede definirse como la capacidad para realizar trabajo, un concepto que se aplica a los motores de automóviles y a las plantas generadoras de electricidad en nuestro mundo físico y a los motores celulares en el mundo biológico. La energía asociada con los enlaces químicos puede ser utilizada para sustentar el trabajo químico y los movimientos de las células.

Para los sistemas biológicos son importantes varias formas de energía

Hay dos formas principales de energía: cinética y potencial. La energía cinética es la energía del movimiento; por ejemplo, el movimiento de las moléculas. La segunda forma de energía, la energía potencial, o energía almacenada, es particularmente importante en el estudio de los sistemas biológicos o químicos.

Energía cinética. El calor, o energía térmica, es una forma de energía cinética: la energía del movimiento de las moléculas. Para que el calor realice trabajo debe fluir desde una región de mayor temperatura --donde la velocidad promedio del movimiento de las moléculas es mayor– a otra de menor temperatura. Aunque pueden existir diferencias en la temperatura entre los ambientes internos y externos de las células, estos gradientes térmicos no suelen servir como fuente de energía para las actividades celulares. La energía térmica en los animales de sangre caliente, que han desarrollado un mecanismo para la termorregulación, es utilizada principalmente para mantener constante la temperatura del organismo. Esta es una función importante, dado que para muchas actividades celulares las velocidades son dependientes de la temperatura. Por ejemplo, enfriar células de mamíferos desde su temperatura corporal normal de 37 °C a 4 °C puede virtualmente "congelar" o detener muchos procesos celulares (p. ej., los movimientos de las membranas intracelulares).

La energía radiante es la energía cinética de los fotones, u ondas de luz, y es crítica para la biología. Esta energía puede convertirse en energía térmica; por ejemplo, cuando la luz es absorbida por las moléculas y la energía se convierte en movimiento molecular. Durante la fotosíntesis, la energía absorbida por las moléculas especializadas (p. ej., la clorofila) es subsecuentemente convertida en la energía de los enlaces químicos (cap. 8),

La energía mecánica, una de las principales formas de energía cinética en la biología, suele ser el resultado de la conversión de la energía almacenada. Por ejemplo, los cambios en la longitud de los filamentos del citoesqueleto generan fuerzas que empujan o tiran de las membranas y los orgánulos (cap. 19).

La energía eléctrica –la energía del movimiento de electrones u otras partículas cargadas– es otra de las principales formas de energía cinética.

Energía potencial. Para la biología tiene importancia fundamental la energía química potencial, la energía almacenada en los enlaces que conectan los átomos en las moléculas. La mayoría de las reacciones bioquímicas descritas en este libro involucran la formación o la ruptura de, por lo menos, un enlace químico covalente. Esta energía se reconoce cuando los compuestos químicos forman parte de reacciones liberadoras de energía. Por ejemplo, la elevada energía potencial de los enlaces covalentes de la glucosa puede ser liberada por combustión enzimática controlada en las células (véase el análisis más adelante). Esta energía es aprovechada por la célula para realizar diversas clases de trabajo.

Una segunda forma de energía potencial biológicamente importante es la energía de un gradiente de concentración. Cuando la concentración de una sustancia a un lado de una barrera, como la membrana, es diferente de la del otro lado, existe un gradiente de concentración. Todas las células forman gradientes de concentración, entre los líquidos internos y externos, mediante el intercambio selectivo de nutrientes, productos de desechos e iones con el medio circundante. Además, a menudo los orgánulos dentro de las células (p. ej., mitocondria, lisosoma) contienen diferentes concentraciones de iones y otras moléculas; como vimos en la sección anterior, la concentración de protones dentro de un lisosoma es cerca de 500 veces la del citoplasma.

Una tercera forma de energía potencial en las células es el potencial eléctrico: la energía de separación de cargas. Por ejemplo, hay un gradiente de carga eléctrica de ≈ 200.000 volt/cm a través de la membrana plasmática de casi todas las células. En el capítulo 7 analizaremos cómo se generan y mantienen los gradientes de concentración y la diferencia de potencial a través de las membranas.

Las células pueden transformar un tipo de energía en otro

De acuerdo con la primera ley de la termodinámica, la energía no se crea ni se destruye, pero puede convertirse de una forma a otra. (En las reacciones nucleares la masa se convierte en energía, pero esto es irrelevante para los sistemas biológicos.) Por ejemplo, en la fotosíntesis la energía radiante de la luz se transforma en energía química potencial, almacenada en los enlaces covalentes entre los átomos de una molécula de sacarosa o de almidón. En los músculos y los nervios, la energía química potencial de los enlaces covalentes es transformada, respectivamente, en energía cinética de la contracción muscular y en energía eléctrica de la transmisión nerviosa. En todas las células, la energía potencial, liberada por la ruptura de determinados enlaces químicos, se utiliza para generar energía potencial en la forma de gradientes de concentración y de potencial eléctrico. Similarmente, la energía almacenada en los gradientes de concentración o potencial eléctrico se utiliza para sintetizar enlaces químicos o para transportar moléculas de un lado de la membrana al otro para generar un gradiente de concentración. Este último proceso ocurre durante el transporte de nutrientes, como la glucosa al interior de ciertas células y el transporte de productos de desecho hacia el exterior de las células.

Dado que todas las formas de energía son intercambiables, se pueden expresar en las mismas unidades de medida. Aunque la unidad estándar de la energía es el joule, los bioquímicos tradicionalmente han utilizado una unidad alternativa, la **caloría** (1 joule = 0,239 calorías). En este libro utilizaremos la kilocaloría para medir los cambios de energía (1 kcal = 1.000 cal).

La variación de la energía libre determina la dirección de una reacción química

Debido a que los sistemas biológicos por lo general, tienen lugar a temperatura y presión constantes, es posible predecir la dirección de una reacción química a partir de la variación en la **energía libre G**, denominada así en honor a J. W. Gibbs, quien demostró que "todos los sistemas cambian de modo tal que la energía libre |G| sea minimizada". En el caso de una reacción química, reactivos $\rightleftharpoons$ productos, la variación en la energía libre ΔG está dada por

$$\Delta G = G_{\text{productos}} - G_{\text{reactivos}}$$

La relación de ΔG con la dirección de cualquier reacción química puede resumirse en tres afirmaciones:

- Si ΔG es negativa, la reacción directa (de izquierda a derecha en la ecuación escrita) tenderá a ocurrir espontáneamente.

- Si ΔG es positiva, tenderá a producirse la reacción inversa (de derecha a izquierda en la ecuación escrita).

- Si ΔG es cero, ambas reacciones, directa e inversa, tienen lugar a la misma velocidad; la reacción está en equilibrio.

La variación estándar de la energía libre de una reacción, $\Delta G°$ es el valor de la variación de energía libre con las condiciones de 298 K (25 °C), 1 atm de presión, pH 7,0 (como en el agua pura) y concentraciones iniciales de 1 M para todos los reactivos y productos excepto los protones, que se mantienen a 10^{-7} M (pH 7,0). La mayoría de las reacciones biológicas difieren de las condiciones estándares, en particular en las concentraciones de los reactivos, las cuales normalmente son menores de 1 M.

La energía libre de un sistema químico puede definirse como $G = H - TS$, donde H es la energía de enlace, o entalpía del sistema; T es la temperatura en grados Kelvin (K); y S es la **entropía**, una medida del desorden o aleatoriedad. Si la temperatura permanece constante, una reacción procede espontáneamente sólo si la variación de energía libre ΔG de la siguiente ecuación es negativa:

$$\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S \qquad (2\text{-}6)$$

En una reacción **exotérmica**, los productos contienen menos energía de enlace que los reactivos, la energía liberada por lo general se convierte en calor (la energía del movimiento molecular) y ΔH es negativa. En una reacción endotérmica, los productos contienen más energía de enlace que los reactivos, se absorbe calor y ΔH es positiva. Los efectos combinados de los cambios en la entalpía y en la entropía determinan si la ΔG para una reacción es positiva o negativa. Una reacción exotérmica ($\Delta H < 0$) en la cual se incrementa la entropía ($\Delta S > 0$) ocurre espontáneamente ($\Delta G < 0$). Una reacción endotérmica ($\Delta H > 0$) ocurrirá espontáneamente si ΔS se incrementa lo suficiente de manera tal que el término $T\,\Delta S$ pueda superar el valor positivo de ΔH.

Muchas reacciones biológicas tienden a incrementar el orden y, como consecuencia, a disminuir la entropía ($\Delta S < 0$). Un ejemplo obvio es la reacción que liga los aminoácidos entre sí para formar una proteína. Una solución de moléculas de proteína tiene menor entropía que otra de los mismos aminoácidos no ligados, porque el movimiento libre de cualquier aminoácido de una proteína está restringido cuando está unido en una cadena larga. A menudo las células compensan la disminución de la entropía mediante el "acoplamiento" de tales reacciones sintéticas con reacciones independientes que tienen una ΔG negativa muy alta (véase más adelante). En este esquema las células pueden convertir las fuentes de energía de su ambiente en la construcción de estructuras altamente organizadas y vías metabólicas que son esenciales para la vida.

La variación de la energía libre durante una reacción es influida por la temperatura, la presión y la concentración inicial de los reactivos y productos, y usualmente difiere de la $\Delta G°$. La mayoría de las reacciones biológicas –como otras que tienen lugar en solución acuosa– también son afectadas por el pH de la solución. Podemos estimar las variaciones de energía libre para diferentes temperaturas y concentraciones iniciales utilizando la ecuación

$$\Delta G = \Delta G° + RT \ln Q = \Delta G° + RT \ln \frac{[\text{productos}]}{[\text{reactivos}]} \qquad (2\text{-}7)$$

donde R es la constante de los gases, 1,987 cal/(grados · mol), T es la temperatura (en grados Kelvin) y Q es la relación *inicial* entre productos y reactivos. Para la reacción A + B $\rightleftharpoons$ C, en la cual dos moléculas se combinan para formar una tercera, Q en la ecuación 2-7 es igual a [C]/ [A] [B]. En este caso, un aumento en la concentración inicial tanto de [A] como de [B] traducirá en un valor negativo grande para ΔG y conducirá la reacción hacia más formación de C.

Independientemente del $\Delta G°$ para una reacción bioquímica particular, ésta se desarrollará de manera espontánea dentro de las células sólo si ΔG es negativa, dada la habitual concentración intracelular de reactivos y productos. Por ejemplo, la conversión de gliceraldehído-3-fosfato (G3P) a dihidroxiacetona fosfato (DHAP), dos intermediarios en la degradación de la glucosa,

$$\text{G3P} \rightleftharpoons \text{DHAP}$$

tiene una $\Delta G°$ de −1840 cal/mol. Si las concentraciones de G3P y DHAP son iguales, entonces $\Delta G = \Delta G°$, porque $RT \ln 1 = 0$; en esta situación, la reacción reversible G3P $\rightleftharpoons$ DHAP procederá en la dirección de la formación de DHAP hasta alcanzar el equilibrio. Sin embargo, si la [DHAP] inicial es 0,1 M y la [G3P] es 0,001 M, con otras condiciones estándares, entonces Q en la ecuación 2-7 es igual 0,1/0,001 = 100, dando una ΔG de +887 cal/mol. En estas condiciones, la reacción procederá en la dirección de formación de G3P.

La ΔG para una reacción es independiente de la velocidad de reacción. En realidad, en condiciones fisiológicas normales, muy pocas, si alguna, de las reacciones bioquímicas necesarias para sustentar la vida podrían ocurrir sin algunos mecanismos para incrementar la velocidad de reacción. Como analizaremos en el capítulo 3, las velocidades de reacción en los sistemas biológicos suelen estar determinadas por la actividad de las enzimas, las proteínas de catálisis que aceleran la formación de productos a partir de reactivos sin alterar el valor de ΔG.

La $\Delta G^{\circ\prime}$ de una reacción puede calcularse a partir de su K_{eq}

Una mezcla química en equilibrio ya se encuentra en un estado de mínima energía libre; esto es, no se genera ni libera energía libre alguna. En consecuencia, para un sistema en equilibrio ($\Delta G = 0$, $Q = K_{eq}$) podemos escribir

$$\Delta G^{\circ\prime} = -2{,}3\ RT \log K_{eq} = -1365 \log K_{eq} \qquad (2\text{-}8)$$

en condiciones estándares (nótese el cambio a la base 10 del logaritmo). Por lo tanto, si se determinan las concentraciones de reactivos y productos en el equilibrio (es decir, la K_{eq}), es posible calcular el valor de $\Delta G^{\circ\prime}$. Por ejemplo, la K_{eq} para la interconversión de gliceraldehído-3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato (G3P $\rightleftharpoons$ DHAP) es 22,2 en condiciones estándares. Si se sustituye este valor en la ecuación 2-8, podemos calcular fácilmente la $\Delta G^{\circ\prime}$ para esta reacción como -1840 cal/mol.

Si se reordena la ecuación 2-8 y se aplica el antilogaritmo, se obtiene

$$K_{eq} = 10^{-(\Delta G^{\circ\prime}/2{,}3RT)} \qquad (2\text{-}9)$$

De esta expresión queda claro que si $\Delta G^{\circ\prime}$ es negativa, el exponente será positivo, por lo que K_{eq} será mayor de 1. Por lo tanto, en el equilibrio habrá más productos que reactivos; en otras palabras, se favorece la formación de productos a partir de los reactivos. Contrariamente, si la $\Delta G^{\circ\prime}$ es positiva, el exponente será negativo y la K_{eq} será menor de 1.

Una reacción química desfavorable puede producirse si se acopla con una reacción energéticamente favorable

Muchos procesos en las células son energéticamente desfavorables ($\Delta G > 0$) y no se producen en forma espontánea. Los ejemplos incluyen la síntesis de DNA a partir de nucleótidos y el transporte de sustancias a través de la membrana plasmática desde concentraciones más bajas hacia más altas. Las células pueden llevar a cabo una reacción que requiere energía ($\Delta G_1 > 0$) mediante el acoplamiento con una reacción que libera energía ($\Delta G_2 < 0$) si la suma de las dos reacciones tiene una ΔG neta negativa.

Supongamos que la reacción A $\rightleftharpoons$ B + X tiene una ΔG de +5 kcal/mol y que la reacción X $\rightleftharpoons$ Y + Z tiene una ΔG de -10 kcal/mol.

(1) A $\rightleftharpoons$ B + X $\quad \Delta G = +5$ kcal/mol

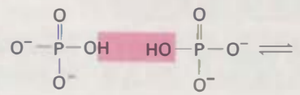
(2) X $\rightleftharpoons$ Y + Z $\quad \Delta G = -10$ kcal/mol

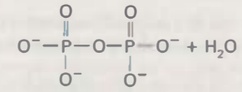
Suma: A $\rightleftharpoons$ B + Y + Z $\quad \Delta G = -5$ kcal/mol

En ausencia de la segunda reacción, podría haber mucho más A que B en el equilibrio. Sin embargo, como la conversión de X en Y + Z es una reacción favorable, empujará el primer proceso hacia la formación de B y el consumo de A. En las células las reacciones energéticamente desfavorables se acoplan a la hidrólisis del ATP, como analizaremos más adelante.

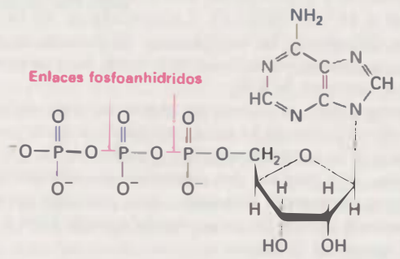
La hidrólisis del ATP libera una cantidad sustancial de energía y conduce muchos procesos celulares

En casi todos los organismos, el adenosintrifosfato, o ATP, es la molécula más importante para la captación, el almacenamiento transitorio y la transferencia subsecuente de energía para realizar trabajo (es decir, biosíntesis, movimientos mecánicos). La energía útil en una molécula de ATP está contenida en los enlaces fosfoanhidridos, los cuales son enlaces covalentes formados a partir de la condensación de dos moléculas de fosfato con pérdida de agua:





Una molécula de ATP tiene dos enlaces fosfoanhidridos clave (fig. 2-24). La hidrólisis de un enlace fosfoanhidrido (~) en cada una de las siguientes reacciones tiene una $\Delta G^{\circ\prime}$ muy negativa, de unos –7,3 kcal/mol:



Adenosintrifosfato (ATP)

▲ **Fig. 2-24. Adenosintrifosfato (ATP).** Los dos enlaces fosfoanhidridos (rojo) en el ATP, los cuales unen los tres grupos fosfatos, tienen cada uno una $\Delta G^{\circ\prime}$ de –7,3 kcal/mol para la hidrólisis. En los sistemas biológicos la hidrólisis de estos enlaces, especialmente el terminal, dirige muchas reacciones que requieren energía.

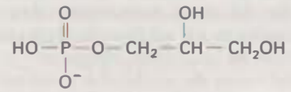
$$\text{Ap~p~p} + H_2O \longrightarrow \text{Ap~p} + P_i + H^+ \quad \text{(ATP)} \quad \text{(ADP)}$$

$$\text{Ap~p~p} + H_2O \longrightarrow \text{Ap} + PP_i + H^+ \quad \text{(ATP)} \quad \text{(AMP)}$$

$$\text{Ap~p} + H_2O \longrightarrow \text{Ap} + P_i + H^+ \quad \text{(ADP)} \quad \text{(AMP)}$$

En estas reacciones, P_i indica fosfato inorgánico (PO_4^{3-}) y PP_i pirofosfato inorgánico, dos grupos fosfato unidos por un enlace fosfodiéster. Como muestran las dos primeras reacciones, la eliminación de un grupo fosfato o pirofosfato a partir del ATP da como resultado adenosindifosfato (ADP) o adenosinmonofosfato (AMP), respectivamente.

Un enlace fosfoanhidrido u otro enlace de alta energía (comúnmente señalado por ~) no es intrínsecamente diferente de otros enlaces covalentes. Simplemente los enlaces de alta energía liberan cantidades muy grandes de energía cuando son rotos por adición de agua (hidrólisis). Por ejemplo, la $\Delta G^{\circ\prime}$ para la hidrólisis de un enlace fosfoanhidrido en ATP (-7,3 kcal/mol) es más de tres veces la $\Delta G^{\circ\prime}$ para la hidrólisis de un enlace fosfoéster (rojo) en el glicerol 3-fosfato (-2,2 kcal/mol):



Glicerol 3-fosfato

Una razón principal para esta diferencia es que el ATP y sus productos de hidrólisis ADP y P_i están altamente cargados a pH neutro. Durante la síntesis de ATP, se requiere un gran aporte de energía para forzar las cargas negativas del ADP y del P_i a juntarse. Contrariamente, se libera mucha energía cuando el ATP es hidrolizado en ADP y P_i. En comparación, la formación del enlace fosfoéster entre un hidroxilo no cargado en el glicerol y P_i requiere menos energía, y se libera menos energía cuando este enlace es hidrolizado.

Las células poseen mecanismos mediados por proteínas para transferir la energía libre liberada por hidrólisis de los enlaces fosfoanhidridos a otras moléculas, y así conducir reacciones que, de otra manera, serían energéticamente desfavorables. Por ejemplo, si la ΔG para la reacción B + C → D es positiva pero menor que la ΔG para la hidrólisis del ATP, la reacción puede ser conducida hacia la derecha por el acoplamiento con la hidrólisis del enlace fosfoanhidrido terminal del ATP. En un mecanismo común de tal acoplamiento energético, parte de la energía almacenada en este enlace fosfoanhidrido es transferida a uno de los reactivos mediante la ruptura del enlace en el ATP y formación de un enlace covalente entre el grupo fosfato liberado y uno de los reactivos. El intermediario fosforilado generado en este esquema puede luego reaccionar con C para formar D + P_i en una reacción que tiene una ΔG negativa:

$$\text{B} + \text{Ap~p~p} \longrightarrow \text{B~p} + \text{Ap~p}$$

$$\text{B~p} + \text{C} \longrightarrow \text{D} + P_i$$

La reacción global

$$\text{B} + \text{C} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{D} + \text{ADP} + P_i$$

es energéticamente favorable ($\Delta G < 0$).

Un mecanismo alternativo de acoplamiento energético es la utilización de la energía liberada por la hidrólisis del ATP para cambiar la conformación de una molécula a un estado más tensionado "rico en energía". A su vez, la energía almacenada como tensión conformacional puede ser liberada a medida que la molécula se "relaja" retornando a su conformación no tensionada. Si este proceso de relajación puede acoplarse de manera mecánica a otra reacción, la energía liberada puede aprovecharse para llevar a cabo numerosos procesos celulares.

Al igual que con muchas reacciones biosintéticas, el transporte de moléculas hacia el interior o exterior de las células suele tener una ΔG positiva y por lo tanto se requiere una entrada de energía para proceder. Tales reacciones simples de transporte no involucran *directamente* la formación o ruptura de enlaces covalentes, por lo tanto la $\Delta G^{\circ\prime}$ es 0. En el caso del movimiento de una sustancia hacia el interior de una célula, la ecuación 2-7 queda

$$\Delta G = RT \ln \frac{[C_{interior}]}{[C_{exterior}]} \qquad (2\text{-}10)$$

donde $[C_{interior}]$ es la concentración inicial de la sustancia dentro de la célula y $[C_{exterior}]$ es la concentración fuera de la célula. A partir de la ecuación 2-10 podemos ver que ΔG es positiva para el transporte de una sustancia hacia adentro de la célula en contra del gradiente de concentración (cuando $[C_{interior}] > [C_{exterior}]$); la energía para conducir este transporte "cuesta arriba" a menudo es provista por la hidrólisis de ATP. Por el contrario, cuando una sustancia se desplaza a favor de su gradiente de concentración ($[C_{exterior}] > [C_{interior}]$), ΔG es negativa. Tal transporte "cuesta abajo" libera energía que puede ser acoplada a reacciones que requieren energía, es decir, el movimiento de otra sustancia cuesta arriba a través de una membrana o la síntesis de ATP en sí mismo (véase cap. 7).

El ATP es generado durante la fotosíntesis y la respiración

Es obvio que para continuar funcionando las células deben restablecer su contenido de ATP. En casi todas las células la luz solar es la fuente de energía inicial, la cual posteriormente es transformada en enlaces fosfoanhidridos del ATP y en enlaces de otros compuestos. En la fotosíntesis, las plantas y ciertos microorganismos pueden captar la energía lumínica y utilizarla para sintetizar ATP a partir de ADP y P_i. Gran parte del ATP producido en la fotosíntesis es hidrolizada para proporcionar energía para la conversión de dióxido de carbono a azúcares de seis carbonos, un proceso denominado fijación del carbono:

$$6\ CO_2 + 6\ H_2O \xrightarrow{\text{ATP}\ \ \text{ADP} + P_i} C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2$$

En los animales, la energía libre de los azúcares y otras moléculas derivadas de los alimentos se libera en el proceso de respiración. Toda la síntesis del ATP en las células animales y en microorganismos no fotosintéticos es resultado de la transformación química de las moléculas ricas en energía, provenientes de la dieta (p. ej., glucosa, almidón). En el capítulo 8 se verán los mecanismos de la fotosíntesis y la respiración celular.

La oxidación completa de la glucosa para dar dióxido de carbono

$$C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \longrightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O$$

tiene una $\Delta G^{\circ\prime}$ de –686 kcal/mol y es la inversa de la fijación fotosintética del carbono. Las células emplean un sistema elaborado de reacciones catalizadas por enzimas para acoplar el metabolismo de una molécula de glucosa con la síntesis de hasta 30 moléculas de ATP a partir de 30 moléculas de ADP. Esta degradación (catabolismo) de la glucosa dependiente de oxígeno (aeróbica) es la forma principal para la generación de ATP en todas las células animales, células de plantas no fotosintéticas y muchas células bacterianas.

La energía lumínica capturada en la fotosíntesis no es la única fuente de energía química para todas las células. Ciertos microorganismos que viven en fosas oceánicas profundas, donde la luz solar falta por completo, derivan la energía para la conversión de ADP y P_i en ATP de la oxidación de compuestos inorgánicos reducidos. Estos compuestos se originan en el centro de la tierra y son liberados en las aberturas.

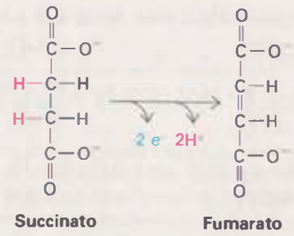
El NAD⁺ y el FAD acoplan muchas reacciones biológicas de oxidorreducción

En muchas reacciones químicas se transfieren electrones de un átomo o molécula a otro; esta transferencia puede acompañar la formación de nuevos enlaces químicos o no. La pérdida de electrones de un átomo o una molécula se denomina **oxidación**, y la ganancia de electrones por un átomo o molécula se denomina reducción. Dado que los electrones no se crean ni se destruyen en una reacción química, si un átomo se oxida, otro se debe reducir. Por ejemplo, el oxígeno capta electrones de los iones Fe^{2+} (ferrosos) para formar iones Fe^{3+} (férricos), una reacción que tiene lugar como parte del proceso por el cual los hidratos de carbono son degradados en las mitocondrias. Cada átomo de oxígeno recibe dos electrones, uno de cada ion Fe^{2+}:

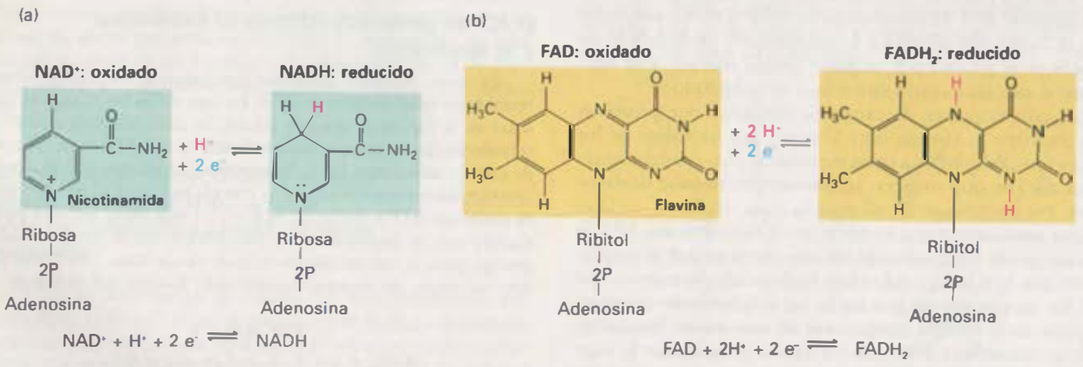
$$2\ Fe^{2+} + 1/2\ O_2 \longrightarrow 2\ Fe^{3+} + O^{2-}$$

Por lo tanto, se oxida Fe^{2+} y se reduce O_2. Tales reacciones, en las cuales una molécula se reduce y otra se oxida, a menudo son referidas como reacciones redox (de oxidorreducción). El oxígeno es un aceptor de electrones en muchas de estas reacciones en las células aeróbicas.

Muchas reacciones de oxidación y reducción, biológicamente importantes, implican la eliminación o la adición de átomos de hidrógeno (protones más electrones) en lugar de la transferencia de electrones aislados. Un ejemplo es la oxidación del succinato a fumarato, que tiene lugar en las mitocondrias (fig. 2-25). Los protones son solubles en solución acuosa (como H_3O^+), pero los electrones no, y



▲ **Fig. 2-25. Conversión de succinato en fumarato.** En esta reacción de oxidación, que tiene lugar en la mitocondria como parte del ciclo del ácido cítrico, el succinato pierde dos electrones y dos protones. Éstos son transferidos al FAD, reduciéndolo a $FADH_2$.



▲ **Fig. 2-26. Coenzimas transportadoras de electrones NAD⁺ y FAD.** (a) El NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleótido) se reduce a NADH mediante la adición de dos electrones y un protón simultáneamente. En muchas reacciones biológicas redox (p. ej., succinato → fumarato), un par de átomos de hidrógeno (dos protones y dos electrones) se eliminan de una molécula. Uno de los protones y ambos electrones son transferidos al NAD^+; el otro protón es liberado y queda en solución. (b) el FAD (flavina adenina dinucléotido) se reduce a $FADH_2$ mediante la adición de dos electrones y dos protones. En esta reacción de dos pasos, la adición de un electrón junto con un protón primero genera un intermediario semiquinona (no mostrado), el cual acepta luego un segundo electrón y un protón.

deben ser transferidos directamente de un átomo o molécula a otro sin intermediarios disueltos en agua. En este tipo de reacciones de oxidación, los electrones a menudo son transferidos hacia pequeñas moléculas portadoras de electrones, a veces referidas como coenzimas. Los portadores de electrones más comunes son el **NAD^+** (nicotinamida adenina dinucleótido), el cual se reduce a NADH, el FAD (flavina adenina dinucleótido), el cual se reduce a $FADH_2$ (fig. 2-26). Las formas reducidas de estas coenzimas pueden transferir protones y electrones a otras moléculas, reduciéndolas.

Para describir las reacciones redox, como la reacción del ion ferroso (Fe^{2+}) y el oxígeno (O_2), lo más sencillo es dividirlas en dos medias reacciones:

$$\textit{Oxidación del } Fe^{2+}\text{:}\quad 2\ Fe^{2+} \longrightarrow 2\ Fe^{3+} + 2\ e^-$$

$$\textit{Reducción del } O_2\text{:}\quad 2\ e^- + {}^1/_2\ O_2 \longrightarrow O^{2-}$$

En este caso, el oxígeno reducido (O^{2-}) reacciona con rapidez con dos protones para formar una molécula de agua (H_2O). La facilidad con la cual un átomo o molécula *gana* un electrón se denomina potencial de reducción *E*. La tendencia a *perder* electrones, el **potencial de oxidación**, tiene la misma magnitud pero signo opuesto que el potencial de reducción para la reacción inversa.

Los potenciales de reducción se miden en voltios (V) a partir de un punto cero arbitrario fijado por el potencial de reducción de la siguiente media reacción en condiciones estándares (25 °C, 1 atm y reactivos 1 M):

$$H^+ + e^- \underset{\text{oxidación}}{\overset{\text{reducción}}{\rightleftharpoons}} {}^1/_2\ H_2$$

El valor de *E* para una molécula o un átomo en condiciones estándares es su potencial de reducción estándar E'_0. Una molécula o ion con un E'_0 positivo tiene una mayor afinidad por los electrones que el ion H^+ en condiciones estándares. Por el contrario, una molécula o ion con un E'_0 negativo tiene una menor afinidad por los electrones que el ion H^+ en condiciones estándares. Al igual que los valores de $\Delta G^{\circ\prime}$, los potenciales de reducción estándar pueden diferir de los hallados en condiciones celulares, porque las concentraciones de los reactivos en una célula no son 1 M.

En una reacción redox, los electrones se mueven espontáneamente hacia los átomos o moléculas que tienen potenciales de reducción *más positivos*. En otras palabras, un compuesto que tiene un potencial de reducción más negativo puede transferir electrones hacia un compuesto (reducido) con un potencial de reducción más positivo. En este tipo de reacción, la variación en el potencial eléctrico ΔE es la suma de los potenciales de reducción y oxidación para las dos medias reacciones. La ΔE para una reacción redox está relacionada con la variación de la energía libre ΔG por la siguiente expresión:

$$\Delta G\ (\text{cal/mol}) = -n\ (23.064)\ \Delta E\ (\text{volts}) \qquad (2\text{-}11)$$

donde *n* es el número de electrones transferidos. Nótese que una reacción redox con un valor positivo de ΔE tendrá una ΔG negativa y por lo tanto tenderá a proceder de izquierda a derecha.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 2.4

Energética bioquímica

- La variación de energía libre ΔG es la medida más útil para predecir la dirección de las reacciones químicas en los sistemas biológicos. Las reacciones químicas tienden a producirse en la dirección hacia la cual ΔG es negativa.
- Directa o indirectamente, la energía lumínica capturada por la fotosíntesis de las plantas y de las bacterias fotosintéticas es la fuente principal de energía química de casi todas las células.
- La variación de energía química libre $\Delta G^{\circ\prime}$ es igual a -2,3 $RT \log K_{eq}$. En consecuencia, el valor de $\Delta G^{\circ\prime}$ puede calcularse a partir de las concentraciones de reactivos y productos determinadas experimentalmente en el equilibrio.
- Una reacción química con una ΔG positiva puede producirse si se acopla con una reacción con ΔG negativa de mayor magnitud.
- Muchos procesos celulares energéticamente desfavorables son conducidos por hidrólisis de enlaces fosfoanhidridos del ATP (véase fig. 2-24).
- Una reacción de oxidación (pérdida de electrones) siempre se acopla con una reacción de reducción (ganancia de electrones).
- Las reacciones biológicas de oxidación y reducción a menudo se acoplan con coenzimas transportadoras de electrones, como el NAD^+ y el FAD (véase fig. 2-26).
- Las reacciones de oxidación y reducción con una ΔE positiva tienen una ΔG negativa, por lo que tienden a producirse en forma espontánea.

PALABRAS CLAVE

ácido *48*
ácidos grasos *43*
acoplamiento energético *53*
átomo de carbono α (C_α) *38*
aminoácidos *38*
anfipáticas *29*
base *48*
bicapas fosfolipídicas *45*
buffer *48*
complementariedad molecular *36*
constante de equilibrio *46*
efecto hidrófobo *35*
enlace disulfuro *38*
enlace covalente *30*
enlaces fosfoanhidridos *52*
enlace hidrógeno *33*
energía química potencial *50*
estado estacionario *46*
entalpía (*H*) *51*
entropía (*S*) *51*
estereoisómeros *31*
ΔG (variación de energía libre) *51*
hidrófobo *29*
hidrófilo *29*
insaturados *43*
interacciones de van der Waals *34*
interacciones iónicas *33*
monosacáridos *41*
nucleósidos *40*
nucleótidos *40*
oxidación *55*
pH *47*
polar *32*
polímero *37*
reacción de deshidratación *37*
reacción redox *54*
reducción *55*
saturados *43*

REVISIÓN DE CONCEPTOS

1. La salamanquesa es un reptil con una capacidad sorprendente para escalar superficies lisas, incluido vidrio. Recientes descubrimientos indican que las salamanquesas se adhieren a superficies lisas mediante interacciones de van der Waals entre sus pies y la superficie lisa. ¿Cómo es que este método de adherencia es ventajoso respecto de las interacciones covalentes? Dado que las fuerzas de van der Waals están entre las interacciones más débiles, ¿cómo los pies de la salamanquesa pueden adherirse tan eficientemente?

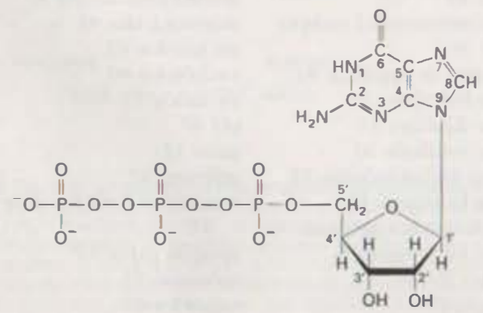
2. Los canales del K^+ son un ejemplo de una proteína transmembrana (una proteína que atraviesa la bicapa fosfolipídica de la membrana plasmática). ¿Qué tipos de aminoácidos es probable encontrar en a) el interior del canal a través del cual pasan los K^+; b) el contacto con la bicapa lipídica que contiene ácidos grasos; c) el dominio citosólico de la proteína; y d) el dominio extracelular de la proteína?

3. V-M-Y-Y-F-N: Esta es la abreviatura de una letra para los aminoácidos de un péptido. Dibuje la estructura de este péptido. ¿Cuál es la carga neta de este péptido a pH 7,0? Una enzima denominada proteína tirosincinasa puede unir fosfatos al grupo hidroxilo de la tirosina. ¿Cuál es la carga neta de un péptido a pH 7,0 después de que ha sido fosforilado por una tirosincinasa? ¿Cuál es la fuente probable de fosfato utilizado por la cinasa para esta reacción?

4. Los enlaces disulfuro ayudan a estabilizar la estructura tridimensional de las proteínas. ¿Qué aminoácidos están involucrados en la formación de enlaces disulfuro? La formación de un enlace disulfuro ¿incrementa o disminuye la entropía (ΔS)?

5. En la década de 1960, se recetó talidomida a mujeres embarazadas para tratar las náuseas matinales. Sin embargo, causó defectos graves en las extremidades de los niños nacidos de algunas mujeres que habían tomado el fármaco, y su uso para las náuseas matinales fue suspendido. Ahora se sabe que la talidomida se administra como una mezcla de dos compuestos estereoisoméricos, uno de los cuales aliviaba las náuseas matinales y el otro producía los defectos congénitos. ¿Qué son los estereoisómeros? ¿Por qué dos compuestos tan estrechamente relacionados pueden tener efectos fisiológicos tan diferentes?

6. Nombre el compuesto mostrado a continuación. Este nucleótido es un componente del DNA, el RNA o ambos? Nombre otra función de este compuesto.



7. La base química de la especificidad de los grupos sanguíneos radica en los carbohidratos dispuestos sobre la superficie de los eritrocitos. Los carbohidratos poseen un notable potencial de diversidad estructural. De hecho, la complejidad estructural de los oligosacáridos que se pueden formar a partir de cuatro azúcares es mayor que la de los oligopéptidos que pueden formarse a partir de cuatro aminoácidos. ¿Qué propiedades de los carbohidratos hacen posible esta gran diversidad estructural?

8. El amoníaco (NH_3) es una base débil que adquiere un protón en condiciones ácidas y se transforma en ion amonio, de acuerdo con la siguiente reacción:

$$NH_3 + H^+ \rightarrow NH_4^+$$

el amoníaco atraviesa libremente las membranas biológicas, incluso las de los lisosomas, orgánulos subcelulares con un pH cercano a 5,0; el pH del citosol es de alrededor de 7,0. ¿Cuál es el efecto sobre el pH del contenido líquido de los lisosomas cuando las células se exponen al amoníaco? *Nota:* El amino protonado no se difunde libremente a través de las membranas.

9. Considere la reacción de unión L + R → LR, donde L es un ligando y R es su receptor. Cuando se adiciona 1×10^{-3} M de L a una solución que contiene 5×10^{-2} M de R, el 90% de L se une para formar LR. ¿Cuál es la K_{eq} de esta reacción? ¿Cómo será afectada la K_{eq} por la adición de una proteína que cataliza esta reacción de unión? ¿Qué es la K_D?

10. ¿Cuál es el estado de ionización del ácido fosfórico en el citoplasma? ¿Por qué el ácido fosfórico es un compuesto fisiológicamente importante?

11. La $\Delta G'^{\circ}$ para la reacción X + Y → XY es –1.000 cal/mol. ¿Cuál es la ΔG a 25°C (298 Kelvin) comenzando con 0,01 M de cada X, Y y XY? Sugiera dos formas que podrían hacer que esta reacción sea energéticamente favorable.

BIBLIOGRAFÍA

Alberty, R. A., and R. J. Silbey.2000. Physical Chemistry, 3d ed. Wiley.

Atkins, P. W. 2000. The Elements of Physical Chemistry, 3d ed. W. H. Freeman and Company.

Berg, J. M., J. L. Tymoczko, and L. Stryer. 2002. Biochemistry, 5th ed. W. H. Freeman and Company.

Cantor, P. R., and C. R. Schimmel.1980. Biophysical Chemistry. W. H. Freeman and Company.

Davenport, H. W. 1974. ABC of Acid-Base Chemistry, 6th ed. University of Chicago Press.

Edsall, J. T., and J. Wyman. 1958. Biophysical Chemistry, vol. 1. Academic Press.

Eisenberg, D., and D. Crothers. 1979. Physical Chemistry with Applications to the Life Sciences. Benjamin-Cummings.

Gennis, R. B. 1989. Biomembranes: Molecular Structure and Function. Springer-Verlag, New York.

Guyton, A. C., and J. E. Hall. 2000. Textbook of Medical Physiology, 10th ed. Saunders.

Hill, T. J. 1977. Free Energy Transduction in Biology. Academic Press.

Klotz, I. M. 1978. Energy Changes in Biochemical Reactions. Academic Press.

Lehninger, A. L., D. L. Nelson, and M. M. Cox. 2000. Principles of Biochemistry, 3d ed. Worth.

Murray, R. K., et al. 1999. Harper's Biochemistry, 25th ed. Lange.

Nicholls, D. G., and S. J. Ferguson. 1992. Bioenergetics 2. Academic Press.

Oxtoby, D., H. Gillis, and N. Nachtrieb. 2003. Principles of Modern Chemistry, 5th ed. Saunders.

Sharon, N. 1980. Carbohydrates. Sci. Am. 243(5):90-116.

Tanford C. 1980. The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes, 2d ed. Wiley.

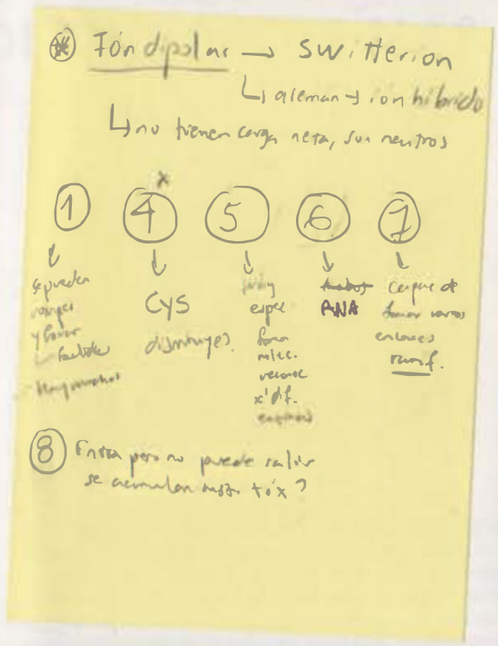
Tinoco, I., K. Sauer, and J. Wang. 2001. Physical Chemistry—Principles and Applications in Biological Sciences, 4th ed. Prentice Hall.

Van Holde, K., W. Johnson, and P. Ho. 1998. Principles of Physical Biochemistry. Prentice Hall.

Voet, D., and J. Voet. 1995. Biochemistry, 2d ed. Wiley.

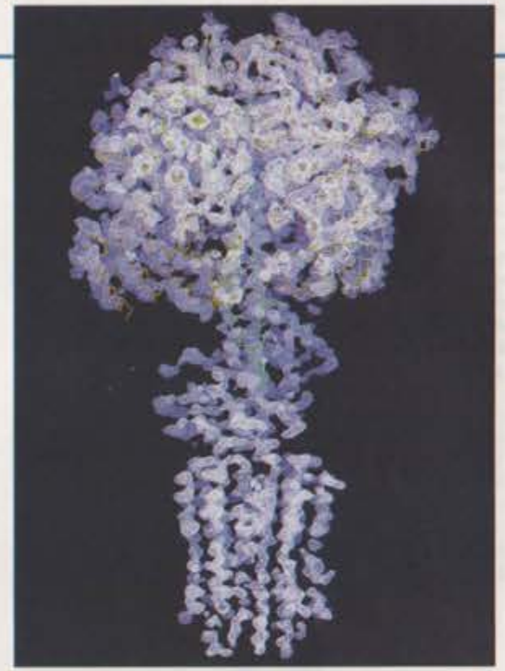
Watson, J. D., et al. 2003. Molecular Biology of the Gene, 5th ed. Benjamin-Cummings.

Wood, W. B., et al. 1981. Biochemistry: A Problems Approach, 2d ed. Benjamin-Cummings.



3

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS



Mapa de densidad de electrones de la F_1-ATPasa asociada con un anillo de 10 subunidades c del dominio F_0 de la ATP sintasa, una maquinaria molecular que lleva a cabo la síntesis del ATP en las eubacterias, los cloroplastos y la mitocondria. (Cortesía de Andrew Leslie, Laboratorio de Biología Molecular MRC, Cambridge, Reino Unido.)

Las proteínas son las moléculas operadoras de la célula y llevan adelante el programa de actividades codificado por los genes. Este programa requiere el esfuerzo coordinado de muchos tipos diferentes de proteínas, las cuales primero evolucionaron como moléculas rudimentarias que facilitaban un número limitado de reacciones químicas. Gradualmente, muchas de estas proteínas primitivas evolucionaron hasta transformarse en una amplia gama de enzimas capaces de catalizar un rango increíble de reacciones químicas intracelulares y extracelulares, con una velocidad y especificidad casi imposibles de obtener en un tubo de ensayo. Con el paso del tiempo, otras proteínas adquirieron capacidades especializadas, pudiendo ser agrupadas en clases funcionales numerosas y diversas: *proteínas estructurales*, que proveen rigidez estructural a la célula; *proteínas transportadoras*, que controlan el flujo de materiales a través de las membranas celulares; *proteínas reguladoras*, que actúan como sensores e interruptores para controlar la actividad de las proteínas y la función de los genes; *proteínas señalizadoras*, incluidas las receptoras de la superficie celular y otras proteínas que transmiten señales externas al interior de la célula; y las *proteínas motoras*, que producen el movimiento.

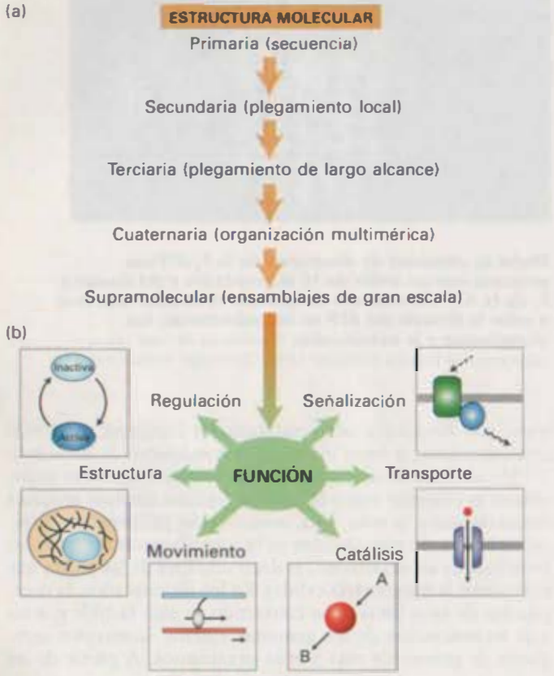
Una clave para entender el diseño funcional de las proteínas es darse cuenta de que muchas tienen partes "móviles" y de que son capaces de transmitir diversas fuerzas y energías de una manera ordenada. Sin embargo, numerosos procesos celulares críticos y complejos –como la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas, la transducción de señales y la fotosíntesis– son llevados a cabo por enormes conglomerados macromoleculares, a veces denominados *máquinas moleculares*.

Un objetivo fundamental de los biólogos celulares moleculares es entender cómo las células realizan diversos procesos esenciales para la vida. Una contribución principal en dirección al logro de este objetivo es la identificación de todas las proteínas de un organismo, es decir una lista de las partes que componen la maquinaria celular. En los últimos años, la compilación de tales listas se ha convertido en algo factible gracias a la secuenciación de los genomas enteros –conjuntos completos de genes– de más y más organismos. A partir de un

CONTENIDO

3.1 Estructura jerárquica de las proteínas
3.2 Plegamiento, modificación y degradación de las proteínas
3.3 Las enzimas y el trabajo químico de las células
3.4 Los motores moleculares y el trabajo mecánico de las células
3.5 Mecanismos generales para la regulación de la función de las proteínas
3.6 Purificación, detección y caracterización de las proteínas

análisis por computadora de las secuencias de los genomas, los investigadores pueden deducir el número y la estructura primaria de las proteínas codificadas (cap. 9). El término proteoma fue acuñado para referirse a la totalidad de las proteínas de un organismo. Por ejemplo, el proteoma de la levadura, *Saccharomyces cerevisiae* consta de unas 6.000 proteínas diferentes; el proteoma humano es sólo alrededor de cinco veces más grande y comprende unas 32.000 proteínas diferentes. Al comparar las secuencias y las estructuras de proteínas, los científicos pueden clasificar muchas proteínas del proteoma de un organismo y deducir sus funciones por homología con las proteínas de función conocida. Aunque se conoce la estructura tridimensional de relativamente pocas proteínas, la función de una proteína cuya estructura no ha sido determinada a menudo puede deducirse a partir de sus interacciones con otras proteínas, de los efectos que resultan como consecuencia de las mutaciones genéticas introducidas, de la bioquímica del complejo al cual pertenece o de todas estas posibilidades.



▲ **Fig. 3-1. Visión general de la estructura y función de una proteína.** (a) La secuencia lineal de aminoácidos (estructura primaria) se pliega en hélices u hojas (estructura secundaria) que se agrupan en un dominio globular o fibroso (estructura terciaria). Algunas proteínas individuales se asocian mutuamente para formar complejos (estructura cuaternaria) que pueden consistir en decenas a cientos de subunidades (ensamblajes supramoleculares). (b) Las proteínas exhiben funciones que incluyen la catálisis de reacciones químicas (enzimas), el flujo de moléculas pequeñas y iones (transporte), el sensado y reacción al entorno (señalización), el control de la actividad proteica (regulación), la organización del genoma, la bicapa lípida y el citoplasma (estructura), y la generación de fuerzas de movimiento (proteínas motoras). Estas y otras funciones surgen de interacciones de unión específicas y cambios de conformación en la estructura de una proteína plegada adecuadamente.

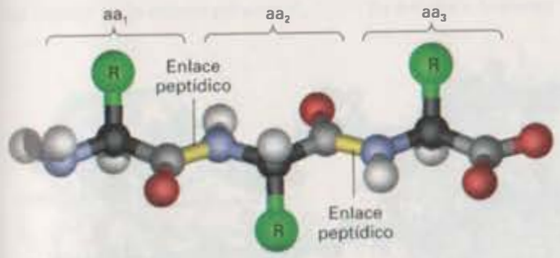
En este capítulo, empezamos estudiando de qué manera la estructura de una proteína da origen a sus funciones, un tema recurrente a lo largo de este libro (fig. 3-1). En la primera sección se analiza cómo se organizan las cadenas de aminoácidos y las diversas formas plegadas de orden superior que adoptan las cadenas. En la próxima sección se estudian las proteínas especiales que contribuyen al plegamiento de las proteínas, las modificaciones que tienen lugar después de la síntesis de la cadena proteica y los mecanismos que las degradan. La tercera sección se centra en proteínas como las catalizadoras y se revén las propiedades básicas que exhiben todas las enzimas. Luego introduciremos los motores moleculares, que convierten la energía química en movimiento. La estructura y función de estas y otras clases funcionales de proteínas se analizarán con detalle en capítulos próximos. A continuación se tratan diversos mecanismos que utilizan las células para controlar la actividad de las proteínas. El capítulo finaliza con una sección acerca de las técnicas más comunes, las herramientas de los biólogos, que se emplean para aislar proteínas y caracterizar sus propiedades.

3.1 Estructura jerárquica de las proteínas

A pesar de estar construidas en cadenas lineales por la polimerización de tan sólo 20 aminoácidos diferentes, las proteínas llevan a cabo una increíble cantidad de tareas diversas. Una cadena de proteínas se pliega adquiriendo una forma única, estabilizada por interacciones no covalentes entre regiones de la secuencia lineal de aminoácidos. Esta organización *espacial* de una proteína –su forma en tres dimensiones– es una clave para el entendimiento de su función. Sólo cuando una proteína se encuentra en su estructura tridimensional correcta, o conformación, es capaz de funcionar con eficiencia. Un concepto clave en la comprensión de cómo trabajan las proteínas es que la *función deriva de la estructura tridimensional y la estructura tridimensional está establecida por la secuencia de aminoácidos.* Aquí consideramos la estructura de las proteínas en cuatro niveles de organización, comenzando con sus monómeros constitutivos, los aminoácidos.

La estructura primaria de una proteína es su disposición lineal de aminoácidos

En el capítulo 2 repasamos las propiedades de los aminoácidos utilizados en la síntesis de proteínas y su unión mediante enlaces peptídicos para formar cadenas lineales. Los átomos repetidos N amido, el carbono α (C_α) y el C del carbonilo de cada residuo de aminoácido forman la *cadena principal* de una molécula de proteína, desde la cual se proyectan los distintos grupos de las cadenas laterales (fig. 3-2). Como consecuencia del enlace peptídico, la cadena principal exhibe polaridad porque todos los grupos amino se localizan del mismo lado de los átomos C_α. De esta manera, uno de los extremos de una proteína tiene un grupo amino libre (no unido) (el *N-terminal*) y el otro extremo tiene un grupo carboxilo libre (el *C-terminal*). Por convención, la secuencia de una cadena de proteína se representa con su aminoácido N-terminal a la izquierda y su aminoácido C-terminal a la derecha.



▲ **Fig. 3-2. Estructura de un tripéptido.** Los enlaces peptídicos (amarillo) conectan el átomo de nitrógeno amido (azul) de un aminoácido (aa) con el átomo de carbono del carbonilo (gris) de uno adyacente en los polímeros lineales conocidos como péptidos o polipéptidos, según su longitud. Las proteínas son polipéptidos que se han plegado en una estructura tridimensional definida (conformación). Las cadenas laterales, o grupos R (verde), que se extienden desde el átomo de carbono α (negro) de los aminoácidos que componen una proteína, determinan en gran medida sus propiedades. A valores fisiológicos de pH, los grupos amino y carboxilo terminales están ionizados.

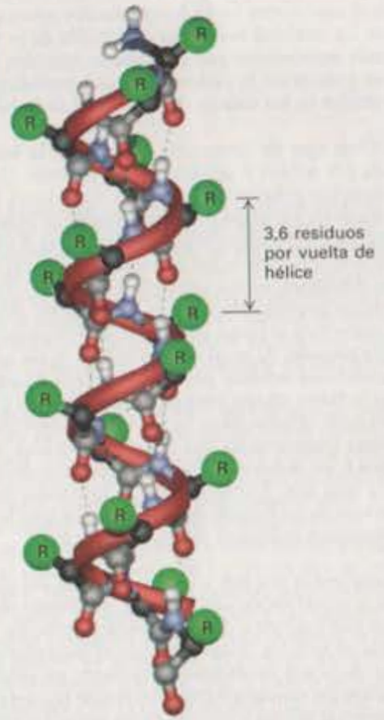
La estructura primaria de una proteína es simplemente la disposición lineal, o *secuencia*, de los residuos de los aminoácidos que la componen. Se utilizan muchas denominaciones para denotar las cadenas formadas por la polimerización de aminoácidos. Una cadena corta de aminoácidos unida por enlaces peptídicos y que tiene una secuencia definida es llamada **péptido**; las cadenas más largas se denominan **polipéptidos**. Los péptidos suelen contener menos de 20-30 residuos de aminoácidos, mientras que los polipéptidos contienen hasta 4.000 residuos. En general, reservamos el término proteína para el polipéptido (o para el complejo de polipéptidos) que tiene una estructura tridimensional bien definida. Queda implícito que las proteínas y los péptidos son productos naturales de una célula.

El tamaño de una proteína o de un polipéptido se informa como su masa en daltons (un dalton es una unidad de masa atómica) o como su peso molecular (PM), que es un número adimensional. Por ejemplo, una proteína de PM 10.000 tiene una masa de 10.000 daltons (Da), o 10 kilodaltons (kDa). En la última sección de este capítulo consideraremos diferentes métodos para medir los tamaños y otras características físicas de las proteínas. Las proteínas conocidas y propuestas, codificadas por el genoma de la levadura, tienen un peso molecular promedio de 52.728 y contienen, en promedio, 466 residuos de aminoácidos. El peso molecular promedio de los aminoácidos en las proteínas es de 113, si se considera su abundancia relativa media. Este valor puede utilizarse para estimar el número de residuos en una proteína a partir de su peso molecular o, por el contrario, su peso molecular a partir del número de residuos.

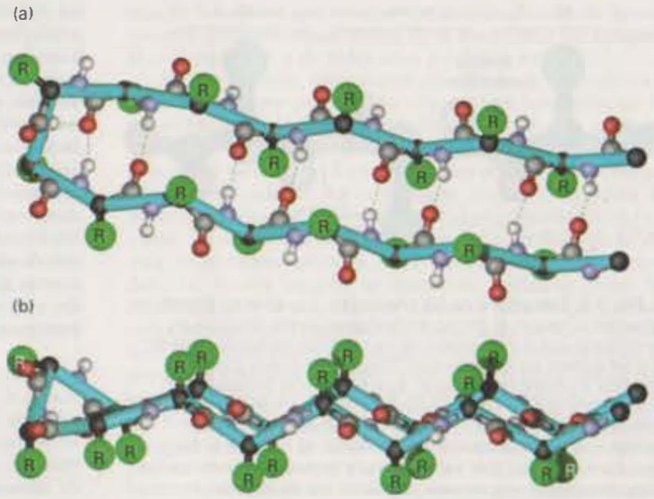
Las estructuras secundarias son los elementos cruciales de la arquitectura de las proteínas

El segundo nivel en la estructura jerárquica de las proteínas consiste en diversas disposiciones espaciales, que resultan del plegado de partes localizadas de una cadena polipeptídica; estas disposiciones se denominan estructuras secundarias. Un único polipéptido puede exhibir múltiples tipos de estructuras secundarias según su secuencia. En ausencia de interacciones estabilizadoras no covalentes, un polipéptido asume una estructura denominada *enrollamiento al azar (random coil)*. Sin embargo, cuando entre ciertos residuos se forman enlaces de hidrógeno estabilizadores, partes de la cadena principal se pliegan en una o más estructuras periódicas bien definidas; la hélice alfa (α), la hoja beta (β), o un *giro* corto en forma de U. En una proteína promedio, el 60% de la cadena polipeptídica se encuentra en forma de hélices α y hoja β; el resto de la molécula aparece como plegamientos y giros al azar. En consecuencia, las hélices α y las hojas β son los principales elementos internos de sostén en las proteínas. En esta sección, se exploran las fuerzas que favorecen la formación de estructuras secundarias. En secciones posteriores, se analizará cómo estas estructuras se pueden agrupar para formar disposiciones más grandes.

Hélice α. En un segmento polipeptídico plegado en una hélice α, el átomo de oxígeno del carbonilo de cada enlace peptídico se une mediante un enlace de hidrógeno con el átomo de hidrógeno amido del aminoácido ubicado cuatro residuos más allá, en dirección al C terminal. Esta disposición regular de enlaces confiere polaridad a la hélice porque todos los donantes en los enlaces de hidrógeno tienen la misma orientación (fig. 3-3). La disposición estable de aminoácidos en la hélice α



▲ **Fig. 3-3. La hélice α, una estructura secundaria frecuente en las proteínas.** La cadena principal polipeptídica (rojo) se pliega en una espiral que se mantiene en su lugar mediante enlaces de hidrógeno entre los átomos de oxígeno e hidrógeno de la cadena principal. La superficie exterior de la hélice está cubierta por los grupos R de las cadenas laterales (verde).



▶ Fig. 3-4. Hoja β, otra estructura secundaria frecuente en las proteínas. (a) Vista superior de una hoja β simple de dos hebras, con hebras β antiparalelas. Los enlaces de hidrógeno estabilizadores entre las hebras β se indican con líneas verdes discontinuas. El giro corto entre las hebras β también es estabilizado por un enlace de hidrógeno. (b) Vista lateral de una hoja β. La proyección de los grupos R (verde) por encima y por debajo del plano de la hoja queda evidenciada en esta vista. El ángulo fijo del enlace peptídico produce un contorno plegado.

mantiene la cadena principal como un cilindro similar a un bastón desde el cual parten las cadenas laterales apuntando hacia el exterior. La cualidad hidrófoba o hidrófila de la hélice está determinada enteramente por las cadenas laterales, dado que los grupos polares de la cadena principal peptídica ya están comprometidos en los enlaces de hidrógeno de la hélice.

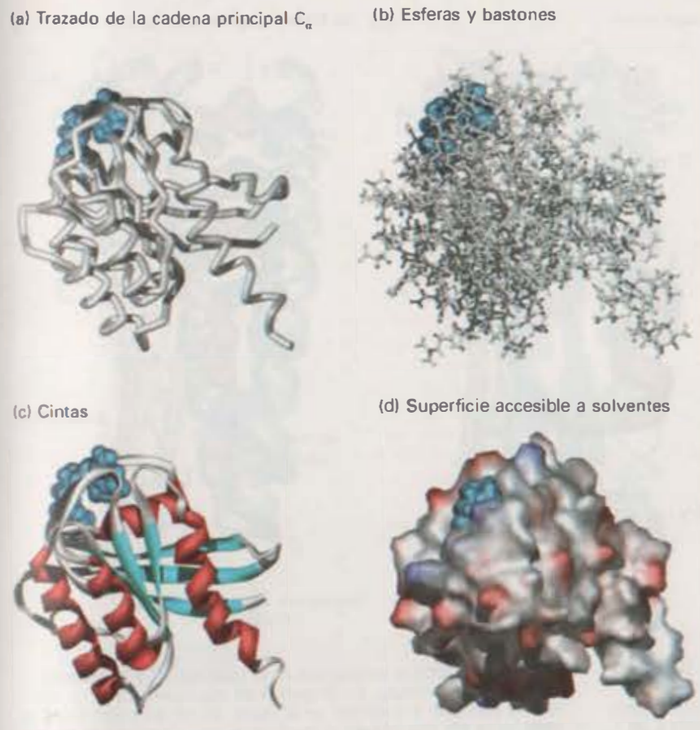
Hoja β. Otro tipo de estructura secundaria, la hoja β, está constituida por hebras β agrupadas lateralmente. Cada hebra β es un segmento polipeptídico corto (5-8 residuos), casi totalmente extendido. La unión mediante enlaces de hidrógeno entre los átomos de la cadena principal, en hebras β adyacentes, dentro de la misma cadena polipeptídica o entre cadenas polipeptídicas diferentes, forma una hoja β (fig. 3-4a). La planaridad del enlace peptídico fuerza a la hoja β a ser plegada; por ello, esta estructura se llama también *hoja β plegada*, o simplemente *hoja plegada*. Al igual que las hélices α, las hojas β tienen una polaridad definida por la orientación del enlace peptídico. Por lo tanto, en una hoja plegada, las hebras β adyacentes pueden estar orientadas en la misma dirección (paralela) o en la opuesta (antiparalela) una respecto de la otra. En ambas disposiciones, las cadenas laterales se proyectan desde las dos caras de la hoja (fig. 3-4b). En algunas proteínas, las hojas β forman la base de un bolsillo de unión; los núcleos hidrófobos de otras proteínas contienen múltiples hojas β.

Giros. Compuestos por tres o cuatro residuos, los giros se localizan en la superficie de una proteína, formando plegamientos agudos que vuelven a dirigir la cadena principal polipeptídica hacia el interior. Estas estructuras secundarias cortas con forma de U son estabilizadas mediante un enlace de hidrógeno entre los residuos terminales (véase fig. 3-4a). Es frecuente encontrar glicina y prolina en los giros. La ausencia de una cadena lateral grande en la glicina y la presencia de una curvatura intrínseca en la prolina le permiten a la cadena principal polipeptídica plegarse para formar una estructura rígida con forma de U. Los giros les permiten a las proteínas grandes plegarse para formar estructuras altamente compactas. Una cadena principal polipeptídica también puede contener curvaturas más largas o *bucles*. A diferencia de los giros, que exhiben sólo pocas estructuras bien definidas, los bucles se pueden formar de muchas maneras diferentes.

El plegamiento global de una cadena polipeptídica proporciona su estructura terciaria

La estructura terciaria se refiere a la conformación global de una cadena polipeptídica, es decir, la disposición tridimensional de todos sus residuos de aminoácidos. A diferencia de las estructuras secundarias, estabilizadas mediante enlaces de hidrógeno, la estructura terciaria se estabiliza principalmente a través de interacciones hidrófobas entre las cadenas laterales no polares, enlaces de hidrógeno entre las cadenas laterales polares y enlaces peptídicos. Estas fuerzas estabilizadoras mantienen compactos los elementos de las estructuras secundarias: hélices α, hebras β, giros y plegamientos al azar. Sin embargo, como las interacciones estabilizadoras son débiles, la estructura terciaria de una proteína no se mantiene fija, sino que sufre una fluctuación continua y momentánea. Esta variación en la estructura tiene consecuencias importantes en el funcionamiento y la regulación de las proteínas.

Las diversas formas en que se representa la conformación de las proteínas transmiten diferentes tipos de información. La forma más simple de representar la estructura tridimensional es trazar el curso de los átomos de la cadena principal con una línea sólida (fig. 3-5a); el modelo más complejo muestra la localización de cada átomo (fig. 3-5b). En el primer caso, un trazado de C_α muestra la organización global de la cadena polipeptídica sin considerar las cadenas laterales de los aminoácidos; en el último, un modelo de esferas y barras detalla las interacciones entre átomos de las cadenas laterales, que estabilizan la conformación de proteínas, así como los átomos de la cadena principal. A pesar de que ambas vistas son útiles, en ellas no se distinguen fácilmente los elementos de la estructura secundaria. Otro tipo de representación utiliza símbolos taquigráficos comunes para representar la estructura secundaria; por ejemplo, cintas enrolladas o cilindros



◀ Fig. 3-5. Distintas representaciones gráficas de la estructura de Ras, una proteína monomérica que une al nucleótido guanina. Se muestra la forma inactiva con el guanosindifosfato (GDP) unido, en las cuatro vistas, el GDP siempre se representa como una figura azul. (a) El trazado de la cadena principal C_α demuestra cómo el polipéptido se acomoda hasta ocupar el mínimo volumen posible. (b) Una representación de esferas y bastones revela la localización de todos los átomos. (c) Una representación de cintas enfatiza la forma como las hebras β y las hélices α se organizan en la proteína. Nótense los giros y los bucles que conectan pares de hélices y hebras. (d) Un modelo de las superficies accesibles al agua revela las numerosas protuberancias, cavidades y hendiduras en la superficie de la proteína. Las regiones de carga positiva están sombreadas en azul; las de carga negativa, en rojo.

sólidos para las hélices α, cintas planas o flechas para las hebras β, y hebras delgadas y flexibles para los giros y los bucles (fig. 3-5c). Este tipo de representación facilita la apreciación de la estructura secundaria de una proteína.

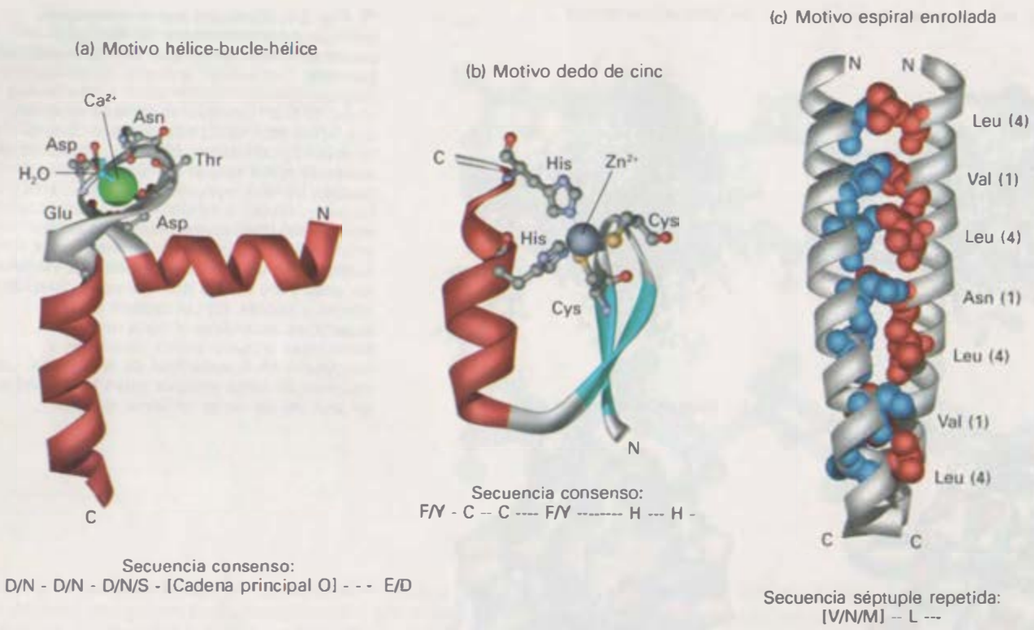
Sin embargo, ninguna de estas tres formas de representar la estructura de una proteína brinda demasiada información sobre la superficie de la proteína, que es de interés porque es allí donde otras moléculas se unen a ella. El análisis por computación permite identificar los átomos de la superficie que están en contacto con el medio acuoso. En esta superficie accesible al agua es posible configurar un mapa de las regiones que tienen características químicas (hidrofobicidad o hidrofilicidad) y eléctricas (básicas o ácidas) en común. Estos modelos revelan la topografía de la superficie proteica y la distribución de carga, características importantes de los sitios de unión, así como las hendiduras en la superficie donde las moléculas pequeñas a menudo se unen (fig. 3-5d). Esta imagen representa una proteína tal y cómo es "vista" por otra molécula.

Los motivos son combinaciones regulares de estructuras secundarias

Las combinaciones particulares de las estructuras secundarias, denominadas motivos o plegamientos, construyen la estructura terciaria de una proteína. En algunos casos, los motivos poseen una topología particular para una función específica. Por ejemplo, el hélice-bucle-hélice es un motivo de unión de Ca^{+2} que se caracteriza por la presencia de ciertos residuos hidrófilos en posiciones invariables en el bucle (fig. 3-6a). Los átomos de oxígeno de los residuos invariables unen un ion calcio mediante enlaces de hidrógeno. Este motivo, también denominado *mano EF*, se encontró en más de 100 proteínas de unión al calcio. En otro motivo frecuente, dedos de cinc, tres estructuras secundarias –una hélice α y dos hebras β con orientación antiparalela– forman un haz digitiforme que se mantiene unido mediante un ion cinc (fig. 3-6 b). Este motivo se encuentra principalmente en las proteínas que se unen al RNA o al DNA.

Muchas proteínas, sobre todo las fibrosas, se asocian mutuamente en oligómeros mediante un tercer motivo, la espiral enrollada. En estas proteínas, cada cadena polipeptídica contiene segmentos de hélice α en el cual los residuos hidrófobos, aunque aparentemente dispuestos al azar, mantienen un patrón regular; una secuencia séptuple repetida. En el heptámero, un residuo hidrófobo –a veces valina, alanina o metionina– se ubica en la posición 1 y un residuo de leucina, en la posición 4. Debido a que las cadenas laterales hidrófilas se extienden desde un lado de la hélice y las cadenas laterales hidrófobas se extienden desde el lado opuesto, la estructura helicoidal general es anfipática. El carácter anfipático de estas hélices α permite que dos, tres o cuatro hélices se enrollen una alrededor de la otra y formen una espiral enrollada; de ahí el nombre de este motivo (fig. 3-6c).

En análisis posteriores de otras proteínas en este y otros capítulos, se verán numerosos motivos adicionales. La presencia del mismo motivo en distintas proteínas con funciones similares indica con claridad que durante la evolución se conservaron estas combinaciones útiles de las estructuras secundarias.



▲ Fig. 3-6. Motivos de la estructura secundaria. (a) Dos hélices conectadas por un bucle corto en una conformación específica constituyen un motivo hélice-bucle-hélice. Este motivo existe en muchas proteínas reguladoras de unión al calcio y de unión al DNA. En las proteínas de unión al calcio, como la calmodulina, los átomos de oxígeno de los residuos de cinco bucles y una molécula de agua forman enlaces iónicos con un ion Ca^{2+}. (b) El motivo de dedo de cinc está presente en muchas proteínas de unión al DNA que ayudan a regular la transcripción. Un ion Zn^{2+} se mantiene entre un par de hebras β (azules) y una hélice α (roja) mediante un par de residuos de cisteína y un par de residuos de histidina. Los dos residuos de cisteína invariables generalmente se encuentran en las posiciones 3 y 6, y los dos residuos de histidina invariables en la posición 20 y 24 en este motivo de 25 residuos. (c) El motivo de espiral enrollada de dos hebras paralelas encontrado en el factor de transcripción Gcn4 se caracteriza por dos hélices α enroscadas una alrededor de la otra. El agrupamiento de hélices se estabiliza por interacciones entre las cadenas laterales hidrófobas (rojas y azules) presentes a intervalos regulares a lo largo de las superficies de las hélices entrelazadas. Cada hélice α exhibe una secuencia séptuple repetida característica con un residuo hidrófobo en las posiciones 1 y 4. (Véase A. Lewit-Bentley y S. Rety, 2000, EF-hand calcium-binding proteins, *Curr Opin Struct Biol* 10:637–643; S.A. Wolfe, L. Nekludova y C.O. Pabo, 2000, DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins, *Ann Rev Biophys Biomol Struct* 29:183–212.)

Hasta la fecha, se han catalogado cientos de motivos y en la actualidad las proteínas se clasifican de acuerdo con ellos.

Los dominios estructurales y funcionales son módulos de estructura terciaria

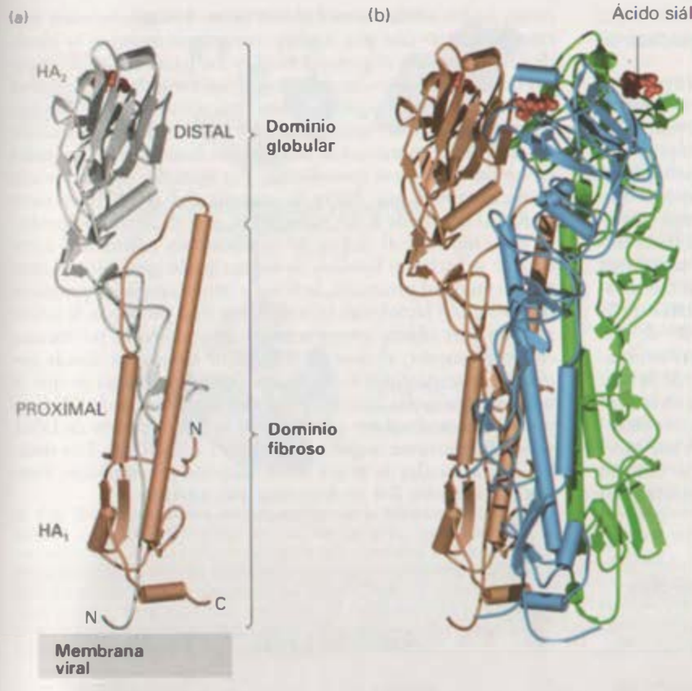
La estructura terciaria de las proteínas de PM mayores de 15.000 está subdividida en diferentes regiones denominadas dominios. Desde el punto de vista estructural, un domino es una región de un polipéptido plegada en forma compacta. En las grandes proteínas se pueden reconocer los dominios en estructuras determinadas mediante cristalografía de rayos X o en imágenes capturadas por microscopia electrónica. Aunque estas regiones se distinguen bien o están físicamente separadas entre sí, están conectadas por segmentos intermediarios de la cadena polipeptídica. Por ejemplo, cada una de las subunidades de la hemaglutinina contiene un dominio globular y un dominio fibroso (fig. 3-7a).

Un dominio estructural está constituido por 100-150 residuos en diversas combinaciones de motivos. A menudo un domino se caracteriza por presentar alguna particularidad estructural interesante: una abundancia inusual de un determinado aminoácido (p. ej., un domino rico en prolina, un dominio acídico), secuencias comunes (conservadas) en muchas proteínas (p. ej., SH3 o región 3 de homología Src) o un motivo particular de estructura secundaria (p. ej., el motivo de dedos de cinc en el dominio de rosquilla).

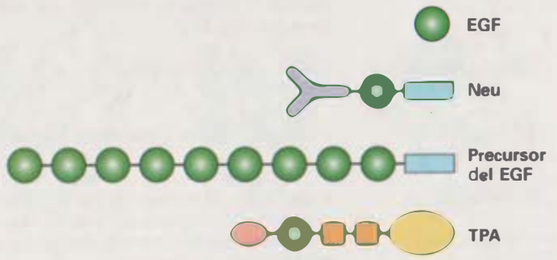
En ocasiones, los dominios están definidos en términos funcionales sobre la base de observaciones de que la actividad de una proteína se localiza en una pequeña región a lo largo de su longitud. Así, una región o regiones particulares de una proteína pueden ser responsables de su actividad catalítica (p. ej., un dominio de cinasa) o de capacidad de unión (p. ej., un dominio de unión al DNA, un dominio de unión a la membrana). Los dominios funcionales se identifican experimentalmente al reducir una proteína a sus fragmentos activos más pequeños con la ayuda de proteasas, enzimas que escinden la cadena principal polipeptídica. Asimismo, se puede someter el DNA que codifica una proteína a mutagénesis, para así eliminar o cambiar los segmentos de la cadena principal de la proteína. Luego se controla la actividad del producto proteico alterado o truncado sintetizado a partir del gen mutado, que sirve como fuente de discernimiento para comprender cuál parte de una proteína es crítica para su función.

La organización de grandes proteínas en múltiples dominios ilustra el principio de que las moléculas complejas se construyen a partir de componentes más simples. Al igual que los motivos de la estructura secundaria, los dominios de la estructura terciaria se incorporan como módulos en diferentes proteínas. En el capítulo 10 consideramos el mecanismo a través del cual los segmentos del gen que corresponde al dominio se mezclaron en el curso de la evolución, dando como resultado su aparición en muchas proteínas. El enfoque modular de la arquitectura de la proteína es particularmente fácil de reconocer en las proteínas grandes, que tienden a ser mosaicos de diferentes dominios, por lo que pueden realizar distintas funciones simultáneas.

El dominio del factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*, EGF) es un ejemplo de un módulo que está presente en varias proteínas (fig. 3-8). El EGF es una hormona peptídica soluble pequeña que se une a las células en el embrión y a la piel y al tejido conectivo en los adultos e induce su división. Se genera por escisión proteolítica entre dominios de EGF repetidos en la proteína precursora de EGF, que queda anclada en la membrana celular por medio de un dominio que atraviesa la membrana. Los módulos de EGF también están presentes en otras proteínas y son liberados por proteólisis; estas proteínas incluyen el activador tisular del plasminógeno (*tissue plasminogen activator*, TPA), una proteasa utilizada para disolver coágulos de sangre en víctimas de ataques cardíacos; la proteína Neu, que interviene en la diferenciación embrionaria; y la proteína Notch, una proteína receptora en la membrana plasmática que participa en procesos de señalización de importancia para el desarrollo (cap. 14). Además del dominio EGF, estas proteínas contienen dominios encontrados en otras proteínas. Por ejemplo, el TPA posee un dominio tripsina, una característica común en las enzimas que degradan proteínas.



◀ Fig. 3-7. Niveles de estructura terciaria y cuaternaria de la hemaglutinina (HA), una proteína de superficie en el virus de la gripe. Esta molécula multimérica larga tiene tres subunidades idénticas, cada una compuesta de dos cadenas polipeptídicas, HA_1 y HA_2. (a) La estructura terciaria de cada subunidad HA constituye el plegamiento de sus hélices y hebras en una estructura compacta que tiene 13,5 nm de longitud y que está dividida en dos dominios. El dominio distal a la membrana está plegado en una conformación globular. El dominio proximal a la membrana tiene una conformación fibrosa con forma de tallo, debido a la alineación de dos hélices α largas (cilindros) de HA_2 con hebras β en HA_1. Giros cortos y bucles más largas, que generalmente están en la superficie de la molécula, conectan las hélices y las hebras en una cadena dada. (b) La estructura cuaternaria de HA se estabiliza por las interacciones laterales entre las hélices largas (cilindros) en los dominios fibrosos de las tres subunidades (amarillo, azul y verde), formando un tronco de resorte enroscado de triple hebra. Cada uno de los dominios distales globulares en HA une el ácido siálico (rojo) en la superficie de las células diana. Al igual que muchas proteínas de membrana, HA contiene varias cadenas de hidratos de carbono (no mostradas) unidas mediante enlaces covalentes.



▲ Fig. 3-8. Esquemas de distintas proteínas que ilustran su naturaleza modular. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) se genera por escisión proteolítica del precursor de una proteína que contiene múltiples dominios EGF (verde) y un dominio que atraviesa la membrana (azul). El dominio EGF también está presente en la proteína Neu y en el activador tisular del plasminógeno (TPA). Estas proteínas también contienen otros dominios ampliamente distribuidos, indicados con forma y color. (Adaptado de I. D. Campbell y P. Bork, 1993, *Curr. Opin. Struc. Biol.* 3:385.)

Las proteínas se asocian en estructuras multiméricas y agrupaciones macromoleculares

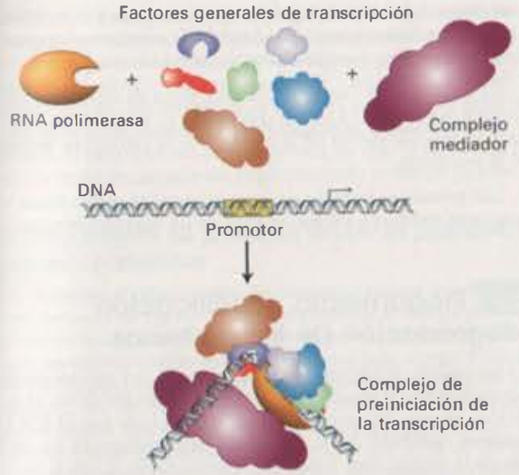
Las proteínas multiméricas constan de dos o más polipéptidos o **subunidades.** Un cuarto nivel de organización estructural, la **estructura cuaternaria**, describe el número (estequiometría) y las posiciones relativas de las subunidades en las proteínas multiméricas. La hemaglutinina, por ejemplo, es un trímero de tres subunidades idénticas que se mantienen unidas mediante enlaces no covalentes (fig. 3-7b). Otras proteínas multiméricas pueden estar compuestas por cualquier número de subunidades idénticas o diferentes. La naturaleza multimérica de muchas proteínas es crítica para los mecanismos que regulan sus funciones. Además, las enzimas de la misma vía pueden estar asociadas como subunidades de una gran proteína multimérica dentro de la célula, incrementando de este modo la eficiencia del funcionamiento de la vía.

El más alto nivel de la estructura de la proteína es la asociación de proteínas para formar asociaciones macromoleculares. Típicamente, tales estructuras son muy grandes, exceden 1 mDa en masa, se aproximan a los 30-300 nm en tamaño y contienen decenas a cientos de cadenas polipeptídicas, así como ácidos nucleicos en algunos casos. Las asociaciones macromoleculares con una función estructural incluyen la cápside que encapsula el genoma viral, y los haces de los filamentos del citoesqueleto que soportan y dan forma a la membrana plasmática. Otras agrupaciones macromoleculares actúan como maquinarias moleculares, llevando a cabo los procesos celulares más complejos al integrar las funciones individuales en un único proceso coordinado. Por ejemplo, la maquinaria transcripcional que inicia la síntesis del RNA mensajero (mRNA) consta de RNA polimerasa, una proteína multimérica en sí misma y al menos 50 componentes adicionales entre los que se incluyen factores de transcripción generales, proteínas de unión al promotor, helicasa y otros complejos proteicos (fig. 3-9). Los factores de transcripción y las proteínas de unión al promotor ubican correctamente una molécula polimerasa en un **promotor**, el sitio de DNA que determina dónde comienza la **transcripción** de un gen específico. Luego de que la helicasa desenrolla la doble hebra de la molécula de DNA, la polimerasa se desplaza a lo largo de la hebra patrón de DNA y simultáneamente sintetiza una hebra de mRNA. Los detalles operacionales de ésta y otras maquinarias complejas listadas en el cuadro 3-1 se describen más adelante.

CUADRO 3-1 Motores moleculares selectos

Motor*	Componentes principales	Localización celular	Función
Replisoma (4)	Helicasa, primasa, DNA polimerasa	Núcleo	Replicación del DNA
Complejo de iniciación de la transcripción (11)	Proteína fijadora de promotor, helicasa, factores generales de transcripción (TF_s), RNA polimerasa, gran complejo mediador de subunidades múltiples.	Núcleo	Síntesis de RNA
Espalmosoma (12)	Pre-mRNA, RNA nucleares pequeños (snRNA), factores proteicos	Núcleo	Eliminación de intrones del mRNA
Complejo del poro nuclear (12)	Nucleoporinas (50-100)	Membrana nuclear	Importación y exportación nuclear
Ribosoma (4)	Proteínas ribosómicas (>50) y cuatro moléculas de rRNA (eucariontes) organizadas en subunidades grandes y pequeñas; asociadas con mRNA y factores proteico (IF_s, EF_s)	Citoplasma/membrana de RE	Síntesis de proteínas
Chaperonina (3)	GroEL, GroES (bacteria)	Citoplasma, mitocondria, retículo endoplasmático	Plegamiento de proteína
Proteasoma (3)	Proteínas "núcleo", proteínas regulatorias (cap)	Citoplasma	Degradación de proteínas
Fotosistema (8)	Complejos captadores de luz (proteínas y pigmentos múltiples), centros de reacción (proteínas multisubunidades con pigmentos y transportadores de electrones asociados)	Membrana tilacoides en los cloroplastos, membrana plasmática de bacterias fotosintéticas	Fotosíntesis (fase inicial)
Cascadas de MAP cinasa (14)	Proteínas plataforma, múltiples proteínas cinasas diferentes	Citoplasma	Transducción de señales
Sarcómero (19)	Filamentos gruesos (miosina), filamentos delgados (actina), líneas Z, titina/nebulina	Citoplasma de células musculares	Contracción

*Los números entre paréntesis indican los capítulos en donde se analizan los diferentes motores.



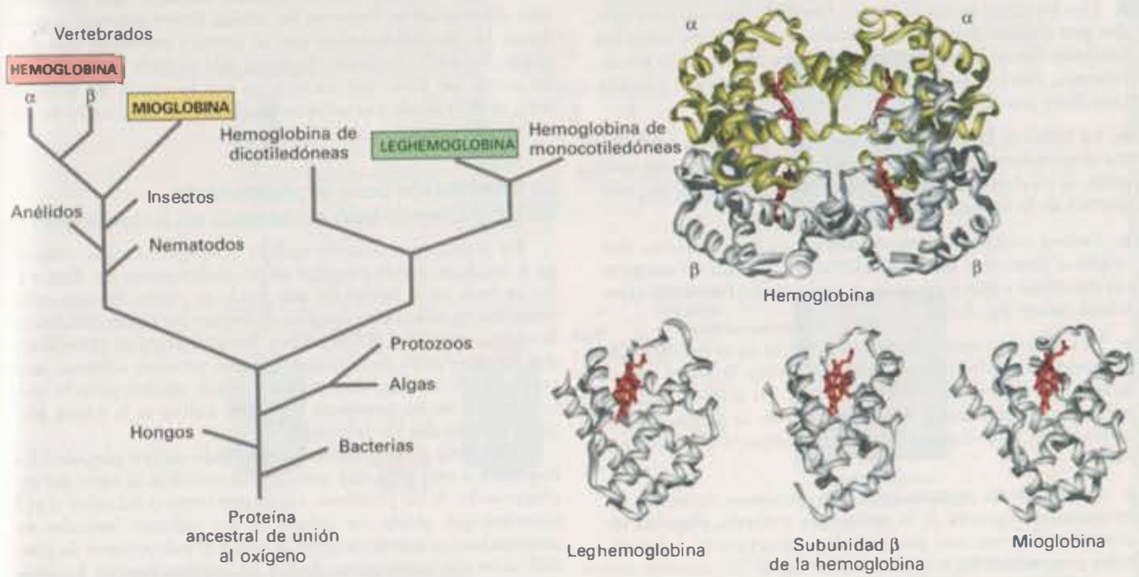
▲ **Fig. 3-9. Maquinaria de iniciación de la transcripción de mRNA.** La RNA polimerasa central, los factores generales de transcripción, un complejo mediador que contiene alrededor de 20 subunidades y otros complejos proteicos no representados aquí se ensamblan en un promotor en el DNA. La polimerasa lleva a cabo la transcripción de DNA; se requieren las proteínas asociadas para la unión inicial de la polimerasa a un promotor específico, iniciando así la transcripción.

Los miembros de las familias de proteínas tienen un antepasado evolutivo en común

Los estudios en la mioglobina y la hemoglobina, las proteínas transportadoras de oxígeno en los músculos y la sangre, respectivamente, proveen evidencia primaria de que la función deriva de la estructura tridimensional, la cual es especificada por la secuencia de aminoácidos. Los análisis por cristalografía de rayos X mostraron que las estructuras tridimensionales de la mioglobina y de las unidades α y β de la hemoglobina son notablemente similares. La secuenciación posterior de las subunidades de la mioglobina y la hemoglobina reveló que a lo largo de toda la estructura primaria de ambas proteínas se encuentran muchos residuos idénticos o químicamente similares en posiciones idénticas.

Comparaciones similares entre otras proteínas confirmaron de manera concluyente la relación entre la secuencia de aminoácidos, la estructura tridimensional y la función de las proteínas. En la actualidad, se emplea este principio para predecir, sobre la base de la comparación de secuencias con proteínas de estructura y función conocidas, la estructura y función de proteínas que no han sido aisladas (cap. 9). La utilización de la comparación de secuencias se ha expandido mucho en los últimos años a medida que se van secuenciando los genomas de más y más organismos.

Esta revolución molecular en la biología durante las últimas décadas del siglo XX también creó un nuevo esquema de clasificación biológica basado en las similitudes y diferencias en las secuencias de aminoácidos de las proteínas. Las pro-



▲ **Fig. 3-10. Evolución de la familia de la proteína globina.** (*Izquierda*). Se cree que una globina monomérica fijadora de oxígeno primitiva es el ancestro de las hemoglobinas de la sangre, las mioglobinas de los músculos y las leghemoglobinas vegetales de hoy en día. Las comparaciones de secuencia han revelado que la evolución de las proteínas globinas es paralela en los animales y en las plantas. Las mayores bifurcaciones ocurrieron con la divergencia de las globinas vegetales respecto de las globinas animales y de la mioglobina respecto de la hemoglobina. La duplicación de genes ulterior dio origen a las subunidades α y β de la hemoglobina. (*Derecha*) La hemoglobina es un tetrámero de dos subunidades α y dos β. La similitud estructural de estas subunidades con la leghemoglobina y la mioglobina, las cuales son monómeros, es evidente. Un grupo hemo (rojo) asociado en forma no covalente con cada polipéptido de globina es la estructura real que une al oxígeno en estas proteínas. ([Izquierda] Adaptado de R. C. Hardison, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5675.)

teínas que tienen un ancestro común son denominadas *homólogas*. La evidencia principal de la homología entre proteínas, y por ende de su ancestro común, es la similitud en sus secuencias o estructuras. Por lo tanto, podemos describir las proteínas homólogas como pertenecientes a una "familia" y rastrear su linaje por comparación de sus secuencias. Las estructuras plegadas tridimensionales de proteínas homólogas son similares incluso si partes de su estructura primaria muestran poca evidencia de homología.

El parentesco entre proteínas homólogas se visualiza más fácilmente a través de un diagrama de árbol basado en el análisis de secuencias. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de las globinas de bacterias, plantas y animales sugieren que evolucionaron a partir de una proteína monomérica ancestral fijadora de oxígeno (fig. 3-10). Con el paso del tiempo, el gen de esta proteína ancestral se modificó lentamente, divergiendo al principio en linajes que condujeron a las globinas vegetales y animales. Cambios posteriores dieron origen a la mioglobina, una proteína monomérica almacenadora de oxígeno de los músculos, y a las subunidades α y β de la molécula de hemoglobina tetramérica (α_2 y β_2) del sistema circulatorio.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 3.1

Estructura jerárquica de las proteínas

- Una proteína es un polímero lineal de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Diversas interacciones entre los aminoácidos en la secuencia lineal, en su mayor parte no covalentes, estabilizan una estructura tridimensional plegada específica (conformación) para cada proteína.
- La hélice α, la hebra y la hoja β, y el giro son los elementos preponderantes de la estructura secundaria de una proteína, la cual es estabilizada por enlaces de hidrógeno entre átomos de la cadena principal peptídica.
- Ciertas combinaciones de estructuras secundarias dan origen a diferentes motivos, que se encuentran en numerosas proteínas y que a menudo se asocian con funciones específicas (véase fig. 3-6).
- La estructura terciaria de una proteína es el resultado de las interacciones hidrófobas entre los grupos laterales no polares y los enlaces de hidrógeno entre los grupos laterales polares que estabilizan el plegamiento de la estructura secundaria en una disposición global compacta o conformación.
- A menudo las proteínas grandes contienen dominios diferenciados, regiones de la estructura terciaria plegadas independientemente con propiedades estructurales o funcionales características, o ambas (véase fig. 3-7).
- La incorporación de dominios como módulos en diferentes proteínas en el curso de la evolución ha generado diversidad en la estructura y función de las proteínas.
- La estructura cuaternaria incluye la cantidad y la organización de subunidades en proteínas multiméricas.
- Las células contienen grandes ensamblajes macromoleculares en los cuales todos los participantes necesarios de los procesos celulares complejos (p. ej., síntesis de DNA, RNA y proteínas; fotosíntesis; transducción de señales) se integran para formar maquinarias moleculares (véase cuadro 3-1).
- La secuencia de una proteína determina su estructura tridimensional, la cual a su vez determina su función. En resumen, la función deriva de la estructura; la estructura deriva de la secuencia.
- Las proteínas homólogas, con secuencias, estructuras y funciones similares, evolucionaron de un ancestro común.

3.2 Plegamiento, modificación y degradación de las proteínas

Una cadena polipeptídica es sintetizada por un complejo proceso llamado traducción en el cual el ensamble de los aminoácidos en una secuencia particular es dictado por el RNA mensajero (mRNA). En el capítulo 4 se considerarán los detalles de la traducción. Aquí describimos cómo la célula promueve el plegamiento apropiado de la cadena polipeptídica naciente y, en muchos casos, modifica los residuos o escinde la cadena principal polipeptídica para generar la proteína final. Además, la célula posee procesos de verificación de errores que eliminan las proteínas sintetizadas o plegadas de manera incorrecta. Las proteínas plegadas incorrectamente suelen carecer de actividad biológica y, en algunas instancias, pueden estar asociadas con enfermedades. El plegamiento erróneo de las proteínas se suprime mediante dos mecanismos diferenciados. Primero, las células tienen sistemas que reducen las posibilidades de que se formen proteínas mal plegadas. Segundo, cualquier proteína mal plegada que se forme, así como las proteínas citosólicas que la célula no necesita más, es degradada por un sistema celular especializado de desecho de basura.

La información para el plegamiento de las proteínas está codificada en la secuencia

En principio, cualquier cadena polipeptídica que contenga *n* residuos puede plegarse en 8^n conformaciones. Este valor se basa en el hecho de que desde el punto de vista estereoquímico, sólo ocho ángulos de enlace están permitidos en la cadena principal polipeptídica. Sin embargo, en general todas las moléculas de cualquier especie proteica adoptan una conformación única, denominada *estado nativo*; para la vasta mayoría de las proteínas, el estado nativo es la forma plegada más estable de la molécula.

¿Que guía a las proteínas a su estado nativo plegado? La respuesta a esta pregunta proviene de estudios in vitro del replegamiento de las proteínas. La energía térmica del calor, el pH extremo que altera las cargas en las cadenas laterales de aminoácidos, y químicos como la urea o el hidrocloruro de guanidina en concentraciones de 6-8 M, pueden romper las interacciones débiles no covalentes que estabilizan la conformación nativa de una proteína. La desnaturalización resultante de tales tratamientos hace que una proteína pierda tanto su conformación nativa como su actividad biológica.

Muchas proteínas que están completamente desplegadas en urea 8 M y β-mercaptoetanol (el cual reduce los enlaces disulfuro) se *renaturalizan* (repliegan) espontáneamente a sus estados nativos cuando se eliminan los reactivos desnaturalizantes mediante diálisis. Debido a que no se requiere ningún cofactor u otras proteínas, el plegamiento de proteínas in vitro es un proceso autodirigido. En otras palabras, la secuencia primaria de la proteína debe contener suficiente información para dirigir un replegamiento correcto. La similitud observada en las estructuras tridimensionales de las proteínas con secuencias similares de aminoácidos, destacada en la sección 3.1, proporcionó otra evidencia de que la secuencia primaria también determina el plegamiento proteico in vivo.

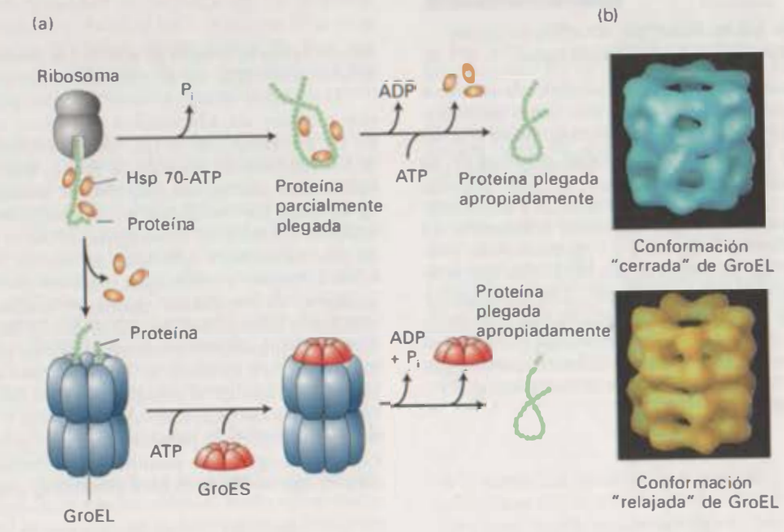
El plegamiento de proteínas in vivo es promovido por las chaperonas

Aunque el plegamiento de proteínas ocurre in vitro, sólo una minoría de las moléculas desplegadas se pliega por completo en la conformación nativa en pocos minutos. Es obvio que las células requieren un mecanismo más rápido y eficiente para plegar las proteínas en sus formas correctas; de otra manera, las células gastarían mucha energía en la síntesis de proteínas no funcionales y en la degradación de proteínas mal plegadas o no plegadas. En efecto, más del 95% de las proteínas presentes dentro de las células han mostrado estar en su conformación nativa, a pesar de las concentraciones elevadas de proteínas (200-300 mg/mL), que favorecen la precipitación de proteínas in vitro.

La explicación de la extraordinaria eficiencia de la célula para promover el plegamiento de las proteínas reside probablemente en las chaperonas, una clase de proteínas halladas en todos los organismos desde las bacterias hasta los seres humanos. Las chaperonas se localizan en todos los compartimientos celulares, se unen a un amplio espectro de proteínas y participan en el mecanismo celular general de plegamiento de las proteínas. Se reconocen dos familias generales de chaperonas:

- *Chaperonas moleculares*, que se unen y estabilizan a proteínas desplegadas o parcialmente plegadas, evitando así que estas proteínas se agrupen y sean degradadas.
- *Chaperoninas*, que facilitan directamente el plegado de las proteínas.

Las chaperonas moleculares integran la familia de las Hsp70 y sus homólogas: las Hsp70 en el citosol y la matriz mitocondrial, BiP en el retículo endoplasmático y DnaK en las bacterias. La Hsp70 y sus homólogas, que se identificaron por primera vez por su rápida aparición luego de un estrés celular provocado por shock térmico, son las principales chaperonas en todos los organismos. (Hsc70 es un homólogo constitutivamente expresado de la Hsp70.) Cuando se encuentran unidas al ATP, las proteínas del tipo Hsp70 asumen una forma abierta en la que un bolsillo hidrófobo expuesto se une a regiones hidrófobas expuestas de la proteína diana desplegada. La hidrólisis del ATP unido hace que las chaperonas moleculares



▲ Fig. 3-11. Plegamiento de proteínas mediado por chaperonas y chaperoninas. (a) Muchas proteínas se pliegan en su estructura tridimensional apropiada con la asistencia de proteínas de tipo Hsp70 (*arriba*). Estas chaperonas moleculares se fijan en forma transitoria a un polipéptido naciente a medida que emerge de un ribosoma. El plegamiento apropiado de otras proteínas (*abajo*) depende de chaperoninas, como la GroEL de los procariontes, un complejo con forma de barril hueco compuesto de 14 subunidades idénticas de PM 60.000 dispuestas en dos anillos apilados. Un extremo de GroEL está bloqueado transitoriamente por la cochaperonina GroES, un ensamblaje de subunidades de PM 10.000. (b) En ausencia de ATP o en presencia de ADP, GroEL existe en un estado de conformación "cerrada" en forma hermética que une las proteínas plegadas parcialmente o mal plegadas. La unión con ATP modifica a GroEL, que adopta un estado más abierto o "relajado" y libera la proteína plegada. Para los detalles véase el texto. (Parte (b) de A. Roseman et al., 1996, *Cell* 87:241; cortesía de H. Saibil.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación focalizada: Plegamiento mediado por chaperonas

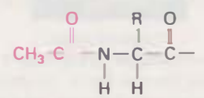
adopten una forma cerrada en la cual una proteína diana puede plegarse. El intercambio de ATP por ADP libera la proteína diana (fig. 3-11a, *arriba*). Este ciclo es acelerado por la cochaperona Hsp40 en las eucariontes. En las bacterias, una proteína adicional llamada GrpE también interactúa con DnaK, promoviendo el intercambio de ATP por la cochaperona bacterial DnaJ y posiblemente su disociación. Se piensa que las chaperonas moleculares unen todas las cadenas polipeptídicas nacientes a medida que son sintetizadas en los ribosomas. En las bacterias, el 85% de las proteínas son liberadas de sus chaperonas y proceden a plegarse normalmente; un porcentaje aún más alto de proteínas en las eucariontes sigue este camino.

El plegamiento apropiado de una gran diversidad de proteínas recientemente sintetizadas o translocadas requiere también la asistencia de las chaperonas. Estos enormes ensamblajes moleculares cilíndricos se forman a partir de dos anillos de oligómeros. La chaperonina eucarionte *TriC* se compone de ocho subunidades por anillo. En la chaperonina bacteriana, mitocondrial y del cloroplasto, conocida como *GroEL*, cada anillo contiene siete subunidades idénticas (fig. 3-11b). El mecanismo de plegamiento GroEL, que es mejor comprendido que el plegamiento mediado por TriC, sirve como modelo general (fig. 3-11a, *abajo*). En las bacterias, un polipéptido parcialmente plegado o mal plegado se inserta en la cavidad de GroEL, donde se une a la pared interna y se pliega en su conformación nativa. En un paso dependiente de ATP, GroEL sufre un cambio conformacional y libera la proteína plegada, un proceso asistido por una cochaperonina, GroES, que cubre los extremos de GroEL.

Muchas proteínas experimentan modificaciones químicas de los residuos de aminoácidos

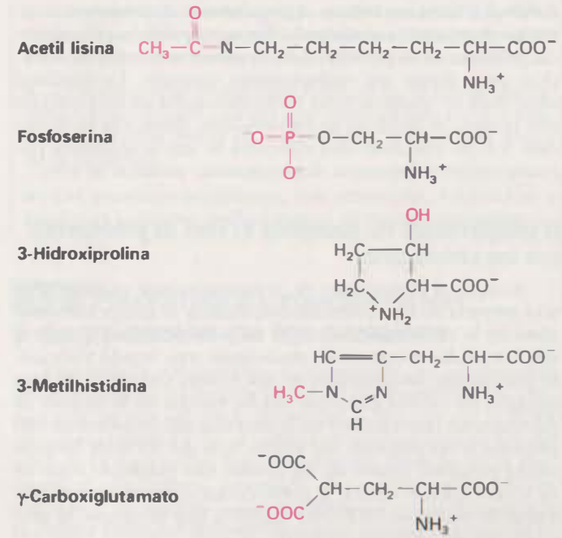
Casi toda proteína en una célula es modificada químicamente luego de su síntesis en un ribosoma. Estas modificaciones, que pueden alterar la actividad, la vida media o la localización celular de las proteínas, implican la unión de un grupo químico a los grupos libres $-NH_2$ o $-COOH$ al extremo de una proteína o a un grupo reactivo de la cadena lateral en un residuo interno. Aunque las células utilizan los 20 aminoácidos mostrados en la figura 2-13 para sintetizar proteínas, los análisis de las proteínas celulares revelan que contienen más de 100 aminoácidos diferentes. Las modificaciones químicas luego de la síntesis dan cuenta de esta diferencia.

La *acetilación*, la adición de un grupo acetilo (CH_3CO) al grupo amino del residuo N-terminal, es la forma más común de modificación química que afecta estimativamente al 80% de todas las proteínas:



N-terminal acetilado

Esta modificación puede desempeñar un papel importante en el control de la vida media de las proteínas dentro de las células, dado que las proteínas no acetiladas son degradadas rápidamente por las proteasas intracelulares. Los residuos ubicados en el extremo terminal de algunas proteínas de membrana o cerca de él son modificados químicamente por la adición de grupos largos semejantes a lípidos. La fijación de estas "colas" hidrófobas, cuya función es anclar las proteínas a la bicapa lipídica, constituye una de las formas por las cuales las células restringen ciertas proteínas a las membranas (cap. 5).



▲ Fig. 3-12. Modificaciones comunes de los residuos de aminoácidos internos que se encuentran en las proteínas. Estos residuos modificados y muchos otros están formados por adición de varios grupos químicos (rojo) a las cadenas laterales de aminoácidos después de la síntesis de una cadena polipeptídica.

Los grupos acetilo y otros diversos grupos químicos pueden también ser adicionados a residuos internos específicos en las proteínas (fig. 3-12). Una importante modificación es la *fosforilación* de residuos de serina, treonina, tirosina e histidina. Hay numerosos ejemplos de proteínas cuya actividad es regulada por fosforilación y desfosforilación reversible. Las cadenas laterales de asparagina, serina y treonina son sitios de *glucosilación*, la adhesión de cadenas de hidratos de carbono lineales y ramificados. Muchas proteínas secretadas y proteínas de membrana contienen residuos glucosilados; la síntesis de tales proteínas se describe en los capítulos 16 y 17. Otras modificaciones postranslacionales encontradas en proteínas selectas incluyen la *hidroxilación* de los residuos de prolina y lisina en el colágeno, la *metilación* de residuos de histidina en los receptores de membrana y la *γ-carboxilación* del glutamato en la protrombina, un factor coagulante esencial de la sangre. Una modificación especial, analizada brevemente, marca las proteínas citosólicas para la degradación.

Diversos segmentos peptídicos de algunas proteínas son eliminados luego de la síntesis

Después de su síntesis, algunas proteínas sufren modificaciones irreversibles que no conllevan cambios en los residuos individuales de los aminoácidos. Este tipo de alteración postraduccional se denomina a veces *procesamiento*. La forma más común es la escisión enzimática del enlace de una cadena principal peptídica mediante proteasas, que determina la eliminación de residuos del C o N terminales de una cadena polipeptídica. La escisión proteolítica es un mecanismo común para activar enzimas que participan en la coagulación de la sangre, la digestión y la muerte celular programada (cap. 22). La proteólisis también genera hormonas peptídicas activas, como EGF e insulina, a partir de polipéptidos precursores de mayor tamaño.

Un tipo de procesamiento inusual y raro, denominado *autoempalme de proteínas*, tiene lugar en bacterias y algunos eucariontes. Este proceso es análogo a la edición de películas; un segmento interno de un polipéptido es eliminado y los extremos del polipéptido se vuelven a unir. A diferencia del procesamiento proteolítico, el autoempalme proteico es un proceso autocatalítico que se produce por sí solo, sin la participación de enzimas. El péptido escindido parece eliminarse a sí mismo de la proteína por un mecanismo similar al usado en el procesamiento de algunas moléculas de RNA (cap. 12). En las células de los vertebrados, el procesamiento de algunas proteínas incluye la autoescisión, pero está ausente el paso siguiente de ligación. Una de tales proteínas es la Hedgehog, una molécula señalizadora unida a membrana crítica para diversos procesos de desarrollo (cap. 15).

La ubicuitina marca a las proteínas citosólicas para su degradación en los proteasomas

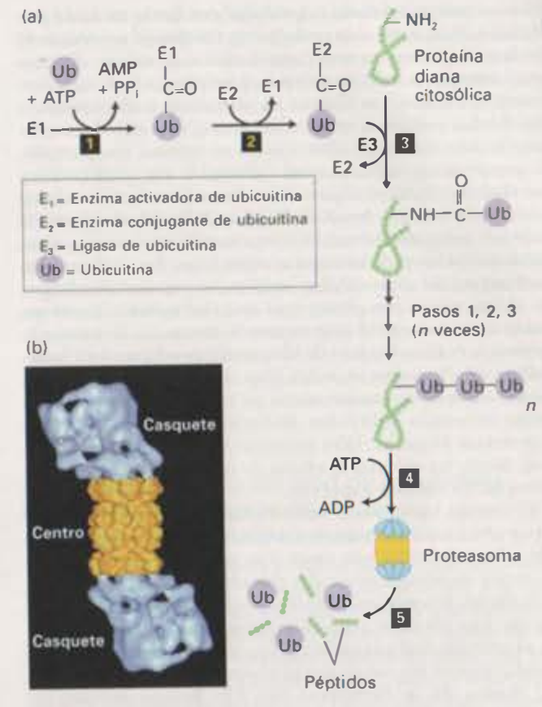
En adición a las modificaciones químicas y al procesamiento, la actividad de una proteína celular depende de la cantidad presente, la cual refleja el balance entre su velocidad de síntesis y su velocidad de degradación en la célula. En capítulos posteriores se abordan las numerosas formas en que las células regulan la síntesis de proteínas. En esta sección examinamos la degradación de las proteínas concentrándonos en las principales vías para degradar las proteínas citosólicas.

La duración de la vida de las proteínas intracelulares varía desde apenas unos minutos para las ciclinas mitóticas, que ayudan a regular el pasaje por la mitosis, hasta tanto como la edad de un organismo para las proteínas del cristalino del ojo. Las células eucariontes poseen varias vías proteolíticas intracelulares para degradar proteínas mal plegadas o desnaturalizadas, proteínas normales cuya concentración debe disminuir y proteínas extracelulares captadas por la célula. Una de las principales vías intracelulares es la degradación por enzimas dentro de los lisosomas, orgánulos limitados por membrana cuyo interior ácido es llenado con enzimas hidrolíticas. La degradación lisosómica está dirigida principalmente a las proteínas extracelulares tomadas por la célula y a los orgánulos envejecidos o defectuosos de la célula (véase fig. 5-20).

Los mecanismos citosólicos para la degradación de proteínas se diferencian de la vía lisosómica. Entre estos mecanismos, el principal es una vía que incluye las modificaciones químicas de la cadena lateral lisina por la adición de ubicuitina, un polipéptido de 76 residuos, seguido por la degradación de la proteína marcada por la ubicuitina. La ubicuitinación es un proceso de tres pasos (fig. 3-13a):

- Activación de la *enzima activadora de ubicuitina* (E1) por adición de una molécula de ubicuitina, una reacción que requiere ATP.
- Transferencia de esta molécula de ubicuitina a un residuo de cisteína en la *enzima combinadora de ubicuitina* (E2).
- Formación de un enlace peptídico entre la molécula de ubicuitina unida a la E2 y un residuo de lisina en la proteína diana, una reacción catalizada por la *ligasa de ubicuitina* (E3).

Este proceso se repite muchas veces, con cada molécula de ubicuitina añadida a la predecesora. La cadena poliubicuitina resultante es reconocida por un proteasoma, otra de las maquinarias moleculares de la célula (fig. 3-13b). Los numerosos proteasomas dispersos a través del citosol celular escinden de manera proteolítica las proteínas marcadas con ubicuitina en un proceso dependiente de ATP que produce moléculas peptídicas cortas (de 7 a 8 residuos) y moléculas de ubicuitina intactas.



▲ Fig. 3-13. Vía proteolítica mediada por ubicuitina. (a) La enzima E1 es activada por la adhesión de una molécula de ubicuitina (Ub) (paso 1) y luego se transfiere esta molécula de Ub a la E2 (paso 2). La ligasa ubicuitina (E3) transfiere la molécula Ub unida en E2 al $-NH_2$ de la cadena lateral de un residuo de lisina en una proteína diana (paso 3). Se añaden moléculas adicionales de Ub a la proteína diana repitiendo los pasos 1-3, formando una cadena de poliubicuitina que dirige a la proteína marcada a un proteasoma (paso 4). Dentro de este gran complejo, se escinde la proteína en numerosos fragmentos peptídicos pequeños (paso 5). (b) La imagen generada por computadora revela que un proteasoma tiene una estructura cilíndrica con un casquete en cada extremo de una región central. La proteólisis de las proteínas marcadas con ubicuitina ocurre a lo largo de la pared interna del centro. (Parte (b) de W. Baumeister et al., 1998, *Cell* 92:357; cortesía de W. Baumeister.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación general: Ciclo de vida de una proteína

Las proteínas celulares degradadas por la vía mediada por ubicuitina caen dentro de una de dos categorías generales: 1) proteínas citosólicas nativas cuya duración de vida es estrictamente controlada y 2) proteínas que se pliegan erróneamente durante el curso de su síntesis en el retículo endoplasmático (RE). Ambas contienen secuencias reconocidas por el complejo enzimático fijador de ubicuitina. Las ciclinas, por ejemplo, son proteínas citosólicas cuyas cantidades son estrictamente controladas durante el ciclo celular. Estas proteínas contienen la secuencia interna Arg-X-X-Leu-Gly-X-Ile-Gly-Asp/Asn (X puede ser cualquier aminoácido), reconocida por complejos enzimáticos fijadores de ubicuitina específicos. En un momento determinado del ciclo celular, cada ciclina es fosforilada por una ciclina cinasa. Se piensa que esta fosforilación causa un cambio conformacional que expone la secuencia de reconocimiento a la enzima fijadora de ubicuitina, conduciendo a la degradación de la ciclina marcada (cap. 21). Asimismo, el plegamiento erróneo de proteínas en el retículo endoplasmático expone secuencias hidrófobas normalmente ocultas dentro de las proteínas plegadas. Tales proteínas son transportadas al citosol, donde las enzimas fijadoras de ubicuitina reconocen las secuencias hidrófobas expuestas.

El sistema inmunitario también hace uso de la vía mediada por ubicuitina en respuesta a células autoalteradas, sobre todo a las infectadas por virus. Las proteínas virales dentro del citosol de células infectadas son ubicuitinadas y luego degradadas en proteasomas especialmente diseñados para esta función. Los péptidos antigénicos resultantes son transportados al retículo endoplasmático, donde se unen a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I dentro de la membrana del RE. Posteriormente, los complejos péptidos-CMH se desplazan a la membrana celular donde los péptidos antigénicos pueden ser reconocidos por los linfocitos T citotóxicos, que median la destrucción de las células infectadas.

Las proteasas digestivas degradan a las proteínas dietarias

La principal vía extracelular para la degradación de proteínas es el sistema de las proteasas digestivas que descomponen las proteínas ingeridas en péptidos y aminoácidos en el tubo digestivo. Tres clases de proteasas participan en la digestión. Las *endoproteasas* atacan enlaces peptídicos específicos dentro de una cadena polipeptídica. Las principales endoproteasas son la pepsina, que escinde preferentemente la cadena peptídica en sitios adyacentes a los residuos de fenilalanina y leucina, y la tripsina y quimiotripsina, que escinden la cadena peptídica en sitios adyacentes a residuos básicos y aromáticos. Las *exopeptidasas* eliminan secuencialmente los residuos de los dominios N-terminal (aminopeptidasas) o C-terminal (carboxipeptidasas) de una proteína. Las *peptidasas* parten los oligopéptidos que contienen cerca de 20 aminoácidos en di- y tripéptidos y aminoácidos individuales. Luego estas moléculas pequeñas se transportan a través del intestino hasta el torrente sanguíneo.

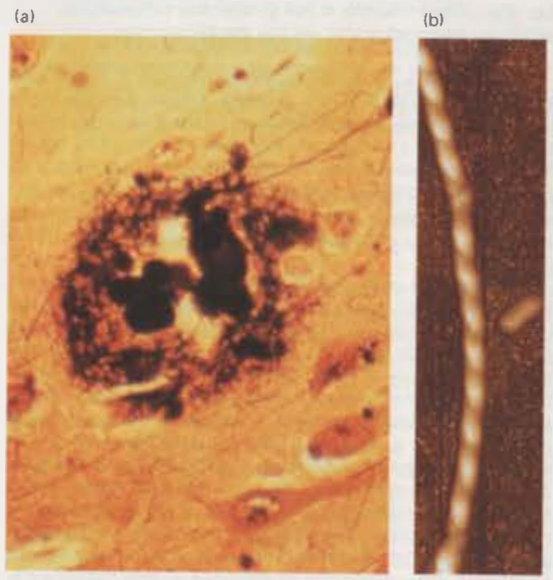
Para proteger a la célula de su propia degradación, las endoproteasas y las carboxipeptidasas se sintetizan y secretan como formas inactivas (cimógenos): la pepsina por células que tapizan el estómago; las otras por células pancreáticas. La escisión proteolítica de los cimógenos dentro de la luz gástrica o intestinal produce las enzimas activas. Las células del epitelio intestinal producen aminopeptidasas y di- y tripeptidasas.

Las proteínas alternativamente plegadas están implicadas en enfermedades de evolución lenta

MEDICINA

Como se explicó, cada especie de proteína comúnmente se pliega en una conformación única energéticamente favorable, especificada por su secuencia de aminoácidos. Sin embargo, evidencia reciente sugiere que una proteína se puede plegar en una estructura tridimensional alternativa como resultado de mutaciones, modificaciones postraduccionales inapropiadas u otras razones aún no identificadas. Tal "plegamiento erróneo" no sólo conduce a una pérdida de las funciones normales de la proteína sino que también la marca para la degradación proteolítica. La acumulación subsecuente de fragmentos proteolíticos contribuye a ciertas enfermedades degenerativas caracterizadas por la presencia de placas proteicas insolubles en distintos órganos, incluidos el hígado y el cerebro.

Algunas enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson en los seres humanos y la encefalopatía espongiforme (la enfermedad



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 3-14 La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la formación de placas insolubles compuestas de proteína amiloide.** (a) Con baja resolución, una placa amiloide en el cerebro de un paciente con Alzheimer aparece como un cúmulo de filamentos. (b) En el microscopio electrónico se revela la estructura regular de los filamentos de las placas. La proteólisis de la proteína precursora de amiloide que ocurre naturalmente produce un fragmento corto, llamado proteína β-amiloide, que por razones desconocidas cambia de una conformación α-helicoidal a una β-laminar. Esta estructura alternativa se agrega en filamentos (amiloides) altamente estables hallados en las placas. Cambios patológicos similares en otras proteínas causan otras enfermedades degenerativas. (Cortesía de K. Kosik.)

de las "vacas locas") en vacas y ovejas, se distinguen por la formación de placas de cúmulos filamentosos en un cerebro en deterioro (fig. 3-14). Los *filamentos amiloides* que componen estas estructuras derivan de abundantes proteínas naturales, como la proteína precursora de amiloide, inmersa en la membrana plasmática, la proteína Tau, una proteína fijadora de microtúbulos, y la proteína prion, una proteína "infecciosa" cuya herencia obedece a la genética mendeliana. Influidas por causas desconocidas, estas proteínas que contienen hélices α o sus fragmentos proteolíticos se pliegan en estructuras alternativas que contienen hojas β, que se polimerizan para formar filamentos muy estables. Aún es poco claro si los depósitos extracelulares de estos filamentos o las proteínas solubles plegadas alternativamente son tóxicos para la célula.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 3.2

Plegamiento, modificación y degradación de las proteínas

- La secuencia de aminoácidos de una proteína determina su plegamiento en una conformación tridimensional específica, el estado nativo.
- El plegamiento de proteínas in vivo requiere la asistencia de chaperonas moleculares (proteínas Hsp70), que se unen a los polipéptidos nacientes que emergen de los ribosomas e impiden su plegamiento erróneo (véase fig. 3-11). Las chaperoninas, grandes complejos de proteínas similares a Hsp60, cubren algunas proteínas parcialmente plegadas o mal plegadas en una cavidad semejante a un barril, proporcionándoles tiempo adicional para que alcancen un plegamiento correcto.
- Después de la síntesis, la mayoría de las proteínas se modifican por la adición de diversos grupos químicos a los residuos de aminoácidos. Estas modificaciones, que alteran la estructura y función de las proteínas, incluyen la acetilación, la hidroxilación, la glucosilación y la fosforilación.
- La duración de la vida de una proteína intracelular es determinada en gran parte por su susceptibilidad a la degradación proteolítica por diversas vías.
- Las proteínas virales que se producen dentro de las células infectadas, las proteínas citosólicas normales y las proteínas mal plegadas se marcan para la destrucción mediante la adición covalente de una cadena de poliubicuitina y luego se degradan dentro de los proteasomas, grandes complejos cilíndricos con múltiples proteasas en su interior (véase fig. 3-13).
- Algunas enfermedades neurodegenerativas son causadas por agregados de proteínas que están establemente plegadas en una conformación alternativa.

3.3 Las enzimas y el trabajo químico de las células

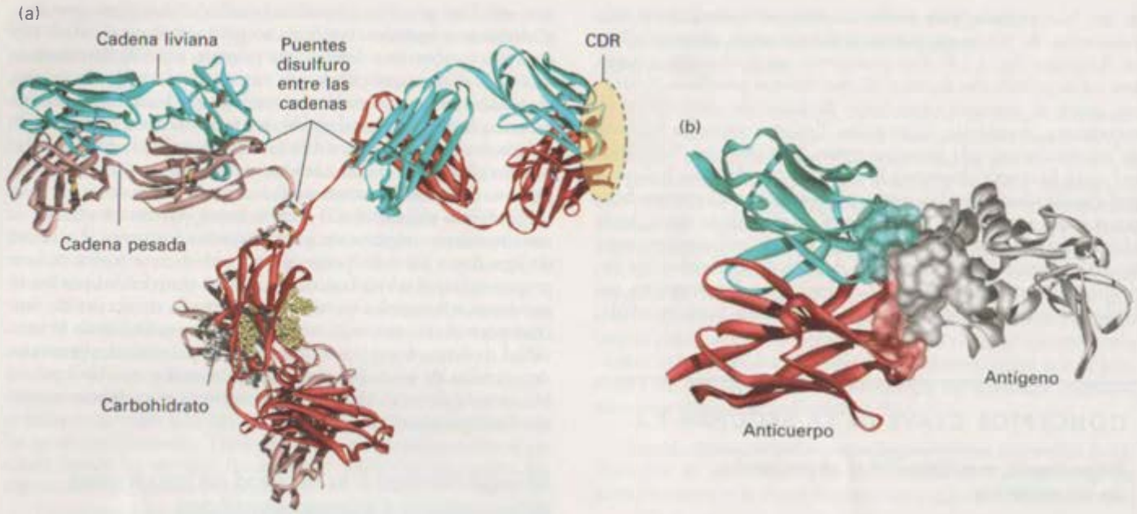
Las proteínas están diseñadas para unirse a toda molécula concebible, desde iones simples y metabolitos pequeños (azúcares, ácidos grasos) hasta grandes moléculas complejas así como otras proteínas y ácidos nucleicos. En efecto, la función de casi todas las proteínas depende de su habilidad para unir otras moléculas, o ligandos, con un alto grado de especificidad. Por ejemplo, una enzima debe unirse primero específicamente a su molécula diana, que puede ser una molécula pequeña (p. ej., glucosa) o una macromolécula, antes de que pueda ejecutar una tarea específica. De igual modo, los muchos tipos diferentes de receptores de hormonas sobre la superficie de las células exhiben un alto grado de sensibilidad y discriminación para sus ligandos. Como analizaremos en el capítulo 11, la unión de ciertas proteínas reguladoras a secuencias específicas en el DNA es un mecanismo importante para controlar los genes. La unión de ligandos a menudo provoca un cambio en la forma de una proteína. Los cambios conformacionales provocados por los ligandos son integrales para los mecanismos de acción de muchas proteínas y son importantes para la regulación de la actividad de éstas. Luego de considerar las propiedades generales de la unión de proteínas y ligandos, veremos más de cerca la forma en que están diseñadas las enzimas para funcionar como los "químicos" de la célula.

La especificidad y la afinidad de las uniones entre proteína y ligando dependen de la complementariedad molecular

Dos propiedades de una proteína caracterizan sus interacciones con los ligandos. La *especificidad* se refiere a la capacidad de una proteína de unir una molécula con preferencia a otra molécula. La *afinidad* se refiere a la fuerza de esta unión. La K_D para un complejo proteína–ligando, que es la inversa de la constante de equilibrio K_{eq} para la reacción de unión, es la medida cuantitativa de afinidad más frecuente (cap. 2). Mientras más fuerte sea la interacción entre una proteína y el ligando, más bajo será el valor de K_D. Tanto la especificidad como la afinidad de una proteína por un ligando dependen de la estructura del sitio de unión del ligando, diseñado para coincidir con su contrapartida como un molde. Para que tengan lugar interacciones de alta afinidad y alta especificidad, la forma y la superficie química del lugar de unión deben ser complementarias a la molécula del ligando, una propiedad denominada complementariedad molecular.

La capacidad de las proteínas para distinguir moléculas diferentes está quizá más desarrollada en las proteínas de la sangre denominadas anticuerpos. Los animales producen anticuerpos en respuesta a los antígenos, como los agentes infecciosos (p. ej., una bacteria o un virus) y ciertas sustancias extrañas (p. ej., proteínas o polisacáridos del polen). La presencia de un antígeno induce al organismo a fabricar gran cantidad de distintos anticuerpos proteicos, cada uno de los cuales puede unirse a una región levemente diferente, o epítopo, del antígeno. Los anticuerpos actúan como sensores específicos para los antígenos, formando complejos de anticuerpos y antígenos que inician una cascada de reacciones protectoras en las células del sistema inmune.

Todos los anticuerpos son moléculas con forma de Y que se generan a partir de dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas livianas idénticas (fig. 3-15a). Cada brazo de una molécula de anticuerpo contiene una cadena liviana única unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro. Cerca del extremo de cada brazo hay seis bucles altamente variables, llamados *regiones determinantes de complementariedad* (CDR), que forman los sitios de unión con el antígeno. Las secuencias de los seis bucles son muy variables entre los anticuerpos, haciéndolos específicos para distintos antígenos. Las interacciones entre un anticuerpo y un epítopo de un antígeno son comple-



▲ Fig. 3-15. Estructura de un anticuerpo e interacciones anticuerpo–antígeno. (a) Modelo de cintas de un anticuerpo. Cada molécula de anticuerpo está compuesta de dos cadenas pesadas idénticas (rojas) y dos cadenas livianas idénticas (azules) unidas en forma covalente por enlaces disulfuro. b) Calce de mano en guante entre un anticuerpo y un epítopo sobre su antígeno; en este caso, lisozima de clara de huevo de gallina. Las regiones donde las dos moléculas hacen contacto se muestran como superficies. El anticuerpo contacta el antígeno con residuos de todas sus regiones determinantes de la complementariedad (CDR). En esta vista, la complementariedad del antígeno y el anticuerpo es especialmente apreciable donde los "dedos" que se extienden desde la superficie del antígeno están opuestos a las "hendiduras" en la superficie del anticuerpo.

mentarias en todos los casos; es decir, la superficie del sitio de unión del antígeno en el anticuerpo coincide físicamente con el correspondiente epítopo como un guante (fig. 3-15b). El contacto íntimo entre estas dos superficies, estabilizado por numerosos enlaces no covalentes, es responsable de la exquisita especificidad de unión exhibida por un anticuerpo.

La especificidad de los anticuerpos es tan precisa que pueden distinguir entre las células de los miembros individuales de una especie y en algunos casos pueden distinguir entre proteínas que sólo difieren en un único aminoácido. Debido a su especificidad y la facilidad con la que pueden ser producidos, los anticuerpos son reactivos utilísimos en muchos de los experimentos que se verán en los capítulos siguientes.

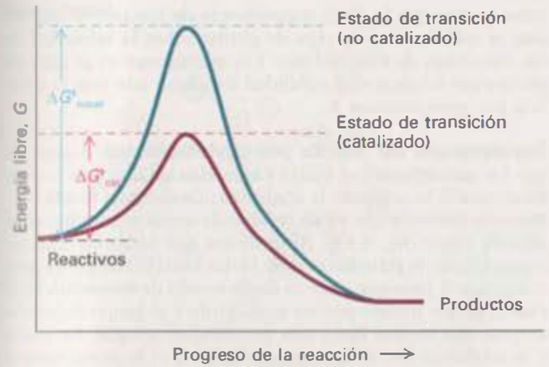
Las enzimas son catalizadores altamente eficientes y específicos

A diferencia de los anticuerpos, que unen y simplemente presentan sus ligandos a otros componentes del sistema inmune, las enzimas promueven las alteraciones químicas de sus ligandos, denominados sustratos. Casi toda reacción química en la célula es catalizada por enzimas específicas. Como todos los catalizadores, las enzimas no afectan la magnitud de la reacción, la cual es determinada por el cambio de la energía libre ΔG entre reactivos y productos (cap. 2). Para las reacciones que son energéticamente favorables ($-\Delta G$), las enzimas incrementan la velocidad de reacción bajando la energía de activación (fig. 3-16). En el tubo de ensayo, catalizadores como el carbón y el platino facilitan reacciones, pero por lo general sólo a altas temperaturas o presiones, a pH extremos elevados o bajos, o en solventes orgánicos. Sin embargo, como catalizadores proteicos de las células, las enzimas deben funcionar eficazmente en ambientes acuosos a 37 °C, 1 atmósfera de presión y un pH 6,5–7,5.

Dos notables propiedades de las enzimas las habilita para funcionar como catalizadores bajo las apacibles condiciones presentes en las células: su enorme *poder catalítico* y su alto grado de *especificidad*. El inmenso poder catalítico de las enzimas hace que las velocidades de las reacciones catalizadas enzimáticamente sean 10^6–10^{12} veces mayores que las de las reacciones no catalizadas correspondientes en condiciones similares. La especificidad exquisita de las enzimas --su habilidad para actuar selectivamente en un sustrato o un número pequeño de sustratos químicamente similares– se ejemplifica con las enzimas que actúan sobre aminoácidos. Como se vio en el capítulo 2, los aminoácidos pueden existir como dos estereoisómeros, designados L y D, aunque sólo los isómeros L se encuentran en los sistemas biológicos. No sorprende que las reacciones catalizadas por enzimas de los aminoácidos L tengan lugar mucho más rápidamente que lo que lo hacen las de los aminoácidos D, a pesar de que ambos estereoisómeros de un aminoácido dado son del mismo tamaño y poseen los mismos grupos R (véase fig. 2-12).

Se han clasificado en la base de datos de las enzimas aproximadamente 3.700 tipos diferentes de enzimas, cada una de las cuales cataliza una reacción química única o un conjunto de reacciones estrechamente relacionadas. Ciertas enzimas se encuentran en la mayoría de las células porque catalizan la síntesis de productos celulares comunes (p. ej., proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos) o participan en la producción de energía por la conversión de glucosa y oxígeno en dióxido de carbono y agua. Otras enzimas están presentes sólo en un tipo particular de célula porque catalizan reacciones exclusivas para ese tipo de célula (p. ej., las enzimas que convierten tirosina en dopamina, un neurotransmisor, en las células nerviosas). Aunque la mayoría de las enzimas están ubicadas dentro de las células, algunas son secretadas y funcionan en sitios extracelulares, como la sangre, la luz del tubo digestivo o incluso fuera del organismo.

La actividad catalítica de algunas enzimas es crítica para procesos celulares diferentes de la síntesis o degradación de las moléculas. Por ejemplo, muchas proteínas regulatorias y proteínas señalizadoras intracelulares catalizan la fosforilación de proteínas, y algunas proteínas de transporte catalizan la hidrólisis de ATP acoplada al movimiento de moléculas a lo largo de las membranas.



▲ Fig. 3-16. Efecto de un catalizador en la energía de activación de una reacción química. Esta vía hipotética de reacción representa los cambios en la energía libre *G* a medida que se realiza la reacción. Una reacción tendrá lugar espontáneamente sólo si la *G* total de los productos es menor que la de los reactivos ($-\Delta G$). Sin embargo, todas las reacciones químicas pasan a través de uno o más estados de transición de alta energía, y la velocidad de reacción es inversamente proporcional a la energía de activación ($\Delta G^{\ddagger}$), que es la diferencia en la energía libre entre los reactivos y los puntos más altos a lo largo de la vía. Las enzimas y otros catalizadores aceleran la velocidad de una reacción al reducir la energía libre del estado de transición y, por ende, la $\Delta G^{\ddagger}$.

El sitio activo de una enzima se une a sustratos y realiza la catálisis

Ciertas cadenas laterales de aminoácidos de una enzima son importantes para determinar su especificidad y poder catalítico. En la conformación nativa de una enzima, estas cadenas laterales se aproximan y forman el sitio activo. En consecuencia, los sitios activos se componen de dos regiones funcionalmente importantes: una que reconoce y fija el sustrato (o sustratos) y otra que cataliza las reacciones luego de que el sustrato ha sido fijado. En algunas enzimas, la región catalítica es parte de la región de unión del sustrato; en otras, las dos regiones son de manera estructural y funcional, diferentes.

Para ilustrar cómo el sitio activo se une a un sustrato específico y luego induce un cambio químico en el sustrato fijado, examinaremos la acción de la proteincinasa dependiente del AMP cíclico, ahora generalmente denominada proteincinasa A (PKA). Esta enzima y otras proteincinasas agregan un grupo fosfato a los residuos de serina, treonina y tirosina en las proteínas, a menudo en respuesta a señales externas. Debido a que las proteincinasas eucariontes pertenecen a una misma superfamilia, la estructura del sitio activo y los mecanismos de fosforilación son muy similares en todas ellas. Por ello, la proteincinasa A puede servir como modelo general para esta importante clase de enzimas.

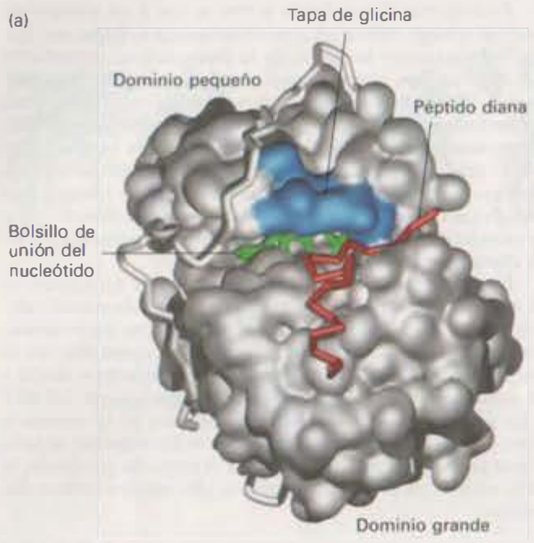
El sitio activo de la proteincinasa A está localizado en el residuo 240, "núcleo de cinasa", de la subunidad catalítica. Este núcleo de cinasa, que se conserva mayoritariamente en todas las proteincinasas, es responsable de la unión de sustratos (ATP y una secuencia peptídica diana) y la subsiguiente transferencia de un grupo fosfato del ATP a un residuo de serina, treonina o tirosina en la secuencia diana. El núcleo de cinasa consiste en un dominio grande y uno pequeño, con una hendidura intermedia profunda; el sitio activo comprende los residuos ubicados en ambos dominios.

Unión del sustrato por proteincinasas. La estructura del sitio de unión a ATP en el núcleo catalítico de la cinasa complementa la estructura del sustrato de nucleótido. El anillo de adenina de ATP se ubica cómodamente en la base de la hendidura entre el dominio grande y el pequeño. Una secuencia altamente conservada, Gly-X-Gly-X-X-Gly-X-Val (X puede ser cualquier aminoácido), apodada la "tapa de glicina", se cierra sobre el anillo de adenina y lo mantiene en su posición (fig. 3-17a). Otros residuos conservados en el bolsillo de fijación estabilizan los grupos fosfatos altamente cargados.

Aunque el ATP es un sustrato común a todas las proteincinasas, la secuencia del péptido diana varía entre distintas cinasas. La secuencia peptídica reconocida por la proteincinasa A es Arg-Arg-X-Ser-Y, donde X es cualquier aminoácido e Y es un aminoácido hidrófobo. La parte de la cadena polipeptídica que contiene el residuo serina o treonina diana se fija a una cavidad poco profunda en el dominio grande del núcleo de cinasa. La especificidad peptídica de la proteincinasa A es conferida por varios residuos de ácido glutámico en el dominio grande, que forma puentes salinos con los dos residuos de arginina en el péptido diana. Distintos residuos determinan la especificidad de otras proteincinasas.

El núcleo catalítico de la proteincinasa A existe en una conformación "abierta" y una "cerrada" (fig. 3-17b). En la conformación abierta, los dominios grande y pequeño están separados lo suficiente para que las moléculas de sustrato puedan ingresar y unirse. Cuando el sitio activo está ocupado por un sustrato, los dominios se unen para adoptar la posición cerrada. Este cambio en la estructura terciaria, un ejemplo de *correspondencia inducida*, atrae la secuencia peptídica diana lo suficientemente cerca para aceptar un grupo fosfato del ATP unido. Una vez completada la reacción de fosforilación, la presencia de los productos hace que los dominios roten hacia la posición abierta, desde la cual se liberan los productos.

La rotación de la posición abierta a la cerrada también provoca el movimiento de la tapa de glicina sobre la hendidura de fijación de ATP. La tapa de glicina controla la entra-



▲ Fig. 3-17. La proteincinasa A y el cambio conformacional inducido por la unión del sustrato. (a) Modelo de la subunidad catalítica de la proteincinasa A con los sustratos unidos; el núcleo (la parte central) conservado de la cinasa se indica como una superficie molecular. Una secuencia rica en glicina (azul) suspendida por encima atrapa al ATP (verde) en una hendidura profunda entre los dominios grande y pequeño del núcleo. Los residuos en el dominio grande unen el péptido diana (rojo). La estructura del núcleo de la cinasa se conserva mayoritariamente en otras proteincinasas eucariontes. (b) Diagrama esquemático de las conformaciones abierta y cerrada del núcleo de cinasa. En ausencia del sustrato, el núcleo de cinasa permanece en la conformación abierta. La unión del sustrato produce una rotación de los dominios grande y pequeño que acerca los sitios de unión del ATP y del péptido, y hace que la tapa de glicina se mueva sobre el residuo de adenina del ATP, atrapando así al nucleótido en la hendidura de unión. El modelo en la parte (a) está en la conformación cerrada.

da de ATP y la liberación de ADP en el sitio activo. En la posición abierta, el ATP puede entrar y fijarse a la hendidura del sitio activo; en la posición cerrada, la tapa de glicina evita que el ATP abandone la hendidura. Después de la transferencia de fosfato desde el ATP unido hasta la secuencia peptídica unida, la tapa de glicina debe rotar de regreso hacia la posición abierta antes de liberar el ADP. Las mediciones cinéticas muestran que la velocidad de liberación de ADP es 20 veces menor que la de la transferencia de fosfato, lo que indica la influencia de la tapa de glicina sobre la velocidad de las reacciones de fosforilación. Las mutaciones en la tapa de glicina que inhiben su flexibilidad lentifican aún más la catálisis por proteincinasa A.

Transferencia de fosfato por proteincinasas. Luego de que los sustratos se han fijado y el núcleo catalítico de la proteincinasa A ha asumido la conformación cerrada, puede producirse la fosforilación de un residuo de serina o treonina en el péptido diana (fig. 3-18). Al igual que con todas las reacciones químicas, la transferencia de fosfato catalizada por la proteincinasa A prosigue a través de un estado de transición en el cual el grupo fosfato por ser transferido y el grupo hidroxilo aceptor son traídos hasta una proximidad cercana. La unión y la estabilización de los intermediarios por la proteincinasa A reducen la energía de activación de la reacción de transferencia de fosforilo, permitiéndoles velocidades mensurables bajo las apacibles condiciones presentes dentro de las células (véase fig. 3-16). La formación de productos induce a la enzima a revertirse a su estado conformacional abierto y permite al ADP y al péptido fosforilado diana difundirse desde el sitio activo.

La $V_{máx}$ y la K_m caracterizan una reacción enzimática

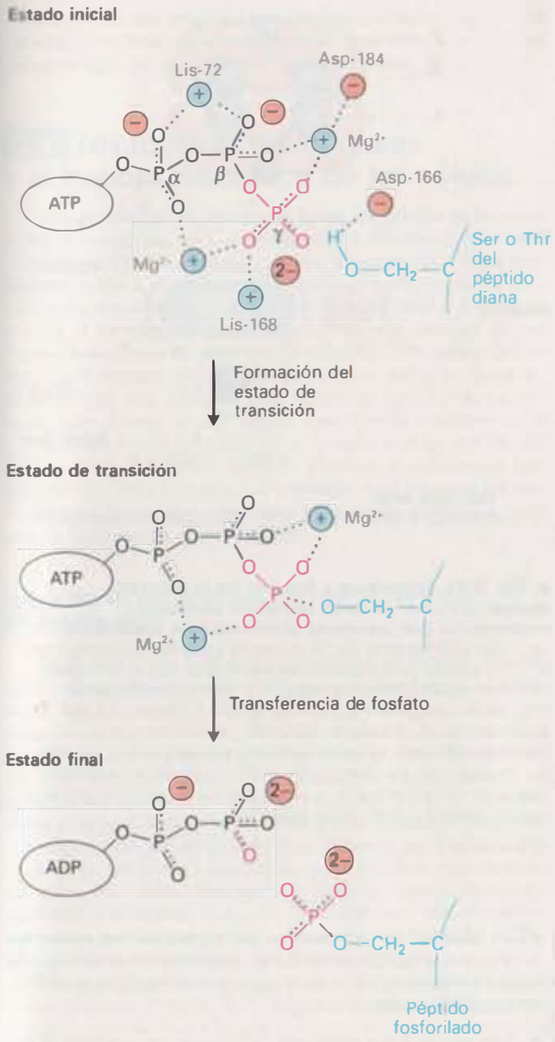
La acción catalítica de una enzima sobre un sustrato dado se describe mediante dos parámetros: $V_{máx}$, la velocidad máxima de reacción a concentraciones de saturación de sustrato, y K_m (la constante de Michaelis), una medida de la afinidad de una enzima por su sustrato (véase fig. 3-19). La K_m se define como la concentración de sustrato que produce una velocidad de reacción igual a la mitad de la velocidad máxima (p. ej., 1/2 $V_{máx}$). Mientras menor sea el valor de K_m, con mayor avidez unirá una enzima el sustrato de una solución diluida y menor será la concentración de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima.

Las concentraciones de las diversas moléculas pequeñas en una célula varían ampliamente, al igual que los valores de K_m para las distintas enzimas que actúan sobre ellas. Por lo general, la concentración intracelular de un sustrato es aproximadamente la misma o superior al valor de K_m de la enzima a la cual se une.

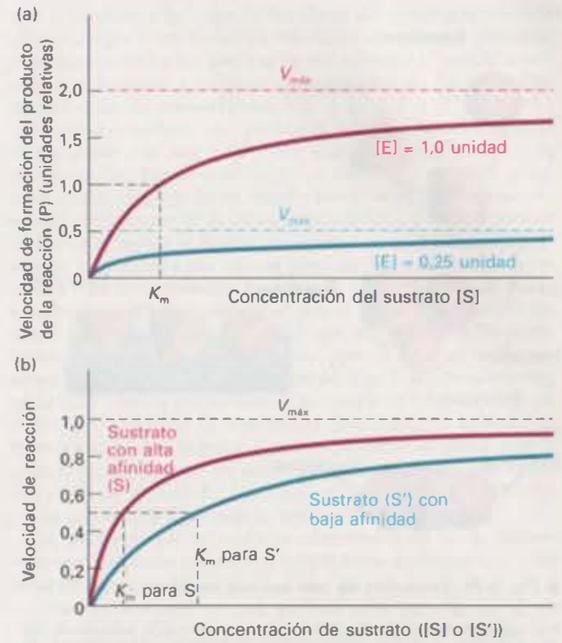
Las enzimas en una vía en común a menudo se asocian físicamente entre sí

Las enzimas que participan en un proceso metabólico en común (p. ej., la degradación de glucosa a piruvato) puede localizarse en el mismo compartimiento celular (p. ej., en el citosol, en la membrana, dentro de un orgánulo en particular). Dentro de un compartimiento, los productos de una reacción pueden moverse por difusión hacia la siguiente enzima en la vía. Sin embargo, la difusión entraña movimientos aleatorios y es un proceso lento e ineficiente para mover moléculas entre enzimas ampliamente dispersas (fig. 3-20a). Para sobreponerse a este impedimento, las células han desarrollado mecanismos para aproximar a las enzimas que se encuentran en una misma vía.

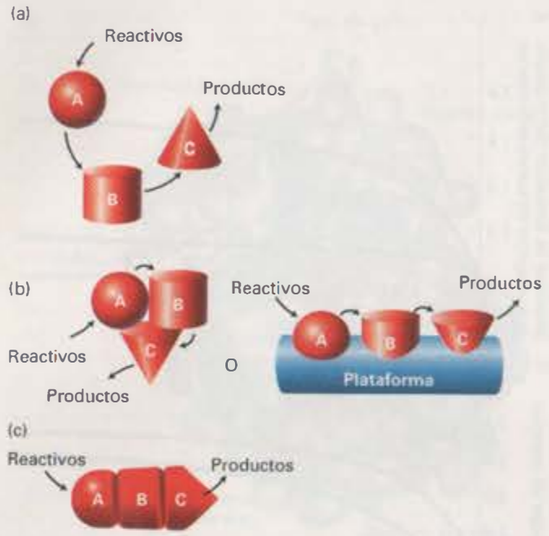
En el más simple de tales mecanismos, los polipéptidos con diferentes actividades catalíticas se agrupan cerradamente como las subunidades de una enzima multimérica o se ensamblan en una "plataforma" en común (fig. 3-20b). Esta disposición permite que los productos de una reacción sean canalizados directamente a la siguiente enzima en la vía. La primera aproximación es ilustrada por la piruvato deshidrogenasa, un complejo de tres enzimas diferentes que convierten el piruvato en acetil CoA en la mitocondria (fig. 3-21). La disposición en plataforma es utilizada por las vías de transducción de señales de las MAP cinasas, que se verán en el capítulo 14. En la levadura, tres proteincinasas ensambladas en



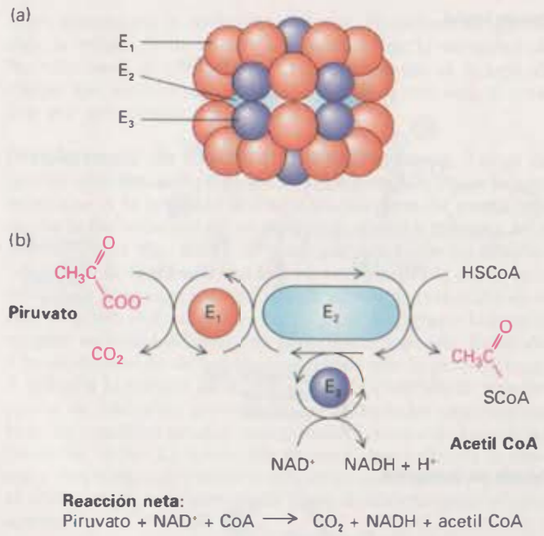
▲ Fig. 3-18. Mecanismos de fosforilación por la proteincinasa A. (*Arriba*) Inicialmente, el ATP y el péptido diana se unen al sitio activo (véase fig. 3-17a). Los electrones del grupo fosfato se deslocalizan debido a interacciones con las cadenas laterales de lisina y con Mg^{2+}. Los círculos coloreados representan los residuos en los núcleos de cinasa que son críticos para la unión de sustratos y la transferencia de fosforilo. Nótese que estos residuos no son adyacentes entre sí en la secuencia de aminoácidos. (*Medio*) Luego, se forma un nuevo enlace entre el átomo de oxígeno de la cadena lateral de la serina o treonina y el fosfato γ, produciendo un intermediario pentavalente. (*Abajo*) Se rompe el enlace fosfoéster entre los fosfatos β y γ, formando los productos ADP y un péptido con la cadena lateral de una serina o treonina fosforilada. El mecanismo de catalización de otras proteincinasas es similar.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 3-19 Determinación de la K_m y la $V_{máx}$ para una reacción catalizada por una enzima a partir de gráficos de la velocidad inicial versus la concentración de sustrato. La forma de estas hipotéticas curvas cinéticas es característica de una reacción simple catalizada por una enzima en la cual un sustrato (S) se convierte en un producto (P). La velocidad inicial se mide inmediatamente después de la adición de la enzima al sustrato antes de que la concentración del sustrato cambie demasiado. (a) Gráficos de la velocidad inicial en dos concentraciones diferentes de una enzima (E) como función de la concentración de sustrato (S). La [S] que produce la mitad de la velocidad máxima de reacción es la constante de Michaelis K_m, una medida de la afinidad de E por S. La duplicación de la concentración de la enzima produce un incremento proporcional de la velocidad de reacción y así se duplica la velocidad máxima $V_{máx}$; sin embargo, la K_m se mantiene inalterada. (b) Gráficos de la velocidad inicial versus la concentración de sustrato con un sustrato S por el cual la enzima tiene una alta afinidad y con un sustrato S′ por el cual la enzima tiene una baja afinidad. Nótese que la $V_{máx}$ es la misma para ambos sustratos, pero que la K_m es mayor para S′, el sustrato de baja afinidad.



▲ **Fig. 3-20. Evolución de una enzima multifuncional.** En la vía de reacción hipotética ilustrada aquí, los reactivos iniciales son convertidos en productos finales por la acción secuencial de tres enzimas: A, B y C. (a) Cuando las enzimas están libres en una solución o aún encerradas dentro del mismo compartimiento celular, los intermediarios en la secuencia de reacción deben difundirse desde una enzima a la siguiente, un proceso inherentemente lento. (b) La difusión es mayormente reducida o eliminada cuando las enzimas se asocian en complejos de subunidades múltiples. (c) Las integraciones o diferentes actividades catalíticas más cercanas ocurren cuando las enzimas se fusionan a nivel genético, convirtiéndose en dominios en una proteína única.



▲ **Fig. 3-21. Estructura y función de la piruvato deshidrogenasa, un gran complejo enzimático multimérico que convierte el piruvato en acetil CoA.** (a) El complejo consta de 24 copias de piruvato descarboxilasa (E_1), 24 copias de lipoamida transacetilasa (E_2) y 12 copias de dihidrolipoil deshidrogenasa (E_3). Las subunidades E_1 y E_3 están unidas al exterior del núcleo formado por las subunidades E_2. (b) Las reacciones catalizadas por el complejo incluyen varios intermediarios unidos a la enzima (no mostrados). La integración estructural estrecha de las tres enzimas incrementa la velocidad de la reacción global y reduce posibles reacciones laterales.

la proteína plataforma Ste5 forman una cascada de cinasas que transduce la señal desencadenada por la unión del factor de apareamiento a la superficie celular.

En algunos casos, se han fusionado a nivel genético las proteínas separadas para crear una única enzima multidominio multifuncional (fig. 3-20c). Por ejemplo, la isomerización del citrato al isocitrato en el ciclo del ácido cítrico es catalizada por la aconitasa, un polipéptido único que lleva a cabo dos reacciones separadas: 1) la deshidratación del citrato para formar *cis*-aconitato y 2) la hidratación de *cis*-aconitato para producir isocitrato (véase fig. 8-9).

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 3.3

Las enzimas y el trabajo químico de las células

- La función de casi todas las proteínas depende de su capacidad para unir otras moléculas (ligandos). Los sitios de unión al ligando en las proteínas y los ligandos correspondientes son química y topológicamente complementarios.
- La afinidad de una proteína por un ligando en particular se refiere a la fuerza de unión: su especificidad se refiere a la unión preferencial de uno o unos pocos ligandos estrechamente relacionados.
- Las enzimas son proteínas catalíticas que aceleran la velocidad de las reacciones celulares al bajar la energía de activación y estabilizar los intermediarios del estado de transición (véase fig. 3-16).
- El sitio activo de una enzima comprende dos partes funcionales; una región de unión al sustrato y una región catalítica. Los aminoácidos que componen el sitio activo no son necesariamente adyacentes en la secuencia de aminoácidos, pero se acercan en el estado nativo.
- A partir de los gráficos de velocidad de reacción y de concentración del sustrato se pueden determinar dos parámetros característicos de una enzima: la constante de Michaelis K_m, una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato, y la velocidad máxima $V_{máx}$, una medida de su poder catalítico (véase fig. 3-19).
- Las enzimas de una misma vía común se localizan en compartimientos celulares específicos y se pueden asociar como dominios de una proteína monomérica, subunidades de una proteína multimérica o componentes de un complejo proteico ensamblado, en una plataforma común (véase fig. 3-20).

3.4 Los motores moleculares y el trabajo mecánico de las células

Una propiedad en común de todas las células es la motilidad, la capacidad para moverse en una dirección específica. Muchos procesos celulares exhiben algunos tipos de movimientos tanto a nivel molecular como celular; todos los movimientos resultan de la aplicación de una fuerza. Por ejemplo, en el movimiento browniano la energía térmica golpea constantemente moléculas y orgánulos en direcciones *aleatorias* y a distancias muy cortas. Por el otro lado, los materiales dentro de una célula se transportan en direcciones específicas y por distancias más largas. Este tipo de movimiento es el resultado del trabajo mecánico llevado a cabo por proteínas que funcionan como motores. Primero describiremos brevemente los tipos y propiedades generales de los motores moleculares y luego veremos cómo un tipo de proteína motor genera fuerza para el movimiento.

Los motores moleculares convierten energía en movimiento

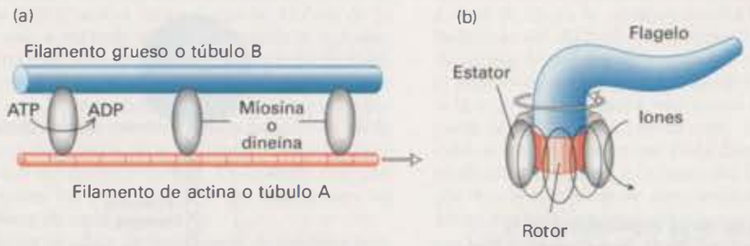
En la escala del orden del nanómetro de células y moléculas, el movimiento es afectado por muchas fuerzas diferentes de las del mundo macroscópico. Por ejemplo, la alta concentración de proteínas (200-300 mg/mL) del citoplasma impide que los orgánulos y las vesículas se difundan más rápido que 100 µm/3 horas. Incluso una bacteria de tamaño en el orden del micrómetro experimenta una fuerza de resistencia al agua que detiene su movimiento de avance en una fracción de un nanómetro cuando deja de nadar activamente. Para generar las fuerzas necesarias para muchos movimientos celulares, las células dependen de enzimas especializadas denominadas proteínas motoras. Estas *enzimas mecanoquímicas* convierten la energía liberada por la hidrólisis del ATP o por gradientes de iones en una fuerza mecánica.

Las proteínas motoras generan tanto movimiento lineal como rotatorio (cuadro 3-2). Algunas proteínas motoras son componentes de ensamblajes macromoleculares, excepto las que se mueven a lo largo de las fibras del citoesqueleto. Este último grupo comprende las **miosinas, cinesinas y dineínas:** proteínas motoras lineales que llevan adheridas "carga" a medida que avanzan a lo largo de cualquiera de los microfilamentos o de los microtúbulos (fig. 3-22a). Las DNA y RNA polimerasas también son proteínas motoras lineales porque se trasladan a lo largo del DNA durante la replicación y la transcripción. Por el contrario, los motores rotatorios giran para causar el golpe de un flagelo bacteriano, para empaquetar el DNA dentro de la cápside de un virus y para sintetizar ATP. Por ejemplo, la fuerza propulsora para la natación bacteriana es generada por un complejo de proteínas motoras rotatorias en la membrana bacteriana. Los iones fluyen hacia abajo en un gradiente electroquímico a través del anillo inmóvil de las proteínas, el *estator*, que se localiza en la membrana. La torsión generada por el estator rota un anillo interno de proteínas y el flagelo unido (fig. 3-22b). Asimismo, en la ATP sintasa mitocondrial, o complejo F_0F_1, un flujo de iones que atraviesa la membrana mitocondrial interna, es transformado por la parte F_0 en rotación de la subunidad γ, la cual se proyecta en un anillo circundante de las subunidades α y β en la parte F_1. Las interacciones entre la subunidad γ y la subunidad β dirigen la síntesis de ATP (cap. 8).

A partir de las actividades observadas de las proteínas motoras, podemos inferir tres propiedades generales que ellas poseen:

- La capacidad para transformar una fuente de energía, ya sea ATP o un gradiente de iones, en un movimiento lineal o rotatorio.
- La capacidad para unirse y trasladarse a lo largo de los filamentos del citoesqueleto, de las hebras de DNA o de complejos proteicos.
- El movimiento neto en una dirección dada.

Las proteínas motoras que se adhieren a las fibras del citoesqueleto también unen y transportan carga a medida que se trasladan. La carga en las células del músculo y los flagelos eucariontes consiste en filamentos gruesos y túbulos B, respectivamente (véase fig. 3-22a). Estas proteínas motoras pueden también transportar como carga cromosomas y vesículas limitadas por membranas a medida que se mueven a lo largo de los microtúbulos o de los microfilamentos (fig. 3-23).

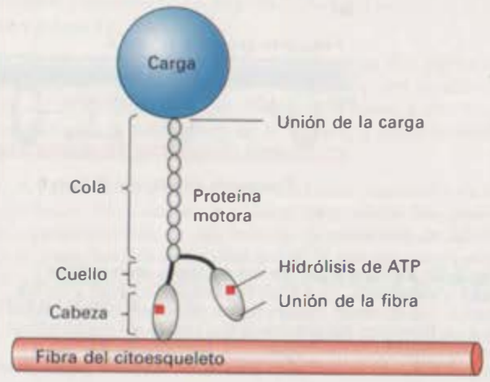


▲ **Fig. 3-22. Comparación de los motores moleculares lineales y rotatorios.** (a) En los flagelos eucariontes y de los músculos, los dominios cabeza de las proteínas motoras (azul) se unen a un filamento delgado de actina (músculo) o a un túbulo A de un microtúbulo doble (flagelo). La hidrólisis de ATP en la cabeza provoca un movimiento lineal de la fibra del citoesqueleto (naranja) relativa al filamento delgado adherido o túbulo B de un microtúbulo doble adyacente. b) En el motor rotatorio en la membrana bacteriana, el estator (azul) está inmovilizado en la membrana. El flujo de iones a través del estator genera un torque que impulsa la rotación del rotor (naranja) y del flagelo unido a él.

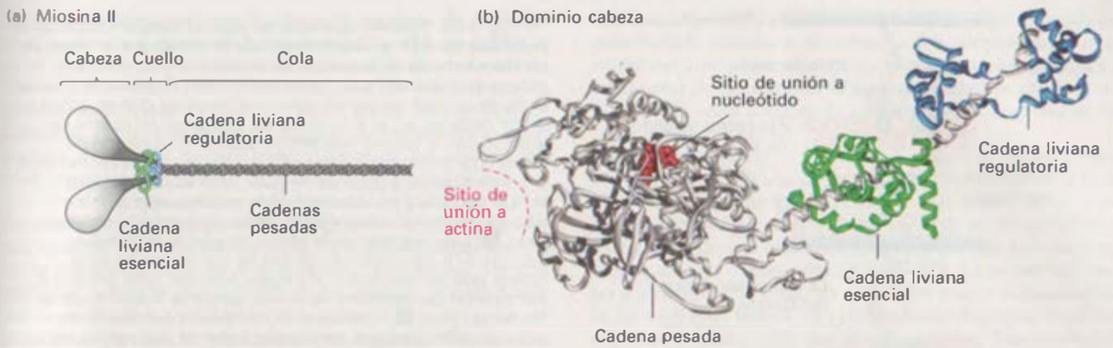
CUADRO 3-2 Motores moleculares selectos

Motor*	Fuente de energía	Estructura/componentes	Localización celular	Movimiento generado
MOTORES LINEALES				
DNA polimerasa (4)	ATP	Multisubunidades de polimerasa δ dentro del replisoma	Núcleo	Traslocación a lo largo del DNA durante la replicación
RNA polimerasa (4)	ATP	Multisubunidades de polimerasa dentro del complejo de elongación de la transcripción	Núcleo	Traslocación a lo largo del DNA durante la replicación
Ribosoma (4)	GTP	Factor de elongación 2 (EF2) unido al ribosoma	Citoplasma/ membrana RE	Traslocación a lo largo del mRNA durante la traducción
Miosinas (3, 19)	ATP	Cadenas pesadas y livianas; dominios cabeza con actividad ATPasa y sitios de unión a microfilamentos	Citoplasma	Transporte de carga en vesículas; contracción
Cinesinas (20)	ATP	Cadenas pesadas y livianas; dominios cabeza con actividad ATPasa y sitios de unión a microtúbulos	Citoplasma	Transporte de carga en vesículas y en cromosomas durante la mitosis
Dineínas (20)	ATP	Múltiples cadenas pesadas, intermedias y livianas; dominios cabeza con actividad ATPasa y sitios de unión a microtúbulos	Citoplasma	Transporte de carga en vesículas; golpeteo de los cilios y flagelos eucariontes
MOTORES ROTATORIOS				
Motor bacteriano flagelar	Gradiente H^+/Na^+	Proteínas stator y rotor, flagelo	Membrana plasmática	Rotación del flagelo unido al rotor
ATP sintetasa, F_0F_1 (8)	Gradiente H^+	Múltiples subunidades forman las partículas F_0 y F_1	Membrana mitocondrial interna, membrana tilacoide, membrana plasmática bacteriana	Rotación de la subunidad γ que resulta en la síntesis de ATP
Motor cápside viral	ATP	Conector, procabeza RNA, ATPasa	Cápside	Rotación de conector resultando en el empaquetamiento del DNA

*Los números entre paréntesis indican los capítulos en donde se analizan los diferentes motores.



► **Fig. 3-23. Movimiento de carga dependiente de la proteína motora.** Los dominios cabeza de las proteínas motoras miosina, dineína y cinesina se unen a una fibra del citoesqueleto (microfilamentos o microtúbulos), y el domino cola se une a uno o a varios tipos de carga; en este caso, una vesícula limitada por membrana. La hidrólisis de ATP en el dominio cabeza hace que este dominio "camine" a lo largo del sendero en una dirección a través de un ciclo repetitivo de cambios conformacionales.



▲ **Fig. 3-24. Estructura de la miosina II.** a) La miosina II es una proteína dimérica compuesta de dos cadenas pesadas idénticas (blanco) y cuatro cadenas livianas (azul y verde). Cada uno de los dominios cabeza transforma la energía liberada de la hidrólisis del ATP en movimiento. Dos cadenas livianas se asocian con el dominio cuello de cada cadena pesada. La secuencia de resorte enrollado del dominio cola organiza la miosina II en un dímero. (b) Modelo tridimensional de un solo dominio cabeza muestra que tiene una forma elongada curva y es bisecado por una gran hendidura. El bolsillo que une nucleótidos se extiende sobre uno de los lados de la hendidura y el sitio de unión a actina se encuentra del otro lado cerca del extremo cabeza. Dos cadenas livianas se enroscan alrededor del mango de la hélice α del cuello. Estas cadenas confieren rigidez al cuello de manera tal que éste puede actuar como palanca de la cabeza. Aquí se muestra la conformación con el ADP unido.

Todas las miosinas tienen dominios cabeza, cuello y cola, con funciones diferenciadas

Para ilustrar más adelante las propiedades de las proteínas motoras, consideraremos la miosina II, la cual se mueve a lo largo de los filamentos de actina en las células musculares durante la contracción. Otros tipos de miosinas pueden transportar vesículas a lo largo de los filamentos de actina en el citoesqueleto. La miosina II y otros miembros de la superfamilia de la miosina están compuestos de una o dos cadenas pesadas y varias cadenas livianas. Las cadenas pesadas están organizadas en tres tipos de dominios estructural y funcionalmente diferentes (fig. 3-24).

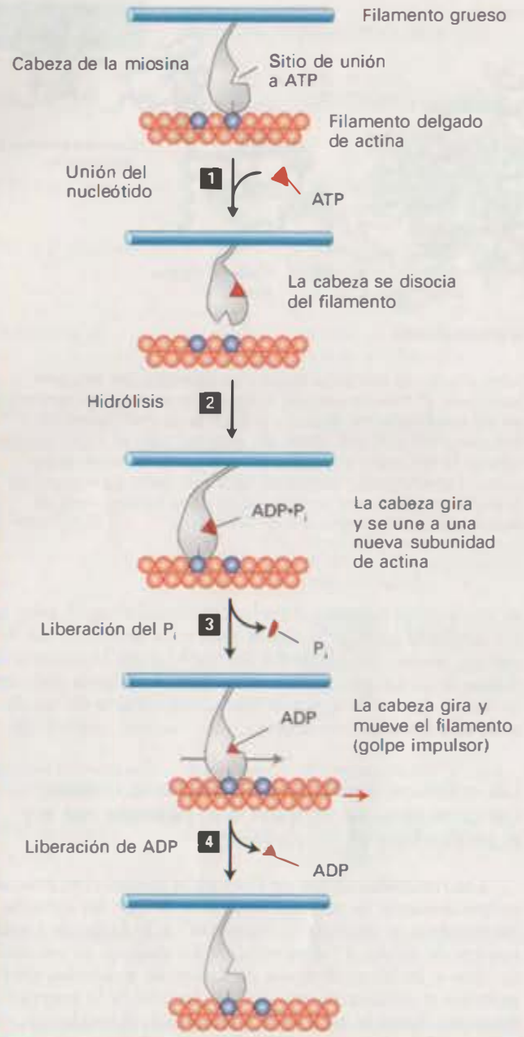
Los dos *dominios* globulares *cabeza* son ATPasas especializadas que acoplan la hidrólisis del ATP con el movimiento. Una característica esencial de la actividad ATPasa de la miosina es la *activación por la actina*. En ausencia de actina, las soluciones de miosina convierten lentamente el ATP en ADP y fosfato. Sin embargo, cuando la miosina se acompleja con la actina, la velocidad de la actividad ATPasa aumenta cuatro a cinco veces más respecto de lo que se observa en ausencia de actina. El paso de activación por la actina asegura que la ATPasa de la miosina sólo funcione a máxima velocidad cuando el dominio cabeza de la miosina esté unido a la actina. Adyacente al dominio cabeza se encuentra *la región del cuello* α-helicoidal, que se asocia con las cadenas livianas. Estas cadenas son cruciales para la conversión de pequeños cambios conformacionales en la cabeza en grandes movimientos de la molécula y para la regulación de la actividad del dominio cabeza. El *dominio cola* con forma de vara contiene los sitios de unión que determinan las actividades específicas de cada miosina.

El resultado de los estudios de fragmentos de miosina producidos por proteólisis ayudó a dilucidar las funciones de los dominios. Los análisis por cristalografía de rayos X del segmento del fragmento S1 de la miosina II, el cual consiste en los dominios cabeza y cuello, revelaron su forma, la posición de la cadena liviana y las localizaciones de los sitios de unión de la actina y del ATP. La cabeza elongada de la miosina está unida en un extremo al cuello α-helicoidal (fig. 3-24b). Las moléculas de cadena liviana se extienden desde la base de la cabeza, enroscadas alrededor del cuello como abrazaderas en forma de C. En esta posición, las cadenas livianas endurecen la región del cuello y, por lo tanto, son capaces de regular la actividad del dominio cabeza.

Los cambios conformacionales en la cabeza de la miosina se acoplan a la hidrólisis del ATP para producir el movimiento

Los resultados de los estudios de la contracción muscular proporcionaron la primera evidencia de que las cabezas de las miosinas se deslizan o "caminan" a lo largo de los filamentos de actina. El desarrollo de los ensayos de movilidad in vitro y de las mediciones de fuerza de moléculas simples permitió el esclarecimiento del mecanismo de la contracción muscular. Sobre la base de la información obtenida con estas técnicas y con la estructura tridimensional de la cabeza de la miosina, los investigadores concibieron un modelo general acerca de cómo la miosina acopla la energía liberada por la hidrólisis del ATP al movimiento a lo largo de un filamento de actina. Dado que se piensa que todas las miosinas utilizan el mismo mecanismo para generar el movimiento, ignoramos si la cola de la miosina está unida a una vesícula o si forma parte de un filamento grueso como en el músculo. Una presunción en este modelo es que cada desplazamiento dado por una molécula de miosina a lo largo del filamento de actina se acopla con la hidrólisis de una molécula de ATP. En el capítulo 19 se analizan las evidencias que apoyan esta presunción.

Como se ilustra en la figura 3-25, la miosina experimenta una serie de sucesos durante cada paso del movimiento. En el transcurso de un ciclo, la miosina debe adoptar al menos tres estados conformacionales: un estado sin ATP unido a la actina, un estado de unión de ADP-P_i a la actina y un estado posterior a que el golpe generado por la fuerza se haya completado. El principal interrogante es cómo se influyen mutua-



◀ Fig. 3-25. Modelo operacional para el acoplamiento de la hidrólisis de ATP al movimiento de la miosina a lo largo de un filamento de actina. Aquí se muestra el ciclo para una cabeza de miosina II que forma parte de un filamento grueso en el músculo, pero se piensa que otras miosinas que se adhieren a otra carga (p. ej., la membrana de una vesícula) operan de acuerdo con el mismo mecanismo cíclico. En ausencia de nucleótido unido, una cabeza de miosina se une estrechamente a la actina, en un estado de "rigor". Paso **1**: La unión de ATP abre la hendidura en la cabeza de la miosina, alterando el sitio de unión a la actina y debilitando la interacción con ella. Paso **2**: Una vez libre de la actina, la cabeza de miosina hidroliza ATP, causando un cambio de conformación en la cabeza que se desplaza a una nueva posición, más cercana al extremo (+) del filamento de actina, donde se vuelve a unir al filamento. Paso **3**: Cuando el (P_i) se disocia del bolsillo de unión de ATP, la cabeza de miosina sufre un segundo cambio de conformación, el golpe impulsor, que restablece en la miosina la conformación de rigor. Dado que la miosina está unida a la actina, este cambio de conformación ejerce una fuerza que hace que la miosina mueva el filamento de actina. Paso **4**: La liberación del ADP completa el ciclo. (Adaptado de R. D. Vale y R. A. Milligan, 2002, *Science* 288:88.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación focalizada: Ciclo de puentes cruzados de la miosina

mente el bolsillo de unión del nucleótido y el sitio distante de unión de la actina y cómo se convierten en fuerza las modificaciones en estos sitios. Los resultados de los estudios estructurales de la miosina en presencia de nucleótidos y de análogos de nucleótidos que imitan los varios pasos en el ciclo indican que la unión e hidrólisis de un nucleótido produce un pequeño cambio conformacional en el dominio cabeza, que es amplificado en un movimiento largo de la región del cuello. Este pequeño cambio conformacional en el dominio cabeza se localiza hacia una región de "cambio" que consiste en sitios de unión de nucleótido y de actina. Una región "convertidora" en la base de la cabeza actúa como un fulcro que provoca que el cuello actúe como palanca para doblar y rotar.

Las estructuras homólogas a la región de cambio, a la región convertidora y a las estructuras de brazos de palanca en la cinesina son las responsables del movimiento de las proteínas motoras cinesinas a lo largo de los microtúbulos. Se desconocen las bases estructurales para el movimiento de la dineína debido a que no se ha determinado aún la estructura tridimensional de ésta.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 3.4

Los motores moleculares y el trabajo mecánico de las células

- Las proteínas motoras son enzimas "mecanoquímicas" que convierten la energía liberada por la hidrólisis del ATP tanto en movimiento lineal como en movimiento rotatorio (véase fig. 3-22).
- Las proteínas motoras lineales (miosina, cinesina y dineína) se desplazan a lo largo de las fibras del citoesqueleto llevando carga, la cual incluye vesículas, cromosomas, filamentos gruesos en el músculo y microtúbulos en los flagelos eucariontes.
- La miosina II comprende dos cadenas pesadas y varias cadenas livianas. Cada cadena pesada posee un dominio cabeza (motor), el cual es una ATPasa activada por actina; un dominio cuello, que está asociado con cadenas livianas; y un dominio cola como si fuera una vara larga que organiza las moléculas diméricas y se une a los filamentos gruesos del músculo (véase fig. 3-24).
- El movimiento de la miosina respecto de un filamento de actina es consecuencia de la adhesión de la cabeza a un filamento de actina, la rotación de la región del cuello y la desunión en un proceso cíclico dependiente del ATP (véase fig. 3-25). Se cree que el mismo mecanismo general se aplica a todos los movimientos mediados por miosinas y cinesinas.

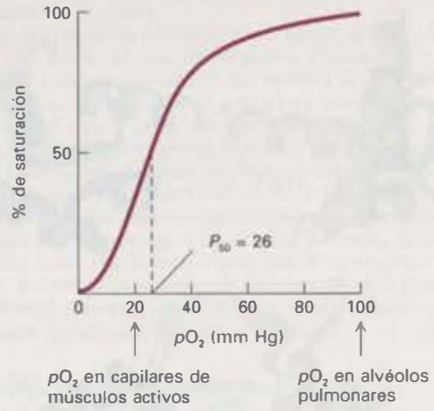
3.5 Mecanismos generales para la regulación de la función de las proteínas

La mayoría de los procesos celulares no ocurren independientemente unos de otros ni tienen velocidad constante. En cambio, la actividad catalítica de las enzimas o el ensamblaje de un complejo macromolecular está regulado de modo tal que la cantidad de producto de reacción o del complejo es justo lo suficiente para satisfacer las necesidades de la célula. Como consecuencia, las concentraciones de los sustratos y productos del estado estable variarán, según las condiciones celulares. El flujo de material en una vía enzimática es controlado por varios mecanismos, algunos de los cuales también regulan las funciones de proteínas no enzimáticas.

Uno de los mecanismos más importantes para regular las funciones proteicas implica el alosterismo. De manera general, el término alosterismo se refiere a cualquier modificación en la estructura terciaria o cuaternaria, o en ambas, de una proteína, inducida por la unión de un ligando, el cual puede ser un activador, un inhibidor, un sustrato o los tres. La regulación alostérica es particularmente importante en las enzimas multiméricas y en otras proteínas. Analizaremos primero varios caminos en los cuales el alosterismo influye en la función de una proteína para considerar luego otros mecanismos que regulan las proteínas.

La unión cooperativa aumenta la respuesta de una proteína a variaciones pequeñas de la concentración del ligando

En muchos casos, sobre todo cuando una proteína se une a varias moléculas de un ligando, la unión es gradual; es decir, la unión de una molécula afecta la de las siguientes moléculas de ligando. Esta clase de alosterismo, denominada cooperatividad, permite a proteínas con múltiples subunidades responder con mayor eficiencia a pequeños cambios en la concentración de ligando. En la cooperatividad positiva aumenta la unión secuencial, en la cooperatividad negativa se inhibe la unión secuencial.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 3-26 La unión secuencial del oxígeno a la hemoglobina exhibe una cooperatividad positiva. Cada molécula de hemoglobina tiene cuatro sitios de unión al oxígeno; cuando hay saturación todos los sitios están cargados con oxígeno. Generalmente la concentración de oxígeno se mide como la presión parcial (pO_2). P_{50} es la pO_2 a la cual la mitad de los sitios de unión al oxígeno están ocupados a una concentración dada de hemoglobina; es equivalente a la K_m para una reacción enzimática. El gran cambio en la cantidad de oxígeno unido respecto de un rango pequeño de valores de pO_2 permite una descarga eficiente de oxígeno en los tejidos periféricos, como los músculos. La forma sigmoide de una curva del porcentaje de saturación frente a la concentración de ligando indica la unión cooperativa. En ausencia de unión cooperativa, la curva de unión es una hipérbola, similar a las curvas cinéticas simples de la figura 3-19. (Adaptado de L. Stryer, *Biochemstry*, 4th ed., 1995, W. H. Freeman and Company.)

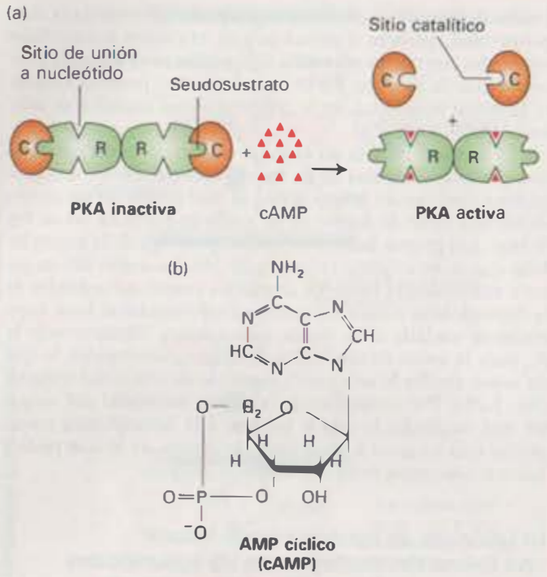
La hemoglobina es un ejemplo clásico de unión cooperativa positiva. Cada una de las cuatro subunidades en la hemoglobina contiene un grupo hemo, el cual consta de un átomo de hierro contenido dentro de un anillo de porfirina (véase fig. 8-16a). Los grupos hemo son los componentes de la hemoglobina que unen oxígeno (véase fig. 3-10). La unión del oxígeno a una molécula hemo en una de las cuatro subunidades de la hemoglobina induce un cambio conformacional local cuyo efecto se traslada a las demás subunidades, disminuyendo la K_m para la unión de moléculas de oxígeno adicionales, lo que da como resultado una curva sigmoide de unión del oxígeno (fig. 3-26). Por consiguiente, la unión secuencial del oxígeno está facilitada, lo que le permite a la hemoglobina transportar más oxígeno a los tejidos periféricos de lo que podría hacer a concentraciones normales de oxígeno.

La unión de un ligando puede inducir una liberación alostérica de las subunidades catalíticas o la transición hacia un estado con actividad diferente

Previamente, nos centramos en la proteincinasa A para ilustrar la unión y la catálisis del sitio activo de la enzima. Esta enzima puede existir como una proteína tetramérica compuesta por dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras. Cada subunidad reguladora contiene una secuencia *seudosustrato* que se une al sitio activo en una subunidad catalítica. Mediante el bloqueo de la unión de sustrato, la subunidad reguladora inhibe la actividad de la subunidad catalítica.

La proteincinasa A es activada por una pequeña molécula segundo mensajero, el AMP cíclico (cAMP). La unión del cAMP a la subunidad reguladora induce un cambio conformacional de la secuencia del seudosustrato de manera tal que ya no pueda unirse a la subunidad catalítica. Por lo tanto, en presencia de cAMP, el tetrámero inactivo se disocia en dos subunidades monoméricas catalíticamente activas y en una subunidad dimérica reguladora (fig. 3-27). Como se verá en el capítulo 13, la unión de varias hormonas a los receptores de superficie celular induce una elevación de la concentración intracelular de cAMP, produciendo la activación de la proteincinasa A. Cuando la señalización finaliza y los niveles de cAMP disminuyen, se inactiva la proteincinasa A y se reorganiza el tetrámero inactivo. La unión de cAMP a las subunidades reguladoras presenta cooperatividad positiva; por consiguiente, variaciones pequeñas en la concentración de esta molécula alostérica producen un cambio grande en la actividad de la proteincinasa A.

Muchas enzimas multiméricas sufren transiciones alostéricas que alteran la relación entre las subunidades, pero no causan la disociación como en la proteincinasa A. En este tipo de regulación alostérica, la actividad de una proteína en el estado de ligando unido difiere de la del estado no unido. Un ejemplo es la chaperonina GroEL que se analizó previamente. Esta máquina con forma de barril que pliega proteínas está compuesta por dos anillos apilados de múltiples subunidades, los cuales pueden existir en un estado de unión



▲ **Fig. 3-27. Activación de la proteincinasa A (PKA) inducida por ligando.** (a) A bajas concentraciones de AMP cíclico (cAMP), la PKA se encuentra como tetrámero inactivo. La unión de cAMP a las subunidades reguladoras (R) provoca un cambio conformacional en estas subunidades que permite la liberación de las subunidades catalíticas monoméricas (C) activas. (b) El cAMP es un derivado de la adenosinamonofosfato. Esta molécula de señalización intracelular, cuyas concentraciones se elevan en respuesta a diferentes señales extracelulares, puede modular la actividad de muchas proteínas.

peptídica "cerrado" en forma hermética y en un estado de liberación peptídica "relajado" (véase fig. 3-11). La unión de ATP y de la cochaperonina GroES a uno de los anillos en estado cerrado provoca una expansión de la cavidad de GroEL al doble, desplazando el equilibrio hacia el estado de péptido plegado.

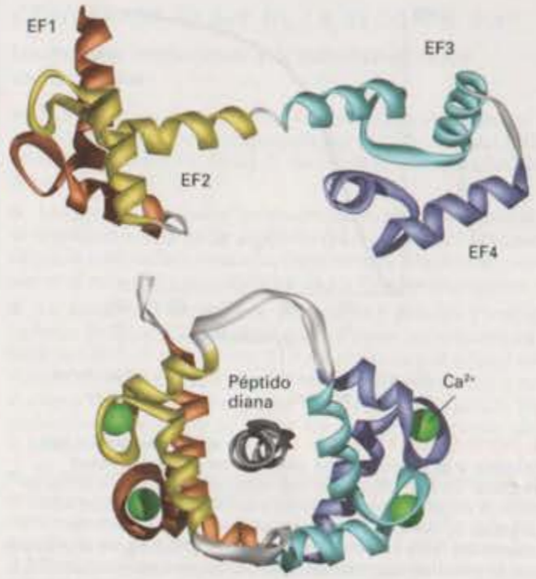
El calcio y el GTP son muy utilizados para modular la actividad proteica

En los ejemplos anteriores, el oxígeno, el cAMP y el ATP causan cambios alostéricos en la actividad de sus proteínas diana (hemoglobina, proteincinasa A y GroEL, respectivamente). Dos ligandos alostéricos adicionales, el Ca^{2+} y el GTP, actúan a través de dos tipos de proteínas ubicuas para regular muchos procesos celulares.

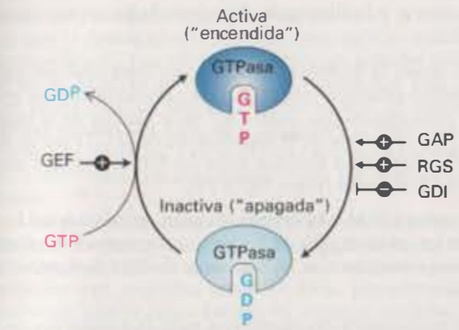
Interrupción mediada por calmodulina. Las proteínas de transporte de la membrana que continuamente bombean Ca^{2+} hacia afuera de la célula o hacia el retículo endoplasmático mantienen la concentración de Ca^{2+} libre en el citosol en niveles muy bajos ($\approx 10^{-7}$ M). Como veremos en el capítulo 7, los niveles citosólicos de Ca^{2+} pueden incrementarse desde 10 hasta 100 veces mediante la liberación del Ca^{2+} almacenado en el RE o por su entrada desde el medio extracelular. Este incremento del Ca^{2+} citosólico es captado por las proteínas que unen Ca^{2+}, sobre todo por las que pertenecen a la *familia de la mano EF*, todas las cuales contienen el motivo hélice-bucle-hélice ya analizado (véase fig. 3-6a).

El prototipo de proteína de la mano EF, la calmodulina, se encuentra en todas las células eucariontes y puede existir como una proteína monomérica o como una subunidad de una proteína multimérica. La calmodulina, una molécula con forma de pesa, contiene cuatro sitios de unión al Ca^{2+} con una K_D de 10^{-6} M. La unión del Ca^{2+} a la calmodulina provoca un cambio conformacional que le permite a la calmodulina/Ca^{2+} unirse a varias proteínas diana y de ese modo cambiar de estado activo a inactivo (fig. 3-28). Por lo tanto, la calmodulina y las proteínas similares de mano EF funcionan como *interruptores* y trabajan al unísono con el Ca^{2+} para modular la actividad de otras proteínas.

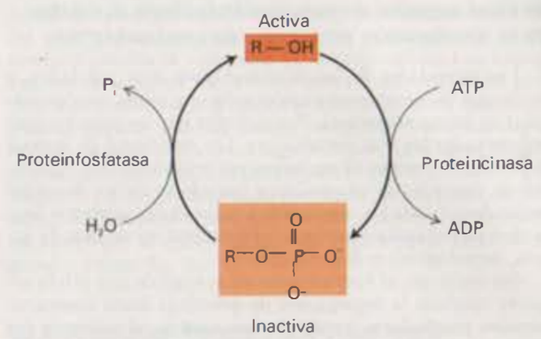
Interrupción mediada por proteínas de unión a nucleótidos de guanina. Otro grupo de proteínas intracelulares interruptoras son los constituyentes de la superfamilia de las GTPasas. Estas proteínas incluyen la proteína monomérica Ras (véase fig. 3-5) y la subunidad G_α de la proteína G trimérica. Ambas proteínas Ras y G_α se unen a la membrana plasmática, intervienen en la señalización celular y cumplen un papel clave en la proliferación y diferenciación celular. Otros miembros de la superfamilia de la GTPasa intervienen en la síntesis de proteínas, en el transporte de las proteínas en-



▲ **Fig. 3-28. Cambio mediado por Ca^{+2}/calmodulina.** La calmodulina es una proteína citosólica ampliamente distribuida que contiene cuatro sitios de unión al Ca^{+2}, uno en cada una de las manos EF. Cada mano EF tiene un motivo hélice-bucle-hélice. En concentraciones citosólicas de Ca^{+2} por encima de 5×10^{-7} M, la unión de Ca^{+2} a la calmodulina cambia la conformación de la proteína. La calmoduliria/Ca^{+2} resultante envuelve las hélices expuestas de diferentes proteínas diana, alterando así su actividad.



▲ **Fig. 3-29. El ciclo de la GTPasa hace que las proteínas alternen entre las formas activas e inactivas.** Las GAP (proteínas aceleradoras de las GTPasa) y las RGS (reguladoras de la señalización de la proteína G) aceleran la conversión de la forma activa en la forma inactiva mediante hidrólisis del GTP unido y las GDI (inhibidoras de la disociación del nucleótido de guanina) la inhiben. Los GEF (factores de intercambio de nucleótidos de guanina) promueven la reactivación.



▲ **Fig. 3-30. Regulación de la actividad proteica mediante el cambio cinasa/fosfatasa.** La fosforilación y desfosforilación cíclica de una proteína es un mecanismo celular común para la regulación de la actividad proteica. En este ejemplo, la proteína diana R está inactiva (anaranjado claro) cuando está fosforilada y está activa (anaranjado oscuro) cuando está desfosforilada; en algunas proteínas se observa el patrón opuesto.

tre el núcleo y el citoplasma, en la formación de vesículas y en su fusión con membranas diana, y en los reordenamientos del citoesqueleto de la actina.

Todas las proteínas interruptoras GTPasas existen en dos formas (fig. 3-29): 1) una forma activa ("encendida") con GTP unido (guanosintrifosfato) que modula la actividad de proteínas diana específicas y 2) una forma inactiva ("apagada") con GDP unido (guanosindifosfato). La GTPasa activa de estas proteínas interruptoras hidroliza lentamente el GTP unido a GDP, lo que da como resultado la forma inactiva. El subsiguiente intercambio de GDP por GTP para regenerar la forma activa ocurre más lentamente aún. La activación es temporaria y es aumentada o disminuida por otras proteínas que actúan como reguladores alostéricos de la proteína interruptora. En capítulos posteriores examinaremos el papel de varias proteínas interruptoras GTPasas en la regulación de la señalización intracelular y de otros procesos.

La fosforilación y la desfosforilación cíclica de proteínas regulan muchas funciones celulares

Como ya vimos, algunos de los mecanismos más comunes para la regulación de la actividad proteica son la fosforilación, la adición y la eliminación de grupos fosfato de los residuos de serina, treonina o tirosina. Las proteincinasas catalizan la fosforiliación y las fosfatasas catalizan la desfosforilación. A pesar de que ambas reacciones son esencialmente irreversibles, la actividad opuesta de las cinasas y las fosfatasas proporciona a las células un "interruptor" capaz de encender y apagar la función de diferentes proteínas (fig. 3-30). La fosforilación cambia la carga de una proteína y puede producir un cambio conformacional; estos efectos pueden alterar significativamente la unión del ligando a la proteína y llevar a un aumento o disminución de su actividad.

Cerca del 3% de todas las proteínas de la levadura son proteincinasas o fosfatasas, lo que indica la importancia de las reacciones de fosforilación y desfosforilación, incluso en células simples. Todas las clases de proteínas –incluidas las proteínas estructurales, las enzimas, los canales de membrana y las moléculas de señalización– están reguladas por interruptores cinasa/fosfatasa. Existen distintas proteinasas y fosfatasas específicas para diferentes proteínas diana y que por lo tanto, pueden regular diversas vías celulares, como veremos en capítulos posteriores. Algunas de estas enzimas actúan en una o pocas proteínas diana, mientras que otras actúan sobre múltiples proteínas. Estas últimas enzimas son útiles en la integración de las actividades de las proteínas que son controladas coordinadamente por un interruptor simple cinasa/fosfatasa. Con frecuencia, las enzimas actúan sobre otras cinasas o fosfatasas, por lo que se crea una red de controles interdependientes.

La escisión proteolítica activa o inactiva irreversiblemente algunas proteínas

Los mecanismos reguladores tratados hasta ahora actúan como interruptores, activando o desactivando reversiblemente a las proteínas. La regulación de algunas proteínas implica mecanismos claramente diferentes: la activación o inactivación irreversible de la función proteica mediante escisión proteolítica. Este mecanismo es el más común en relación con algunas hormonas (p. ej., la insulina) y con proteasas digestivas. Son buenos ejemplos las enzimas tripsina y quimiotripsina, que se sintetizan en el páncreas y se secretan al intestino delgado como cimógenos inactivos, *tripsinógeno* y *quimiotripsinógeno*, respectivamente. La enterocinasa, una aminopeptidasa secretada por las células del revestimiento de la mucosa del intestino delgado, convierte el tripsinógeno en tripsina, el cual a su vez escinde el quimiotripsinógeno para dar quimiotripsina. El retraso en la activación de estas proteasas hasta que alcanzan el intestino impide que digieran el tejido pancreático donde son sintetizadas.

Un nivel superior de regulación incluye el control de la localización proteica y su concentración

Las actividades de las proteínas están muy reguladas, a fin de que las numerosas proteínas en una célula puedan trabajar en forma armoniosa. Por ejemplo, hay un estrecho control de todas las vías metabólicas. Las reacciones de síntesis se producen cuando se necesitan sus productos; las reacciones de degradación se producen cuando se deben degradar moléculas. Todos los mecanismos reguladores descritos hasta ahora afectan localmente a las proteínas en su sitio de acción, activándolas o desactivándolas.

Sin embargo, el funcionamiento normal de una célula requiere también la segregación de proteínas hacia compartimientos particulares, como la mitocondria, el núcleo y los lisosomas. Con respecto a las enzimas, la separación en compartimentos no sólo proporciona una oportunidad para el control de la entrega de sustratos o la salida de productos, sino permite también que tengan lugar al mismo tiempo reacciones en competencia en distintas partes de la célula. En los capítulos 16 y 17 describimos los mecanismos utilizados por las células para dirigir diversas proteínas hacia compartimientos diferentes.

Además de la regulación asociada a la localización diferencial, los procesos celulares están regulados por la síntesis y la degradación. Por ejemplo, a menudo las proteínas son sintetizadas a bajas velocidades cuando la célula tiene escasa o nula necesidad de su actividad. Si la célula enfrenta un incremento en la demanda (p. ej., la aparición de un sustrato en el caso de las enzimas, la estimulación de linfocitos B por un antígeno), responde sintetizando nuevas moléculas de proteínas. Más tarde, el pool de proteínas disminuye cuando los niveles de sustrato descienden o la célula se inactiva. Las señales extracelulares suelen ser instrumentos en la inducción de cambios en las velocidades de síntesis y degradación de las proteínas (caps. 13-15). Estos cambios regulados cumplen un papel esencial en el ciclo celular (cap. 21) y en la diferenciación celular (cap. 22).

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 3.5

Mecanismos generales para la regulación de la función de las proteínas

- En el alosterismo, la unión de una molécula de ligando (un sustrato, un activador o un inhibidor) induce un cambio conformacional, o transición alostérica, que altera la actividad de la proteína o la afinidad por otros ligandos.
- En las proteínas multiméricas, como la hemoglobina, que unen múltiples moléculas de ligando, la unión de una molécula del ligando puede aumentar o disminuir la afinidad de unión para las siguientes moléculas del ligando. Las enzimas que unen sustrato en forma cooperativa muestran cinéticas sigmoideas similares a la curva de unión del oxígeno a la hemoglobina (véase fig. 3-26).
- Varios mecanismos alostéricos actúan como interruptores, activando o desactivando de manera reversible una proteína.
- La unión de una molécula de ligando puede llevar a la conversión de una proteína de un estado conformacional/activo a otro o a la liberación de subunidades activas (véase fig. 3-27).
- Dos clases de proteínas interruptoras intracelulares regulan diversos procesos celulares: 1) la calmodulina y las proteínas relacionadas que unen Ca^{2+} de la familia de la mano EF y 2) los miembros de la superfamilia de la GTPasa (p. ej., Ras y G_α), las cuales alternan entre las formas activa e inactiva con GTP unido (véase fig. 3-29).
- La fosforilación y la desfosforilación de las cadenas laterales de los aminoácidos de las proteincinasas y de las fosfatasas proporcionan una regulación reversible de numerosas proteínas.
- Los mecanismos no alostéricos para la regulación de la actividad proteica incluyen la escisión proteolítica, la cual convierte irreversiblemente los cimógenos inactivos en enzimas activas, la distribución de las proteínas en compartimentos y la modulación de síntesis y degradación de las proteínas inducida por señales.

3.6 Purificación, detección y caracterización de las proteínas

Es necesario purificar una proteína antes de estudiar su estructura y su mecanismo de acción. Sin embargo, dado que las proteínas varían en tamaño, carga e hidrosolubilidad, no se puede utilizar un método único para aislar todas las proteínas. Aislar una proteína determinada a partir del estimado de 10.000 proteínas diferentes en una célula es una tarea que intimida y que requiere métodos de separación y de detección de la presencia de proteínas específicas.

Cualquier molécula, sea proteína, carbohidrato o ácido nucleico, puede ser separada, o *resuelta*, de otras proteínas sobre la base de sus diferencias en una o más características físicas o químicas. Cuanto más grandes o más numerosas sean las diferencias entre dos proteínas, más fácil y más eficiente será su separación. Las características que más se utilizan para la separación de proteínas son el *tamaño*, definido como longitud o masa, y la *afinidad de unión* a ligandos específicos. En esta sección, se delinean en forma breve varias técnicas importantes para separar proteínas; estas técnicas también son útiles para la separación de ácidos nucleicos y otras biomoléculas. (En los próximos capítulos se analizarán métodos especializados para la separación de la membrana de las proteínas de membrana, una vez que se analicen las propiedades únicas de estas proteínas.) Luego consideraremos métodos generales para la detección, o *determinación*, de proteínas específicas, incluido el uso de compuestos radiactivos para rastrear actividades biológicas. Por último, veremos distintas técnicas para la caracterización de la masa, la secuencia y la estructura tridimensional de una proteína.

La centrifugación puede separar partículas y moléculas que difieren en masa o densidad

La centrifugación es el primer paso en un esquema típico de purificación de proteínas. Se basa en el principio de que dos partículas en suspensión (células, orgánulos o moléculas), con masas y densidades distintas, sedimentarán en el fondo de un tubo a velocidades diferentes. Cabe recordar que la

masa es el peso de una muestra (expresado en gramos), mientras que la *densidad* es la relación entre su peso y su volumen (gramos/litros). Las proteínas presentan grandes variaciones en masa, pero no en densidad. A menos que una proteína esté adosada a un lípido o carbohidrato, su densidad no variará en más del 15% de 1,37 g/cm^3, la densidad promedio de una proteína. Las moléculas más pesadas o más densas sedimentan con más rapidez que las livianas o menos densas.

Una centrífuga acelera la sedimentación al someter las partículas en suspensión a fuerzas centrífugas de hasta un millón de veces la fuerza de gravedad *g*, la cual puede sedimentar partículas tan pequeñas como 10 kDa. Las ultracentrífugas modernas logran estas fuerzas al alcanzar aceleraciones de 150.000 revoluciones por minuto (rpm) o mayores. Sin embargo, las partículas pequeñas, con masas inferiores a 5 kDa o menos no sedimentarán de manera uniforme ni siquiera con estas velocidades de rotación elevadas.

La centrifugación se utiliza con dos fines principales: 1) como técnica preparativa para separar un tipo de material del resto y 2) como técnica analítica para medir propiedades físicas (p. ej., peso molecular, densidad, forma y constantes de disociación) de macromoléculas. La *constante de sedimentación, s*, de una proteína es una medida de su velocidad de sedimentación. La constante de sedimentación se suele expresar en svedbergs (S): 1 S = 10^{-13} segundos.

Centrifugación diferencial. El paso inicial más común en la purificación de una proteína es la separación de las proteínas más solubles del material celular insoluble mediante *centrifugación diferencial*. Se vierte una mezcla inicial, por lo general un homogenado celular, en un tubo y se centrifuga por un período que fuerza a los orgánulos celulares como el núcleo a sedimentar como un precipitado *(pellet)* en el fondo; las proteínas solubles permanecen en el sobrenadante (fig. 3-31a). Luego la fracción sobrenadante se recolecta y puede ser sometida a otros métodos de purificación para separar las numerosas proteínas diferentes que contiene.

Centrifugación por zonas de velocidad. Sobre la base de las diferencias de masa, es posible separar las proteínas por centrifugación a través de una solución con densidades crecientes denominada *gradiente de densidad*. Se utiliza casi siempre una solución de sacarosa para formar estos gradientes. Cuando se coloca una mezcla de proteínas sobre la parte superior de un gradiente de sacarosa en un tubo y se la somete a centrifugación, cada proteína de la mezcla migra hacia la parte inferior del tubo a una velocidad controlada por los factores que afectan la constante de sedimentación. Todas las proteínas comienzan a partir de una zona delgada en la parte superior del tubo, y se separan en bandas, o zonas (en realidad son discos), de proteínas con distintas masas. En esta técnica de separación, que se denomina *centrifugación por zona de velocidad*, las muestras se centrifugan el tiempo suficiente para separar en zonas las moléculas de interés (fig. 3-31b). Si la muestra se centrifuga por un período demasiado corto las moléculas de proteínas no se separarán lo suficiente. Si una muestra se centrifuga mucho más de lo necesario, todas las moléculas terminan sedimentándose en el fondo del tubo y forman un precipitado.

Aunque la velocidad de sedimentación está influida en gran medida por la masa de la partícula, la centrifugación por zonas de velocidad rara vez es eficaz para la determinación del peso molecular *exacto* porque las variaciones de forma también afectan la velocidad de sedimentación. Los efectos exactos de la forma son difíciles de evaluar, en especial para proteínas y moléculas de ácidos nucleicos de hebra única, que pueden adoptar muchas formas complejas. No obstante, se ha demostrado que la centrifugación por zonas de velocidad es el método más práctico para separar tipos diferentes de polímeros y partículas. Una segunda técnica de gradiente de densidad, denominada *centrifugación por gradiente de densidad en equilibrio*, se utiliza sobre todo para separar DNA u orgánulos (véase fig. 5-37).

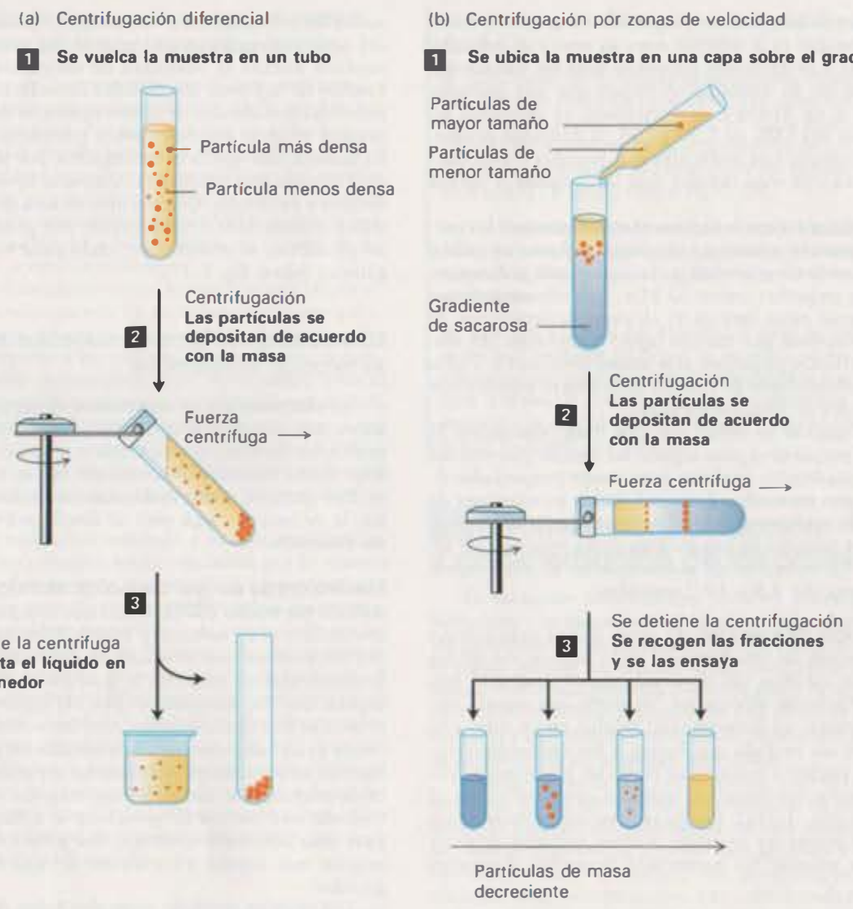
La electroforesis separa moléculas según su relación carga:masa

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas en una mezcla por aplicación de un campo eléctrico. Las moléculas disueltas se desplazan o migran en un campo eléctrico a una velocidad determinada por su relación carga:masa. Por ejemplo, si dos moléculas tienen masa y formas iguales, la de mayor carga neta se desplazará más rápido hacia un electrodo.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS). Dado que muchas proteínas o ácidos nucleicos de tamaño y forma diferentes tienen relaciones carga:masa casi idénticas, la electroforesis de estas macromoléculas en solución se traduce en muy escasa o nula separación. No obstante, es posible lograr la separación de proteínas y ácidos nucleicos mediante electroforesis en distintos geles (suspensiones semisólidas en agua) en lugar de hacerlo en soluciones líquidas. La separación electroforética de proteínas se suele efectuar en *geles de poliacrilamida*. Cuando una mezcla de proteínas se aplica a un gel y se le pasa una corriente eléctrica, las proteínas más pequeñas migran más rápido a través del gel que las proteínas más grandes.

Los geles se moldean entre dos hojas de vidrio mediante polimerización de una solución de monómeros de acrilamida en cadenas de poliacrilamida y al mismo tiempo se crean enlaces cruzados que forman una matriz semisólida. El *tamaño de poro* de un gel se puede variar mediante ajustes en las concentraciones de poliacrilamida y del reactivo que forma enlaces cruzados. La velocidad a la cual una proteína se mueve a través del gel depende del tamaño del poro del gel y de la fuerza del campo eléctrico. Mediante el ajuste apropiado de estos parámetros, es posible separar proteínas de tamaños muy variables.

En la técnica más poderosa para separar mezclas de proteínas, éstas son expuestas al detergente iónico SDS antes y durante la electroforesis en gel (fig. 3-32). El SDS desnaturaliza las proteínas, haciendo que las proteínas multiméricas se disocien en sus subunidades y todas las cadenas polipeptídicas son forzadas a adoptar conformaciones extendidas, con relaciones carga:masa similares. Así, el tratamiento con SDS elimina el efecto de las diferencias de forma, por lo que la longitud de la cadena, que refleja la masa, es el único determinante de la velocidad de migración de las proteínas en la electroforesis en poliacrilamida con SDS. Incluso con esta técnica se pueden separar las cadenas cuyo peso molecular difiere en menos de 10%. Además, es posible estimar el peso molecular de una proteína por comparación de la distancia



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 3-31 Técnicas de centrifugación para separar partículas que difieren en masa o densidad.** (a) En la centrifugación diferencial, un homogenado celular u otra mezcla se centrifuga lo suficiente para sedimentar las partículas más densas (p. ej., orgánulos celulares, células), las cuales se recogen como un precipitado *(pellet)* en el fondo del tubo (paso 2). Las partículas menos densas (p. ej., proteínas solubles, ácidos nucleicos) permanecen en el líquido sobrenadante, que se puede transferir a otro tubo (paso 3). (b) En la centrifugación por zonas de velocidad, una mezcla se centrifuga lo suficiente para que las moléculas que difieren en masa, pero que tienen formas y densidades similares (p. ej., proteínas globulares, moléculas de RNA), se separen en zonas dentro de un gradiente de densidad generalmente formado por una solución concentrada de sacarosa (paso 2). Se eliminan las fracciones desde la parte inferior del tubo y se realizan los ensayos (paso 3).

que migró en un gel con el de proteínas de peso molecular conocido.

Electroforesis bidimensional en gel. La electroforesis de todas las proteínas celulares en un gel de SDS puede separar proteínas con diferencias bastante grandes de peso molecular, pero no las de pesos moleculares similares (p. ej., una proteína de 41-kDa de una proteína de 42 kDa). Para separar proteínas de masas similares se debe utilizar otra característica física. Por lo general, se usa la carga eléctrica, determinada por la cantidad de residuos ácidos y básicos de una proteína. Es poco probable que dos proteínas no relacionadas, con masas similares, tengan cargas netas idénticas, dado que las secuencias son distintas, y por lo tanto, la cantidad de residuos ácidos y básicos es diferente.

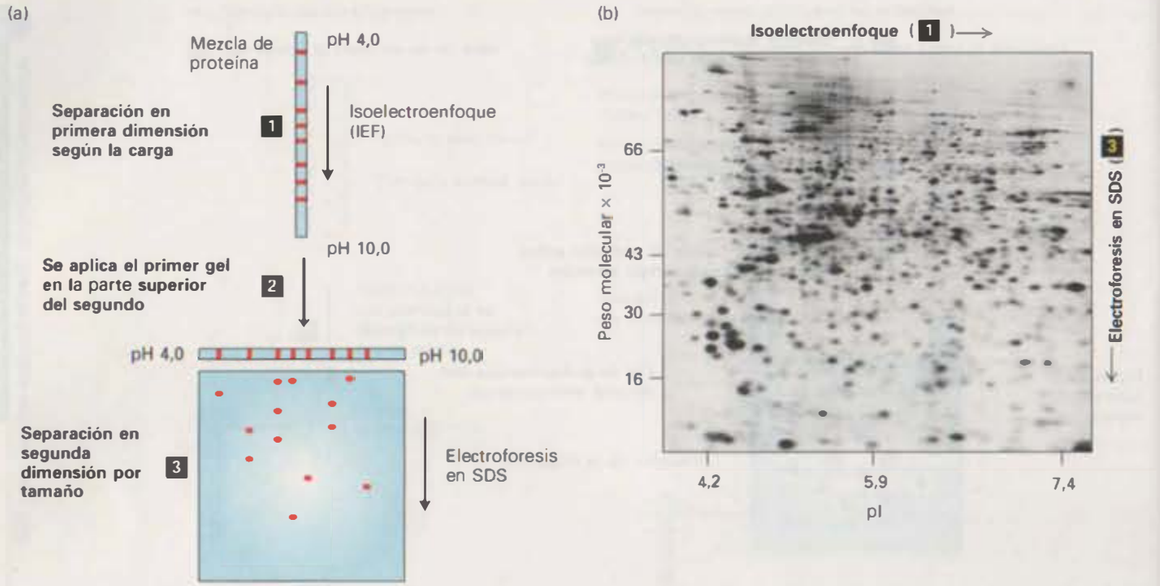
En la electroforesis bidimensional, las proteínas se separan de manera secuencial, primero por sus cargas y luego por sus masas (fig. 3-33a). En el primer paso se desnaturaliza por completo un extracto celular mediante el agregado de altas concentraciones de urea (8 M) y luego se extiende sobre una tira de gel que contiene un gradiente continuo de pH. El gradiente está formado por *anfolitos*, una mezcla de moléculas polianiónicas y policatiónicas, que están dispersas en el gel, con los anfolitos más acídicos en un extremo y los más básicos en el extremo opuesto. Una proteína cargada migrará a través del gradiente hasta que alcance su punto isoeléctrico (pI), es decir el pH al cual la proteína tiene carga neta cero. Esta técnica, denominada **enfoque isoeléctrico (isoelectroenfoque) (IEF)**, es capaz de separar proteínas que sólo difieren en una unidad de carga. Para completar esta separación, las proteínas separadas en un gel mediante IEF pueden ser separadas en una segunda dimensión sobre la base de su peso molecular. Para ello, se extiende la tira de gel sobre una placa de gel de poliacrilamida (el segundo gel), esta vez saturada con SDS. Al aplicar un campo eléctrico, las proteínas migran desde el gel de IEF al segundo gel de SDS y así las proteínas se separan de acuerdo con su masa.

Mediante la resolución secuencial de proteínas por carga y masa se logra una excelente separación de proteínas celulares (fig. 3-33b). Por ejemplo, los geles bidimensionales han sido de gran utilidad en la comparación de proteomas en células diferenciadas y en no diferenciadas, o en células normales y en cancerosas debido a que se pueden resolver hasta 1.000 proteínas simultáneamente.

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación técnica: Electroforesis en gel con SDS



◀ **FIGURA EXPERIMENTAL 3-32 La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS separa las proteínas únicamente sobre la base de su masa.** El tratamiento inicial con SDS, un detergente cargado negativamente, disocia las proteínas multiméricas y desnaturaliza todas las cadenas polipeptídicas (paso 1). Durante la electroforesis, los complejos SDS-proteína migran a través del gel de poliacrilamida (paso 2). Las proteínas más pequeñas son capaces de moverse a través de los poros con mayor facilidad y rapidez que las proteínas más grandes. En consecuencia, las proteínas se separan en bandas de acuerdo con su tamaño a medida que migran a través del gel. Las bandas de proteínas separadas se visualizan mediante tinción con un colorante (paso 3).



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 3-33 La electroforesis bidimensional puede separar proteínas de masas similares. (a) En esta técnica, primero se separan las proteínas sobre la base de sus cargas mediante isoelectroenfoque (paso 1). Se aplica la tira de gel resultante a un gel de electroforesis con SDS y las proteínas se separan en bandas de acuerdo con su masa (paso 3). (b) En este gel bidimensional de extractos proteicos obtenidos a partir de cultivos celulares, cada mancha representa un polipétido único. Se pueden detectar estos polipéptidos mediante tinciones, como en este caso, o por otras técnicas, como la autorradiografía. Cada polipéptido se caracteriza por su punto isoeléctrico (pI) y su peso molecular. (Parte (b) cortesía de J. Celis.)

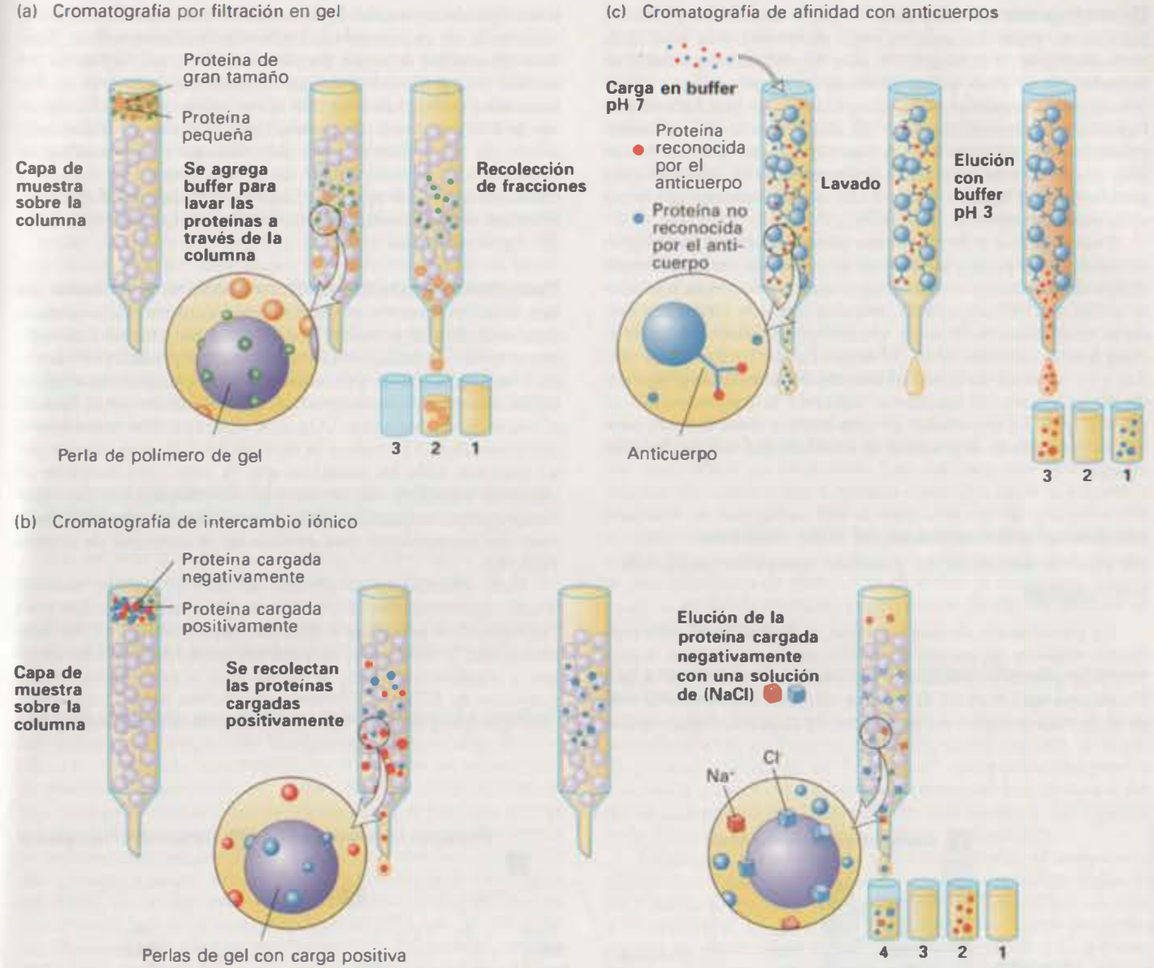
La cromatografía en fase líquida separa proteínas por su masa, carga o afinidad de unión

Una tercera técnica de uso común para separar mezclas de proteínas, ácidos nucleicos y otras moléculas se basa en el principio de que las moléculas disueltas en solución interactúan (se unen y se disocian) con una superficie sólida. Si se permite que la solución fluya a través de la superficie, las moléculas que interactúan con frecuencia con la superficie permanecerán más tiempo unidas a ella, por lo que se moverán más lentamente que las moléculas que interactúan poco con la superficie. En esta técnica, denominada cromatografía líquida, la muestra se coloca sobre la parte superior de una columna de perlas esféricas densamente empaquetadas en un tubo de vidrio. La naturaleza de estas perlas determina si la separación de las proteínas depende de diferencias de masa, carga o afinidad de unión.

Cromatografía por filtración en gel. Es posible separar proteínas que difieren en su masa en una columna compuesta de perlas porosas fabricadas a partir de poliacrilamida, dextrán (un polisacárido bacteriano) o agarosa (un derivado de algas). Esta técnica se denomina *cromatografía por filtración en gel*. Aunque las proteínas *fluyen alrededor* de las perlas esféricas en la cromatografía por filtración en gel, éstas pasan cierto tiempo dentro de los grandes orificios que perforan la superficie de las esferas. Dado que las proteínas más pequeñas pueden penetrar en los orificios con mayor facilidad que las más grandes, se desplazan por la columna de filtración en gel con mayor lentitud que las más voluminosas (fig. 3-34a). (Por el contrario, las proteínas migran *a través* de los poros en una electroforesis en gel; en consecuencia las proteínas más pequeñas, migran con mayor rapidez que las grandes.) El volumen total del líquido requerido para eluir una proteína de la columna depende de su masa: cuanto menor sea la masa, mayor será el volumen de elución. Mediante el uso de proteínas con masa conocida, es posible utilizar el volumen de elución para estimar la masa de una proteína en una mezcla.

Cromatografía por intercambio iónico. En un segundo tipo de cromatografía líquida, denominada *cromatografía por intercambio iónico*, las proteínas se separan sobre la base de la diferencia de sus cargas. En esta técnica se utilizan perlas especialmente modificadas, cuyas superficies están cubiertas por grupos amino o carboxilo, por lo que portan cargas positivas (NH_3^+) o negativas (COO^-) a pH neutro.

Las proteínas de una mezcla portan distintas cargas netas a un pH determinado. Cuando una mezcla de proteínas fluye a través de una columna con perlas cargadas positivamente, sólo las de carga neta negativa (proteínas ácidas) se adhieren a las perlas; las neutras y las básicas fluyen sin impedimento a través de la columna (fig. 3-34b). Luego las proteínas ácidas se eluyen selectivamente mediante el pasaje de un gradiente de concentraciones crecientes de una sal a través de la columna. A bajas concentraciones de sal, las moléculas proteicas y las perlas son atraídas por las cargas opuestas. A concentraciones de sal más elevadas, los iones salinos negativos se unen a las perlas cargadas positivamente, por lo que las proteínas con cargas negativas se desplazan. En un gradiente de concentraciones salinas crecientes, las proteínas cargadas débilmente son eluidas primero, y las que tienen cargas más grandes pueden ser utilizadas para retener y fraccionar proteínas básicas.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 3-34 Tres técnicas comunes de cromatografía líquida que se utilizan para separar proteínas sobre la base de sus masas, cargas o afinidad por un ligando específico. (a) La cromatografía por filtración en gel separa las proteínas que difieren en tamaño. Se coloca con cuidado una mezcla de proteínas sobre la parte superior del cilindro de vidrio lleno de perlas porosas. Las proteínas más pequeñas migran a través de la columna con menor velocidad que las más grandes. En consecuencia, las diferentes proteínas tienen distintos volúmenes de elución y se pueden separar en fracciones líquidas desde el fondo. (b) La cromatografía de intercambio iónico separa las proteínas que difieren en carga neta en columnas llenas de perlas especiales que poseen carga positiva (como se muestra aquí) o carga negativa. Las proteínas con la misma carga neta que las perlas son repelidas y fluyen a través de la columna, mientras que las proteínas con carga opuesta se unen a las perlas. Las proteínas unidas –en este caso con carga negativa– se eluyen mediante el pasaje de un gradiente salino (por lo general, NaCl o KCl) a través de la columna. A medida que los iones se unen a las perlas, desplazan a las proteínas. (c) En la cromatografía de afinidad con anticuerpos, la columna se empaqueta con perlas que tienen adheridos en forma covalente un anticuerpo específico. Sólo la proteína con afinidad elevada por el anticuerpo es retenida por la columna; todas las proteínas que no se unen fluyen a través. La proteína unida se eluye con una solución ácida que perturba los complejos antígeno-anticuerpo.

Cromatografía de afinidad. La capacidad de las proteínas para unirse específicamente a otras moléculas es la base de la *cromatografía de afinidad*. En esta técnica, las moléculas de ligando que se unen a una proteína de interés se ligan covalentemente a las perlas utilizadas para formar la columna. Los ligandos pueden ser sustratos de enzimas u otras moléculas pequeñas que se unen a proteínas específicas. En una forma muy usada de esta técnica, la *cromatografía de afinidad a los anticuerpos*, el ligando fijado es un anticuerpo específico para la proteína deseada (fig. 3-34c).

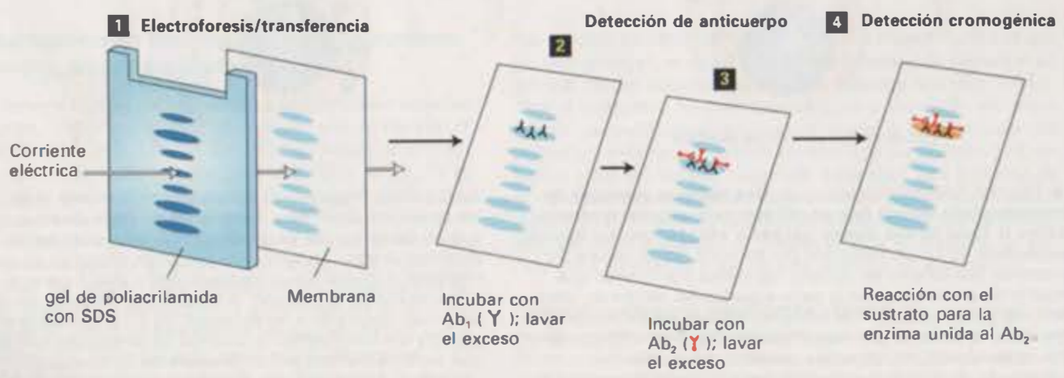
Una columna sólo retiene las proteínas que fijan el ligando unido a las perlas; el resto de la proteínas, independientemente de sus cargas o masas, atraviesan la columna sin unirse a ella. Sin embargo, si la proteína retenida interactúa con otras moléculas, formando un complejo, entonces todo el complejo es retenido en la columna. Luego las proteínas unidas a la columna de afinidad son eluidas mediante el agregado de un exceso de ligando o variando la concentración de sal o el pH. La capacidad de esta técnica para separar proteínas particulares depende de la selección de los ligandos adecuados.

Los ensayos de anticuerpos o de enzimas altamente específicas pueden detectar proteínas individuales

La purificación de una proteína, o de cualquier otra molécula, requiere un ensayo específico capaz de detectar la molécula de interés en fracciones de columna o en bandas de gel. Un ensayo saca ventaja de algunas características muy distintivas de una proteína en particular: la capacidad para unirse a un ligando en especial, de catalizar una reacción determinada o de ser reconocida por un anticuerpo específico. También un ensayo debe ser simple y rápido, para disminuir los errores y la posibilidad de que la proteína de interés se desnaturalice o degrade mientras se realiza la prueba. El objetivo de todo esquema de purificación es aislar cantidad suficiente de una determinada proteína para su estudio; en consecuencia, el ensayo debe ser lo suficientemente sensible y consumir sólo una pequeña porción del material disponible. Muchos ensayos comunes de proteínas sólo requieren 10^{-9} - 10^{-12} g de material.

Reacciones enzimáticas cromogénicas y emisoras de luz. Muchos ensayos se diseñan para detectar algún aspecto funcional de una proteína. Por ejemplo, las pruebas enzimáticas se basan en la capacidad para detectar pérdidas de sustrato o la formación de producto. Algunas pruebas enzimáticas utilizan sustratos *cromogénicos*, que varían de color durante el curso de la reacción. (Algunos sustratos son cromógenos por naturaleza.) Debido a la especificidad de una enzima por su sustrato, sólo las muestras que la contienen variarán de color en presencia de un sustrato cromogénico y de otros componentes requeridos para la reacción; la velocidad de la reacción proporciona una medida de la cantidad de enzima presente.

Estas enzimas cromogénicas también se pueden fusionar o unir químicamente a un anticuerpo y ser utilizadas para "informar" la presencia o localización del antígeno. Alternativamente, la *luciferasa*, una enzima presente en las luciérnagas y algunas bacterias, se puede unir a un anticuerpo. En presencia de ATP y luciferina, la luciferasa cataliza una reacción que emite luz. En cada caso, después de que el anticuerpo se une a la proteína de interés se adicionan los sustratos de la enzima fijada y se controla la aparición de color o la luz emitida. Una variación de esta técnica, particularmente útil en la detección específica de proteínas dentro de células vivas, utiliza la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*, GFP), una proteína fluorescente que se encuentra naturalmente en las medusas (véase fig. 5-46).



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 3-35 El Western blot (inmunoblot) combina varias técnicas para resolver y detectar una proteína específica. Paso **1**: luego de someter una mezcla de proteínas a electroforesis en gel con SDS, se transfieren las bandas separadas del gel a una membrana porosa. Paso **2**: se impregna la membrana con una solución de anticuerpo (Ab_1) específico para la proteína deseada. Sólo la banda que contiene esa proteína se une al anticuerpo y forma una capa de moléculas de anticuerpo (si bien no se distingue su posición en este momento). Después de transcurrido un tiempo suficiente para la unión, se lava la membrana para eliminar Ab_1. Paso **3**: se incuba la membrana con un segundo anticuerpo (Ab_2) que se une al Ab_1 unido. Este segundo anticuerpo está unido mediante un enlace covalente a una fosfatasa alcalina que cataliza una reacción cromogénica. Paso **4**: por último, se agrega el sustrato y se forma un precipitado púrpura oscuro, marcando la banda que contiene la proteína deseada.

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación técnica: Inmunoblot

Western blot. Uno de los métodos más poderosos para detectar una proteína particular en una mezcla compleja combina el poder de resolución superior de la electroforesis en gel, la especificidad de los anticuerpos y la sensibilidad de las pruebas enzimáticas. Se denomina Western blot, o immunoblot, y es un procedimiento de múltiples pasos que suele utilizarse para separar proteínas y luego identificar una proteína específica de interés. Como se muestra en la figura 3-35, en este método se utilizan dos anticuerpos diferentes, uno específico para la proteína buscada y el otro unido a una enzima informadora *(reporter)*.

Los radioisótopos son herramientas indispensables para detectar moléculas biológicas

Un método sensible para rastrear el destino de una proteína u otras moléculas biológicas es la detección de la radiactividad emitida por radioisótopos introducidos en las moléculas. Al menos un átomo en una molécula radiomarcada está presente en una forma radiactiva, denominada radioisótopo.

Los radioisótopos son útiles en la investigación biológica. Cientos de compuestos biológicos (aminoácidos, nucleósidos y numerosos intermediarios) marcados se encuentran disponibles comercialmente. Estas preparaciones muestran una variación considerable en su *actividad específica*, que es la cantidad de radiactividad por unidad de material medida en desintegraciones por minuto (dpm) por milimol. La actividad específica de un compuesto marcado depende de la probabilidad de decaimiento del radioisótopo, indicado por su *vida media*, que es el tiempo requerido para que la mitad de los átomos sufran decaimiento radiactivo. En general, cuanto menor es la vida media de un radioisótopo, mayor será la actividad específica (cuadro 3-3).

La actividad específica de un compuesto marcado debe alcanzar valores suficientemente altos para que en las moléculas celulares se incorpore la radiactividad necesaria para ser detectada con exactitud. Por ejemplo, metionina y cisteína marcadas con azufre 35 (^{35}S) tienen amplia aplicación para marcar proteínas celulares, dado que se dispone de preparaciones de estos aminoácidos con actividades específicas elevadas (> 10^{15} dpm/mmol). De modo similar, las preparaciones comerciales de precursores de ácidos nucleicos marcados con ^{3}H tienen actividades específicas muy superiores a las preparaciones marcadas con ^{14}C correspondientes. En la mayoría de los experimentos se prefieren los primeros, porque permiten una marcación adecuada de RNA o DNA después de un corto período de incorporación o requieren una muestra celular más pequeña. Existen numerosos compuestos que contienen fosfato, en los que cada átomo de fósforo es el radioisótopo fósforo-32. Debido a su elevada especificidad, los nucleótidos marcados con ^{32}P suelen utilizarse para marcar ácidos nucleicos en sistemas libres de células.

CUADRO 3-3 Radiosótopos de uso común en la investigación biológica

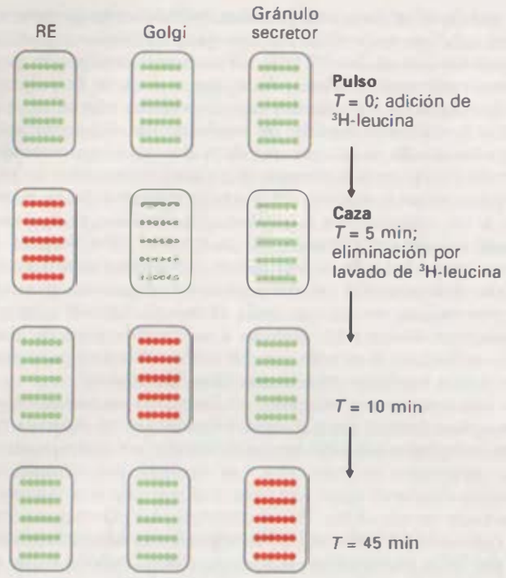
Isótopo	Vida media
Fósforo-32	14,3 días
Yodo-125	60,4 días
Azufe-35	87,5 días
Tritio (hidrógeno-3)	12,4 años
Carbono-14	5.730,4 años

Los compuestos marcados en los cuales un radioisótopo reemplaza átomos normalmente presentes en la molécula tienen las mismas propiedades químicas que los correspondientes compuestos no marcados. Las enzimas, por ejemplo, no pueden distinguir entre sustratos marcados de esta manera y sustratos no marcados. Por el contrario, las marcaciones con el radioisótopo yodo 125 (^{125}I) requieren la adición covalente del ^{125}I a una proteína o ácido nucleico. Debido a que este procedimiento de marcación modifica la estructura química de la molécula marcada puede diferir de alguna manera de la forma no marcada.

Experimentos de marcación y detección de moléculas radiomarcadas. De acuerdo con la naturaleza de un experimento, los compuestos marcados se detectan por autorradiografía, en ensayo visual semicuantitativo, o la radiactividad se mide en un "contador" apropiado, una prueba altamente cuantitativa capaz de determinar la concentración de un compuesto radiomarcado en una muestra. En algunos experimentos se utilizan ambos tipos de detección.

En uno de los usos de la autorradiografía, se marca una célula o un constituyente celular con un compuesto radiactivo y luego se lo cubre con una emulsión fotográfica sensible a la radiación. El desarrollo de la emulsión libera pequeños granos de plata, cuya distribución corresponde a la del material radiactivo. Los estudios autorradiográficos de células completas han tenido importancia crucial en la determinación de los sitios intracelulares donde se sintetizan distintas macromoléculas y de sus movimientos posteriores dentro de las células. Diferentes técnicas que emplean microscopia de fluorescencia, que describiremos en el próximo capítulo, han suplantado a la autorradiografía para estudios de este tipo. Sin embargo, ésta suele utilizarse en distintas pruebas para detectar secuencias específicas de DNA o RNA aisladas (cap. 9).

Para las mediciones cuantitativas de la radiactividad en un material marcado se utilizan distintos instrumentos. Un *contador Geiger* mide los iones producidos en un gas por las partículas β o los rayos γ emitidos por un radioisótopo. En un *contador de centelleo*, la muestra radiomarcada se mezcla con un líquido que contiene un compuesto fluorescente que emite un rayo de luz cuando absorbe la energía de las partículas β o los rayos γ liberados durante el decaimiento del radioisótopo; un fototubo en el instrumento detecta y cuenta estos centelleos. Los detectores de *imágenes fosforadas* se utilizan para detectar compuestos marcados sobre una superficie; almacenan datos digitales sobre el número de decaimientos en las desintegraciones por minuto por píxel pequeño de



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 3-36 Los experimentos de pulso y caza pueden rastrear la vía del movimiento de una proteína dentro de las células. Para determinar la vía que las proteínas secretoras atraviesan luego de ser sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso (RE), las células se incuban brevemente en un medio que contiene un aminoácido radiomarcado (p. ej., [³H]leucina), el pulso que marcará cualquier proteína sintetizada durante ese período. Luego se lavan las células con buffer para eliminar el pulso y se las transfiere a un medio al que le falta el precursor radiomarcado, la caza. Se toman muestras periódicas para analizar por autorradiografía a fin de determinar la localización celular de la proteína marcada. Al comienzo del experimento (t = 0), la proteína no está marcada, como lo indican las líneas de puntos verdes. Al final del pulso (t = 5 minutos), toda la proteína marcada (líneas rojas) aparece en el RE. En los tiempos siguientes, se visualiza esta proteína recién sintetizada marcada primero en el complejo de Golgi y luego en las vesículas secretoras. Debido a que cualquier proteína sintetizada durante el período de caza no está marcada, se puede definir en forma bastante precisa el movimiento de la proteína marcada.

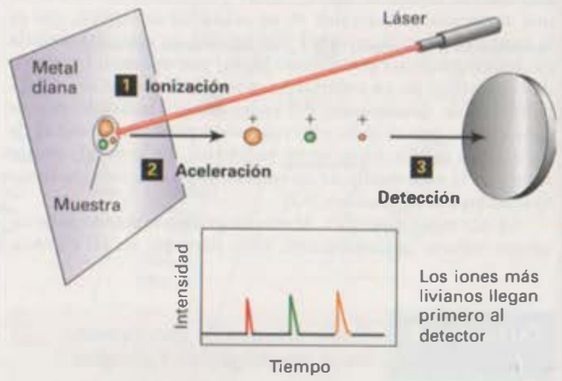
área superficial. En general estos instrumentos, que pueden pensarse como una clase de película electrónica reutilizable, se emplean para cuantificar las moléculas radiactivas separadas por electroforesis en gel y con este objeto reemplazan a las películas fotográficas.

En los experimentos de marcación suele utilizarse una combinación de técnicas bioquímicas y de marcación y métodos de detección visuales y cuantitativos. Por ejemplo, para identificar las principales proteínas sintetizadas por un tipo particular de célula, se incuba una muestra de células con aminoácidos radiactivos (p. ej., [^{35}S] metionina) durante unos minutos. Luego, la muestra de proteínas celulares se separa en un gel de electroforesis el cual se somete a autorradiografía o análisis con un detector de imágenes fosforadas. Las bandas radiactivas corresponden a las proteínas recién sintetizadas, que han incorporado el aminoácido marcado. Al mismo tiempo, las proteínas se pueden separar mediante cromatografía líquida y con un contador se determina cuantitativamente la radiactividad de las fracciones eluidas.

Los experimentos de pulso y caza son muy útiles para rastrear los cambios en la localización intracelular de las proteínas o la transformación de un metabolito en otros, a medida que transcurre el tiempo. En este protocolo experimental se expone una muestra celular a un compuesto marcado durante un período breve –de "pulso"–, luego se lava con un buffer para eliminar el pulso marcado y por último se incuba con una forma no marcada del compuesto –la "caza"– (fig. 3-36). Se toman muestras periódicas para determinar la localización o la forma química de la marca radiactiva. Un uso clásico de la técnica de pulso y caza fue en estudios para elucidar la vía que atraviesan las proteínas secretadas desde su sitio de síntesis en el retículo endoplasmático hasta la superficie de la célula (cap. 17).

La espectrometría de masa mide la masa de las proteínas y de los péptidos

La espectrometría de masa es una poderosa técnica para la medición de la masa de moléculas como las proteínas y los péptidos. Esta técnica requiere un método para la ionización de la muestra, por lo general una mezcla de péptidos o proteínas, para la aceleración de los iones moleculares y luego para la detección de los iones. En un espectrómetro de masa con desorción láser, las proteínas se mezclan con un ácido orgánico y luego se secan sobre un soporte metálico. La energía del láser ioniza las proteínas y un campo eléctrico acelera los iones por un tubo hacia el detector (fig. 3-37). Alternativamente, en un espectrómetro de masa electrospray, se ioniza una niebla fina que contiene la muestra y se la introduce en una cámara de separación donde las moléculas cargadas positivamente son aceleradas por un campo magnético. En ambos instrumentos, el tiempo de vuelo es inversamente proporcional a la masa y directamente proporcional a la carga de la proteína. Se pueden medir tan poco como 1×10^{-15} mol (1 femtomol) de una proteína con un peso molecular (PM) hasta de 200.000 con un error del 0,1%.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 3-37 Se puede determinar el peso molecular de proteínas y péptidos mediante espectrometría de masa con "tiempo de vuelo". En un espectrómetro de masa con desorción láser, los pulsos de luz de un láser ionizan una proteína o una mezcla de péptidos absorbidas sobre un metal diana (1). Un campo eléctrico acelera las moléculas de la muestra hacia el detector (2 y 3). El tiempo que tardan en llegar al detector es inversamente proporcional a la masa de la molécula. Para moléculas que tienen la misma carga, el tiempo hacia el detector es inversamente proporcional a la masa. El peso de la molécula se calcula utilizando el tiempo de vuelo de un patrón.

La estructura primaria de las proteínas puede determinarse por métodos químicos y a partir de secuencias génicas

El método clásico para la determinación de la secuencia de aminoácidos de una proteína es la *degradación de Edman*. En este procedimiento, se marca el grupo amino del aminoácido N-terminal de un polipéptido, y luego se lo escinde e identifica mediante cromatografía líquida de alta presión. El polipéptido es un residuo más corto del lado izquierdo, con nuevos aminoácidos en el extremo N-terminal. El ciclo se repite y se va acortando la cadena polipeptídica hasta que todos los residuos han sido identificados.

Antes de 1985 era frecuente que los biólogos utilizaran el procedimiento químico de Edman para la determinación de la secuencia de las proteínas. Ahora, esta secuencia se determina principalmente mediante análisis de las secuencias del genoma. Ya se han secuenciado los genomas completos de diferentes organismos, y la base de datos de las secuencias de los genomas se está expandiendo con rapidez. Como analizaremos en el capítulo 9, se pueden deducir las secuencias de proteínas a partir de las secuencias de DNA que se presupone que codifican las proteínas.

Una aproximación importante para la determinación de la estructura primaria de una proteína aislada combina la espectrometría de masa y el uso de bases de datos de secuencias. Primero, se utiliza la espectrometría de masa para determinar la *huella digital de la masa peptídica* de la proteína. Esta huella digital es una compilación de los pesos moleculares de los péptidos, los cuales son generados por proteasas específicas. Los pesos moleculares de la proteína original y sus fragmentos proteolíticos se utilizan luego para buscar genomas en las bases de datos para cualquier proteína de tamaño similar con idénticos o similares mapas de masa peptídica.

Los péptidos con una secuencia definida pueden sintetizarse químicamente

Los péptidos sintéticos idénticos a los sintetizados in vivo son herramientas experimentales útiles para los estudios de las proteínas y las células. Por ejemplo, los péptidos sintéticos cortos, de 10-15 residuos, pueden actuar como antígenos que desencadenan la producción de anticuerpos en los animales. Cuando un péptido sintético se acopla a una proteína transportadora grande, puede desencadenar la producción de anticuerpos que unen el antígeno proteico natural de tamaño completo. Como se verá a través de todo este libro, los anticuerpos son reactivos muy versátiles para el aislamiento de proteínas de una mezcla mediante cromatografía de afinidad (véase fig. 3-34c), para separar y detectar proteínas con técnica de Western blot (véase fig. 3-35) y para localizar proteínas celulares mediante las técnicas microscópicas descritas en el capítulo 5.

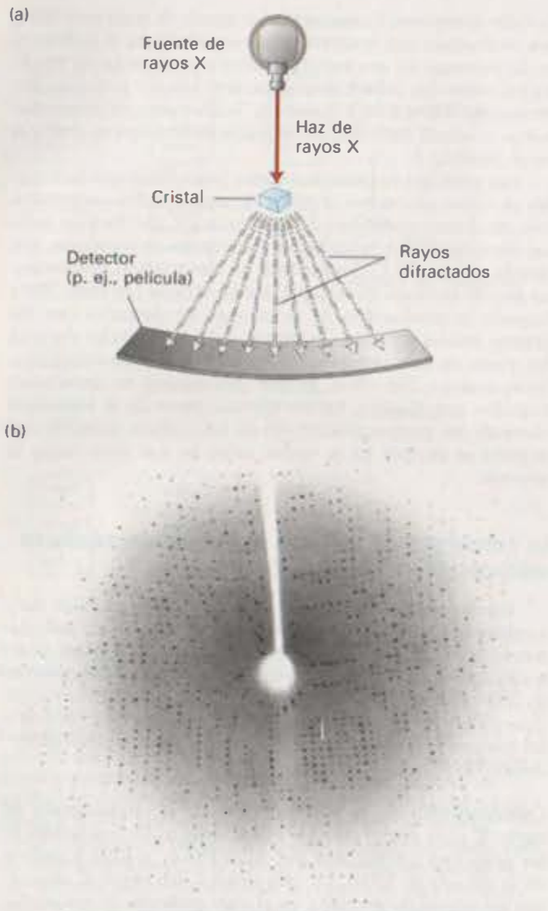
Los péptidos se sintetizan como procedimientos habituales en tubos de ensayo, a partir de aminoácidos monoméricos, mediante reacciones de condensación que forman enlaces peptídicos. Los péptidos se construyen en secuencia, por acoplamiento del C-terminal de un aminoácido monomérico con el extremo N-terminal de la cadena creciente. Para impedir la producción de reacciones no deseadas con los grupos amino y carboxilo de las cadenas laterales durante los pasos de acoplamiento, se les adosa un grupo protector (bloqueador). Sin estos grupos protectores se generarían péptidos ramificados. En los últimos pasos de la síntesis se eliminan los grupos protectores de las cadenas laterales y el péptido se escinde de la resina sobre la que tiene lugar la síntesis.

La conformación proteica se determina mediante métodos físicos sofisticados

En este capítulo se destacó que la función proteica deriva de la estructura de la proteína. En consecuencia, para determinar cómo actúa una proteína es necesario conocer la estructura tridimensional. La determinación de la conformación de una proteína requiere métodos físicos sofisticados y análisis complejos de los datos experimentales. Describiremos brevemente tres métodos utilizados para generar modelos tridimensionales de las proteínas.

Cristalografía de rayos X. El uso de la cristalografía de rayos X para determinar las estructuras tridimensionales de las proteínas fue iniciado por Max Perutz y John Kendrew en la década de 1950. En esta técnica, los rayos X atraviesan un cristal de proteína en el cual millones de moléculas están alineadas unas con otras en un ordenamiento rígido característico de la proteína. Las longitudes de onda de los rayos X miden 0,1-0,2 nm, suficientes para resolver los átomos del cristal de proteína. Éstos dispersan los rayos X, produciendo un patrón de difracción de puntos o manchas separadas cuando son interceptadas por una película fotográfica (fig. 3-38). Estos patrones son en extremo complejos, pudiéndose obtener hasta 25.000 manchas de difracción de una proteína pequeña. Es necesario efectuar cálculos elaborados y modificar la proteína (como la unión de metales pesados) para interpretar el patrón de difracción y descifrar su estructura. El proceso es análogo a la reconstrucción de la forma precisa de una roca a partir de las ondas que ésta genera en una laguna. Hasta la actualidad, se han establecido las estructuras tridimensionales de más de 10.000 proteínas mediante cristalografía de rayos X.

Microscopia crioelectrónica. Si bien algunas proteínas se cristalizan con facilidad, la obtención de cristales de otras proteínas, sobre todo las que tienen múltiples subunidades grandes, requiere un esfuerzo prolongado de prueba y error para encontrar con exactitud las condiciones correctas. Mediante *microscopia crioelectrónica* se pueden obtener las estructuras de estas proteínas difíciles de cristalizar. En esta téc-



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 3-38 La cristalografía de rayos X proporciona datos de difracción a partir de los cuales se puede determinar la estructura tridimensional de una proteína. (a) Componentes básicos para una determinación cristalográfica de rayos X. Cuando un haz estrecho de rayos X incide sobre un cristal, parte de él atraviesa el cristal directamente y el resto se dispersa (es difractado) en distintas direcciones. La intensidad de las ondas difractadas se registra en una película radiográfica o con un detector electrónico de estado sólido. (b) Patrón de difracción de rayos X de un cristal de topoisomerasa obtenido con un detector de estado sólido. A partir de análisis complejos de patrones como éstos es posible determinar la localización de cada átomo en una proteína. (Parte (a) adaptada de L. Stryer, 1995, *Biochemestry*, 4th ed., W. H. Freeman and Company, p. 64; parte (b) cortesia de J. Berger.)

nica se congela rápidamente una muestra proteica en helio líquido para preservar la estructura y examinar la proteína en estado hidratado congelado en un microscopio crioelectrónico. Se registran las imágenes en una película con una baja dosis de electrones, a fin de impedir el daño de la estructura inducido por las radiaciones. Programas sofisticados informáticos analizan las imágenes y reconstruyen la estructura de la proteína en tres dimensiones. Los avances recientes en microscopia crioelectrónica, permiten a los investigadores obtener modelos moleculares comparables con los generados por cristalografía por rayos X. El uso de la microscopia crioelectrónica y de otros tipos de microscopia electrónica para el estudio de las estructuras celulares se explica en el capítulo 5.

Espectroscopia por resonancia magnética nuclear (RMN). Las estructuras tridimensionales de las proteínas pequeñas, que contienen hasta unos 200 aminoácidos, se pueden estudiar con espectroscopia por RMN. En esta técnica, se coloca una solución concentrada de proteína en un campo magnético y se miden los efectos de diferentes radiofrecuencias sobre el espín de distintos átomos. El comportamiento de cualquier átomo es influido por los átomos vecinos en residuos adyacentes; los residuos muy cercanos muestran mayor perturbación que los residuos distantes. En función de la magnitud de este efecto es posible calcular las distancias entre residuos, que luego se utilizan para generar un modelo de la estructura tridimensional de la proteína.

Si bien la RMN no requiere la cristalización de una proteína, una gran ventaja, esta técnica sólo se puede aplicar a proteínas menores de 20 kDa. No obstante, el análisis por RMN también puede aplicarse a dominios de proteínas, los cuales tienden a tener el tamaño adecuado para esta técnica y a menudo se obtienen como estructuras estables.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 3.6

Purificación, detección y caracterización de las proteínas

- Se pueden aislar proteínas respecto de otros componentes celulares y sobre la base de diferencias de las propiedades físicas y químicas.
- La centrifugación separa las proteínas sobre la base de sus velocidades de sedimentación, la cual es influida por sus masas y sus formas.
- La electroforesis en gel separa las proteínas sobre la base de su velocidad de desplazamiento ante la aplicación de un campo eléctrico. La electroforesis en gel de poliacrilamida puede resolver cadenas polipeptídicas que difieren en 10% en el peso molecular o incluso menos (véase fig. 3-32).
- La cromatografía líquida separa las proteínas sobre la base de sus velocidades de desplazamiento a través de una columna en la que hay perlas esféricas. Las proteínas que difieren en masa se separan en columnas de filtración en gel; las que difieren en carga, en columnas de intercambio iónico y las que difieren en las propiedades de fijación al ligando, en columnas de afinidad (véase fig. 3-34).
- Para detectar y cuantificar proteínas se utilizan distintos ensayos. Algunos utilizan una reacción que produce luz o radiactividad para generar la señal. Otros producen una señal coloreada amplificada por la acción de enzimas y sustratos cromogénicos.
- Los anticuerpos son poderosos reactivos utilizados para detectar, cuantificar y aislar proteínas. Se usan en cromatografía por afinidad y, combinados con electroforesis en gel en la técnica de Western blot constituyen un método excelente para separar y detectar una proteína en una mezcla (véase fig. 3-35).
- La autorradiografía es una técnica semicuantitativa para la detección de moléculas con marca radiactiva en células, tejidos o geles de electroforesis.
- La experimentos de marcación de pulso y caza pueden determinar el destino de las proteínas y otros metabolitos (véase fig. 3-36).
- Se obtienen estructuras tridimensionales de proteínas mediante cristalografía de rayos X, espectroscopia por RMN y microscopia crioelectrónica. La cristalografía de rayos X proporciona las estructuras más detalladas, pero requiere la cristalización de la proteína. La microscopia crioelectrónica tiene particular utilidad para los grandes complejos proteicos, difíciles de cristalizar. Sólo las proteínas relativamente pequeñas pueden analizarse por RMN.

PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO

La expansión impresionante del poder de las computadoras se encuentra en el centro de los avances para determinar la estructura tridimensional de las proteínas. Por ejemplo, las computadoras de tubo de vacío que utilizaban programas perforados en tarjetas fueron utilizadas para resolver las primeras estructuras de las proteínas, basándose en la cristalografía de rayos X. En el futuro, los investigadores apuntan a predecir la estructura de proteínas basándose sólo en la secuencia de aminoácidos deducida a partir de las secuencias génicas. Estos problemas computacionales desafiantes requieren supercomputadoras o grandes agrupaciones de computadoras que trabajan en sincronía. Actualmente, sólo las estructuras de dominios muy pequeños, que contienen 100 residuos o menos pueden predecirse a baja resolución. Sin embargo, desarrollos continuos en la informática y en los modelos de plegamiento de proteínas, combinados con esfuerzos en gran escala para resolver la estructura de todos los motivos de las proteínas a través de la cristalografía de rayos X, permitirán la predicción de la estructura de grandes proteínas. Con un crecimiento exponencial de las bases de datos de motivos, dominios y proteínas, los científicos serán capaces de identificar los motivos en una proteína desconocida, hacer corresponder el motivo con la secuencia y utilizar esto como punto de partida para predecir la estructura tridimensional de toda la proteína.

La combinación de nuevos enfoques ayudará en la determinación de estructuras de alta resolución de maquinarias moleculares como las listadas en el cuadro 3-1. Aunque estas grandes agrupaciones macromoleculares suelen ser difíciles de cristalizar y, por ende, de resolver por cristalografía de rayos X, pueden ser representadas en un microscopio crioelectrónico a las temperaturas del helio líquido y altas energías del electrón. A partir de millones de "partículas" individuales, cada una de las cuales representan una vista al azar del complejo proteico, es posible reconstruir la estructura tridimensional. Debido a que las subunidades del complejo pueden estar ya resueltas por cristalografía, se generará una estructura compuesta consistente de las subunidades de las estructuras derivadas de los rayos X adecuadas al modelo derivado de EM. Una interesante aplicación de este tipo de estudios podría ser la solución de la estructura de las proteínas amiloide y prion, especialmente en las etapas iniciales de la formación de los filamentos insolubles.

El entendimiento del funcionamiento de las máquinas proteicas requerirá la medición de muchas características nuevas de las proteínas. Por ejemplo, debido a que muchas máquinas nuevas realizan trabajo no químico de algún tipo, los biólogos serán capaces de identificar las fuentes de energía (mecánica, eléctrica o térmica) y medir la cantidad de energía para determinar los límites de una máquina particular. La mayoría de las actividades de las máquinas incluyen un movimiento de un tipo u otro, por lo tanto, la fuerza que impulsa el movimiento y su relación con la actividad biológica pueden ser una fuente de entendimiento acerca de cómo la generación de fuerza está asociada con la química. Las herramientas mejoradas, como las trampas ópticas y el microscopio de fuerza atómica, permitirán estudios detallados de las fuerzas y la química concerniente a la operación de las maquinarias proteicas individuales.

PALABRAS CLAVE

alosterismo *83*
autorradiografía *93*
centrifugación por zonas de velocidad *87*
chaperona *69*
conformación *60*
cooperatividad *83*
cristalografía de rayos X *95*
cromatografía líquida *90*
dominio *63*
electroforesis *87*
energía de activación *74*
enlace peptídico *60*
estructura cuaternaria *66*
estructura primaria *61*
estructura secundaria *61*
estructura terciaria *62*
filamento amiloide *73*
hélice α *61*
hoja β *61*
homología *68*
K_m *76*
ligando *73*
maquinaria molecular *59*
motivo *63*
polipéptido *61*
proteasoma *71*
proteína *61*
proteína motora *79*
proteoma *60*
sitio activo *75*
ubicuitina *71*
$V_{máx}$ *76*

REVISIÓN DE CONCEPTOS

1. La estructura tridimensional de una proteína está determinada por sus estructuras primaria, secundaria y terciaria. Defina estas estructuras. ¿Cuáles son algunas de las estructuras secundarias más comunes? ¿Cuáles son las fuerzas que mantienen unidas las estructuras secundaria y terciaria? ¿Qué es la estructura cuaternaria?

2. El plegado correcto de las proteínas es esencial para la actividad biológica. Describa el papel de las chaperonas y de las chaperoninas moleculares en el plegado de las proteínas.

3. Las proteínas son degradadas en las células. ¿Qué es la ubicuitina y qué papel cumple en el marcado de las proteínas para la degradación? ¿Cuál es la función de los proteasomas en la degradación de las proteínas?

4. Las enzimas pueden catalizar reacciones químicas. ¿Cómo incrementan las enzimas la velocidad de reacción? ¿Qué constituye el sitio activo de una enzima? Para una reacción catalizada por enzimas, ¿qué son la K_m y la $V_{máx}$? Para una enzima X, la K_m para el sustrato A es 0,4 mM y para el sustrato B es 0,01 mM. ¿Cuál sustrato tiene una afinidad más alta por la enzima X?

5. Las proteínas motoras, como la miosina, convierten la energía en fuerza mecánica. Describa las tres propiedades generales características de las proteínas motoras. Describa los eventos bioquímicos que ocurren durante un ciclo de movimientos de miosina en relación con un filamento de actina.

6. El funcionamiento de las proteínas puede ser regulado de numerosas maneras. ¿Qué es la cooperatividad y cómo influye en el funcionamiento de las proteínas? Describa cómo la fosforilación y la escisión proteolítica pueden modular el funcionamiento de las proteínas.

7. Numerosas técnicas pueden separar proteínas según sus diferencias de masa. Describa el uso de dos de estas técnicas, la centrifugación y la electroforesis en gel. Las proteínas de la sangre transferrina (PM 76 kDa) y las lisosimas (PM 15 kDa) se pueden separar mediante centrifugación por zonas de velocidad o por electroforesis en gel de policrilamida con SDS. ¿Cuál de las dos proteínas sedimentará más rápidamente durante la electroforesis? ¿Cuál migrará más rápidamente durante la electroforesis?

8. La cromatografía es un método analítico utilizado para separar las proteínas. Describa los principios para separar proteínas mediante filtración de gel, intercambio iónico y cromatografía de afinidad.

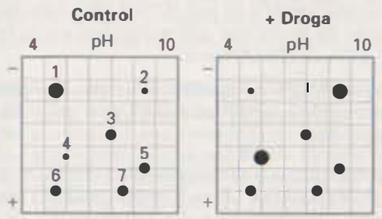
9. Se han desarrollado diversos métodos para detectar proteínas. Describa cómo pueden utilizarse los radioisótopos y la autorradiografía para marcar y detectar proteínas. ¿Cómo se detectan proteínas por Western blot?

10. Los métodos físicos se utilizan a menudo para determinar la conformación de las proteínas. Describa cómo pueden usarse la cristalografía de rayos X, la microscopia crioelectrónica y la espectroscopia por RMN para determinar la forma de las proteínas.

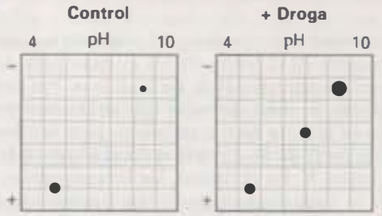
ANÁLISIS DE LOS DATOS

La proteómica involucra el análisis global de la expresión de las proteínas. En un enfoque, se extraen todas las proteínas de las células de control y de las células tratadas y luego se separan usando la electroforesis bidimensional en gel. Típicamente se resuelven, es decir se distinguen cientos o miles de puntos de proteínas y se comparan los niveles de estado estable de cada proteína entre las células control y las tratadas. Por simplicidad, en el siguiente ejemplo se muestran sólo algunos puntos de las proteínas. Las proteínas se separan en la primera dimensión sobre la base de la carga por isoelectroenfoque (pH 4–10) y luego se separan por tamaño mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. Las proteínas son detectadas con una tintura como la azul de Coomassie y se les asignan números para la identificación.

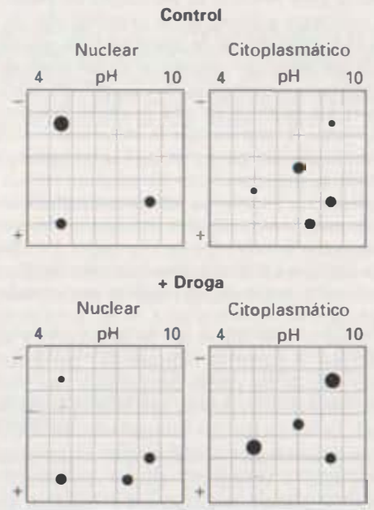
a. Las células se tratan con una droga ("Droga + ") o se dejan sin tratar ("Control") y luego se extraen las proteínas y se las separa por electroforesis bidimensional en gel. Los geles teñidos se muestran abajo. ¿Qué puede concluir acerca del efecto de la droga sobre estos niveles del estado estable de las proteínas 1–7?



b. Usted sospecha que la droga puede estar induciendo una proteincinasa, así que repite el experimento de la parte a. en presencia del fosfato inorgánico marcado ^{32}P. En este experimento se exponen los geles bidimensionales a hojas de rayos X para detectar la presencia de las proteínas marcadas con ^{32}P. Las hojas de rayos X se muestran abajo. A partir de este experimento, ¿qué concluye acerca del efecto de la droga en las proteínas 1–7?



c. Para determinar la localización celular de las proteínas 1–7, las células de la parte a. fueron separadas en fragmentos nucleares y citoplasmáticos por centrifugación diferencial. Se corrieron los geles bidimensionales y los geles teñidos se muestran abajo. ¿Qué concluye acerca de la localización de las proteínas 1–7?



d. Resuma las propiedades globales de las proteínas 1–7, combinando los datos de las partes a, b, y c. Describa cómo podría determinar la identidad de cualquiera de las proteínas.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía general

Berg, J. M., J. L. Tymoczko, and L. Stryer. 2002. Biochemistry, 5th ed. W. H. Freeman and Company, chaps. 2-4, 7-10.

Nelson, D. L., and M. M. Cox. 2000. Lehninger Principles of Biochemistry, 3d ed. Worth Publishers, chaps. 5-8.

Sitios Web

Entry site into the proteins, structures, genomes, and taxonomy: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/

The protein 3D structure database: http://www.rcsb.org/

Structural classifications of proteins: http://scop.mrclmb.cam.ac.uk/scop/

Sites containing general information about proteins: http://www.expasy.ch/; http://www.proweb.org/

Sites for specific protein families: http://www.pkr.sdsc. edu/html/index.shtml The protein kinase resource; http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/myosin/myosin.html The myosin home page; http://www. proweb.org/kinesin// The kinesin home page

Estructura jerárquica de las proteínas

Branden, C., and J. Tooze. 1999. Introduction to Protein Structure. Garland.

Creighton, T. E. 1993. Proteins: Structures and Molecular Properties, 2d ed. W. H. Freeman and Company.

Hardison, R. 1998. Hemoglobins from bacteria to man: Evolution of different patterns of gene expression. J. Exp. Biol. 201: 1099.

Lesk, A. M. 2001. Introduction to Protein Architecture. Oxford.

Macromolecular Machines. 1998. Cell 92:291-423. A special review issue on protein machines.

Patthy, L. 1999. Protein Evolution. Blackwell Science.

Plegamiento, modificación y degradación de las proteínas

Cohen, F. E. 1999. Protein misfolding and prion diseases. J. Mol Biol. 293:313-320.

Dobson, C. M. 1999. Protein misfolding, evolution, and disease. Trends Biochem. Sci. 24:329-332.

Hartl, F. U., and M. Hayer-Hartl. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein. Science 295:1852-1858.

Kirschner, M. 1999. Intracellular proteolysis. Trends Cell Biol. 9:M42-M45.

Kornitzer, D., and A. Ciechanover. 2000. Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. J Cell Physiol. 182:1-11.

Laney, J. D., and M. Hochstrasser. 1999. Substrate targeting in the ubiquitin system. Cell 97:427-430.

Rochet, J.-C., and P. T. Landsbury. 2000. Amyloid fibrillogenesis: Themes and variations. Curr. Opin. Struct. Biol. 10:60-68.

Weissman, A. M. 2001. Themes and variations on ubiquitylation. Nature Cell Biol. 2:169-177.

Zhang, X., F. Beuron, and P. S. Freemont. 2002. Machinery of protein folding and unfolding. Curr. Opin. Struct. Biol. 12:231-238.

Zwickil, P., W. Baumeister, and A. Steven. 2000. Dis-assembly lines: The proteasome and related ATPase-assisted proteases. Curr. Opin. Struct. Biol. 10:242-250.

Las enzimas y el trabajo químico de las células

Dressler, D. H., and H. Potter. 1991. Discovering Enzymes. Scientific American Library.

Fersht, A. 1999. Enzyme Structure and Mechanism, 3d ed. W. H. Freeman and Company.

Smith, C. M., et al. 1997. The protein kinase resource. Trends Biochem. Sci. 22:444-446.

Taylor, S. S., and E. Radzio-Andzelm. 1994. Three protein kinase structures define a common motif. Structure 2:345-355.

Los motores moleculares y el trabajo mecánico de las células

Cooke, R. 2001. Motor proteins. Encyclopedia Life Sciences. Nature Publishing Group.

Spudich, J. A. 2001. The myosin swinging cross-bridge model. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2:387-392.

Vale, R. D., and R. A. Milligan. 2000. The way things move: Looking under the hood of molecular motor proteins. Science 288:88-95.

Mecanismos generales para la regulación de la función de la proteína

Ackers, G. K. 1998. Deciphering the molecular code of hemoglobin allostery. Adv. Protein Chem. 51:185-253.

Austin, D. J., G. R. Crabtree, and S. L. Schreiber. 1994. Proximity versus allostery: The role of regulated protein dimerization in biology. Chem. Biol. 1:131-136.

Burack, W. R., and A. S. Shaw. 2000. Signal transduction: Hanging on a scaffold. Curr. Opin. Cell. Biol. 12:211-216.

Cox, S., E. Radzio-Andzelm, and S. S. Taylor. 1994. Domain movements in protein kinases. Curr. Opin. Struct. Biol. 4:893-901.

Horovitz, A., Y. Fridmann, G. Kafri, and O. Yifrach. 2001. Review: Allostery in chaperonins. J. Struct. Biol. 135:104-114.

Kawasaki, H., S. Nakayama, and R. H. Kretsinger. 1998. Classification and evolution of EF-hand proteins. Biometals 11:277-295.

Lim, W. A. 2002. The modular logic of signaling proteins: Building allosteric switches from simple binding domains. Curr. Opin. Struct. Biol. 12:61-68.

Ptashne, M., and A. Gann. 1998. Imposing specificity by localization: Mechanism and evolvability. Curr. Biol. 8:R812-R822.

Saibil, H. R., A. L. Horwich, and W. A. Fenton. 2001. Allostery and protein substrate conformational change during GroEL/GroES-mediated protein folding. Adv. Protein Chem. 59:45-72.

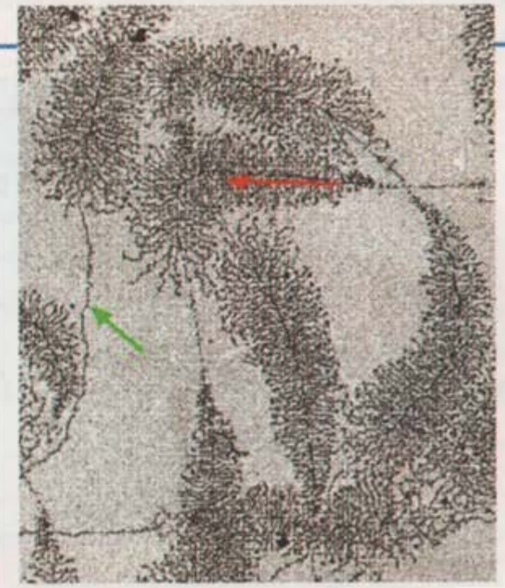
Yap, K. L., J. A. B. Ames, M. B. Sindells, and M. Ikura. 1999. Diversity of conformational states and changes within the EF-hand protein superfamily. Proteins 37:499-507.

Purificación, detección y caracterización de las proteínas

Hames, B. D. A Practical Approach. Oxford University Press. A methods series that describes protein purification methods and assays.

4

MECANISMOS GENÉTICOS MOLECULARES BÁSICOS



Microfotografía electrónica del DNA (flecha verde) que es transcripto a RNA (flecha roja). (O. L. Miller, Jr. y Barbara R. Beatty, Oak Ridge National Laboratory.)

En el capítulo 3 se describió la extraordinaria versatilidad de las proteínas como motores e interruptores moleculares, catalizadores y componentes de estructuras celulares. En este capítulo se consideran los ácidos nucleicos. Estas macromoléculas 1) contienen la información para determinar la secuencia de aminoácidos y por lo tanto la estructura y función de todas las proteínas de una célula, 2) son parte de las estructuras celulares que seleccionan y alinean aminoácidos en el orden correcto a medida que se sintetiza una cadena polipeptídica, y 3) catalizan numerosas reacciones químicas fundamentales, incluida la formación de enlaces peptídicos entre aminoácidos durante la síntesis de proteínas.

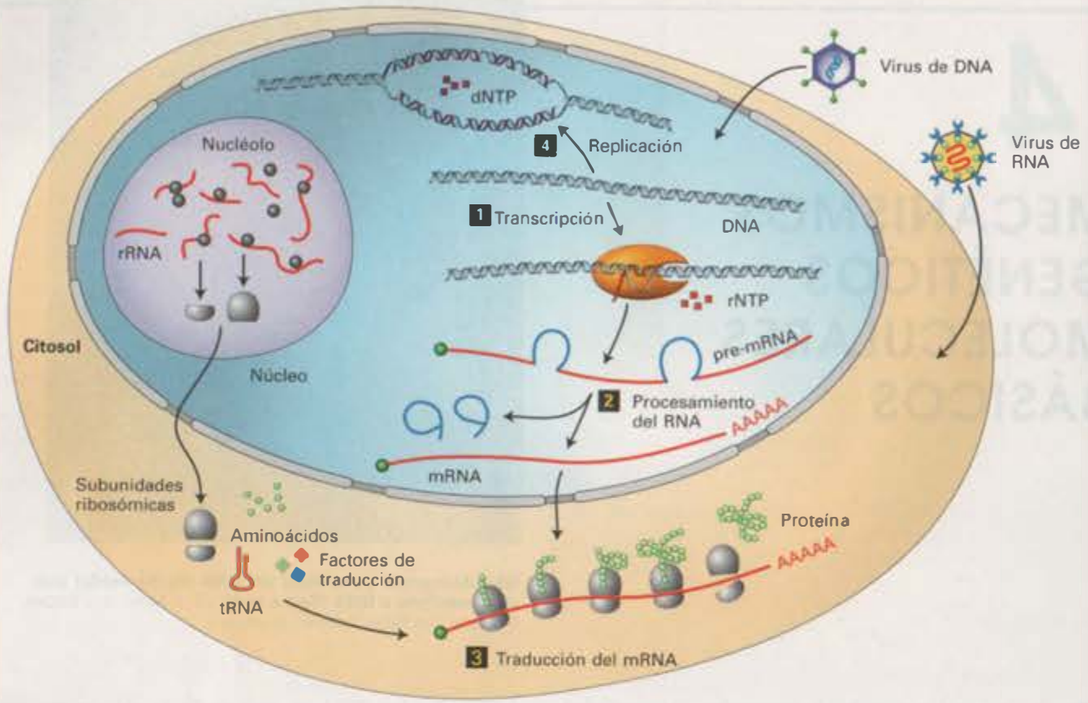
El ácido desoxirribonucleico (DNA) contiene toda la información necesaria para construir las células y los tejidos de un organismo. La replicación exacta de esta información en cualquier especie asegura su continuidad genética de una generación a otra y es crítica para el desarrollo normal de un individuo. La información acumulada en el DNA está organizada en unidades hereditarias, hoy conocidas como genes, que controlan rasgos identificables de un organismo. En el proceso de transcripción, la información almacenada en el DNA es copiada al ácido ribonucleico (RNA), que lleva a cabo tres funciones distintas en la síntesis proteica.

El RNA mensajero (mRNA) porta las instrucciones del DNA que especifican el orden correcto de los aminoácidos durante la síntesis de proteínas. El ensamblaje paso a paso, notablemente preciso, de los aminoácidos para formar las proteínas tiene lugar mediante la traducción del mRNA. En este proceso, la información en el mRNA es interpretada por un segundo tipo de RNA denominado RNA de transferencia (tRNA) con la ayuda de un tercer tipo de RNA, el RNA ribosómico (rRNA) y sus proteínas asociadas. A medida que los aminoácidos apropiados son ubicados en secuencia por los tRNA, se unen mediante enlaces peptídicos para formar proteínas.

El descubrimiento de la estructura del DNA en 1953 y posteriores dilucidaciones de cómo el DNA dirige la síntesis de RNA, el cual luego dirige el ensamblaje de las proteínas –el también llamado *dogma central*–fueron logros monumentales que marcaron los primeros días de la biología molecular. Sin embargo, la representación simplificada del dogma central como DNA→RNA→proteína no refleja el papel de las proteínas en la síntesis de los ácidos nucleicos. Aún más, como se analizará en capítulos posteriores, las proteínas son en gran parte responsables de la *regulación* de la expresión génica, el proceso global en el que la información codificada en el DNA es decodificada en las proteínas que caracterizan los diversos tipos de células.

CONTENIDO

4.1 Estructura de los ácidos nucleicos
4.2 Transcripción de genes codificadores de proteínas y formación de mRNA funcional
4.3 Control de la expresión génica en los procariontes
4.4 Las tres funciones del RNA en la traducción
4.5 Pasos de la síntesis de proteínas sobre los ribosomas
4.6 Replicación del DNA
4.7 Virus: parásitos del sistema genético celular



▲ Fig. 4.1. Vista general de cuatro procesos genéticos básicos. En este capítulo cubrimos los tres procesos que conducen a la producción de proteínas (1 – 3) y el proceso para replicar el DNA (4). Debido a que los virus utilizan estructuras de la célula huésped, han sido modelos importantes para estudiar estos procesos. Durante la transcripción de un gen que codifica una proteína mediante la RNA polimerasa (1), el código de cuatro bases del DNA que especifica la secuencia de aminoácidos de una proteína se copia en un precursor del RNA mensajero (pre-mRNA) mediante la polimerización de monómeros de ribonucleósido trifosfato (rNTP). La eliminación de secuencias extrañas y otras modificaciones al pre-mRNA (2), conocidas como *procesamiento del RNA*, producen un mRNA funcional, que es transportado al citoplasma. Durante la traducción (3), el código de cuatro bases del mRNA es decodificado al "lenguaje" de 20 aminoácidos de las proteínas. Los ribosomas, las estructuras macromoleculares que traducen el código del mRNA, están compuestas de dos subunidades ensambladas en el nucléolo a partir de RNA ribosómicos (rRNA) y múltiples proteínas (*izquierda*). Después de ser transportadas al citoplasma, las subunidades ribosómicas se asocian con un mRNA y llevan a cabo la síntesis proteica con la ayuda de los RNA de transferencia (tRNA) y diversos factores de traducción. Durante la replicación del DNA (4), que ocurre sólo en células preparadas para dividirse, los monómeros de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTP) son polimerizados para producir dos copias idénticas de cada molécula cromosómica de DNA. Cada célula hija recibe una de las copias.

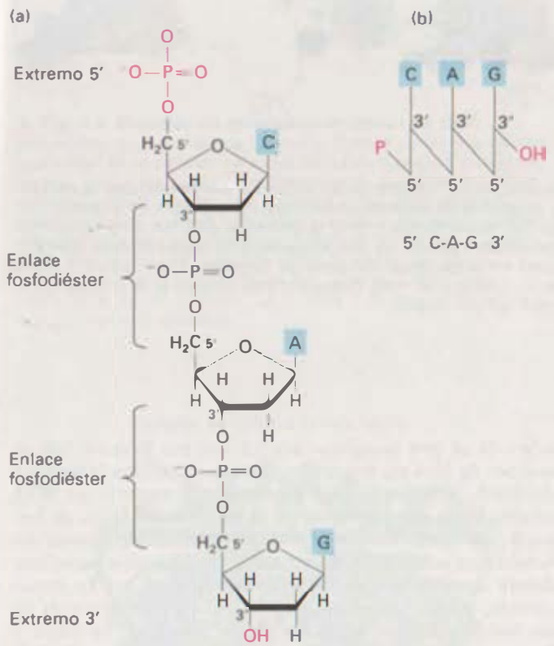
En este capítulo, revisaremos primero las estructuras básicas y las propiedades del DNA y de RNA. En las próximas secciones se analizarán los procesos básicos que se resumen en la figura 4-1: la transcripción del DNA en precursores de RNA, el procesamiento de estos precursores para hacer moléculas funcionales de RNA, la traducción de los mRNA en proteínas, y la replicación del DNA. A lo largo del camino comparamos las estructuras genéticas en procariontes y eucariontes y describimos cómo las bacterias controlan la transcripción, estableciendo la base para los mecanismos más complejos del control de la transcripción en los eucariontes que serán tratados en el capítulo 11. Luego de esbozar los papeles individuales del mRNA, el tRNA y el rRNA en la síntesis de proteínas, presentaremos una descripción detallada de los componentes y los pasos bioquímicos de la traducción. También se considerarán los problemas moleculares involucrados en la replicación del DNA y la compleja maquinaria celular para asegurar el copiado exacto del material genético. La sección final del capítulo presenta la información básica acerca de los virus, que son modelos importantes de organismos para estudiar la síntesis macromolecular y otros procesos celulares.

4.1 Estructura de los ácidos nucleicos

El DNA y el RNA son químicamente muy similares. La estructura primaria de ambos son polímeros lineales compuestos de monómeros llamados nucleótidos. El RNA celular posee una longitud que va desde menos de cien hasta varios miles de nucleótidos. Las moléculas de DNA celular pueden ser tan largas como varios cientos de millones de nucleótidos. Estas grandes unidades de DNA, en asociación con las proteínas, se pueden teñir con colorantes y visualizar en el microscopio óptico como cromosomas, denominados así debido a su aptitud de colorearse.

Una hebra de ácidos nucleicos es un polímero lineal con direccionalidad de un extremo a otro

El DNA y el RNA constan, cada uno, de sólo cuatro nucleótidos distintos. Recuerde del capítulo 2, que todos los nucleótidos tienen una base orgánica unida a un azúcar de cinco carbonos que posee un grupo fosfato unido al carbono 5. En el RNA, el azúcar es ribosa; en el DNA, desoxirribosa (véase fig. 2-14). Los nucleótidos que se utilizan en la síntesis de DNA y RNA contienen cinco bases diferentes. La bases *adenina* (A) y *guanina* (G) son purinas, que contienen un par de anillos fusionados; las bases *citosina* (C), *timina* (T) y *uracilo* (U) son pirimidinas, que contienen un único anillo (véase fig. 2-15). Tanto el DNA como el RNA contienen tres de estas bases: A, G y C; sin embargo, T sólo se encuentra en el DNA y U sólo en el RNA. (Nótese que la abreviatura de una letra para estas bases también suele utilizarse para designar todos los nucleótidos en los polímeros de los ácidos nucleicos.)



▲ Fig. 4-2. Representaciones alternativas de una hebra de ácidos nucleicos que ilustran su direccionalidad química. Aquí se muestra una única hebra de DNA que contiene sólo tres bases: citosina (C), adenina (A) y guanina (G). (a) La estructura química muestra un grupo hidroxilo en el extremo 3′ y un grupo fosfato en el extremo 5′. Nótese también que dos enlaces fosfoéster unen nucleótidos adyacentes; esta unión de dos enlaces suele ser referida como *enlace fosfodiéster*. (b) En el diagrama de "barras" (*arriba*), los azúcares están indicados como líneas verticales y los enlaces fosfodiéster como líneas diagonales; las bases se indican por sus abreviaturas de una letra. En la representación más simple (*abajo*), sólo se señalan las bases. Por convención, una secuencia de polinucleótidos se escribe siempre en la dirección 5′→3′ (de izquierda a derecha) a menos que esté indicado de otra manera.

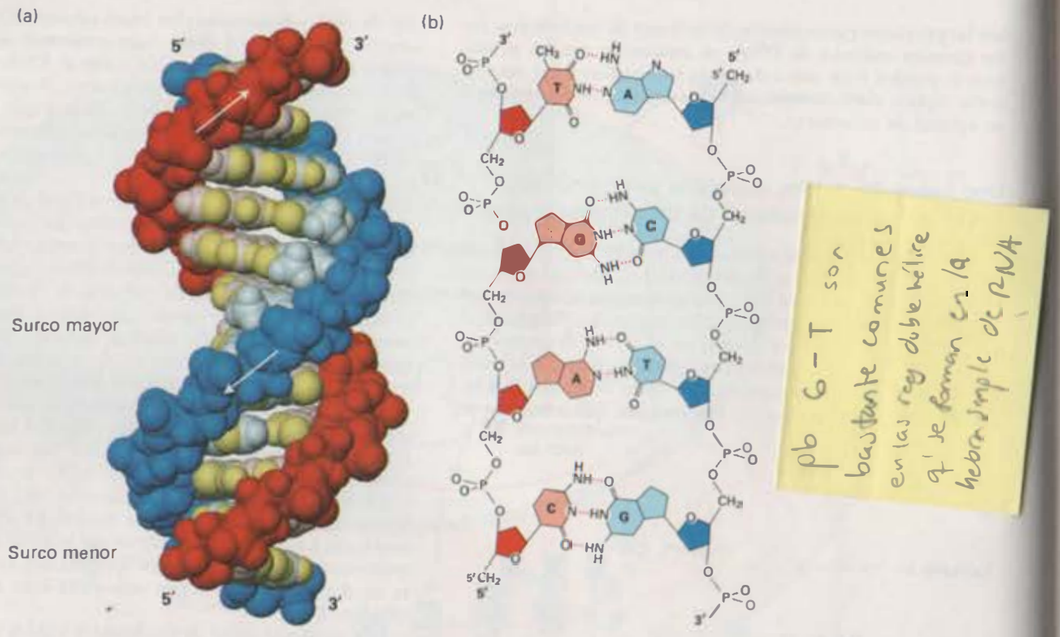
Una sola hebra de ácido nucleico tiene un *esqueleto* compuesto por unidades repetidas de pentosa-fosfato a partir de la cual se extienden como grupos laterales las bases purina y pirimidina. Como un polipéptido, una hebra de ácido nucleico tiene una orientación química, de extremo a extremo: el *extremo 5′* tiene un grupo hidroxilo o fosfato en el carbono 5′ de su azúcar terminal; el *extremo 3′* generalmente contiene un grupo hidroxilo en el carbono 3′ de su azúcar terminal (fig. 4-2). Esta dirección específica o polaridad, sumada al hecho de que la síntesis procede del 5′ al 3′, ha dado origen a la convención de leer y escribir las secuencias de polinucleótidos en la dirección 5′→3′ (de izquierda a derecha); por ejemplo, la secuencia AUG se supone que es (5′)AUG(3′). Como veremos, la direccionalidad 5′→3′ de una hebra de ácido nucleico es una propiedad importante de la molécula. La unión química entre nucleótidos adyacentes, comúnmente denominada enlace fosfodiéster, en realidad consta de dos enlaces fosfoéster, uno en el lado 5′ del fosfato y otro en el lado 3′.

La secuencia lineal de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster constituye la estructura primaria de los ácidos nucleicos. Al igual que los polipéptidos, los polinucleótidos pueden enroscarse y plegarse para formar conformaciones tridimensionales estabilizadas por enlaces no covalentes. Si bien las estructuras primarias del DNA y el RNA suelen ser similares, sus conformaciones tridimensionales son bastante diferentes. Estas diferencias estructurales son críticas para las distintas funciones de los dos tipos de ácidos nucleicos.

El DNA nativo es una doble hélice de hebras complementarias y antiparalelas

La era moderna de la biología molecular comienza en 1953, cuando James D. Watson y Francis H. C. Crick propusieron que el DNA tiene una estructura de doble hélice. La propuesta, basada en el análisis de patrones de difracción de rayos-X asociados con una construcción cuidadosa de modelos, probó ser correcta y posibilitó las condiciones para nuestra comprensión actual de la forma de funcionar del DNA como material genético.

El DNA consta de dos hebras de polinucleótidos asociadas que se entrelazan entre sí para formar una doble hélice. Los dos esqueletos de azúcar-fosfato se ubican en la parte exterior de la doble hélice y las bases se proyectan hacia el interior. Las bases adyacentes de cada hebra se apilan una sobre otra en planos paralelos (fig. 4-3a). La orientación de las dos hebras es *antiparalela*; es decir sus direcciones 5′→3′ son opuestas. Las hebras se mantienen en un registro exacto debido a la formación de pares de bases entre las dos hebras: A está apareada con T a través de dos enlaces de hidrógeno y G está apareada con C a través de tres enlaces de hidrógeno (fig. 4-3b). Esta complementariedad de pares de bases es una consecuencia del tamaño, forma y composición química de las bases. La presencia de miles de tales enlaces de hidrógeno en una molécula de DNA contribuye en gran medida a



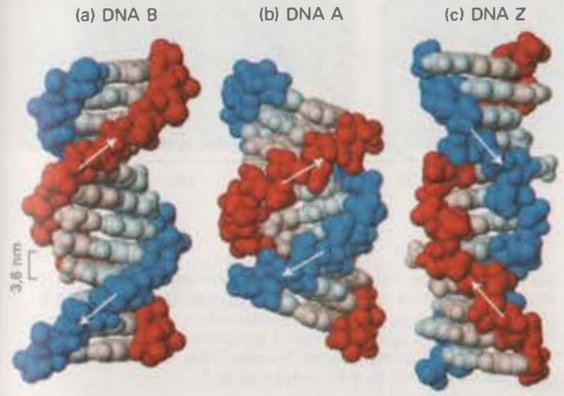
▲ Fig. 4-3. La doble hélice de DNA. (a) Modelo espacial de DNA B, la forma más común de DNA en las células. Las bases (colores claros) se proyectan hacia el interior de los esqueletos de azúcar-fosfato (azul y rojo) de cada hebra, pero sus extremos son accesibles a través de los surcos mayor y menor. Las flechas indican la dirección 5′→3′ de cada hebra. Los enlaces de hidrógeno entre las bases están en el centro de la estructura. Los surcos mayor y menor están alineados por potenciales donantes y aceptores de enlaces de hidrógeno (resaltados en amarillo). (b) Estructura química de la doble hélice de DNA. Este esquema extendido muestra los dos esqueletos de azúcar-fosfato que se unen entre los pares de bases de Watson y Crick, A·T y G·C. [Parte (a) de R.Wing et al., 1980, *Nature* 287:755; parte (b) de R. E. Dickerson, 1983, *Sci. Am.* 249:94.]

la estabilidad de la doble hélice. Las interacciones hidrófobas y de van der Waals entre los pares de bases adyacentes apiladas también estabilizan la estructura de doble hélice.

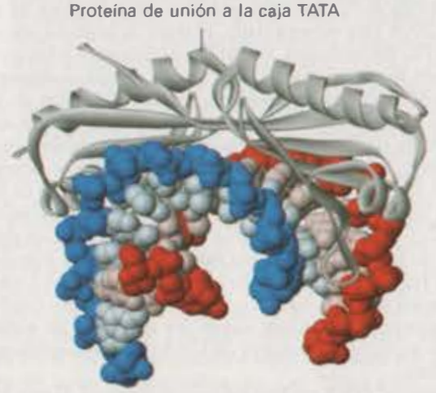
En el DNA natural, A siempre se une mediante enlaces de hidrógeno con T y G con C, formando pares de bases A·T y G·C como se muestra en la figura 4-3b. Estas asociaciones entre una purina más grande y una pirimidina más pequeña son a menudo denominadas *pares de bases de Watson y Crick*. Dos hebras de polinucleótidos o sus regiones, en las cuales todos los nucleótidos forman estos pares de base, se denominan complementarias. Sin embargo, en teoría y en el DNA sintético, pueden formarse otros pares de bases. Por ejemplo, una guanina (una purina) puede formar un enlace de hidrógeno con una timina (una pirimidina), causando sólo una distorsión menor en la hélice. El espacio disponible en la hélice también permitiría el apareamiento entre las dos pirimidinas citosina y timina. Si bien los pares de bases no estándares G·T y C·T no suelen encontrarse en el DNA, los pares de bases G·U son bastante comunes en las regiones de doble hélice que se forman en la hebra simple de RNA.

La mayoría del DNA en las células es una hélice *con giro hacia la derecha*. El patrón de difracción por rayos X del DNA indica que las bases apiladas están separadas por un espacio regular de 0,36 nm a lo largo del eje de la hélice. La hélice da un giro completo cada 3,6 nm; por lo tanto, hay alrededor de 10,5 pares por giro. Esto se denomina la *forma B* del DNA, la forma normal presente en la mayoría del DNA celular. En la parte exterior en la forma B del DNA de forma B, los espacios entre las hebras entrelazadas forman dos hendiduras helicoidales de distinto ancho, descritas como hendidura *mayor* y hendidura *menor* (véase fig. 4-3a). En consecuencia, los átomos en los bordes de cada base dentro de estas hendiduras son accesibles desde afuera de la hélice y forman dos tipos de superficies de unión. Las proteínas de unión al DNA pueden "leer" la secuencia de bases en el DNA bicatenario contactando los átomos en cualquiera de las hendiduras mayor o menor.

Además de la forma B principal, se describieron tres estructuras adicionales de DNA. Dos de estas se comparan con el DNA B en la figura 4-4. Con muy baja humedad, la estructura cristalográfica del DNA B cambia a la *forma A*; las hélices RNA-DNA y RNA-RNA existen en esta forma en las células e in vitro. Las moléculas cortas de DNA compuestas de nucleótidos alternados de purina y pirimidina (especialmente G y C) adoptan una configuración alternativa con giro hacia la izquierda en lugar de la hélice normal con giro hacia la derecha. Esta estructura se denomina *DNA Z* porque las bases parecen zigzaguear cuando se visualizan de costado. Algunas evidencias sugieren que el DNA Z puede presentarse en las células, aunque su función se desconoce. Por último, una estructura de DNA con triple hebra se forma cuando se mezclan los polímeros sintéticos de poli(A) y poli-



▲ Fig. 4-4. Modelos de diversas estructuras de DNA conocidas. Los esqueletos de azúcar-fosfato de las dos hebras, que están en el exterior en todas las estructuras, se muestran en rojo y azul; las bases (sombreadas más suavemente) están orientadas hacia adentro. (a) La forma B del DNA tiene ≈10,5 pares de bases por giro helicoidal. Los pares de bases apilados adyacentes están separados por 0,36 nm. (b) La forma A de DNA, más compacta, tiene 11 pares de bases por giro y presenta una gran inclinación de los pares de bases con respecto al eje de la hélice. (c) El DNA Z es una doble hélice con giro hacia la izquierda.



▲ Fig. 4-5. El DNA se dobla como resultado de la unión de proteínas. El dominio conservado terminal C de la proteína de unión a la caja TATA (TBP) se une al surco menor de secuencias específicas de DNA ricas en A y T, desenroscando y doblando abruptamente la doble hélice. La transcripción de la mayoría de los genes eucariontes requiere la participación de TBP. (Adaptada de D.B. Nikolov y S. K. Burley, 1997, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 94:15.)

desoxi(U) en el tubo de ensayo. Además, extensiones homopoliméricas de DNA compuestas de residuos C y T en una hebra y residuos A y G en la otra pueden formar una estructura de triple hebra al unir tramos coincidentes de poli (C+T) sintético. Es pobable que esas estructuras no se produzcan naturalmente en las células, pero pueden ser útiles como agentes terapéuticos.

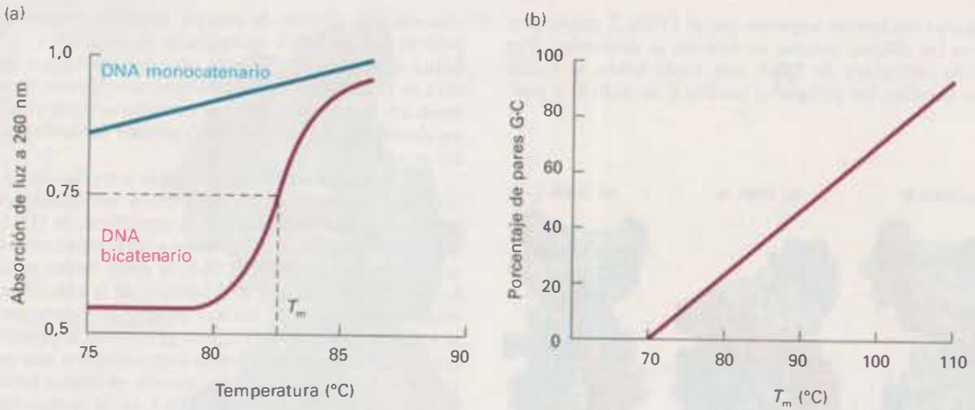
Sin duda, las modificaciones más importantes en la estructura de la forma B estándar de DNA son consecuencia de la unión de proteínas a secuencias específicas de DNA. Aunque los múltiples enlaces hidrófobos y de hidrógeno entre las bases provee estabilidad al DNA, la doble hélice es flexible sobre su eje longitudinal. A diferencia de la hélice α en las proteínas (véase fig. 3-3), no hay enlaces de hidrógeno paralelos al eje de la hélice de DNA. Esta propiedad le permite al DNA que se doblarse cuando forma complejos con una proteína de unión al DNA (fig. 4-5). La torsión es crítica para lograr el empaquetamiento denso del DNA en la cromatina, el complejo proteínas-DNA, como se presenta el DNA nuclear en las células eucariontes (cap. 10).

Las hebras del DNA pueden separarse de manera reversible

Durante la replicación y transcripción del DNA, las hebras de la doble hélice deben separarse de manera tal para permitir que los bordes internos de las bases puedan formar pares con las bases de los nucleótidos a ser polimerizados en nuevas cadenas de polinucleótidos. En secciones posteriores, describimos los mecanismos celulares que separan y luego reasocian a las hebras de DNA durante la replicación y la transcripción. Aquí veremos los factores que influyen en la separación y reasociación in vitro de las hebras de DNA.

El proceso de desenrollar y separar las hebras de DNA, denominado desnaturalización, o "fusión", se puede inducir experimentalmente al incrementar la temperatura de una solución de DNA. A medida que la energía térmica se incrementa, el aumento resultante en el movimiento molecular rompe finalmente los enlaces de hidrógeno y otras fuerzas que estabilizan la doble hélice; las hebras luego se separan, alejadas por las repulsiones electrostáticas del esqueleto de desoxirribosa-fosfato cargada negativamente de cada hebra. Cerca de la temperatura de desnaturalización, un incremento pequeño en la temperatura causa una pérdida rápida y casi simultánea de las múltiples interacciones débiles que mantienen las hebras juntas a lo largo de toda la longitud de las moléculas de DNA, llevando a un cambio abrupto en la absorción de luz ultravioleta (UV) (fig. 4-6a).

La *temperatura de fusión* T_m a la cual las hebras de DNA se separan depende de varios factores. Las moléculas que contienen una gran proporción de pares G·C requieren temperaturas más altas para su desnaturalización porque los tres enlaces de hidrógeno en los pares de G·C hacen a estos pares de bases más estables que los pares A·T, que tienen sólo dos enlaces de hidrógeno. De hecho, es posible estimar el porcentaje de los pares de bases G·C en una muestra de DNA a partir de su T_m (fig. 4-6b). La concentración de iones también influye en la T_m porque los grupos fosfato cargados negativamente en las dos hebras están protegidos por iones cargados positivamente. Cuando la concentración iónica es baja, esta protección disminuye, incrementándose así las fuerzas repulsivas entre las hebras y reduciendo la T_m. Los agentes que desestabilizan los en-



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 4-6 La temperatura a la cual el DNA se desnaturaliza se incrementa con la proporción de pares G·C. (a) Se puede monitorizar la separación del DNA doble hebra mediante la absorción de luz ultravioleta a 260 nm. A medida que las regiones del DNA bicatenario se desaparean, la absorción de luz por esas regiones se incrementa casi al doble. La temperatura a la cual la mitad de las bases en una muestra de DNA bicatenario se ha desnaturalizado se denomina T_m (temperatura de fusión). La absorción de luz por el DNA monocatenario cambia mucho menos a medida que aumenta la temperatura. (b) La T_m es una función del contenido de G·C del DNA; mientras más alto es el porcentaje de G + C, mayor es la T_m.

laces de hidrógeno, como el formaldehído o la urea, también disminuyen la T_m. Por último, los extremos de pH desnaturalizan el DNA a baja temperatura. A pH bajo (ácido), las bases se protonan y así, cargadas positivamente, se repelen. A pH alto (alcalino), las bases pierden protones y se cargan negativamente, repeliéndose otra vez por las cargas similares.

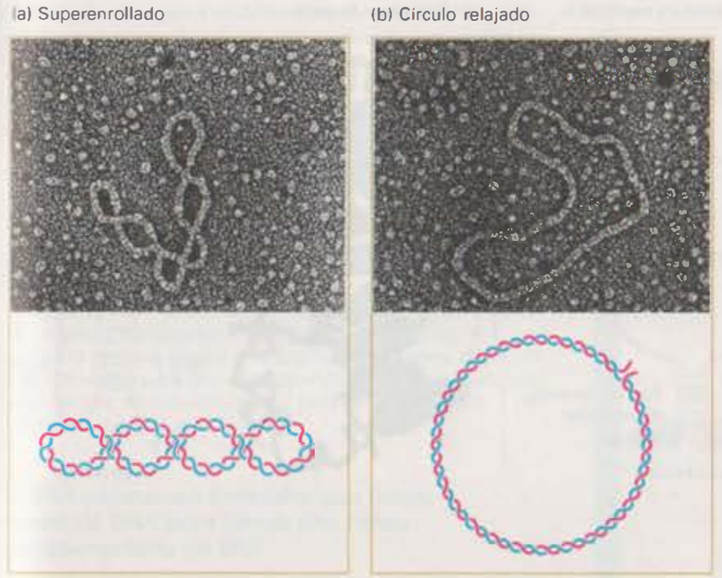
Las moléculas de DNA monocatenario, o hebra simple, resultante de la desnaturalización, forman ordenamientos al azar sin una estructura organizada. Disminuyendo la temperatura, aumentando la concentración de iones o neutralizando el pH, se logra que las dos hebras complementarias se reasocien en una doble hélice perfecta. La magnitud de tal *renaturalización* depende del tiempo, de la concentración de DNA y de la concentración iónica. Dos hebras de DNA no relacionadas en secuencia permanecerán como ordenamientos al azar y no se renaturalizarán; más aún, no inhibirán el hecho de que dos hebras complementarias se encuentren y se renaturalicen. La desnaturalización y la renaturalización de DNA son la base de la hibridación de los ácidos nucleicos, una técnica poderosa utilizada para estudiar la relación de dos muestras de DNA y para detectar y aislar las moléculas específicas en una mezcla que contiene numerosas secuencias diferentes de DNA (véase fig. 9-16).

Muchas moléculas de DNA son circulares

Muchos de los DNA genómicos procariontes y muchos DNA virales son moléculas circulares. Las moléculas circulares de DNA también se hallan en las mitocondrias, que están presentes en casi todas las células eucariontes, y en los cloroplastos que se encuentran en las plantas y en algunos eucariontes unicelulares.

Cada una de las dos hebras en una molécula circular de DNA forma una estructura cerrada sin extremos libres. Los desenrollamientos localizados de una molécula circular de DNA, que aparecen durante la replicación, inducen tensiones de torsión en la porción restante de la molécula debido a que los extremos de las hebras no pueden rotar libremente. Como resultado, la molécula de DNA se enrolla sobre sí misma, como una banda de goma enrollada y forma *superenrollamientos* (fig. 4-7b). En otras palabras, cuando parte de la hélice de DNA está subenrollada, el resto de la molécula se superenrolla. Sin embargo, las células eucariontes y bacterianas contienen *topoisomerasa I*, que puede aliviar cualquier tensión de torsión que se desarrolle en las moléculas de DNA durante la replicación u otros procesos. Esta enzima se une al DNA en sitios al azar y rompe un enlace fosfodiéster en una hebra. Tal rotura de una hebra en el DNA se denomina *muesca*. El extremo roto luego se enrolla alrededor de la hebra sin cortes y provoca la pérdida de superenrollamientos (fig. 4-7a). Por último, la misma enzima une (liga) los dos extremos de la hebra rota. Otro tipo de enzima, la *topoisomerasa II*, realiza cortes en ambas hebras de un DNA bicatenario, o hebra doble, y luego vuelve a ligarlas. Como resultado, la topoisomerasa II puede aliviar las tensiones de torsión y unir dos moléculas circulares de DNA como los eslabones de una cadena.

Aunque el DNA nuclear eucarionte es lineal, largos bucles de DNA son fijadas en su lugar dentro de los cromosomas (cap. 10). Así, las tensiones de torsión y la formación consecuente de superenrollamientos también pueden suscitarse durante la replicación del DNA nuclear. Al igual que en las células bacterianas, la abundante topoisomerasa I en el núcleo eucarionte alivia cualquier tensión de torsión en el DNA nuclear que se puede desarrollar en ausencia de esta enzima.



◀ FIGURA EXPERIMENTAL 4-7. Los superenrollamientos de DNA se pueden eliminar mediante la escisión de una hebra. (a) Microfotografía electrónica del DNA viral de SV40. Cuando el DNA circular del virus SV40 es aislado y separado de su proteína asociada, el dúplex se retuerce y asume la configuración superenrollada. (b) Si a un DNA superenrollado se le realiza una muesca (es decir, se corta una hebra), las hebras pueden volver a enrollarse, llevando a la pérdida del superenrollamiento. La topoisomerasa I cataliza esta reacción y también vuelve a sellar los extremos rotos. Todos los superenrollamientos en el DNA de SV40 pueden ser eliminados por la acción secuencial de esta enzima, produciendo la conformación de círculo laxo. Para mayor claridad se han simplificado las formas de las moléculas de la parte inferior.

Los diferentes tipos de RNA exhiben diversas conformaciones relacionadas con sus funciones

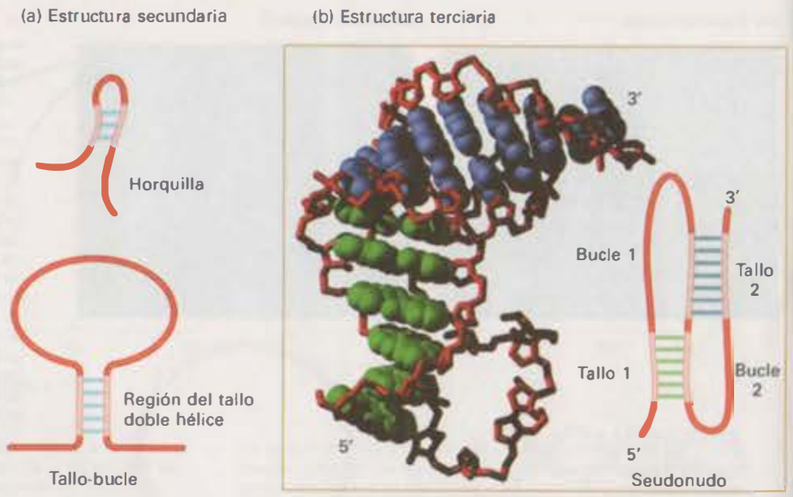
Como ya se vio, la estructura primaria de RNA es similar a la del DNA con dos excepciones: el componente azúcar del RNA, la ribosa, tiene un grupo hidroxilo en la posición 2′ (véase fig. 2-14b) y la timina en el DNA es reemplazada por uracilo en el RNA. El grupo hidroxilo en el C_2 de la ribosa hace que el RNA tenga mayor labilidad química que el DNA y provee un grupo químicamente reactivo que participa en la catálisis mediada por RNA. Como resultado de esta labilidad, el RNA se escinde para formar mononucleótidos en solución alcalina, lo que no ocurre con el DNA. Al igual que el DNA, el RNA es un largo polinucleótido que puede ser bicatenario o monocatenario, lineal o circular. También puede participar en una hélice híbrida compuesta de una hebra de RNA y una hebra de DNA. Como ya se dijo, las dobles hélices de RNA-RNA y RNA-DNA tienen una conformación compacta como la forma A del DNA (véase fig. 4-4b).

A diferencia del DNA, el cual existe principalmente como una doble hélice muy larga, la mayoría del RNA celular es una hebra simple y exhibe diversas conformaciones (fig. 4-8). Las diferencias en los tamaños y las conformaciones de los distintos tipos de RNA les permiten llevar a cabo funciones específicas en la célula. Las estructuras secundarias más simples en los RNA monocatenarios están formadas por apareamiento de bases complementarias. Las "horquillas" se forman por apareamiento de bases separadas por ≈5-10 nucleótidos entre una y otra, y los "tallos y bucles", por apareamiento de bases separadas por >10 a varios cientos de nucleótidos. Estos plegamientos simples pueden cooperar para formar estructuras terciarias más complicadas, una de las cuales se denomina "seudonudo".

Como se verá en sus detalles más adelante, las moléculas de tRNA adoptan una arquitectura tridimensional bien definida en solución, que es crucial en la síntesis de proteínas. Las moléculas más grandes de rRNA también tienen estructuras tridimensionales locales bien definidas, con enlaces más flexibles entre ellas. También se han reconocido estructuras secundarias y terciarias en el mRNA, sobre todo cerca de los extremos de las moléculas. En consecuencia, claramente las moléculas de RNA son como las proteínas en cuanto a que poseen dominios estructurados conectados por extensiones flexibles menos estructuradas.

Los dominios plegados de las moléculas de RNA no sólo tienen una analogía estructural con las hélices α y las hebras β halladas en las proteínas, sino que en algunos casos también tienen capacidad catalítica. Estos RNA catalíticos son llamados ribozimas. Aunque las ribozimas generalmente suelen estar asociadas con las proteínas que estabilizan la estructura ribosómica, es el RNA el que actúa como un catalizador. Algunas ribozimas pueden catalizar la eliminación de intrones, un proceso notable en el cual se corta y elimina una secuencia interna de RNA y luego se ligan las dos cadenas resultantes. Este proceso de corte y empalme tiene lugar durante la formación de la mayoría de las moléculas funcionales de mRNA en las células eucariontes y también en eubacterias y en Archaea. Notablemente, algunos RNA realizan la *autoeliminación de intrones*, mediante la actividad catalítica residente en la secuencia que es eliminada. En el capítulo 12 se detallan los mecanismos de eliminación y autoeliminación. Como veremos más adelante en este capítulo, el rRNA desempeña un papel catalítico en la formación de enlaces peptídicos durante la síntesis de proteínas.

En este capítulo, nos centramos en las funciones del mRNA, el tRNA y el rRNA en la expresión génica. En capítulos posteriores encontraremos otros RNA, a menudo asociados con proteínas, que participan en otras funciones celulares.



▶ **Fig. 4-8. Estructuras secundaria y terciaria del RNA.** (a) Se pueden formar tallos y bucles, horquillas y otras estructuras secundarias por apareamiento de bases entre segmentos complementarios distantes de una molécula de RNA. En los tallos y bucles, el bucle de hebra simple entre el tallo helicoidal de bases apareadas puede tener cientos o hasta miles de nucleótidos de longitud, mientras que en las horquillas, el giro corto puede contener hasta apenas cuatro nucleótidos. (b) Los seudonudos, un tipo de estructura terciaria de RNA, están formados por la interacción de los bucles secundarios a través del apareamiento de bases entre bases complementarias (verde y azul). Sólo se muestran las bases que participan en el apareamiento. A la derecha se ilustra un diagrama de la estructura secundaria. (Parte (b) adaptada de P.J. Michiels et al. 2001, *J. Mol. Biol.* 310:1109.)

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 4.1

Estructura de los ácidos nucleicos

- El ácido desoxirribonucleico (DNA), el material genético, contiene información para especificar las secuencias de aminoácidos de las proteínas. Esta se transcribe a varios tipos de ácidos ribonucleicos (RNA), incluidos el RNA mensajero (mRNA), el RNA de transferencia (tRNA) y el RNA ribosómico (rRNA), que intervienen en la síntesis de proteínas (véase fig. 4-1).
- Tanto el DNA como el RNA son largos polímeros no ramificados de nucleótidos, que constan de una pentosa fosforilada unida a una base orgánica, ya sea una purina o una pirimidina.
- Las purinas adenina (A) y guanina (G) y la pirimidina citosina (C) están presentes tanto en el DNA como en el RNA. La pirimidina timina (T) presente en el DNA es reemplazada por la pirimidina uracilo (U) en el RNA.
- Los nucleótidos adyacentes en un polinucleótido están unidos por enlaces fosfodiéster. Toda la hebra tiene una direccionalidad química o polaridad: el extremo 5′con un hidroxilo libre o grupo fosfato en el carbono 5′ del azúcar, y el extremo 3′ con un grupo hidroxilo libre en el carbono 3′ del azúcar (véase fig. 4-2).
- El DNA natural (DNA B) contiene dos hebras complementarias antiparalelas de polinucleótidos enrolladas entre sí para formar una doble hélice regular con giro hacia la derecha con las bases en la parte interior y los dos esqueletos azúcar-fosfato en la parte exterior (véase fig. 4-3). El apareamiento de bases entre las hebras y las interacciones hidrófobas entre bases adyacentes en la misma hebra estabilizan la estructura nativa.
- Las bases en los ácidos nucleicos pueden interactuar a través de los enlaces de hidrógeno. Los pares de bases de Watson y Crick estándares son G·C, A·T (en el DNA) y A·U (en el RNA). El apareamiento de bases estabiliza las estructuras tridimensionales nativas de DNA y RNA.
- La unión de proteínas al DNA puede deformar su estructura helicoidal, provocando la torsión o el desenrollamiento local de la molécula de DNA.
- El calor hace que las hebras de DNA se separen (se desnaturalicen). La temperatura de fusión T_m del DNA se incrementa con el porcentaje de pares de bases G·C. En condiciones apropiadas, las hebras separadas de ácidos nucleicos complementarias se renaturalizan.
- Las moléculas circulares de DNA pueden estar enrolladas sobre sí mismas formando superenrollamientos (véase fig. 4-7). Las enzimas llamadas *topoisomerasas* pueden aliviar la tensión torsional y eliminar los superenrollamientos de las moléculas circulares de DNA.
- Los RNA celulares son polinucleótidos monocatenarios, algunos de los cuales forman estructuras secundarias y terciarias bien definidas (véase fig. 4-8). Algunos RNA, llamados *ribozimas*, poseen actividad catalítica.

4.2 Transcripción de genes codificadores de proteínas y formación de mRNA funcional

La definición más simple de un gen es una "unidad de DNA que contiene la información para especificar la síntesis de una única cadena polipeptídica o RNA funcional (tal como un tRNA)." La gran mayoría de los genes contienen información para construir moléculas proteicas; las copias de RNA de tales *genes codificadores de proteínas* constituyen las moléculas de mRNA de las células. Las moléculas de DNA de pequeños virus contienen sólo algunos genes, mientras que la molécula de DNA en cada uno de los cromosomas de los animales y plantas superiores puede contener varios miles.

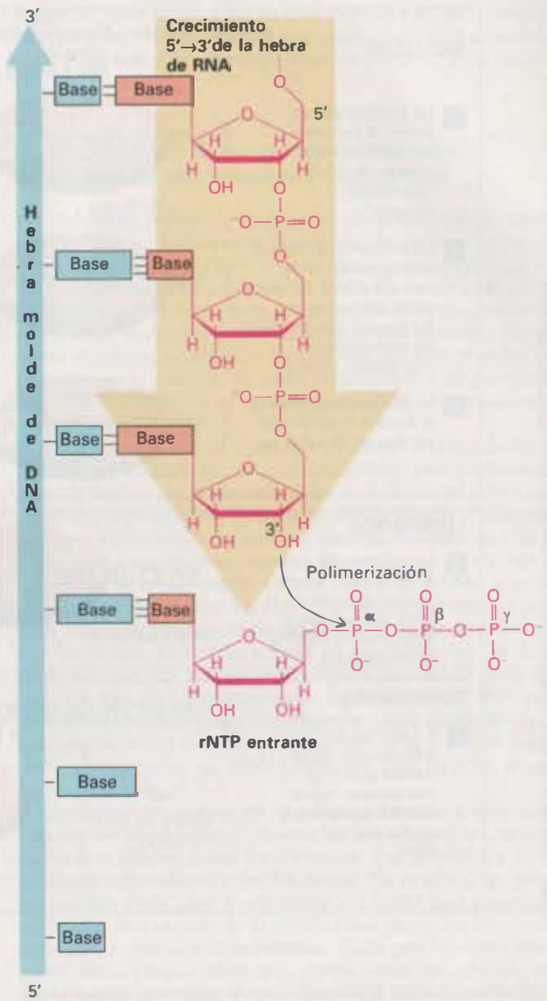
Durante la síntesis de RNA, el lenguaje de cuatro bases del DNA, que contiene A, G, C y T simplemente es copiado o *transcripto*, al lenguaje de cuatro bases de RNA, que es idéntico con la excepción de que U reemplaza a T. Por el contrario, durante la síntesis de proteínas, el lenguaje de cuatro bases del DNA y del RNA es *traducido* al lenguaje de 20 aminoácidos de las proteínas. En esta sección nos centramos en la formación de los mRNA funcionales a partir de los genes codificadores de proteínas (véase fig. 4-1, paso 1). Un proceso similar produce los precursores de rRNA y tRNA codificados por los genes rNA y tRNA; estos precursores son modificados luego para producir rRNA y tRNA funcionales (cap. 12).

La RNA polimerasa transcribe una hebra molde de DNA para formar una hebra complementaria de RNA

Durante la transcripción de DNA, una hebra de DNA actúa como un *molde* o *patrón*, determinando el orden en que los monómeros de ribonucleósido trifosfato (rNTP) son polimerizados para formar una cadena complementaria de RNA. Las bases en la hebra patrón de DNA forman pares de bases con los monómeros de rNTP complementarios entrantes, que luego se unen en una reacción de polimerización catalizada por una RNA polimerasa. La polimerización implica un ataque nucleofílico del oxígeno 3′ en la cadena creciente de RNA sobre el fosfato α del siguiente nucleótido precursor a ser añadido, lo que da lugar a la formación de un enlace fosfodiéster y la liberación de un pirofosfato (PP_i). Como consecuencia de este mecanismo, las moléculas de RNA siempre se sintetizan en la dirección 5′→3′ (fig. 4-9).

La energía de la reacción de polimerización favorece fuertemente la adición de ribonucleótidos a la cadena de RNA en crecimiento debido a que el enlace de alta energía entre el fosfato α y β de los monómeros de rNTP es reemplazado por el enlace fosfodiéster, de menor energía, entre los nucleótidos. El equilibrio para la reacción se desplaza más hacia la elongación de la cadena por acción de la pirofosfatasa, una enzima que cataliza la escisión de PP_i en dos moléculas de fosfato inorgánico. Al igual que las dos hebras en el DNA, la hebra molde de DNA y la hebra en crecimiento de RNA, que está apareada por sus bases a ella, tienen una direccionalidad 5′→3′opuesta.

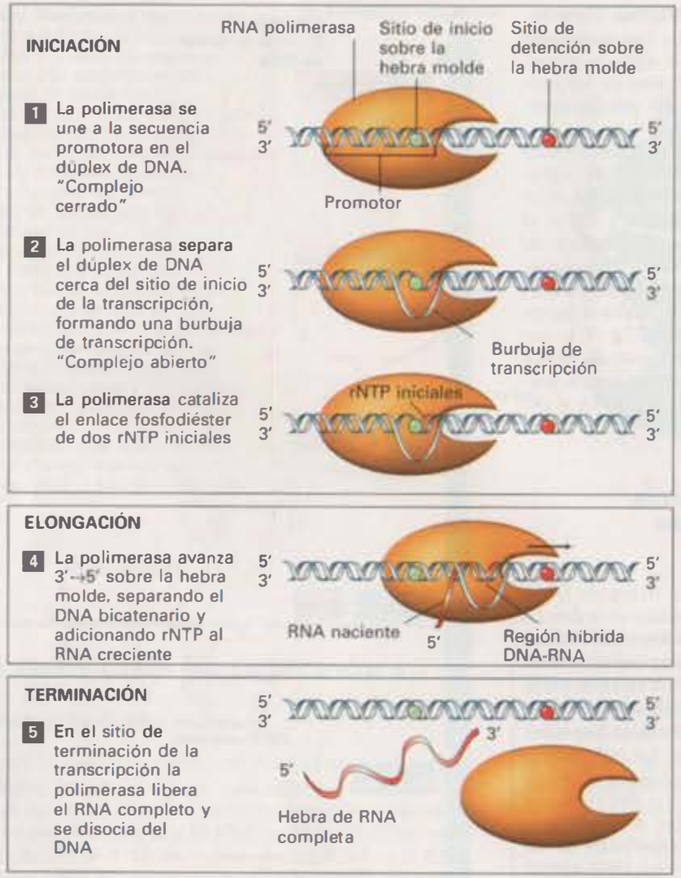
Por convención, el sitio en el cual la RNA polimerasa comienza la transcripción se numera +1. Se denomina corriente abajo a la dirección en la cual una hebra molde de DNA es transcripta (o el mRNA es traducido); así, una secuencia corriente abajo se dirige hacia el extremo 3′ en relación al sitio de inicio, considerando la hebra de DNA con la misma polaridad que el RNA transcripto. Corriente arriba indica la dirección opuesta. Las posiciones de los nucleótidos en la secuencia de DNA corriente abajo desde el sitio de inicio se indican con un signo positivo (+); aquellas corriente arriba, con un signo negativo (–).



▲ **Fig. 4-9. Polimerización de ribonucleótidos por la RNA polimerasa durante la transcripción.** El ribonucleótido a ser añadido al extremo 3′ de una hebra de RNA en crecimiento está especificado por el apareamiento de bases entre la siguiente base en la hebra molde de DNA y el ribonucleósido trifosfato complementario entrante (rNTP). Un enlace fosfodiéster se forma cuando la RNA polimerasa cataliza una reacción entre el O 3′ de la hebra creciente y el fosfato α de un rNTP correctamente apareado. Las hebras de RNA siempre se sintetizan en la dirección 5′→3′y son opuestas en polaridad a sus hebras molde de DNA.

Etapas en la transcripción. Para llevar a cabo la transcripción, la RNA polimerasa desempeña varias funciones distintas, como ilustra la figura 4-10. Durante la *iniciación* de la transcripción, la RNA polimerasa reconoce y se une a un sitio específico, denominado promotor, en el DNA de hebra

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación focalizada: Mecanismo transcripcional básico



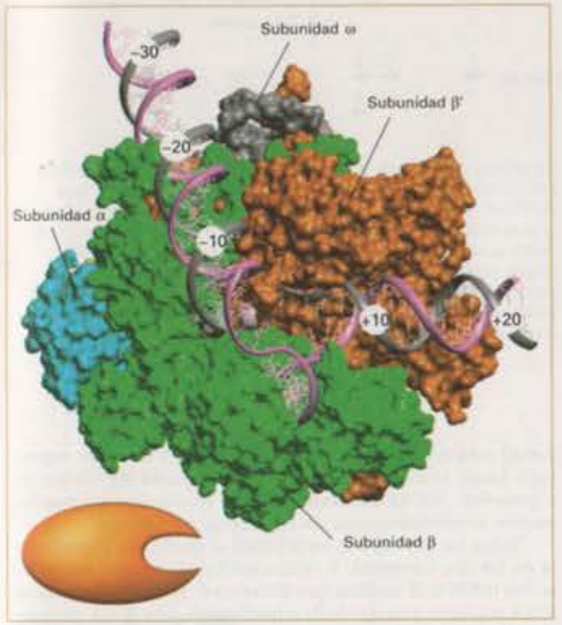
◀ Fig. 4-10. Las tres etapas en la transcripción. Durante la iniciación de la transcripción, la RNA polimerasa forma una burbuja de transcripción y comienza la polimerización de ribonucleótidos (rNTP) en el sitio de inicio, localizado dentro de la región del promotor. Una vez que una región de DNA ha sido transcripta, las hebras separadas se reasocian en una doble hélice, desplazando el RNA naciente excepto en su extremo 3′. El extremo 5′ de la hebra de RNA sale de la RNA polimerasa a través de un canal en la enzima. La terminación ocurre cuando la polimerasa encuentra una secuencia de terminación específica (o sitio de detención). Para los detalles, véase el texto.

doble (paso 1). Las RNA polimerasas nucleares requieren diversos factores proteicos, denominados factores de transcripción generales, para ayudarlas a localizar los promotores e iniciar la transcripción. Luego de unirse al promotor, la RNA polimerasa disocia las hebras de DNA para hacer que las bases en la hebra molde estén disponibles para el apareamiento con las bases de los ribonucleósidos trifosfatos que se polimerizarán. Las RNA polimerasas celulares disocian aproximadamente 14 pares de bases de DNA alrededor del sitio de inicio de la transcripción, localizado en la hebra molde dentro de la región del promotor (paso 2). Se considera que la iniciación de la transcripción se ha completado cuando los dos primeros ribonucleótidos de una cadena de RNA están unidos mediante un enlace fosfodiéster (paso 3).

Después de que varios ribonucleósidos han sido polimerizados, la RNA polimerasa se disocia del DNA promotor y de los factores de transcripción generales. Durante la etapa de *elongación de las hebras*, la RNA polimerasa se mueve a lo largo del DNA molde de a una base por vez, abriendo el DNA doble hebra delante de su dirección de movimiento e hibridando las hebras detrás de sí. (fig. 4-10), paso 4). Durante la elongación de la hebra, ejecutada por la polimerasa, los ribonucleótidos se añaden uno por uno al extremo 3′ de la cadena creciente (*naciente*) de RNA. La enzima mantiene disociada una región de alrededor de 14 pares de bases, denominada *burbuja de transcripción*. Aproximadamente ocho nucleótidos en el extremo 3′ de la hebra de RNA en crecimiento permanecen apareados por sus bases a la hebra molde de DNA en la burbuja de transcripción. El complejo de elongación, que comprende la RNA polimerasa, el DNA molde y la hebra creciente (naciente) de RNA es extraordinariamente estable. Por ejemplo, la RNA polimerasa transcribe el gen conocido más largo de los mamíferos, que contiene ≈ 2 × 10^6 pares de bases, sin disociarse del molde de DNA ni liberar el RNA naciente. Puesto que la síntesis de RNA tiene lugar a una velocidad de alrededor de 1.000 nucleótidos por minuto a 37 °C, el complejo de elongación debe permanecer intacto por más de 24 horas para asegurar la síntesis ininterrumpida del RNA.

Durante la *terminación* de la transcripción, la etapa final en la síntesis de RNA, la molécula completa de RNA, o transcripto primario, se libera de la RNA polimerasa y ésta se disocia del DNA molde (fig. 4-10, paso 5). Secuencias específicas en el DNA molde le señalan a la RNA polimerasa implicada que termine la transcripción. Una vez liberada, la RNA polimerasa está libre para transcribir de nuevo el mismo gen u otro.

Estructura de las RNA polimerasas. Las RNA polimerasas de Eubacteria, de Archaea y eucariontes son fundamentalmente similares en estructura y función. Las RNA polimerasas bacterianas están compuestas de dos grandes subunidades relacionadas (β′ y β), dos copias de subunidades más pequeñas (α) y una copia de una quinta subunidad (ω) que no es esencial para la transcripción o la viabilidad de la célula, pero estabiliza la enzima y presta asistencia en el ensamblaje de sus subunidades. Las RNA polimerasas de eucariontes y de archaea tienen varias subunidades pequeñas adicionales asociadas con este complejo central, que describimos en el capítulo 11. Los diagramas esquemáticos del proceso de transcripción suelen mostrar la RNA polimerasa unida a una molécula de DNA desdoblada, como en la figura 4-10. Sin embargo, de acuerdo con un modelo actualizado de la interacción entre la RNA polimerasa bacteriana y el DNA promotor, el DNA se tuerce agudamente luego de penetrar en la enzima (fig. 4-11).



▲ Fig. 4-11. Modelo actualizado de la RNA polimerasa bacteriana unida a un promotor. Esta estructura corresponde a la molécula de polimerasa como se muestra esquemáticamente en el paso 2 de la Fig. 4-10. La subunidad β′ está en color naranja; β está en verde. Parte de una de las dos subunidades α puede verse en azul; la subunidad ω está en gris. Las hebras molde y no molde del DNA se muestran, respectivamente, como cintas grises y rosadas. Un ion Mg^{2+} en el centro activo se ilustra como una esfera gris. Los números indican las posiciones en la secuencia de DNA relativa al sitio de inicio de la transcripción, con números positivos (+) en la dirección de transcripción y números negativos (–) en la dirección opuesta. (Cortesia de R. H. Ebright, Waksman Institue.)

La organización de los genes es diferente en el DNA de procariontes y eucariontes

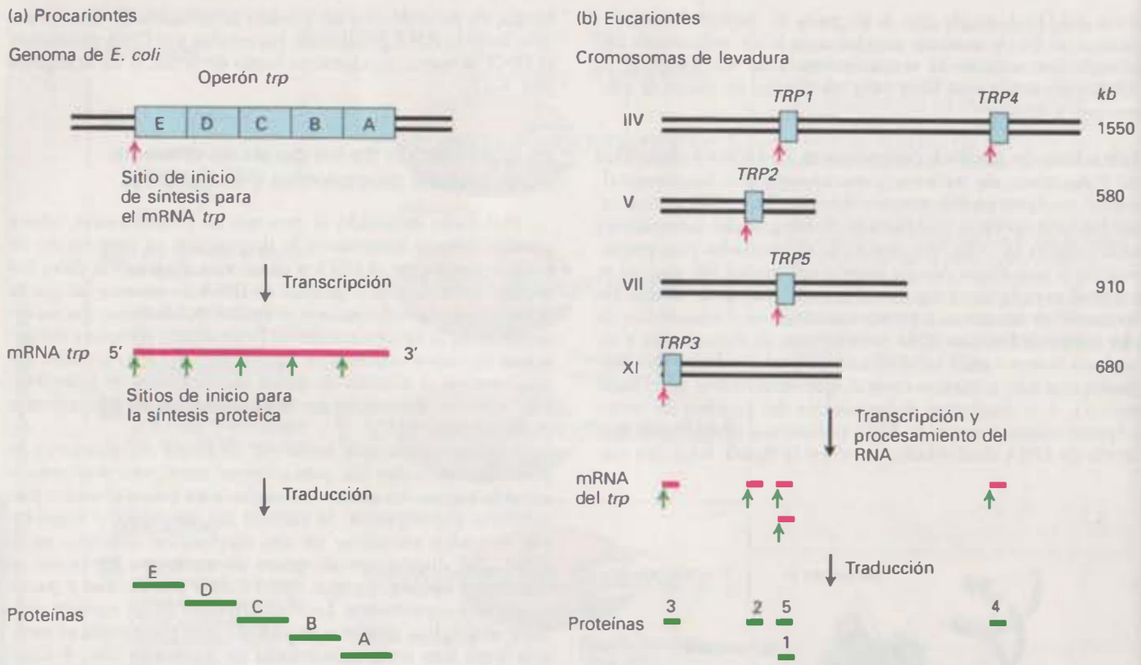
Habiendo delineado el proceso de transcripción, ahora consideraremos brevemente la disposición en gran escala de la información en el DNA y cómo esta disposición dicta los requerimientos para la síntesis de DNA de manera tal que la transferencia de información se realice fluidamente. En los últimos años, la determinación de la secuencia completa del genoma de varios organismos ha revelado no sólo grandes variaciones en el número de genes codificadores de proteínas, sino también diferencias en su organización en procariontes y eucariontes.

La disposición más frecuente de genes codificadores de proteínas en todas las procariontes tiene una poderosa y notable lógica: los genes dedicados a un único objetivo metabólico, supongamos, la síntesis del ammoácido triptófano, se suelen encontrar en una disposición contigua en el DNA. Tal disposición de genes en un grupo funcional se denomina operón, porque opera como una unidad a partir de un único promotor. La transcripción de un operón produce una hebra continua de mRNA que transporta el mensaje para una serie relacionada de proteínas (fig. 4-12a). Cada sección del mRNA representa la unidad (o gen) que codifica una de las proteínas en la serie. En el DNA procarionte, los genes están estrechamente empaquetados, con muy pocos intervalos no codificadores, y el DNA se transcribe directamente en mRNA colineal, que luego es traducido a proteína.

Este cúmulo económico de genes dedicados a una única función metabólica no se observa en los eucariontes, incluso en los más simples como las levaduras, que pueden ser metabólicamente similares a las bacterias. En cambio, los genes eucariontes dedicados a una única vía están más a menudo separados físicamente en el DNA; estos genes suelen localizarse sobre distintos cromosomas. Cada gen se transcribe a partir de su propio promotor, produciendo un mRNA, que generalmente es traducido para producir un único polipéptido (fig. 4-12b).

Cuando los investigadores compararon por primera vez las secuencias de nucleótidos de los mRNA de eucariontes a partir de organismos multicelulares con las secuencias de DNA que los codificaban, se sorprendieron al encontrar que la secuencia codificante de una proteína ininterrumpida de un mRNA dado estaba partida (era discontinua) en la correspondiente sección de DNA. Concluyeron que el gen eucarionte existía en porciones de secuencias codificantes, los exones, separados por segmentos no codificadores de proteínas, los intrones. Este asombroso hallazgo implicaba que la larga transcripción primaria inicial –la copia de RNA de la secuencia de DNA transcripta en su totalidad– tuvo que haber sido cortada y hecha a un lado para eliminar los intrones y luego reunificada con cuidado para producir los mRNA eucariontes.

Aunque los intrones son comunes en los eucariontes multicelulares, son excepcionales en las eubacterias y archaeas y poco frecuentes en muchos eucariontes unicelulares, como la levadura de cocina. Sin embargo, los intrones están presentes



▲ Fig. 4-12. Comparación de la organización de genes, transcripción y traducción en procariontes y eucariontes. (a) El operón triptófano (*trp*) es un segmento continuo del cromosoma de *E. coli* que contiene cinco genes (azul) que codifican las enzimas necesarias para la síntesis paso a paso del triptófano. Todo el operón se transcribe a partir de un promotor y forma un mRNA *trp* largo continuo (rojo). La traducción de este mRNA comienza en cinco diferentes sitios, produciendo cinco proteínas (verde). El orden de los genes en el genoma bacteriano es paralelo a la función secuencial de las proteínas codificadas en la vía del triptófano. (b) Los cinco genes que codifican las enzimas requeridas para la síntesis del triptófano en la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) se encuentran en cuatro cromosomas distintos. Cada gen es transcripto a partir de su propio promotor para producir un transcripto primario que es procesado en un mRNA funcional que codifica una única proteína. La longitud de los cromosomas de la levadura se mide en kilobases (10^3 bases).

en el DNA de virus que infectan las células eucariontes. En efecto, la presencia de intrones fue descubierta primero en tales virus, cuyo DNA es transcripto por las enzimas de las células huéspedes.

Los precursores de mRNA de los eucariontes son procesados para formar los mRNA funcionales

En las células procariontes, que carecen de núcleo, la traducción de un mRNA en una proteína puede comenzar desde el extremo 5′ del mRNA incluso mientras el extremo 3′ está aun siendo sintetizado por la RNA polimerasa. En otras palabras, en los procariontes la transcripción y la traducción pueden suceder al mismo tiempo. Sin embargo, en las células eucariontes, no sólo el núcleo está separado del citoplasma donde ocurre la traducción, sino que también los transcriptos primarios de los genes codificadores de proteínas son precursores de los mRNA (pre-mRNA), que deben atravesar varias modificaciones, denominadas en su conjunto *procesamiento del RNA*, para producir un mRNA funcional (véase fig. 4-1, paso 2). Este mRNA debe ser exportado luego al citoplasma antes de que pueda ser traducido a proteína. Así, la transcripción y la traducción no pueden ocurrir simultáneamente en las células eucariontes.

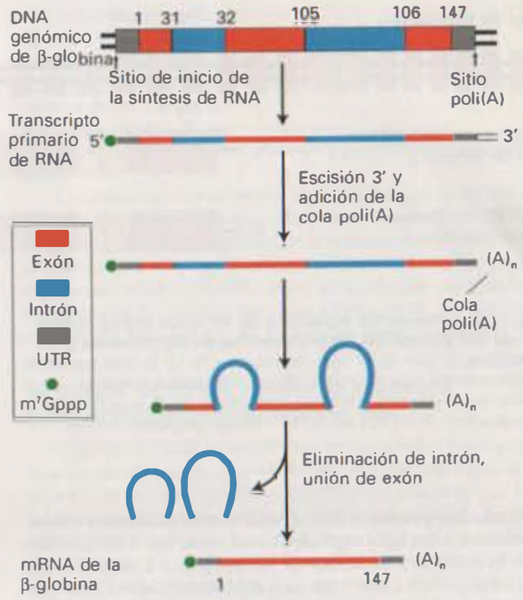
Todos los pre-mRNA eucariontes se modifican inicialmente en los dos extremos, y estas modificaciones son retenidas en los mRNA. A medida que el extremo 5′ de una cadena de RNA naciente emerge de la superficie de una RNA polimerasa II, es inmediatamente influido por varias enzimas que en conjunto sintetizan el *casquete 5′*, un 7-metilguanilato es unido al nucleótido terminal del RNA por una unión inusual 5′,5′ trifosfato (fig. 4-13). El casquete protege al mRNA de la degradación enzimática y contribuye a su desplazamiento hacia el citoplasma. Al casquete también se une un factor proteico necesario para comenzar la traducción en el citoplasma.

El procesamiento en el extremo 3′ de un pre-mRNA incluye la escisión por acción de una endonucleasa para producir un grupo hidroxilo libre 3′ al que una enzima denominada *poli(A) polimerasa* le agrega, uno por uno, una hilera de residuos de ácido adenílico. La *cola poli (A)* resultante contiene 100-250 bases y es más corta en las levaduras y en los

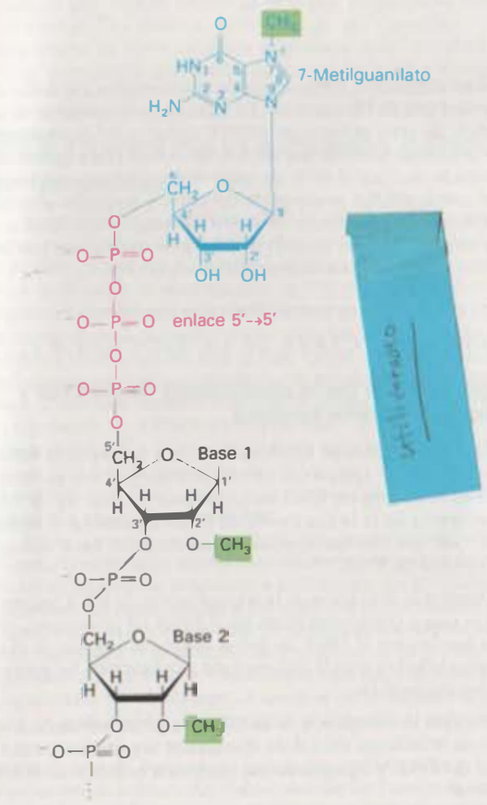
invertebrados que en los vertebrados. La poli(A) polimerasa es parte de un complejo de proteínas que pueden localizar y escindir un transcripto en un sitio específico y luego agregar el número correcto de residuos A, en un proceso que no requiere un molde.

El paso final en el procesamiento de muchas moléculas distintas de mRNA eucariontes es el **corte y empalme (splicing) del RNA**: la escisión interna del transcripto para eliminar los intrones, seguida por la ligación de los exones codificadores. La figura 4-14 resume los pasos básicos en el procesamiento de mRNA eucarionte, utilizanado como ejemplo al gen de la β-globina. En el capítulo 12 examinamos la maquinaria celular para llevar a cabo el procesamiento de mRNA, tanto como del tRNA y del rRNA.

El mRNA eucarionte funcional producido por el procesamiento de RNA retiene las regiones no codificantes de cada extremo, denominadas *regiones no traducidas 5′ y 3′ (untranslated regions, UTR)*. En el mRNA de los mamíferos, la UTR 5′ puede ser de cien o más nucleótidos de largo, y la UTR 3′ puede ser de varios kilobases de longitud. El mRNA procarionte a menudo también tiene regiones UTR 5′ y 3′, pero son mucho más cortas que las de los mRNA eucariontes y contienen menos de 10 nucleótidos.



▲ Fig. 4-14. Visión general del procesamiento del RNA para producir un mRNA funcional en eucariontes. El gen de la β-globina contiene tres exones codificadores de proteínas (región codificadora, rojo) y dos intrones intermedios no codificadores (azul). Los intrones interrumpen la secuencia de codificación de proteínas entre los codones de los aminoácidos 31 y 32, y 105 y 106. La transcripción de los genes eucariontes codificadores de proteínas comienza antes de la secuencia que codifica el primer aminoácido y se extiende más allá de la secuencia codificante del último aminoácido, lo que da como resultado regiones no codificantes (gris) al final del transcripto primario. Estas regiones no traducidas (UTR) son retenidas durante el procesamiento. El casquete 5′ (m^7Gppp) se agrega durante la formación del transcripto primario de RNA, que se extiende más allá del sitio poli(A). Después de la escisión en el sitio del poli(A) y el agregado de múltiples residuos A al extremo 3′, el proceso de corte y empalme de intrones elimina los intrones y une los exones. Los números pequeños se refieren a las posiciones en la secuencia de 147 aminoácidos de la β-globina.

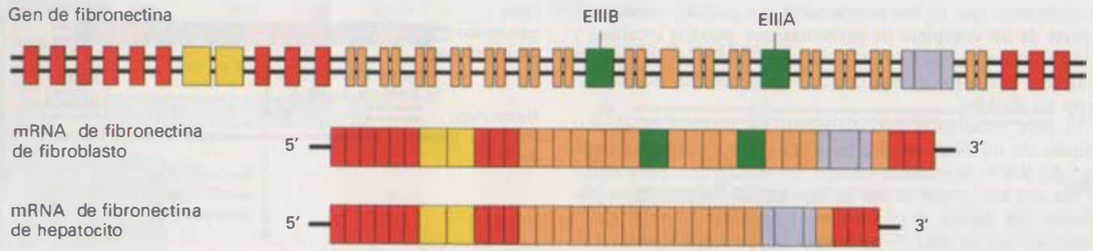


▲ Fig. 4-13. Estructura de la cápsula 5′ metilada del mRNA eucarionte. Las características químicas distintivas son las uniones 5′→5′ de 7-metilguanilato al nucleótido inicial de la molécula de mRNA y el grupo metilo al hidroxilo 2′ de la ribosa del primer nucleótido (base1). Estas dos características tienen lugar en todas las células animales y en las células de las plantas superiores; las levaduras carecen del grupo metilo en el nucleótido 1. La ribosa del segundo nucleótido (base 2) también está metilado en los vertebrados. (Véase A. J. Shatkin, 1976, *Cell* 9:645.)

El corte y empalme alternativo del RNA incrementa el número de proteínas expresadas a partir de un gen eucarionte único

A diferencia de los genes bacterianos y de archaea, la gran mayoría de los genes en los eucariontes multicelulares superiores contienen múltiples intrones. Como se vio en el capí-

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación general: Ciclo de vida de un mRNA



▲ Fig. 4-15. Eliminación específica de intrones según el tipo de célula del pre-mRNA de fibronectina en fibroblastos y hepatocitos. El gen de la fibronectina de ≈75 kb (*arriba*) contiene múltiples exones. Los exones EIIIB y EIIIA (verde) codifican dominios de unión para proteínas específicas en la superficie de los fibroblastos. El mRNA de la fibronectina producido en los fibroblastos incluye los exones EIIIA y EIIIB, mientras que estos exones son eliminados del mRNA de la fibronectina de los hepatocitos. En este diagrama, los intrones (líneas negras) no están dibujados a escala; la mayoría de ellos son mucho más largos que cualquiera de los exones.

tulo 3, muchas proteínas de los eucariontes superiores tienen una estructura terciaria multidominio (véase fig. 3-8). Los dominios individuales repetidos de las proteínas a menudo son codificados por un exón o un pequeño número de exones que codifican para secuencias de aminoácidos idénticas o casi idénticas. Se piensa que tales exones repetidos evolucionaron a través de la duplicación accidental múltiple de un tramo de DNA que se extendía entre dos sitios de intrones adyacentes, dando como resultado la inserción de una hebra de exones repetidos, separados por intrones, entre los dos intrones originales. La presencia de múltiples intrones en muchos genes eucariontes permite la expresión de proteínas múltiples y emparentadas a partir de un gen único por acción del corte y empalme alternativo. En los eucariontes superiores, el corte y empalme alternativo de intrones es un mecanismo importante para la producción de diferentes formas de una proteína, denominadas isoformas, por distintos tipos de células.

La fibronectina, una proteína adhesiva extracelular multidominio que se encuentra en los mamíferos, provee un buen ejemplo del corte y empalme alternativo (fig. 4-15). El gen de fibronectina contiene numerosos exones, agrupados en varias regiones correspondientes a dominios específicos de la proteína. Los fibroblastos producen mRNA de fibronectina que contienen exones EIIIA y EIIIB; estos exones codifican las secuencias de aminoácidos que se unen con firmeza a las proteínas en la membrana plasmática del fibroblasto. En consecuencia, esta isoforma de la fibronectina adhiere los fibroblastos a la matriz extracelular. La eliminación alternativa de intrones del transcripto primario de la fibronectina en los hepatocitos, el tipo principal de células del hígado, produce mRNA que carecen de los exones EIIIA y EIIIB. Como resultado, la fibronectina secretada a la sangre por los hepatocitos no se adhiere con firmeza a los fibroblastos u otros tipos de células, lo que le permite circular. Sin embargo, durante la formación de coágulos de sangre, los dominios de unión a fibrina de la fibronectina de los hepatocitos se unen a la fibrina, uno de los principales constituyentes de los coágulos. Luego la fibronectina unida interactúa con las integrinas sobre las membranas de las plaquetas circulantes, activadas, expandiendo de este modo el coágulo mediante la incorporación de plaquetas.

Se han identificado más de 20 isoformas diferentes de fibronectina, cada una codificada por un mRNA de distinto corte y empalme alternativo, compuestos de una combinación única de exones del gen de fibronectina. La reciente determinación de la secuencia de gran número de mRNA aislados de diversos tejidos y la comparación de sus secuencias con el DNA genómico ha revelado que casi el 60% de todos los genes humanos se expresan como mRNA proveniente del corte y empalme alternativo. Claramente, el corte y empalme alternativo del RNA expande enormemente el número de proteínas codificadas por los genomas de organismos multicelulares superiores.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 4.2

Transcripción de genes codificadores de proteínas y formación de mRNA funcional

- La transcripción de DNA es llevada a cabo por la RNA polimerasa, que agrega un ribonucleótido por vez al extremo 3′de la cadena de RNA en crecimiento (véase fig. 4-10). La secuencia de la hebra molde de DNA determina el orden en el cual los ribonucleótidos se polimerizan para formar una cadena de RNA.
- Durante la iniciación de la transcripción, la RNA polimerasa se une a sitios específicos en el DNA (el promotor), disocia localmente el DNA de hebra doble para poner al descubierto la hebra molde desapareada y polimeriza los primeros dos nucleótidos.
- Durante la elongación de la hebra, la RNA polimerasa se desplaza a lo largo del DNA, disociando segmentos secuenciales del DNA y agregando nucleótidos a la hebra de RNA creciente.
- Cuando la RNA polimerasa llega a una secuencia de terminación en el DNA, la enzima detiene la transcripción lo que da como resultado la liberación del RNA terminado y la disociación de la enzima del DNA molde.
- En el DNA procarionte, varios genes codificadores de proteínas suelen agruparse para formar una región funcional, un operón, que se transcribe a partir de un único promotor para formar un mRNA, que codifica múltiples proteínas con funciones relacionadas (véase fig. 4-12a). La traducción del mRNA bacteriano puede comenzar antes de que la síntesis del mRNA haya sido completada.
- En el DNA eucarionte, cada gen codificador de proteínas se transcribe desde su propio promotor. El transcripto primario inicial muy a menudo contiene regiones no codificantes (intrones) diseminadas entre las regiones codificantes (exones).
- Los transcriptos primarios de eucarionte deben atravesar el procesamiento de RNA para producir RNA funcionales. Durante el procesamiento, los extremos de casi todos los transcriptos primarios de los genes codificadores de proteínas se modifican mediante la adición de un casquete 5′ y una cola poli(A) 3′. Los transcriptos de los genes que contienen intrones sufren la escisión y eliminación de intrones y la unión de exones (véase fig. 4-14).
- Los dominios individuales de las proteínas multidominio presentes en los eucariontes superiores a menudo son codificados por exones individuales o por un pequeño número de exones. Las distintas isoformas de tales proteínas suelen expresarse en tipos celulares específicos como resultado del corte y empalme alternativo de exones (splicing alternativo).

4.3 Control de la expresión génica en los procariontes

Puesto que la estructura y la función de una célula están determinadas por las proteínas que contiene, el control de la expresión génica es un aspecto fundamental de la biología celular molecular. Comúnmente, la "decisión" de iniciar la transcripción del gen que codifica una proteína en particular es el mecanismo principal para controlar la producción de la proteína codificada en una célula. Controlando la iniciación de la transcripción, una célula puede regular que proteína produce y con qué rapidez. Cuando la transcripción de un gen es *reprimida*, el mRNA correspondiente y la proteína o proteínas codificadas son sintetizados a baja velocidad. Inversamente, cuando la transcripción de un gen es *activada*, tanto el mRNA como la proteína o proteínas codificadas son producidos a mayores velocidades.

En la mayoría de las bacterias y otros organismos unicelulares, la expresión génica está altamente regulada de manera tal de ajustar la maquinaria enzimática de la célula y los componentes estructurales a los cambios en los medios nutricional y físico. De esta forma, en cualquier momento, una célula bacteriana sólo sintetiza las proteínas de su proteoma requeridas para sobrevivir en condiciones particulares. En los organismos multicelulares, el control de la expresión génica está en gran medida dirigido hacia el objetivo de asegurar que el gen correcto sea expresado en la célula correcta en el momento correcto durante el desarrollo embrionario y la diferenciación de tejidos. Aquí describimos las características básicas del control de la transcripción en las bacterias, utilizando como primer ejemplo el operón *lac* en *E. coli*. Muchos de estos procesos, al igual que otros, están involucrados en el control de la transcripción eucarionte, que se aborda en el capítulo 11.

En *E. coli*, casi la mitad de los genes están agrupados en operones, cada uno de los cuales codifica enzimas involucradas en una vía metabólica en particular o proteínas que interactúan para formar una proteína de subunidades múltiples. Por ejemplo, el operón *trp* ya mencionado, codifica cinco enzimas necesarias en la biosíntesis del triptófano (véase fig. 4-12). De manera similar, el operón *lac* codifica tres enzimas requeridas para el metabolismo de la lactosa, un azúcar presente en la leche. Puesto que un operón bacteriano se transcribe a partir de un sitio de inicio a un único mRNA, todos los genes dentro de un operón están regulados coordinadamente; es decir, todos son activados o reprimidos en igual medida.

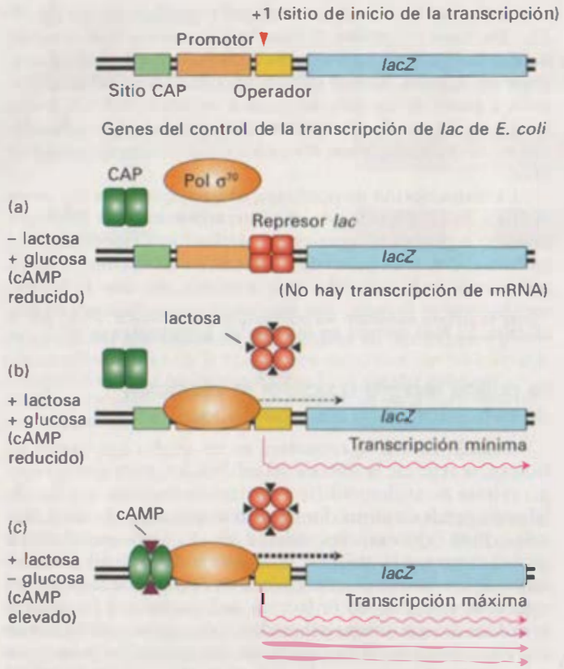
La transcripción de operones, al igual que la de los genes aislados, es controlada por una interacción entre la RNA polimerasa y proteínas *represoras* y *activadoras* específicas. Sin embargo, con el objetivo de iniciar la transcripción, la RNA polimerasa de *E. coli* debe estar asociada con uno de los pocos *factores* σ *(sigma)*, que funcionan como factores de iniciación. El más común en las células bacterianas es σ^{70}.

Se puede reprimir o activar la iniciación de la transcripción del operón *lac*

Cuando *E. coli* se encuentra en un medio que carece de lactosa, se reprime la síntesis del mRNA *lac*, para que la energía celular no se desperdicie sintetizando enzimas que las células no pueden utilizar. En un medio que contiene tanto lactosa como glucosa, las células de *E. coli* metabolizan preferentemente la glucosa, la molécula central del metabolismo de los carbohidratos. La lactosa es metabolizada a gran velocidad sólo cuando la lactosa está presente y la glucosa se reduce drásticamente del medio. Este ajuste metabólico se logra reprimiendo la transcripción del operón *lac* hasta que la lactosa esté presente, y la síntesis de sólo niveles bajos de mRNA *lac* hasta que la concentración citosólica de glucosa caiga a niveles bajos. La transcripción del operón *lac* en distintas condiciones es controlada por el represor *lac* y por la proteína activadora de catabolito (CAP), cada una de las cuales se une a una secuencia de DNA específica en la región de control de transcripción de *lac* (fig. 4-16, *arriba*).

Para que la transcripción del operón *lac* comience, la subunidad σ^{70} de la RNA polimerasa debe unirse al promotor *lac*, que se ubica a poca distancia corriente arriba del sitio de inicio. Cuando no hay lactosa presente, la unión del represor *lac* a una secuencia denominada operador *lac*, que se superpone al sitio de inicio de la transcripción, bloquea la iniciación de la transcripción por la polimerasa (fig. 4-16a). Cuando la lactosa está presente, se une a sitios de unión específicos en cada subunidad del represor tetramérico *lac*, provocando un cambio de conformación en la proteína que la hace disociarse del operador *lac*. Como resultado, la polimerasa puede iniciar la transcripción del operón *lac*. Sin embargo, cuando la glucosa también está presente, la frecuencia de iniciación de la transcripción (es decir, el número de veces por minuto que distintas moléculas de polimerasa inician la transcripción) es muy baja, lo que da como resultado la síntesis de tan sólo bajos niveles de mRNA *lac* y de las proteínas codificadas en el operón *lac* (fig. 4-16b).

Una vez que la glucosa se agota del medio y la concentración de glucosa intracelular disminuye, las células de *E. coli* reaccionan sintetizando AMP cíclico (véase fig. 3-27b). A medida que la concentración de cAMP se incrementa, éste se une a un sitio en cada subunidad de la proteína dimérica CAP, provocando un cambio conformacional que le permite a la proteína unirse al sitio del CAP en la región de control de transcripción de *lac*. El complejo CAP-cAMP unido interactúa con la polimerasa unida al promotor, estimulando en gran medida la frecuencia de iniciación de la transcripción.



▲ Fig. 4-16. Regulación de la transcripción a partir del operón *lac* de *E. coli*. (*Arriba*). La región de control de transcripción, compuesta de ≈10 pares de bases, incluye tres regiones de unión de proteínas: el sitio CAP, que une la proteína activadora del catabolito; el promotor *lac*, que une el complejo RNA polimerasa σ^{70}; y el operador *lac*, que une el represor *lac*. El gen *lacZ*, el primero de tres genes en el operón, se muestra a la derecha. (a) En ausencia de lactosa, se produce muy poco del mRNA *lac* porque el represor *lac* se une al operador, inhibiendo la iniciación de la transcripción por la RNA polimerasa σ^{70}. (b) En presencia de glucosa y lactosa, el represor *lac* se une a la lactosa y se disocia del operador, permitiendo a la RNA polimerasa σ^{70} iniciar la transcripción a una frecuencia baja. (c) La máxima transcripción del operón *lac* tiene lugar en presencia de lactosa y en ausencia de glucosa. En esta situación, el cAMP se incrementa en respuesta a la concentración baja de glucosa y forma el complejo CAP-cAMP, que se une al sitio CAP, donde interactúa con la RNA polimerasa para estimular la velocidad de iniciación de la transcripción.

Esta activación lleva a la síntesis de altos niveles de mRNA *lac* y posteriormente de las enzimas codificadas por el operón *lac* (fig. 4-16c).

Aunque los promotores para distintos genes de *E. coli* exhiben una homología considerable, sus secuencias exactas difieren. La secuencia del promotor determina la frecuencia intrínseca a la cual un complejo RNA polimerasa-σ inicia la transcripción de un gen en ausencia de una proteína represora o activadora. Los promotores que mantienen una alta frecuencia de iniciación de transcripción se denominan *promotores fuertes*. Los que mantienen una baja frecuencia de iniciación de transcripción se denominan *promotores débiles*. El operón *lac*, por ejemplo, tiene un promotor débil; su baja frecuencia intrínseca de iniciación es reducida aún más por el represor *lac* y elevada sustancialmente por el activador cAMP-CAP.

Moléculas pequeñas regulan la expresión de muchos genes bacterianos a través de los represores de unión al DNA

La transcripción de la mayoría de los genes de *E. coli* se regula mediante procesos similares a los descritos para el operón *lac*. El mecanismo general involucra un represor específico que se une a la región operadora de un gen o al operón, bloqueando de este modo la iniciación de la transcripción. Una molécula pequeña (o moléculas), denominada un *inductor*, se une al represor, controlando su actividad de unión al DNA y en consecuencia la frecuencia de transcripción de forma tal que sea apropiada para las necesidades de la célula.

Por ejemplo, cuando la concentración de triptófano en el medio y en el citosol es alta, la célula no sintetiza las diversas enzimas codificadas en el operón *trp*. La unión del triptófano al represor *trp* provoca un cambio conformacional que le permite a la proteína unirse al operador *trp*, reprimiendo así la expresión de las enzimas que sintetizan el triptófano. Contrariamente, cuando la concentración de triptófano en el medio y en el citosol es baja, el triptófano se disocia del represor *trp*, provocando un cambio conformacional en la proteína que hace que se disocie del operador *trp*, lo que permite la transcripción del operón *trp*. En el caso del operón *lac*, la unión del inductor de la lactosa al represor de *lac* reduce la unión del represor al operador, promoviendo así la transcripción.

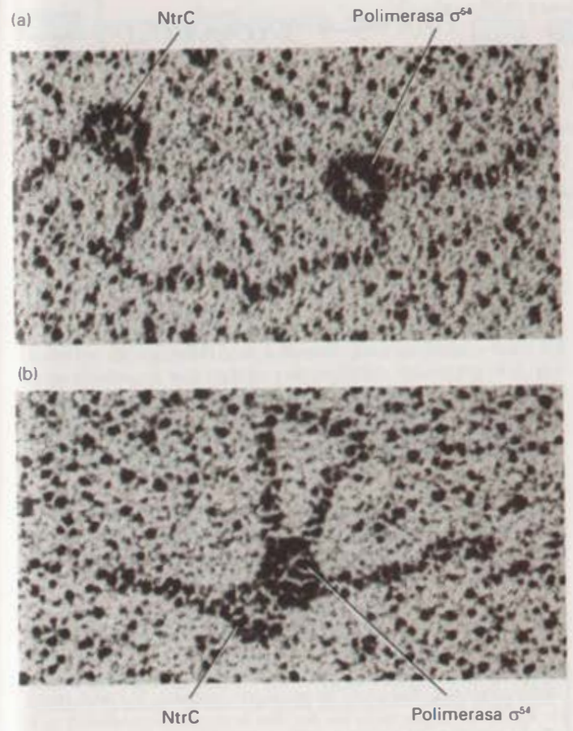
Proteínas activadoras específicas, como la CAP en el operón *lac*, también controlan la transcripción de algunos, pero no de todos los genes bacterianos. Estos activadores se unen al DNA junto con la RNA polimerasa, estimulando la transcripción desde un promotor específico. La actividad de unión al DNA de un activador es modulada en respuesta a las necesidades celulares por medio de la unión de pequeñas moléculas específicas (p. ej., cAMP) que alteran la conformación del activador.

La transcripción por RNA polimerasa σ^{54} es controlada por activadores que se unen lejos del promotor

La mayoría de los promotores de *E. coli* interactúan con la RNA polimerasa que contiene σ^{70} (RNA polimerasa σ^{70}), la forma principal de la enzima bacteriana. Sin embargo, la transcripción de ciertos grupos de genes, es llevada a cabo por la RNA polimerasa de *E. coli*, que contiene uno de varios factores sigma alternativos que reconocen secuencias promotoras consenso diferentes de las que reconoce σ^{70}. Todos, excepto uno de estos factores, están emparentados en sus secuencias con σ^{70}. La iniciación de la transcripción por la RNA polimerasa que contiene estos factores similares al σ^{70} es regulada por represores y activadores que se unen al DNA cerca de la región donde la polimerasa se une, similar a la iniciación por la misma RNA polimerasa σ^{70}.

La secuencia de un factor sigma de *E. coli*, σ^{54}, es distintivamente diferente de aquella de todos los factores similares al σ^{70}. La transcripción de genes por la RNA polimerasa que contiene σ^{54} está regulada exclusivamente por activadores cuyos sitios de unión al DNA, denominados amplificadores, generalmente están localizados 80-160 pares de bases corriente arriba desde el sitio de inicio. Incluso cuando los amplificadores se encuentran a más de una kilobase de distancia respecto de un sitio de inicio, los activadores σ^{54} pueden activar la transcripción.

El activador σ^{54} mejor caracterizado –la proteína NtrC (proteína C reguladora de nitrógeno)– estimula la transcripción a partir del promotor del gen *glnA*. Este gen codifica la enzima glutamina sintetasa, que sintetiza el aminoácido glutamina a partir de ácido glutámico y amoníaco. La RNA polimerasa σ^{54} se une al promotor de *glnA* pero no separa las cadenas de DNA e inicia la transcripción cuando es activada por la NtrC, una proteína dimérica. La NtrC, a su vez, es regulada por una proteincinasa denominada NtrB. En respuesta a bajos niveles de glutamina, la NtrB fosforila a la NtrC dimérica, que luego se une a un amplificador corriente arriba del promotor *glnA*. La NtrC fosforilada unida al amplificador estimula a la RNA polimerasa σ^{54} unida al promotor para que separe las cadenas de DNA e inicie la transcripción.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 4-17 Los bucles del DNA permiten la interacción de la RNA polimerasa σ54 y la NtrC unida. (a) Microfotografía electrónica de un fragmento de restricción de DNA con un dímero de NtrC fosforilado unido a la región amplificadora, cerca de un extremo, y la RNA polimerasa σ^{54} unida al promotor *glnA* cerca del otro extremo. (b) Microfotografía electrónica del mismo preparado de fragmentos que muestra los dímeros de NtrC y la polimerasa σ^{54} unidos entre sí con el DNA interpuesto formando un bucle entre ambos. (De Su, W et al., *Proc Nat'l. Acad. Sci. USA*, 1990; 87:5505; gentileza de S. Kustu.)

Los estudios con microscopio electrónico han mostrado que la NtrC fosforilada unida a amplificadores y la RNA polimerasa σ^{54} unida en el promotor interactúan directamente, formando un bucle en el DNA entre los sitios de unión (fig. 4-17). Como se comenta en el capítulo 11, este mecanismo de activación es, en cierta forma, similar al mecanismo predominante de la activación transcripcional en los eucariontes.

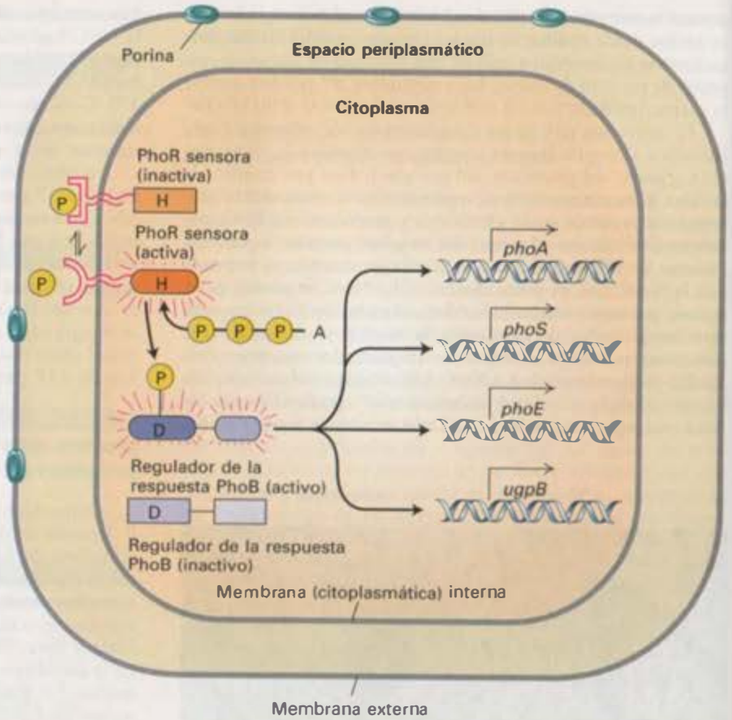
La NtrC tiene una actividad ATPasa y se requiere la hidrólisis de ATP para la activación, por la NtrC fosforilada, de la RNA polimerasa σ^{54} unida. Evidencia de esto es que las mutantes con una NtrC deficiente en la hidrólisis de ATP son invariablemente deficientes en la estimulación de la RNA polimerasa σ^{54} para separar las cadenas de DNA en el sitio de inicio de la transcripción. Se sugiere que la hidrólisis de ATP aporta la energía necesaria para la disociación de las cadenas del DNA. Por el contrario, la RNA polimerasa σ^{70} no requiere la hidrólisis de ATP para separar las cadenas en el sitio de inicio.

Muchas respuestas bacterianas son controladas por sistemas reguladores de dos componentes

Como acabamos de ver, el control del gen *glnA* de *E. coli* depende de dos proteínas, NtrC y NtrB. Tales sistemas reguladores de dos componentes controlan numerosas respuestas de las bacterias a cambios en su medio ambiente. Otro ejemplo comprende las proteínas PhoR y PhoB de *E. coli*, que regulan la transcripción en respuesta a la concentración de fosfato libre. PhoR es una proteína transmembrana, ubicada en la membrana interna (plasmática), cuyo dominio periplasmático fija fosfato con afinidad moderada y el dominio citosólico tiene actividad de proteincinasa; PhoB es una proteína citosólica.

Los grandes poros proteicos en la membrana exterior de *E. coli* permiten que los iones se difundan libremente entre el medio externo y el espacio periplasmático. En consecuencia, cuando la concentración de fosfato en el medio disminuye, también disminuye en el espacio periplasmático, causando que el fosfato se disocie del dominio periplasmático de PhoR, como se representa en la figura 4-18. Esto provoca un cambio conformacional en el dominio citoplasmático de la PhoR, que promueve la actividad proteincinasa. La PhoR activada inicialmente transfiere un fosfato γ desde el ATP a una cadena lateral de histidina en el mismo domino cinasa de la PhoR. El mismo fosfato luego es transferido a una cadena lateral de ácido aspártico específica en la PhoB, convirtiendo a PhoB de su forma de activador transcripcional inactiva a su forma activa. La PhoB fosforilada activa induce entonces la transcripción de varios genes que contribuyen a que la célula enfrente las condiciones de escasez de fosfato.

Muchas otras respuestas bacterianas son reguladas por dos proteínas homólogas a PhoR y PhoB. En cada uno de estos sistemas regulatorios, una proteína, llamada *sensora* contiene un dominio transmisor homólogo al dominio proteincinasa de PhoR. El dominio transmisor de la proteína sensora es regulado por un segundo dominio proteico singular (p. ej., el dominio periplasmático de PhoR) que detecta los cambios del medio ambiente. La segunda proteína, llamada *regulador de respuesta*, contiene un dominio receptor homólogo al de la región de PhoB que es fosforilada por la PhoR activada. El dominio receptor del regulador de respuesta está asociado con un segundo dominio que determina la función de la proteína. La actividad de este segundo dominio funcional es regulada por la fosforilación del do-



▶ Fig. 4-18. Sistema regulador de dos componentes PhoR/PhoB en *E. coli*. En respuesta a las bajas concentraciones de fosfatos en el medio y el espacio periplasmático, un ion fosfato se disocia del dominio periplasmático de la proteína sensora PhoR. Esto causa un cambio de conformación que activa un dominio transmisor de proteincinasa en la región citosólica de la PhoR. El dominio transmisor activado transfiere un fosfato γ del ATP a una histidina conservada en el dominio transmisor. Este fosfato es luego transferido a un ácido aspártico en el dominio receptor del regulador de respuesta PhoB. Varias proteínas PhoB pueden ser fosforiladas por un PhoR activado. Luego, las proteínas PhoB fosforiladas activan la transcripción de genes que codifican proteínas que ayudan a la célula a responder al bajo fosfato, incluidos *phoA, phoS, phoE* y *ugpB*.

minio receptor. Aunque todos los dominios transmisores son homólogos (como lo son también los dominios receptores), el dominio transmisor de una proteína sensora específica fosforilará sólo dominios receptores específicos de reguladores de respuestas específicas, permitiendo respuestas específicas frente a diferentes cambios ambientales. Nótese que NtrB y NtrC, comentadas antes, funcionan como proteína sensora y reguladora de respuesta, respectivamente, en el sistema regulador de dos componentes que controla la transcripción de *glnA*. Similares sistemas reguladores fosforilantes de dos componentes histidil-aspartil también se encuentran en las plantas.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 4.3

Control de la expresión génica en los procariontes

- La expresión génica, tanto en los procariontes como en los eucariontes, es regulada principalmente por mecanismos que controlan la iniciación de la transcripción.
- La unión de la subunidad σ en una RNA polimerasa a una región promotora es el primer paso en la iniciación de la transcripción en *E. coli*.
- La secuencia de nucleótidos de un promotor determina su fuerza, es decir, cuán frecuentemente distintas moléculas de RNA polimerasa se pueden unir e iniciar la transcripción por minuto.
- Los represores son proteínas que se unen a secuencias operadas, que se superponen o se ubican adyacentes a los promotores. La unión de un represor a un operador inhibe la iniciación de la transcripción.
- La actividad de unión al DNA de la mayoría de los represores bacterianos es modulada por pequeñas moléculas efectoras (inductoras). Esto le permite a las células bacterianas regular la transcripción de genes específicos en respuesta a cambios en la concentración de diversos nutrientes en el medio.
- El operón *lac* y algunos otros genes bacterianos también están regulados por proteínas activadoras que se unen a los promotores contiguos e incrementan la frecuencia de iniciación de la transcripción por la RNA polimerasa.
- El principal factor sigma en *E. coli* es el σ^{70}, pero también se encuentran varios otros factores sigma menos abundantes, cada uno de los cuales reconocen diferentes secuencias promotoras consenso.
- La iniciación de la transcripción por todas las RNA polimerasas de *E. coli*, a excepción de las que contienen σ^{54}, puede ser regulada por represores y activadores que se unen cerca del sitio de inicio de la transcripción (véase fig. 4-16).
- Los genes transcriptos por RNA polimerasas con σ^{54} son regulados por activadores que se unen a los amplificadores ubicados a ≈ 100 pares de base corriente arriba desde el sitio de inicio. Cuando el activador y la RNA polimerasa σ^{54} interactúan, el DNA entre sus sitios de unión forma un bucle (véase fig. 4-17).
- En los sistemas reguladores de dos componentes, una proteína actúa como un sensor, monitorizando el nivel de nutrientes u otros componentes en el ambiente. En condiciones apropiadas, el fosfato γ de un ATP es transferido primero a una histidina en la proteína sensora y luego a un ácido aspártico en la segunda proteína, el regulador de respuesta. El regulador de respuesta fosforilado se une luego a las secuencias reguladoras del DNA, estimulando o reprimiendo de este modo la transcripción de genes específicos (véase fig. 4-18).

4.4 Las tres funciones del RNA en la traducción

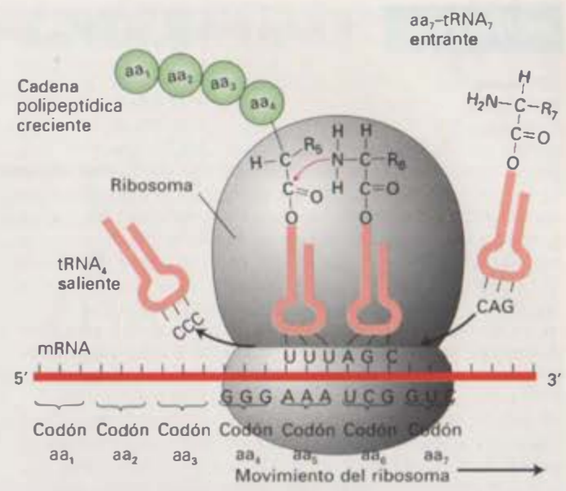
Si bien el DNA almacena información para la síntesis de proteínas y el mRNA transmite las instrucciones codificadas en el DNA, la mayoría de las actividades biológicas son realizadas por las proteínas. Como vimos en el capítulo 3, el orden lineal de los aminoácidos en cada proteína determina su estructura tridimensional y su actividad. Por esta razón, el ensamblaje de aminoácidos en el orden correcto, como está codificado en el DNA, es crítico para la producción de proteínas funcionales y por lo tanto para el funcionamiento correcto de células y organismos.

La traducción es el proceso por el cual la secuencia de nucleótidos de un mRNA es utilizada para ordenar y unir los aminoácidos en una cadena polipeptídica (véase fig. 4-1, paso 3). En las células eucariontes, la síntesis de proteínas tiene lugar en el citoplasma, donde tres tipos de moléculas de RNA se reúnen para realizar funciones distintas pero cooperativas (fig. 4-19).

1. El RNA mensajero (**mRNA**) transporta la información genética transcripta desde el DNA, bajo la forma de una serie de secuencias de tres nucleótidos, denominados codones, cada uno de los cuales específica un aminoácido en particular.

2. El RNA de transferencia (**tRNA**) es la clave para descifrar los codones en el mRNA. Cada tipo de aminoácido tiene su propio subgrupo de tRNA, que une el aminoácido y lo transporta hasta el extremo creciente de una cadena polipeptídica, si el próximo codón en el mRNA así lo requiere. El tRNA correcto, con su aminoácido adosado, es seleccionado a cada paso, porque cada molécula específica de tRNA contiene una secuencia de tres nucleótidos, un anticodón, que puede aparear bases con su codón complementario en el mRNA.

3. El **RNA ribosómico (rRNA)** se asocia con un conjunto de proteínas para formar ribosomas. Estas complejas estructuras, que se mueven físicamente a lo largo de una molécula de mRNA, catalizan el ensamblaje de aminoácidos para formar cadenas polipeptídicas. También unen tRNA y diversas proteínas accesorias necesarias para la síntesis de proteínas. Los ribosomas están compuestos de una subunidad mayor y una menor, cada una de las cuales contiene su propia molécula o moléculas de rRNA.



▲ Fig. 4-19. Las tres funciones del RNA en la síntesis de proteínas. El RNA mensajero (mRNA) es traducido en proteína por la acción conjunta del RNA de transferencia (tRNA) y el ribosoma, que está compuesto de numerosas proteínas y dos moléculas importante de RNA ribosómico (rRNA) (no mostradas). Nótese el apareamiento de bases entre los anticodones de tRNA y los codones complementarios en el mRNA. La formación de un enlace peptídico entre el grupo amino N en el aa-tRNA entrante y el carboxilo C-terminal de la cadena proteica creciente (violeta) es catalizada por uno de los rRNA. aa: aminoácido; R: grupos laterales. (Adaptado de A. J. F. Griffiths et al., 1999, *Modern Genetic Analysis*, W. H. Freeman and Company.)

Estos tres tipos de RNA participan en la traducción en todas las células. En efecto, el desarrollo de tres RNA funcionalmente distintos fue probablemente la clave molecular para el origen de la vida. En esta sección describimos cómo la estructura de cada RNA se relaciona con sus tareas específicas, mientras que la forma como los tres tipos trabajan en conjunto, junto con los factores proteicos requeridos para sintetizar las proteínas, se detalla en las secciones posteriores. Puesto que la traducción es esencial para la síntesis de proteínas, suele decirse que los dos procesos son intercambiables. Sin embargo, las cadenas polipeptídicas resultantes de la traducción experimentan plegamientos postraduccionales y a menudo otros cambios requeridos para la producción de proteínas funcionales maduras (p. ej.,) modificaciones químicas, asociaciones con otras cadenas (cap. 3).

El RNA mensajero transporta información del DNA en un código genético de tres letras

Como ya se dijo, el código genético utilizado por las células es un código por *tripletes*, en el que una secuencia de tres nucleótidos, o codón, es leída a partir de un punto de inicio específico en el mRNA. De los 64 codones posibles en

CUADRO 4-1 El código genético (de RNA a aminoácidos)*

Primera posición (extremo 5′)	Segunda posición U	Segunda posición C	Segunda posición A	Segunda posición G	Tercera posición (extremo 3′)
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Terminación	Terminación	A
	Leu	Ser	Terminación	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu (Met)*	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met (inicio)	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val (Met)*	Ala	Glu	Gly	G

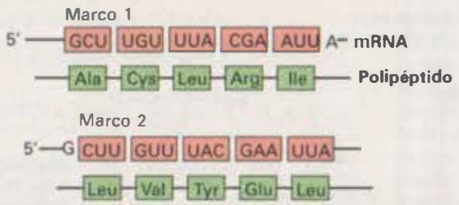
*AUG es el codón de iniciación más frecuente; GUG suele codificar valina, y CUG, leucina, pero rara vez, estos codones pueden también codificar metionina para iniciar una cadena proteica.

el código genético, 61 especifican aminoácidos individuales y tres son codones de terminación. El cuadro 4-1 muestra que la mayoría de los aminoácidos son codificados por más de un codón. Sólo dos –la metionina y el triptófano– tienen un único codón; en el otro extremo, la leucina, la serina y la arginina están especificados, cada uno, por seis codones diferentes. Se dice que los distintos codones para un aminoácido dado son sinónimos. El código en sí mismo es denominado *degenerado*, lo cual implica que más de un codón puede especificar el mismo aminoácido.

La síntesis de todas las cadenas polipeptídicas en las células procariontes y eucariontes comienza con el aminoácido metionina. En la mayoría de los mRNA, el *codón de inicio (iniciador)* que especifica esta metionina aminoterminal es AUG. En algunos mRNA bacterianos, GUG se usa como el codón iniciador, y en ocasiones CUG se usa como codón iniciador para la metionina en los eucariontes. Los tres codones UAA, UGA y UAG no especifican aminoácidos, pero constituyen *codones de terminación (stop)* que marcan el carboxilo terminal de las cadenas polipeptídicas en casi todas las células. La secuencia de codones que transcurre desde un codón de inicio específico hasta un codón de terminación se denomina marco de lectura. Esta disposición lineal precisa de ribonucleótidos, en grupos de tres, en el mRNA especifica la secuencia lineal exacta de aminoácidos en una cadena polipeptídica y señala también dónde comienza y termina la síntesis de la cadena.

Debido a que el código genético es un código de tripletes no superpuesto y sin comas, en teoría un mRNA particular podría ser traducido en tres marcos de lectura diferentes. De hecho, algunos mRNA han demostrado contener información superpuesta que puede ser traducida en distintos marcos de lectura, produciendo distintos polipéptidos (fig. 4-20). Sin embargo, la gran mayoría de los mRNA sólo pueden ser leídos en un marco de lectura porque los codones de terminación que se encuentran en los otros dos posibles marcos de lectura terminan la traducción antes de que se produzca la proteína funcional. Otra disposición de codificación no habitual se debe al *corrimiento del marco de lectura (frameshifting)*. En este caso, las estructuras sintetizadoras de proteínas puede leer cuatro nucleótidos como un solo aminoácido y luego continuar leyendo tripletes, o retroceder una base y leer todos los tripletes consecutivos en el nuevo marco hasta que sobrevenga la terminación de la cadena. Los corrimientos del marco de lectura no son eventos comunes, pero se observaron algunas decenas de estos casos.

El significado de cada codón es el mismo en la mayoría de los organismos conocidos; un fuerte argumento a favor de que la vida en la Tierra tuvo una evolución común única. Sin embargo, se descubrió que el código genético difiere en algunos codones en muchas mitocondrias, en los protozoos ciliados y en *Acetabularia*, una planta unicelular. Como se muestra en el cuadro 4-2, la mayoría de estos cambios implican la lectura de codones de terminación normales como aminoácidos, no del intercambio de un aminoácido por otro. Estas excepciones al código general probablemente fueron acontecimientos evolutivos posteriores; es decir, en ningún momento el código se mantuvo inmutable, aunque los cambios masivos no fueron tolerados una vez que un código general comenzó a funcionar al principio de la evolución.



▲ Fig. 4-20. Ejemplo de cómo el código genético –un código de tripletes no superpuesto, sin interrupciones– puede ser leído en diferentes marcos. Si la traducción de la secuencia del mRNA ilustrada comienza en dos sitios de inicio diferentes ubicados corriente arriba (no mostrados), son posibles, entonces, dos marcos de lectura superpuestos. En este ejemplo, los codones se desplazaron una base a la derecha en el marco inferior. En consecuencia, la misma secuencia de nucleótidos especifica diferentes aminoácidos durante la traducción. Aunque son poco frecuentes, se han descubierto muchas instancias de tales superposiciones en los genes virales y celulares de procariontes y eucariontes. En teoría, es posible que el mRNA tenga un tercer marco de lectura.

La estructura plegada de tRNA promueve sus funciones decodificadoras

La traducción, o decodificación, del lenguaje de cuatro nucleótidos del DNA y mRNA al lenguaje de 20 aminoácidos de las proteínas requiere tRNA y enzimas denominadas *aminoacil-tRNA sintetasas*. Para participar en la síntesis de proteínas, una molécula de tRNA debe estar unida químicamente a un aminoácido en particular a través de un enlace de alta energía, formando aminoacil-tRNA; luego, el anticodón en el tRNA aparea las bases con un codón en el mRNA para que el aminoácido activado pueda agregarse a la cadena polipeptídica en crecimiento (fig. 4-21).

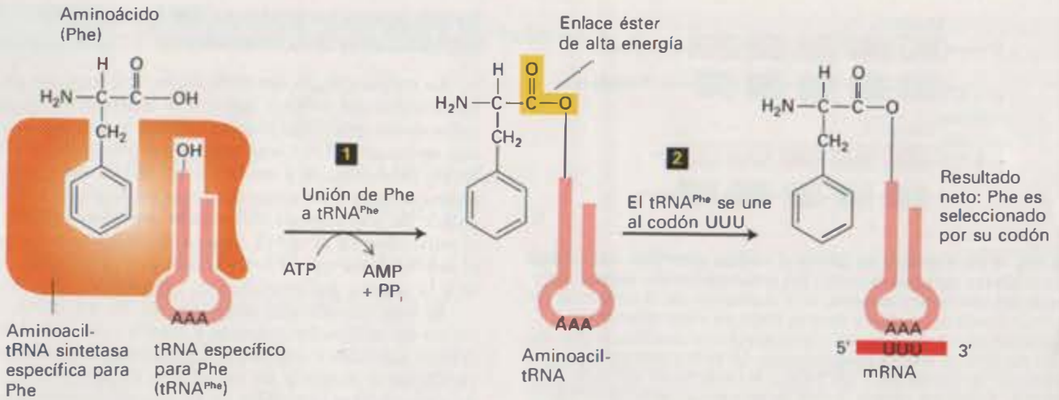
Se han identificado alrededor de 30–40 tRNA diferentes en las células bacterianas y tantos como 50–100 en las células animales y vegetales. En consecuencia, el número de tRNA en la mayoría de las células es superior al número de aminoácidos utilizados en la síntesis de proteínas (20) y también difiere del número de codones de aminoácidos del código genético (61). En consecuencia, muchos aminoácidos tienen más de un tRNA al cual pueden fijarse (lo que explica cómo puede haber más tRNA que aminoácidos); además, muchos tRNA pueden aparearse con más de un codón (lo cual explica cómo puede haber más codones que tRNA).

La función de las moléculas de tRNA, que tienen 70-80 nucleótidos de largo, depende de la exactitud de sus estructuras tridimensionales. En solución, todas las moléculas de t-RNA se pliegan en una disposición similar de tallo con bucle, semejante a una hoja de trébol dibujada en dos dimensiones (fig. 4-22a). Los cuatro tallos son hélices dobles cortas estabilizadas por apareamiento de bases de Watson y Crick; tres de los cuatro tallos tienen bucles que contienen siete u ocho bases en sus extremos, mientras que el tallo sin bucle restante contiene los extremos libres 3′ y 5′ de la cadena. Los tres nucleótidos que componen los anticodones están ubicados en el centro de un bucle, en una posición accesible que facilita el apareamiento de bases entre el codón y el anticodón. En todos los tRNA, el extremo 3′ del *tallo aceptor* de aminoácidos sin bucle tiene la secuencia CCA, que en la mayoría de los casos se agrega después de que haya sido completada la síntesis y el procesamiento de tRNA. Varias bases en la mayoría de los tRNA también son modificadas luego de la síntesis. Vista en tres dimensiones, la molécula plegada de tRNA tiene una forma

CUADRO 4-2 Desviaciones conocidas del código genético universal

Codón	Código universal	Código inusual*	Ocurrencia
UGA	Terminación	Trp	*Mycoplasma*, *Spiroplasma*, mitocondrias de muchas especies
CUG	Leu	Thr	Mitocondrias en levaduras
UAA, UAG	Terminación	Gln	*Acetabularia*, *Tetrahymena*, Paramecio, etc.
UGA	Teminación	Cys	*Euplotes*

* "Código inusual" es usado en genes nucleares de los organismos listados y en genes mitocondriales como se indica. FUENTE: S. Osawa et al., 1992, *Microbiol. Rev* 56:229.

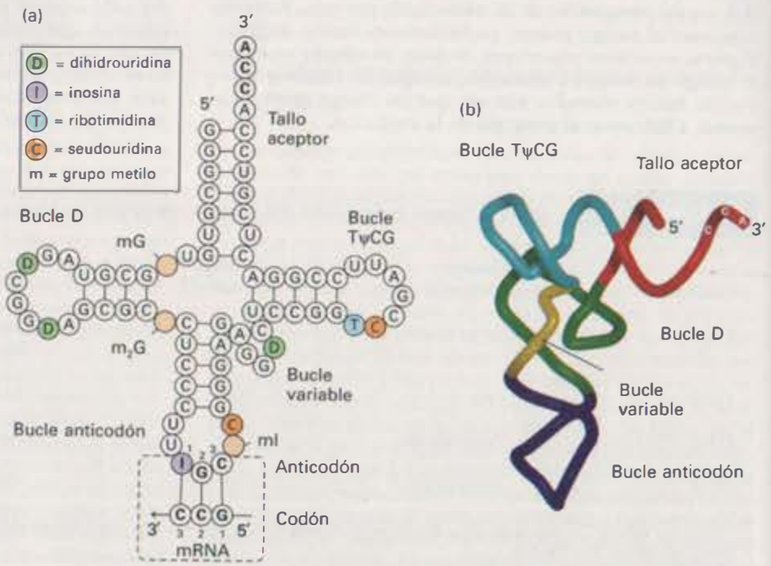


▲ Fig. 4-21. La traducción de las secuencias de ácidos nucleicos del mRNA en secuencias de aminoácidos de proteínas requiere un proceso decodificador de dos pasos. Paso **1**: Una aminoacil-tRNA sintetasa acopla un aminoácido específico, a través de un enlace éster de alta energía (amarillo), a un hidroxilo 2' o 3' de la adenosina terminal en el tRNA correspondiente. Paso **2**: Una secuencia de tres bases en el tRNA (el anticodón) aparea sus pases con el codón del mRNA, lo cual especifica los aminoácidos adosados. Si se produce un error en alguno de los pasos, se puede incorporar el aminoácido erróneo a la cadena polipeptídica. Phe: fenilalanina.

de L con el bucle del anticodón y el tallo aceptor que forman los extremos de los dos brazos (fig. 4-22b).

A menudo se produce un apareamiento no estándar de bases entre codones y anticodones

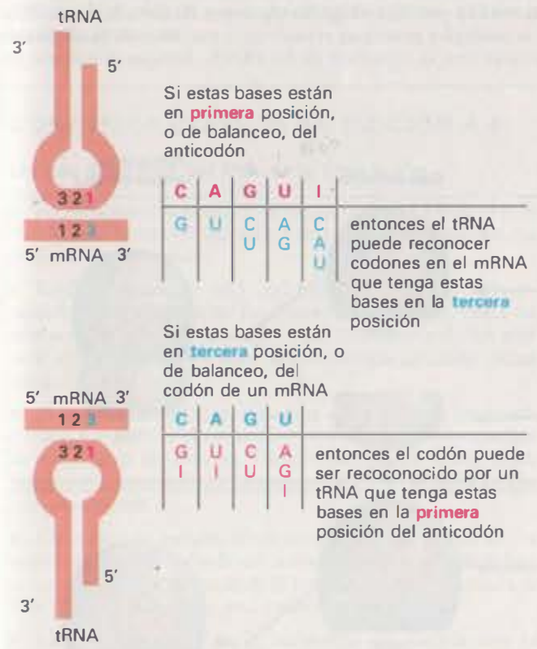
Si sólo fuera posible el apareamiento perfecto de bases de Watson y Crick entre codones y anticodones, las células deberían tener exactamente 61 especies distintas de tRNA, una por cada codón que especifica un aminoácido. Sin embargo, como ya se vio, muchas células contienen menos de 61 tRNA. La explicación de este número menor radica en la capacidad de un solo anticodón de tRNA de reconocer más de un codón correspondiente a un aminoácido dado pero no necesariamente todos. Este reconocimiento más amplio puede ocurrir debido a un apareamiento no estándar entre las bases en la posición denominada "de balanceo"; es decir, la tercera base (3') de un codón de mRNA y la primera base (5') correspondiente del anticodón del tRNA.



▶ Fig. 4-22. Estructura de los tRNA. a) Aunque la secuencia exacta de nucleótidos varía entre los tRNA, todos se pliegan para formar cuatro tallos de bases apareadas y tres bucles. La secuencia CCA en el extremo 3' también se encuentra en todos los tRNA. La unión de un aminoácido al extremo 3' del brazo A forma un aminoacil-tRNA. Algunos de los residuos A, C, G y U se modifican en la mayoría de los tRNA (véase recuadro). La dihidrouridina (D) casi siempre está presente en el bucle D; del mismo modo casi siempre se encuentra ribotimidina (T) y seudouridina (Ψ) en el bucle TΨCG. El tRNA de alanina de levadura, representado aquí, también contiene otras bases modificadas. El triplete en el extremo del anticodón del bucle se aparea con el codón correspondiente del mRNA. (b) Modelo tridimensional del esqueleto general de todos los tRNA. Nótese la forma en L de la molécula. [Parte (a) véase R. W. Holly et al., 1965, *Science* 147:1462; parte (b) de J. G. Arnez y D. Moras, 1997, *Trends Biochem., Sci.* 22:211.]

La primera y la segunda base de un codón casi siempre forman pares estándares de bases de Watson y Crick con la tercera y la segunda base, respectivamente, del anticodón correspondiente, pero en la posición de balanceo pueden ocurrir cuatro interacciones no estándares. Tiene particular importancia el par de bases G. U, que coincide estructuralmente casi tan bien como el par estándar G. C. En consecuencia, un anticodón dado en el tRNA con G en la primera posición (de balanceo) puede aparearse con los dos codones correspondientes que tienen tanto pirimidina (C o U) en la tercera posición (fig. 4-23). Por ejemplo, los codones fenilalanina UUU y UUC (5'→3') son reconocidos por el tRNA que tiene GAA (5'→3') como anticodón. De hecho, dos codones cualesquiera del tipo NNPir (N = cualquier base; Pir = pirimidina) codifican un único aminoácido y son decodificados por un único tRNA con G en la primera posición (de balanceo) del anticodón.

Si bien rara vez se encuentra una adenina en la posición de balanceo del anticodón, muchos tRNA en plantas y animales contienen inosina (I), un producto desaminado de la adenina, en esta posición. La inosina puede formar un apareamiento no estándar de base con A, C y U. En consecuencia, un tRNA con inosina en la posición de balanceo puede reconocer los codones de mRNA correspondientes con A, C o U en la tercera posición (de balanceo) (véase fig. 4-23). Por esta razón, los tRNA que contienen inosina tienen gran aplicación en la traducción de codones sinónimos que especifican un único aminoácido. Por ejemplo, cuatro de los seis codones para la leucina (CUA, CUC, CUU y UUA) son reconocidos por el mismo tRNA con el anticodón 3'-GAI-5'; la inosina en la posición de balanceo forma un apareamiento no estándar con la tercera base de los cuatros codones. En este caso del codón UUA, un par G U no estándar también se forma entre la posición 3 del anticodón y la posición 1 del codón.



▲ Fig. 4-23. Apareamiento no estándar de bases entre el codón y el anticodón en la posición de balanceo. La base en la tercera posición (o de balanceo) de un codón de mRNA a menudo forma un par no estándar de bases con la base en la primera posición (o de balanceo) del anticodón de un tRNA. El apareamiento de balanceo permite a un tRNA reconocer más de un codón de mRNA (*arriba*); por otro lado, permite que un codón sea reconocido por más de una clase de tRNA (*abajo*), aunque cada tRNA portará el mismo aminoácido. Nótese que un tRNA con una I (inosina) en la posición de balanceo puede "leer" (aparearse con) tres codones diferentes, y un tRNA con G o U en la posición de balanceo puede leer dos codones. Si bien en teoría es posible hallar A en la posición de balanceo del anticodón, casi nunca aparece así en la naturaleza.

La aminoacil-tRNA sintetasa activa los aminoácidos al unirlos mediante enlaces covalentes a los tRNA

El reconocimiento del codón o de los codones que especifican un determinado aminoácido por un tRNA particular es, en realidad, el segundo paso en la decodificación del mensaje genético. El primer paso, la fijación del aminoácido adecuado al tRNA, es catalizado por una aminoacil-tRNA sintetasa específica. Cada una de las 20 sintetasas diferentes reconocen *un* aminoácido y *todas* las moléculas de tRNA compatibles o *análogos*. Estas enzimas acoplantes unen un aminoácido al hidroxilo 2' o 3'libre de la adenosina en el extremo 3' terminal de las moléculas de tRNA mediante una reacción que requiere ATP. En esta reacción, el aminoácido se une al tRNA mediante un enlace de alta energía y, por lo tanto, se dice que se *activa*. La energía de este enlace impulsa posteriormente las reacciones de los enlaces peptídicos que unen los aminoácidos adyacentes en la cadena polipeptídica creciente. El equilibrio de la reacción de aminoacilación se desplaza más hacia la activación del aminoácido por la hidrólisis del enlace fosfoanhídrido de alta energía en el pirofosfato liberado (véase fig. 4-21).

Debido a que algunos aminoácidos tienen gran similitud estructural, a veces las aminoacil-tRNA sintetasas cometen errores. Sin embargo, éstos son corregidos por las propias enzimas, las cuales poseen una actividad *de corrección (proofreading)* que controla el calce en sus bolsillos de unión al aminoácido. Si el aminoácido equivocado comienza a unirse al tRNA, la sintetasa unida cataliza la eliminación del aminoácido del tRNA. Esta función crucial ayuda a garantizar que un tRNA entregue el aminoácido correcto a la maquinaria que sintetiza la proteína. La velocidad de error global para la traducción en *E. coli* es muy baja, aproximadamente 1 por 50.000 codones, lo que evidencia la importancia de la actividad correctora de prueba de las aminoacil-tRNA sintetasas.

Los ribosomas son estructuras sintetizadoras de proteínas

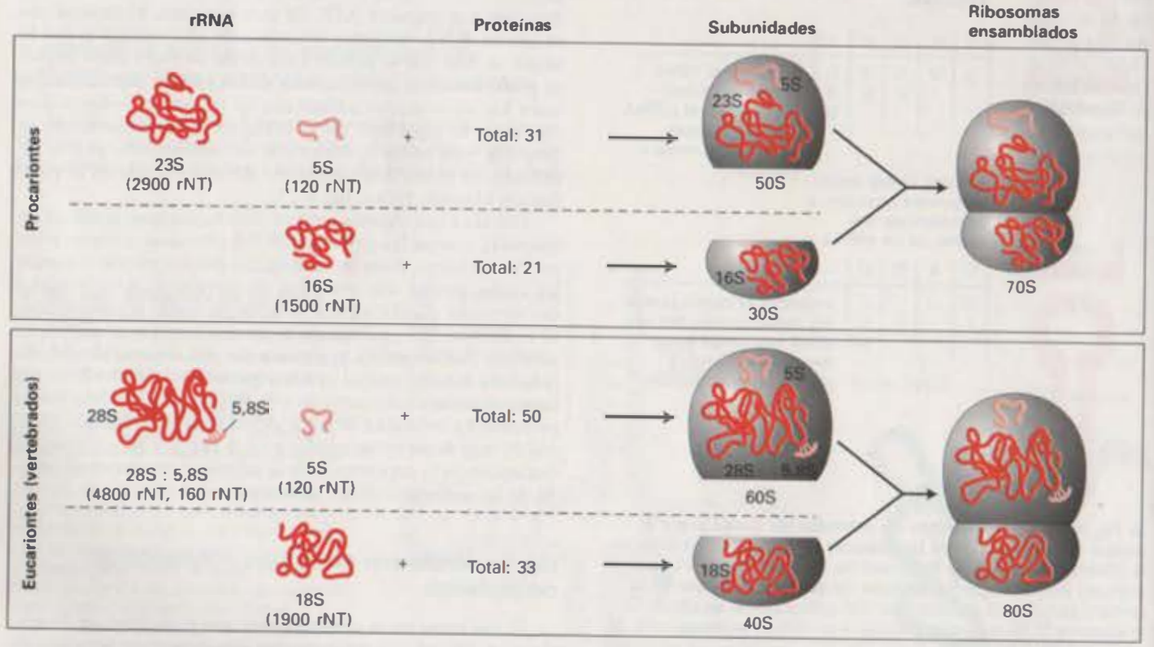
Si los numerosos componentes que participan en la traducción del mRNA tuvieran que interactuar en solución libre, la probabilidad de que ocurran colisiones simultáneas sería tan pequeña que la velocidad de polimerización de aminoácidos sería muy baja. La eficiencia de traducción se incrementa mucho por la unión del mRNA y los aminoacil tRNA individuales al complejo de RNA-proteína más abundante de la célula, el ribosoma, el cual dirige la elongación

de un polipéptido a una velocidad de tres a cinco aminoácidos agregados por segundo. Por lo tanto, las pequeñas proteínas de 100-200 aminoácidos se forman en un minuto o menos. Por otra parte, se tarda entre 2-3 horas en formar la proteína más grande conocida, la titina, la cual se encuentra en el músculo y contiene alrededor de 30.000 residuos de aminoácidos. La maquinaria celular que lleva a cabo esta tarea debe ser precisa y persistente.

Con la ayuda del microscopio electrónico se descubrieron los ribosomas, primero como partículas ricas en RNA, pequeñas y separadas en la célula, que secretaban grandes cantidades de proteínas. Sin embargo, en un principio se desconocía el papel que desempeñaban en la síntesis de proteínas hasta que se pudieron obtener preparaciones de ribosomas razonablemente puras. Los experimentos de radiomarcación in vitro con estas preparaciones demostraron que los aminoácidos radiactivos eran incorporados a las cadenas polipeptídicas creciente asociadas con ribosonas, antes de incorporarse las cadenas completas.

Un ribosoma se compone de tres (en bacterias) o cuatro (en eucariontes) moléculas de rRNA y de tantas como 83 proteínas, organizadas en una subunidad mayor y una subunidad menor (fig. 4-24). Las subunidades ribosómicas y las moléculas de rRNA se suelen designar en unidades Svedberg (S), una medida de la velocidad de sedimentación de partículas centrifugadas en condiciones estándares. La subunidad menor contiene una molécula única de rRNA, denominada *rRNA pequeño*. La subunidad mayor contiene una molécula de *rRNA grande* y una molécula de rRNA 5S, más una molécula adicional de rRNA 5,8 S en los vertebrados. La longitud de las moléculas de rRNA, la cantidad de proteínas en cada subunidad, y por consiguiente los tamaños de las subunidades son diferentes en células bacterianas y eucariontes. Los ensamblajes ribosómicos son 70S en las eubacterias y 80S en los vertebrados. Pero más interesante que las diferencias son las similitudes estructurales y funcionales entre los ribosomas de todas las especies. Esta coherencia es otro reflejo del origen evolutivo común de los constituyentes más básicos de las células vivas.

Hoy se conocen las secuencias de los rRNA grande y pequeño de varios miles de organismos. Si bien las secuencias primarias de nucleótidos de estos rRNA varían considerablemente, en teoría las mismas partes de cada tipo de rRNA pueden formar tallos con bucles de bases apareadas, que generarían una estructura tridimensional similar para cada rRNA de todos los organismos. La estructura tridimensional actual de los rRNA bacterianos de *Thermus thermopolis* ha sido determinada por cristalografía de rayos X del ribosoma 70S. Las múltiples proteínas ribosómicas mucho más pequeñas se asocian con la superficie de los rRNA. Aunque el número de moléculas de proteínas en los ribosomas excede en gran medida el número de moléculas de RNA, éste constituye cerca del 60% de la masa de un ribosoma.



▲ **Fig. 4-24. Estructura general de los ribosomas en procariontes y eucariontes.** En todas las células cada ribosoma está constituido por dos subunidades: una mayor y una menor. Las dos subunidades continen rRNA (rojo) de distintas longitudes, como también un grupo diferente de proteínas. Todos los ribosomas contienen dos moléculas principales de rRNA (23S y16S en las bacterias; 28S y 18S en los vertebrados) y un rRNA 5S. La subunidad mayor de los ribosomas de los vertebrados también contiene un rRNA 5,8S que forma pares de bases con el rRNA 28S. En cada tipo de rRNA se indica el número de ribonucleótidos (rNT).

Durante la traducción, un ribosoma se mueve a lo largo de una cadena de mRNA interactuando con distintos factores proteicos y los tRNA y es muy probable que sufra grandes cambios conformacionales. A pesar de la complejidad del ribosoma, se han realizado importantes progresos en la determinación de la estructura global de los ribosomas bacterianos y en la identificación de distintos sitios activos. Por ejemplo, estudios de cristalografía de rayos X del ribosoma 70S de *T. thermophilus*, no sólo han revelado las dimensiones y la forma global de las subunidades ribosómicas, sino también la localización de las posiciones de unión de los tRNA al ribosoma durante la elongación de una cadena de proteína creciente. Además, técnicas químicas poderosas, como el ensayo de unión al DNA o ensayos de huellas (**footprinting**), que se describe en el capítulo 11, han sido utilizadas para identificar la secuencia de nucleótidos específica en los rRNA que se une a las proteínas u a otro RNA. Como analizaremos en la siguiente sección, alrededor de cuarenta años después del descubrimiento de los ribosomas comienza a esclarecerse la estructura y el funcionamiento global durante la síntesis de proteínas.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 4.4

Las tres funciones del RNA en la traducción

- La información genética es transcripta del DNA al mRNA bajo la forma de un código de tripletes degenerado, superpuesto y sin comas.
- Cada aminoácido está codificado por una o más secuencias de trinucleótido (codones) en el mRNA. Cada codón especifica un aminoácido, pero la mayoría de los aminoácidos están codificados por múltiples codones (véase cuadro 4-1).
- El codón AUG para la metionina es el codón de inicio más común, y especifica el aminoácido del extremo NH_2- terminal de una cadena de proteína. Tres codones (UAA, UAG, UGA) funcionan como codones de terminación y no especifican ningún aminoácido.
- Un marco de lectura, la secuencia ininterrumpida de codones en el mRNA desde un codón de inicio específico hasta un codón de terminación, se traduce en una secuencia lineal de aminoácidos en una cadena polipeptídica.
- La decodificación de la secuencia de nucleótidos en el mRNA en una secuencia de aminoácidos de una proteína depende de los tRNA y de las aminoacil-tRNA sintetasas.
- Todos los tRNA tienen una estructura tridimensional similar, que incluye un brazo aceptor para la fijación de un aminoácido específico y un tallo con bucle con una secuencia anticodón de tres bases en el extremo (véase fig. 4-22). El anticodón puede aparearse con su correspondiente codón del mRNA.
- Debido a las interacciones no estándares, un tRNA puede aparearse con más de un codón del mRNA; a la inversa, un codón particular puede tener un apareamiento de bases con múltiples tRNA. Sin embargo, en cada caso, sólo el aminoácido adecuado es insertado en una cadena polipeptídica creciente.
- Cada una de las 20 aminoacil-tRNA sintetasas reconoce un único aminoácido y lo une, mediante enlaces covalentes, a un tRNA análogo, para formar un aminoacil-tRNA (véase fig. 4-21). Esta reacción activa el aminoácido para que pueda participar en la formación de un enlace peptídico.
- Tanto los ribosomas de los procariontes como los de los eucariontes –los grandes complejos de ribonucleoproteínas sobre los cuales ocurre la traducción– constan de una subunidad mayor y una menor (véase fig. 4-24). Cada suhunidad contiene numerosas proteínas diferentes y una molécula principal de rRNA (grande o pequeña). La subunidad grande también contiene un rRNA 5S accesorio en los procariontes y dos rRNA accesorios en los eucariontes (5S y 5,8S en los vertebrados).
- Los rRNA análogos de muchas especies diferentes se pliegan para formar estructuras tridimensionales que contienen numerosos tallos con bucles y sitios de unión para proteínas, mRNA y tRNA. Muchas proteínas ribosómicas pequeñas se asocian con la periferia de los rRNA.

4.5 Pasos de la síntesis de proteínas sobre los ribosomas

En las secciones anteriores se describieron los principales participantes en la síntesis de proteínas: el mRNA, los tRNA aminoacilados, y los ribosomas que contienen los rRNA grande y pequeño. Ahora se verá en sus detalles cómo estos componentes se juntan para realizar los procesos bioquímicos que conducen a la formación de las proteínas en los ribosomas. El complejo proceso de la traducción, similar a la transcripción, se puede dividir en tres etapas –iniciación, elongación y terminación– que se considerarán en orden. Centraremos la descripción de la traducción en las células eucariontes, pero el mecanismo de la traducción es fundamentalmente el mismo en todas las células.

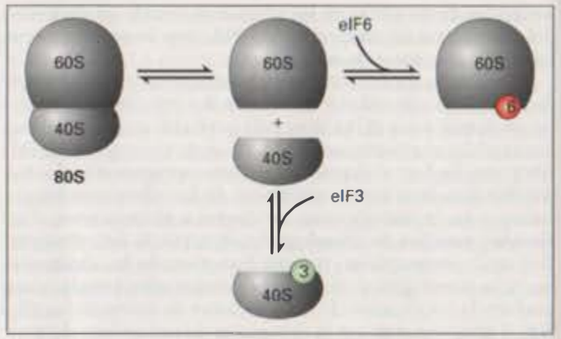
El codón de iniciación AUG es reconocido por el metionil-$tRNA_i^{Met}$

Como ya se dijo, el codón AUG para la metionina funciona como codón de inicio en la gran mayoría de los mRNA. Un aspecto crítico de la iniciación de la traducción es comenzar la síntesis en el codón de inicio, estableciendo así el marco de lectura correcto para todo el mRNA. Tanto los procariontes como los eucariontes contienen dos metionina-tRNA diferentes: $tRNA_i^{Met}$ puede iniciar la síntesis de proteínas, $tRNA^{Met}$ puede incorporar metionina sólo a la cadena creciente de proteína. La misma aminoacil-tRNA sintetasa (MetRS) carga ambos tRNA con metionina. Pero *sólo* Met-$tRNA_i^{Met}$ (es decir, la metionina activada fijada al $tRNA_i^{Met}$) es capaz de unirse al sitio apropiado sobre la subunidad ribosómica menor, el *sitio P*, para comenzar la síntesis de una cadena polipeptídica. El Met- $tRNA^{Met}$ regular y todos los otros tRNA cargados se unen sólo a otro sitio ribosómico, el *sitio A*, como describiremos más adelante.

La iniciación de la traducción suele ocurrir cerca del primer AUG más próximo al extremo 5' de un mRNA

Durante la primera etapa de la traducción, un ribosoma se ensambla, formando un complejo con un mRNA y un tRNA iniciador activado, el cual está correctamente posicionado en el codón de inicio. Las subunidades ribosómicas mayor y menor que no participan activamente en la traducción son mantenidas aparte por la unión de dos factores de iniciación, denominados eIF3 y eIF6 en los eucariontes. Un *complejo de preiniciación* se forma cuando al complejo formado por la subunidad 40S y el eIF3, se le une el eIF1A y un complejo ternario de Met- $tRNA_i^{Met}$, eIF2 y GTP (fig. 4-25, paso1). Las células pueden regular la síntesis proteica a través de la fosforilación de un residuo de serina sobre el eIF2 unido al GDP; el complejo fosforilado es incapaz entonces de intercambiar el GDP unido por GTP y no puede unir Met- $tRNA_i^{Met}$, lo cual inhibe la síntesis de proteína.

Durante la iniciación de la traducción, la subunidad eIF4E del complejo de unión al casquete eIF4 se une casquete 5' del mRNA a ser traducido. Luego, el complejo mRNA-eIF4 se asocia con el complejo de preiniciación a través de una interacción de la subunidad eIF4G y eIF3, formando el *complejo de iniciación* (fig. 4-25, paso 2). Es probable entonces que el complejo de iniciación se deslice, o *rastree*, a lo largo del mRNA asociado con la actividad helicasa del eIF4A utilizando la energía de la hidrólisis de ATP para desenrollar la estructura secundaria del RNA. El rastreo se detiene cuando el anticodón $tRNA_i^{Met}$ reconoce el codón de inicio, el cual es el primer AUG hacia abajo a partir del extremo 5' en la mayoría de los mRNA de los eucariontes (paso 3). El reconocimiento del codón de inicio conduce a la hidrólisis del GTP asociado con eIF2, un paso irreversible que evita rastreos posteriores La selección del AUG iniciador se facilita por la presencia de nucleótidos específicos circundantes denominados la *secuencia de Kozak*, por Marilyn Kozack, quien la definió como: (5')AC-CAUGG(3'). La A que precede a AUG (subrayado) y la G que la sigue inmediatamente después son los nucleótidos más importantes que afectan la eficiencia de la iniciación de la traducción. Una vez que la subunidad ribosómica menor, con el Met- $tRNA_i^{Met}$unido, se ubica correctamente en el codón de inicio, la unión con la subunidad ribosómica mayor (60S) completa la formación de un ribosoma 80S. Esto requiere la acción de otro factor (eIF5) y la hidrólisis de un GTP asociado



▶ **Fig. 4-25. Iniciación de la traducción en eucariontes.** (*arriba*) Cuando un ribosoma se disocia al finalizar la traducción, las subunidades 40S y 60S se asocian con los factores de iniciación eIF3 y eIF6, formando los complejos que pueden iniciar otra ronda de traducción. Pasos **1** y **2**: La adición secuencial de los componentes indicados al complejo subunidad 40S-eIF3 forma el complejo de iniciación. Paso **3**: El rastreo del mRNA por parte del complejo de iniciación asociado lleva al posicionamiento de la subunidad menor y a la unión del Met-$tRNA_i^{Met}$ en el codón de inicio. Paso **4**: La asociación de la subunidad mayor (60S) forma un ribosoma 80S listo para traducir el mRNA. Dos factores de iniciación, el eIF2 (paso **1**) y el eIF5 (paso **4**) son proteínas de unión a GTP, que hidrolizan sus GTP unidos durante la iniciación de la traducción. Todavía no está bien caracterizado el tiempo preciso al cual se liberan los factores de iniciación particulares. Para mayores detalles véase el texto. (Adaptado de R. Méndez y J. D. Richter, 2001, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2:521.)

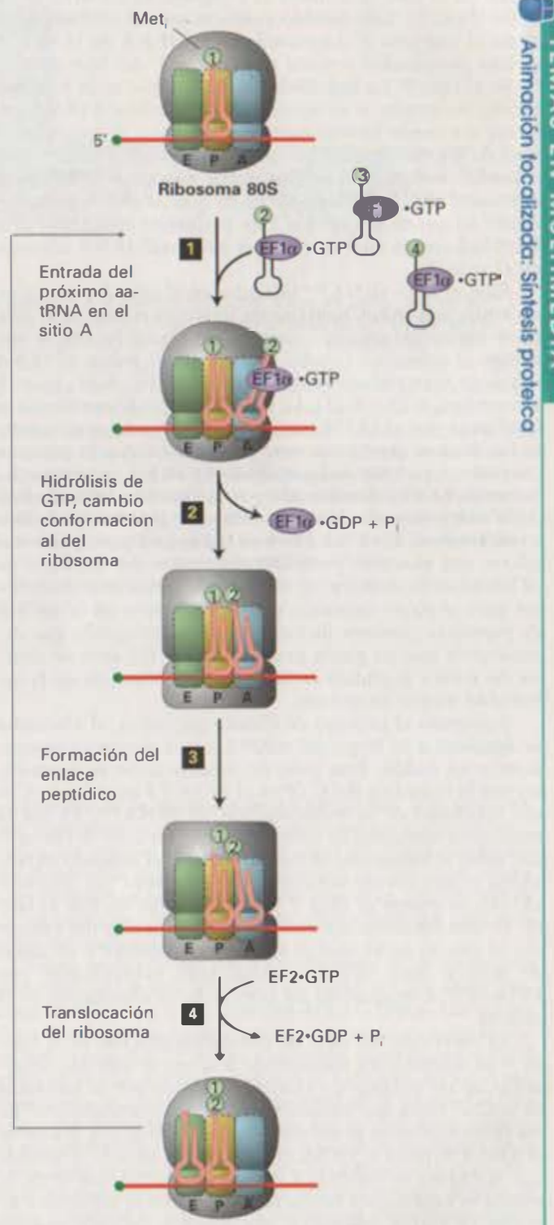
con (paso 4). El acoplamiento de la reacción de unión con la hidrólisis de GTP hace de este un paso irreversible, de manera tal que las subunidades ribosómicas no pueden disociarse más hasta que todo el mRNA sea traducido y finalice la síntesis proteica. Como analizaremos luego, durante la elongación de la cadena, el polipétido creciente permanece fijado al tRNA en este sitio P en el ribosoma.

La maquinaria de síntesis proteica de los eucariontes comienza la traducción de la mayoría de los mRNA celulares dentro de los 100 nucleótidos, aproximadamente del casquete del extremo 5', como lo acabamos de describir. Sin embargo, algunos mRNA celulares contienen un sitio interno de entrada en el ribosoma (IRES) localizado lejos hacia abajo del extremo 5'. Además, la traducción de algunos mRNA virales, a los que les falta el casquete 5', es iniciada en los IRES por la maquinaria de la célula huésped de células eucariontes infectada. Algunos de los mismos factores de iniciación de la traducción que contribuyen en el rastreo desde el casquete 5' se necesitan para la localización de un codón de inicio AUG interno, pero es poco clara la manera como se reconoce un IRES. Resultados recientes indican que algunos IRES se pliegan en una estructura de RNA que se une a un tercer sitio sobre el ribosoma, el *sitio E*, por lo que se posiciona un codón de inicio AUG interno en el sitio P.

Durante la elongación de la cadena cada aminoacil-tRNA entrante se mueve a través de tres sitios ribosómicos

El posicionamiento correcto del complejo eucariote ribosoma 80S-Met-$tRNA_i^{Met}$ está ahora listo para comenzar la tarea de agregar paso a paso aminoácidos mediante la traducción en marco de la lectura del mRNA. Como en el caso de la iniciación, se requiere un tipo de proteínas especiales, denominadas factores de elongación (EF), para llevar a cabo el proceso de elongación de la cadena. Los pasos clave de la elongación son la entrada de cada aminoacil-tRNA consecutivo, la formación del enlace peptídico, y el movimiento o *translocación* del ribosoma de un codón por vez a lo largo del mRNA.

Como ya se notó al completar la iniciación de la traducción, el Met- $tRNA_i^{Met}$ está unido en el sitio P sobre el ribosoma ensamblado 80S (fig. 4-26, *arriba*). Esta región del ribosoma se denomina sitio *P* debido a que el tRNA unido químicamente a la cadena polipetídica creciente se localiza aquí. El segundo aminoacil-tRNA ingresa en el ri-



▶ **Fig. 4-26. Ciclo de elongación de la cadena peptídica durante la traducción en los eucariontes.** Una vez que el ribosoma 80S con el Met- $tRNA_i^{Met}$ en el sitio P del nbosoma está ensamblado (*arriba*), un complejo ternario que lleva el segundo aminoácido (aa_2) codificado por el mRNA se une al sitio A (paso **1**). Luego de un cambio conformacional en el ribosoma, inducido por la hidrólisis del GTP en el EF1α·GTP (paso **2**), el rRNA grande cataliza la formación del enlace peptídico entre Met$_i$ y aa_2 (paso **3**). La hidrólisis de GTP en el EF2·GTP provoca otro cambio conformacional en el ribosoma que en su traslocación dispone un codón a lo largo del mRNA y desplaza el $tRNA_i^{Met}$ no acilado al sitio E y el tRNA con el péptido unido al sitio P (paso **4**). El ciclo puede comenzar de nuevo con la unión de un complejo ternario que lleva el aa_3 al sitio A ahora abierto. En el segundo y en los siguientes ciclos de elongación, el tRNA en el sitio E es expulsado durante el paso **2** como resultado del cambio conformacional inducido por la hidrólisis del GTP en el EF1α–GTP. Para los detalles véase el texto. (Adaptado de K. H. Nierhaus et al., 2000, en R. A. Garrett et al., eds., *The ribosome: structure, function, antibiotics, and cellular interactions*, ASM Press, p. 319.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación focalizada: Síntesis proteica

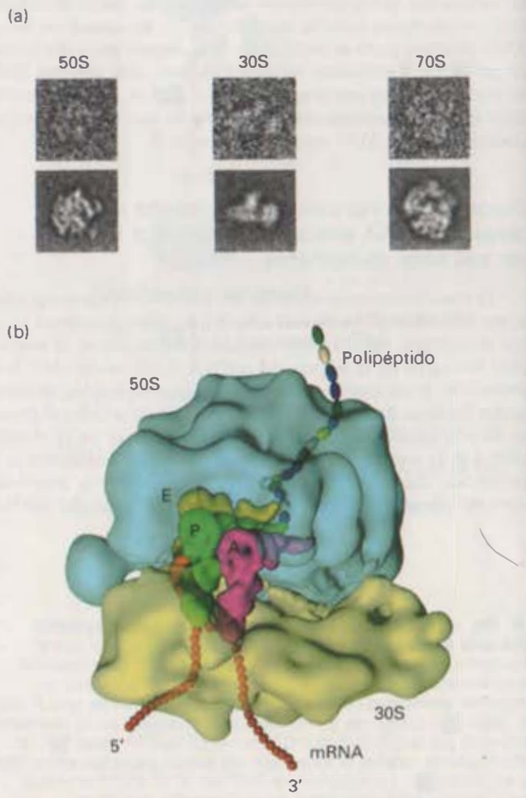
bosoma como un complejo ternario en asociación con EF1α·GTP y se vuelve a unir al sitio *A*, denominado así porque es donde se une el tRNA *a*minoacilado (paso 1). Si el anticodón del aminoacil-tRNA entrante (el segundo) forma pares de bases correctos con el segundo codón del mRNA, el GTP del EF1α·GTP asociado se hidroliza. La hidrólisis del GTP promueve un cambio conformacional en el ribosoma que conduce a una unión fuerte del aminoacil-tRNA en el sitio A y libera el complejo EF1α·GDP resultante (paso 2). Este cambio conformacional también posiciona el extremo 3' aminoacilado del tRNA en el sitio A en una proximidad cercana al extremo 3' del Met- $tRNA_i^{Met}$ en el sitio P. La hidrólisis del GTP, y por ende la unión fuerte, no ocurre si el anticodón del aminoacil-tRNA entrante no puede formar pares de bases con el codón en el sitio A. En este caso, el complejo ternario se difunde lejos, dejando un sitio A vacío que puede asociar otro complejo aminoacil tRNA- EF1α·GTP hasta que un tRNA correctamente apareado sea unido. Este fenómeno contribuye a la fidelidad con la cual se carga el aminoacil-tRNA correcto en el sitio A.

Con el Met- $tRNA_i^{Met}$ iniciador en el sitio P y el segundo aminoacil-tRNA fuertemente unido en el sitio A, el grupo α–amino del segundo aminoácido reacciona con la metionina "activada" (unida por un éster) sobre el tRNA iniciador formando un enlace peptídico (fig. 4-26, paso 3; véanse figs. 4-19 y 4-21). La *reacción peptidiltransferasa* es catalizada por el rRNA mayor, el cual orienta precisamente los átomos interactuantes, permitiendo que la reacción continúe. La capacidad catalítica del rRNA mayor en las bacterias ha sido demostrada por la eliminación cuidadosa de la vasta mayoría de las proteínas de la subunidad ribosómica mayor. El rRNA 23S bacteriano casi puro puede catalizar una reacción peptidiltransferasa entre análogos de tRNA aminoacilados y peptidil-tRNA. Evidencias posteriores para el papel catalítico del rRNA mayor en la síntesis de proteínas proviene de estudios de cristalografía que demostraron que no yacen proteínas cerca del sitio de síntesis del enlace peptídico en la estructura cristalina de la subunidad mayor bacteriana.

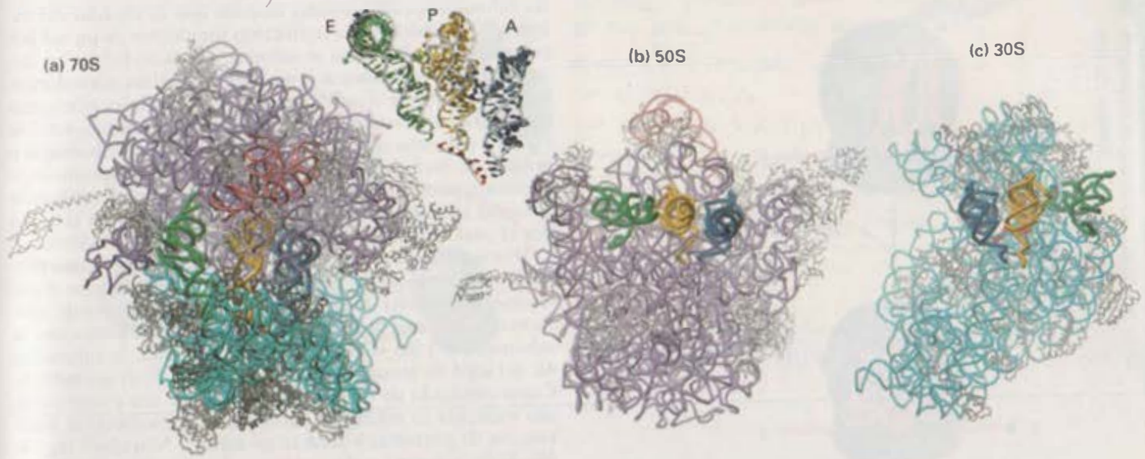
Siguiendo el proceso de síntesis peptídica, el ribosoma se desplaza a lo largo del mRNA a una distancia equivalente a un codón. Este paso de translocación es promovido por la hidrólisis del GTP en el EF2·GTP eucarionte. Como resultado de la translocación, el $tRNA_i^{Met}$, ya sin la metionina activada, se desplaza hacia un sitio E (de salida) sobre el ribosoma; al mismo tiempo, el segundo tRNA, ahora unido covalentemente a un dipéptido (un peptidil-tRNA), se mueve al sitio P (fig. 4-26, paso 4). Por lo tanto, la translocación retorna a la conformación del ribosoma al estado en el cual el sitio A está abierto y es capaz de aceptar otro tRNA aminoacilado acomplejado con EF1α·GTP, comenzando así otro ciclo de elongación de la cadena.

La repetición del ciclo de elongación descrito en la figura 4-26 adiciona un aminoácido a la vez al extremo C-terminal de un polipéptido creciente dirigido por la secuencia de mRNA hasta que encuentra un codón de terminación. En los ciclos siguientes el cambio conformacional que ocurre en el paso 2 expulsa el tRNA no acilado del sitio E. A medida que la cadena polipeptídica naciente se vuelve más larga, la misma es ensartada a través de un canal en la subunidad ribosómica mayor, saliendo a una posición del lado opuesto que interactúa con la subunidad menor (fig. 4-27).

Las localizaciones de los tRNA unidos en los sitios A, P y E son visibles en la estructura cristalina del ribosoma bacteriano determinada recientemente (fig. 4-28). también es visible el apareamiento de bases entre los tRNA en los sitios A y P con sus respectivos codones en el mRNA (véase fig. 4-28, *inserto*). Un híbrido RNA-RNA de sólo tres pares de bases no es estable en condiciones fisiológicas. Sin embargo, múltiples interacciones entre los rRNA mayor y menor y los dominios generales de los tRNA (p. ej., los bucles D y TψCG) estabilizan los tRNA en los sitios A y P, mientras otras interacciones RNA-RNA detectan el apareamiento correcto codón-anticodón, asegurando que el código genético sea leído apropiadamente.



▲ **Fig. 4-27. Modelo de baja resolución del ribosoma 70S de *E. coli*.** (a) Los paneles de la parte superior muestran imágenes por microscopia crioelectrónica de los ribosomas 70S y las subunidades 50S y 30S. Los paneles inferiores muestran promedios obtenidos por computadora de muchas docenas de imágenes en la misma orientación. (b) Modelo de un ribosoma 70S basado en imágenes derivadas por computación y estudios de entrecruzamientos químicos. Tres tRNA superpuestos en los sitios A (rosado), P (verde) y E (amarillo). La cadena polipeptídica naciente oculta en un túnel en la subunidad ribosómica mayor aparece cerca del tallo aceptor del tRNA en el sitio P. (Véase I. S. Gabashvili et al., 2000, *Cell* 100:537; cortesía de Frank J.)



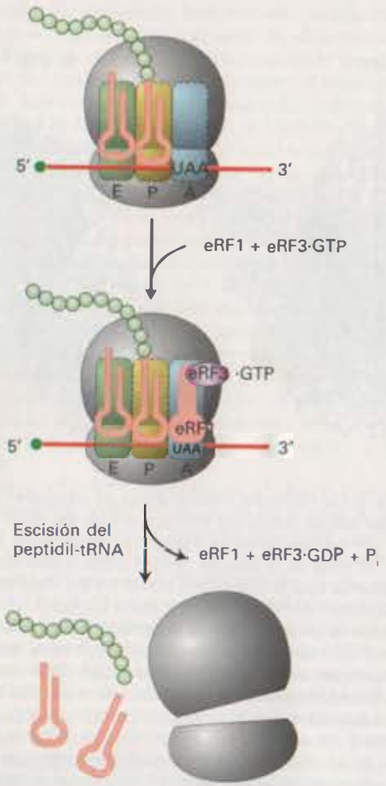
▲ **Fig. 4-28. Estructura del ribosoma 70S de T. thermophilus determinada mediante cristalografía de rayos X.** (a) Modelo total del ribosoma total visto desde el lado diagramado en la figura 4-26 con la subunidad mayor sobre la parte superior y la subunidad menor en la parte inferior. Los tRNA posicionados en los sitios A (azul), P (amarillo) y E (verde) son visibles en la interfaz entre las subunidades con sus bucles anticodón apuntan hacia abajo en la subunidad menor. El rRNA 16S es color turquesa; el rRNA 23S, violeta; el rRNA 5S, rosado; el mRNA, rojo; las proteínas ribosómicas pequeñas, gris oscuro; y las proteínas ribosómicas grandes, gris claro. Nótese que las proteínas ribosómicas están localizadas principalmente sobre la superficie del ribosoma y los RNA en el interior. (b) Vista de la subunidad mayor rotada 90° respecto de la horizontal de la vista en (a) que muestra la cara que interactúa con la subunidad menor. El bucle del anticodón del tRNA apunta hacia afuera de la página. En el ribosoma intacto, éstas se extienden en la subunidad menor donde los anticodones de los tRNA en los sitios A y P forman pares de bases con los codones en el mRNA. (c) Vista de la cara de la subunidad ribosómica menor que interactúa con la subunidad mayor en (b). Aquí los bucles de los anticodones del tRNA apuntan hacia la página. Los bucles TΨCG y los tallos aceptores se extienden fuera de la página y el extremo 3'CCA del tRNA en los sitios A y P hacia abajo. Nótese la oposición cercana del tallo aceptor de los tRNA en los sitios A y P, los cuales permiten que el grupo amino del tRNA acilado en el sitio A reaccione con el carboxilo-C terminal del peptidil-tRNA en el sitio P (véase fig. 4-19). En el ribosoma intacto, éstos se localizan en el sitio activo de la peptidiltransferasa de la subunidad mayor. (Adaptado de M. M. Yusupov et al., 2000, *Science* 292:883.)

La traducción es finalizada por factores de liberación una vez que se alcanza un codón de terminación

La fase final de la traducción, al igual que la iniciación y la elongación, requiere señales moleculares muy específicas que deciden el destino del complejo mRNA-ribosoma-peptidil-tRNA. Se han descubierto dos tipos de factores de liberación (RF). El eRF1 eucarionte, cuya forma es similar a la de los tRNA, aparentemente actúa uniéndose al sitio A del ribosoma y reconoce directamente el codón de terminación. Al igual que algunos de los factores de iniciación y de elongación ya tratados, el segundo factor de liberación, eRF3, es una proteína de unión a GTP. El eRF3·GTP actúa en concierto con eRF1 para promover la escisión del peptidil-tRNA, liberando así la cadena proteica completa (fig. 4-29). Las bacterias tienen dos factores de liberación (RF1 y RF2) que funcionan análogamente a eRF1 y un factor que une GTP (RF3) que es análogo a eRF3.

Después de su liberación de los ribosomas, la proteína recién sintetizada se pliega en su conformación tridimensional nativa, un proceso facilitado por otras proteínas denominadas chaperonas (cap. 3). Luego, factores de liberación adicionales promueven la disociación del ribosoma, y liberación de las subunidades, del mRNA y del tRNA terminal para otra ronda de traducción.

Ahora podemos ver que en cada etapa de la traducción participan una o más proteínas de unión a GTP. Estas proteínas pertenecen a la superfamilia de las GTPasas que actúan como interruptores de las proteínas que alternan entre la forma activa con el GTP unido y la forma inactiva con el GDP unido (véase fig. 3-29). Se cree que la hidrólisis del GTP unido provoca un cambio conformacional en la propia GTPasa o en otras proteínas asociadas que son críticas para diferentes procesos moleculares. Por ejemplo, en la iniciación de la traducción, la hidrólisis de eIF2·GTP a eIF2·GDP evita rastreos posteriores del mRNA una vez encontrado el sitio de inicio y permite la unión de la subunidad ribosómica mayor a la subunidad menor (véase fig. 4-25, paso 3). Asimismo, la



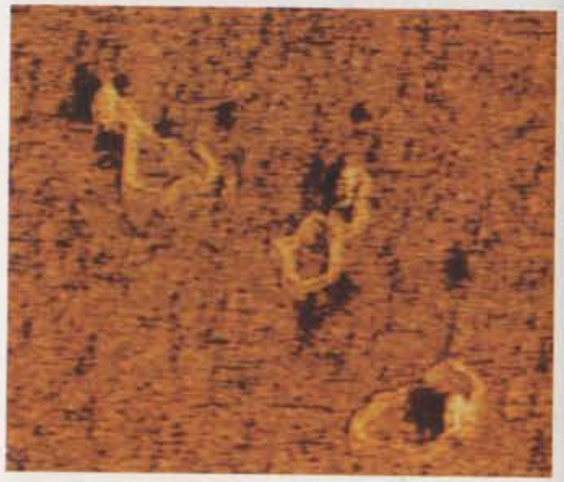
▲ Fig. 4-29. Terminación de la traducción en los eucariontes. Cuando un ribosoma que está formando una cadena proteica naciente alcanza un codón de terminación (UAA, UGA, UAG), el factor de liberación eRF1 ingresa en el complejo ribosómico, probablemente en el sitio A o cerca de él junto con el eRF3·GTP. La hidrólisis del GTP unido está acompañada por la escisión de la cadena peptídica desde el tRNA en el sitio P y la liberación de los tRNA y las dos subunidades ribosómicas.

hidrólisis de EF2·GTP a EF2·GDP durante la elongación de la cadena conduce a la translocación del ribosoma a lo largo del mRNA (véase fig. 4-26, paso 4).

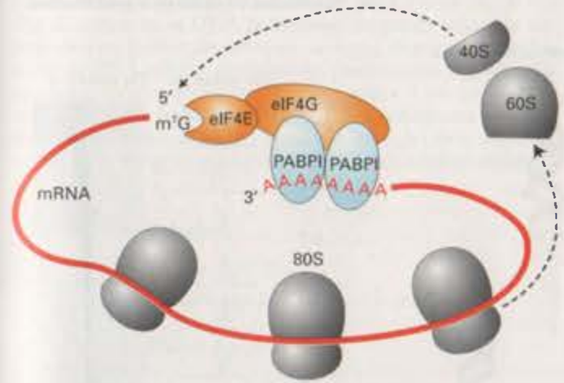
Los polisomas y el reciclaje rápido de los ribosomas aumentan la eficiencia de la traducción

Como ya se dijo, para producir una proteína de tamaño medio la traducción de una molécula única de mRNA eucarionte tarda 30-60 segundos. Dos fenómenos incrementan en forma significativa la velocidad global de la síntesis proteica por las células: la traducción simultánea de una molécula única de mRNA por múltiples ribosomas y el reciclaje rápido de las subunidades ribosómicas después que se separan del extremo 3' del mRNA. La traducción simultánea de un mRNA por múltiples ribosomas se advierte con facilidad en las microfotografías electrónicas y mediante el análisis por sedimentación, que revela el mRNA adosado a múltiples ribosomas que portan cadenas peptídicas nacientes en crecimiento. Se observó que estas estructuras, denominadas polirribosomas o *polisomas*, eran circulares en las micrografías electrónicas de algunos tejidos. Estudios siguientes con levaduras explicaron la forma circular de los polirribosomas y sugirieron el modo por el cual se reciclan los ribosomas de manera eficiente.

Estos estudios revelaron que múltiples copias de una proteína citosólica que se encuentra en todas las células eucariontes, la *proteína de unión a poli (A)* (PABPI), puede interactuar tanto con la cola poli (A) del mRNA como con la subunidad 4G del eIF4 de levadura. Más aún, la subunidad 4E del eIF4 de levadura se une al extremo 5' de un mRNA. Como resultado de estas interacciones, los dos extremos de una molécula de mRNA se pueden acercar mediante la intervención de proteínas y formar un mRNA "circular" (fig. 4-30). Debido a que los dos extremos de un polisoma están relativamente cerca, las subunidades ribosómicas que se sueltan del extremo 3' se posicionan cerca del extremo 5', facilitando la reiniciación mediante la interacción de la subunidad 40S con el eIF4 unida al casquete 5'. El camino circular descrito en la figura 4-31, que puede funcionar en muchas células eucariontes, podría potenciar el reciclaje de los ribosomas y, por ende, aumentar la eficiencia de la síntesis proteica.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 4-30 Un mRNA eucarionte forma una estructura circular mediante las interacciones de tres proteínas. En presencia de la proteína de unión a poli(A) (PABPI) purificada, los eIF4E, eIF4G y los mRNA eucariontes forman estructuras circulares, visibles en esta microfotografía electrónica de campo de fuerza. En estas estructuras, las interacciones proteína-proteína y proteína-mRNA forman un puente entre los extremos 5' y 3' del mRNA como se diagrama en la figura 4-31. (Cortesía de A. Sachs.)



◀ Fig. 4-31. Modelo de la síntesis proteica sobre los polisomas circulares y reciclaje de las subunidades ribosómicas. Múltiples ribosomas individuales pueden traducir simultáneamente un mRNA eucarionte, como se muestra aquí en una forma circular estabilizada por interacciones entre proteínas unidas a los extremos 3' y 5'. Cuando un ribosoma completa la traducción y se disocia del extremo 3', las subunidades separadas pueden hallar rápidamente el casquete 5' cercano (m^7G) e inician otra ronda de síntesis.

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación general: Ciclo de vida de un mRNA

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 4.5

Pasos de la síntesis de proteínas sobre los ribosomas

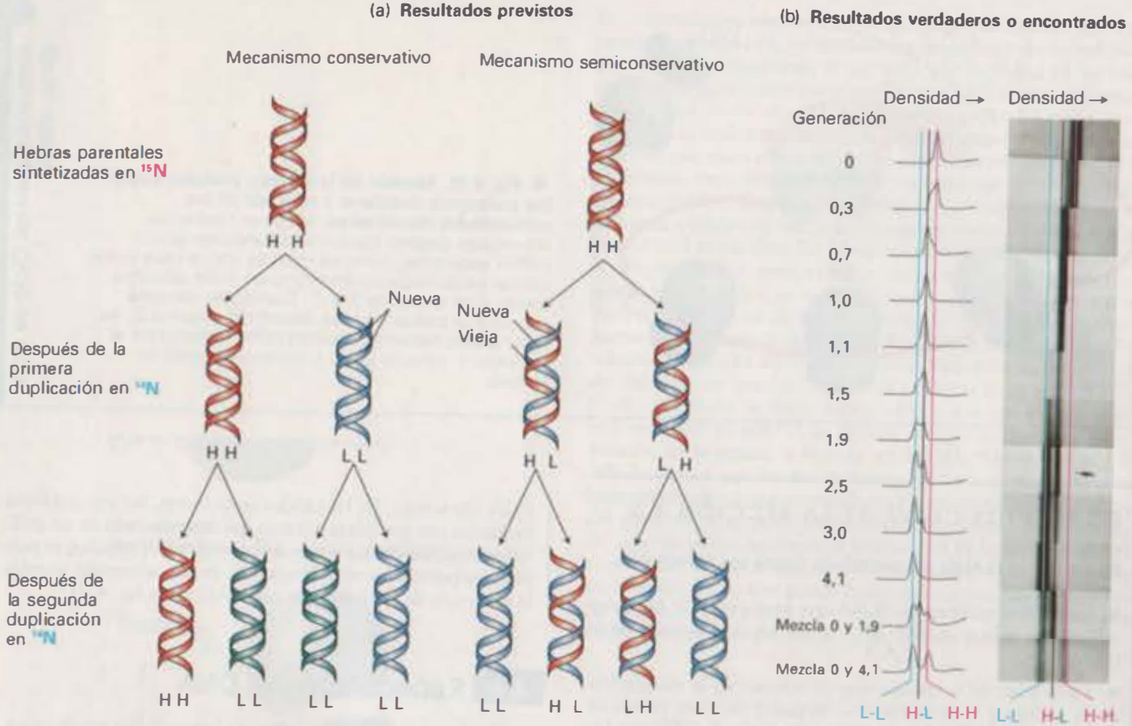
- De las dos metioninas-tRNA que se encuentran en todas las células, sólo una ($tRNA_i^{Met}$) actúa en la iniciación de la traducción.
- Cada paso de la traducción –la iniciación, la elongación de la cadena y la terminación– requiere factores proteicos específicos incluidas las proteínas de unión a GTP que hidrolizan el GTP unido a GDP cuando un paso ha sido completado con éxito.
- Durante la iniciación, las subunidades ribosómicas se ensamblan cerca del sitio de inicio de la traducción de una molécula de mRNA y el tRNA que porta la metionina amino-terminal (Met-$tRNA_i^{Met}$) apareada con el codón de inicio (fig. 4-25).
- La elongación de una cadena incluye un ciclo repetitivo de cuatro pasos: la unión laxa de un aminoacil-tRNA entrante al sitio A sobre el ribosoma; la unión fuerte del aminoacil-tRNA correcto al sitio A acompañado por la liberación del tRNA previamente utilizado del sitio E; la transferencia de la cadena peptidil creciente al aminoácido entrante catalizada por el rRNA grande; y la translocación del ribosoma al codón siguiente, moviendo de esta forma el peptidil-tRNA del sitio A al sitio P y el tRNA ahora no acilado, del sitio P al sitio E (véase fig. 4-26).
- En cada ciclo de elongación de la cadena, el ribosoma sufre dos cambios conformacionales monitorizados por las proteínas de unión a GTP. El primero permite una unión fuerte del aminoacil-tRNA entrante al sitio A y la expulsión de un tRNA desde el sitio E, y el segundo conduce a la translocación.
- La terminación de la traducción es llevada a cabo por dos tipos de factores de terminación: los que reconocen codones de terminación y los que promueven la hidrólisis de peptidil-tRNA (véase fig. 4-29).
- La eficiencia de la síntesis de proteína se incrementa con la traducción simultánea de un único mRNA mediante múltiples ribosomas. En las células eucariontes, las interacciones mediadas por proteínas acercan los dos extremos de un polirribosoma, juntándolos y promoviendo así el reciclaje rápido de las subunidades ribosómicas, las cuales aumentan además la eficiencia de la síntesis de proteína (véase fig. 4-31).

4.6 Replicación del DNA

Ahora que hemos visto cómo la información genética codificada en las secuencias de nucleótidos del DNA es traducida en la estructura de proteínas que llevan a cabo la mayoría de las funciones celulares, podemos apreciar la necesidad del copiado preciso de la secuencia del DNA durante la replicación (véase fig. 4-1, paso 4). El apareamiento regular de las bases en la estructura de doble hélice del DNA sugirió a Watson y Crick que las nuevas hebras de DNA son sintetizadas utilizando las hebras existentes (*parentales*) como moldes para la formación de las nuevas hebras *hijas* complementarias a las hebras parentales.

Este modelo teórico del molde de bases apareadas pudo proceder tanto por un mecanismo *conservativo* como por uno *semiconservativo*. En un mecanismo conservativo, las dos hebras hijas podrían formar una nueva molécula de DNA de hebra doble (*dúplex o bicatenario*) y el DNA bicaternario parental permanecería intacto. En un mecanismo semiconservativo, las hebras parentales están permanentemente separadas y cada una forma una molécula dúplex mediante apareamiento de bases con la hebra hija. Las evidencias definitivas de que el DNA bicatenario se replica mediante un mecanismo semiconservativo provinieron de un experimento, ahora clásico, conducido por M. Melselson y W. F. Stahl, representado en la figura 4-32.

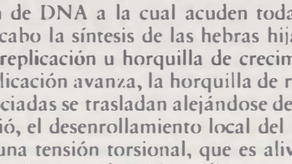
Por lo tanto, el copiado de una hebra molde de DNA a una hebra complementaria es una característica común de la replicación y de la transcripción del DNA en RNA. En ambos casos, la información en el molde se preserva. En algunos virus, las moléculas de RNA hebra simple funcionan como moldes para la síntesis de hebras complementarias de RNA o DNA. Sin embargo, la vasta mayoría del RNA y el DNA en las células se sintetiza a partir de DNA bicatenario preexistente.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 4-32 El experimento de Meselson-Stahl demostró que el DNA se replica por un mecanismo semiconservativo. En este experimento, inicialmente se hicieron crecer células de *E. coli* en un medio que contenía sales de amonio preparadas con nitrógeno "pesado" (^{15}N) hasta marcar todo el DNA celular. Después de que se transfirieron todas las células a un medio con el isótopo normal "liviano" (^{14}N), se eliminaron las muestras periódicamente desde los cultivos y se analizó el DNA de cada muestra mediante centrifugación en gradiente de densidad (véase fig. 5-37). Esta técnica puede separar en bandas distintas dúplex pesado-pesado (H-H), liviano-liviano (L-L) y pesado-liviano (H-L). (a) Composición esperada de las moléculas dúplex hijas sintetizadas a partir del DNA marcado con ^{15}N después de que las células de *E. coli* son cambiadas a un medio que contiene ^{14}N, si la replicación del DNA ocurre según un mecanismo conservativo o semiconservativo. Las hebras parentales pesadas (H) están en rojo; las hebras livianas (L) sintetizadas después del cambio al medio con ^{14}N están en azul. Nótese que el mecanismo conservativo nunca genera DNA H-L y que el mecanismo semiconservativo nunca genera DNA H-H pero sí DNA H-L durante la segunda y las siguientes duplicaciones. Con ciclos de replicación adicionales, las hebras (H) marcadas con ^{15}N del DNA original se diluyen, de manera tal que el vasto seno del DNA consistiría en dúplex L-L con ambos mecanismos. (b) Patrones verdaderos de bandeo de DNA sujeto a centrifugación por gradiente de densidad en equilibrio antes y después de cambiar las células de *E. coli* marcadas con ^{15}N a un medio con ^{14}N. Las bandas de DNA son visualizadas bajo luz ultravioleta y fotografiadas. Las improntas sobre la izquierda son una medida de la densidad de la señal fotográfica, y en consecuencia la concentración de DNA, a lo largo de las células centrifugadas de izquierda a derecha. El número de generaciones (más hacia la izquierda) luego del cambio al medio que contiene ^{14}N se determina mediante conteo de la concentración de las células de *E. coli* en el cultivo. Este valor corresponde al número de ciclos de replicación que habían ocurrido al tiempo en que se tomó cada muestra. Después de una generación de crecimiento, todo el DNA extraído tuvo la densidad de DNA H-L. Después de 1,9 generaciones, aproximadamente la mitad del DNA tuvo la densidad de DNA H-L; la otra mitad tuvo la densidad de DNA L-L. Con generaciones adicionales, una fracción cada vez más grande de DNA extraído consistió en dúplex L-L; los dúplex H-H nunca aparecieron. Estos resultados corresponden a los patrones previstos para el mecanismo de replicación semiconservativa descrito en (a). Las dos células centrifugadas de la parte inferior contienen mezclas de DNA H-H y DNA aislado en las generaciones 1,9 y 4,1 para mostrar claramente las posiciones del DNA H-H, H-L y L-L en el gradiente de densidad. (Parte (b) de M. Meselson y F. W. Stahl, 1958, *Proc Natl Acad Sci USA* 44:671.)

La DNA polimerasa requiere un cebador para iniciar la replicación

Análogamente al RNA, el DNA se sintetiza a partir de precursores de desoxinucleósidos 5'-trifosfato (dNTP). También al igual que la síntesis de RNA, la síntesis de DNA siempre procede en la dirección 5'→3' debido a que el crecimiento de la cadena resulta de la formación de una enlace fosfoéster entre el oxígeno 3' de una hebra creciente y el fosfato α de un dNTP (véase fig. 4-9). Como ya analizamos, una RNA polimerasa puede encontrar un sitio de inicio de la transcripción sobre el DNA bicatenario e iniciar la síntesis de un RNA complementario a la hebra molde de DNA (véase fig. 4-10). Por el contrario, la DNA polimerasa no puede iniciar la síntesis de una cadena de novo; en su lugar, requiere una hebra corta de DNA o RNA preexistente, denominada cebador, para comenzar el crecimiento de una cadena. Con un cebador apareado a una hebra molde, una DNA polimerasa adiciona desoxinucleótidos al grupo hidroxilo libre del extremo 3' de un cebador dirigido por la secuencia de una hebra molde:



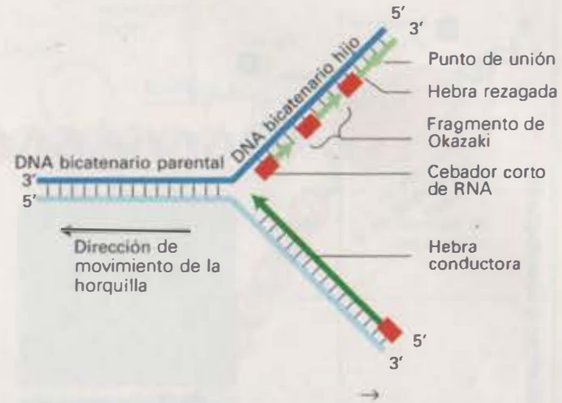
Cuando el RNA es el cebador la hebra hija que se forma es RNA en el extremo 5' y DNA en el extremo 3'.

El DNA bicatenario se desenrolla y las hebras hijas se forman en la horquilla de replicación del DNA

Para que un DNA bicatenario funcione como un molde durante la replicación, las dos hebras enrolladas entre sí deben ser desenrolladas, o desplegadas, para que las bases estén disponibles para el apareamiento con las bases de los dNTP que son polimerizados en las nuevas hebras hijas sintetizadas. Este desenrollamiento de las hebras hijas parentales lo realizan las helicasas, comenzando en segmentos únicos en las moléculas de DNA denominados *orígenes de replicación*, o simplemente *orígenes*. Las secuencias de nucleótidos de los orígenes de diferentes organismos varían mucho, aunque suelen contener secuencias ricas en A·T. Una vez que las helicasas han desenrollado el DNA parental en un origen, una RNA polimerasa especializada denominada primasa forma un cebador corto de RNA complementario a las hebras moldes desenrolladas. El cebador, aun apareado a su hebra de DNA complementaria, es luego elongado por una DNA polimerasa, formando por lo tanto una nueva hebra hija.

La región de DNA a la cual acuden todas las proteínas que llevan a cabo la síntesis de las hebras hijas se denomina **horquilla de replicación** u **horquilla de crecimiento**. A medida que la replicación avanza, la horquilla de replicación y las proteínas asociadas se trasladan alejándose del origen. Como ya se describió, el desenrollamiento local del DNA bicatenario produce una tensión torsional, que es aliviada por la topoisomerasa I. Para que la DNA polimerasa se traslade a lo largo y copie un DNA bicatenario, la helicasa debe desenrollar secuencialmente la hebra doble y las topoisomerasas deben eliminar los superenrollamientos que se forman.

La complicación principal en la operación de una horquilla de replicación de DNA surge a partir de dos propiedades: las dos hebras del DNA bicatenario son antiparalelas y las DNA polimerasas (al igual que las RNA polimerasas) pueden adicionar nucleotidos a las nuevas hebras crecientes sólo en la dirección 5'→3'. La síntesis de una hebra hija, denominada hebra conductora, puede continuar a partir de un solo cebador de RNA en la dirección 5'→3', *la misma dirección que el movimiento de la horquilla de replicación* (fig. 4-33). El problema aparece en la síntesis de la otra hebra hija, denominada **hebra rezagada**.

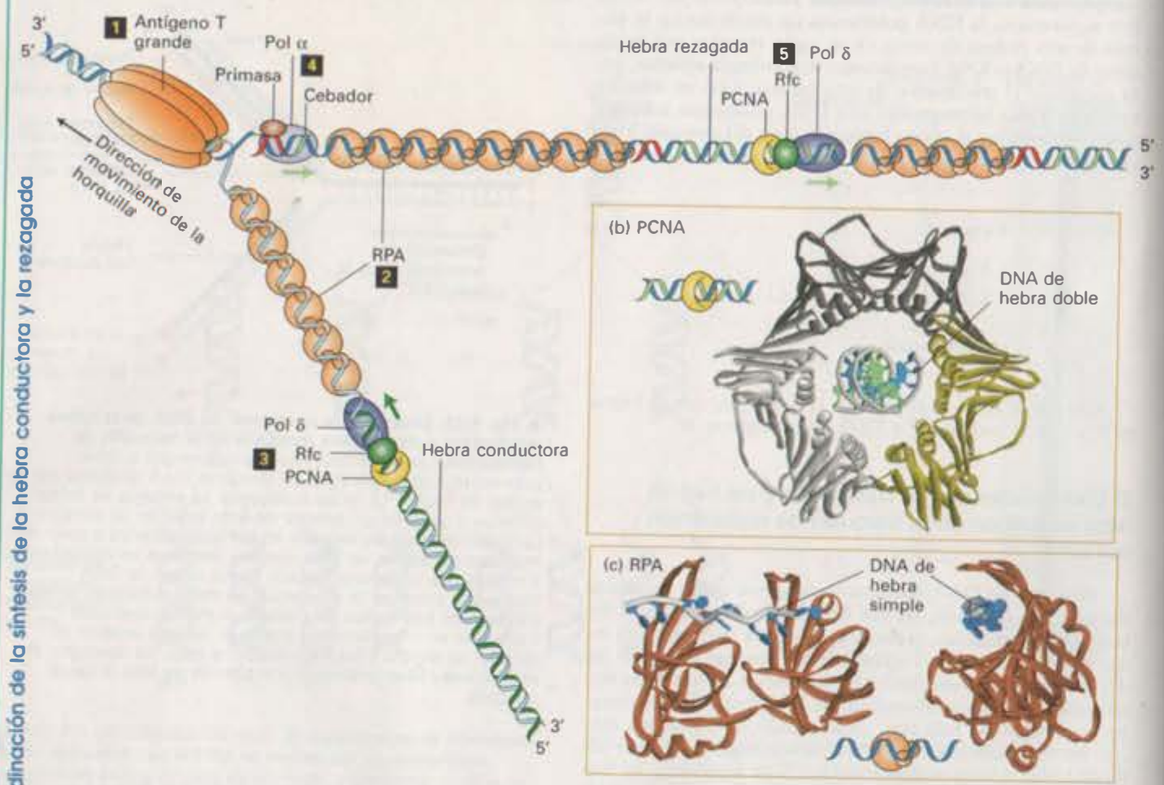


▲ Fig. 4-33. Esquema de la síntesis de DNA de la hebra conductora y de la hebra rezagada en la horquilla de replicación. Los nucleótidos son agregados por la DNA polimerasa a cada hebra hija en dirección 5'→3' (indicada por las puntas de flecha). La hebra conductora se sintetiza en forma continua a partir de un cebador de RNA (rojo) en su extremo 5'. La hebra rezagada se sintetiza en forma discontinua a partir de múltiples cebadores de RNA que son formados periódicamente a medida que se desenrolla cada nueva región de DNA bicatenario parental. La elongación de estos cebadores produce inicialmente fragmentos de Okazaki. A medida que cada fragmento en crecimiento se acerca al cebador anterior, el cebador se elimina y los fragmentos se ligan. La repetición de este proceso lleva finalmente a la síntesis de toda la hebra rezagada.

Como el crecimiento de la hebra rezagada debe seguir la dirección 5'→3', el copiado de su hebra molde debe, de alguna manera, ocurrir en la dirección *opuesta* al movimiento de la horquilla de replicación. Una célula realiza esto sintetizando un nuevo cebador cada cientos de bases o hasta la segunda hebra parental, a medida que la hebra es expuesta por el desenrollamiento. Cada uno de estos cebadores, apareados a su hebra molde, se elonga en la dirección 5'→3', formando segmentos discontinuos denominados **fragmentos de Okazaki** por su descubridor, Reiji Okazaki (véase fig. 4-33). El cebador de RNA de cada fragmento de Okazaki se elimina y se reemplaza por una cadena de DNA creciente a partir del fragmento de Okazaki vecino; por último una enzima denominada DNA *ligasa* une los fragmentos adyacentes.

La helicasa, la primasa, la DNA polimerasa y otras proteínas participan en la replicación del DNA

El entendimiento detallado de las proteínas de los eucariontes que participan en la replicación del DNA provino en su gran mayoría de estudios con DNA virales pequeños, sobre todo del DNA SV40, un genoma circular de un virus pequeño que infecta a los monos. La figura 4-34 describe las múltiples proteínas que coordinan el copiado del DNA SV40 en la horquilla de replicación. Las proteínas ensambladas en la horquilla de replicación ilustraron el concepto de las ma-



▲ Fig. 4-34. Modelo de una horquilla de replicación del DNA SV40 y las proteínas ensambladas. (a) un hexámero del antígeno T grande (1), una proteína viral, que funciona como una helicasa para desenrollar las hebras de DNA parentales. Múltiples copias de la proteína heterodimérica RPA se unen a las regiones de hebra simple del molde parental desenrollado por el antígeno T grande (2). La hebra conductora es sintetizada por un complejo de DNA polimerasa δ (Pol δ), PCNA y Rfc (3). Los cebadores para la síntesis de la hebra rezagada (RNA, rojo; DNA, celeste) son sintetizados por un complejo de DNA polimerasa α (Pol α) y primasa (4). El extremo 3' de cada cebador sintetizado por la Pol α-primasa es luego unido por el complejo PCNA-Rfc - Pol δ, el cual extiende el cebador y sintetiza la mayoría de cada fragmento de Okazaki (5). Véase el texto para más detalles. (b) Las tres subunidades de PCNA, mostradas en diferentes colores, forman una estructura circular con un hueco central a través del cual pasa el DNA de hebra doble. En el centro de un modelo de cintas del trímero PCNA se muestra un diagrama de DNA (c) La subunidad grande de RPA contiene dos dominios que unen DNA de hebra simple. A la izquierda, los dos dominios de unión a DNA de RPA se muestran en perpendicular al esqueleto de DNA (esqueleto blanco con bases azules). Nótese que la hebra simple de DNA se extiende con las bases expuestas, una conformación óptima para la replicación por una DNA polimerasa. A la derecha, la vista es debajo de la longitud de la hebra simple de DNA, revelando cómo las hebras β de RPA se envuelven alrededor del DNA. (Parte (a) adaptado de S. J. Flint et al., 2000, Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control, ASM Press: parte (b) después de J. M. Gulbis et al., 1996, *Cell* 87:297; y parte (c) después de A. Bochkarev et al., 1997, *Nature* 385:176.)

quinarias moleculares introducido en el capítulo 3. Estos complejos de múltiples componentes le permiten a la célula llevar a cabo una secuencia ordenada de eventos que realizan las funciones celulares esenciales.

En la maquinaria molecular que replica el DNA SV40, un hexámero de una proteína viral denominada *antígeno-T grande* desenrolla las hebras parentales en la horquilla de replicación. La célula huésped proporciona todas las otras proteínas involucradas en la replicación del DNA SV40. Los cebadores para las hebras conductora y rezagada de DNA son sintetizados por un complejo de primasa, el cual sintetiza un cebador corto de RNA, y una *DNA polimerasa* α (Pol α), que extiende el RNA cebador con desoxinucleótidos, formando un cebador mixto RNA-DNA.

El cebador es extendido en la hebra hija de DNA por la *DNA polimerasa* δ (Pol δ), la cual es menos probable que cometa errores durante el copiado de la hebra molde que la Pol α. La Pol δ forma un complejo con el *Rfc* (*f*actor C de *r*eplicación) y con *PCNA* (antígeno nuclear de *p*roliferación *c*elular), el cual desplaza el complejo primasa-Pol α siguiendo la síntesis del cebador. Como se ilustra en la figura 4-34b, el PCNA es una proteína homotrimérica que tiene un hueco central a través del cual pasa el dúplex de DNA hija, previniendo así que el complejo PCNA-Rfc-Pol δ se disocie del molde.

Luego de que el DNA parental se separa en moldes de hebra simple en la horquilla de replicación, se unen múltiples copias de RPA (*P*roteína *A* de *r*eplicación), una proteína heterotrimérica (fig. 4-34c). La unión de RPA mantiene el molde en una conformación uniforme óptima para el copiado por la DNA polimerasa. Las proteínas RPA unidas son desplazadas desde las hebras parentales por las Pol α y la Pol δ a medida que sintetizan las hebras complementarias apareadas con las hebras parentales.

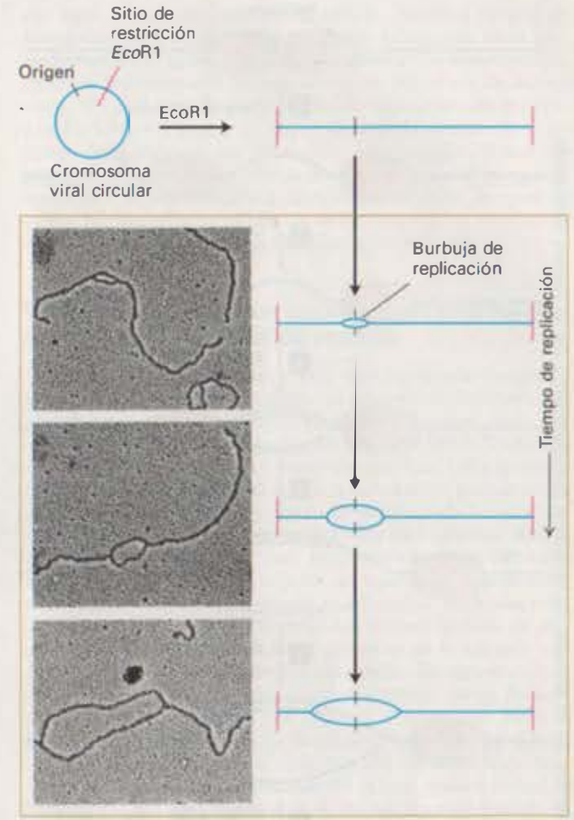
En la figura 4-34 no se describen varias de las proteínas eucariontes que funcionan en la replicación del DNA. Una topoisomerasa se asocia con la DNA parental delante de la helicasa para eliminar la tensión de torsión introducida por el desenrollamiento de las hebras parentales. La ribonucleasa H y Fen 1 eliminan los ribonucleótidos en los extremos 5' de los fragmentos de Okazaki; estos son reemplazados por desoxinucleótidos adicionados por la DNA polimerasa δ a medida que se extiende. Sucesivamente los fragmentos de Okazaki se unen mediante la DNA ligasa a través de enlaces fosfoésteres estándares 5'→3'.

La replicación del DNA suele ocurir de manera bidireccional a partir de cada origen

Como se indica en las figuras 4-33 y 4-34, ambas hebras parentales que son expuestas por un desenrollamiento local en la horquilla de replicación son copiadas en hebras hijas. En teoría, la replicación del DNA a partir de un solo origen podría involucrar una horquilla de replicación que se mueve en una dirección. Alternativamente, dos horquillas de replicación podrían ensamblarse en un solo origen y luego moverse en direcciones opuestas, llevando a un *crecimiento bidireccional* de ambas hebras hijas. Varios tipos de experimentos, incluido el único que se muestra en la figura 4-35, proporcionaron evidencia temprana que avala la bidireccionalidad del crecimiento de la hebra.

El consenso general es que todas las células procariontes y eucariontes emplean un mecanismo bidireccional de replicación del DNA. En el caso del DNA SV40, la replicación es iniciada por la unión de dos helicasas hexaméricas de antígeno T grande al único origen del SV40 y el ensamblaje de otras proteínas que forman dos horquillas de replicación. Luego éstas se alejan del origen del SV40 en direcciones opuestas y la síntesis de la hebra conductora y rezagada ocurre en ambas horquillas. Como se muestra en la figura 4-36, la horquilla de replicación de la izquierda extiende la síntesis del DNA en la dirección hacia la izquierda; similarmente, la horquilla de replicación de la derecha extiende la síntesis en la dirección hacia la derecha.

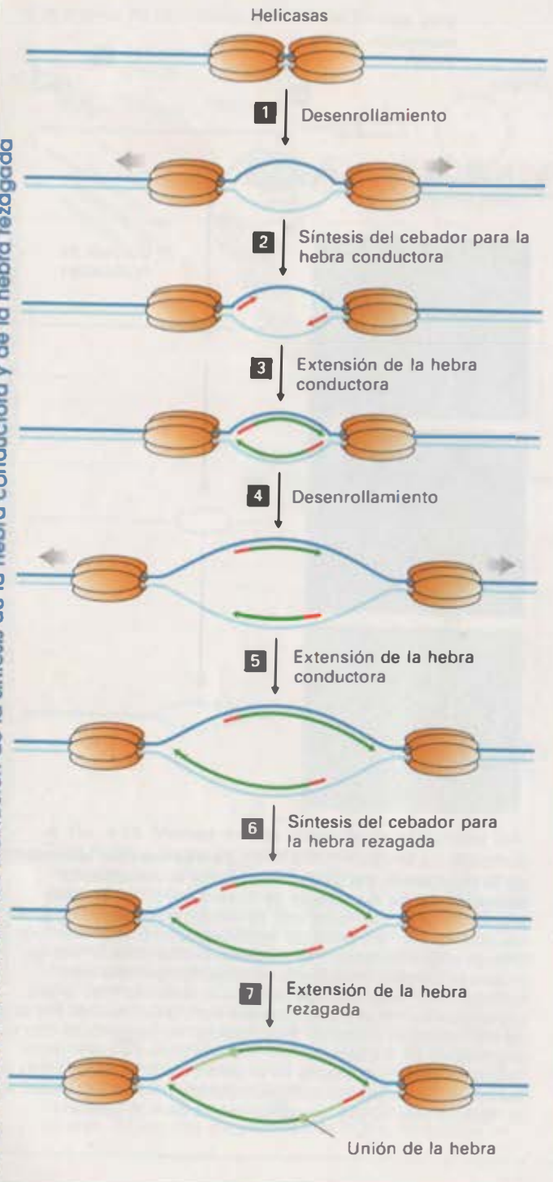
A diferencia del DNA SV40, las moléculas de DNA cromosómico eucariontes contienen múltiples orígenes de replicación separados por diez a cientos de kilobases. Una proteína de seis subunidades denominada ORC, por complejo de reconocimiento del origen, se une a cada origen y se asocia con otras proteínas necesarias para cargar las helicasas celulares compuestas de seis proteínas *MCM* homólogas. Dos helicasas MCM opuestas separan las hebras parentales en el origen, con las proteínas RPA unidas a la hebra simple de



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 4-35 La microscopia electrónica de la replicación del DNA SV40 indica el crecimiento bidireccional de las hebras de DNA a partir de un solo origen. El DNA viral replicante de células infectadas con SV40 fue cortado con la enzima de restricción EcoRI, que reconoce un sitio en el DNA circular. Las microfotografías electrónicas de muestras tratadas muestran una colección de moléculas cortadas con "burbujas" de replicación cada vez mas largas, cuyos centros están a una distancia constante de cada extremo de las moléculas cortadas. Este hallazgo es consistente con el crecimiento de las cadenas en dos direcciones a partir de un origen en común localizado en el centro de la burbuja, como se ilustra en los diagramas correspondientes. (Véase G. C. Fareed et al., 1992, *J. Virol.* 10:484; fotografías cortesía de N. P. Salzman.)

DNA resultante. Se piensa que la síntesis de los cebadores y los pasos siguientes en la replicación del DNA celular son análogos a los de la replicación del DNA SV40 (véanse figs. 4-34 y 4-36).

La replicación del DNA celular y otros eventos que llevan a la proliferación de las células están fuertemente regulados, de manera tal que durante el desarrollo y el transcurso de la vida de un organismo se produzca el número apropiado de células constituyentes de cada tejido. Como en la transcripción de la mayoría de los genes, el control del paso de iniciación es el mecanismo primario para la regulación



◀ Fig. 4-36. Mecanismo de replicación bidireccional del DNA. La horquilla de replicación de la izquierda es comparable con la horquilla de replicación diagramada en la figura 4-34, que también muestra otras proteínas además del antígeno T grande (*arriba*). Dos helicasas antígenos T grandes hexaméricos se unen primero en el origen de replicación con orientaciones opuestas. Paso 1: Utilizando la energía proporcionada por la hidrólisis del ATP, las helicasas se mueven en direcciones opuestas, desenrollando el DNA parental y generando moldes hebra simple que son unidos por proteínas RPA. Paso 2: El complejo primasa-Pol α sintetiza cebadores cortos que se aparean a cada una de las hebras parentales separadas. Paso 3: Los complejos PCNA-Rfc-Pol δ reemplazan a los complejos primasa-Pol α y extienden los cebadores cortos, generando las hebras conductoras (verde oscuro) en cada horquilla de replicación. Paso 4: Las helicasas siguen desenrollando las hebras parentales y las proteínas RPA se unen a las nuevas regiones de hebra simple expuestas. Paso 5: Los complejos PCNA-Rfc-Pol δ luego extienden las hebras. Paso 6: Los complejos primasa-Pol α sintetizan cebadores para la síntesis de la hebra rezagada en cada horquilla de replicación. Paso 7: Los complejos PCNA-Rfc-Pol δ desplazan a los complejos primasa-Pol α y extienden los fragmentos de Okazaki de la hebra rezagada (verde claro), que finalmente se ligan a los extremos 5' de las hebras conductoras. La posición donde ocurre la ligación se representa con un círculo. La replicación continúa mediante desenrollamientos posteriores de la hebra parental y síntesis de las hebras conductoras y rezagadas como en los pasos 4-7. Aunque se describen como pasos individuales para mayor claridad, el desenrollamiento y la síntesis de las hebras conductoras y rezagadas ocurren simultáneamente.

de la replicación del DNA. La activación de la actividad helicasa de MCM, requerida para iniciar la replicación del DNA, está regulada por una proteincinasa específica denominada cinasa dependiente de ciclina de la fase S. Otra cinasa dependiente de ciclina regula aspectos adicionales de la proliferación celular, incluido el complejo proceso de la mitosis mediante el cual una célula eucarionte se divide en dos células hijas. En el capítulo 11 analizamos los diversos mecanismos regulatorios que determinan la velocidad de la división celular.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 4.6

Replicación del DNA

- En un DNA bicatenario parental, cada hebra, actúa como un molde para la síntesis de una hebra hija que permanece apareada por sus bases a la nueva hebra, formando un DNA bicatenario hijo (mecanismo semiconservativo). Las nuevas hebraas se forman en la dirección 5'→3'.
- La replicación comienza en una secuencia denominada origen. Cada molécula de DNA cromosómico en eucariontes contiene múltiples orígenes de replicación.
- Las DNA polimerasas, a diferencia de las RNA polimerasas, no puede desenrollar las hebras del DNA bicatenario y no pueden iniciar la síntesis de nuevas hebras complementarias a las hebras molde.
- En una horquilla de replicación, una hebra hija (la hebra conductora) es elongada continuamente. La otra hebra hija (la hebra rezagada) es formada como una serie de fragmentos de Okazaki discontinuos a partir de cebadores sintetizados cada algunos cientos de nucleótidos (fig. 4-33).
- Los ribonucleótidos en el extremo 5' de cada fragmento de Okazaki son eliminados y reemplazados por elongación del extremo 3' del próximo fragmento de Okazaki. Por último, fragmentos de Okazaki adyacentes son unidos por la DNA ligasa.
- Las helicasas utilizan la energía proveniente de la hidrólisis del ATP para separar las hebras de DNA parentales (molde). La primasa sintetiza un cebador de RNA corto, que permanece apareado con el molde de DNA. Este, inicialmente es extendido en el extremo 3' por la DNA polimerasa α (Pol α), resultando en una hebra corta de DNA hija (5')RNA-(3')DNA.
- La mayoría del DNA de las células eucariontes es sintetizado por la Pol δ, que comanda a partir de la Pol α y continúa la elongación de la hebra hija en la dirección 5'→3'. La Pol δ permanece asociada en forma estable con el molde mediante la unión a la proteína Rfc, que a su vez su une a PCNA, una proteína trimérica que rodea al DNA bicatenario hija (véase figura 4-34).
- Generalmente la replicación del DNA ocurre mediante un mecanismo bidireccional en el cual dos horquillas de replicación se forman en un origen y se mueven en direcciones opuestas, con ambas hebras molde comenzando a ser copiadas en cada horquilla (véase fig. 4-36).
- La síntesis de DNA en eucariontes es regulada in vivo mediante el control de la actividad de las helicasas MCM que inician la replicación del DNA en múltiples orígenes separados, a lo largo del DNA cromosómico.

4.7 Virus: parásitos del sistema genético celular

Los virus no pueden reproducirse por sí mismos y deben apropiarse por la fuerza de la maquinaria de la célula huésped para sintetizar las proteínas virales y en algunos casos para replicar el genoma viral. Los virus de RNA, que generalmente se replican en el citoplasma de las células huéspedes, tienen un genoma RNA, y los virus del DNA, que comúnmente se replican en el núcleo de las células huéspedes, tienen un genoma DNA (véase fig. 4-1). Los genomas virales pueden ser monocatenario o bicatenarios, según el tipo específico de virus. Toda la partícula infecciosa del virus, denominada virión, está constituida por el ácido nucleico y una cubierta externa de proteína; los virus más simples contienen sólo RNA o DNA suficiente para codificar cuatro proteínas. Los más complejos pueden codificar 100-200 proteínas. Además de su obvia importancia como causales de enfermedad, los virus son extremadamente útiles como herramientas de investigación en el estudio de los procesos biológicos básicos.

El rango de huéspedes de los virus es restringido

La superficie de un virión contiene muchas copias de un tipo de proteína que se une específicamente a múltiples copias de un receptor proteico sobre una célula huésped. Esta interacción determina el *rango de huéspedes* --el grupo de tipos de células que un virus puede infectar– y comienza el proceso de infección. La mayoría de los virus tienen un rango de huéspedes bastante limitado.

Un virus que infecta sólo bacterias se denomina bacteriófago, o simplemente *fago*. Los virus que infectan células animales o vegetales suelen denominarse virus animales o vegetales. Algunos virus pueden crecer tanto en las plantas como en los insectos que se alimentan de ellos. Los insectos muy móviles sirven como vectores para la transferencia de tales virus entre huéspedes vegetales sensibles. Amplios rangos de huéspedes también son característicos de algunos virus animales estrictos, como el virus de la estomatitis vesicular, que crece en los insectos y en muchos tipos diferentes de mamíferos. Sin embargo, la mayoría de los virus animales no cruzan los filos, y algunos (p. ej., el virus de la poliomelitis) infectan sólo especies estrechamente relacionadas, como los primates. El espectro de células huésped de algunos virus animales está más restringido a un número limitado de tipos de célula porque sólo estas células tienen superficies receptoras apropiadas a las cuales pueden fijarse los viriones.

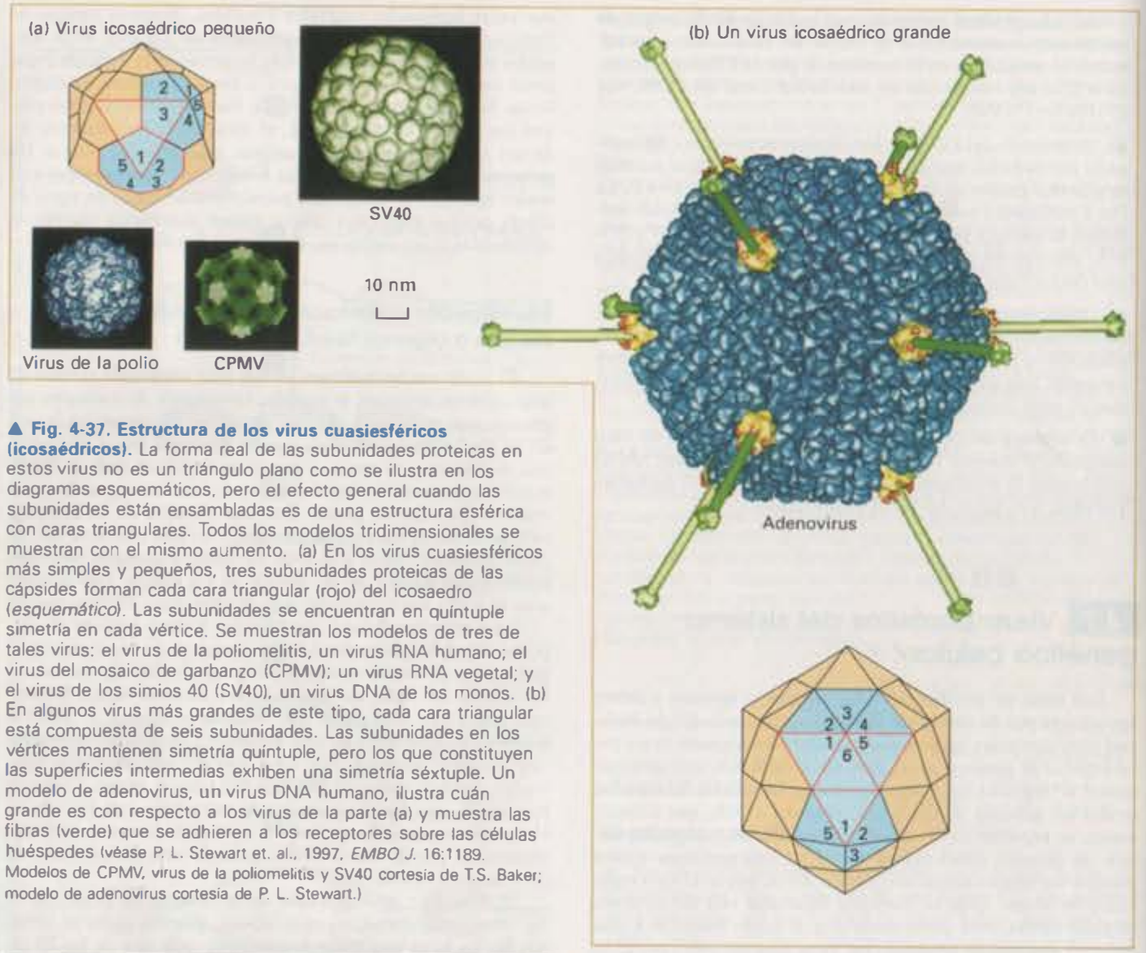
Las cápsides virales son disposiciones regulares de uno o algunos tipos de proteína

El ácido nucleico de un virión está encerrado dentro de una cubierta proteica, o cápside, compuesta de múltiples copias de una proteína o algunas proteínas diferentes, cada una de las cuales está codificada por un gen viral único. Debido a esta estructura, un virus es capaz de codificar toda la información para construir una cápside relativamente grande en un número pequeño de genes. Este uso eficiente de la información genética es importante, ya que sólo una cantidad limitada de RNA o DNA, y por ende un número limitado de genes, puede caber dentro de la cápside de un virión. Una cápside más el ácido nucleico encerrado se denomina nucleocápside.

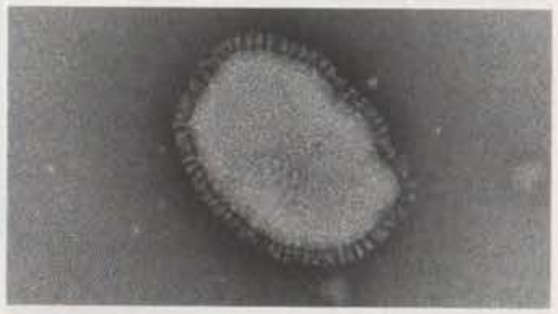
La naturaleza ha encontrado dos formas básicas de disponer las múltiples subunidades proteicas de la cápside y el genoma viral dentro de una nucleocápside. En algunos virus, las copias múltiples de una cubierta proteica única forman una estructura *helicoidal* que encierra y protege el RNA o DNA viral, que corre en una hendidura helicoidal en el interior del tubo proteico. Los virus con esa nucleocápside helicoidal, como el virus del mosaico del tabaco, tienen forma de bastón. El otro tipo importante de estructura está basado en el icosaedro, un objeto sólido, aproximadamente esférico, construido por 20 caras idénticas, cada una de las cuales es un triángulo equilátero.

El número y la disposición de la cubierta de proteínas en los virus icosaédricos, o casi esféricos, difieren según su tamaño. En los virus pequeños de este tipo, cada una de las 20 caras triangulares está construida por tres subunidades proteicas de la cápside idénticas, que suman un total de 60 subunidades por cápside. Todas las subunidades proteicas están en contacto *equivalente* entre sí (fig. 4-37a). En los virus cuasi esféricos grandes, cada cara del icosaedro está compuesta de más de tres subunidades. Como resultado, los contactos entre las subunidades que no están en los vértices son *cuasiequivalentes* (fig. 4-37b). Los modelos de varios virus *cuasiequivalentes*, basados en microscopia electrónica, se muestran en la figura 4-37. En los virus más pequeños (p. ej., los poliovirus), las hendiduras que rodean cada uno de los vértices de la estructura icosaédrica interactúan con los receptores en la superficie de las células huéspedes durante la infección. En los virus más grandes (p. ej., los adenovirus), proteínas largas similares a fibras que se extienden desde la nucleocápside interactúan con los receptores de la superficie celular en las células huéspedes.

En muchos bacteriófagos de DNA, el DNA viral se localiza dentro de una "cabeza" icosaédrica adherida a una "cola" tipo bastón. Durante la infección, las proteínas virales en la punta de la cola se unen a los receptores de la célula huésped; luego el DNA viral pasa a través de la cola e ingresa en el citoplasma de la célula huésped.



▲ Fig. 4-37. Estructura de los virus cuasiesféricos (icosaédricos). La forma real de las subunidades proteicas en estos virus no es un triángulo plano como se ilustra en los diagramas esquemáticos, pero el efecto general cuando las subunidades están ensambladas es de una estructura esférica con caras triangulares. Todos los modelos tridimensionales se muestran con el mismo aumento. (a) En los virus cuasiesféricos más simples y pequeños, tres subunidades proteicas de las cápsides forman cada cara triangular (rojo) del icosaedro (*esquemático*). Las subunidades se encuentran en quíntuple simetría en cada vértice. Se muestran los modelos de tres de tales virus: el virus de la poliomelitis, un virus RNA humano; el virus del mosaico de garbanzo (CPMV); un virus RNA vegetal; y el virus de los simios 40 (SV40), un virus DNA de los monos. (b) En algunos virus más grandes de este tipo, cada cara triangular está compuesta de seis subunidades. Las subunidades en los vértices mantienen simetría quíntuple, pero los que constituyen las superficies intermedias exhiben una simetría séxtuple. Un modelo de adenovirus, un virus DNA humano, ilustra cuán grande es con respecto a los virus de la parte (a) y muestra las fibras (verde) que se adhieren a los receptores sobre las células huéspedes (véase P. L. Stewart et. al., 1997, *EMBO J.* 16:1189. Modelos de CPMV, virus de la poliomelitis y SV40 cortesía de T.S. Baker; modelo de adenovirus cortesía de P. L. Stewart.)

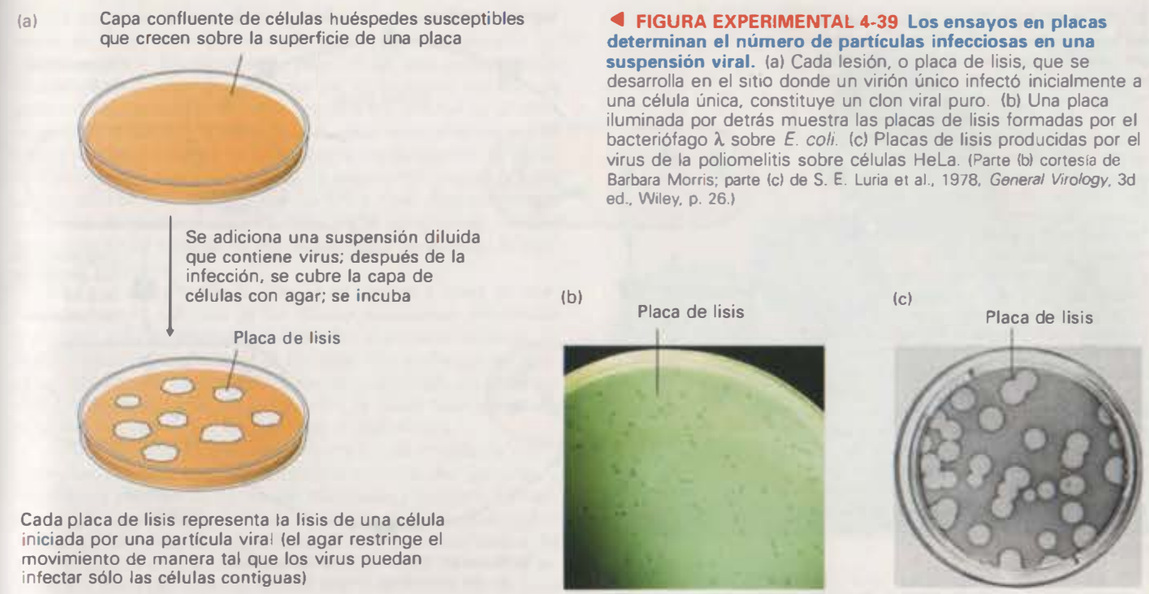


▲ FIGURA EXPERIMENTAL 4-38 Protuberancias punzantes de la proteína viral de la superficie de un virión del virus de la gripe. Los virus de la gripe están rodeados por una envoltura formada por una bicapa fosfolipídica y proteínas virales incrustadas. Las grandes púas que se ven en esta microfotografía electrónica de un virión de gripe teñido negativamente están compuestas de neuraminidasa, una proteína tetramérica, o hemaglutinina, una proteína trimérica (véase fig. 3-7). Dentro, está la nucleocápside helicoidal. (Cortesía de A. Helenius y J. White.)

En algunos virus, la nucleocápside dispuesta simétricamente está cubierta por una membrana externa, o envoltura, formada principalmente por una bicapa fosfolipídica pero que contiene también uno o dos tipos de glucoproteínas codificadas por el virus (fig. 4-38). Los fosfolípidos de la envoltura viral son similares a los de la membrana plasmática de una célula huésped infectada. De hecho, la envoltura viral deriva de gemaciones de esa membrana, pero principalmente contiene glucoproteínas virales, como veremos ensegida.

Los virus pueden ser clonados y contados por ensayos en placa

El número de partículas infecciosas en una muestra se puede cuantificar mediante un ensayo en placa. Este ensayo se realiza con el cultivo de una muestra diluida de partículas virales sobre una placa cubierta con células huéspedes y luego se efectúa el recuento del número de lesiones locales, denominadas *placas de lisis*, que se desarrollan (fig. 4-39). Una placa de lisis se desarrolla sobre el medio allí donde un virión único infecta inicialmente una célula única. El virus se replica en esta



◀ FIGURA EXPERIMENTAL 4-39 Los ensayos en placas determinan el número de partículas infecciosas en una suspensión viral. (a) Cada lesión, o placa de lisis, que se desarrolla en el sitio donde un virión único infectó inicialmente a una célula única, constituye un clon viral puro. (b) Una placa iluminada por detrás muestra las placas de lisis formadas por el bacteriófago λ sobre *E. coli*. (c) Placas de lisis producidas por el virus de la poliomelitis sobre células HeLa. (Parte (b) cortesía de Barbara Morris; parte (c) de S. E. Luria et al., 1978, *General Virology*, 3d ed., Wiley, p. 26.)

célula huésped inicial y luego lisa (rompe) la célula, liberando muchos viriones de su progenie que infectan las células vecinas. Después de algunos de estos ciclos de infección, se lisan suficientes células para producir un área despejada visible, o placa de lisis, en la capa de células restantes no infectadas.

Puesto que toda la progenie de viriones en una placa de lisis deriva de un virus progenitor único, constituyen un clon viral. Este tipo de ensayo en placa es un estudio estándar para virus bacterianos y animales. Los virus vegetales se pueden estudiar de manera similar, mediante el recuento de lesiones locales en las hojas de las plantas inoculadas con virus. El análisis de mutantes virales, que suelen aislarse mediante ensayos en placa, ha contribuido en gran medida a la comprensión actual de los procesos celulares moleculares. El ensayo de placas también es esencial para el aislamiento de los clones del bacteriófago λ portadores de segmentos de DNA celular, como se estudia en el capítulo 9.

Los ciclos líticos de crecimiento virales conducen a la muerte de las células huéspedes

Aunque los detalles varían entre los distintos tipos de virus, los que exhiben un *ciclo lítico* de crecimiento pasan por las siguientes etapas generales:

1. *Adsorción* – El virión interactúa con una célula huésped por la unión de múltiples copias de la proteína de la cápside a receptores específicos sobre la superficie de la célula.

2. *Penetración* – El genoma viral cruza la membrana plasmática. Para los virus animales y vegetales, las proteínas virales también penetran en la célula huésped.

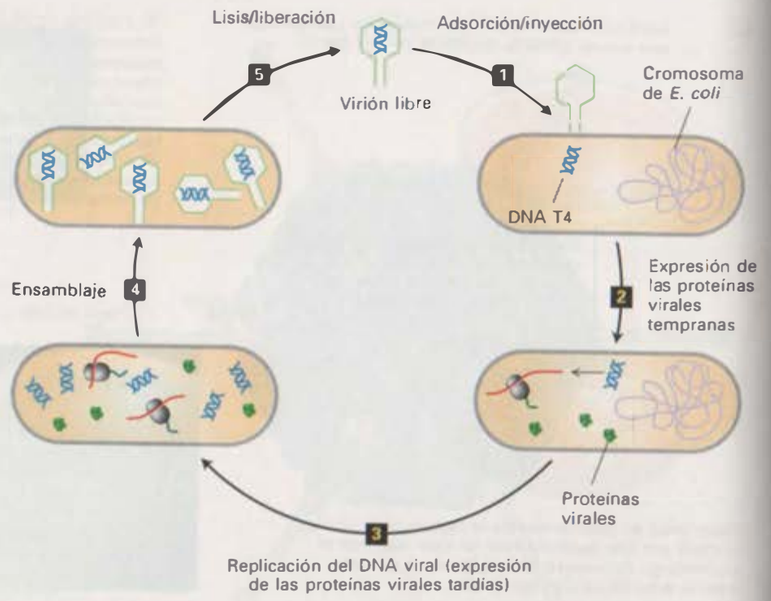
3. *Replicación* – Los mRNA virales se producen con la ayuda de la maquinaria de transcripción de la célula huésped (virus de DNA) o por las enzimas virales (virus de RNA). Para ambos tipos de virus, los mRNA virales son traducidos por la maquinaria de traducción de la célula huésped. La producción de múltiples copias del genoma viral es llevada a cabo por las proteínas virales solas o con la ayuda de proteínas de la célula huésped.

4. *Ensamblaje* – Las proteínas virales y los genomas replicados se asocian para formar la progenie de los viriones.

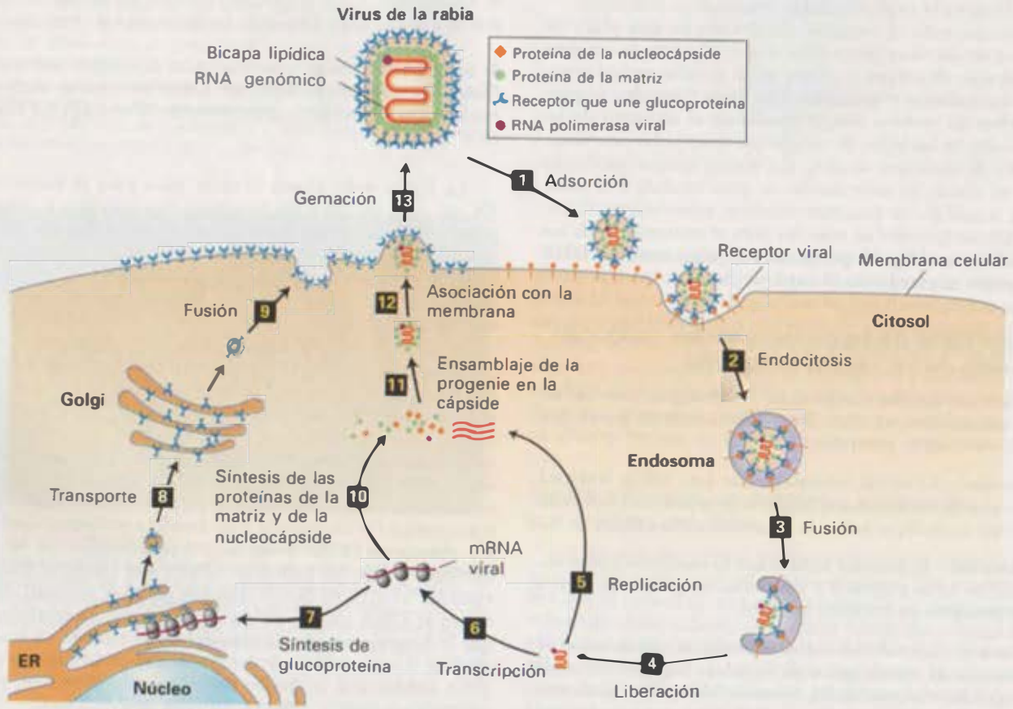
5. *Liberación* – Las células infectadas se rompen súbitamente (lisis), liberando en el momento todos los viriones recién formados, o se desintegran gradualmente, liberando los viriones de a poco.

La figura 4-40 ilustra el ciclo lítico para el bacteriófago T4, un virus de DNA sin envoltura que infecta a *E. coli*. Las proteínas de la cápside suelen producirse en grandes cantidades debido a que se requieren muchas copias para el ensamblaje de cada virión de la progenie. En cada célula infectada se producen y liberan por lisis, alrededor de 100-200 viriones T4 de la progenie.

El ciclo lítico es de alguna manera, un poco más complicado para los virus de DNA que infectan las células eucariontes. En la mayoría de esos virus, el genoma de DNA es transportado (con algunas proteínas asociadas) al núcleo celular. Una vez dentro del núcleo, el DNA viral se transcribe a RNA mediante la maquinaria de transcripción del huésped. El procesamiento del transcripto primario del RNA viral por las enzimas de la célula huésped produce el mRNA viral, que es transportado al citoplasma y traducido a proteínas virales por los ribosomas tRNA y factores traduccionales de la célula huésped. Luego las proteínas virales son transportadas nuevamente al núcleo, donde algunas de ellas replican directamente el DNA viral o dirigen a las proteínas celulares para que lo hagan, como en el caso del SV40 tratado en la última sección. El ensamblaje de las proteínas de la cápside con el DNA viral recién replicado tiene lugar en el núcleo, produciendo de cientos a miles de viriones descendientes.



▶ Fig. 4-40. Ciclo lítico de replicación del bacteriófago T4 en *E. coli*, un virus sin envoltura con un genoma de DNA bicatenario. Luego de que las proteínas de recubrimiento viral de la punta de la cola en el T4 interactúan con proteínas receptoras específicas en el exterior de la célula huésped, el genoma viral es inyectado dentro del huésped (paso 1). A continuación, las enzimas de la célula huésped transcriben los genes virales "tempranos" a mRNA y después los traducen a proteínas virales "tempranas" (paso 2). Las proteínas tempranas replican el DNA viral e inducen la expresión de las proteínas virales "tardías" mediante enzimas de la célula huésped (paso 3). Las proteínas virales tardías incluyen la cápside, las proteínas de ensamblaje y las enzimas que degradan el DNA de la célula huésped, abasteciéndose de nucleótidos para la síntesis de más DNA viral. La progenie de virones es ensamblada en la célula (paso 4) y liberada (paso 5) cuando las proteínas virales lisan la célula. Los virus recién liberados inician otro ciclo de infección en otras células huéspedes.

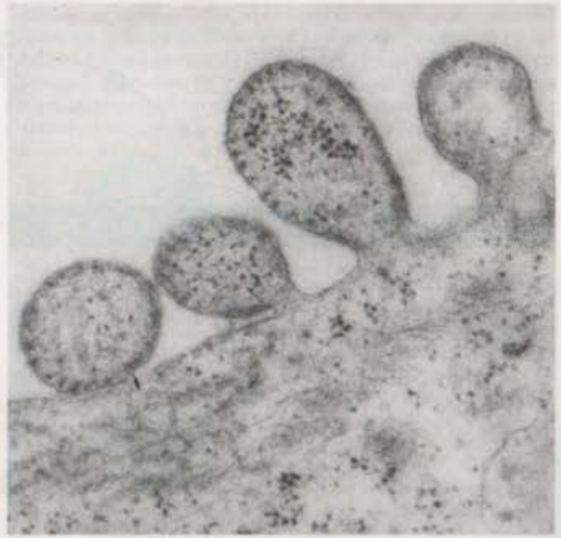


◀ Fig. 4-41. Ciclo lítico de replicación del virus de la rabia, un virus con envoltura con un genoma RNA monocatenario. Los componentes estructurales de este virus están representados en la parte superior. Nótese que la nucleocápside es helicoidal en lugar de icosaédrica. Luego de que un virión se adsorbe a copias múltiples de una proteína específica de la membrana del huésped (paso 1), la célula la envuelve en un endosoma (paso 2). Una proteína celular de la membrana del endosoma bombea iones H^+ desde el citosol hacia el interior del endosoma. La disminución consecuente del pH endosómico induce un cambio de conformación en la glucoproteína viral, conduciendo a la fusión de la envoltura viral con la bicapa lipídica endosómica y a la liberación de la nucleocápside en el citosol (pasos 3 y 4). La RNA polimerasa viral utiliza ribonucleósido trifosfatos en el citosol para replicar el genoma RNA viral (paso 5) y sintetizar los mRNA virales (paso 6). Uno de los mRNA virales codifica la glucoproteína transmembrana, que se inserta en la membrana del retículo endoplasmático (RE) a medida que es sintetizado sobre los ribosomas adosados al RE (paso 7). El carbohidrato se adiciona al dominio mayor plegado dentro de la luz del RE y es modificado a medida que la membrana y la glucoproteína asociada pasan a través del aparato de Golgi (paso 8). Las vesículas con la glucoproteína madura se fusionan con la membrana plasmática del huésped y depositan la glucoproteína viral sobre la superficie de la célula con el dominio mayor de unión al receptor por fuera de ella (paso 9). Mientras tanto, otros mRNA virales son traducidos sobre ribosomas de la célula huésped a proteínas de la nucleocápside, proteínas de la matriz y RNA polimerasa viral (paso 10). Estas proteínas son ensambladas con el genoma RNA viral replicado (rojo vivo) para formar la nucleocápside de la progenie (paso 11), que luego se asocia con el dominio citosólico de las glucoproteínas transmembrana en la membrana plasmática (paso 12). La membrana plasmática se pliega alrededor de la nucleocápside y forma un "brote" que finalmente es liberado (paso 13).

La mayoría de los virus vegetales y animales con un genoma de RNA no requieren funciones nucleares para la replicación lítica. En algunos de estos virus, una enzima codificada por el virus que ingresa en el huésped durante la penetración transcribe el RNA genómico a mRNA en el citoplasma de la célula. El mRNA se traduce directamente a proteínas virales mediante la maquinaria traduccional de la célula huésped. Luego una o más de estas proteínas producen copias adicionales del genoma de RNA viral. Por último, la progenie de genomas se ensambla en el citoplasma con las proteínas de la cápside recién sintetizadas formando la progenie de virones.

Una vez completada la síntesis de cientos a miles de nuevos virones, la mayoría de las células bacterianas infectadas y algunas células animales y vegetales infectadas se lisan, liberando todos los virones al instante. Sin embargo, en muchas infecciones virales en animales y plantas, no ocurren eventos líticos aislados; en vez de esto, la célula huésped muerta libera los virones a medida que se desintegra.

Como ya se dijo, los virus animales sin envoltura están rodeados por una capa fosfolipídica externa derivada de la membrana plasmática de células huéspedes y contienen abundantes glucoproteínas virales. El proceso de adsorción y liberación de los virus con envoltura difiere sustancialmente de estos procesos en los virus sin envoltura. Para ilustrar la replicación lítica de virus con envoltura, examinaremos el virus de la rabia, cuya nucleocápside consta de un único genoma de RNA de hebra simple rodeado por múltiples copias de la proteína de la nucleocápside. Al igual que otros virus de RNA líticos, los virones rábicos se replican en el citoplasma y no requieren enzimas nucleares de la célula huésped. Como se muestra en la figura 4-41, un virión rábico es absorbido por endocitosis, y la liberación de los virones de la progenie se produce por *gemación* de la membrana plasmática. Los virones que geman son claramente visibles en las microfotografías electrónicas de las células infectadas, como se ilustra en la figura 4-42. Muchas decenas de miles de virones descendientes brotan de una célula huésped infectada antes de que muera.

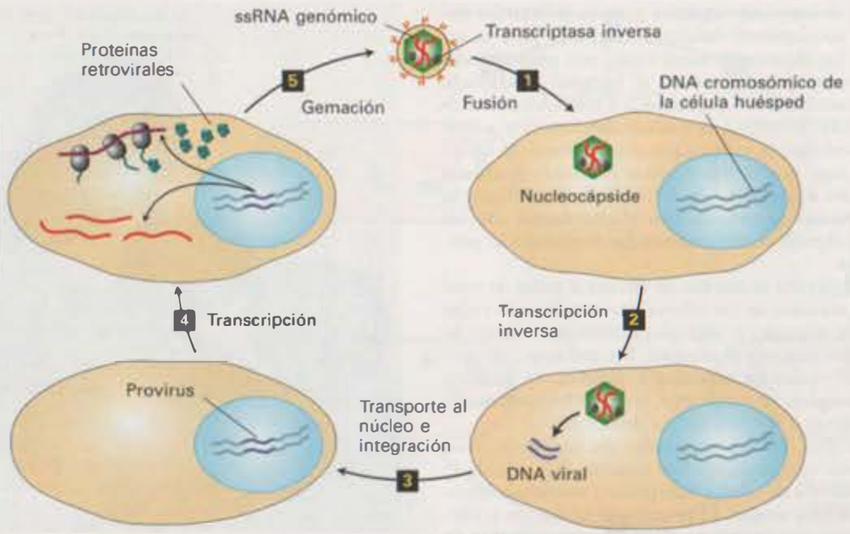


▲ FIGURA EXPERIMENTAL 4-42 La progenie de virones de virus con envoltura es liberada mediante gemación a partir de las células infectadas. En esta microfotografía de transmisión de electrones de una célula infectada con el virus del sarampión se ven con claridad, los brotes de virones que se proyectan desde la superficie de la célula. El virus del sarampión es un virus RNA con envoltura, con una nucleocápside helicoidal, como el virus de la rabia, y se replica de la manera ilustrada en la figura 4-41. (De A. Levine, 1991, *Viruses*, Scientific American Library, p. 22.)

El DNA viral se integra al genoma de la célula huésped en algunos ciclos de crecimiento viral no líticos

Algunos virus bacterianos, denominados *fagos moderados o atemperados*, pueden establecer una asociación no lítica con su célula huésped, que no mata a la célula. Por ejemplo, cuando el bacteriófago λ infecta a *E. coli*, el DNA viral puede estar integrado dentro del cromosoma de la célula huésped en lugar de ser replicado. El DNA viral integrado, denominado *profago*, es replicado como parte del DNA celular de una generación de la célula huésped a la siguiente. Este fenómeno se denomina **lisogenia**. En ciertas condiciones, el DNA profago se activa, lo que lleva a su escisión del cromosoma de la célula huésped, su ingreso en el ciclo lítico, y la subsecuente producción y liberación de la progenie de virones.

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación general: Ciclo vital de un retrovirus



▲ **Fig. 4-43. Ciclo de vida retroviral.** Los retrovirus tienen un genoma de dos copias idénticas de RNA monocatenario y una envoltura externa. Paso 1: Luego de que las glucoproteínas en la envoltura interactúan con una proteína de membrana específica de la célula huésped, la envoltura retroviral se fusiona directamente con la membrana plasmática, permitiendo la entrada de la nucleocápside en el citoplasma de la célula. Paso 2: La transcriptasa inversa viral y otras proteínas copian el genoma viral ssRNA en un DNA de doble hebra. Paso 3: El dsDNA viral es transportado al núcleo e integrado en uno de los muchos sitios posibles en el DNA cromosómico de la célula huésped. Para mayor simplicidad, se representa sólo un cromosoma de la célula huésped. Paso 4: El DNA viral integrado (provirus) es transcripto por la RNA polimerasa de la célula huésped, generando los mRNA (rojo oscuro) y las moléculas de RNA genómico (rojo brillante). La maquinaria de la célula huésped traduce los mRNA virales en glucoproteínas y proteínas de la nucleocápside. Paso 5: Luego la progenie viral es ensamblada y liberada por gemación, como se ilustra en la figura 4-41.

Los genomas de un cierto número de virus animales pueden también integrarse al genoma de la célula huésped. Probablemente los más importantes son los retrovirus, virus con envoltura que tienen un genoma compuesto de dos hebras idénticas de RNA. Estos virus se conocen como *retrovirus* porque su genoma de RNA actúa como molde para la formación de una molécula de DNA; el flujo opuesto de información genética comparado con la más frecuente transcripción de DNA a RNA. En el ciclo de vida retroviral (fig. 4-43), una enzima viral denominada transcriptasa inversa, inicialmente copia el genoma viral de RNA a una hebra simple de DNA complementaria al RNA virión; la misma enzima cataliza luego la síntesis de una hebra complementaria de DNA. (Esta reacción compleja se detalla en el capítulo 10 al analizar los parásitos intracelulares íntimamente relacionados, llamados retrotransposones.) El DNA de hebra doble resultante se integra al DNA cromosómico de la célula infectada. Por último, el DNA integrado, denominado *provirus*, es transcripto a RNA por la propia maquinaria celular, que luego es traducido a proteínas virales o es empacado dentro de las proteínas virales de la cubierta para formar la progenie de viriones que se liberan a través de gemación de la membrana de la célula huésped. Dado que la mayoría de los retrovirus no matan a sus células huésped, las células infectadas pueden replicarse, produciendo células hijas con el DNA proviral integrado. Estas células hijas continúan la transcripción del DNA proviral y la gemación de los viriones de la progenie.

MEDICINA

Algunos retrovirus contienen genes que causan cáncer (oncogenes); debido a ello, en las células infectadas con tales retrovirus se produce una transformación oncogénica en células tumorales. Estudios con retrovirus oncogénicos (en su mayor parte virus de aves y ratones) revelaron gran cantidad de información sobre los procesos que llevan a la transformación oncogénica (cap. 23).

Entre los retrovirus humanos conocidos se encuentran el virus linfotrófico de células T humanas (HTLV), que causa una forma de leucemia, y el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) que causa el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Estos dos virus sólo infectan tipos celulares específicos, sobre todo determinadas células del sistema inmune y, en el caso del HIV, también ciertas neuronas y células gliales del sistema nervioso central. Sólo estas células tienen receptores de superficie que interactúan con las proteínas virales, responsables de la especificidad de estos virus por las células huéspedes. A diferencia de la mayoría de los otros retrovirus, el HIV finalmente mata a sus células huéspedes. La muerte de gran número de células del sistema inmune produce la respuesta inmunitaria defectuosa característica del SIDA.

Algunos virus de DNA también pueden integrarse al cromosoma de una célula huésped. Un ejemplo son los papilomavirus (HPV), que frecuentemente causan verrugas y otras lesiones benignas en la piel. Sin embargo, los genomas de ciertos serotipos de HPV, se integran a veces al DNA cromosómico de células epiteliales cervicales infectadas inician el desarrollo de cáncer cervical. Los estudios citológicos de rutina (Pop) pueden detectar células en las etapas tempranas del proceso de transformación iniciado por la integración de HPV y permiten implementar un tratamiento eficaz.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 4.7

Virus: parásitos del sistema genético celular

- Los virus son parásitos pequeños que pueden replicarse sólo en las células huéspedes. Los genomas virales pueden ser de DNA (virus de DNA) o de RNA (virus de RNA) y monocatenarios o bicatenarios.
- La cápside, que rodea el genoma viral, está compuesta de múltiples copias de una o un pequeño número de proteínas codificadas por el virus. Algunos virus también tienen una envoltura exterior, que es similar a la membrana plasmática pero que contiene proteínas virales transmembrana.
- La mayoría de los virus de DNA animales y vegetales requieren enzimas nucleares de la célula huésped para llevar a cabo la transcripción del genoma viral a mRNA y la producción de la progenie de genomas. Por el contrario, la mayoría de los virus de RNA codifican las enzimas que pueden transcribir el genoma de RNA en mRNA viral y producir nuevas copias del genoma RNA.
- Los ribosomas de la célula huésped, los tRNA, y los factores traduccionales son usados en la síntesis de todas las proteínas virales en las células infectadas.
- La infección viral lítica comprende la absorción, penetración, síntesis de proteínas virales y de genomas de la progenie (replicación), ensamblaje de los viriones de la progenie, y la liberación de cientos de miles de viriones, conduciendo a la muerte de la célula huésped (véase fig. 4-40). La liberación de virus con envoltura se produce por medio de la gemación de la membrana plasmática de la célula huésped (véase fig. 4-41).
- La infección no lítica sucede cuando el genoma viral se integra al DNA de la célula huésped y generalmente no conduce a la muerte de la célula.
- Los retrovirus son virus animales con envoltura que contienen un genoma de RNA monocatenario. Una vez que una célula huésped es penetrada, la transcriptasa inversa, una enzima viral transportada en el virión, convierte el genoma viral de RNA en DNA bicatenario, que se integra al DNA cromosómico (véase fig. 4-43).
- A diferencia de la infección por otros retrovirus, la infección por HIV finalmente mata las células huéspedes y provoca los defectos en la respuesta inmune característicos del SIDA.
- Los virus tumorales, que contienen oncogenes, pueden tener un genoma de RNA (p. ej., los virus linfotróficos de células T) o un genoma de DNA (p. ej., los papilomavirus humanos). En el caso de estos virus, la integración del genoma viral en un cromosoma de la célula huésped puede causar la transformación de la célula en una célula tumoral.

PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO

En este capítulo repasamos primero la estructura del DNA y del RNA y luego describimos los aspectos fundamentales de la transcripción del DNA por la RNA polimerasa. Las RNA polimerasas se analizarán con mayor detalle en el capítulo 11, sólo con los factores adicionales requeridos para la iniciación de la transcripción en células eucariontes y las interacciones con factores de transcripción regulatorios. Luego, analizamos el código genético y la participación de los tRNA y la maquinaria sintetizadora de proteínas, el ribosoma, en la decodificación de la información en el mRNA para permitir el ensamblaje preciso de las cadenas proteicas. En el capítulo 12 se considerarán los mecanismos que regulan cúando una célula replica su DNA y qué coordina la replicación del DNA con el complejo proceso de la mitosis que distribuye de igual manera las moléculas de DNA hijas a cada célula hija.

Estos procesos celulares forman los principios fundamentales de la biología celular molecular. Nuestra comprensión actual de estos procesos se basa en numerosos resultados experimentales y no es probable que cambie. Sin embargo, nuestra comprensión continuará creciendo a medida que se descubran más detalles de las estructuras e interacciones de las maquinarias macromoleculares. La determinación de la estructura tridimensional de las RNA polimerasas, las subunidades ribosómicas y las proteínas de replicación del DNA le ha permitido a los investigadores diseñar aproximaciones experimentales más profundas para revelar cómo operan estas macromoléculas a nivel molecular. El conocimiento pormenorizado de estos mecanismos permitirá el diseño de nuevos agentes más eficaces para el tratamiento de las enfermedades humanas. Por ejemplo, las recientes estructuras de alta resolución de los ribosomas está proporcionando penetración en los mecanismos por los cuales los antibióticos inhiben la síntesis proteica bacteriana sin afectar la función de los ribosomas de los mamíferos. Este nuevo conocimiento puede permitir el diseño de antibióticos aún más eficaces. Asimismo, el discernimiento de los mecanismos que regulan la transcripción de genes humanos específicos puede conducir a estrategias terapéuticas que ayudarían a reducir o prevenir respuestas inmunes inapropiadas que llevan a la esclerosis múltiple y a la artritis, la división celular inapropiada que es el sello distintivo del cáncer, y otros procesos patológicos.

Gran parte de la investigación biológica actual está enfocada en descubrir cómo las interacciones moleculares confieren a las células capacidad de decisión y propiedades especiales. Por esta razón varios de los capítulos siguientes describen el conocimiento actual acerca de cómo tales interacciones regulan la transcripción y la síntesis de proteínas en los organismos multicelulares y cómo tales regulaciones dotan a las células con la capacidad de volverse especializadas y desarrollarse en órganos complejos. Otros capítulos tratan cómo las interacciones proteína-proteína enfatizan la construcción de orgánulos especializados en las células, y cómo ellos determi-

nan la forma y el movimiento celular. Los rápidos avances en la biología celular molecular en los últimos años mantienen la promesa de que en un futuro no tan distante, entenderemos cómo la regulación de funciones celulares especializadas, la forma y la movilidad acoplada con la replicación celular regulada y la muerte celular (apoptosis) conducen al desarrollo de organismos complejos como los árboles y los seres humanos.

PALABRAS CLAVE

anticodón *119*
cebador *133*
código genético *119*
codones 119
complementario *104*
DNA polimerasas *133*
doble hélice *103*
enlaces fosfodiéster *103*
ensayo en placas *138*
envoltura (viral) *137*
exones *111*
fragmentos de Okazaki *133*
hebra conductora *133*
hebra rezagada *133*
horquilla de replicación *133*
intrones *111*
marco de lectura *120*
operón *111*
pares de bases de Watson y Crick *103*
polirribosomas *130*
promotor *109*
RNA mensajero (mRNA) *119*
RNA polimerasa *109*
RNA ribosómico (rRNA) *142*
ribosomas *119*
traducción *101*
transcripción *101*
transcriptasa inversa *142*
transcripto primario *110*

REVISIÓN DE CONCEPTOS

1. ¿Qué son los pares de bases de Watson y Crick? ¿Por qué son importantes?

2. Las proteínas de unión a la caja TATA se unen al surco menor del DNA, resultante de la curvatura de la hélice del DNA (véase fig. 4-5). ¿Qué propiedades del DNA permiten a la proteína de unión a la caja TATA reconocer la hélice del DNA?

3. La preparación del DNA (hebra doble, circular) de un plásmido para secuenciación involucra la hibridación de un cebador de oligonucleótidos hebra simple de DNA complementario, corto, a una hebra molde del plásmido. Esto rutinariamente se logra calentando el DNA del plásmido y el cebador hasta 90°C y luego bajando lentamente la temperatura hasta 25°C. ¿Por qué funciona este protocolo de trabajo?

4. ¿Qué diferencia entre el RNA y el DNA ayuda a explicar la gran estabilidad del DNA? ¿Qué implicaciones tiene esto para la función del DNA?

5. ¿Cuáles son las principales diferencias en la síntesis y la estructura de los mRNA de procariontes y eucariontes?

6. Mientras se investigada la función de un gen humano que codifica el receptor de un factor de crecimiento específico, se encontró que dos tipos de proteínas son sintetizadas a partir de este gen. La proteína más grande que contiene un dominio que atraviesa la membrana funciona reconociendo los factores de crecimiento en la superficie celular, estimulando un camino de señalización específico hacia el interior. En contraste, una proteína relativa, más pequeña, es secretada desde la célula y funciona uniendo un factor de crecimiento disponible circulante en la sangre. Explique cómo la célula sintetiza estas proteínas dispares.

7. Describa los eventos moleculares que ocurren en el operón *lac* cuando células de *E. coli* son cambiadas de un medio que contiene glucosa a uno con lactosa.

8. La concentración de fosfato libre afecta la transcripción de algunos genes de *E. coli*. Describa el mecanismo correspondiente.

9. Compare cómo ocurre la selección del sitio de inicio de la traducción en los mRNA de bacterias, de eucariontes y de poliovirus.

10. ¿Cuál es la evidencia de que el rRNA 23S en la subunidad ribosómica mayor tiene actividad peptidil transferasa?

11. ¿Cómo podría afectar la traducción una mutación en el gen I de la proteína de unión poli(A)? ¿Cómo podría una microfotografía electrónica de tal mutante diferir de la del patrón normal?

12. ¿Qué características del DNA derivan en la necesidad de alguna síntesis del DNA sea discontinua? ¿Cómo la célula utiliza los fragmentos de Okazaki y la DNA ligasa?

13. ¿Qué gen es único en los retrovirus? ¿Por qué la proteína codificada por este gen es absolutamente necesaria para el mantenimiento del ciclo de vida retroviral, pero no lo es para otros virus?

ANÁLISIS DE LOS DATOS

La NASA ha identificado un microbio nuevo en Marte y le solicita que determine el código genético de este miocroorganismo. Para lograr el objetivo, usted aísla un extracto a partir de ese microbio que contiene todos los componentes necesarios para la síntesis de proteína excepto el mRNA. Se adiciona mRNA sintético a este extracto y se analizan los polipéptidos resultantes:

mRNA sintético	*Polipéptido resultante*
AAAAAAAAAAAAAAAA	Lisina-lisina-lisina etc.
CACACACACACACACA	Treonina-histidina-treonina-histidina etc.
AACAACAACAACAACA	Treonina-treonina-Treonina etc.
	Glutamina-glutamina-glutamina etc.
	Asparagina-asparagina-asparagina etc.

Con estos datos, ¿qué puede concluir respecto del código genético del microbio? ¿Cuál es la secuencia del bucle anticodón de un tRNA que porta una treonina? Si usted encuentra que este microbio contiene 61 tRNA diferentes, ¿qué podría suponer acerca de la fidelidad de la traducción en este organismo?

BIBLIOGRAFÍA

Estructura de los ácidos nucleicos

Dickerson, R. E. 1983. The DNA helix and how it is read. Sci. Am. 249:9111.

Doudna, J. A., and T. R. Cech. 2002. The chemical repertoire of natural ribozymes. Nature 418:222-228.

Kornberg, A., and T. A. Baker. 1992. DNA Replication, 2d ed. W. H. Freeman and Company, chap. 1. A good summary of the principles of DNA structure.

Wang, J. C. 1980. Superhelical DNA. Trends Biochem. Sci. 5:219-221.

Transcripción de genes codificadores de proteínas y formación de los mRNA funcionales

Brenner, S., F. Jacob, and M. Meselson. 1961. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. Narure 190:576-581.

Young, B. A., T. M. Gruber, and C. A. Gross. 2002. Views of transcription initiation. Cell 109:417-420.

Control de la expresión génica en los procariontes

Bell, C. E., and M. Lewis. 2001. The Lac repressor: a second generation of structural and functional studies. Curr. Opin. Struc. Biol. 11:19-25.

Busby, S., and R. H. Ebright. 1999. Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). J. Mol. Biol. 293:199-213.

Darst, S. A. 2001. Bacterial RNA polymerase. Curr. Opin. Struc. Biol. 11:155-162.

Muller-Hill, B. 1998. Some repressors of bacterial transcription. Curr. Opin. Microbiol. 1:145-151.

Las tres funciones del RNA en la traducción

Alexander, R. W., and P. Schimmel, 2001. Domain-domain communication in aminoacyl-tRNA synthetases. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 69:317-349.

Bjork, G. R., et al.1987. Transfer RNA modification. Ann. Rev. Biochern. 56:263-287.

Garrett, R. A., et al., eds. 2000. The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions. ASM Press.

Hatfield, D. L., and V. N. Gladyshev. 2002. How selenium has altered our understanding of the genetic code. Mol. Cell. Biol. 22:3565-3576.

Hoagland, M. B., et al. 1958. A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. J. Biol. Chem. 231:241-257.

Holley, R. W., et al. 1965. Structure of a ribonucleic acid. Science 147:1462-1465.

Ibba, M., and D. Soll. 2001. The renaissance of aminoacyl-tRNA synthesis. EMBO Rep. 2:382-387.

Khorana, G. H., et al. 1966. Polynucleotide synthesis and the genetic code. Cold Spring Harbor Symp. Quan. Biol. 31:39 19.

Maguire, B. A., and R. A. Zimmermann. 2001. The ribosome in focus. Cell 104:813-816.

Nirenberg, M., et al. 1966. The RNA code in protein synthesis. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31:11-24.

Ramakrishnan, V.2002. Ribosome structure and the mechanism of translation. Cell 108:557-572.

Rich, A., and S.-H. Kim. 1978. The three-dimensional structure of transfer RNA. Sci. Am. 240(1):52-62 (offprint 1377).

Pasos en la síntesis de proteínas sobre los ribosomas

Gingras, A. C., R. Raught, and N. Sonenberg. 1999. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. Ann. Rev Biochem. 68:913-963.

Green, R. 2000. Ribosomal translocation: EF-G turns the crank. Curr. Biol. 10:R369-R373.

Hellen, C. U., and P. Sarnow. 2001.Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. Genet. Devel. 15:1593-1612.

Kisselev, L. L., and R. H. Buckingham. 2000. Translational termination comes of age. Trends Biochem. Sci. 25:561-566.

Kozak, M. 1999. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. Gene 234:187-208.

Noller, H. F., et al. 2002. Translocation of tRNA during protein synthesis. FEBS Lett. 514:11-16.

Pestova, T. V., et al. 2001. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 98:7029-7036.

Poole, E., and W. Tate. 2000. Release factors and their role as decoding proteins: specificity and fidelity for termination of protein synthesis. Biochim. Biophys. Acta 1493:1-11.

Ramakrishnan, V. 2002. Ribosome structure and the mechanism of translation. Cell 108:557-572.

Sonenberg, N., J. W. B. Hershey, and M. B. Mathews, eds.2000. Translational Control of Gene Expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Replicación del DNA

Bullock, P. A. 1997. The initiation of simian virus 40 DNA replication in vitro. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 32:503-568.

Kornberg, A., and T. A. Baker. 1992. DNA Replication, 2d ed. W. H. Freeman and Company

Waga, S., and B. Stillman. 1998. The DNA replication fork in eukaryotic cells. Ann. Rev. Biochem. 67:721-751.

Virus: Parásitos del sistema genético celular.

Flint, S. J., et al. 2000. Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control. ASM Press.

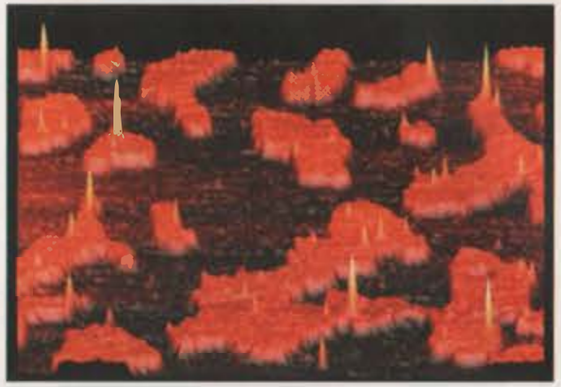
Hull, R. 2002. Mathews' Plant Virology. Academic Press.

Knipe, D. M., and P. M. Howley, eds. 2001. Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins.

Kornberg, A., and T. A. Baker. 1992. DNA Replication, 2d ed. W. H. Freeman and Company. Good summary of bacteriophage molecular biology.

5

BIOMEMBRANAS Y ARQUITECTURA CELULAR



El microscopio de fuerza atómica revela "rafts" lipídicos (bolsas lipicicas) de esfingomielina (naranja) que se proyectan por encima de un fondo de dioleoilfosfatidilcolina (negro) en una bicapa lipídica sustentada por mica. La fosfatasa alcalina placentaria (picos amarillos), una proteína anclada por glucosilfosfatidilinositol, muestra su asociación casi exclusiva con los rafts. [De D. E. Saslowsky et al., 2002, *J Biol. Chem.* 277:26966-26970.]

Los procariontes, que representan las células más simples y más pequeñas (alrededor de 1-2 μm de longitud) están rodeados por una membrana plasmática, pero no contienen subcompartimientos internos limitados por membranas (véase fig. 1-2a). Aunque el DNA se concentra en el centro de estos organismos unicelulares, se cree que la mayoría de las enzimas y los metabolitos se difunden con libertad dentro del único compartimiento acuoso interno. Ciertas reacciones metabólicas, incluidas la síntesis de proteínas y la glucólisis anaerobia tienen lugar allí; otras, como la replicación del DNA y la producción de ATP, ocurren en la membrana plasmática.

Sin embargo, en las células más grandes de los eucariontes la velocidad de las reacciones químicas estaría limitada por la difusión de moléculas pequeñas si la célula no estuviera dividida en subcompartimientos más pequeños denominados orgánulos. Cada orgánulo está rodeado por una o más biomembranas, y cada tipo de orgánulo contiene un conjunto único de proteínas, algunas inmersas en su membrana, otras en su espacio acuoso interior, o luz. Estas proteínas le permiten a cada orgánulo llevar a cabo sus funciones celulares características. El citoplasma es la parte de la célula por afuera del orgánulo más grande, el núcleo. El citosol, la parte acuosa del citoplasma por afuera de todos los orgánulos, también contiene sus propias proteínas distintivas.

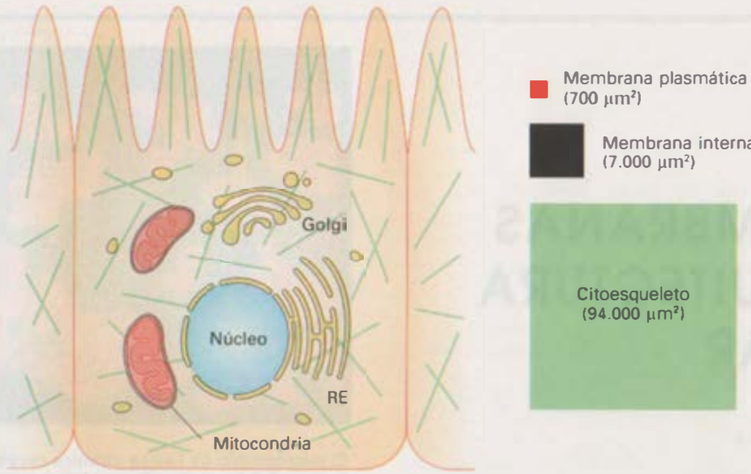
Todas las biomembranas forman estructuras cerradas que separan la luz en el interior del exterior y se basan en una estructura de bicapa similar. Controlan el movimiento de moléculas entre el interior y el exterior de una célula y hacia adentro y afuera de los orgánulos de las células eucariontes. De acuerdo con la importancia de las membranas internas para el funcionamiento de la célula, el área total de estas membranas es alrededor de diez veces mayor que el de la membrana plasmática (fig. 5-1).

Aunque la arquitectura básica de todas las células eucariontes está construida a partir de membranas, orgánulos y citosol, cada tipo de célula exhibe un diseño distintivo definido por la forma de la célula y por la localización de sus orgánulos. La base estructural del diseño único de cada tipo de célula reside en el citoesqueleto, una red densa de tres clases de filamentos proteicos que impregnan el citosol y dan soporte mecánico a las membranas celulares. Las proteínas citoesqueléticas se encuentran entre las proteínas más abundantes de una célula, y la enorme superficie de su citoesqueleto (véase fig. 5-1) constituye un armazón al cual se fijan grupos particulares de proteínas y membranas.

Comenzamos nuestro examen de la arquitectura de la célula considerando la estructura básica de las biomembranas. Los componentes lipídicos de las membranas no sólo afectan su forma y su función, sino que también desempeñan un papel importante en el anclaje de las proteínas a la membrana, en la modificación de las actividades de las proteínas de la

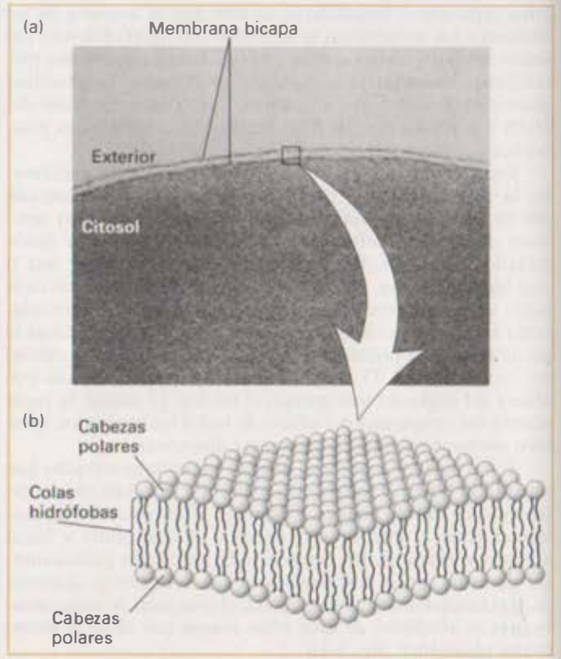
CONTENIDO

5.1 Biomembranas: composición lipídica y organización estructural
5.2 Biomembranas: componentes proteicos y funciones básicas
5.3 Orgánulos de la célula eucarionte
5.4 El citoesqueleto: componentes y funciones estructurales
5.5 Purificación de las células y de sus partes
5.6 Visualización de la arquitectura celular



▲ Fig. 5-1. Vista general esquemática de los principales componentes de la arquitectura celular eucarionte. La membrana plasmática (roja) define el exterior de la célula y controla el movimiento de las moléculas entre el citosol y el medio extracelular. Diferentes tipos de orgánulos y vesículas pequeñas encerradas dentro de sus propias membranas distintivas (negro) desempeñan funciones especiales, como la expresión génica, la producción de energía, la síntesis de membrana y el transporte intracelular. Las fibras del citoesqueleto (verde) proveen soporte estructural para la célula y sus compartimientos internos. Las membranas internas de los orgánulos y las vesículas poseen más área superficial que la de la membrana plasmática, pero menos área que la del citoesqueleto, como se representa esquemáticamente con las cajas roja, negra y verde. La enorme área superficial del citoesqueleto le permite funcionar como un armazón sobre el cual pueden tener lugar las reacciones celulares.

membrana y en la transducción de señales al citoplasma. Más tarde consideramos la estructura general de las proteínas de membrana y cómo se pueden relacionar con diferentes membranas. La función única de cada membrana está determinada en gran medida por el conjunto de proteínas de su interior y adyacentes a ella. El tema de los compartimientos limitados por membranas continúa con una revisión de las funciones de los diversos orgánulos. Luego presentamos la estructura y la función del citoesqueleto, que está íntimamente asociado con todas las biomembranas; los cambios en la organización de esta red filamentosa afectan la estructura y la función de las membranas conectadas. En el resto del capítulo describimos los métodos comunes para aislar tipos particulares de estructuras celulares y subcelulares, y diversas técnicas microscópicas para estudiar la estructura y la función celular.



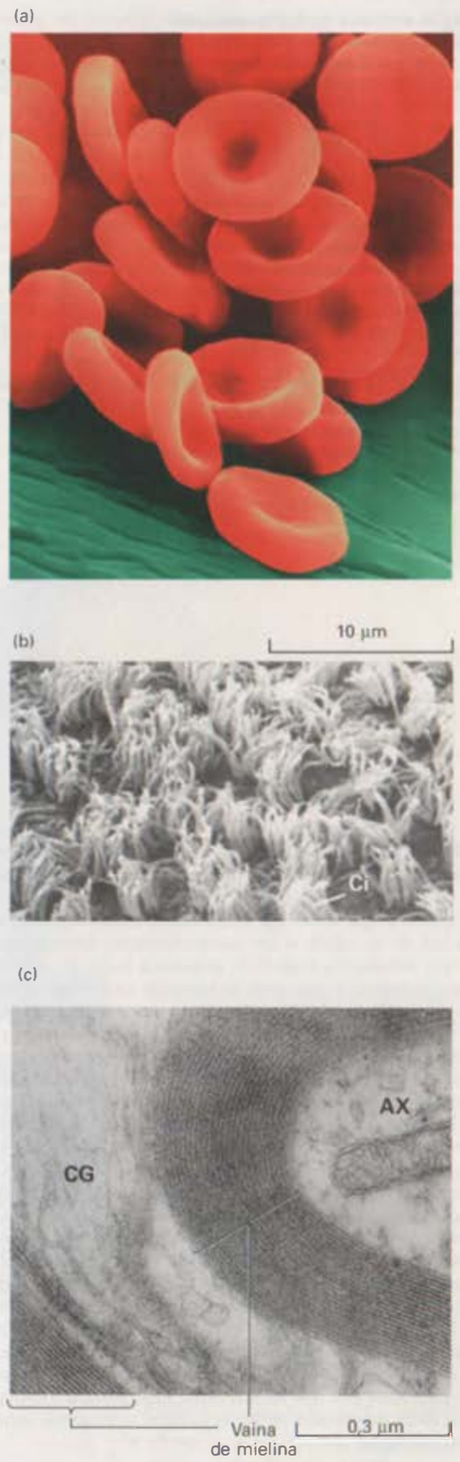
▶ Fig. 5-2. Estructura bicapa de las biomembranas. (a) Microfotografía electrónica de una sección delgada a través de la membrana de un eritrocito teñido con tetróxido de osmio. El aspecto característico de "vía férrea" de la membrana indica la presencia de dos capas polares, compatibles con la estructura bicapa de las membranas fosfolipídicas. (b) Interpretación esquemática de la bicapa fosfolipídica en la cual los grupos polares miran hacia afuera para proteger del agua a las colas hidrófobas de acilos grasos. El efecto hidrófobo y las interacciones de van der Waals entre las colas de acilos grasos conducen el ensamblaje de la bicapa (cap. 2). (Parte (a) cortesía de J. D. Robertson.)

5.1 Biomembranas: composición lipídica y organización estructural

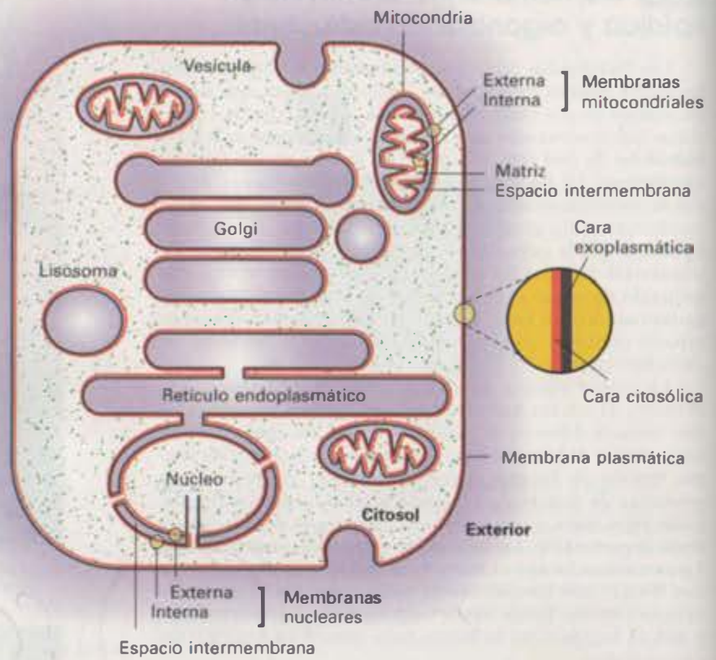
Los fosfolípidos presentes en las células forman espontáneamente **bicapas fosfolipídicas** similares a hojas, que tienen un espesor de dos moléculas. En cada capa u *hojuela*, las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos forman un núcleo hidrófobo de 3–4 nm de espesor en la mayoría de las biomembranas. La microscopia electrónica de secciones delgadas de membranas teñidas con tetróxido de osmio, que se fija fuertemente a los grupos polares de las cabezas de los fosfolípidos, revela la estructura de doble capa (fig. 5-2). Un corte transversal de todas las membranas individuales teñidas con tetróxido de osmio se parece a una vía férrea: dos líneas delgadas oscuras (los complejos de las cabezas teñidas) con un espacio uniforme claro de alrededor de 2 nm (las colas hidrófobas) entre sí.

La bicapa lipídica posee dos propiedades importantes. Primero, el núcleo hidrófobo es una barrera impermeable que evita la difusión de solutos solubles en agua (hidrófilos) a través de la membrana. Más importante aún, esta simple función de barrera está modulada por la presencia de proteínas de membrana que median el transporte de moléculas específicas a través de una bicapa que de otro modo sería impermeable. La segunda propiedad es la estabilidad. La estructura bicapa es mantenida por interacciones de van der Waals entre las cadenas de lípidos. Aunque el ambiente acuoso exterior puede variar ampliamente en fuerza iónica y pH, la bicapa tiene la fuerza para retener su arquitectura característica.

Las membranas naturales de diferentes tipos de células exhiben diversas formas que complementan la función de una célula (fig. 5-3). La superficie suave y flexible de la membrana plasmática del eritrocito le permite a la célula escurrirse a través de capilares sanguíneos angostos. Algunas células tienen una larga y estilizada extensión de la membrana plasmática, llamada cilio o flagelo, que se mueve a modo de látigo. Este movimiento provoca que los líquidos fluyan a lo largo de la superficie de una célula epitelial o espermática para nadar a través del medio. Los axones de muchas neuronas están envueltos por múltiples capas de una membrana plasmática modificada denominada vaina de mielina. Esta estructura membranosa es elaborada por una célula de soporte adyacente y facilita la conducción de impulsos nerviosos a través de lar-



▶ Fig. 5-3. Variaciones de las biomembranas de diferentes tipos de células. (a) Una membrana suave y flexible cubre la superficie de la célula discoide eritrocítica. (b) Penachos de cilios (Ci) se proyectan desde las células ependimarias que revisten los ventrículos cerebrales. (c) Muchos axones nerviosos están enfundados en una vaina de mielina compuesta de múltiples capas de una membrana plasmática modificada. Las capas individuales de mielina pueden verse en esta microfotografía electrónica de un corte transversal de un axón (AX). La vaina de mielina está formada por células gliales (CG) de sostén. [Partes (a) y (b) de R. G. Kessel y R. H. Kardon, 1979, *Tissues and Organs; A Text- Atlas of Scanning Electron Microscopy*, W. H. Freeman and Company. Parte (c) de P. C. Cross y K. L. Mercer, 1993, *Cell and Tissue Ultrastructure: A Functional Perspective*, W. H. Freeman and Company, p. 137.]



▶ Fig. 5-4. Caras de las membranas celulares. La membrana plasmática, una membrana bicapa única, encierra la célula. En esta representación muy esquemática, el citosol interno (punteado en verde) y el ambiente externo (violeta) definen las caras citosólica (rojo) y exoplasmática (negra) de la bicapa. Las vesículas y algunos orgánulos tienen una única membrana y su espacio interno acuoso (violeta) es topológicamente equivalente al exterior de la célula. Tres orgánulos –el núcleo, la mitocondria y los cloroplastos (que no se muestran)– están encerrados por dos membranas separadas por un pequeño espacio intermembrana. Las caras exoplasmáticas de las membranas interna y externa alrededor de estos orgánulos bordean el espacio intermembrana entre ellas. Por simplicidad, el interior hidrófobo de la membrana no está indicado en este diagrama.

gas distancias (cap. 7). A pesar de sus formas y funciones diversas, estas membranas y todas las otras biomembranas poseen una estructura de bicapa común.

Debido a que todas las membranas celulares encierran la totalidad de la célula o un compartimiento interno, poseen una *cara interna* (la superficie orientada hacia el interior del compartimiento) y una *cara externa* (la superficie orientada hacia el medio). Más comúnmente, las superficies de una membrana celular son designadas como cara citosólica y cara exoplasmática. Esta nomenclatura es útil para destacar la equivalencia topográfica de las caras en membranas diferentes, como se diagrama en la figura 5-4. Por ejemplo, la cara exoplasmática de la membrana plasmática está dirigida hacia afuera del citosol hacia el espacio extracelular o medio externo y define el límite exterior de la célula. Sin embargo, para los orgánulos y las vesículas rodeadas por una membrana única, la cara dirigida hacia afuera del citosol –la cara exoplasmática– está en el interior en contacto con un espacio acuoso equivalente al espacio extracelular. Esta correspondencia se comprende con más facilidad en las vesículas que surgen por invaginación de la membrana plasmática; este proceso da como resultado que la cara externa de la membrana plasmática se torne la cara interna de la membrana vesicular. Tres orgánulos –el núcleo, la mitocondria y los cloroplastos– están rodeados por dos membranas; la superficie exoplasmática de cada membrana enfrenta el espacio existente entre las dos membranas.

Se pueden encontrar tres clases de lípidos en las biomembranas

Una biomembrana típica se construye a partir de fosfoglicéridos, esfingolípidos y esteroides. Las tres clases de lípidos son moléculas anfipáticas que tienen una cabeza polar (hidrófila) y una cola hidrófoba. El efecto hidrófobo y las interacciones de van der Waals, tratadas en el capítulo 2, hacen que los grupos de la cola se asocien entre sí para formar una bicapa con las cabezas orientadas hacia el agua (véase fig. 5-2). Aunque los lípidos típicos de la membrana tienen este carácter anfipático en común, difieren en sus estructuras químicas, abundancia y funciones en la membrana.

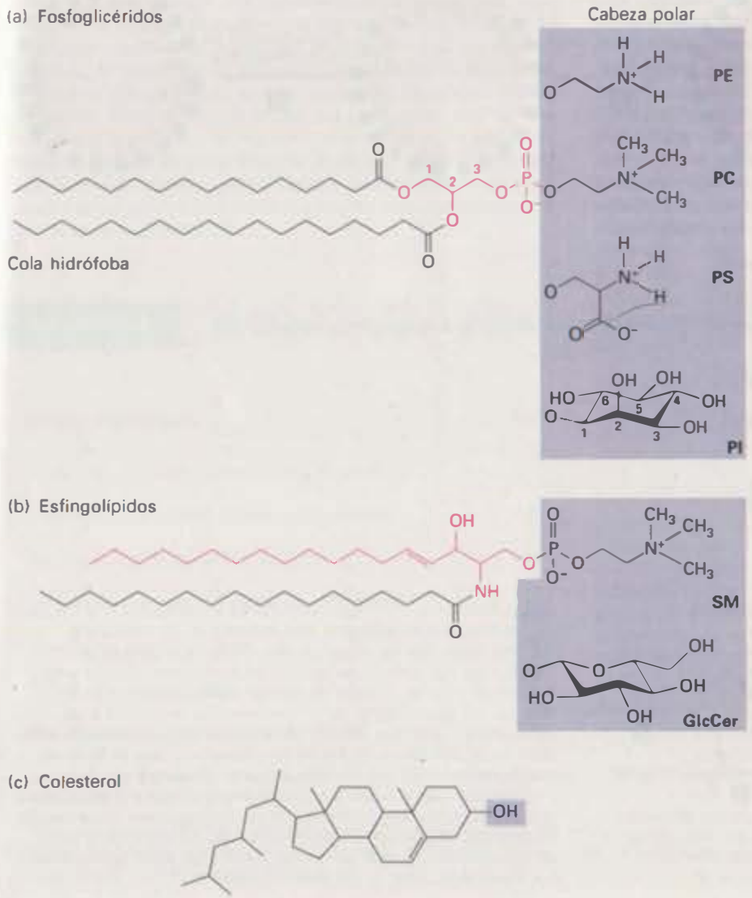
Los fosfoglicéridos, la clase de lípidos más abundantes en la mayoría de las membranas, son derivados del glicerol 3-fosfato (fig. 5-5a). Una molécula típica de fosfoglicérido consta de una cola hidrófoba compuesta de dos cadenas acilos grasos esterificados con los dos grupos hidroxilo del glicerol fosfato y una cabeza polar unida al fosfato. Las dos cadenas de acilos grasos pueden diferir en el número de carbonos que contienen (comúnmente 16 o 18) y su grado de saturación (0, 1 o 2 dobles enlaces). Un fosfoglicérido se clasifica de acuerdo con la naturaleza de su cabeza. En las fosfatidilcolinas –los fosfolípidos más abundantes en la membrana plasmática– las cabezas polares contienen colina, un alcohol cargado positivamente, esterificado al fosfato con

carga negativa. En otros fosfoglicéridos, una molécula que contiene OH, como la etanolamina, la serina y el derivado inositol, se une al grupo fosfato. El grupo fosfato cargado negativamente y los grupos cargados positivamente o los grupos hidroxilo en la cabeza interactúan fuertemente con el agua.

Los *plasmalógenos* son un grupo de fosfoglicéridos que contienen una cadena de acilos grasos, unida al glicerol por un enlace éster y una larga cadena hidrocarbonada, unida al glicerol por un enlace éter (C–O–C). Estas moléculas constituyen alrededor del 20% del contenido total de fosfoglicéridos en los seres humanos. Su abundancia varía de acuerdo con los tejidos y las especies, pero es especialmente alta en el cerebro humano y en el tejido del corazón. La estabilidad química adicional de los enlaces éter en los plasmalógenos o las sutiles diferencias en sus estructuras tridimensionales comparadas con las de otros fosfoglicéridos puede tener una importancia fisiológica aún no reconocida.

Una segunda clase de lípidos de membrana es la de los esfingolípidos. Todos estos compuestos son derivados de la esfingosina, un aminoalcohol con una larga cadena hidrocarbonada, y contienen un acilo graso de cadena larga adherido al grupo amino de la esfingosina. En el esfingolípido más abundante; la esfingomielina, la fosfocolina se fija al grupo hidroxilo terminal de la esfingosina (fig. 5-5b). La esfingomielina es, entonces, un fosfolípido, y su estructura global es bastante similar a la de la fosfatidilcolina. Otros esfingolípidos son glucolípidos anfipáticos cuyas cabezas polares son azúcares. El glucosilcerebrósido, el glucoesfingolípido más simple, contiene una unidad de glucosa única ligada a la esfingosina. En los complejos glucoesfingolipídicos llamados *gangliósidos*, una o dos cadenas de azúcares que contienen grupos de ácido siálico están adheridas a la esfingosina. Los glucolípidos constituyen el 2-10% del total de lípidos en las membranas plasmáticas y abundan mayoritariamente en el tejido nervioso.

El colesterol y sus derivados constituyen la tercera clase importante de lípidos de membranas, los esteroides. La estructura básica de los esteroides es de cuatro anillos hidrocarbonados. El colesterol, el principal constituyente esteroide



◀ Fig. 5-5. Tres clases de membranas lipídicas. (a) La mayoría de los fosfoglicéridos son derivados del glicerol 3-fosfato (rojo) que contiene dos cadenas de acilos grasos esterificadas, que constituyen la "cola" hidrófoba y una "cabeza" polar esterificada con fosfato. Los ácidos grasos pueden variar en longitud y ser saturados (sin enlaces dobles) o insaturados (uno, dos o tres enlaces dobles). En la fosfatidilcolina (PC), el grupo cabeza es la colina. También se muestran las moléculas adheridas a los grupos fosfato en otros tres fosfoglicéridos frecuentes: la fosfatidiletanolamina (PE), la fosfatidilserina (PS) y el fosfatidilinositol (PI). (b) Los esfingolípidos son derivados de la esfingosina (rojo), un aminoalcohol con una cadena hidrocarbonada larga. Diversas cadenas de acilos grasos están conectadas a la esfingosina mediante un enlace amida. Las esfingomielinas (SM), que contienen un grupo cabeza de fosfocolina, son fosfolípidos. Otros esfingolípidos son glucolípidos en los que un único residuo de azúcar u oligosacárido ramificado está unido a la columna vertebral de esfingosina. Por ejemplo, el glucolípido simple glucosilcerebrósido (GlcCer) tiene un grupo cabeza de glucosa. (c) Al igual que otros lípidos de membrana, el esteroide colesterol es anfipático. Su único grupo hidroxilo es equivalente al grupo cabeza polar de otros lípidos; el anillo conjugado y la cadena hidrocarbonada corta forman la cola hidrófoba. (Véase H. Sprong et al., 2001, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2:504.)

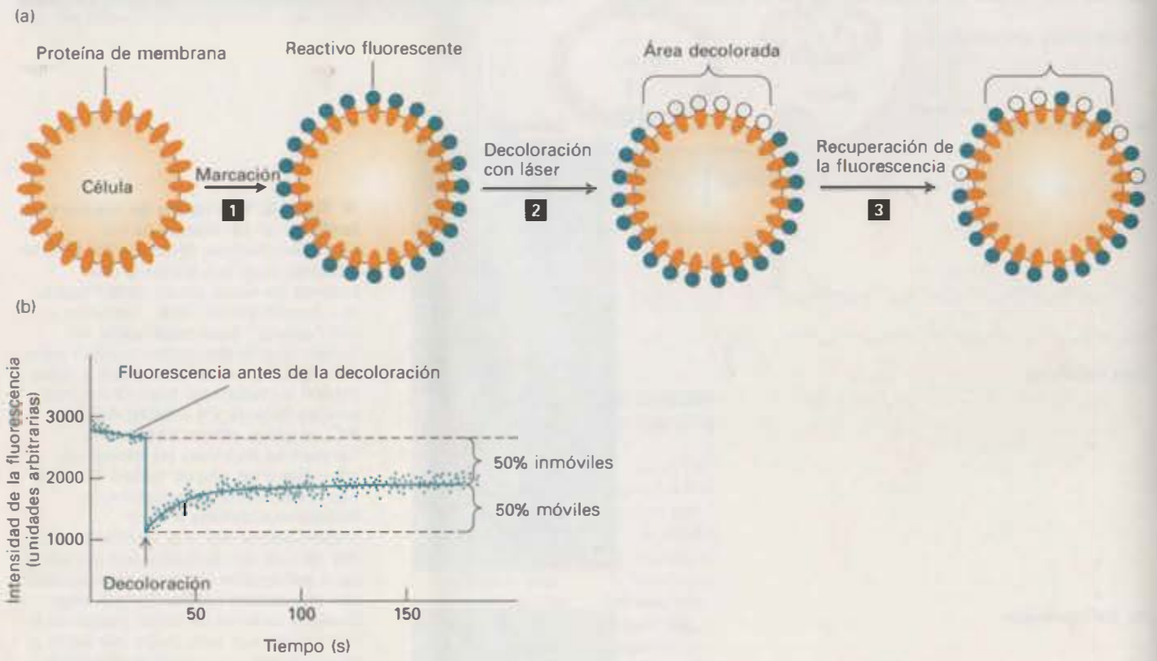
de los tejidos animales, tiene un hidroxilo en uno de los anillos (fig. 5-5c). Aunque el colesterol tiene una composición hidrocarbonada casi exclusiva, es anfipático debido a que su grupo hidroxilo puede interactuar con el agua. El colesterol es abundante sobre todo en las membranas plasmáticas de las células de los mamíferos, pero está ausente en la mayoría de las células procariontes. Hasta un 30-50% de los lípidos de las membranas plasmáticas vegetales contienen ciertos esteroides exclusivos de los vegetales.

A pH neutro, algunos fosfoglicéridos (p. ej., fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina) no tienen carga eléctrica neta, mientras que otros (p. ej., fosfatidilinositol y fosfatidilserina) transportan una carga neta negativa única. Sin embargo, en todos los fosfolípidos las cabezas polares pueden agruparse para formar la estructura bicapa característica. Las esfingomielinas son similares en forma a los fosfoglicéridos y pueden formar bicapas mezcladas con ellas. El colesterol y otros esteroides son demasiado hidrófobos para formar una estructura bicapa a menos que se mezclen con fosfolípidos.

La mayoría de los lípidos y muchas proteínas tienen movilidad lateral en las biomembranas

En el plano bidimensional de una bicapa, el movimiento térmico les permite a las moléculas lipídicas rotar libremente alrededor de sus largos ejes y difundirse lateralmente dentro de cada hojuela. Debido a que tales movimientos son laterales o rotacionales, las cadenas de acilos grasos permanecen en el interior hidrófobo de la bicapa. Tanto en las membranas naturales como en las artificiales, una molécula lipídica típica intercambia lugares con sus vecinas en una hojuela alrededor de 10^7 veces por segundo y se difunde varios micrómetros por segundo a 37 °C. Esta velocidad de difusión indica que la viscosidad de la bicapa es 100 veces mayor que la del agua; aproximadamente la misma viscosidad del aceite de oliva. Aun cuando los lípidos se difunden más lentamente en la bicapa que en un solvente acuoso, un lípido de membrana podría difundirse toda la longitud de una célula bacteriana típica (1 µm) en apenas 1 segundo y toda la longitud de una célula animal en aproximadamente 20 segundos. Los desplazamientos laterales de proteínas y lípidos específicos de la membrana plasmática pueden cuantificarse por medio de una técnica denominada *recuperación de fluorescencia luego de fotodecoloración* (fluorescence recovery after photobleaching, *FRAP*). Con este método, descrito en la figura 5-6, puede determinarse la velocidad a la que se mueven las moléculas lipídicas o proteicas de membrana –el coeficiente de difusión– como también la proporción de moléculas que se desplazan lateralmente.

Los resultados de los estudios de FRAP con fosfolípidos y marcación fluorescente demostraron que en las membranas plasmáticas de los fibroblastos todos los fosfolípidos se mueven con libertad sobre distancias de alrededor de 0,5 µm, pero la mayoría de ellos no pueden difundirse a través de distancias mucho mayores. Estos hallazgos sugieren que regiones de la membrana plasmática ricas en proteínas, de alrededor de 1 µm de diámetro, separan regiones ricas en lípidos que contienen la mayor parte de los fosfolípidos de la membrana. Los fosfolípidos pueden difundirse con libertad dentro de tales regiones, pero no de una región rica en lípidos a una adyacente. Más aún, la velocidad de difusión lateral de los lípidos en la membrana plasmática es casi un orden de magnitud menor que en las bicapas fosfolipídicas: las constantes de difusión de 10^{-8} cm²/seg y 10^{-7} cm²/seg son características de las membranas plasmáticas y las bicapas lipídicas, respectivamente. Esta diferencia sugiere que en algunas membranas los lípidos pueden estar unidos con firmeza pero no irreversiblemente a ciertas proteínas integrales.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 5-6 La recuperación de la fluorescencia luego de los experimentos con fotodecoloración (FRAP) puede cuantificar los movimientos laterales de las proteínas y lípidos dentro de la membrana plasmática. (a) Protocolo experimental. Paso 1: Primero, se marcan las células con un reactivo fluorescente que se adhiere uniformemente a un lípido o proteína de membrana. Paso 2: Luego se enfoca una luz láser sobre un área pequeña, decolorando irreversiblemente el reactivo adherido y reduciendo así la fluorescencia en el área iluminada. Paso 3: Con el tiempo, la fluorescencia de la zona decolorada se incrementa a medida que las moléculas fluorescentes no decoloradas de la superficie se difunden hacia adentro y los decolorados se difunden hacia afuera. El grado de recuperación de la fluorescencia en la zona decolorada es proporcional a la fracción de moléculas marcadas que son móviles en la membrana. (b) Resultados de los experimentos FRAP con células de hepatomas humanas tratadas con un anticuerpo fluorescente específico para la proteína receptora asialoglucoproteína. El hallazgo de que el 50% de la fluorescencia retornó al área decolorada indica que el 50% de las moléculas receptoras en la zona de la membrana irradiada se movieron y que el 50% se mantuvieron inmóviles. Debido a que la velocidad de recuperación de la fluorescencia es proporcional a la velocidad a la cual las moléculas marcadas se movieron dentro de la región decolorada, el coeficiente de difusión de una proteína o lípido en la membrana puede calcularse a partir de esos datos. (Véase Y. I. Henis et al., 1990, *J. Cell Biol.* 111:1409.)

La composición lipídica influye en las propiedades físicas de las membranas

Una célula típica contiene una miríada de tipos de membranas, cada una con propiedades únicas conferidas por su mezcla particular de lípidos y proteínas. Los datos del cuadro 5-1 ilustran las variaciones de la composición lipídica entre diferentes biomembranas. Varios fenómenos contribuyen a estas diferencias. Por ejemplo, las diferencias entre las membranas del retículo endoplasmático (RE) y del aparato de Golgi se explican en gran medida por el hecho de que los fosfolípidos son sintetizados en el RE, mientras que los esfingolípidos lo son en el Golgi. Como resultado, la proporción de esfingomielina, como un porcentaje del total de fósforo lipídico, es alrededor de seis veces más alta en las membranas del Golgi que en las del RE. En otros casos, la translocación de las membranas de un compartimiento celular a otro puede enriquecer selectivamente membranas en ciertos lípidos.

Las diferencias en la composición lipídica pueden también ser propias de la especialización funcional de la membrana. Por ejemplo, la membrana plasmática de las células epiteliales absorbentes que revisten el intestino exhibe dos regiones distintas: la superficie apical enfrenta la luz del intestino y está expuesta a condiciones externas muy variables; la superficie basolateral interactúa con otras células epiteliales y con estructuras extracelulares subyacentes (véase fig. 6-5). En la membrana basolateral de las células polarizadas, la proporción entre esfingolípidos, fosfoglicéridos y colesterol es 0,5:1,5:1, aproximadamente equivalente a la de la membrana plasmática de una célula no polarizada típica sujeta a poco estrés. Por el contrario, la membrana apical de las células intestinales, que están sujetas a un estrés considerable, exhibe una proporción de estos lípidos de 1:1:1. La concentración relativamente alta de esfingolípidos en esta membrana puede

CUADRO 5-1 Principales componentes lipídicos de biomembranas seleccionadas

Fuente/localización	Composición (mol %) PC	PE + PS	SM	Colesterol
Membrana plasmática (eritrocitos humanos)	21	29	21	26
Membrana de mielina (neuronas humanas)	16	37	13	34
Membrana plasmática (*E. coli*)	0	85	0	0
Membrana del retículo endoplasmático (rata)	54	26	5	7
Membrana del Golgi (rata)	45	20	13	13
Membrana mitocondrial interna (rata)	45	45	2	7
Membrana mitocondrial externa (rata)	34	46	2	11
Localización primaria en la hojuela	Exoplasmática	Citosólica	Exoplasmática	Ambas

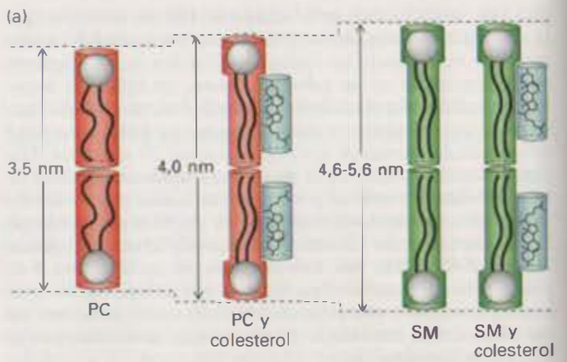
PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PS: fosfatidilserina; SM: esfingomielina.
Fuente: W. Dowhan y M. Bogdanov, 2002, en D. E. Vance y J. E. Vance, eds., *Biochemestry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes*, Elsevier.

incrementar su estabilidad debido a la extensión de los puentes de hidrógeno de los grupos –OH libres de la mitad esfingosina de la molécula (véase fig. 5-5).

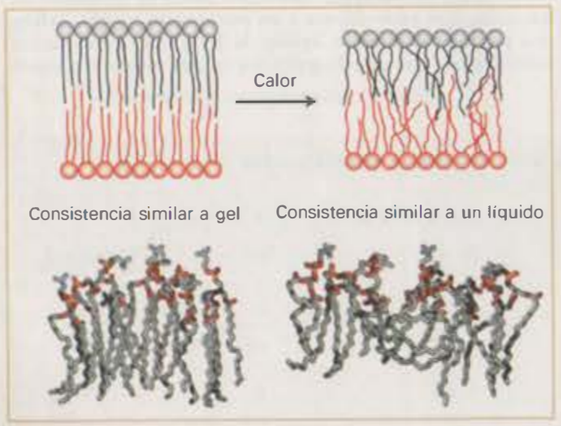
La capacidad de los lípidos para difundirse lateralmente en una bicapa indica que pueden comportarse como un fluido. El grado de fluidez de la bicapa depende de la composición lipídica, la estructura de las colas hidrófobas y la temperatura. Como ya se dijo, las interacciones de van der Waals y el efecto hidrófobo provocan la agregación de las colas no polares de los fosfolípidos. Las cadenas saturadas largas de acilos grasos tienden a agruparse, estrechándose firmemente entre sí hasta adquirir un estado similar al de un gel. Los fosfolípidos con cadenas de acilos grasos cortas, que tienen menos superficie de interacción, forman bicapas más fluidas. De igual forma, debido a las inflexiones de las cadenas de acilos grasos no saturadas, se forman interacciones de van der Waals menos estables y, por ende, más fluidas con otros lípidos que las de las bicapas de cadenas saturadas. Cuando se calienta una bicapa altamente ordenada tipo gel, la movilidad molecular cada vez mayor de las colas de acilos grasos hace que éstas sufran una transición a un estado más fluido y desordenado (fig. 5-7).

A temperaturas fisiológicas habituales, el interior hidrófobo de las membranas naturales suele tener baja viscosidad y consistencia líquida más que de gel. El colesterol es importante para mantener la fluidez de las membranas naturales, la cual parece esencial para el crecimiento y reproducción normal de la célula. Como ya se dijo, el colesterol no puede formar una bicapa laminar por su cuenta. En las concentraciones halladas en las membranas naturales, el colesterol se intercala (inserta) entre los fosfolípidos. El colesterol restringe los movimientos aleatorios de las cabezas de los fosfolípidos, en la superficie externa de las hojuelas, pero su efecto sobre el movimiento de las colas fosfolipídicas largas depende de la concentración. A concentraciones habituales de colesterol, las interacciones del anillo esteroide con las colas hidrófobas largas de los fosfolípidos tienden a inmovilizar estos lípidos y por ende a disminuir la fluidez de las biomembranas. Sin embargo, a bajas concentraciones de colesterol, el anillo esteroide separa y dispersa las colas fosfolipídicas, lo que provoca que las regiones internas de la membrana se tornen ligeramente más fluidas.

La composición lipídica de una bicapa también influye en su espesor, que a su vez puede desempeñar un papel en la localización de una proteína en una membrana en particular.



▲ Fig. 5-8. Efecto de la composición lipídica en el grosor y la curvatura de las bicapas. (a) Una bicapa de esfingomielina (SM) pura es más gruesa que una formada a partir de un fosfoglicérido como la fosfatidilcolina (PC). El colesterol tiene un efecto de ordenamiento lipídico sobre las bicapas de fosfoglicéridos que incrementan su grosor pero que no afecta el grosor de las bicapas de SM que son más ordenadas. (b) Los fosfolípidos, como la PC, tienen una forma cilindrica y forman monocapas más o menos planas, mientras que los que tienen cabezas más pequeñas como la fosfatidiletanolamina (PE) tienen una forma cónica. (c) Una bicapa enriquecida con PC en la hojuela exoplasmática y con PE en la cara citosólica, como en muchas membranas plasmáticas, tendría una curvatura natural. (Adaptado de H. Sprong et al., 2001, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2:504.)



▲ Fig. 5-7. Formas de gel y fluido de la bicapa fosfolipídica. (*Arriba*) Representación de la transición de la forma de gel a la forma fluida. Los fosfolípidos con cadenas largas de acilos grasos saturados tienden a agruparse para formar una bicapa altamente ordenada similar a gel, en la cual existe poca superposición de las colas no polares en las dos hojuelas. El calor desordena las colas no polares e induce una transición de un gel a un fluido dentro de un espectro de temperaturas de sólo algunos grados. Mientras la cadena se desordena, la bicapa también pierde espesor. (*Abajo*) Modelos moleculares de las monocapas fosfolipídicas en los estados fluidos y de gel, como lo determinan los cálculos de dinámica molecular. [(Abajo) basado en H. Heller et al., 1993, *J. Phys. Chem.* 97:8343.]

Los resultados de los estudios con membranas artificiales demuestran que la esfingomielina se asocia para formar bicapas más gruesas y parecidas a un gel que las que forman los fosfolípidos (fig. 5-8a). De manera similar, el colesterol y otras moléculas que disminuyen la fluidez de la membrana incrementan el grosor de ésta. Debido a que las colas de esfingomielina ya están estabilizadas óptimamente, la adición de colesterol no tiene ningún efecto sobre el grosor de una bicapa de esfingomielina.

Otra propiedad dependiente de la composición lipídica de una bicapa es su curvatura local, que depende de los tamaños relativos de las cabezas polares y de las colas no polares de sus fosfolípidos constituyentes. Los lípidos con colas largas y cabezas grandes tienen forma cilíndrica; aquellos con cabezas pequeñas tienen forma de cono (fig. 5-8b). Como resultado, las bicapas compuestas de lípidos cilíndricos son relativamente planas, mientras que las que contienen grandes cantidades de lípidos con forma de cono constituyen bicapas curvadas (fig. 5-8c). Este efecto de la composición lipídica sobre la curvatura de la bicapa puede desempeñar un papel en la formación de fositas y evaginaciones de membrana altamente curvadas, de vesículas de membranas internas y de estructuras especializadas de membrana, como las microvellosidades.

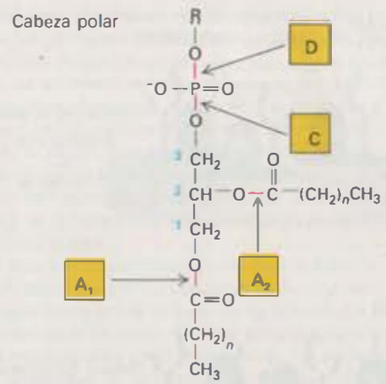
Los lípidos de la membrana suelen distribuirse de manera desigual entre las hojuelas exoplasmática y citosólica

Una característica de todas las membranas es la asimetría en la composición lipídica a lo largo de la bicapa. Aunque la mayoría de los fosfolípidos están presentes en ambas hojuelas de la membrana, casi siempre son más abundantes en una u otra hojuela. Por ejemplo, en las membranas plasmáticas de los eritrocitos humanos y de ciertas células de riñón canino crecidas en cultivos, casi toda la esfingomielina y la fosfatidilcolina, las cuales forman bicapas menos fluidas, se encuentran en la hojuela exoplasmática. Por el contrario, la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol, que forman bicapas más fluidas, se encuentran preferentemente en la hojuela citosólica. Esta segregación de lípidos a través de la bicapa puede influir en la curvatura de la membrana (véase fig. 5-8c). A diferencia de los fosfolípidos, el colesterol se distribuye de manera bastante más equitativa entre ambas hojuelas de las membranas celulares.

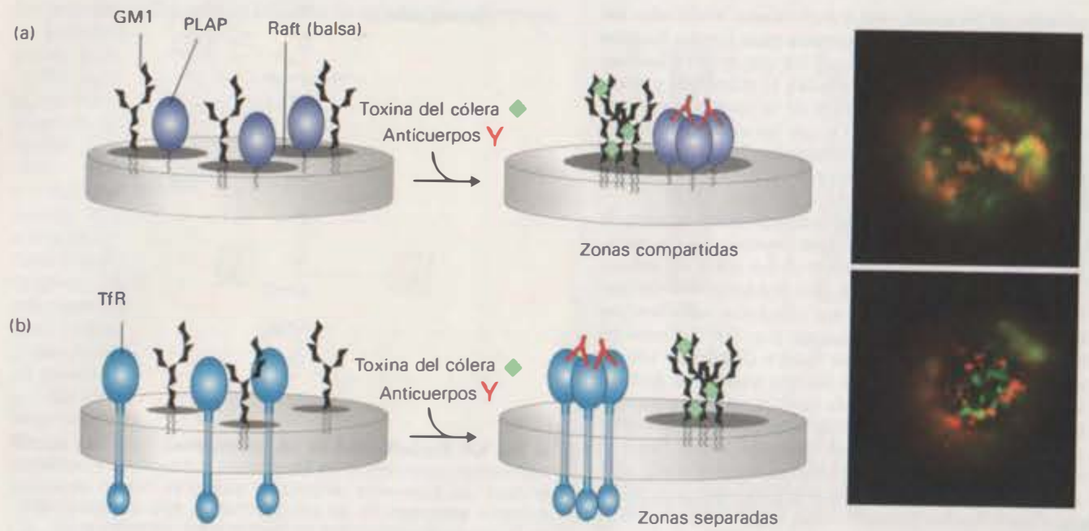
La abundancia relativa de un fosfolípido en particular en las dos hojuelas de una membrana plasmática puede determinarse sobre la base de su susceptibilidad a la hidrólisis por fosfolipasas, enzimas que pueden escindir diversos enlaces en los extremos hidrófilos de los fosfolípidos (fig. 5-9). Los fosfolípidos de la hojuela citosólica son resistentes a la hidrólisis por fosfolipasas añadidas al medio externo porque las enzimas no pueden penetrar en la cara citosólica de la membrana plasmática.

Aún es incierto cómo surge la distribución asimétrica de los fosfolípidos en las hojuelas de las membranas. En las bicapas puras, los fosfolípidos no migran de manera espontánea o alternan de una hojuela a la otra (*flip-flop*). Energéticamente, tal movimiento alternado es muy desfavorable porque implica el movimiento de la cabeza polar de los fosfolípidos a través del interior hidrófobo de la membrana. En una primera aproximación, la asimetría en la distribución de fosfolípidos es el resultado de la síntesis vectorial de lípidos en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi. La esfingomielina se sintetiza sobre la cara luminal (exoplasmática) del Golgi, que se convierte en la cara exoplasmática de la membrana plasmática. En cambio, los fosfoglicéridos se sintetizan en la superficie citosólica de la membrana reticuloendotelial, la cual es topográficamente idéntica a la superficie citosólica de la membrana plasmática (véase fig. 5-4). Sin duda, esto no explica el porqué de la ubicación preferencial de la fosfatidilcolina en la hojuela exoplasmática. El movimiento de este fosfoglicérido y quizá de otros de una hojuela a la otra en algunas membranas naturales es catalizado por ciertas proteínas transportadoras impulsadas por ATP denominadas **flipasas**, tratadas en los capítulos 7 y 18.

La ubicación preferencial de los lípidos en una cara de la bicapa es necesaria para diversas funciones basadas en la membrana. Por ejemplo, las cabezas de todas las formas fosforiladas del fosfatidilinositol enfrentan el citosol. Algunas de ellas son escindidas por la fosfolipasa C ubicada en el citosol; esta enzima a su vez es activada como resultado de la estimulación celular por muchas hormonas. Estas escisiones generan fosfoinositoles solubles en el citosol y diacilglicerol soluble en la membrana. Como veremos en los próximos capítulos, estas moléculas participan en las vías de señalización que afectan muchos aspectos del metabolismo celular. La fosfatidilserina también suele abundar en la hojuela citosólica de la membrana plasmática. En las etapas iniciales de la estimulación de las plaquetas por el suero, la fosfatidilserina es translocada brevemente a la cara exoplasmática, tal vez por una enzima flipasa, donde activa enzimas que participan en la coagulación de la sangre.



▲ Fig. 5-9. Especificidad de las fosfolipasas. Cada tipo de fosfolipasas escinde uno de los enlaces susceptibles mostrados en rojo. Los átomos de carbono del glicerol se indican con números pequeños. En las células intactas, sólo los fosfolípidos de la hojuela exoplasmática de la membrana plasmática son escindidos por las fosfolipasas del medio circundante. La fosfolipasa C, una enzima citosólica, escinde ciertos fosfolípidos de la hojuela citosólica de la membrana plasmática.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 5-10 Algunos lípidos y proteínas de membrana se colocalizan en "rafts" lipídicos. Los resultados de estudios bioquímicos sugirieron que GM1, un glucoesfingolípido, y la fosfatasa alcalina placentaria (PLAP), una proteína de membrana anclada por lípidos, se agrupan para formar un "raft" lipídico, mientras que el receptor transferrina (TfR), que atraviesa toda la membrana, no lo hace. Para localizar estos componentes en la membrana plasmática intacta, las células fueron tratadas con la toxina del cólera marcada con fluorescencia (verde), que entrecruza las moléculas de GM1 separadas por poca distancia, y con anticuerpos marcados con fluorescencia (rojo) específicos para la PLAP o el TfR. Cada anticuerpo puede entrecruzar moléculas de la proteína que reconoce separadas por poca distancia. Los entrecruzamientos hacen que las proteínas o lípidos formen parches o zonas más grandes que pueden ser detectados por microscopia de fluorescencia (véase fig. 5-42). (a) Microfotografía de una célula tratada con toxina y con anticuerpos anti-PLAP muestra los GM1 y las PLAP colocalizados en las mismas zonas (amarillo). Estas zonas compartidas sugieren que tanto el GM1 como la PLAP están presentes en los "raft" lipídicos que se combinan en presencia de los reactivos de formación de enlaces cruzados. (b) Microfotografía de una célula tratada con toxina y con anticuerpo anti-TfR que muestra que los GM1 y los TfR residen en zonas separadas (es decir, rojo y verde), lo que indica que el TfR no es una proteína residente en los rafts. (Microfotografías de T. Harder et al., 1998, *J. Cell Biol.* 141:929.)

El colesterol y los esfingolípidos se agrupan con proteínas específicas en microdominios de membrana

El resultado de estudios recientes ha desafiado la creencia mantenida durante mucho tiempo de que los lípidos se mezclan de manera aleatoria en cada hojuela de una bicapa. El primer indicio de que los lípidos pueden estar organizados dentro de las hojuelas fue el descubrimiento de que los residuos que quedaban luego de la extracción de las membranas plasmáticas con detergentes contenían dos lípidos: colesterol y esfingomielina. Debido a que estos dos lípidos se encuentran en bicapas más ordenadas y menos fluidas, los investigadores formularon la hipótesis de que forman microdominios, denominados "rafts" lipidic (balsas lipídicas), rodeados por otros fosfolípidos más fluidos que son fácilmente extraídos por detergentes.

La evidencia bioquímica y microscópica avala la existencia de "rafts" lipídicos en las membranas naturales. Por ejemplo, la microscopia fluorescente revela agrupaciones de lípidos y proteínas específicas de rafts en la membrana (fig. 5-10). Si bien los "rafts" lipídicos son heterogéneos en tamaño, tienen un diámetro típico de 50 nm. Estos rafts pueden ser desestabilizados por metil-β-ciclodextrina, que reduce el colesterol de la membrana, o por antibióticos, como la filipina, que secuestran el colesterol; tales descubrimientos indican la importancia del colesterol en el mantenimiento de la integridad de los rafts. Además del enriquecimiento en colesterol y esfingolípidos, los "rafts" lipídicos están enriquecidos en muchos tipos de proteínas receptoras de la superficie celular, así como en muchas proteínas señalizadoras que se unen a los receptores y son activadas por ellos. Estos complejos proteína-lípidos sólo pueden formarse en el ambiente bidimensional de una bicapa hidrofóba y, como se explica en capítulos posteriores, se cree que facilitan la detección de señales químicas del ambiente externo y la activación subsecuente de eventos citosólicos.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 5.1

Biomembranas: composición lipídica y organización estructural

- La célula eucarionte está separada del ambiente externo por la membrana plasmática y organizada en compartimientos internos limitados por membranas (orgánulos y vesículas).
- El área total de las membranas internas excede por mucho al de la membrana plasmática.
- La bicapa fosfolipídica, la unidad estructural básica de todas las biomembranas, es una lámina lipídica bidimensional con caras hidrófilas y un núcleo hidrófobo, que es impermeable a las moléculas e iones solubles en agua (véase fig. 5-2).
- Ciertas proteínas presentes en las biomembranas las hacen selectivamente permeables a moléculas e iones solubles en agua.
- Los principales componentes lipídicos de las biomembranas son fosfoglicéridos, esfingolípidos y esteroides (véase fig. 5-5).
- La mayoría de los lípidos y muchas proteínas de las biomembranas tienen movilidad lateral.
- Las distintas membranas celulares varían en la composición lipídica (véase cuadro 5-1). Los fosfolípidos y los esfingolípidos se distribuyen asimétricamente en las dos hojuelas de la bicapa, mientras que el colesterol se distribuye en forma medianamente equitativa en ambas hojuelas.
- Las biomembranas naturales suelen tener una consistencia similar a un fluido. En general, la fluidez de la membrana es atenuada por los esfingolípidos y el colesterol e intensificada por los fosfoglicéridos. La composición lipídica de una membrana también influye en su grosor y curvatura (véase fig. 5-8).
- Los "rafts" lipídicos son microdominios que contienen colesterol, esfingolípidos y ciertas proteínas de membrana que se forman en el plano de la bicapa. Estos agregados son sitios para la señalización a través de la membrana plasmática.

5.2 Biomembranas: componentes proteicos y funciones básicas

Las proteínas de membrana se definen por su localización en la superficie de una bicapa fosfolipídica o en el interior de ella. Aunque cada membrana biológica posee la misma estructura de bicapa, las proteínas asociadas con una membrana en particular son responsables de sus actividades distintivas. La densidad y la dotación de las proteínas asociadas con biomembranas varían según el tipo de célula y la ubicación subcelular. Por ejemplo, la membrana mitocondrial interna tiene un 76% de proteína; la membrana de mielina tiene sólo un 18%. El alto contenido fosfolipídico de la mielina le permite aislar eléctricamente a una célula nerviosa de su entorno. La importancia de las proteínas de membrana se sugiere a partir del hallazgo de que cerca de un tercio de todos los genes de levadura codifican proteínas de membrana. La relativa abundancia de genes para las proteínas de membrana es aún mayor en los organismos multicelulares, en los cuales las proteínas de membrana tienen funciones adicionales en la adhesión celular.

La bicapa lipídica presenta un ambiente hidrófobo bidimensional apropiado para las proteínas de membrana. Algunas proteínas están enterradas en la bicapa rica en lípidos; otras están asociadas con la hojuela exoplasmática o citosólica de la bicapa. Los dominios proteicos de la superficie extracelular de la membrana plasmática suelen unirse a otras moléculas, incluidas las proteínas externas de señalización, los iones, y los metabolitos pequeños (p. ej., glucosa, ácidos grasos), y a moléculas de adhesión de otras células o del ambiente externo. Los dominios dentro de la membrana plasmática, sobre todo los que forman canales y poros, mueven moléculas dentro y fuera de la célula. Los dominios que se extienden a lo largo de la cara citosólica de la membrana plasmática tienen un amplio abanico de funciones, desde el anclaje de proteínas citoesqueléticas a la membrana hasta desencadenar la señalización de vías intracelulares.

En muchos casos puede predecirse la función de una proteína de membrana y la topología de su cadena polipeptídica en la membrana sobre la base de su homología con otra proteína bien caracterizada. En esta sección examinamos los aspectos estructurales característicos de las proteínas de membrana y algunas de sus funciones básicas. En varios de los capítulos siguientes se presenta una caracterización más completa de la estructura y función de diversos tipos de proteínas de membrana; en los capítulos 16 y 17 se tratan la síntesis y el procesamiento de este grupo grande y diverso.

Las proteínas interactúan con las membranas de tres maneras diferentes

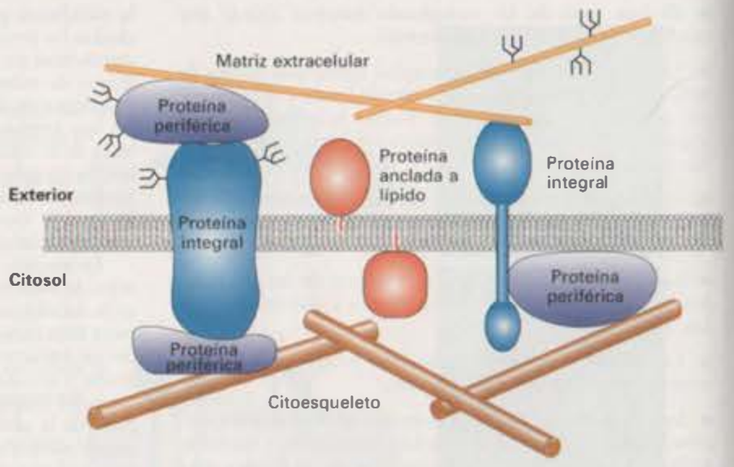
Las proteínas de membrana se pueden clasificar en tres categorías –integrales, ancladas por lípidos y periféricas– sobre la base de la naturaleza de las interacciones entre la membrana y la proteína (fig. 5-11).

Las proteínas integrales de membrana, también denominadas *proteínas transmembrana*, atraviesan una bicapa fosfolipídica y se componen de tres segmentos. Los dominios citosólicos y exoplasmáticos tienen superficies exteriores hidrófilas que interactúan con las soluciones acuosas en las caras citosólica y exoplasmática de la membrana. Estos dominios se asemejan a otras proteínas solubles en agua en su composición de aminoácidos y estructura. Por el contrario, el dominio de 3 nm de grosor que atraviesa la membrana contiene muchos aminoácidos hidrófobos cuyas cadenas laterales se proyectan hacia afuera e interactúan con el núcleo hidrocarbonado de la bicapa fosfolipídica. En todas las proteínas transmembrana examinadas hasta la fecha, los dominios que abarcan la membrana constan de una o más hélices α o de múltiples cadenas β. Además, la mayoría de las proteínas transmembrana están glucosiladas con un grupo azúcar ramificado unido a una o varias cadenas laterales de aminoácidos. Estas cadenas de azúcares se localizan siempre en los dominios exoplasmáticos.

Las proteínas de membrana ancladas a lípidos se unen en forma covalente a una o más moléculas lipídicas. La cadena carbonada hidrófoba del lípido al que se adhieren está inmersa en una hojuela y ancla la proteína a la membrana. La cadena polipeptídica en sí misma no entra en la bicapa fosfolipídica.

Las proteínas periféricas de membrana no interactúan con el núcleo hidrófobo de la bicapa fosfolipídica. En cambio, suelen unirse a la membrana de manera indirecta mediante interacciones con proteínas integrales de membrana o directamente mediante interacciones con las cabezas de los lípidos. Las proteínas periféricas se localizan en la cara citosólica o en la cara exoplasmática de la membrana.

Además de estas proteínas, vinculadas estrechamente con la bicapa, los filamentos citoesqueléticos se asocian en forma más laxa con la cara citosólica, casi siempre a tra-



▶ Fig. 5-11. Diagrama de cómo diversas clases de proteínas se asocian con la bicapa lipídica. Las proteínas integrales (transmembrana) atraviesan la bicapa. Las proteínas ancladas a lípidos están atadas a una hojuela por una cadena hidrocarbonada larga fijada en forma covalente. Las proteínas periféricas se asocian con la membrana principalmente mediante interacciones específicas no covalentes con proteínas integrales o lípidos de membrana. Más alejadas de la membrana se encuentran las proteínas asociadas con la membrana, incluidas las del citoesqueleto, la matriz extracelular en las células animales y la pared celular en las células vegetales y bacterianas (no representadas). Las cadenas de carbohidratos están unidas a muchas proteínas extracelulares y al dominio exoplasmático de muchas proteínas transmembrana.

vés de una o más proteínas periféricas (adaptadoras) (véase fig. 5-11). Tales asociaciones con el citoesqueleto proveen apoyo para varias membranas celulares (véase sección 5.4); también desempeñan un papel en la comunicación de dos vías entre el interior y el exterior de la célula, como se verá en el capítulo 6. Por último, las proteínas periféricas sobre la superficie exterior de la membrana plasmática y los dominios exoplasmáticos de proteínas de membrana integrales a menudo se adhieren a componentes de la matriz extracelular o de la pared celular que rodea a las células bacterianas y vegetales.

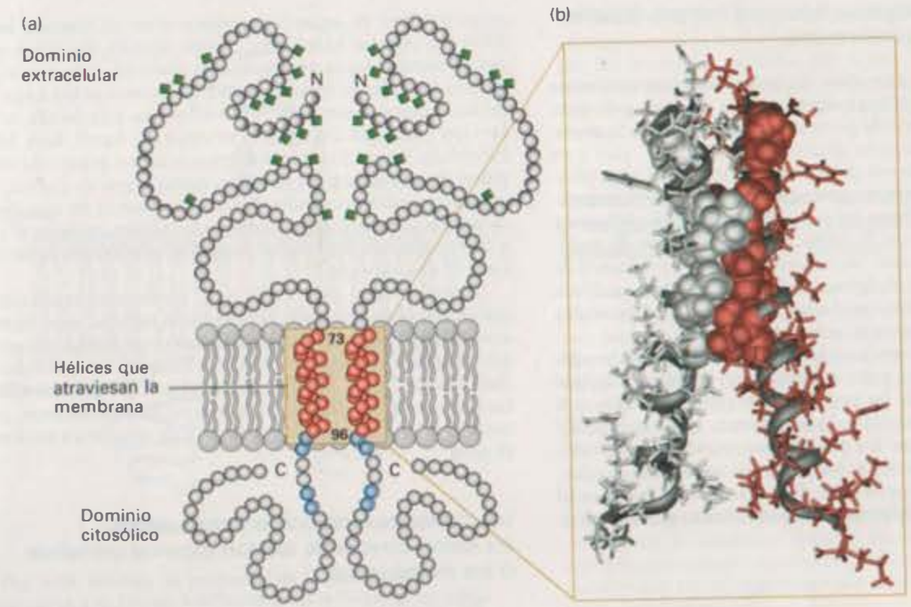
Las hélices α inmersas en la membrana son las principales estructuras secundarias de la mayoría de las proteínas transmembrana

Las proteínas solubles exhiben cientos de distintas estructuras plegadas localizadas llamadas motivos (véase fig. 3-6). En comparación, el repertorio de estructuras plegadas de las proteínas integrales de membrana es bastante limitado y predomina la hélice α hidrófoba. Las proteínas integrales que contienen dominios hélice α que atraviesan la membrana están insertadas en las membranas mediante interacciones hidrófobas con lípidos específicos y probablemente también mediante interacciones iónicas con las cabezas polares de los fosfolípidos.

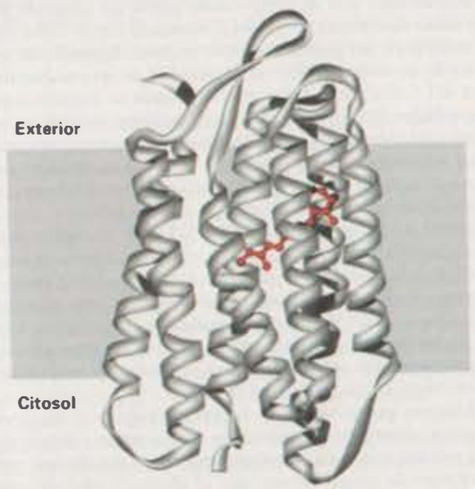
La glucoforina A, la proteína más abundante de la membrana plasmática del eritrocito, es una proteína transmembrana *de un solo paso*, que contiene sólo una hélice α que atraviesa la membrana (fig. 5-12). Una hélice α típica insertada en la membrana se compone de 20-25 aminoácidos hidrófobos (no cargados) (véase fig. 2-13). La longitud predicha de tal hélice (3,75 nm) es apenas suficiente para atravesar el núcleo hidrocarbonado de la bicapa fosfolipídica. Las cadenas laterales hidrófobas se proyectan hacia afuera de la hélice y forman interacciones de van der Waals con las cadenas de acilos grasos de las bicapas. A su vez, los grupos carbonilo (C═O) e imino (NH), que participan en la formación del esqueleto de enlaces peptídicos a través de los enlaces (puentes) de hidrógeno, se encuentran en el interior de la hélice α (véase fig. 3-3); así, estos grupos polares están resguardados del interior hidrófobo de la membrana. La hélice transmembrana de una molécula de glucoforina A se asocia con la hélice de otra para formar un dímero en espiral enrollada (véase fig. 5-12b). Tal interacción de hélices que atraviesan la membrana es un mecanismo común para crear proteínas de membrana diméricas. Muchos receptores de la superficie celular, por ejemplo, se activan por dimerización.

Existe una gran e importante familia de proteínas integrales que se define por la presencia de siete hélices α que atraviesan la membrana. Entre las más de 150 de estas proteínas *multipaso* de "siete pasos" que han sido identificadas se encuentran las proteínas G acopladas a receptores descritos en el capítulo 13. La estructura de la bacteriorrodopsina, una proteína que se encuentra en la membrana de ciertas bacterias fotosintéticas, ilustra la estructura general de todas estas proteínas (fig. 5-13). La absorción de luz por el grupo retinal fijado en forma covalente a la bacteriorrodopsina produce un cambio conformacional en la proteína que se traduce en el bombeo de protones desde el citosol a través de la membrana bacteriana hacia el espacio extracelular. En consecuencia, el gradiente de concentración de protones así generado a través de la membrana se utiliza para sintetizar ATP (cap. 8). En la estructura de alta resolución de la bacteriorrodopsina actualmente disponible, se puede determinar la posición de todos los aminoácidos individuales del retinal y los lípidos circundantes. Como se podría esperar, casi todos los aminoácidos en el exterior de los segmentos de la bacteriorrodopsina que atraviesan la membrana son hidrófobos e interactúan con el núcleo hidrocarbonado de la bicapa lipídica circundante.

Los canales de iones componen una segunda familia extensa e importante de proteínas transmembrana multipaso. Como lo revela la estructura cristalina de un canal de K^+, los canales de iones son, típicamente, proteínas tetraméricas. Cada una de las cuatro subunidades tiene un par de hélices que atraviesan la membrana y se unen con las hélices de otras



▲ Fig. 5-12. Estructura de la glucoforina A, una proteína transmembrana típica de un solo paso. (a) Diagrama de la glucoforina dimérica que muestra las características principales de la secuencia y su relación con la membrana. La única hélice α de 23 residuos que atraviesa la membrana ubicada en cada monómero está compuesta de aminoácidos con cadenas laterales (esferas rojas) hidrófobas (descargadas). Al unir los polipéptidos de las de cabezas cargadas negativamente, los residuos de arginina y lisina cargados positivamente (esferas azules) cerca del lado citosólico de la hélice ayudan a anclar la glucoforina a la membrana. Tanto el dominio extracelular como el citosólico son ricos en residuos cargados y en residuos polares descargados; el dominio extracelular está densamente glucosilado, con las cadenas laterales de carbohidratos (diamantes verdes) adheridos a residuos específicos de serina, treonina y asparagina. (b) Modelo molecular del dominio transmembrana de la glucoforina dimérica correspondiente a los residuos 73-96. Las cadenas laterales de la hélice α en un monómero se muestran en rojo; las del otro monómero, en gris. Los residuos representados como estructuras espaciales rellenas participan en las interacciones de van der Waals entre monómeros que estabilizan el dímero en espiral enrollada. [Parte (b) adaptada de K. R. MacKenzie et al., 1997, *Science* 276:131.]



subunidades formando un canal central (véase fig. 7-15). Los residuos polares e hidrófobos que revisten el centro del haz forman un canal en la membrana pero, al igual que con la bacteriorrodopsina, virtualmente todos los aminoácidos en el exterior del dominio que atraviesa la membrana, son hidrófobos. En muchos canales de iones, los factores externos (p. ej., ligando, voltaje o tensión mecánica) regulan el flujo de iones a través de la bicapa al reorientar las hélices. En el capítulo 7 se detallan los canales de iones y sus estructuras.

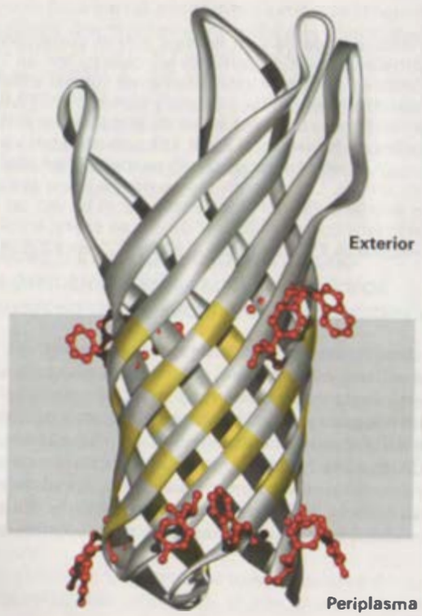
◀ Fig. 5-13. Modelo estructural de la bacteriorrodopsina, una proteína transmembrana multipaso que funciona como un fotorreceptor en ciertas bacterias Las siete hélices α hidrófobas en la bacteriorrodopsina atraviesan la bicapa lipídica. Una molécula de retinal (rojo) adherida en forma covalente a una hélice α absorbe la luz. Los receptores acoplados a la proteína G de las células eucariontes también tienen siete hélices α que atraviesan la membrana; su estructura tridimensional es similar a la de la bacteriorrodopsina. (Según H. Luecke et al., 1999, *J. Mol. Biol.* 291:899.)

En las porinas múltiples cadenas β forman "barriles" que atraviesan la membrana

Las porinas son una clase de proteínas transmembrana cuya estructura difiere radicalmente de la de otras proteínas integrales. Varios tipos de porinas se encuentran en la membrana exterior de bacterias gramnegativas como *E. coli* y en las membranas exteriores de la mitocondria y los cloroplastos. La membrana exterior protege a las bacterias intestinales de los agentes dañinos (p. ej,. antibióticos, sales biliares y proteasas), pero permite la captación y eliminación de moléculas hidrófilas pequeñas, incluidos nutrientes y productos de desecho. Las porinas de la membrana externa de una célula de *E. coli* proporcionan canales para el pasaje de disacáridos y otras moléculas pequeñas, así como fosfatos.

Las secuencias de aminoácidos de las porinas son predominantemente polares y no contienen los segmentos hidrófobos largos típicos de las proteínas integrales con dominios α helicoidales que atraviesan la membrana. La cristalografía por rayos X reveló que las porinas son trímeros de subunidades idénticas. En cada subunidad, 16 cadenas β conforman una estructura con forma de barril con un poro en el centro (fig. 5-14). A diferencia de las proteínas globulares típicas solubles en agua, una porina tiene un interior hidrófilo y un exterior hidrófobo; en este sentido, las porinas tienen el interior hacia afuera. En un monómero de porina, los grupos laterales orientados hacia el exterior sobre cada una de las cadenas β son hidrófobos y forman una banda no polar tipo cinta que circunda el exterior del barril. Esta banda hidrófoba interactúa con los grupos acilos grasos de los lípidos de membrana o con otros monómeros de porina. Los grupos laterales orientados hacia el interior de un monómero de porina son predominantemente hidrófilos; revisten el poro a través del cual moléculas pequeñas solubles en agua atraviesan la membrana.

Como se trata en el capítulo 7, las membranas plasmáticas de las células animales contienen un canal acuoso llamado *acuaporina*. Al igual que muchas otras proteínas integrales, las acuaporinas contienen múltiples hélices α transmembrana. Así, a pesar de su nombre, las acuaporinas difieren estructuralmente de las porinas al igual que funcionalmente, en el sentido de que median el transporte de una única molécula, el agua.



▲ Fig. 5-14. Modelo estructural de una subunidad de OmpX, una porina que se encuentra en la membrana exterior de *E. coli*. Todas las porinas son proteínas triméricas transmembrana. Cada subunidad tiene forma de barril, con hebras β que forman la pared y un poro transmembrana en el centro. Una banda de cadenas laterales alifáticas (no cíclicas) (amarillo) y un borde de cadenas laterales aromáticas (que contienen anillos) (rojo) posicionan la proteína en la bicapa. (Según G. E. Schulz, 2000, *Curr. Opin. Struc. Biol.* 10:443.)

Las cadenas hidrocarbonadas unidas en forma covalente anclan algunas proteínas a las membranas

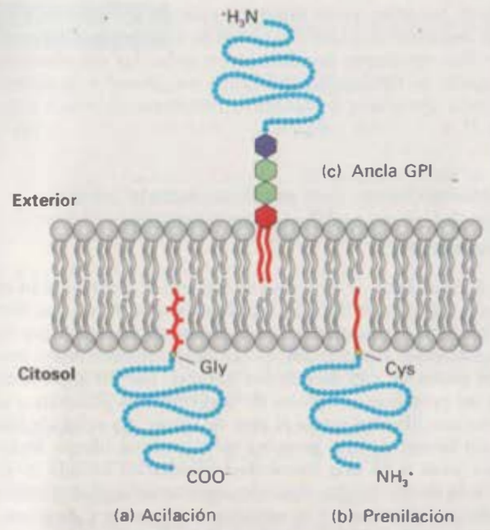
En las células eucariontes, varios tipos de lípidos fijados en forma covalente anclan algunas proteínas a una u otra hojuela de la membrana plasmática y algunas otras membranas celulares. En estas proteínas ancladas por lípidos, las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos se insertan en la bicapa, pero la proteína en sí misma no la penetra.

Un grupo de proteínas citosólicas está anclado a la cara citosólica de una membrana por medio de un grupo acilo graso (p. ej., miristato o palmitato) unido al residuo de glicina N-terminal (fig. 5-15a). La retención de tales proteínas en la membrana por el ancla del acilo N-terminal puede tener un papel importante en la función asociada con una membrana. Por ejemplo, v-Src, una forma mutante de una tirosincinasa celular es oncogénica y puede transformar células sólo cuando tiene un N-terminal miristilado.

Un segundo grupo de proteínas citosólicas está anclado a las membranas por un grupo acilo graso no saturado fijado al residuo de cisteína cerca del C-terminal (fig. 5-15b). En estas proteínas, un grupo farnesilo o geranilgeranilo se une a través de un enlace tioéter al grupo –SH de un residuo de cisteína del C-terminal. Estas *anclas prenilo* se forman a partir de unidades de isopreno (C_5), que también se utilizan en la síntesis del colesterol (cap. 18). En algunos casos, un segundo grupo geranilgeranilo o palmitato se une a un residuo de cisteína cercano. Se piensa que el ancla adicional refuerza la fijación de la proteína a la membrana. La proteína Ras, que pertenece a la superfamilia de las GTPasa y cumple funciones en la señalización intracelular, está ubicada en la cara citosólica de la membrana plasmática por esa doble ancla. Las proteínas Rab, que también pertenecen a la superfamilia de las GTPasa, están similarmente unidas a la superficie citosólica de las vesículas intracelulares por anclas tipo prenil; estas proteínas son requeridas para la fusión de vesículas con sus membranas diana (cap. 17).

Algunas proteínas de la superficie celular y los proteoglucanos altamente glucosilados de la matriz extracelular están unidos a la cara exoplasmática de la membrana por un tercer tipo de grupo de anclaje, el glucosilfosfatidilinositol (GPI). Las estructuras exactas de las *anclas GPI* varían enormemente en diferentes tipos de células, pero siempre contienen fosfatidilinositol (PI), cuyas dos cadenas de acilos grasos se extienden hacia el interior de la bicapa lipídica; fosfoetanolamina, que une en forma covalente el ancla al C-terminal de una proteína; y varios residuos de azúcar (fig. 5-15c). Diversos experimentos han demostrado que el ancla GPI es tanto necesaria como suficiente para la unión de proteínas a la membrana. Por ejemplo, la enzima fosfolipasa C escinde el enlace fosfato-glicerol de los fosfolípidos y de las anclas GPI (véase fig. 5-9). El tratamiento de células con la fosfolipasa C libera proteínas ancladas por GPI, como Thy-1 y fosfatasa alcalina placentaria (PLAP) de la superficie celular.

Como ya se dijo, la PLAP se concentra en los "rafts" lipídicos, microdominios de la bicapa más ordenados que están enriquecidos en esfingolípidos y colesterol (véase fig. 5-10).



▲ Fig. 5-15. Anclaje de proteínas de la membrana plasmática a la bicapa mediante grupos hidrocarbonados unidos en forma covalente. (a) Las proteínas citosólicas como v-Src están asociadas con la membrana plasmática a través de una cadena única de acilo graso adherida al residuo de glicina del N terminal (Gly) del polipéptido. El miristato (C_{14}) y el palmitato (C_{16}) son anclas acilo habituales. (b) Otras proteínas citosólicas (p. ej., las proteínas Ras y Rab) están ancladas a la membrana mediante prenilación de uno o dos residuos de cisteína (Cys) C-terminal o cerca de él. Las anclas son grupos farnesil (C_{15}) o geranilgeranilo (C_{20}), los cuales son insaturados. (c) El ancla lipídica en la superficie exoplasmática de la membrana plasmática es el glucosilfosfatidilinositol (GPI). La parte fosfatidilinositol (rojo) de este ancla contiene dos cadenas de acilos grasos que se extienden hacia la bicapa. La unidad fosfoetanolamina (violeta) en el ancla la une a la proteína. Los dos hexágonos verdes representan unidades de azúcares, que varían en número y disposición en diferentes anclas GPI. La estructura completa del ancla GPI de la levadura se muestra en la figura 16-14. (Adaptado de H. Sprong, et al., 2001, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2:504.)

Aunque la PLAP y otras proteínas ancladas al GPI se encuentran en la hojuela de membrana opuesta a la que están las proteínas ancladas por acilos, ambos tipos de proteínas de membrana están concentradas en "rafts" lipídicos. Por el contrario, las proteínas preniladas no se encuentran en los "rafts" lipídicos.

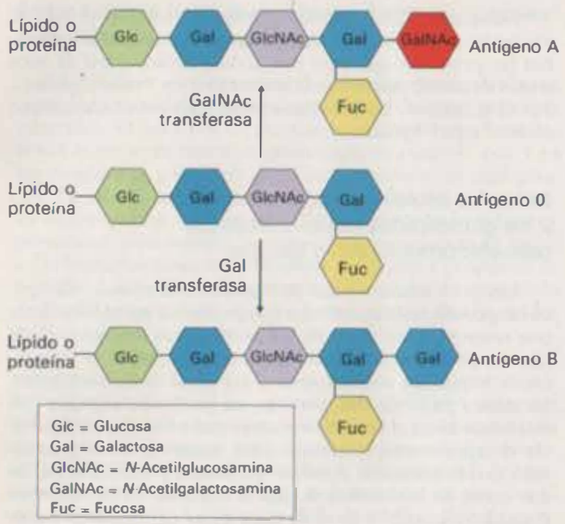
Todas las proteínas transmembrana y los glucolípidos están orientados asimétricamente en la bicapa

Las proteínas ancladas por lípidos son sólo un ejemplo de las proteínas de membrana que se ubican asimétricamente con respecto a las caras de las membranas celulares. Cada tipo de proteínas transmembrana tiene también una orientación específica con respecto a las caras de la membrana. La misma parte de una proteína en particular siempre está orientada hacia el citosol, mientras que otras partes dan hacia el espacio exoplasmático. Esta asimetría en la orientación de las proteínas confiere diferentes propiedades a las dos caras de la membrana. (En el capítulo 16 describimos cómo la orientación de diferentes tipos de proteínas transmembrana se establece durante su síntesis.) Nunca se observaron proteínas de membrana alternando a través de una membrana; tal movimiento, que requiere un pasaje transitorio de los residuos hidrófilos de aminoácidos a través del interior hidrófobo de una membrana, sería energéticamente desfavorable. En consecuencia, la asimetría de una proteína transmembrana, que se establece durante su biosíntesis e inserción dentro de una membrana, se mantiene durante toda la vida de una proteína.

Muchas proteínas transmembrana contienen cadenas de carbohidratos unidas en forma covalente a las cadenas laterales de serina, treonina o asparagina del polipéptido. Estas glucoproteínas transmembrana se orientan siempre en forma tal que las cadenas de carbohidratos se encuentran en el dominio exoplasmático (véanse figs. 5-11 y 5-12). Asimismo, los glucolípidos, en los cuales una cadena de carbohidratos está adherida al esqueleto de glicerol o de esfingosina, se ubican en la hojuela exoplasmática con la cadena de carbohidratos proyectándose desde la superficie de la membrana. Tanto las glucoproteínas como los glucolípidos son especialmente abundantes en las membranas plasmáticas de las células eucariontes; están ausentes en la membrana mitocondrial interna, la laminilla de los cloroplastos y otras diversas membranas intracelulares. Como las cadenas de carbohidratos de las glucoproteínas y los glucolípidos en la membrana plasmática se extienden hacia el espacio extracelular, están disponibles para interactuar con componentes de la matriz extracelular al igual que las lectinas, los factores de crecimiento y los anticuerpos.

MEDICINA

Una consecuencia importante de tales interacciones se ilustra con los antígenos de los grupos sanguíneos A, B y 0. Estos tres componentes oligosacáridos estructuralmente relacionados de ciertas glucoproteínas y glucolípidos se expresan en la superficie de los eritrocitos humanos y en muchos otros tipos celulares (fig. 5-16). Todos los seres humanos tienen las enzimas para sintetizar los antígenos 0. Las personas con el tipo de sangre A también tienen una glucosiltransferasa que añade una N-*acetilgalactosamina* extra al antígeno 0 para formar el antígeno A. Aquellos con el tipo de sangre B tienen una transferasa dife-



▲ Fig. 5-16. Antígenos de los grupos sanguíneos AB0. Estos antígenos son cadenas de oligosacáridos unidos en forma covalente a glucolípidos o glucoproteínas en la membrana plasmática. Los azúcares terminales de los oligosacáridos distinguen a los tres antígenos. La presencia o ausencia de las glucosiltransferasas que añaden galactosa (Gal) o *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) al antígeno del 0 determina el tipo de sangre de una persona.

rente que añade una galactosa extra al antígeno 0 para formar el antígeno B. Las personas con ambas transferasas producen los dos antígenos A y B (tipo sanguíneo AB); quienes carecen de estas transferasas producen sólo el antígeno 0 (tipo sanguíneo 0).

Las personas cuyos eritrocitos carecen de antígenos A, antígenos B o ambos en sus superficies normalmente tienen anticuerpos contra el antígeno(s) faltante en sus sueros. Así, si una persona de tipo A o 0 recibe una transfusión de tipo de sangre B, los anticuerpos contra el epítopo B se unirán a las células rojas introducidas y causarán su destrucción. Para prevenir tales reacciones perniciosas, en todas las transfusiones se requiere la tipificación del grupo sanguíneo y la correspondencia apropiada de dadores y receptores de sangre (cuadro 5-2). ▮

CUADRO 5-2 Grupos sanguíneos AB0

Tipo de grupo sanguíneo	Antígenos sobre los eritrocitos*	Anticuerpos séricos	Puede recibir sangre del tipo
A	A	Anti-B	A y 0
B	B	Anti-A	B y 0
AB	A y B	Ninguno	Todos
0	0	Anti-A y Anti-B	0

*Ver figura 5-16 para la estructura de los antígenos.

Las interacciones con el citoesqueleto impiden la movilidad de las proteínas integrales de membrana

Los resultados de experimentos como el representado en la figura 5-6 y otros tipos de estudios han mostrado que muchas proteínas transmembrana y proteínas ancladas por lípidos, como los fosfolípidos, flotan bastante libremente dentro del plano de una membrana natural. Del 30 al 90% de todas las proteínas integrales de la membrana plasmática se mueven con libertad según el tipo de célula. La velocidad de difusión lateral de una proteína móvil en una bicapa fosfolipídica pura o en una membrana plasmática aislada es similar a la de los lípidos. Sin embargo, la velocidad de difusión de una proteína en la membrana plasmática de células intactas suele ser 10-30 veces más baja que la de la misma proteína insertada en estructuras bicapa esféricas sintéticas (liposomas). Estos hallazgos sugieren que la movilidad de proteínas integrales en la membrana plasmática de las células vivas está restringida por las interacciones con el citoesqueleto submembranoso rígido. Algunas proteínas integrales están unidas permanentemente al citoesqueleto subyacente; estas proteínas permanecen inmóviles en la membrana. En lo que respecta a las proteínas móviles, tales interacciones se rompen y se reconstruyen a medida que las proteínas se difunden lateralmente en la membrana plasmática, disminuyendo así su velocidad de difusión. En el capítulo 6 consideramos la naturaleza y las consecuencias funcionales de las uniones entre las proteínas integrales de membrana y el citoesqueleto.

Los motivos de unión a lípidos ayudan a dirigir las proteínas periféricas a la membrana

Hasta la década pasada, se pensaba que la interacción de las proteínas periféricas con las proteínas integrales era el mecanismo principal por el cual las proteínas periféricas se unían a las membranas. Los resultados de las últimas investigaciones indican que las interacciones entre las proteínas y los lípidos son igualmente importantes para ubicar las proteínas periféricas en las membranas celulares (véase fig. 5-11).

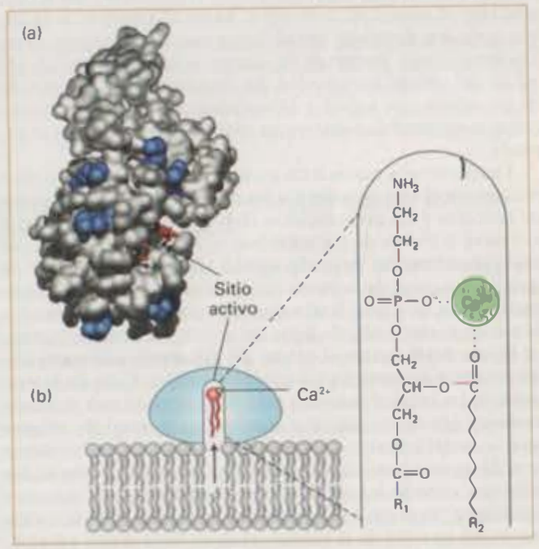
El análisis de las secuencias del genoma reveló varios motivos de unión a lípidos ampliamente distribuidos en las proteínas (cuadro 5-3). Por ejemplo, el *dominio de homología con la pleckstrina (PH)*, que une dos tipos de fosfatidilinositoles fosforilados, es el undécimo dominio proteico más común codificado en el genoma humano. Este dominio se reconoció por primera vez en la proteína *pleckstrina*, hallada en las plaquetas. La alta frecuencia de los dominios PH indica que las proteínas localizadas en la superficie de las membranas llevan a cabo muchas funciones importantes. Otros motivos fijadores de lípidos frecuentes incluyen el dominio C2, el dominio de repetición de anquirina, y el dominio FERM. Descubierto en la proteincinasa C, el dominio C2 es un dominio de varias cinasas, fosfatasas y fosfolipasas que las dirige a la membrana.

Las fosfolipasas son representativas de las enzimas solubles en agua que se asocian con las cabezas polares de los fosfolípidos de membrana para realizar sus funciones catalíticas. Como ya se vio, las fosfolipasas hidrolizan diversos enlaces en las cabezas fosfolipídicas (véase fig. 5-9). Estas enzimas tienen un papel importante en la degradación de membranas celulares dañadas o envejecidas y son moléculas activas en muchos venenos de serpientes. Los mecanismos de acción de la fosfolipasa A_2 ilustran cómo tales enzimas solubles en agua pueden interactuar reversiblemente con las membranas y catalizar reacciones en la interfaz entre una solución acuosa y una superficie lipídica. Cuando esta enzima se encuentra en solución acuosa, su sitio activo que contiene Ca^{2+} se sumerge en un canal revestido con aminoácidos hidrófobos. La enzima se une con mayor afinidad a las bicapas compuestas de fosfolípidos cargados negativamente (p. ej., fosfatidiletanolamina). Este descubrimiento sugiere que un borde de residuos de lisina y arginina cargado positivamente alrededor del canal catalítico de entrada es particularmente importante en la unión de la interfaz (fig. 5-17a). La unión induce un cambio pequeño en la conformación de la fosfolipasa A_2 que fija la proteína a las cabe-

CUADRO 5-3 Motivos de unión a lípidos seleccionados

Motivo	Ligando*	Proteínas con motivos seleccionados
PH	PIP_2, PIP_3	Fosfolipasa $C_\gamma 1$, proteincinasa B, pleckstrina
C2	Fosfolípidos acídicos	Proteincinasa C, PI-3 cinasa, fosfolipasa, PTEN fosfatasa
Repetición anquirina	PS	Anquirina†
FERM	PIP_2	Proteína banda 4,1; ezrina, radixina, moesina (ERM)†

*PIP_2, PIP_3 y PI-3P: derivados del fosfatidilinositol con grupos fosfatos adicionales sobre el anillo de inositol (véase fig. 14-26); PH: homología con la pleckstrina; PS: fosfatidilserina.
† Estas proteínas intervienen en la unión del citoesqueleto de actina a la membrana plasmática.



▲ Fig. 5-17. Superficie de unión de la interfaz y mecanismo de acción de la fosfolipasa A_2. (a) Modelo estructural de la enzima que muestra la superficie que interactúa con una membrana. Esta superficie de unión de la interfaz contiene un borde de residuos de arginina y lisina cargados positivamente, representados en azul, que rodea la cavidad del sitio catalítico activo en el cual un sustrato lipídico (estructura de bastón roja) está unido. (b) Diagrama de catálisis por la fosfolipasa A_2. Cuando se estacionan sobre una membrana lipídica modelo, los residuos cargados positivamente del sitio de unión de la interfaz se unen a grupos polares cargados negativamente en la superficie de la membrana. Esta unión causa un pequeño cambio de conformación, abriendo un canal revestido con aminoácidos hidrófobos que conduce de la bicapa al sitio catalítico. A medida que un fosfolípido se mueve hacia adentro del canal, un ion Ca^{2+} (verde) unido a la enzima se une al grupo cabeza, posicionando el enlace éster a ser escindido junto al sitio catalítico. [Parte (a) adaptada de M. H. Gelb et al., 1999, *Curr. Opin. Struc. Biol.* 9:428. Parte (b), véase D. Blow, 1991, *Nature* 351:444.]

zas fosfolipídicas y abre el canal hidrófobo. A medida que una molécula fosfolipídica se difunde desde la bicapa hacia el canal, el Ca^{2+} adherido a la enzima se une al fosfato en el grupo de la cabeza, posicionando así el enlace éster junto al sitio catalítico para que sea escindido (fig. 5-17b).

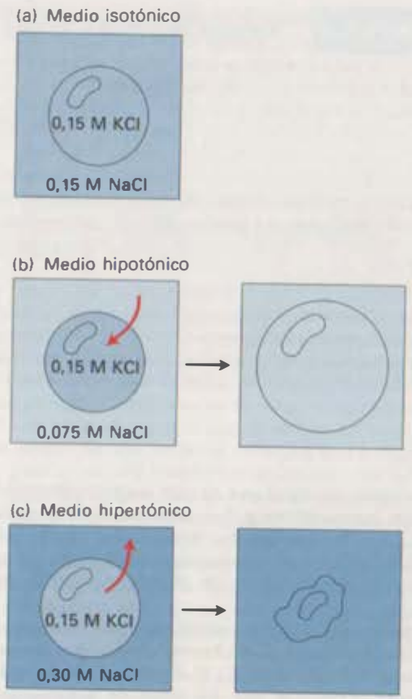
La membrana plasmática cumple muchas funciones comunes en todas las células

Aunque la composición lipídica de una membrana determina en gran medida sus características físicas, su conjunto de proteínas es, ante todo, el responsable de las propiedades funcionales de la membrana. Ya nos hemos referido a muchas funciones de la membrana plasmática, consideremos aquí brevemente sus funciones principales.

En todas las células, la membrana plasmática actúa como una barrera de permeabilidad que previene la entrada de materiales no deseados desde el ambiente extracelular y la salida de los metabolitos necesarios. Las proteínas de transporte de membrana, específicas de la membrana plasmática, permiten el pasaje de nutrientes hacia el interior de la célula y de los desechos metabólicos hacia el exterior; otras funcionan para mantener la composición iónica y el pH (≈7,2) del citosol apropiados. La estructura y la función de las proteínas que hacen a la membrana plasmática selectivamente permeable a diferentes moléculas se tratan en el capítulo 7.

La membrana plasmática es muy permeable al agua pero poco permeable a las sales y a las moléculas pequeñas, como los azúcares y los aminoácidos. Debido a la ósmosis, el agua se mueve a través de las membranas semipermeables desde una concentración baja de soluto (concentración alta de agua) hacia una de concentración alta de soluto (concentración baja de agua) hasta que las concentraciones totales de soluto y, por ende, de agua en ambos lados sean iguales. La figura 5-18 ilustra el efecto de diferentes concentraciones externas de iones en las células animales. Cuando la mayoría de las células animales son colocadas en una solución isotónica (es decir, con una concentración total de solutos igual a la del interior de la célula), no hay un movimiento neto de agua hacia adentro o hacia afuera de la célula. Sin embargo, cuando las células son colocadas en una solución hipotónica (es decir, con una menor concentración de soluto que la del interior de la célula), el agua fluye hacia adentro, haciendo que la célula se hinche. A la inversa, en una solución hipertónica (es decir, con una mayor concentración de soluto que la del interior de la célula), el agua fluye hacia afuera de la célula y provoca su encogimiento. En condiciones normales in vivo, los canales de iones de la membrana plasmática controlan el movimiento de iones hacia el interior y hacia el exterior celular de manera de que no haya movimiento neto de agua y se mantenga el volumen habitual de la célula.

A diferencia de las células animales, las células de bacterias, hongos y vegetales están rodeadas por una pared rígida y carecen de la matriz extracelular hallada en los tejidos animales. La membrana plasmática está íntimamente comprometida en el ensamblaje de las paredes celulares, que en las plantas están compuestas principalmente de celulosa. La pared celular evita la dilatación o el encogimiento de una célula que, de otra manera, ocurriría cuando se la coloca en un medio hipotónico o hipertónico, respectivamente. Por este motivo, las células rodeadas por una pared



▲ **Fig. 5-18. Efecto de la concentración externa de iones sobre el flujo de agua a través de la membrana plasmática de una célula animal.** El sodio, el potasio y los iones cloruro no se mueven libremente a través de la membrana plasmática, pero los canales de agua (acuaporinas) de la membrana permiten el flujo de agua en la dirección determinada por la concentración de iones del medio circundante. (a) Cuando el medio es isotónico, no hay un flujo neto de agua hacia adentro o afuera de la célula. (b) Cuando el medio es hipotónico, el agua fluye dentro de la célula (flecha roja) hasta que la concentración de iones dentro y fuera de la célula sea la misma. Debido al aflujo de agua, el volumen de la célula se incrementa. (c) Cuando el medio es hipertónico, el agua fluye fuera de la célula hasta que la concentración de iones dentro y fuera de la célula es el mismo. Debido a que el agua se pierde, el volumen celular disminuye.

pueden crecer en un medio con fuerzas osmóticas mucho menores que las del citosol. Las propiedades, funciones y formación de las paredes celulares vegetales se tratan en el capítulo 6.

Además de estas funciones universales, la membrana plasmática desempeña otros papeles cruciales en los organismos multicelulares. Pocas células de las plantas multicelulares y de los animales existen como entidades aisladas; preferentemente grupos de células con especializaciones relacionadas, se combinan para formar tejidos. En las células animales áreas especializadas de la membrana plasmática contienen proteínas y glucolípidos que forman uniones intercelulares específicas para reforzar los tejidos y permitir el intercambio de metabolitos entre células. Ciertas proteínas de la membrana plasmática anclan las células a los componentes de la matriz extracelular, la mezcla de proteínas fibrosas y polisacáridos que proveen un lecho sobre el cual descansan la mayoría de las lámmas de células epiteliales o glándulas pequeñas. Examinaremos estas dos funciones de la membrana en el capítulo 6. Aún otras proteínas de la membrana plasmática actúan como puntos de anclaje para muchas de las fibras citoesqueléticas que impregnan el citosol, confiriendo forma y fuerza a las células (véase sección 5.4).

Las membranas plasmáticas de muchos tipos de células eucariontes también contienen proteínas receptoras que unen moléculas señalizadoras específicas (p. ej., hormonas, factores del crecimiento, neurotransmisores) y conducen a diversas respuestas celulares. Estas proteínas, críticas para el desarrollo y el funcionamiento celular, se describirán en otros capítulos más adelante. Por último, las proteínas citosólicas periféricas que son reclutadas en la superficie de la membrana funcionan como enzimas, transductores de señales intracelulares y proteínas estructurales para estabilizar la membrana.

Al igual que la membrana plasmática, la membrana que rodea cada orgánulo en las células eucariontes contiene un conjunto único de proteínas esenciales para su funcionamiento apropiado. En la siguiente sección proporcionamos una breve visión general de los principales orgánulos eucariontes.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 5.2

Biomembranas: componentes proteicos y funciones básicas

- Las membranas biológicas generalmente contienen proteínas integrales de membrana (transmembrana) y periféricas, que no entran en el núcleo hidrófobo de la bicapa (véase fig. 5-11).
- La mayoría de las proteínas integrales de membrana contienen una o más hélices α hidrófobas que atraviesan la membrana y dominios hidrófilos que se extienden desde las caras citosólicas y exoplásmicas de la membrana (véase fig. 5-12).
- Las porinas, a diferencia de otras proteínas integrales, contienen láminas β que atraviesan la membrana y que forman un canal tipo barril a través de la bicapa.
- Los lípidos de cadena larga unidos a ciertos aminoácidos anclan algunas proteínas a una u otra hojuela de la membrana (véase fig. 5-15).
- Algunas proteínas periféricas se asocian con la membrana mediante interacciones con proteínas integrales. Los motivos de unión a lípidos en otras proteínas periféricas interactúan con las cabezas polares de los fosfolípidos de membrana (véase cuadro 5-3).
- La unión de una enzima soluble en agua (p. ej., fosfolipasa, cinasa o fosfatasa) a la superficie de una membrana acerca la enzima a su sustrato y en algunos casos la activa. Tal unión de interfaz se debe a la atracción entre las cargas positivas de los residuos básicos de la proteína y las cargas negativas sobre las cabezas de los fosfolípidos de la bicapa.

5.3 Orgánulos de la célula eucarionte

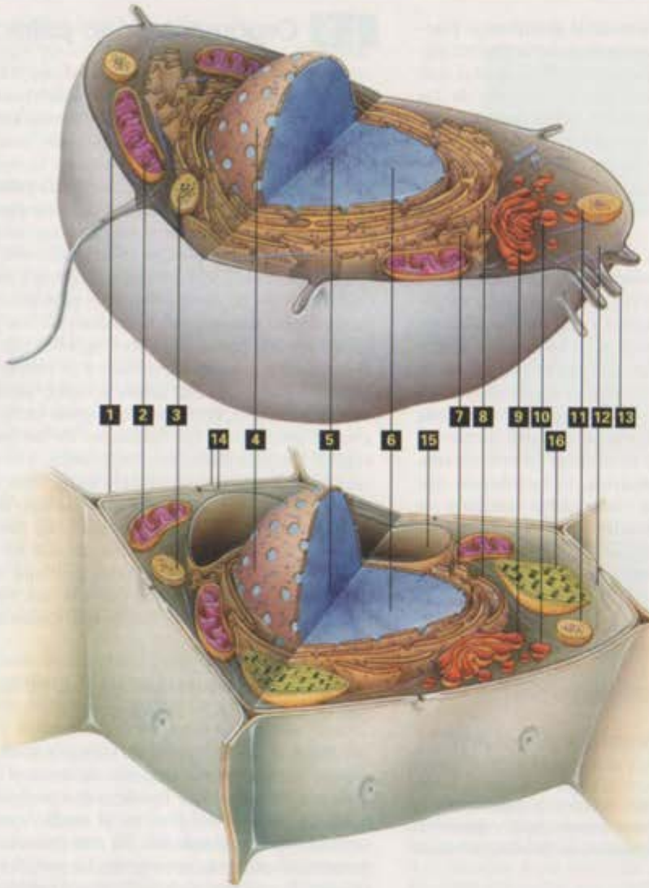
La célula se encuentra en un flujo dinámico. Observada con el microscopio óptico, una célula viva exhibe una miríada de movimientos que van desde la translocación de cromosomas y vesículas hasta los cambios de forma asociados con el desplazamiento en medios líquidos y la reptación de la célula. La investigación de las estructuras intracelulares comienza con las microfotografías de células seccionadas fijadas, en las cuales todos los movimientos están congelados. Tales fotos estáticas de la célula revelan la organización del citoplasma en compartimientos y la ubicación estereotipada de cada tipo de orgánulo dentro de la célula. En esta sección, describimos las estructuras básicas y las funciones de los principales orgánulos de las células animales y vegetales (fig. 5-19). Las células de vegetales y hongos contienen la mayor parte de los orgánulos hallados en una célula animal, pero carecen de lisosomas. En cambio, contienen una gran vacuola central que lleva a cabo muchas de las funciones de un lisosoma. Una célula vegetal también contiene cloroplastos, y su membrana está fortalecida por una pared celular rígida. Proteínas exclusivas en el interior y en las membranas de cada tipo de orgánulo determinan en gran medida sus características funcionales específicas, que se examinarán con mayor detalle en los siguientes capítulos. Los orgánulos limitados por una membrana única se tratarán primero, seguidos por los tres tipos que poseen una membrana doble: el núcleo, la mitocondria y los cloroplastos.

Los endosomas toman macromoléculas solubles del exterior de la célula

Aunque las proteínas de transporte en la membrana plasmática median el movimiento de iones y moléculas pequeñas a través de la bicapa lipídica, las proteínas y algunas otras macromoléculas solubles en el medio extracelular son internalizadas por endocitosis. En este proceso, un segmento de la membrana plasmática se invagina para formar una "fosita recubierta", cuya cara citosólica está revestida por un conjunto específico de proteínas, incluida la clatrina. La fosita se desprende de la membrana para formar una vesícula pequeña limitada por membrana, que contiene material extracelular y es enviada a un endosoma temprano, una estación de clasificación de cisternas y vesículas limitadas por membrana (fig. 5-20a, b). Desde este compartimiento, se reciclan algunas proteínas de membrana para ser devueltas a la membrana plasmática; otras proteínas de membrana son transportadas a un endosoma tardío donde se lleva a cabo una clasificación ulterior. La vía endocítica finaliza cuando un endosoma tardío entrega su membrana y su contenido interno a los lisosomas para su degradación. La vía endocítica completa se describe con mayor detalle en el capítulo 17.

Los lisosomas son orgánulos acídicos que contienen una batería de enzimas degradativas

Los lisosomas proveen un ejemplo excelente de la capacidad de las membranas intracelulares para formar compartimientos cerrados en los cuales la composición de la luz (el interior acuoso del compartimiento) difiere sustancialmente de la del citosol circundante. Exclusivos de las células animales, los lisosomas son responsables de degradar ciertos



1 La membrana plasmática controla los movimientos de moléculas hacia adentro y afuera de la célula, y cumple funciones en la señalización y en la adhesión celular.

2 Las mitocondrias, que están rodeadas por una doble membrana, generan ATP por oxidación de glucosa y ácidos grasos.

3 Los lisosomas cuyo lumen es ácido, degradan material internalizado por la célula y membranas y organelas celulares desgastadas.

4 La envoltura nuclear, una doble membrana, encierra el contenido del núcleo; la membrana nuclear externa se continúa con el RE rugoso.

5 El nucléolo es un subcompartimiento nuclear donde se sintetiza la mayoría del rRNA celular.

6 El núcleo está lleno de cromatina compuesta de DNA y proteínas; es el lugar de la síntesis de mRNA y tRNA.

7 El retículo endoplasmático liso (RE) sintetiza los lípidos y destoxifica ciertos compuestos hidrófobos.

8 El retículo endoplasmático rugoso (RE) participa en la síntesis, el procesamiento y la clasificación de proteínas secretadas, proteínas lisosómicas y ciertas membranas.

9 El complejo de Golgi procesa y clasifica las proteínas secretadas, las proteínas lisosómicas, y las proteínas de membrana sintetizadas en el RE rugoso.

10 Las vesículas secretoras almacenan las proteínas secretadas y se fusionan con la membrana plasmática para liberar su contenido.

11 Los peroxisomas destoxifican diversas moléculas y también descomponen ácidos grasos para producir grupos acetilo para la biosíntesis.

12 Las fibras citoesqueléticas forman redes y haces que dan soporte a las membranas celulares, ayudan a organizar las organelas y participan en el movimiento de la célula.

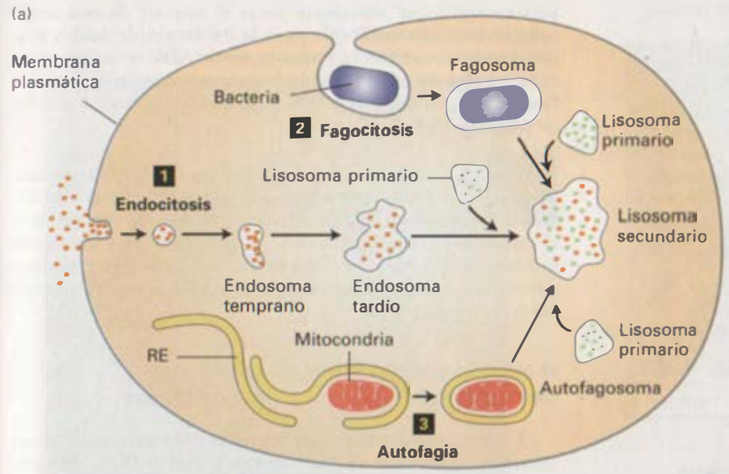
13 Las microvellosidades incrementan el área superficial para la absorción de nutrientes del medio circundante.

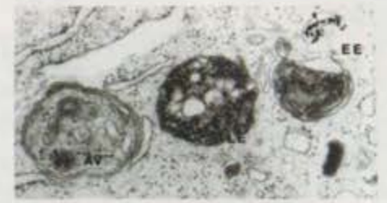
14 La pared celular, compuesta en gran parte de celulosa, ayuda a mantener la forma de la célula y provee protección contra la tensión mecánica.

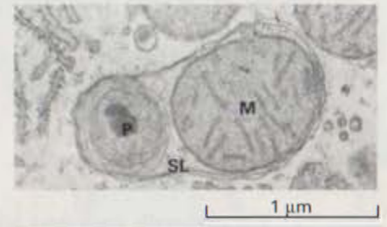
15 La vacuola almacena agua, iones y nutrientes, degrada las macromoléculas y participa en la elongación celular durante el crecimiento.

16 Los cloroplastos, que llevan a cabo la fotosíntesis, están rodeados por una doble membrana y contienen una red de sacos internos unidos por membranas.

▲ Fig. 5-19. Vista general esquemática de una célula animal y una célula vegetal "típicas" y sus principales subestructuras. No todas las células poseerán todos los orgánulos, gránulos y estructuras fibrosas mostradas aquí, y otras subestructuras pueden estar presentes en algunas. Las células también difieren considerablemente en tamaño y forma, y en la prominencia de diversos orgánulos y subestructuras.







▲ Fig. 5-20. Estructuras celulares que participan en la entrega de materiales a los lisosomas. (a) Vista general esquemática de tres vías a través de las cuales los materiales son transportados hacia los lisosomas. Las moléculas solubles son llevadas dentro de la célula por invaginación de fositas recubiertas de la membrana plasmática y enviadas a los lisosomas a través de la vía endocítica (1). Células enteras y otras partículas insolubles grandes se mueven desde la superficie celular hacia los lisosomas a través de la vía fagocítica (2). Orgánulos envejecidos o en desuso y porciones del citoplasma son entregados a los lisosomas a través de la vía autofágica (3). Dentro del compartimiento ácido de los lisosomas, las enzimas hidrolíticas degradan las proteínas, los ácidos nucleicos y otras moléculas grandes. (b) Microfotografía electrónica de una sección de una célula de mamífero cultivada que ha incorporado partículas de oro pequeñas revestidas con la proteína de huevo ovoalbúmina. La ovoalbúmina marcada con oro (puntos negros) se encuentra en los endosomas tempranos (EE) y en los endosomas tardíos (LE), pero hay muy poco presente en los autofagosomas (AV). (c) Microfotografía electrónica de una sección de una célula de hígado de rata que muestra un lisosoma secundario (SL) que contiene fragmentos de una mitocondria (M) y un peroxisoma (P). [Parte (b) de T.E. Tjelle et al., 1996, *J. Cell Sci.* 109:2905. Part (c) cortesía de D. Friend.]

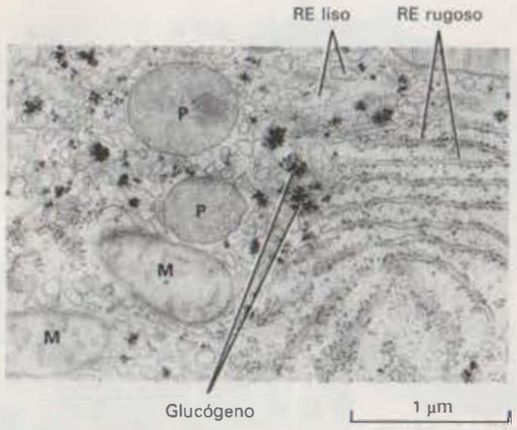
componentes que se han tornado obsoletos para la célula o el organismo. El proceso por el cual un orgánulo envejecido es degradado en un lisosoma se denomina *autofagia* ("comerse a uno mismo"). Los materiales llevados por endocitosis o fagocitosis hacia el interior de una célula también pueden ser degradados en los lisosomas (véase fig. 5-20a). En la fagocitosis partículas insolubles grandes (p. ej., bacterias) son envueltas por la membrana plasmática e internalizadas.

Los lisosomas contienen un grupo de enzimas que degradan los polímeros en sus unidades monoméricas. Por ejemplo, las nucleasas degradan el RNA y el DNA en sus mononucleótidos constitutivos; las proteasas degradan diversas proteínas y péptidos; las fosfatasas quitan los grupos fosfato a los mononucleótidos, a los fosfolípidos y a otros compuestos; otras enzimas degradan los polisacáridos complejos y los glucolípidos en unidades pequeñas. Todas las enzimas lisosómicas trabajan con mayor eficiencia con valores de pH ácido y colectivamente se denominan *hidrolasas ácidas*. Dos tipos de proteínas de transporte de la membrana lisosómica trabajan juntas para bombear los iones H^+ y Cl^- (HCl) desde del citosol a través de la membrana, acidificando de este modo la luz (véase fig. 7-10b). El pH ácido ayuda a desnaturalizar las proteínas, haciéndolas accesibles a la acción de las hidrolasas lisosómicas, las cuales son resistentes a la desnaturalización acídica. Las enzimas lisosómicas son poco activas al pH neutro de las células y de la mayoría de los líquidos extracelulares. Así, si un lisosoma libera sus enzimas al citosol, donde el pH se encuentra entre 7,0 y 7,3, causa poca degradación de los componentes citosólicos. Las proteínas citosólicas y nucleares no son casi nunca degradadas en los lisosomas sino más bien en los proteasomas, grandes complejos multiproteicos en el citosol (véase fig. 3-13).

Los lisosomas varían en tamaño y forma, y pueden hallarse varios cientos en una célula animal típica. En efecto, funcionan como sitios donde se acumulan diversos materiales para ser degradados. Los *lisosomas primarios* son aproximadamente esféricos y no contienen partículas ni desechos de membrana visibles. Los *lisosomas secundarios*, que son más grandes y de forma irregular, parecen ser el resultado de la fusión de lisosomas primarios con otros orgánulos y vesículas. Contienen partículas o membranas en proceso de ser digeridas (fig. 5-20c).

MEDICINA

La *enfermedad de Tay-Sachs* es causada por un defecto en una de las enzimas que catalizan una etapa en la degradación lisosómica de los gangliósidos. La acumulación resultante de estos glucolípidos, sobre todo en las células nerviosas, tiene consecuencias devastadoras. Los síntomas de esta enfermedad hereditaria suelen evidenciarse antes del primer año de vida. Los niños afectados suelen ser dementes y ciegos a los 2 años de edad y morir antes de su tercer cumpleaños. Las células nerviosas de esos niños se agrandan enormemente con los lisosomas dilatados llenos de lípidos. ■



▲ **Fig. 5-21. Microfotografía electrónica que muestra diversos orgánulos en una célula de hígado de rata.** Dos perixosomas (P) se encuentran en las cercanías de la mitocondria (M) y del retículo endoplasmático rugoso y liso (RE). También son visibles acumulaciones de glucógeno, un polisacárido que es la principal molécula de almacenamiento de glucosa en los animales (Cortesía de P. Lazarow.)

Los peroxisomas degradan ácidos grasos y compuestos tóxicos

Todas las células animales (a excepción de los eritrocitos) y muchas células vegetales contienen peroxisomas, una clase de orgánulos aproximadamente esféricos, de 0,2–1,0 µm de diámetro (fig. 5-21). Los peroxisomas contienen varias *oxidasas*, enzimas que utilizan oxígeno molecular para oxidar sustancias orgánicas, formando en el proceso peróxido de hidrógeno (H_2O_2), una sustancia corrosiva. Los peroxisomas también contienen copiosas cantidades de la enzima *catalasa*, que degrada el peróxido de hidrógeno para producir agua y oxígeno:

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalasa}} H_2O + O_2$$

A diferencia de la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria, que produce CO_2 y está acoplada a la generación de ATP, la oxidación peroxisómica de ácidos grasos produce grupos acetilo y no está ligada a la formación de ATP (véase fig. 8-11). La energía liberada durante la oxidación peroxisómica se convierte en calor, y los grupos acetilo se transportan hacia el citosol, donde son utilizados en la síntesis de colesterol y otros metabolitos. En la mayoría de las células eucariontes, el peroxisoma es el principal orgánulo en el cual se oxidan los ácidos grasos, generando de este modo precursores para vías biosintéticas importantes. Sobre todo en el hígado y en las células de los riñones, diversas moléculas tóxicas que entran en el torrente sanguíneo también son degradadas por los peroxisomas y producen productos inocuos.

MEDICINA

En la enfermedad genética *adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X (ADL)*, la oxidación peroxisómica de los ácidos grasos de cadena larga es defectuosa. El gen *ADL* codifica la proteína de membrana peroxisómica que transporta hacia el interior de este orgánulo una enzima requerida para la oxidación de ácidos grasos. Las personas con la forma grave de ADL no se ven afectadas hasta la mitad de la niñez, cuando aparecen los trastornos neurológicos graves, seguidos por la muerte al cabo de algunos años.

PLANTAS

Las semillas de las plantas contienen *glioxisomas*, orgánulos pequeños que oxidan los lípidos almacenados como fuente de carbono y de energía para el crecimiento. Son similares a los perixosomas y contienen muchos de los mismos tipos de enzimas, así como algunas adicionales utilizadas para convertir ácidos grasos en precursores de la glucosa.

El retículo endoplasmático es una red de membranas internas interconectadas

La membrana más grande de una célula eucarionte generalmente encierra al retículo endoplasmático (RE), una red extensa de sacos cerrados aplanados limitados por una membrana llamados cisternas (véase fig. 5-19). El retículo endoplasmático cumple numerosas funciones dentro de la célula pero es muy importante para la síntesis de lípidos, de proteínas de membrana y de proteínas de secreción. El *retículo endoplasmático liso* es liso porque carece de ribosomas. Por el contrario, la cara citosólica del *retículo endoplasmático rugoso* está tachonada de ribosomas.

Retículo endoplasmático liso. La síntesis de ácidos grasos y fosfolípidos tiene lugar en el RE liso. Aunque muchas células tienen muy poco RE, este orgánulo abunda en los hepatocitos. Las enzimas del RE liso del hígado también modifican o destoxifican las sustancias químicas hidrófobas, como los pesticidas y los carcinógenos, y los convierten en productos químicamente conjugados más hidrosolubles que pueden ser excretados. Altas dosis de estos componentes dan como resultado una gran proliferación del RE liso en las células del hígado.

Retículo endoplasmático rugoso. Los ribosomas unidos al RE rugoso sintetizan ciertas proteínas de membrana y de los orgánulos y, de hecho, todas las proteínas que serán secretadas por la célula (cap. 16). Un ribosoma que fabrica tal proteína está unido al RE rugoso mediante la cadena polipeptídica naciente de la proteína. A medida que el polipéptido en crecimiento emerge del ribosoma, atraviesa la membrana del RE rugoso, con la ayuda de proteínas específicas de la membrana. Las proteínas de membrana recién sintetizadas permanecen asociadas con la membrana del RE rugoso y las proteínas por ser secretadas se acumulan en la luz del orgánulo.

Todas las células eucariontes contienen una cantidad distinguible de RE rugoso porque es necesario para la síntesis de proteínas de la membrana plasmática y de proteínas de la matriz extracelular. El RE rugoso abunda en las células especializadas que producen gran cantidad de proteínas específicas para ser secretadas. Por ejemplo, las células plasmáticas producen anticuerpos, las células acinosas pancreáticas sintetizan las enzimas digestivas y las células en los islotes de Langerhans producen las hormonas polipeptídicas insulina y glucagón. En éstas y en otras células secretoras, una gran parte del citosol está ocupada por el RE rugoso y por vesículas secretorias (fig. 5-22).



▲ **Fig. 5-22. Rasgos característicos de las células especializadas para secretar gran cantidad de proteínas específicas (p. ej., hormonas, anticuerpos).** (a) Microfotografía electrónica de una sección delgada de una célula secretora de hormonas hipofisarias de rata. Un extremo de la célula (*arriba*) está lleno de abundantes sacos del RE rugoso y del Golgi, donde las hormonas polipeptídicas son sintetizadas y empaquetadas. En el extremo opuesto de la célula (*abajo*) hay numerosas vesículas secretoras, que contienen hormonas recién sintetizadas que finalmente serán secretadas. (b) Diagrama de una célula secretora típica que traza la vía seguida por una proteína (puntos rojos pequeños) por ser secretada. Inmediatamente después de su síntesis sobre los ribosomas (puntos azules) del RE rugoso, las proteínas secretadas se encuentran en la luz del RE rugoso. Las vesículas de transporte se desprenden y transportan estas proteínas hacia el complejo de Golgi. (1), donde las proteínas son concentradas y empaquetadas para formar vesículas secretoras inmaduras (2). Estas vesículas se combinan luego para formar vesículas secretoras maduras más grandes que pierden agua hacia el citosol, dejando en la luz una mezcla casi cristalina de proteínas secretadas (3). Después de que estas vesículas se acumulan bajo la superficie apical, se funden con la membrana plasmática y liberan su contenido (exocitosis) en respuesta a la estimulación hormonal o nerviosa apropiada (4). [Parte (a) cortesía de Biophoto Associates.]

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación general: Secreción de proteínas

El complejo de Golgi procesa y clasifica las proteínas secretadas y de membrana

Varios minutos después de que las proteínas son sintetizadas en el RE rugoso, la mayor parte de ellas abandona el orgánulo dentro de vesículas pequeñas de transporte limitadas por membrana. Estas vesículas, que brotan de las regiones del RE rugoso que no están revestidas con ribosomas, transportan las proteínas a otro orgánulo limitado por membrana, el complejo de Golgi (véase fig. 5-22).

Reconstrucciones tridimensionales de secciones seriadas de un complejo de Golgi revelan que este orgánulo está conformado por una serie de vesículas o sacos (cisternas) aplanados limitados por membrana, rodeados por un cierto número de vesículas limitadas por membranas más o menos esféricas (fig. 5-23). La pila de cisternas del Golgi tiene tres regiones definidas: la *cis*, la *medial* y la *trans*. Las vesículas de transporte del RE rugoso se fusionan con la región *cis* del complejo de Golgi, donde depositan su contenido de proteínas. Como se detalla en el capítulo 17, estas proteínas avanzan desde la región *cis* a la *medial* y luego a la *trans*. Dentro de cada región se encuentran distintas enzimas que modifican en forma diferente las proteínas por ser secretadas y las proteínas de membrana, según sus estructuras y destinos finales.

Después que las proteínas por ser secretadas y las proteínas de membrana son modificadas en el complejo de Golgi, son transportadas afuera por un segundo grupo de vesículas que parecen brotar del lado trans del complejo. Algunas vesículas transportan las proteínas de membrana destinadas a la membrana plasmática o las proteínas solubles para ser

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Modelo tridimensional de un complejo de Golgi



▲ Fig. 5-23. Modelo del complejo de Golgi basado en la reconstrucción tridimensional de imágenes del microscopio electrónico. Las vesículas de transporte (esferas blancas) que han brotado por fuera del RE rugoso se fusionan con las membranas *cis* (celeste) del complejo de Golgi. A través de mecanismos descritos en el capítulo 17, las proteínas se mueven desde la región *cis* a la región *medial* y finalmente a la región *trans* del complejo de Golgi. Por último, las vesículas brotan por afuera de las membranas *trans* del Golgi (naranja y rojo); algunas se mueven a la superficie de la célula y otras se mueven hacia los lisosomas. El complejo de Golgi, al igual que el retículo endoplasmático, es especialmente prominente en las células secretoras. (De B. J. Marsh et al., 2001, *Proc Nat'l. Acad. Sci USA* 98:2399.)

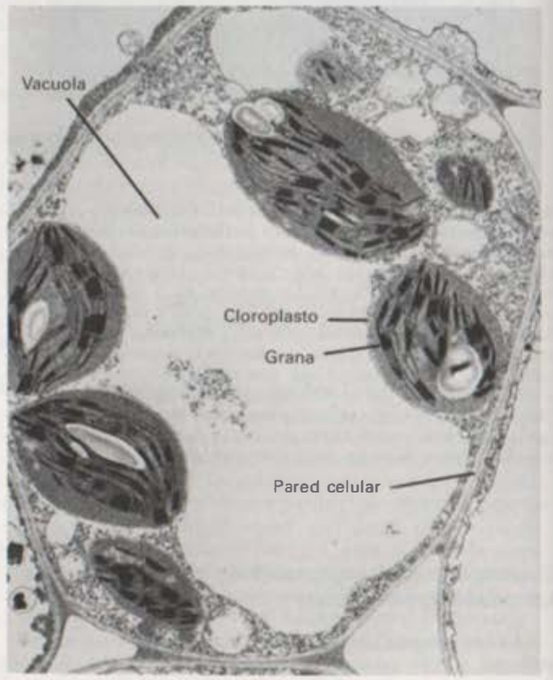
liberadas desde la superficie celular; otras transportan proteínas solubles o de membrana a los lisosomas u otros orgánulos. En el capítulo 17 se estudia cómo las vesículas de transporte intracelulares "saben" con cuáles membranas fusionarse y dónde entregar sus contenidos.

Las vacuolas vegetales almacenan moléculas pequeñas y le permiten a una célula alargarse con rapidez

PLANTAS

La mayoría de las células vegetales contiene al menos una vacuola interna limitada por membrana. El número y el tamaño de las vacuolas dependen tanto del tipo de células como de su estado de desarrollo; una vacuola única puede ocupar hasta el 80% de una célula vegetal madura (fig. 5-24). Diversas proteínas de transporte en la membrana de la vacuola permiten que las células vegetales acumulen y almacenen agua, iones y nutrientes (p. ej., sacarosa, aminoácidos) dentro de las vacuolas (cap. 7). La luz de una vacuola contiene numerosas enzimas degradativas y su pH ácido se mantiene, al igual que en un lisosoma, por proteínas de transporte similares a las lisosómicas presentes en la membrana de la vacuola. Por ende, las vacuolas vegetales pueden tener también una función degradativa similar a la de los lisosomas en las células animales. Vacuolas de almacenamiento similares se hallan en las algas verdes y en numerosos microorganismos, como los hongos.

Como muchas membranas celulares, la membrana vacuolar es permeable al agua pero poco permeable a las moléculas pequeñas almacenadas en su interior. Debido a que la concentración de soluto es mucho más alta en la luz de la vacuola que en el citosol o en los líquidos extracelulares, el agua tiende a desplazarse por flujo osmótico dentro de las vacuolas, del mismo modo que ingresa en una célula colocada en un medio hipotónico (véase fig. 5-18). Este ingreso de agua provoca que la vacuola se expanda y que el agua se desplace hacia el interior celular, creando una presión hidrostática, o *turgencia*, dentro de la célula. Esta presión está balanceada por la resistencia mecánica de las paredes celulares ricas en celulosa que rodean las células vegetales. La mayoría de estas células tiene una turgencia de 5 a 20 atmósferas (atm); sus paredes deben ser lo suficientemente fuertes para reaccionar a esta presión de manera controlada. A diferencia de



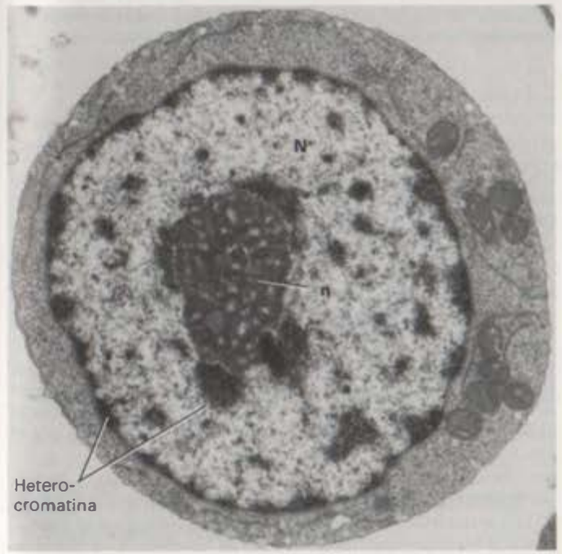
▲ Fig. 5-24. Microfotografía electrónica de una sección delgada de la célula de una hoja. En esta célula, una única vacuola grande ocupa la mayor parte del volumen celular. También son visibles parte de cinco cloroplastos y la pared celular. Nótense los subcompartimientos internos en los cloroplastos. (Cortesía de Biophoto Associates/Myron C. Ledbetter/Brookhaven National Laboratory.)

las células animales, las células vegetales pueden alargarse con extrema rapidez, a velocidades de 20-75 µm/h. Esta elongación, que suele acompañar el crecimiento vegetal, sucede cuando un segmento elástico de la pared celular se estira bajo la presión creada por el agua captada dentro de la vacuola. ▮

El núcleo contiene el genoma de DNA, el aparato sintetizador de RNA y una matriz fibrosa

El **núcleo**, el orgánulo más grande de las células animales, está rodeado por dos membranas, cada una de las cuales es una bicapa fosfolipídica que contiene muchos tipos diferentes de proteínas. La membrana nuclear interna delimita de por sí al núcleo. En la mayoría de las células, la membrana nuclear externa se continúa con el retículo endoplasmático rugoso, y el espacio entre las membranas nucleares externa e interna se continúa con la luz de ese retículo (véase fig. 5-19). Las dos membranas parecen fusionarse en los poros nucleares, complejos de tipo anillo compuestos de proteínas de membrana específicas, a través del cual el material se mueve entre el núcleo y el citosol. La estructura de los poros nucleares y el transporte regulado de material a través de ellos se detallan en el capítulo 12.

En una célula en crecimiento o en proceso de diferenciación, el núcleo está metabólicamente activo, replicando



▲ Fig. 5-25. Microfotografía electrónica de una sección delgada de una célula madre (stem cell) de la médula ósea. El nucléolo (n) es un subcompartimiento del núcleo (N) y no está rodeado por una membrana. La mayor parte del RNA ribosómico se produce en el nucléolo. Las áreas teñidas de oscuro en el núcleo fuera del nucléolo son regiones de heterocromatina. (De P. C. Cross y K. L. Mercer, 1993, *Cell and Tissue Ultrastructure*, W. H. Freeman and Company, p. 165.)

el DNA y sintetizando rRNA, tRNA y mRNA. Dentro del núcleo, el mRNA se une a proteínas específicas, formando partículas ribonucleoproteicas. La mayor parte del RNA ribosómico de las células se sintetiza en el nucléolo, un subcompartimiento del núcleo que no está delimitado por una membrana fosfolipídica (fig. 5-25). Algunas proteínas ribosómicas también se agregan a los RNA ribosómicos dentro del nucléolo. Las subunidades ribosómicas terminadas o parcialmente terminadas, así como las partículas que contienen tRNA y mRNA, pasan a través del poro nuclear hacia el interior del citosol para ser utilizadas en la síntesis de proteínas (cap. 4). En los eritrocitos maduros de los vertebrados no mamíferos y otros tipos de células "en reposo", el núcleo está inactivo o durmiente y apenas existe una mínima síntesis de DNA y de RNA.

En el capítulo 10 se describe cómo el DNA nuclear se empaqueta para formar cromosomas. En un núcleo que no se está dividiendo, los cromosomas están dispersos y no se encuentran lo suficientemente densos para ser observados con el microscopio óptico. Sólo durante la división celular los cromosomas individuales son visibles con ese microscopio. Con el microscopio electrónico puede verse que las regiones no nucleolares del núcleo, el *nucleoplasma*, poseen áreas moteadas oscuras y claras. Las regiones oscuras, que a menudo están estrechamente asociadas con la membrana nuclear, contienen DNA condensado concentrado, denominado heterocromatina (véase fig. 5-25). Las proteínas fibrosas denominadas laminas, forman una red bidimensional a lo largo de la superficie de la membrana interna, confiriéndole forma y aparentemente fijando el DNA. La degradación de esta red tiene lugar al comienzo de la división celular, como se detalla en el capítulo 21.

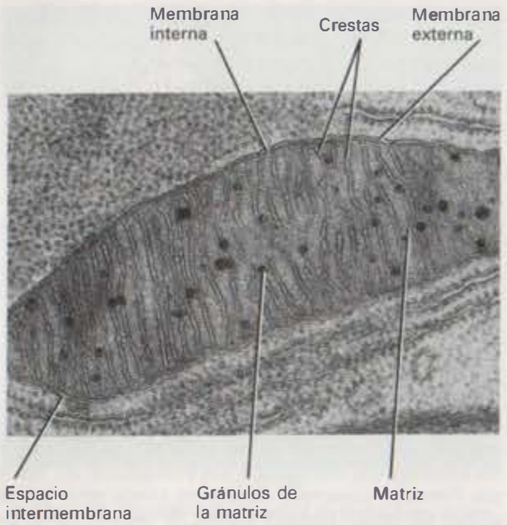
Las mitocondrias son los sitios principales de producción de ATP en las células aeróbicas

La mayoría de las células eucariontes contiene muchas mitocondrias, que ocupan más del 25% del volumen del citoplasma. Estos orgánulos complejos, los sitios principales de producción de ATP durante el metabolismo aerobio, suelen ser superados en tamaño por el núcleo, las vacuolas y los cloroplastos.

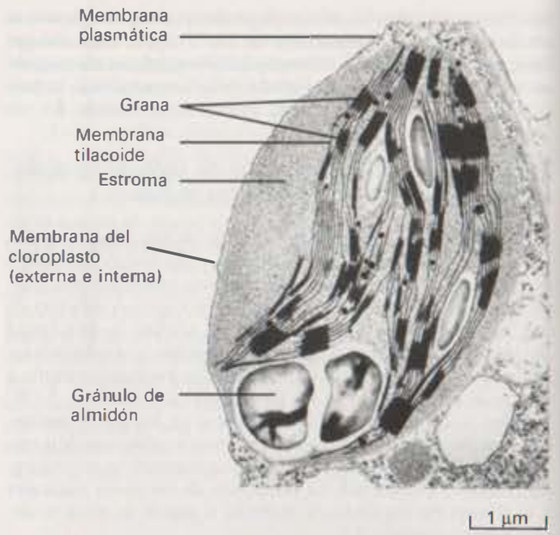
Las dos membranas que limitan una mitocondria difieren en composición y en funciones. La membrana exterior, compuesta aproximadamente mitad por lípidos y mitad por proteínas, contiene porinas (véase fig. 5-14) que la hacen permeable a moléculas con un peso molecular tan alto como 10.000. Con respecto a esto, la membrana exterior es similar a la de las bacterias gramnegativas. La membrana interna, mucho menos permeable, contiene alrededor de 20% de lípidos y 80% de proteínas; una proporción de proteína más alta que la existente en otras membranas celulares. La superficie de la membrana interna está incrementada en gran medida por numerosos plegamientos o *crestas*, que se proyectan hacia la *matriz*, o espacio central (fig. 5-26).

En las células no fotosintéticas, los principales combustibles para la síntesis de ATP son los ácidos grasos y la glucosa. La degradación aeróbica completa de la glucosa a CO_2 y H_2O está acoplada a la síntesis de tanto como 30 moléculas de ATP. En las células eucariontes, las etapas iniciales de la degradación de glucosa tienen lugar en el citosol, donde se generan dos moléculas de ATP por molécula de glucosa. Las etapas terminales de la oxidación y la síntesis acoplada de

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Modelo tridimensional de una mitocondria



▲ **Fig. 5-26. Microfotografía electrónica de una mitocondria.** La mayor producción de ATP en las células no fotosintéticas tiene lugar en la mitocondria. La membrana interna, que rodea el espacio de la matriz, tiene muchos plegamientos, denominados crestas. También se evidencian pequeños gránulos de la matriz que contienen calcio. (De D. W. Fawcett, 1981, *The Cell*, 2d ed., Saunders, p. 421.)



▲ **Fig. 5-27. Microfotografía electrónica de un cloroplasto vegetal.** Las vesículas de la membrana interna (tilacoides) se fusionan para formar apilamientos (grana), que residen en la matriz (la estroma). Toda la clorofila en la célula está contenida en las membranas tilacoides, donde tiene lugar la producción de ATP inducida por luz durante la fotosíntesis. (Cortesía de Biophoto Associates/Myron C. Ledbetter/Brookhaven National Laboratory.)

ATP son realizadas por las enzimas de la matriz mitocondrial y de la membrana interna (cap. 8). En la mitocondria se generan 28 moléculas de ATP por molécula de glucosa. Asimismo, casi todo el ATP formado en la oxidación de ácidos grasos a CO_2 se genera en ella. En consecuencia, las mitocondrias pueden considerarse las "plantas de energía" de la célula.

Los cloroplastos contienen compartimientos internos en los cuales tiene lugar la fotosíntesis

PLANTAS

A excepción de las vacuolas, los cloroplastos son los orgánulos más grandes y más característicos de las células vegetales y de las algas verdes. Pueden tener una longitud de 10 µm y típicamente tienen 0,5-2 µm de grosor, pero varían en tamaño y forma en distintas células, sobre todo entre las algas. Además de la doble membrana que rodea a un cloroplasto, este orgánulo contiene también un extenso sistema interno de sacos limitados por membranas interconectados, denominados **tilacoides**, que se aplanan para formar discos (fig. 5-27). Los tilacoides a menudo forman pilas llamadas *grana* y están incluidos en una matriz, la *estroma*. Las membranas tilacoideas contienen pigmentos verdes (clorofilas) y otros pigmentos que absorben la luz, al igual que las enzimas que generan ATP durante la fotosíntesis. Parte de este ATP se utiliza para convertir CO_2 en intermediarios tricarbonados mediante enzimas ubicadas en la estroma; los intermediarios salen luego al citosol y son convertidos en azúcares. ▮

Los mecanismos moleculares por los cuales el ATP se forma dentro de la mitocondria y de los cloroplastos son muy similares, como se explica en el capítulo 8. Los cloroplastos y las mitocondrias tienen otros rasgos en común: ambos suelen migrar de un lugar a otro dentro de las células y contienen su propio DNA, que codifica algunas de las proteínas clave del orgánulo (cap. 10). Las proteínas codificadas por el DNA del cloroplasto o de la mitocondria se sintetizan sobre los ribosomas dentro de los orgánulos. Sin embargo, la mayoría de las proteínas en cada orgánulo están codificadas en el DNA nuclear y son sintetizadas en el citosol; esas proteínas son incorporadas luego dentro de los orgánulos por procesos que se describen en el capítulo 16.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 5.3

Orgánulos de la célula eucarionte

- Todas las células eucariontes contienen un núcleo y otros numerosos orgánulos en su citosol (véase fig. 5-19).
- El núcleo, la mitocondria y los cloroplastos están limitados por dos membranas bicapa separadas por un espacio intermembrana. Todos los otros orgánulos están rodeados por una membrana única.
- Los endosomas internalizan las proteínas de la membrana plasmática y los materiales solubles del medio extracelular y los clasifican para devolverlos a la membrana o a los lisosomas para su degradación.
- Los lisosomas tienen un interior acídico y contienen diversas hidrolasas que degradan los componentes que ya no son funcionales o son innecesarios, así como algunos materiales ingeridos (véase fig. 5-20).
- Los peroxisomas son orgánulos pequeños que contienen enzimas que oxidan diversos compuestos orgánicos sin la producción de ATP. Los subproductos de la oxidación se utilizan en reacciones biosintéticas.
- Las proteínas secretadas y las proteínas de membrana se sintetizan sobre el retículo endoplasmático rugoso, una red de sacos aplanados limitados por membrana tachonados de ribosomas.
- Las proteínas sintetizadas en el RE rugoso luego se mueven al complejo de Golgi, donde son procesadas y clasificadas para ser transportadas a la superficie celular o a otros destinos (véase fig. 5-22).
- Las células vegetales contienen una o más vacuolas grandes, que son sitios de almacenaje de iones y nutrientes. El flujo osmótico del agua hacia el interior de las vacuolas genera una presión de turgencia que empuja la membrana plasmática contra la pared celular.
- El núcleo alberga el genoma de una célula. Las membranas nucleolar interna y externa están fusionadas en numerosos poros nucleares, a través de los cuales pasan los materiales entre el núcleo y el citosol. La membrana nuclear externa se continúa con la del retículo endoplasmático rugoso.
- La mitocondria tiene una membrana externa altamente permeable y una membrana interna rica en proteínas muy plegada. Las enzimas en la membrana mitocondrial interior y en la matriz central llevan a cabo las etapas terminales de la oxidación de azúcares y lípidos acoplada a la síntesis de ATP.
- Los cloroplastos contienen un sistema complejo de membranas tilacoides en su interior. Estas membranas contienen los pigmentos y las enzimas que absorben luz y producen ATP durante la fotosíntesis.

5.4 El citoesqueleto: componentes y funciones estructurales

El citosol es un sitio primordial de metabolismo celular y contiene un gran número de enzimas diferentes. Las proteínas constituyen alrededor del 20–30% del peso del citosol y alrededor de un cuarto a la mitad del total de proteínas dentro de la célula se encuentra en él. Las estimaciones acerca de la concentración de proteínas en el citosol van desde los 200 hasta los 400 mg/mL. Debido a la alta concentración de proteínas citosólicas, los complejos de proteínas pueden formarse aun si la energía que las estabiliza es débil. Muchos investigadores creen que el citosol está altamente organizado, con las proteínas más solubles ya sea unidas a los filamentos o localizadas de otra manera en regiones específicas. En una microfotografía electrónica de una célula animal típica, las proteínas solubles que cubren el interior de la célula ocultan la mayor parte de la estructura interna. Si una célula es tratada previamente con un detergente no iónico (p. ej., Triton X-100), que permeabiliza la membrana, las proteínas citosólicas solubles se difunden hacia afuera. En las microfotografías de células animales extraídas por medio de detergentes, sobresalen dos tipos de estructuras: los orgánulos y los filamentos del citoesqueleto, que llenan el citosol (fig. 5-28).

▲ **Fig. 5-28. Microfotografía electrónica de la parte apical de una célula epitelial intestinal extraída por medio de detergentes.** Las microvellosidades digitiformes de la membrana plasmática cubren la superficie apical de una célula intestinal epitelial. Un haz de microfilamentos en el centro de cada microvellosidad estabiliza la estructura. La membrana plasmática que rodea a una microvellosidad está adherida a los lados del haz por conexiones entre los microfilamentos y la membrana espaciadas uniformemente (amarillo). El haz continúa dentro de la célula como una raicilla corta. Las raicillas de múltiples microvellosidades están reforzadas por fibras conectoras entrecruzadas (rojo) compuestas de una isoforma intestinal de espectrina. Esta proteína fibrosa de unión a la actina se encuentra en una banda estrecha inmediatamente debajo de la membrana plasmática en muchas células animales. Las bases de las raicillas están unidas a los filamentos intermedios de queratina. Estas numerosas conexiones anclan las raíces pequeñas a un enrejado de filamentos y de esta forma mantienen la orientación vertical de las microvellosidades. (Cortesía de N. Hirokawa.)

En esta sección, presentamos los filamentos proteicos que componen el citoesqueleto y luego describimos cómo mantienen la membrana plasmática y la nuclear, y cómo organizan el contenido de la célula. Los capítulos posteriores tratarán acerca de las propiedades dinámicas del citoesqueleto, su armado y desarmado, y su papel en los movimientos celulares.

Tres tipos de filamentos componen el citoesqueleto

El citosol de una célula eucarionte contiene tres tipos de filamentos que pueden ser distinguidos sobre la base de su diámetro, el tipo de subunidades y la disposición de las subunidades (fig. 5-29). Los **filamentos de actina**, también denominados **microfilamentos**, tienen 8-9 nm de diámetro y poseen una estructura de dos hebras enrolladas entre sí. Los **microtúbulos** son estructuras huecas similares a tubos, de 24 nm de diámetro, cuyas paredes están formadas por protofilamentos adyacentes. Los **filamentos intermedios (IF)** tienen la estructura de una cuerda de 10 nm de diámetro.

Cada tipo de filamento del citoesqueleto es un polímero de subunidades proteicas (cuadro 5-4). Las subunidades monoméricas de actina se ensamblan formando microfilamentos; las subunidades diméricas compuestas de α y β tubulina se polimerizan para formar microtúbulos. A diferencia de los microfilamentos y los microtúbulos, que son ensamblados a partir de una o dos proteínas, los filamentos intermedios son ensamblados por una gran y diversa familia de proteínas. Los filamentos intermedios más comunes, hallados en el núcleo, se componen de *laminas*. Los filamentos intermedios construidos a partir de otras proteínas se manifiestan preferentemente en ciertos tejidos; por ejemplo, los filamentos que contienen *queratina* en las células epiteliales, los que contienen *desmina*, en las células musculares y los que contienen *vimentina*, en las células mesenquimáticas.

▶ Fig. 5-29. Comparación de los tres tipos de filamentos que forman el citoesqueleto. (a) Diagrama de las estructuras básicas de un filamento de actina (FA), un filamento intermedio (FI) y un microtúbulo (MT). La estructura de cuentas de un filamento de actina muestra el empaquetamiento de las subunidades de actina. Las subunidades de los filamentos intermedios se empaquetan para formar cuerdas en las que las subunidades individuales son difíciles de distinguir. Las paredes de los microtúbulos están formadas por protofilamentos de subunidades de tubulina. (b) Microfotografía de una mezcla de filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios de vimentina, que muestra las diferencias de forma, tamaño, y flexibilidad. Preparaciones purificadas de subunidades de actina, tubulina y vimentina se polimerizaron separadamente en un tubo de ensayo para formar los filamentos correspondientes. Se aplicó una mezcla de los filamentos sobre una película de carbono sobre la grilla de un microscopio y luego se la enjuagó con una solución diluida de acetato de uranilo (UC), que rodea, pero no penetra la proteína. (c) Debido a que el acetato de uranilo es un metal pesado que dispersa los electrones fácilmente, las áreas de la grilla ocupadas por la proteína producen una imagen "negativa" en la película metálica cuando se proyecta sobre una placa fotográfica, como se muestra en la parte (b) (Parte (b) cortesía de G. Waller y P. Matsudaria.)

La mayoría de las células eucariontes contienen los tres tipos de filamentos citoesqueléticos que suelen concentrarse en distintos lugares. Por ejemplo, en las células epiteliales absorbentes que revisten la luz del intestino, los microfilamentos de actina son abundantes en la región apical, donde se asocian con uniones entre célula y célula, y mantienen una densa superficie de microvellosidades (fig. 5-30a). Los filamentos de actina también están presentes en una zona estrecha adyacente a la membrana plasmática en las regiones laterales de estas células. Los filamentos intermedios de queratina, que forman un

CUADRO 5-4 Subunidades proteicas en los filamentos citoesqueléticos

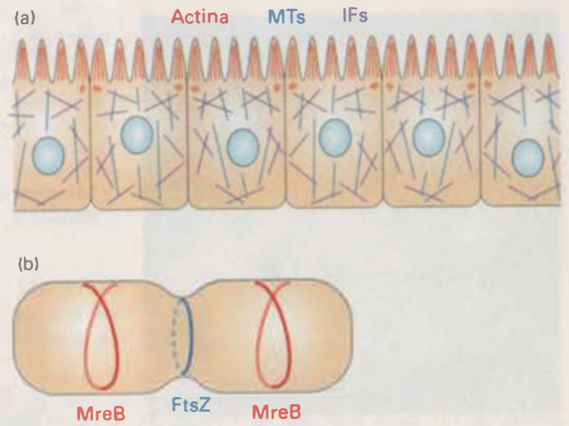
Subunidades proteicas	PM	Ubicación	Función
MICROFILAMENTOS			
Actina	42.000	Hongos, plantas, animales	Soporte estructural, movilidad
MreB	36.000	Bacterias con forma de bastón	Control de anchura
MICROTÚBULOS			
Tubulina (α y β)	58.000	Hongos, plantas, animales	Soporte estructural, movilidad, polaridad celular
FtsZ	58.000	Bacterias	División celular
FILAMENTOS INTERMEDIOS			
Laminas	Varios	Plantas, animales	Soporte para la membrana nuclear
Desmina, queratina, vimentina, otros	Varios	Animales	Adhesión celular
OTROS			
MSP	50.000	Esperma nematodo	Movilidad



entramado, conectan las microvellosidades y están conectados a las uniones entre las células. Los filamentos intermedios de la lamina sostienen la membrana nuclear interna. Por último, los microtúbulos, alineados con el eje a lo largo de la célula, están en cercana proximidad con los principales orgánulos, como el retículo endoplasmático, el complejo de Golgi y las vesículas.

El citoesqueleto ha sido altamente conservado durante la evolución. Una comparación de las secuencias genéticas evidencia sólo un pequeño porcentaje de diferencias entre las secuencias de actina y tubulina de levadura, y la de actina y tubulina humanas. Esta conservación estructural se explica por las diversas funciones críticas que dependen del citoesqueleto. Una mutación en una proteína del citoesqueleto podría desestabilizar el ensamblaje de filamentos y su unión con otras proteínas. Los análisis de la secuencia genética y de las estructuras proteicas han logrado identificar homólogos bacterianos de la actina y la tubulina. La ausencia de proteínas similares a los IF en las bacterias y en los eucariontes unicelulares es evidencia de que los filamentos intermedios aparecieron más tarde en la evolución del sistema citoesquelético. La primera proteína de los IF surgió probablemente de una lamina nuclear a partir de la cual evolucionaron las proteínas citosólicas de los IF.

El simple citoesqueleto bacteriano controla la longitud de la célula, la anchura y el sitio de división celular. La proteína FtsZ, un homólogo bacteriano de la tubulina, se ubica alrededor del cuello de las células bacterianas en división, lo que sugiere que la FtsZ participa en la división celular (fig. 5-30b). Los resultados de los experimentos bioquímicos con FtsZ purificada demuestran que puede polimerizarse para producir protofilamentos, pero éstos no se agrupan para formar microtúbulos intactos. Se descubrió que otra proteína bacteriana, la MreB, es similar a la actina en cuanto a la estructura atómica y de los filamentos; una fuerte evidencia de que la actina evolucionó a partir de la MreB. Las claves para la función de la MreB incluyen su localización en un filamento que circunda las células bacterianas con forma de bastón, su ausencia en las bacterias esféricas y el hallazgo de que las células mutantes que carecen de MreB se vuelven más anchas, pero no más largas. Estas observaciones indican que MreB controla la longitud de las bacterias con forma de bastón.



▲ Fig. 5-30. Representación esquemática de la distribución de los filamentos del citoesqueleto en las células eucariontes y bacterianas. (a) En las células epiteliales absortivas, los filamentos de actina (FA) (rojo) están concentrados en la región apical y en una banda estrecha en la región basolateral. Los microtúbulos (MT) (azul) se orientan con el eje mayor de la célula, y los filamentos intermedios (FI) (verde) se concentran a lo largo de la periferia celular, sobre todo en las uniones especializadas con las células vecinas y recubriendo la membrana nuclear. (b) En una célula bacteriana con forma de bastón, los filamentos de MreB, el homólogo bacteriano de la actina, circundan la célula y constriñen su anchura. El homólogo bacteriano de la tubulina, la FtsZ, forma filamentos en los sitios de la división celular.

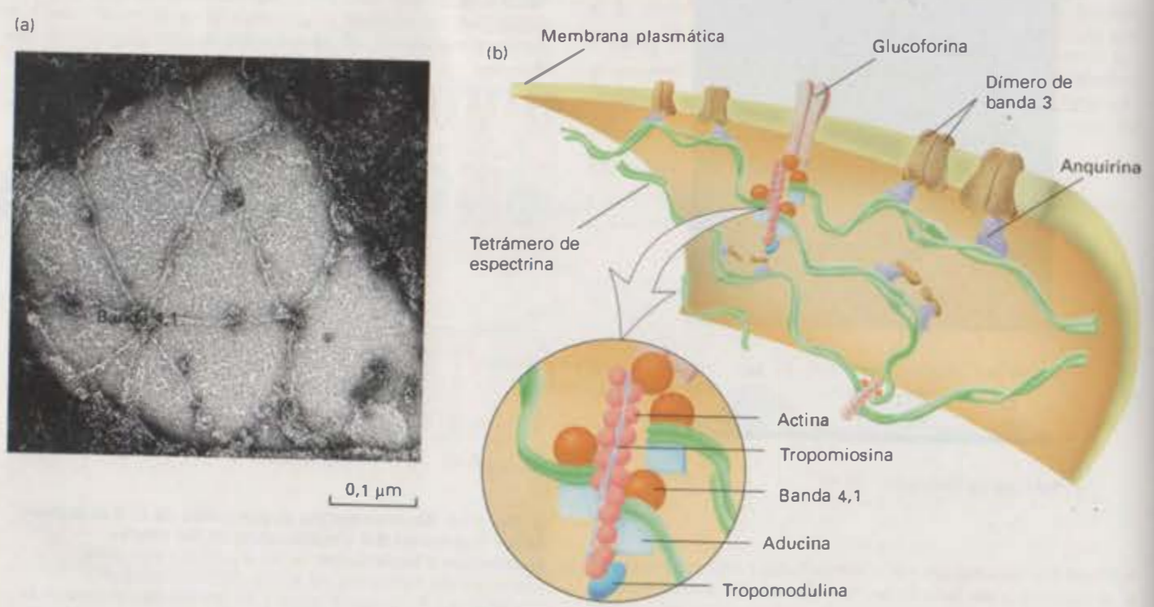
Los filamentos del citoesqueleto están organizados en haces y retículos

Cuando se observan por primera vez las microfotografías de una célula, lo que más impresiona es la densa y aparentemente desorganizada trama de filamentos presentes en el citosol. Sin embargo, un ojo entrenado comenzará a detectar áreas, generalmente donde la membrana se proyecta desde la superficie celular o donde una célula se adhiere a la superficie de otra célula, en las cuales los filamentos están concentrados en haces. Desde estos haces, los filamentos continúan hacia el interior de la célula, donde se acomodan y pasan a formar parte de un retículo de filamentos. Estas dos estructuras, los *haces* y los *retículos*, son las disposiciones más frecuentes de filamentos del citoesqueleto en una célula.

Estructuralmente, los haces difieren de los retículos principalmente en la organización de los filamentos. En los haces, los filamentos están estrechamente empaquetados en disposiciones paralelas. En un retículo, los filamentos se entrecruzan, a menudo en ángulos rectos, y están empaquetados en forma laxa. Los retículos pueden estar más subdivididos. Un tipo, asociado con las membranas plasmática y nuclear, es planar (bidimensional), como una malla o una red; otro tipo, presente dentro de la célula, es tridimensional, y le confiere al citosol propiedades similares a las de un gel. En todos los haces y los retículos, los filamentos están unidos entre sí por diversas proteínas de enlaces cruzados. Consideraremos diversas proteínas del citoesqueleto de enlace cruzado, así como sus funciones, en los capítulos 19 y 20.

Los microfilamentos y las proteínas de unión a la membrana forman un esqueleto subyacente a la membrana plasmática

La forma distintiva de una célula depende de la organización de los filamentos de actina y de las proteínas que conectan los microfilamentos a la membrana. Estas proteínas, denominadas *proteínas de unión de microfilamentos a la membrana*, actúan como soldaduras puntuales que fijan el armazón del citoesqueleto de actina a la membrana que yace por encima. Cuando la membrana se encuentra adherida a un haz de filamentos, adquiere la forma digitiforme de una microvellosidad o una proyección similar (véase fig. 5-28). Cuando se encuentra adherida a un retículo de filamentos plano, se mantiene plana como la membrana celular del glóbulo rojo. Las conexiones más simples entre la membrana y el citoesqueleto implican la unión de proteínas integrales directamente a los filamentos de actina. Más comunes son las uniones que conectan los filamentos de actina con las proteínas integrales de membrana a través de proteínas periféricas de membrana que funcionan como proteínas adaptadoras. Tales uniones entre el citoesqueleto y ciertas proteínas de membrana plasmáticas se tratan en el capítulo 6.



▲ Fig. 5-31. Citoesqueleto cortical que sostiene la membrana plasmática en los eritrocitos humanos. (a) Microfotografía electrónica de una membrana de eritrocito que muestra la organización de rayos y ejes del citoesqueleto. Los rayos largos están compuestos principalmente de espectrina y se puede ver cómo se intersectan en los ejes, o sitios de adhesión a la membrana. Los puntos más oscuros a lo largo de los rayos son moléculas de anquirina, que establecen enlaces cruzados entre la espectrina y las proteínas integrales de membrana. (b) Diagrama del citoesqueleto de los eritrocitos que muestra los distintos componentes. Para mayor información véase el texto. [Parte (a) de T. J. Byers y D. Branton, 1985, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 82:6153. Cortesía de D. Branton. Parte (b) adaptada de S. E. Lux, 1979, *Nature* 281:426, y E. J. Luna y A. L. Hitt, 1992, *Science* 258:955.]

El área más rica en filamentos de actina en muchas células está en la *corteza*, una zona estrecha inmediatamente debajo de la membrana plasmática. En esta región, la mayoría de los filamentos de actina se disponen en un retículo que excluye a la mayor parte de los orgánulos del citoplasma cortical. Quizás el citoesqueleto más simple es el retículo bidimensional de filamentos de actina adyacentes a la membrana plasmática del eritrocito. En citoesqueletos más complicados, como los de las plaquetas, las células epiteliales y los músculos, los filamentos de actina son parte de un retículo tridimensional que llena el citosol y ancla la célula al sitio de apoyo.

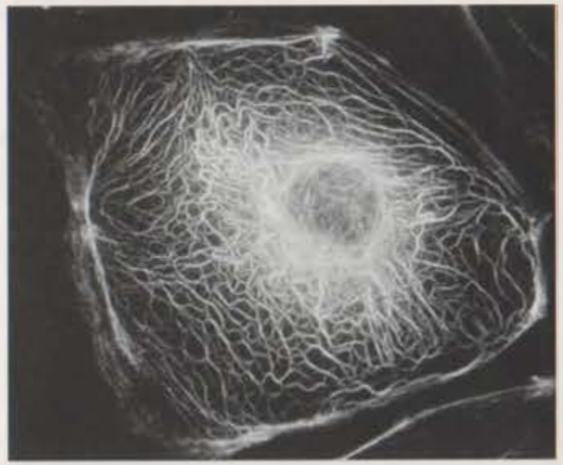
Un glóbulo rojo debe escurrirse a través de capilares sanguíneos estrechos sin romper su membrana. La fuerza y flexibilidad de la membrana plasmática del eritrocito dependen de un retículo citoesquelético denso que subyace a toda la membrana y que está adherido a ella en muchos puntos. El componente principal del citoesqueleto del eritrocito es la *espectrina*, una proteína fibrosa de 200 nm de largo. Todo el citoesqueleto está dispuesto en forma de rayos y ejes de una rueda formando una red (fig. 5-31a). Cada rayo está compuesto por una molécula única de espectrina que se extiende desde dos ejes y establece un enlace cruzado entre ellos. Cada eje comprende un filamento corto de actina (14 subunidades) más aducina, tropomiosina y tropomodulina (fig. 5-31b, *recuadro*). Las dos últimas proteínas fortalecen el retículo al evitar que los filamentos de actina se despolimericen. Seis o siete rayos irradian desde cada eje, lo que sugiere que seis o siete moléculas de espectrina están unidas al mismo filamento de actina.

Para asegurar que el eritrocito conserve su forma característica, el citoesqueleto de actina y espectrina se adhiere con firmeza a la membrana plasmática que yace por encima del eritrocito por medio de dos proteínas periféricas de membrana, cada una de las cuales se une a proteínas integrales y a fosfolípidos de membrana. La *anquirina* conecta el centro de la espectrina a la proteína banda 3, una proteína de la membrana transportadora de aniones. La *proteína banda 4,1*, un componente del eje, se une a la proteína integral de membrana glucoforina, cuya estructura ya se explicó (véase fig. 5-12). Tanto la proteína anquirina como la banda 4,1 contienen también motivos de unión a lípidos, que ayudan a unirla a la membrana (véase cuadro 5-3). La unión dual por anquirina y banda 4.1 asegura que la membrana esté conectada tanto a los rayos como a los ejes del citoesqueleto de actina y espectrina (véase fig. 5-31b).

Los filamentos intermedios sostienen la membrana nuclear y ayudan a conectar las células para formar tejidos

Los filamentos intermedios atraviesan el citosol y forman un entramado interno que se extiende desde el envoltorio nuclear hasta la membrana plasmática (fig. 5-32). Una red de filamentos intermedios se localiza junto a algunas membranas celulares, donde proporciona soporte mecánico. Por ejemplo, los filamentos de la lamina A y de la lamina C forman un entramado ortogonal que se asocia con la lamina B. Toda la estructura de sostén, denominada **lámina nuclear**, está anclada a la membrana nuclear interna por medio de anclas prenilo o laminas B.

En la membrana plasmática, los filamentos intermedios están adheridos por proteínas adaptadoras a uniones celulares especializadas denominadas *desmosomas* y *hemidesmosomas*,

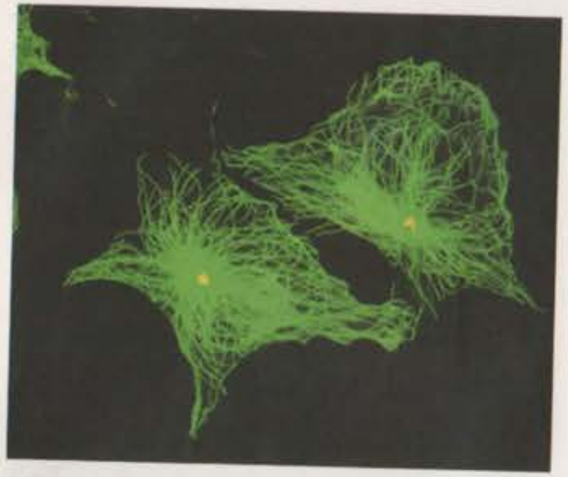


▲ Fig. 5-32. Microfotografía fluorescente de una célula de fibroblasto PtK2 teñida para revelar los filamentos intermedios de queratina. Un retículo de filamentos atraviesa la célula desde el núcleo hasta la membrana plasmática. En la membrana plasmática, los filamentos están unidos por proteínas adaptadoras a dos tipos de uniones de anclaje: los desmosomas entre células adyacentes y los hemidesmosomas entre la célula y la matriz. (Cortesía de D. Goldman.)

que median, respectivamente, la adhesión entre célula y célula, y entre la célula y la matriz, sobre todo en los tejidos epiteliales. De esta forma, los filamentos intermedios de una célula están conectados indirectamente a los filamentos intermedios de una célula vecina o a la matriz extracelular. Debido a los importantes papeles de las uniones celulares en la adhesión celular y en la estabilidad de los tejidos, en el capítulo 6 examinamos con mayor detalle su estructura y su relación con los filamentos citoesqueléticos.

Los microtúbulos se extienden desde los centrosomas y organizan ciertas estructuras subcelulares

Al igual que los microfilamentos y los filamentos intermedios, los microtúbulos no están distribuidos aleatoriamente en la célula. En cambio, se extienden desde el centrosoma, que es el principal centro organizador de microtúbulos (MTOC) en las células animales (fig. 5-33). Como se describe en el capítulo 20, los dos extremos de un microtúbulo difieren en sus propiedades dinámicas y son designados comúnmente como los extremos (+) y (–). Por esta razón, los microtúbulos pueden tener distintas orientaciones relativas entre sí y con otras estructuras celulares. En muchas células animales que no se dividen, el MTOC se localiza en el centro de la célula cerca del núcleo, y los microtúbulos que se irradian están todos orientados con sus extremos (+) dirigidos hacia la periferia de la célula. Aunque la mayoría de las células animales en interfase contienen un MTOC perinuclear único, las células epiteliales y las células vegetales contienen cientos de MTOC. Ambos tipos celulares exhiben distintas propiedades



▲ Fig. 5-33 Microfotografía fluorescente de una célula de ovario de hámster chino teñida para revelar los microtúbulos y el MTOC. Se aprecia que los microtúbulos (verde), detectados con un anticuerpo para la tubulina, irradian desde un punto central, el centro de organizador de microtúbulos (MTOC), cerca del núcleo. El MTOC (amarillo) es detectado con un anticuerpo para una proteína localizada en el centrosoma. (Cortesía de R. Kuriyama.)

funcionales o estructurales en diferentes regiones de la célula. La **polaridad** estructural de estas células está unida a la orientación de microtúbulos dentro de ellas.

Los hallazgos de estudios que se analizan en el capítulo 20 muestran que la asociación de los microtúbulos con el retículo endoplasmático y otros orgánulos limitados por membrana puede ser crítica para la ubicación y organización de estos orgánulos dentro de la célula. Por ejemplo, si los microtúbulos son destruidos por drogas como el nocodazol o el colcemid, el RE pierde su organización tipo reticular. Los microtúbulos también son críticos para la formación del aparato mitótico; la estructura elaborada y transitoria que en la división celular captura y luego separa a los cromosomas replicados.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 5.4

El citoesqueleto: componentes y funciones estructurales

- El citosol es el medio acuoso interno de la célula exclusivo de todos los orgánulos y del citoesqueleto. Contiene numerosas enzimas solubles responsables de gran parte de la actividad metabólica de la célula.
- Tres tipos principales de filamentos proteicos –los filamentos de actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios– constituyen el citoesqueleto (véase fig. 5-29).
- Los microfilamentos son ensamblados a partir de subunidades monoméricas de actina; los microtúbulos, a partir de subunidades de α y β tubulina; y los filamentos intermedios, a partir de subunidades de lamina y otras proteínas específicas de los tejidos.
- En todas las células animales y vegetales, el citoesqueleto provee estabilidad estructural para la célula y contribuye al movimiento celular. Algunas bacterias tienen un citoesqueleto primitivo.
- Los haces de actina forman el núcleo de microvellosidades y otras proyecciones digitiformes de la membrana plasmática.
- Los retículos corticales de espectrina y actina están unidos a la membrana celular por proteínas bivalentes de unión a los microfilamentos y a la membrana, como la anquirina y la banda 4,1 (véase fig. 5-31).
- Los filamentos intermedios son ensamblados para formar retículos y haces a través de diversas proteínas de unión a filamentos que también establecen enlaces cruzados entre los filamentos intermedios y las membranas plasmática y nuclear, los microtúbulos y los microfilamentos.
- En algunas células animales, los microtúbulos se extienden hacia afuera desde un centro organizador único de microtúbulos situado en el centro de la célula (véase fig. 5-33). Los microtúbulos intactos parecen ser necesarios para que el retículo endoplasmático y las membranas del Golgi constituyan estructuras organizadas.

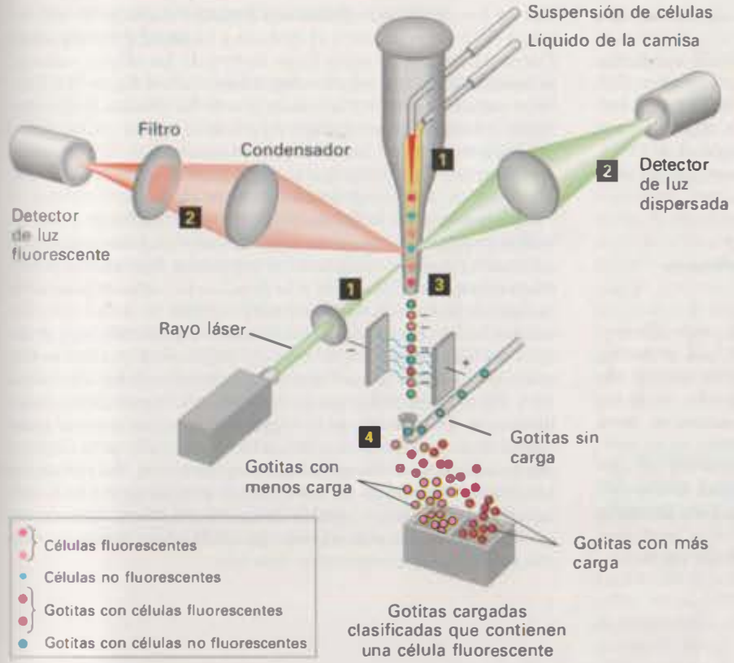
5.5 Purificación de las células y de sus partes

Muchos estudios acerca de la estructura y función celular requieren muestras de un tipo particular de orgánulo celular o subcelular. Sin embargo, la mayoría de los tejidos celulares y vegetales contienen una mezcla de tipos de células; de igual manera, la mayoría de las células están llenas de diversos orgánulos. En esta sección, describimos varias técnicas utilizadas comúnmente para separar los diferentes tipos de células y orgánulos. La purificación de proteínas de membrana presenta algunos problemas exclusivos que también se consideran aquí.

La citometría de flujo separa distintos tipos celulares

Algunos tipos celulares difieren en densidad lo suficiente como para ser separados de acuerdo con esta propiedad física. Por ejemplo, los glóbulos blancos (leucocitos) y los glóbulos rojos (eritrocitos) tienen densidades muy diferentes debido a que los eritrocitos no tienen núcleo; por ende, estas células pueden ser separadas por centrifugación en equilibrio de densidad (descrita más adelante). Dado que la mayoría de los tipos celulares no pueden ser diferenciados con tanta facilidad, para separarlos deben usarse otras técnicas, como la citometría de flujo.

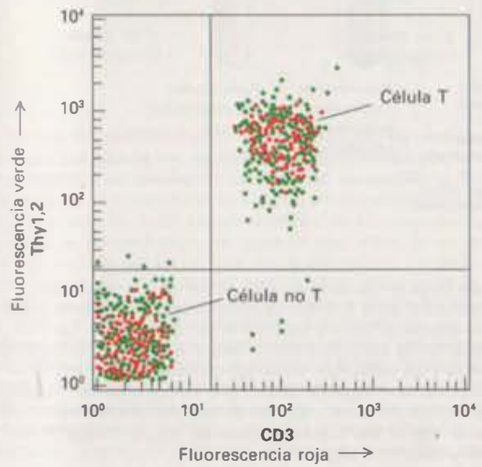
La citometría de flujo identifica diferentes células con la medición de la luz que dispersan y la fluorescencia que emiten a medida que fluyen a través de un rayo láser; así puede clasificar células de un tipo en particular presentes en una mezcla. Más aún, el *clasificador celular activado por fluorescencia* (*FACS*), un instrumento basado en la citometría de flujo, puede seleccionar una célula a partir de cientos de otras



◀ FIGURA EXPERIMENTAL 5-34 El clasificador celular activado por fluorescencia (FACS) separa células marcadas diferencialmente con un reactivo fluorescente. Paso 1: Una suspensión concentrada de células marcadas se mezcla con el buffer (el líquido de la vaina) de manera tal que las células pasen de a una a través del haz de rayos láser: Paso 2: Se mide tanto la luz fluorescente emitida como la luz dispersada por cada célula; a partir de las medidas de la luz dispersada, se puede determinar el tamaño y la forma de las células. Paso 3: Luego la suspensión es forzada a pasar a través de una boquilla que forma pequeñas gotitas que contienen, como máximo, una célula. En el momento de la formación, a cada gotita se le da una carga eléctrica proporcional a la cantidad de fluorescencia de su célula. Paso 4: Las gotitas sin carga y aquellas con cargas eléctricas diferentes son separadas mediante un campo eléctrico y recogidas. Solo se tardan milisegundos para clasificar cada gotita, por lo que pueden pasar a través del dispositivo tanto como 10 millones de células por hora. De esta forma, es posible separar y luego cultivar las células con las propiedades deseadas. (Adaptado de D. R. Parks y L. A. Herzenberg, 1982, *Meth. Cell Biol.* 26:283.)

células (fig. 5-34). Por ejemplo, si un anticuerpo específico para una cierta molécula de la superficie celular está unido a un colorante fluorescente, cualquier célula que tenga esa molécula fijará el anticuerpo y luego será separada de otras células cuando fluorezca en el FACS. Una vez separadas de otras células, las células seleccionadas pueden cultivarse.

El procedimiento FACS se utiliza para purificar los diferentes tipos de glóbulos blancos, cada uno de los cuales lleva en su superficie una o más proteínas distintivas y así unirá anticuerpos monoclonales específicos para esa proteína.



Sólo las células T del sistema inmune, por ejemplo, tienen tanto la proteína CD3 como la Thy 1,2 en su superficie. La presencia de estas proteínas de superficie les permite a las células T separarse con facilidad de otros tipos de células sanguíneas o células del bazo (fig. 5-35). En una variación del uso de anticuerpos monoclonales para la separación de células, pequeñas esferas o cuentas magnéticas son recubiertas con un anticuerpo monoclonal específico para una proteína de superficie como la CD3 o la Thy 1,2. Sólo las células con estas proteínas se pegarán a las esferas y podrán recuperarse



◀ FIGURA EXPERIMENTAL 5-35 Las células T unidas a anticuerpos marcados con fluorescencia para dos proteínas de la superficie celular son separadas de otros glóbulos blancos por FACS. Las células del bazo de un ratón reaccionan con un anticuerpo monoclonal marcado con fluorescencia (verde) específico para la proteína CD3 de la superficie celular y con un anticuerpo monoclonal marcado con fluorescencia (rojo) específico para una segunda proteína de la superficie celular, Thy 1,2. A medida que las células fueron pasando a través de la máquina FACS, se grabó la intensidad de la fluorescencia roja y verde emitida por cada célula. Este esquema de la fluorescencia roja (eje vertical) versus la fluorescencia verde (eje horizontal) para miles de células muestra que cerca de la mitad de las células –las células T– expresan sobre sus superficies tanto la proteína CD3 como la Thy1,2 (cuadrante superior derecho). Las células restantes, que exhiben baja fluorescencia (cuadrante inferior izquierdo), expresan sólo niveles de fondo de estas proteínas y son otros tipos de glóbulos blancos. Nótese la escala logarítmica en ambos ejes (Cortesía de Chengcheng Zhang.)

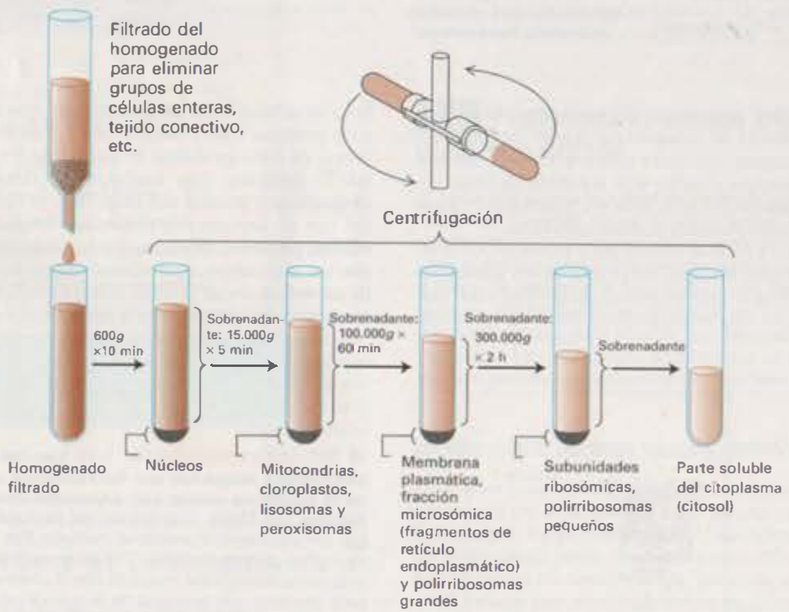
de la preparación por adhesión a pequeños magnetos en los lados del tubo de ensayo.

Otros usos de la citometría de flujo incluyen la medición del contenido de DNA y RNA de una célula y la determinación de su forma y de su tamaño general. El FACS puede hacer mediciones simultáneas del tamaño de una célula (a partir de la cantidad de luz dispersada) y de la cantidad de DNA que contiene (a partir de la cantidad de fluorescencia emitida por un colorante unido al DNA).

La ruptura de las células libera sus orgánulos y demás elementos celulares

El paso inicial en la purificación de estructuras subcelulares es romper la membrana plasmática y, si está presente, la pared celular. Primero, las células se suspenden en una solución de un pH y un contenido salino apropiado, en general sacarosa isotónica (0,25 M) o una combinación de sales similares en composición a las que se encuentran en el interior de la célula. Así, es posible romper muchas células al agitar la suspensión en un agitador de alta velocidad o al exponerla a sonidos de muy alta frecuencia (*sonicación*). También es posible fragmentar las membranas plasmáticas mediante equipos especiales de homogenización de tejidos presurizados en los cuales las células son forzadas a través de un espacio muy estrecho entre el émbolo y la pared del recipiente. Como ya se dijo, el agua fluye dentro de las células cuando se las coloca en una solución hipotónica (véase fig. 5-18). Este flujo osmótico provoca la hinchazón de las células, lo que debilita la membrana plasmática y facilita su ruptura. Casi siempre, la solución con las células se mantiene a 0 °C para preservar mejor las enzimas y otros constituyentes tras ser liberados de las fuerzas estabilizadoras celulares.

La ruptura de la célula produce una mezcla de componentes celulares suspendidos que se denomina homogenado, del cual se pueden recuperar los orgánulos buscados. La homogeneización de la célula y la dilución del citosol provocan la **despolimerización** de los microfilamentos de actina y de los microtúbulos, liberando sus subunidades monoméricas, y divide los filamentos intermedios en fragmentos pequeños. De este modo, otros procedimientos, descritos en los capítulos 19 y 20, son utilizados para estudiar estos importantes constituyentes. Debido a que el hígado de la rata contiene gran cantidad de un tipo único de células, este tejido se utilizó en muchos estudios clásicos de orgánulos celulares. Sin embargo, los mismos principios de aislamiento se aplican a casi todas las células y tejidos, y pueden utilizarse modificaciones de estas técnicas de fraccionamiento de células para separar y purificar cualquier componente deseado.

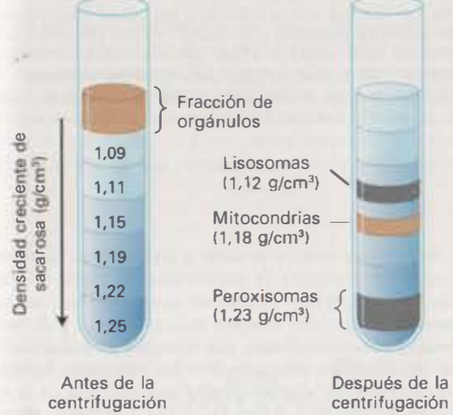


▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 5-36 La centrifugación diferencial es un primer paso común en el fraccionamiento de un homogenado de células.** El homogenado resultante de la ruptura de células es filtrado para eliminar las células intactas y luego centrifugado a una velocidad medianamente baja para sedimentar el núcleo; el orgánulo más grande. El material no precipitado (el sobrenadante) se centrifuga entonces a mayor velocidad para sedimentar las mitocondrias, los cloroplastos, los lisosomas y los perixosomas. La posterior centrifugación en ultracentrífuga a 100,000*g* durante 60 minutos produce la sedimentación de la membrana plasmática, los fragmentos del retículo endoplasmático y los polirribosomas grandes. La recuperación de las subunidades ribosómicas, los polirribosomas pequeños y las partículas, como los complejos de enzimas, requiere una centrifugación adicional a velocidades aún mayores. Sólo el citosol –la porción acuosa soluble del citoplasma– permanece en el sobrenadante luego de una centrifugación a 300.000*g* durante 2 horas.

La centrifugación puede separar muchos tipos de orgánulos

En el capítulo 3 consideramos los principios de la centrifugación y los usos de las técnicas de centrifugación para separar las proteínas y los ácidos nucleicos. Se emplean métodos similares para separar y purificar los diversos orgánulos, que difieren en tamaño y densidad, y por ende experimentan la sedimentación a diferentes velocidades.

La mayoría de los procedimientos de fraccionamiento celular comienzan con la *centrifugación diferencial* de un homogenado celular previamente filtrado, a velocidades cada vez más altas (fig. 5-36). Luego de la centrifugación con cada velocidad por un tiempo apropiado, se vuelca el sobrenadante y se centrifuga a una velocidad aún mayor. Las fracciones sedimentadas obtenidas por centrifugación diferencial suelen contener una mezcla de orgánulos, aunque el núcleo y las partículas virales pueden a veces ser purificados por completo con este procedimiento. Una fracción de orgánulo impura, obtenida por centrifugación diferencial, puede luego ser purificada aún más por *centrifugación en gradiente de densidad en equilibrio*, que separa los componentes celulares de acuerdo con su densidad. Una vez resuspendida la fracción, se coloca en la parte superior de una solución que contiene un gradiente de una sustancia densa no iónica (p. ej., sacarosa o glicerol). El tubo se centrifuga a alta velocidad (alrededor de 40.000 rpm) durante varias horas, permitiéndole a cada partícula migrar a una posición de equilibrio donde la densidad del líquido circundante es igual a la de la partícula (fig. 5-37).



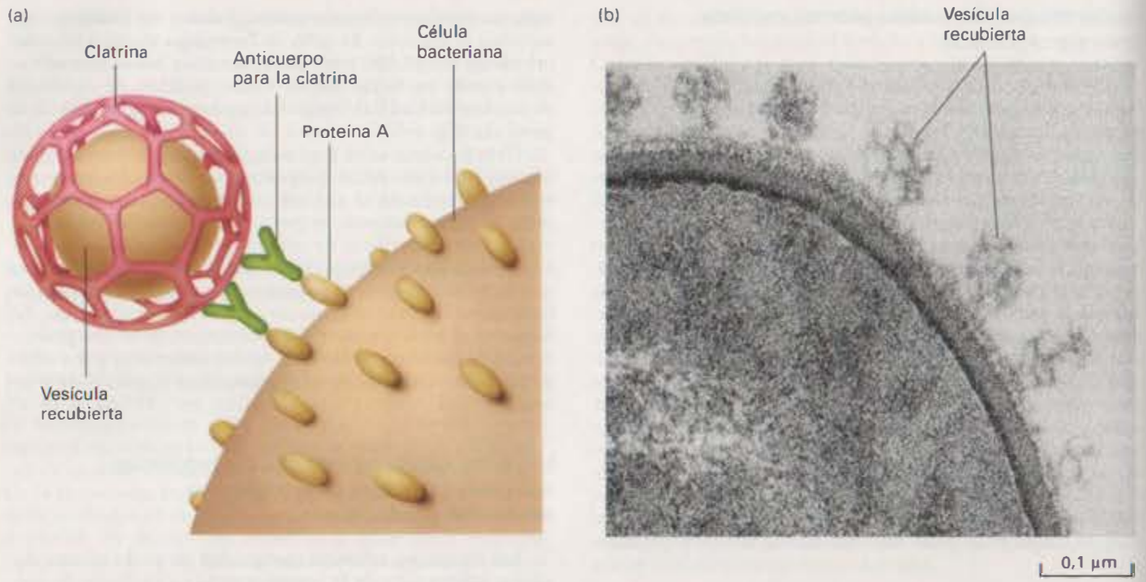
▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 5-37 Una fracción de una mezcla de orgánulos puede ser separada posteriormente por centrifugación en gradiente de densidad en equilibrio.** En este ejemplo, el material del sedimento de la centrifugación a 15.000*g* (véase fig. 5-36) se resuspende y se lo coloca sobre un gradiente de concentración creciente de soluciones de sacarosa cada vez más densa, en un tubo de centrifugación. Durante la centrifugación por varias horas, cada orgánulo migra hacia la densidad de equilibrio apropiada y permanece allí. Para obtener una separación adecuada de lisosomas y mitocondrias, se perfunde el hígado con una solución que contiene una pequeña cantidad de detergente antes de romper el tejido. Durante este período, el detergente es incorporado dentro de la célula por endocitosis y transferido a los lisosomas, haciéndolos menos densos de lo que normalmente serían, lo cual permite una separación "limpia" de lisosomas respecto de las mitocondrias.

Debido a que cada orgánulo tiene rasgos morfológicos únicos, la pureza de las preparaciones de orgánulos puede evaluarse mediante el análisis con un microscopio electrónico. Alternativamente, se puede cuantificar las moléculas marcadoras específicas de orgánulos. Por ejemplo, la proteína citocromo *c* está presente sólo en la mitocondria; así que la presencia de esta proteína en un fraccionamiento de lisosomas indicaría su contaminación con mitocondrias. En forma similar, la catalasa está presente sólo en los perixosomas; la fosfatasa ácida sólo en los lisosomas, y los ribosomas sólo en el retículo endoplasmático rugoso o en el citosol.

Los anticuerpos específicos de orgánulos son útiles para preparar orgánulos altamente purificados

Las fracciones celulares que quedan luego de la centrifugación diferencial y de la centrifugación en gradiente de densidad en equilibrio todavía pueden contener más de un tipo de orgánulo. Los anticuerpos **monoclonales** para diversas proteínas de membrana específicas de un orgánulo son una herramienta poderosa para la purificación posterior de tales fraccionamientos. Un ejemplo es la purificación de vesículas recubiertas cuya superficie exterior está cubierta con clatrina (fig. 5-38). Un anticuerpo para la clatrina, unido a un soporte bacteriano, puede unir selectivamente estas vesículas en una preparación cruda de membranas, y todo el complejo del anticuerpo luego puede ser aislado mediante centrifugación a baja velocidad. Una técnica relacionada utiliza esferas metálicas pequeñas cubiertas con anticuerpos específicos. Los orgánulos que se unen a los anticuerpos, y que por ende están unidos a las esferas metálicas, son recuperados de la preparación al adherirse a un pequeño imán al costado del tubo de ensayo.

Todas las células contienen una docena o más de tipos diferentes de vesículas pequeñas limitadas por membrana de aproximadamente el mismo tamaño (50-100 nm de diámetro) y densidad. Debido a su tamaño y forma similares, estas vesículas son difíciles de separar por técnicas de centrifugación. Las técnicas inmunológicas son muy útiles para purificar clases específicas de **esas** vesículas. Por ejemplo, las células grasas y musculares contienen un transportador de glucosa en particular (GLUT4) ubicado en la membrana de un tipo específico de vesícula. Cuando la insulina se añade a las células, estas vesículas se fusionan con la membrana de la superficie celular e incrementan el número de transportadores de glucosa capaces de tomar glucosa de la sangre. Como veremos en el capítulo 15, este proceso es crítico para mantener la concentración apropiada de azúcar en la sangre. Las vesículas que contienen GLUT4 pueden ser purificadas utilizando un anticuerpo que se une al segmento de la proteína GLUT4 orientada hacia el citosol. De igual manera, las diversas vesículas de transporte tratadas en el capítulo 7 se caracterizan por proteínas superficiales únicas que permiten su separación con la ayuda de anticuerpos específicos.



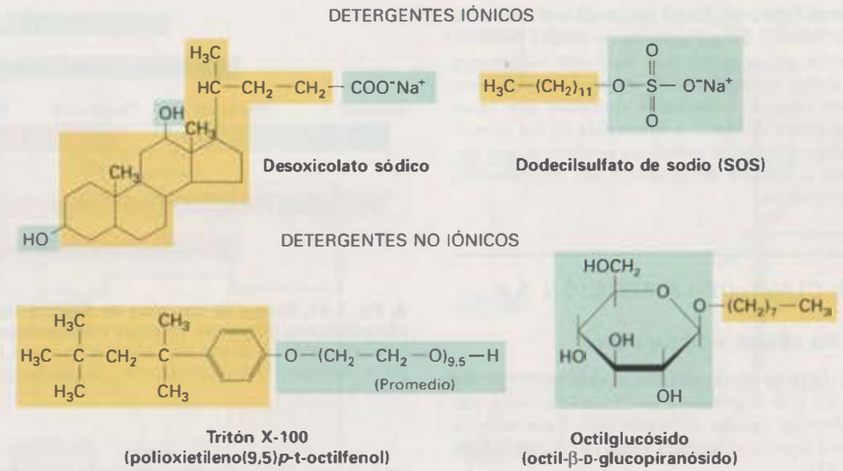
▲ FIGURA EXPERIMENTAL 5-38 Vesículas pequeñas pueden ser purificadas por unión con un anticuerpo especifico para una proteína de la superficie vesicular que también se une a células bacterianas. En este ejemplo, una suspensión de membranas provenientes de hígado de rata se incuba con un anticuerpo especifico para la clatrina, una proteína que recubre la superficie exterior de ciertas vesículas citosólicas. A esta mezcla se le agrega una suspensión de bacterias de *Staphylococcus aureus*, cuya membrana superficial contiene proteína A, que se une a la región constante Fc de los anticuerpos. (a) La interacción de la proteína A con anticuerpos unidos a las vesículas recubiertas por clatrina une la vesícula a las células bacterianas. Estos complejos de bacterias y vesículas pueden posteriormente recuperarse por centrifugación a baja velocidad. (b) Microfotografía electrónica de una sección delgada que revela las vesículas recubiertas por clatrina, unidas a una célula de *S. aureus*. (Véase E. Merisko et al., 1982, *J. Cell Biol.* 93:846. Microfotografía cortesía de G. Palade.)

Las proteínas pueden ser extraídas de las membranas por la acción de detergentes o soluciones salinas concentradas

Los detergentes son moléculas anfipáticas que rompen la membrana al intercalarse dentro de las bicapas fosfolipídicas y solubilizan lípidos y proteínas. La parte hidrófoba de una molécula de detergente es atraída hacia cadenas hidrocarbonadas y luego se entremezcla con facilidad con ellas; la parte hidrófila es atraída fuertemente hacia el agua. Algunos detergentes son productos naturales, pero la mayoría son moléculas sintéticas desarrolladas para limpiar y dispersar mezclas de aceites y agua (fig. 5-39). Los detergentes iónicos, como el desoxicolato de sodio y el dodecilsulfato de sodio (SDS), contienen un grupo cargado; los detergentes no iónicos, como el Triton X-100 y el octilglucósido, carecen de grupos cargados. A muy bajas concentraciones, los detergentes se disuelven en agua pura como moléculas aisladas. En cuanto la concentración aumenta, las moléculas empiezan a formar micelas, pequeños conglomerados esféricos en los cuales las partes hidrófilas de las moléculas se orientan hacia el exterior y las partes hidrófobas se agrupan en el centro (véase fig. 2-20). La *concentración micelar crítica (CMC)* a la cual se forman las micelas es característica de cada detergente y es una función de las estructuras de sus partes hidrófobas e hidrófilas.

Los *detergentes iónicos* se unen a las regiones hidrófobas expuestas de las proteínas de membrana, así como al centro hidrófobo de las proteínas solubles en agua. Debido a su carga, estos detergentes también rompen enlaces iónicos y de hidrógeno. A altas concentraciones, por ejemplo, el dodecilsulfato de sodio desnaturaliza por completo las proteínas, ligándose a cada cadena lateral, una propiedad aprovechada en la electroforesis en gel con SDS (véase fig. 3-32). Los *detergentes no iónicos* no desnaturalizan las proteínas y por ello son útiles en la extracción de proteínas de membranas antes de purificarlas. Estos detergentes actúan de distintas maneras y a diferentes concentraciones. A altas concentraciones (por encima de la CMC) solubilizan membranas biológicas y forman micelas mixtas de detergente, fosfolípidos y proteínas integrales de membrana (fig. 5-40). A bajas concentraciones (debajo de la CMC), se unen a las regiones hidrófobas de la mayoría de las proteínas integrales de membrana y las hacen solubles en soluciones acuosas.

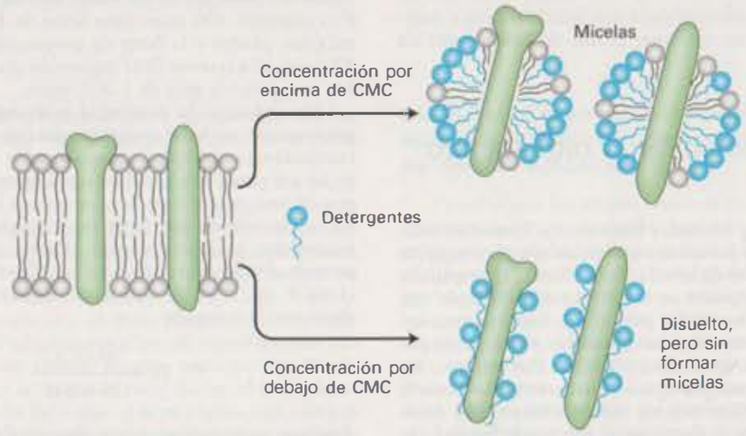
El tratamiento de células cultivadas con una solución de buffer salino, que contiene un detergente no iónico, como el Triton X-100, extrae las proteínas solubles en agua, así como las proteínas integrales de membrana. Como ya se dijo, los dominios exoplasmático y citosólico de las proteínas integrales de membrana son generalmente hidrófilos y solubles en agua. Sin embargo, el dominio que atraviesa la membrana es



▲ Fig. 5-39. Estructura de cuatro detergentes comunes. La parte hidrófoba de cada molécula se muestra en amarillo; la parte hidrófila, en azul. La sal biliar desoxicolato sódico es un producto natural; los otros son sintéticos. Aunque los detergentes iónicos comúnmente utilizados provocan la desnaturalización de las proteínas, los detergentes no iónicos no lo hacen y por ende son útiles para solubilizar proteínas integrales de membrana.

rico en residuos hidrófobos no cargados (véase fig. 5-12). Cuando son separados de la membrana, estos segmentos hidrófobos expuestos tienden a interactuar y provocan la agrupación de las moléculas de proteína y su precipitación de la solución acuosa. Las partes hidrófobas de las moléculas del detergente no iónico se ligan preferentemente a los segmentos hidrófobos de las proteínas transmembrana, impiden la agrupación de proteínas y les permite a las proteínas permanecer en la solución acuosa. Las proteínas transmembrana, solubles en detergentes, pueden luego ser purificadas por cromatografía de afinidad y otras técnicas usadas en la purificación de proteínas solubles en agua (cap. 3).

Como ya se mencionó, la mayoría de las proteínas periféricas están unidas a proteínas transmembrana específicas o



▲ Fig. 5-40. Solubilización de proteínas integrales de membrana con detergentes no iónicos. A una concentración superior a la concentración micelar crítica (CMC), un detergente solubiliza lípidos y proteínas integrales de membrana, formando micelas mixtas que contienen moléculas de detergente, de proteínas y de lípidos. A concentraciones inferiores a la CMC, los detergentes no iónicos (p. ej., octilglucósido, Triton X-100) pueden disolver proteínas de membrana sin formar micelas, al recubrir las regiones que atraviesan la membrana.

a fosfolípidos de membrana mediante interacciones iónicas u otras interacciones débiles. En general, las proteínas periféricas se pueden extraer de la membrana mediante soluciones con gran fuerza iónica (concentración salina elevada), que rompen los enlaces iónicos, o mediante químicos que unen cationes divalentes como el Mg^{2+}. A diferencia de las proteínas integrales, la mayoría de las proteínas periféricas son solubles en soluciones acuosas y no necesitan ser solubilizadas por detergentes no iónicos.

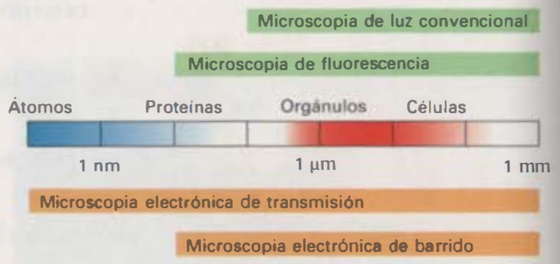
CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 5.5

Purificación de las células y de sus partes

- La citometría de flujo puede identificar diferentes células basándose en la luz que dispersan y en la fluorescencia que emiten. El clasificador celular activado por fluorescencia (FACS) es útil para separar diferentes tipos de células (véanse figs. 5-34 y 5-35).
- La ruptura de las células por homogeneización, sonificación vigorosa u otras técnicas libera sus orgánulos. La hinchazón de las células en una solución hipotónica debilita la membrana plasmática y facilita su ruptura.
- La centrifugación diferencial secuencial de un homogenado celular produce fracciones de orgánulos parcialmente purificadas que difieren en masa y densidad (véase fig. 5-36).
- La centrifugación en gradiente de densidad en equilibrio, que separa los componentes celulares de acuerdo con sus densidades, puede purificar aún más las fracciones celulares obtenidas por centrifugación diferencial.
- Las técnicas inmunológicas, utilizando anticuerpos contra las proteínas de membrana específicas de un orgánulo, son muy útiles para purificar orgánulos y vesículas de tamaños y densidades similares.
- Las proteínas transmembrana son solubilizadas y purificadas selectivamente mediante el uso de detergentes no iónicos.

5.6 Visualización de la arquitectura celular

En los años 1830, Matthias Schleiden y Theodore Schwann propusieron que las células individuales constituían las unidades fundamentales de la vida. Esta primera formulación de la teoría celular se basaba en la observación realizada con microscopios ópticos bastantes primitivos. Los biólogos celulares modernos cuentan con herramientas mucho más poderosas para revelar la arquitectura celular. Por ejemplo, las variaciones de la microscopia óptica convencional les permite a los científicos visualizar objetos indetectables varias décadas atrás. La microscopia electrónica, que puede revelar objetos extremadamente pequeños, ha proporcionado mucha información acerca de las partículas subcelulares y de la organización de los tejidos vegetales y animales. Cada técnica es de utilidad para detectar y visualizar una característica estructural particular de la célula (fig. 5-41). Los sistemas de registro digital y los algoritmos computarizados representan



▲ Fig. 5-41. Rango de tamaños de objetos capturados en imágenes por diferentes técnicas microscópicas. El objeto más pequeño que puede ser capturado por una técnica en particular está limitado por el poder de resolución del equipo y otros factores.

otro avance en la visualización de la arquitectura celular difundidos ampliamente en la década pasada. Los sistemas digitales no sólo proporcionan imágenes microscópicas de calidad mejorada, sino que permiten realizar reconstrucciones tridimensionales de los componentes de una célula a partir de imágenes bidimensionales.

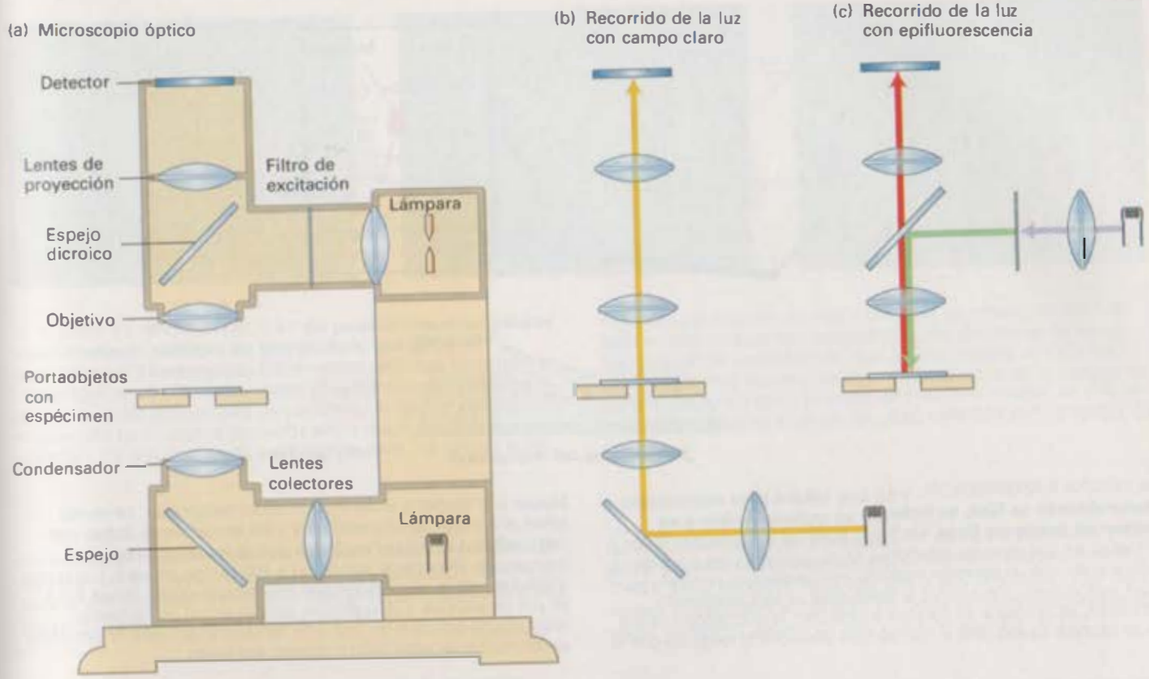
Un microscopio detecta, magnifica y discrimina objetos pequeños

Todos los microscopios producen una imagen magnificada de un objeto pequeño, pero la naturaleza de las imágenes depende del tipo de microscopio empleado y de la forma en la cual se prepara la muestra. El microscopio compuesto, utilizado en la *microscopia óptica de campo brillante* convencional, contiene varias lentes que magnifican la imagen de una muestra en estudio (fig. 5-42a, b). El aumento total es el producto del aumento de las lentes individuales: si la lente objetivo aumenta 100 veces (una lente de 100×, generalmente el máximo usado) y la lente de proyección, u ocular, aumenta 10 veces, el aumento final registrado por el ojo humano o sobre una película será de 1.000 veces.

Sin embargo, la propiedad más importante de cualquier microscopio no es el aumento, sino su poder de resolver, o resolución: la capacidad para distinguir entre dos objetos ubicados uno muy cerca del otro. El mero aumento de la imagen de una muestra no lleva a nada si la imagen es borrosa. La resolución de una lente microscópica es numéricamente equivalente a D, la distancia mínima entre dos objetos que permite distinguirlos como tales. Mientras más pequeño sea el valor de D, mejor será la resolución. El valor de D está dado por la ecuación

$$D = \frac{0{,}61\,\lambda}{N \operatorname{sen} \alpha} \qquad (5\text{-}1)$$

donde α es la apertura angular, o la mitad del ángulo de apertura del cono de luz que ingresa en el objetivo desde la muestra; N es el índice de refracción del medio entre la muestra y la lente objetivo (p. ej., la velocidad relativa de la luz en el medio comparada con la velocidad en el aire); y λ es la longitud de onda de la luz incidente. La resolución se mejora utilizando longitudes de onda de luz más



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 5-42 Los microscopios ópticos suelen estar configurados para microscopia de campo claro (luz transmitida) y de epifluorescencia. (a) En un microscopio óptico típico, el espécimen está montado en un portaobjetos de vidrio transparente que se ubica sobre una platina móvil. Los dos métodos de obtención de imágenes requieren sistemas de iluminación separados, pero utilizan los mismos sistemas de recolección y detección de luz. (b) En la microscopia óptica de campo claro, la luz de una lámpara de tungsteno se focaliza sobre un espécimen con una lente condensadora debajo de la platina, la luz sigue la trayectoria mostrada. (c) En la microscopia de epifluorescencia, la luz ultravioleta de una lámpara de mercurio posicionada encima del portaobjetos se enfoca sobre el espécimen con la lente objetivo. Los filtros interpuestos seleccionan una longitud de onda de luz ultravioleta específica para iluminar y sirven para captar la longitud de onda de la luz emitida por el espécimen.

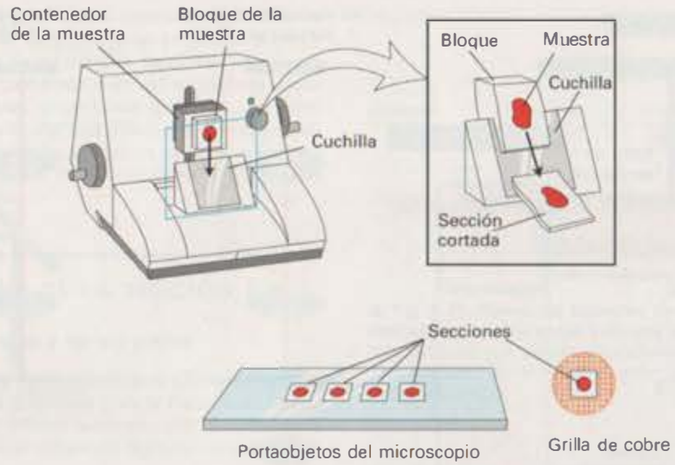
cortas (disminuyendo el valor de λ) o recogiendo más luz (incrementando N o α). Nótese que el aumento no es parte de esta ecuación.

Debido a las limitaciones en los valores de α, λ y N, el *límite de resolución* de un microscopio óptico utilizando luz visible es de alrededor de 0,2 μm (200 nm). Sin importar cuántas veces se amplía la imagen, el microscopio nunca puede resolver objetos que están separados por menos de ≈0,2 μm o mostrar detalles menores de ≈0,2 μm. A pesar de este límite de resolución, el microscopio óptico puede utilizarse para ubicar granos pequeños de tamaño conocido hasta una precisión de apenas algunos nanómetros. Si conocemos el tamaño y la forma exactos de un objeto –digamos, una esfera de oro de 5 nm– y si se utiliza una cámara de video para grabar la imagen microscópica como una imagen digital, una computadora puede calcular la posición del centro del objeto con un margen de escasos nanómetros. Esta técnica se utilizó para medir partículas de tamaño nanométrico a medida que moléculas y vesículas se mueven a lo largo de los filamentos citoesqueléticos (véanse fig. 19-17, 19-18 y 20-18).

Las muestras para un microscopio se deben fijar, seccionar y teñir para obtener imágenes de detalles subcelulares

Las células y los tejidos vivos carecen de componentes que absorben la luz y, por ende, son casi invisibles con un microscopio óptico. A pesar de que estos especímenes pueden visualizarse por medio de técnicas especiales que trataremos a continuación, estos métodos no revelan detalles finos de la estructura y requieren que las células estén ubicadas en cámaras especiales de vidrio facetado, denominadas cámaras de cultivo, que puedan ser montadas en la platina de un microscopio. Por estas razones, las células son a menudo fijadas, seccionadas y teñidas para revelar las estructuras subcelulares.

Las muestras para la microscopia óptica y electrónica suelen fijarse con una solución que contiene químicos que establecen enlaces cruzados entre la mayoría de las proteínas y los ácidos nucleicos. El formaldehído, un fijador de uso frecuente, establece enlaces cruzados entre los aminoácidos de moléculas adyacentes; estos enlaces covalentes estabilizan las interacciones entre proteínas y entre éstas y los ácidos nu-



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 5-43 Los tejidos para microscopio, generalmente se fijan, se incluyen en material sólido y se cortan en secciones finas. Un tejido fijado es deshidratado al ser inmerso en una serie de soluciones compuestas por agua y alcohol, terminando con un solvente orgánico compatible con el medio en el cual está incluido. Para incluir el tejido para su seccionamiento posterior, se lo coloca en parafina líquida para la microscopia óptica o en plástico líquido para la microscopia electrónica; luego de que el bloque que contiene el espécimen se ha endurecido, se monta sobre el soporte de un micrótomo y las secciones se cortan con una cuchilla. Las secciones típicas que se cortan para un microscopio electrónico son de 50 a 100 nm de espesor. Los cortes utilizados para la observación con microscopio óptico tienen 0,5 a 50 µm de espesor. Los cortes se colocan en un portaobjetos (microscopia óptica) o en una grilla recubierta de cobre (microscopia electrónica) y se tiñen con un agente apropiado.

cleicos, y tornan las moléculas insolubles y estables para procedimientos posteriores. Después de la fijación, se incluye la muestra en parafina o plástico y se la corta en secciones de 0,5-50 µm de espesor (fig. 5-43). En forma alternativa, la muestra puede ser congelada sin una fijación previa y luego seccionada; tal tratamiento preserva la actividad de las enzimas para una detección posterior por reactivos citoquímicos.

Un paso final en la preparación de una muestra para el microscopio óptico es teñirla de manera tal de visualizar los rasgos estructurales de la célula o del tejido. Muchos colorantes químicos se unen a las moléculas que tienen rasgos específicos. Por ejemplo, la *hematoxilina* se une a aminoácidos básicos (lisina y arginina) sobre muchos tipos diferentes de proteínas, mientras que la *eosina* se une a moléculas ácidas (como el DNA y las cadenas laterales de aspartato y glutamato). Debido a sus diferentes propiedades fijadoras, estos colorantes tiñen diversos tipos de células en forma suficientemente diferente para poder visualizarlas. Si una enzima cataliza una reacción que produce un precipitado coloreado o visible de otra forma a partir de un precursor sin color, la enzima puede ser detectada en las secciones de la célula gracias a sus productos de reacción coloreados. Aunque tales técnicas de tinción fueron bastante comunes en el pasado, han sido reemplazadas en gran medida por otras técnicas para visualizar proteínas o estructuras particulares, como veremos a continuación.

La microscopia de contraste de fase y la de contraste de interferencia diferencial visualizan células vivas no teñidas

Dos métodos comunes para tomar imágenes de células vivas y tejidos no teñidos generan contraste al tomar ventaja de las diferencias de los índices de refracción y del espesor de los materiales celulares. Estos métodos, denominados *microscopia de contraste de fase* y *microscopia de contraste por interferencia diferencial (DIC)* (o microscopio de interferencia de Nomarski), producen imágenes que difieren en apariencia y revelan diferentes rasgos de la arquitectura celular. La figura 5-44 compara imágenes de células vivas cultivadas obtenidas con estos dos métodos y con el microscopio de campo claro.

En las imágenes de contraste de fase, todo el objeto y sus estructuras subcelulares son resaltados por anillos de interferencia: halos concéntricos de bandas claras y oscuras. Este artificio, que es inherente al método, genera contraste por interferencia entre la luz difractada y la no difractada por los especímenes. Debido a que los anillos de interferencia alrededor de un objeto oscurecen muchos detalles, esta técnica es apropiada para observar sólo células individuales o capas celulares delgadas, pero no tejidos gruesos. Es muy útil para examinar la ubicación y los movimientos de orgánulos grandes en las células vivas.

La microscopia de DIC se basa en interferencias de la luz polarizada y es el método elegido para visualizar detalles pequeñísimos y objetos gruesos. El contraste se genera por diferencias en el índice de refracción del objeto y su medio circundante. En las imágenes de DIC, los objetos aparentan arrojar una sombra en un lado. La "sombra" primariamente representa una diferencia en el índice de refracción de un espécimen, más que su topografía. La microscopia de DIC define con facilidad los bordes de los grandes orgánulos, como el núcleo y las vacuolas. Además de tener una apariencia de "relieve", una imagen de DIC es una *sección óptica* delgada, o "rebanada" del objeto. Así, los detalles del núcleo de los especímenes gruesos (p. ej., un nematodo *Caenorhabditis elegans* intacto) pueden observarse en una serie de esas secciones ópticas, y la estructura tridimensional del objeto puede reconstruirse al combinar las imágenes individuales de DIC.

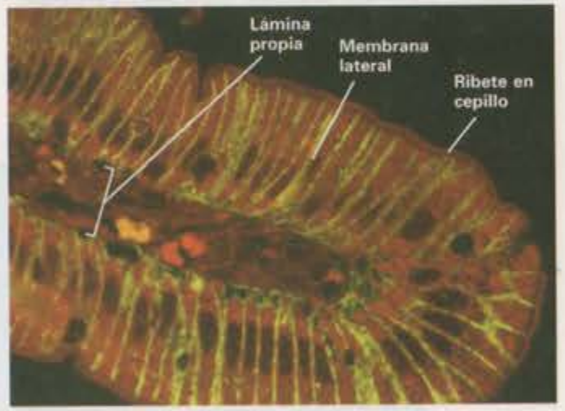


▲ FIGURA EXPERIMENTAL 5-44 Es posible visualizar células vivas mediante técnicas de microscopia que generan contraste por interferencia. Estas microfotografías muestran macrófagos vivos cultivados, vistos con microscopio de campo claro (*izquierda*), microscopio de contraste de fase (*medio*) y microscopio de contraste de interferencia diferencial (DIC) (derecha). En una imagen de contraste de fase, las células están rodeadas por bandas oscuras y brillantes alternadas; detalles en foco y fuera de foco son fotografiados simultáneamente en un microscopio de contraste de fase. En una imagen de DIC, las células aparecen en seudorrelieve. Debido a que en la imagen se captura sólo una región estrecha en foco, una imagen de DIC es una rebanada óptica a través del objeto. (Cortesía de N. Watson y J. Evans.)

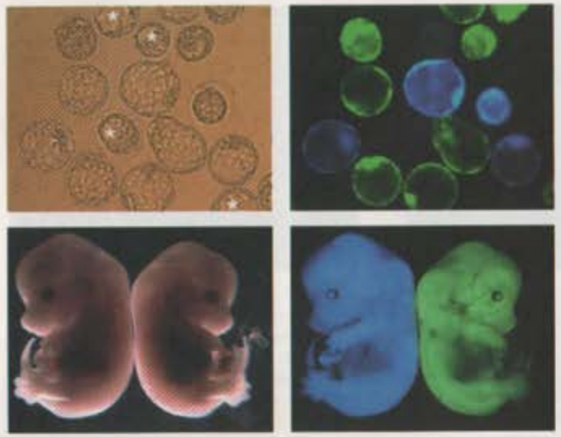
El microscopio de fluorescencia puede localizar y cuantificar moléculas específicas en células vivas y fijadas

Quizá la técnica más versátil y poderosa para la localización de proteínas dentro de una célula por microscopia óptica es la **tinción fluorescente** de las células y la observación con el *microscopio de fluorescencia*. Se dice que un químico es fluorescente si absorbe la luz de determinada longitud de onda (la longitud de onda de excitación) y emite luz (fluoresce) a una longitud de onda específica más larga. La mayoría de los colorantes fluorescentes, o flurocromos, emiten luz visible, pero algunos (como el Cy5 y la Cy7) emiten luz infrarroja. En los microscopios de fluorescencia modernos, sólo la luz fluorescente emitida por la muestra se usa para formar una imagen; la luz de la longitud de onda de excitación induce fluorescencia, pero luego no se le permite pasar a través de los filtros colocados entre el objetivo de la lente y el ojo o la cámara (véase fig. 5-42a, c).

Detección inmunológica de proteínas específicas en células fijadas. Los colorantes químicos recién mencionados tiñen los ácidos nucleicos o una extensa variedad de proteínas. No obstante, a menudo los investigadores desean detectar la presencia y localización de proteínas específicas. Un método muy utilizado con este propósito emplea anticuerpos específicos unidos en forma covalente a los flurocromos. Los flurocromos utilizados incluyen la rodamina y el rojo Texas, que emite luz roja; Cy3, que emite luz anaranjada y la fluoresceína que emite luz verde. Estos flurocromos pueden ser combinados químicamente con anticuerpos específicos purificados para casi cualquier macromolécula deseada. Cuando un complejo de anticuerpo-flurocromo se agrega a una sección celular o tisular permeabilizada, el complejo se unirá al antígeno correspondiente, que luego emitirá luz cuando se lo ilumine con la longitud de onda de excitación, una técnica denominada *microscopia de inmunofluorescencia* (fig. 5-45). Teñir un espécimen con dos o tres colorantes que fluorescen a diferentes longitudes de onda permite localizar múltiples proteínas dentro de una célula (véase fig. 5-33).



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 5-45 Una o más proteínas específicas pueden localizarse en secciones de tejido fijado mediante microscopia de inmunofluorescencia. Una sección de la pared intestinal de una rata fue teñida con azul de Evans, que genera una fluorescencia roja no específica, y con un anticuerpo verde fluorescente específico para la GLUT2, una proteína transportadora de glucosa. Como se evidencia a partir de esta microfotografía fluorescente, la GLU2 está presente en la región lateral y basal de las células intestinales, pero está ausente en el borde en cepillo, compuesto de microvellosidades estrechamente empaquetadas sobre la superficie apical orientada hacia la luz intestinal. Los capilares corren a través de la lámina propia, un tejido conectivo laxo ubicado por debajo de la capa epitelial. (Véase B. Thorens et al., 1990, *Am. J. Physio* 259:C279; cortesía de B. Thorens.)



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 5-46 La expresión de proteínas fluorescentes en embriones de ratón tempranos y tardíos es detectada por emisión de luz azul y verde amarillenta.** Los genes codificantes de la proteína azul fluorescente (ECFP) y de la proteína verde amarillenta (EYFP) fueron introducidos en células madres embrionarias de ratón, que luego se hicieron crecer para formar embriones de etapa temprana (*arriba*) y embriones de etapa tardía (*abajo*). Estas microfotografías de campo claro (*izquierda*) y de fluorescencia (*derecha*) revelan que todos los embriones de etapa temprana excepto cuatro muestran una fluorescencia azul o verde amarillenta, lo que indica la expresión de los genes de la ECFP y de la EYFP introducidos. De los dos embriones de etapa tardía mostrados, uno expresó el gen de la ECFP (*izquierda*) y uno expresó el gen EYFP (*derecha*). (De A.-K. Hadjantonakis et al., 2002 *BMC Biotechnol.* 2:11.)

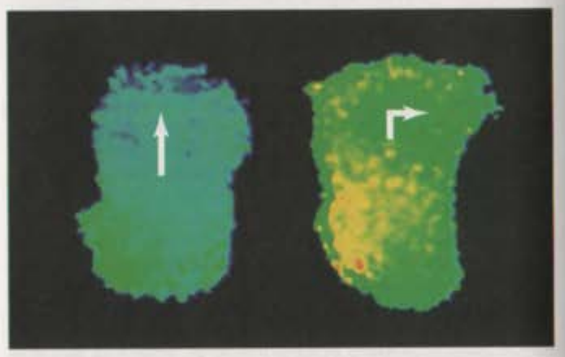
Expresión de proteínas fluorescentes en células vivas. Se puede sacar provecho de una proteína naturalmente fluorescente hallada en la medusa *Aequorea victoria* para visualizar células vivas y proteínas específicas dentro de ellas. Esta proteína de 238 residuos, denominada proteína verde fluorescente (GFP, *green fluorescent protein*), contiene una secuencia de serina, tirosina y glicina cuyas cadenas laterales espontáneamente han adoptado una forma cíclica para formar un cromóforo verde fluorescente. Con el uso de las técnicas de recombinación de DNA detalladas en el capítulo 9, el gen de GFP puede ser introducido en células cultivadas o en células específicas de un animal entero. Las células que contienen el gen introducido expresarán la GFP y por ende emitirán una fluorescencia verde cuando sean irradiadas; esta fluorescencia de la GFP puede utilizarse para localizar las células dentro de un tejido. La figura 5-46 ilustra el resultado de esta metodología, en la cual se usó una variante de GFP que emite una fluorescencia azul.

En una aplicación particularmente útil de la GFP, una proteína celular de interés es "marcada" con GFP para localizarla. En esta técnica, el gen para GFP se fusiona al gen de una proteína celular produciendo un DNA recombinante que codifica una proteína quimérica larga que contiene la totalidad de ambas proteínas. Las células en las cuales se introdujo este DNA recombinante sintetizarán la proteína quimérica cuya fluorescencia verde revela la ubicación subcelular de la proteína de interés. Esta técnica de marcado por GFP, por ejemplo, se utilizó para visualizar la expresión y distribución de proteínas específicas que median la adhesión entre célula y célula (véase fig. 6-8).

En algunos casos, una proteína purificada químicamente unida a un colorante fluorescente puede ser microinyectada dentro de las células y seguida por microscopia fluorescente. Por ejemplo, los hallazgos de estudios bioquímicos cuidadosos establecieron que la actina purificada "marcada" con un flurocromo es indistinguible en relación con su contraparte normal. Cuando la proteína marcada es microinyectada dentro de una célula cultivada, los monómeros de actina marcados que fueron inyectados y los endógenos celulares se copolimerizan para formar fibras largas de actina. Esta técnica también puede usarse para estudiar microtúbulos individuales dentro de una célula.

Determinación de los niveles de Ca^{2+} y H^+ con colorantes fluorescentes sensibles a los iones Los flurocromos cuya fluorescencia depende de la concentración de Ca^{2+} o H^+ han demostrado su utilidad en la medición de la concentración de estos iones dentro de las células vivas. Como se verá en capítulos posteriores, las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} e H^+ tienen efectos pronunciados sobre muchos procesos celulares. Por ejemplo, numerosas hormonas u otros estímulos causan un aumento del Ca^{2+} citosólico desde los niveles de reposo de alrededor de 10^{-7} M hasta 10^{-6} M, que induce diversas respuestas celulares, incluida la contracción de los músculos.

El colorante fluorescente *fura-2*, que es sensible al Ca^{2+}, contiene cinco grupos carboxilo que forman enlaces éster con



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 5-47 Fura-2, un flurocromo sensible al Ca^{2+}, puede utilizarse para monitorizar las concentraciones citosólicas de Ca^{2+} en diferentes regiones de células vivas** (*izquierda*). En un leucocito en movimiento, se establece un gradiente de Ca^{2+}. Los niveles más altos (verde) se encuentran en la parte trasera de la célula, donde tienen lugar las contracciones corticales, y los niveles más bajos (azul) se encuentran en el frente de la célula, donde la actina se polimeriza (*derecha*). Cuando una pipeta llena de moléculas quimiotácticas ubicadas en los lados de la célula induce a la célula a girar, la concentración de Ca^{2+} se incrementa momentáneamente a lo largo del citoplasma y se establece un nuevo gradiente. El gradiente se orienta de tal forma que la región de menor Ca^{2+} (azul) se ubique en la dirección en que la célula girará, mientras que una región de mayor Ca^{2+} (amarillo) siempre se forma en el sitio que se transformará en la parte trasera de la célula. (De R. A. Brundage et al., 1991, *Science* 254:703; Cortesia de F. Fay.)

el etanol. El éster fura-2 resultante es lipófilo y puede propagarse desde el medio a través de la membrana plasmática hacia el interior celular. Dentro del citosol, las esterasas hidrolizan el éster de fura-2, produciendo fura-2, cuyos grupos carboxilados libres tornan la molécula no lipófila y, por ende, no puede cruzar las membranas celulares y permanece en el citosol. Dentro de las células, cada molécula de fura-2 puede unir un único ion Ca^{2+} pero ningún otro catión celular. Esta unión, que es proporcional a la concentración citosólica de Ca^{2+} dentro de cierto rango, incrementa la fluorescencia de fura-2 a una longitud de onda en particular. A una segunda longitud de onda, la fluorescencia de la fura-2 es la misma sin importar que el Ca^{2+} esté unido o no y provee una medida de la cantidad total de fura-2 en una región de la célula. Si se examinan células continuamente con el microscopio de fluorescencia y se miden los cambios rápidos en la velocidad de la fluorescencia de la fura-2 a esas dos longitudes de onda, es posible cuantificar los cambios rápidos en la fracción de fura-2 que se ha unido al ion Ca^{2+} y, por ende, en la concentración del Ca^{2+} citosólico (fig. 5-47).

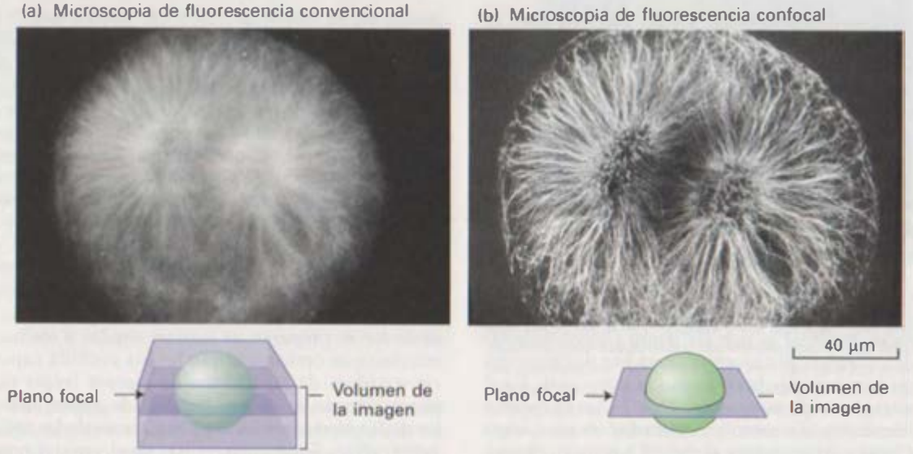
Similarmente al fura-2, los colorantes fluorescentes (p. ej. SNARF-1) que son sensibles a la concentración de H^+ pueden utilizarse para monitorizar el pH citosólico de células vivas.

La microscopia de barrido confocal y la de desconvulsión proveen imágenes más nítidas de objetos tridimensionales

La microscopia de fluorescencia convencional tiene dos limitaciones principales. Primero, el proceso físico de cortar una sección destruye material y así, en el seccionamiento consecutivo (en serie), se pierden partes pequeñas de la estructura de la célula. Segundo, la luz fluorescente emitida por una muestra proviene de moléculas por encima y por debajo del plano de foco; por ende, el observador ve una imagen borrosa causada por la superposición de imágenes fluorescentes de moléculas ubicadas a muchas profundidades en la célula. Ese efecto borroso dificulta la determinación de la disposición molecular tridimensional real (fig. 5-48a). Dos poderosos refinamientos de la microscopia por fluorescencia producen imágenes mucho más detalladas al reducir los efectos de degradación por luz fuera de foco.

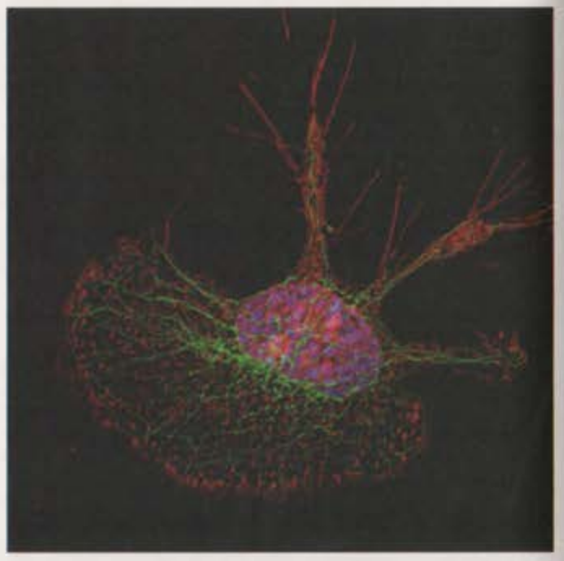
En la *microscopia de barrido confocal*, la luz de excitación proveniente de un rayo láser enfocado ilumina sólo una parte pequeña de la muestra por un instante, y luego se mueve rápidamente a diferentes puntos en el plano focal de la muestra. La luz fluorescente emitida pasa a través de un orificio pequeño, que filtra la luz desenfocada, por lo que se produce una imagen bien definida. Como la luz con la imagen en foco es recogida por el orificio, el área barrida es una sección óptica a través de la muestra. La intensidad de luz de estas áreas en foco es registrada por un tubo fotomultiplicador y la imagen se guarda en una computadora (fig. 5-48b).

El *microscopio de desconvolución* logra el mismo efecto de nitidez de la imagen que la microscopia de barrido confocal, pero a través de un proceso diferente. En este método, se recogen las imágenes de planos focales consecutivos del espécimen. También se recoge por separado una serie focal de imágenes de una sección de prueba de una esfera de tamaño inferior al de resolución (es decir, 0,2 μm de diámetro). Cada esfera representa un puntito de luz que se vuelve un objeto borroso por la óptica imperfecta del microscopio. La desconvolución invierte la degradación de la imagen al usar las esferas



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 5-48 La microscopia confocal produce una sección óptica en foco a través del espesor de las células.** Un huevo mitótico fertilizado de un erizo de mar (*Psammechinus*) fue lisado con un detergente, expuesto a un anticuerpo antitubulina y luego expuesto a un anticuerpo marcado con fluoresceína que se fija al primer anticuerpo. (a) Cuando se observa con microscopio de fluorescencia convencional el huso mitótico se ve borroso. Esto se debe a que se detecta el trasfondo de la tubulina que se encuentra por arriba y por debajo del plano focal como se muestra en el esquema. (b) La imagen del microscopio confocal es nítida, sobre todo en el centro del huso mitótico. En este caso, sólo se detecta la fluorescencia de las moléculas en el plano focal, generando una sección óptica muy delgada. (Microfotografía de J. G. White et al., 1987, *J. Cell Biol.* 104:41.)





▲ FIGURA EXPERIMENTAL 5-49 La microscopia de fluorescencia por desconvolución produce secciones ópticas de alta resolución que pueden ser reconstruidas para formar una imagen tridimensional. Una célula de macrófago fue teñida con reactivos marcados con fluorocromo específicos para el DNA (azul), para los microtúbulos (verde) y para los microfilamentos de actina (rojo). La serie de imágenes fluorescentes obtenidas en planos focales consecutivos (secciones ópticas) a través de la pared celular fueron recombinadas en tres dimensiones. (a) En esta reconstrucción tridimensional de las imágenes en bruto, el DNA, los microtúbulos y la actina aparecen como zonas difusas en la célula. (b) Luego de la aplicación del algoritmo de desconvolución a las imágenes, la organización fibrilar de los microtúbulos y la localización de actina en las zonas de adhesión se tornan fácilmente visibles en la reconstrucción (Cortesía de J. Evans.)

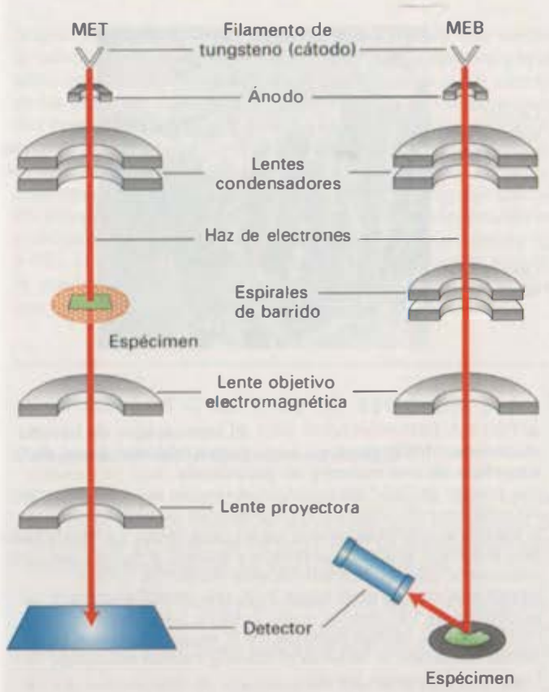
borrosas como objeto de referencia. La luz fuera de foco es reasignada matemáticamente con la ayuda de algoritmos de desconvolución. Las imágenes recuperadas por desconvolución presentan detalles impresionantes sin ninguna distorsión (fig. 5-49). Los astrónomos utilizan los algoritmos de desconvolución para obtener imágenes más nítidas de estrellas distantes.

La resolución del microscopio electrónico de transmisión es muy superior a la del microscopio óptico

Los principios fundamentales de la observación con el microscopio electrónico son similares a los del microscopio óptico; la diferencia principal es que las lentes electromagnéticas, en lugar de las lentes ópticas, enfocan un haz de electrones de alta velocidad en lugar de hacerlo con la luz visible. En el *microscopio electrónico de transmisión* (*MET*), los electrones son emitidos desde un filamento y acelerados en un campo eléctrico. Una lente condensadora enfoca el haz de electrones sobre la muestra; las lentes del objetivo y del proyector enfocan los electrones que pasan a través de la muestra y los proyectan sobre una pantalla de observación u otro detector (fig. 5-50, *izquierda*). Debido a que los electrones son absorbidos por los átomos del aire, todo el tubo entre la fuente de electrones y el detector se mantiene bajo un vacío extremo.

La corta longitud de onda de los electrones implica que el límite de resolución para la microscopia electrónica de transmisión es, en teoría, de 0,005 nm (menor que el diámetro de un átomo único), o 40.000 veces mejor que la resolución de un microscopio óptico y dos millones de veces mejor que la del ojo humano desnudo. Sin embargo, la resolución efectiva del microscopio electrónico de transmisión en el estudio de sistemas biológicos es muchísimo menor que la ideal. En condiciones óptimas, se puede obtener una resolución de 0,10 nm con los microscopios electrónicos de transmisión, alrededor de 2.000 veces mejor que la mejor resolución de los microscopios ópticos. En la sección 5.3 se incluyen numerosos ejemplos de estructuras celulares y subcelulares captados en imágenes por el MET.

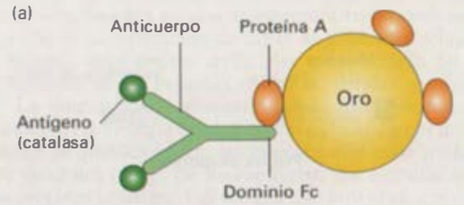
Dado que el MET requiere secciones fijas muy delgadas (alrededor de 50 nm), sólo una pequeña parte de una célula puede observarse en cualquier sección. Los especímenes seccionados se preparan de manera similar a los usados para el microscopio óptico, utilizando una cuchilla capaz de producir secciones de 50-100 nm de espesor (véase fig. 5-43). La generación de la imagen depende de dispersiones diferenciales de los electrones incidentes a través de las moléculas de la preparación. Sin tinción, el haz de electrones pasa uniformemente a través de una muestra, y así, toda la muestra parece brillante con poca diferenciación de los componentes. Por lo general, para obtener imágenes válidas para el MET los cortes se tiñen con metales pesados, como el oro o el osmio. Las áreas teñidas con metal aparecen oscuras en una microfotografía porque los metales dispersan (difractan) la mayor parte de los electrones incidentes; los electrones dispersados no son enfocados por las lentes electromagnéticas y no contribuyen

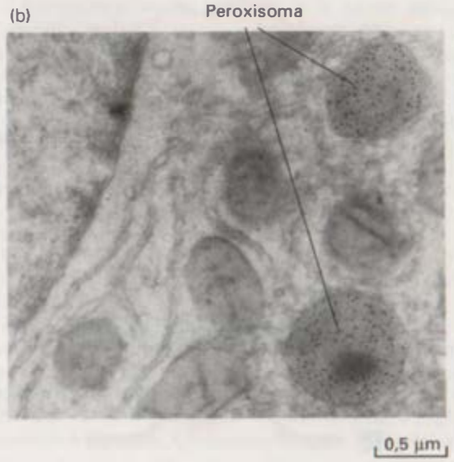


▲ FIGURA EXPERIMENTAL 5-50 En la microscopia electrónica, las imágenes se forman a partir de electrones que pasan a través de un espécimen o que son liberados desde un espécimen cubierto con un metal. En un microscopio electrónico de transmisión (MET), los electrones son extraídos de un filamento calentado, acelerados por un campo eléctrico, y enfocados sobre la muestra por una lente magnética condensadora. Los electrones que pasan a través de la muestra son enfocados por una serie de objetivos magnéticos y lentes proyectoras para formar una imagen magnificada de la muestra sobre un detector, que puede ser una pantalla fluorescente de visualización, una película fotográfica o una cámara CCD (dispositivo de carga acoplada). En un microscopio electrónico de barrido (MEB), los electrones son enfocados por un condensador y una lente objetivo sobre una muestra recubierta con metal. Bobinas de barrido mueven el rayo a través de la muestra y los electrones del metal son recogidos por un tubo detector fotomultiplicador. En ambos tipos de microscopios, debido a que los electrones son fácilmente dispersados por las moléculas de aire, toda la columna se mantiene en un medio de vacío muy alto.

a la imagen. Las áreas que toman menos tintura aparecen más claras. El tetróxido de osmio tiñe preferencialmente ciertos componentes celulares, como las membranas (véase fig. 5-2a). Es posible detectar proteínas específicas en secciones delgadas utilizando partículas de oro densas a los electrones recubiertas con proteína A, una proteína bacteriana que se une, inespecíficamente, a moléculas de anticuerpo (fig. 5-51).

La microscopia electrónica estándar no puede utilizarse para estudiar células vivas porque éstas suelen ser demasiado vulnerables a las condiciones requeridas y a las técnicas preparatorias. En particular, la ausencia de agua provoca que las macromoléculas se desnaturalicen y se vuelvan no funcionales. Sin embargo, las técnicas de *criomicroscopia electrónica* permiten el examen de especímenes hidratados no teñidos no fijados directamente con un microscopio electrónico de transmisión. En esta técnica, una suspensión acuosa de una muestra se aplica como una película extremadamente fina sobre una cuadrícula. Luego de ser congelada con nitrógeno líquido y mantenida en este estado por medio de un soporte especial, la muestra se observa con un microscopio electrónico. La temperatura muy baja (– 196 °C) evita que el agua se evapore aun en el vacío, y la muestra puede observarse con los detalles de su estado nativo hidratado sin ser fijada o teñida con metales pesados. A través del promedio de cientos de imágenes puede



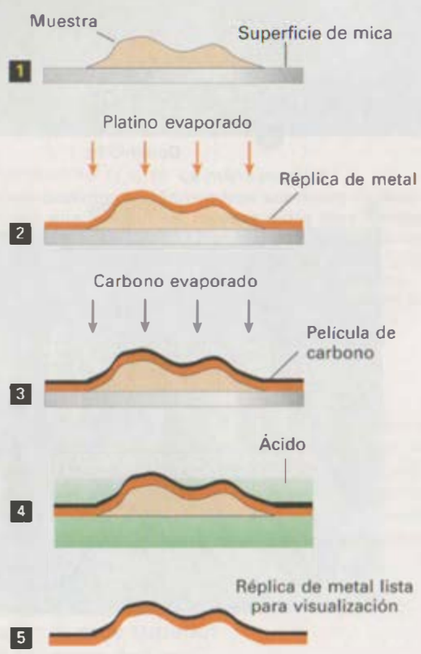


▲ FIGURA EXPERIMENTAL 5-51 Partículas de oro recubiertas con proteína A son usadas para detectar, por medio de un microscopio electrónico de transmisión, una proteína unida a un anticuerpo. (a) Primero se permite que los anticuerpos interactúen con sus antígenos específicos (p. ej., catalasa) en una sección de tejido fijado. Luego la sección se trata con un complejo de proteína A de la bacteria *S. aureus* y partículas de oro densas a los electrones. La fijación de este complejo a los dominios Fc de las moléculas del anticuerpo hace que la ubicación de la proteína diana, en este caso la catalasa, sea visible con el microscopio electrónico. (b) Un corte delgado de tejido de hígado se fijó con glutaraldehído, se seccionó y luego se trató como se describe en la parte (a) para localizar la catalasa. Las partículas de oro (puntos negros) indicativos de la presencia de catalasa, se localizan exclusivamente en los perixosomas (De H. J. Geuze et al., 1981, *J. Cell Biol.* 89:653. Reproducido del *Journal of Cell Biology* con permiso de derecho de autor de The Rockefeller University Press.)

generarse un modelo tridimensional por computadora con una resolución casi atómica. Por ejemplo, este método se utilizó para generar modelos de ribosomas (véase fig. 4-27), de la bomba de calcio muscular que se analiza en el capítulo 7, y otras proteínas grandes difíciles de cristalizar.

La microscopia electrónica de muestras recubiertas con metales puede revelar rasgos superficiales de las células y de sus componentes

La microscopia electrónica de transmisión también se utiliza para obtener información acerca de la forma de virus purificados, fibras, enzimas y otras partículas subcelulares a través de una técnica denominada *sombreado metálico*, en la cual una capa fina de metal, como el platino, se evapora sobre una muestra biológica fijada y seccionada o congelada rápidamente (fig. 5-52). El tratamiento con ácido disuelve la célula y deja una réplica metálica que se puede observar con un microscopio electrónico de transmisión.



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 5-52 El sombreado metálico hace visible los detalles de la superficie de partículas muy pequeñas mediante el microscopio electrónico de transmisión.** Se coloca la muestra sobre una superficie de mica y luego se seca en un evaporador de vacío (**1**). Un filamento de un metal pesado, como platino u oro, se calienta eléctricamente de manera que el metal se evapore y parte de él caiga sobre la grilla con la muestra como una película muy delgada (**2**). Para estabilizar la réplica, la muestra se cubre a continuación con una película de carbono evaporada desde un electrodo colocado por encima (**3**). El material biológico se disuelve luego con ácido (**4**), dejando una réplica metálica de la muestra (**5**), que se observa con un MET. En las microfotografías electrónicas de tales preparaciones, las áreas cubiertas de carbono se ven claras, al revés de las microfotografías de preparaciones cubiertas con metal en las que las áreas de mayor cobertura metálica aparecen más oscuras.



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 5-53 El microscopio de barrido electrónico (MEB) produce una imagen tridimensional de la superficie de una muestra no seccionada.** Aquí se muestra una imagen de SEM del epitelio que recubre la luz del intestino. Abundantes microvellosidades digitiformes se extienden desde la superficie orientada hacia la luz de cada célula. La lámina basal bajo el epitelio ayuda a mantenerlo y anclarlo al tejido conectivo subyacente (cap. 6). Compárese esta imagen de células intestinales con las de la figura 5-28, una microfotografía electrónica de transmisión, y con la figura 5-45, una microfotografía de fluorescencia (De R. Kessel y R. Kardon, 1979, *Tissues and Organs, A Text-Atlas of Scanning Electron Microscopy*, W. H. Freeman and Company, p. 176.)

Alternativamente, el *microscopio electrónico de barrido* permite a los investigadores ver las superficies de muestras no seccionadas recubiertas de metal. Un intenso haz de electrones dentro del microscopio barre rápidamente la muestra. Las moléculas de la cubierta son excitadas y liberan electrones secundarios que son focalizados sobre un detector de centelleo; la señal resultante se muestra en un tubo de rayos catódicos (véase fig. 5-50, *derecha*). Debido a que el número de electrones secundarios producidos por cualquier punto sobre la muestra depende del ángulo del haz de electrones respecto de la superficie, la microfotografía electrónica de barrido tiene un aspecto tridimensional (fig. 5-53). El poder de resolución de los microscopios electrónicos de barrido, que está limitado por el espesor del recubrimiento metálico, es aproximadamente de sólo 10 nm, mucho menos que el de los instrumentos de transmisión.

Se pueden construir modelos tridimensionales a partir de imágenes del microscopio

En la década pasada, las cámaras digitales reemplazaron en gran medida a las cámaras ópticas para registrar imágenes microscópicas. Las imágenes digitales pueden guardarse en una computadora y manipularse por programas de fotografía convencionales al igual que por algoritmos especializados. Como ya se mencionó, el algoritmo de desconvolución puede hacer nítida una imagen al restaurar los fotones fuera de foco a su origen; un ejemplo de un método computarizado que mejora la calidad de la imagen. Los detalles de las imágenes digitales almacenadas también pueden ser cuantificados y los objetos de las imágenes pueden ser reconstruidos en tres dimensiones. Por ejemplo, el modelo tridimensional de un objeto puede calcularse por métodos tomográficos a partir de una colección de imágenes que cubren distintas vistas del objeto. En la microscopia óptica, secciones ópticas apiladas recogidas con un microscopio de desconvolución o con uno confocal pueden recombinarse para formar una imagen tridimensional (véase fig. 5-49). Si una muestra del MET se inclina en diversos ángulos es posible recombinar las imágenes resultantes para generar una vista tridimensional del objeto (véase fig. 5-23).

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 5-6

Visualización de la arquitectura celular

- El límite de resolución de un microscopio óptico es de alrededor de 200 nm; el de un microscopio electrónico de barrido, de alrededor de 10 nm; y el de un microscopio electrónico de transmisión, de alrededor de 0,1 nm.
- Debido a que las células y los tejidos son casi transparentes, se utilizan diversos tipos de colorantes y técnicas ópticas para generar el contraste suficiente para formar una imagen.
- La microscopia de contraste de fase y la de contraste de interferencia diferencial se utilizan para ver detalles de células vivas, no teñidas y para monitorizar el movimiento celular.
- En la microscopia de inmunofluorescencia, proteínas y orgánulos específicos de células fijadas son teñidos con anticuerpos monoclonales marcados con fluorescencia. Múltiples proteínas pueden ser ubicadas en la misma muestra al teñirla con anticuerpos marcados con diferentes flurocromos.
- Cuando las proteínas marcadas con la proteína verde fluorescente que se produce naturalmente (GFP) o sus variantes son expresadas en las células vivas, pueden visualizarse con un microscopio de fluorescencia.
- Con el uso de colorantes cuya fluorescencia es proporcional a la concentración de iones Ca^{2+} o H^+, la microscopia de fluorescencia puede medir la concentración local de iones Ca^{2+} y el pH intracelular en las células vivas.
- La microscopia confocal y la microscopia de desconvolución utilizan diversos métodos para realizar una sección óptica de una muestra, reduciendo así la falta de nitidez debida a la luz fluorescente fuera de foco. Ambos métodos proveen imágenes mucho más nítidas, sobre todo de muestras gruesas, que las de la microscopia de fluorescencia convencional.
- Las muestras para la microscopia electrónica generalmente se deben fijar, seccionar, deshidratar y luego teñir con metales pesados densos a los electrones.
- Los detalles de la superficie de los objetos pueden revelarse mediante la microscopia electrónica de transmisión de muestras recubiertas con metal. La microscopia electrónica de barrido de células o tejidos no seccionados y cubiertos con metal produce imágenes que parecen tridimensionales.

PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO

Los avances en la bioingeniería aportarán importantes contribuciones no sólo a nuestra comprensión de las funciones de las células y los tejidos, sino también a la calidad de la salud humana. En un portaobjetos de vidrio compuesto de canales y pocillos microfabricados, por ejemplo, pueden ser introducidos los reactivos y expuestos a partes selectas de células individuales; las respuestas de las células pueden luego detectarse por microscopia óptica y analizarse con programas poderosos de procesamiento de imágenes. Este tipo de estudios conducirá al descubrimiento de nuevos fármacos, la detección de fenotipos sutiles de células mutantes (p. ej., células tumorales) y el desarrollo de modelos globales de procesos celulares. Los bioingenieros también están fabricando tejidos artificiales basados en una arquitectura tridimensional sintética con la incorporación de capas de diferentes células. Con el tiempo, estos tejidos artificiales reemplazarán los tejidos defectuosos en las personas enfermas, heridas o envejecidas.

La microscopia continuará siendo una herramienta primordial en la biología celular, proveyendo imágenes que la vinculen a la química (p. ej., las interacciones entre proteínas) y a la mecánica (p. ej., los movimientos) involucradas en diversos procesos celulares. Las fuerzas que provocan movimientos celulares y moleculares serán detectadas directamente por sensores fluorescentes en las células y en la matriz extracelular. Las mejoras en los métodos de captura de imágenes de alta resolución permitirán estudios de moléculas individuales en células vivas, posible ahora sólo in vitro. Por último, las células serán estudiadas en contextos más naturales, no bajo cubiertas de vidrio, sino en geles 3D de moléculas de la matriz extracelular. Para ayudar a la toma de imágenes, el uso de más etiquetas y marcas fluorescentes permitirá la visualización simultánea de cinco o seis tipos diferentes de moléculas. Con más proteínas marcadas, las complejas interacciones entre proteínas y orgánulos se comprenderán mejor.

Finalmente, el microscopio electrónico se transformará en el instrumento dominante para estudiar las máquinas proteicas in vitro e in situ. Los métodos tomográficos aplicados a células y moléculas individuales combinados con métodos de reconstrucción automatizada generarán modelos de estructuras basadas en proteínas que no pueden ser determinadas por cristalografía de rayos X. Los modelos tridimensionales de alta resolución de las moléculas en las células ayudarán a explicar las intrincadas interacciones bioquímicas entre las proteínas.

PALABRAS CLAVE

ancla de prenilo *160*
ancla de GPI *161*
apical *153*
basolateral *153*
bicapa fosfolipídica *149*
cara exoplasmática *150*
cara citosólica *150*
citoesqueleto *147*
citosol *147*
cloroplasto *172*
complejo de Golgi *169*
dominio con la homología pleckstrina (PH) *163*
endosoma *165*
esfingolípido *151*
fosfoglicérido *150*
filamento intermedio *174*
filamentos de actina *174*
glucolípidos *151*
lámina nuclear *177*
lisosoma *165*
luz *147*

microfilamento *174*
microscopio de inmunofluorescencia *187*
microtúbulo *174*
mitocondria *171*
nucléolo *171*
perixosoma *168*
porina *160*
proteína de membrana periférica *157*
proteína integral de membrana *157*
"rafts" lipídicos *156*
retículo endoplasmático (RE) *168*
resolución *184*
tinción fluorescente *187*

REVISIÓN DE CONCEPTOS

1. Cuando se observa con un microscopio electrónico, la bicapa lipídica se describe a menudo como de aspecto similar a una vía ferroviaria. Explique cómo la estructura de la bicapa crea esta imagen.

2. Las biomembranas contienen muchos tipos distintos de moléculas lipídicas. ¿Cuáles son los tres tipos principales de moléculas lipídicas halladas en las biomembranas? ¿En qué son los tres tipos similares y en qué son diferentes?

3. Las bicapas lipídicas se consideran líquidos bidimensionales; ¿qué significa esto? ¿Qué impulsa el movimiento de lípidos y proteínas dentro de la bicapa? ¿Cómo pueden medirse esos movimientos? ¿Qué factores afectan el grado de fluidez de la membrana?

4. Explique lo siguiente: la estructura de todas las biomembranas depende de las propiedades químicas de los fosfolípidos, mientras que la función de cada biomembrana depende de las proteínas específicas asociadas con esa membrana.

5. Nombre los tres grupos dentro de los cuales se pueden clasificar las proteínas asociadas con la membrana. Explique el mecanismo por el cual cada grupo se asocia con una biomembrana.

6. Aunque ambas caras de una biomembrana están compuestas de los mismos tipos generales de macromoléculas, principalmente lípidos y proteínas, las dos caras de la bicapa no son idénticas. ¿Qué explica la asimetría entre las dos caras?

7. Uno de los rasgos que definen a las células eucariontes es la presencia de orgánulos. ¿Cuáles son los principales orgánulos de las células eucariontes y cuál es la función de cada uno? ¿Qué es el citosol? ¿Qué procesos celulares ocurren dentro del citosol?

8. Los orgánulos celulares, como la mitocondria, los cloroplastos y el aparato de Golgi tienen estructuras propias. ¿Cómo es la estructura de cada orgánulo en relación con su función?

9. Mucho de lo que sabemos acerca del funcionamiento celular depende de experimentos que utilizan células específicas y partes específicas (p. ej., orgánulos) de las células. ¿Qué técnicas utilizan comúnmente los científicos para aislar las células y los orgánulos de mezclas complejas y cómo trabajan estas técnicas?

10. El aislamiento de algunas proteínas de membrana requiere el uso de detergentes; el aislamiento de otras puede lograrse con el uso de soluciones salinas concentradas. ¿Qué tipos de proteínas de membrana requieren detergentes como parte de su proceso de aislamiento? ¿Qué tipos de proteínas de membrana pueden ser aislados con soluciones salinas concentradas? Describa cómo las propiedades químicas de los detergentes y la concentración elevada de sales facilitan los procesos de aislamiento de cada tipo de proteína de membrana.

11. En la mayoría de las células eucariontes existen tres sistemas de filamentos citoesqueléticos. Compárelos en lo que respecta a su composición, función y estructura.

12. Los filamentos citoesqueléticos individuales están tipicamente organizados en estructuras más complejas dentro del citosol. ¿Cuáles son los dos tipos generales de estructuras que hacen que los filamentos individuales se combinen para formar esas estructuras en el citosol? ¿Cómo se crean y se mantienen estas estructuras?

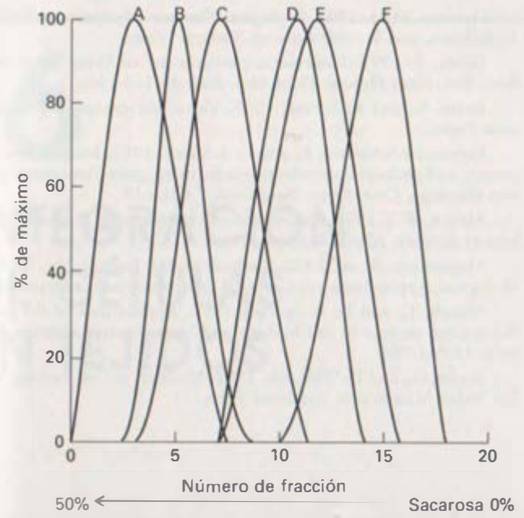
13. Tanto la microscopia electrónica como la óptica suelen utilizarse para visualizar las células, las estructuras celulares y la ubicación de moléculas específicas. Explique por qué un científico puede elegir una u otra técnica microscópica para utilizar en investigación.

14. ¿Por qué son necesarios los colorantes químicos para visualizar las células y los tejidos con el microscopio óptico común? ¿Qué ventajas provee el microscopio fluorescente en comparación con los colorantes químicos utilizados para teñir muestras para el microscopio óptico? ¿Qué ventajas proveen la microscopia de barrido confocal y la microscopia de desconvolución en comparación con la microscopia de fluorescencia convencional?

15. En ciertos métodos de la microscopia electrónica no se toma directamente una imagen de la muestra. ¿Cómo este método provee información acerca de la estructura celular y qué tipos de estructuras se visualizan?

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Células de hígado de rata fueron homogeneizadas y el homogenado se sometió a centrifugación de equilibrio en gradientes de densidad con gradientes de sacarosa. Las fracciones obtenidas a partir de estos gradientes fueron analizadas para detectar *moléculas marcadoras* (es decir, moléculas que están limitadas a orgánulos específicos). El resultado de estos análisis se muestra en la figura. Las moléculas marcadoras cumplen las siguientes funciones: la citocromo oxidasa es una enzima involucrada en el proceso por el cual el ATP se forma en la degradación aerobia completa de la glucosa o de los ácidos grasos; el RNA ribosómico forma parte de los ribosomas sintetizadores de proteínas; la catalasa cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno; la fosfatasa ácida hidroliza los ésteres monofosfóricos a pH ácido; la citidil transferasa está involucrada en la síntesis biológica de los fosfolípidos y la aminoácido permeasa contribuye en el transporte de aminoácidos a través de las membranas.



Curva A = citocromo oxidasa
Curva B = RNA ribosómico
Curva C = catalasa
Curva D = fosfatasa ácida
Curva E = citidil transferasa
Curva F = aminoácido permeasa

a. Nombre la molécula marcadora y dé el número de la fracción en la que está *más* enriquecida para cada uno de los siguientes componentes celulares: lisosomas; peroxisomas; mitocondria; membrana plasmática; retículo endoplasmático rugoso; retículo endoplasmático liso.

b. El retículo endoplasmático rugoso, ¿es más o menos denso que el retículo endoplasmático liso? ¿Por qué?

c. Describa un enfoque alternativo por el cual se podría identificar cuál fracción está enriquecida por un orgánulo determinado.

d. ¿Cómo afecta los resultados del equilibrio en gradiente de densidad la adición de un detergente al homogenado?

BIBLIOGRAFÍA

Textos y atlas de histología general

Cross, P. A., and K. L. Mercer. 1993. Cell and Tissue Ultrastructure: A Functional Perspective. W. H. Freeman and Company.

Fawcett, D. W. 1993. Bloom and Fawcett: A Textbook of Histology, 12th ed. Chapman & Hall.

Kessel, R., and R. Kardon. 1979. Tissues and Organs: A Text-Atlas of Scanning Electron Microscopy. W. H. Freeeman and Company.

Biomembranas: composición lipídica y organización estructural

Simons, K., and D. Toomre. 2000. Lipid rafts and signal transduction. Nature Rev Mol. Cell Biol. 1:31-41.

Sprong, H., P. van der Sluijs, and G. van Meer. 2001. How proteins move lipids and lipids move proteins. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2:504-513.

Tamm, L. K., V. K. Kiessling, and M. L. Wagner. 2001. Membrane dynamics. Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group.

Vance, D. E., and J. E. Vance. 2002. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes, 4th ed. Elsevier.

Yeager, P. L. 2001. Lipids. Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group.

Biomembranas: componentes proteicos y funciones básicas

Cullen, P. J., G. E. Cozier, G. Banting, and H. Mellor. 2001. Modular phosphoinositide-binding domains: their role in signalling and membrane trafficking. Curr. Biol. 11: R882-R893.

Lanyi, J. K., and H. Luecke. 2001. Bacteriorhodopsin. Curr. Opin. Struc. Biol. 11:415-519.

MacKenzie, K. R., J. H. Prestegard, and D. M. Engelman. 1997. A transmembrane helix dimer: structure and implications. Science 276:131-133.

Minor, D. L. 2001. Potassium channels: life in the post-strucural world. Curr. Opin. Struc. Biol. 11:408-414.

Schulz, G. E. 2000. β-Barrel membrane proteins. Curr. Opin. Struc. Biol. 10:443-447.

Orgánulos de la célula eucarionte

Bainton, D. 1981. The discovery of lysosomes. J Cell Biol 91: 66s-76s.

Cuervo, A. M., and J. F. Dice. 1998. Lysosomes: a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. J. Mol. Med. 76:6-12.

de Duve, C. 1996. The peroxisome in retrospect. Ann. NY Acad. Sci. 804:1-10.

Holtzman, E. 1989. Lysosomes. Plenum Press.

Lamond, A., and W. Earnshaw. 1998. Structure and function in the nucleus. Science 280:547-553.

Masters, C., and D. Crane. 1996. Recent developments in peroxisome biology. Endeavour 20:68-73.

Palade, G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. Science 189:347-358. The Nobel Prize lecture of a pioneer in the study of cellular organelles. (See also de Duve, 1996.)

Subramani, S. 1998. Components involved in peroxisome import, biogenesis, proliferation, turnover, and movement. Physiol. Rev. 78:171-188.

El citoesqueleto: componentes y funciones estructurales

Bray, D. 2001. Cell Movements: From Molecules to Motility. Garland. Excellent overview of the cytoskeleton and motility.

Various authors. Curr. Topics Cell Biol. February issue is always devoted to the cytoskeleton.

Purificación de las células y de sus partes

Battye, F. L., and K. Shortman. 1991. Flow cytometry and cell-separation procedures. Curr. Opin. Immunol. 3:238-241.

de Duve, C. 1975. Exploring cells with a centrifuge. Science 189:186-194. The Nobel Prize lecture of a pioneer in the study of cellular organelles.

de Duve, C., and H. Beaufay. 1981. A short history of tissue fractionation. J. Cell Biol. 91:293s-299s.

Howell, K. E., E. Devaney, and J. Gruenberg. 1989. Subcellular fractionation of tissue culture cells. Trends Biochem. Sci. 14:44-48.

Ormerod, M. G., ed. 1990. Flow Cytometry: A Practical Approach. IRL Press.

Rickwood, D. 1992. Preparative Centrifutation: A Practical Approach, IL. Press

Visualización de la arquitectura celular

Bastiaens, P. I. H., and R. Pepperkok. 2000. Observing proteins in their natural habitat: the living cell. Trends Biochem. Sci. 25:631-637.

Baumeister, W., and A. C. Steven. 2000. Macromolecular electron microscopy in the era of strucrural genomics. Trends Biochem. Sci. 25:624-630.

Bozzola, J. J., and L. D. Russell. 1992. Electron Microscopy. Jones and Bartlett.

Dykstra, M. J. 1992. Biological Electron Microscopy: Theory, Techniques, and Troubleshooting. Plenum Press.

Gilroy, S. 1997. Fluorescence microscopy of living plant cells. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:165-190.

Inoué, S., and K. Spring. 1997. Video Microscopy, 2d ed. Plenum Press.

Lippincott-Schwartz, J., and C. L Smith. 1997. Insights into secretory and endocytic membrane traffic using green fluorescent protein chimeras. Curr. Opin. Neurobiol. 7:631-639.

Mason, W. T. 1999. Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity, 2d ed. Academic Press.

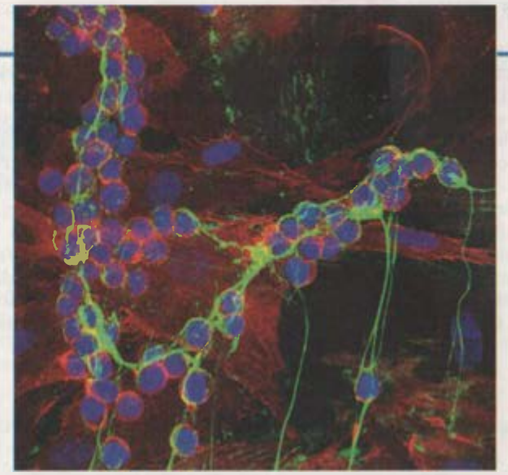
Matsumoto, B., ed. 2002. Methods in Cell Biology, Vol. 70: Cell Biological Applications of Confocal Microscopy. Academic Press.

Misteli, T., and D. L. Spector, 1997. Applications of the green fluorescent prorein in cell biology and biotechnology. Nature Biotech. 15:961-964.

Sluder, G., and D. Wolf, eds. 1998. Methods in Cell Biology, Vol. 56: Video Microscopy. Academic Press.

6

INTEGRACIÓN DE CÉLULAS EN TEJIDOS



Modelo de una enfermedad inflamatoria intestinal en la cual células del músculo liso del intestino grueso fueron inducidas a secretar filamentos de hialuronano (verde) que se unen a leucocitos mononucleares esferoidales a través de sus receptores CD44 (rojo). Los núcleos están teñidos de azul. (Cortesía de C. de la Motte et al., Lerner Research Institute.)

En el desarrollo de los organismos multicelulares complejos, como las plantas y los animales, las células progenitoras se diferencian en distintos "tipos" que tienen composiciones, estructuras y funciones características. Las células de un tipo dado suelen agruparse para formar un *tejido* y desempeñar cooperativamente una función común: los músculos se contraen; los tejidos nerviosos conducen impulsos eléctricos; los tejidos del xilema de las plantas transportan agua. Distintos tejidos pueden organizarse para formar un *órgano*, nuevamente para ejecutar una o más funciones específicas. Por ejemplo, los músculos, las válvulas y los vasos sanguíneos del corazón trabajan juntos para bombear sangre a través del cuerpo. El funcionamiento coordinado de muchos tipos de células entre tejidos, así como de los tejidos de múltiples especializaciones, permite al organismo reproducirse como una totalidad, moverse, metabolizar y llevar a cabo otras actividades esenciales.

La forma adulta del nematodo *Caenorhabditis elegans* contiene apenas 959 células, a pesar de lo cual esas células se encuentran en 12 diferentes tipos generales de células y muchos subtipos distintos. Los vertebrados tienen cientos de tipos diferentes de células, incluidos leucocitos (glóbulos blancos), eritrocitos y macrófagos en la sangre; fotorreceptores en la retina; adipocitos que almacenan grasa; células secretoras α y β en el páncreas; fibroblastos en los tejidos conectivos; y cientos de subtipos diferentes de neuronas en el cerebro humano. A pesar de sus diferentes formas y funciones todas las células animales se pueden clasificar como componentes de sólo cinco clases principales de tejido: *tejido epitelial, tejido conectivo, tejido muscular, tejido nervioso* y *sangre*. Diversos tipos de células se organizan en patrones precisos de asombrosa complejidad para generar diferentes tejidos y órganos. El costo de tal complejidad incluye requerimientos crecientes de información, material, energía y tiempo durante el desarrollo de un organismo individual. A pesar de que el costo fisiológico de los tejidos complejos y los órganos es alto, éstos proporcionan organismos con la capacidad de proliferar en ambientes variados y cambiantes, una ventaja evolutiva fundamental.

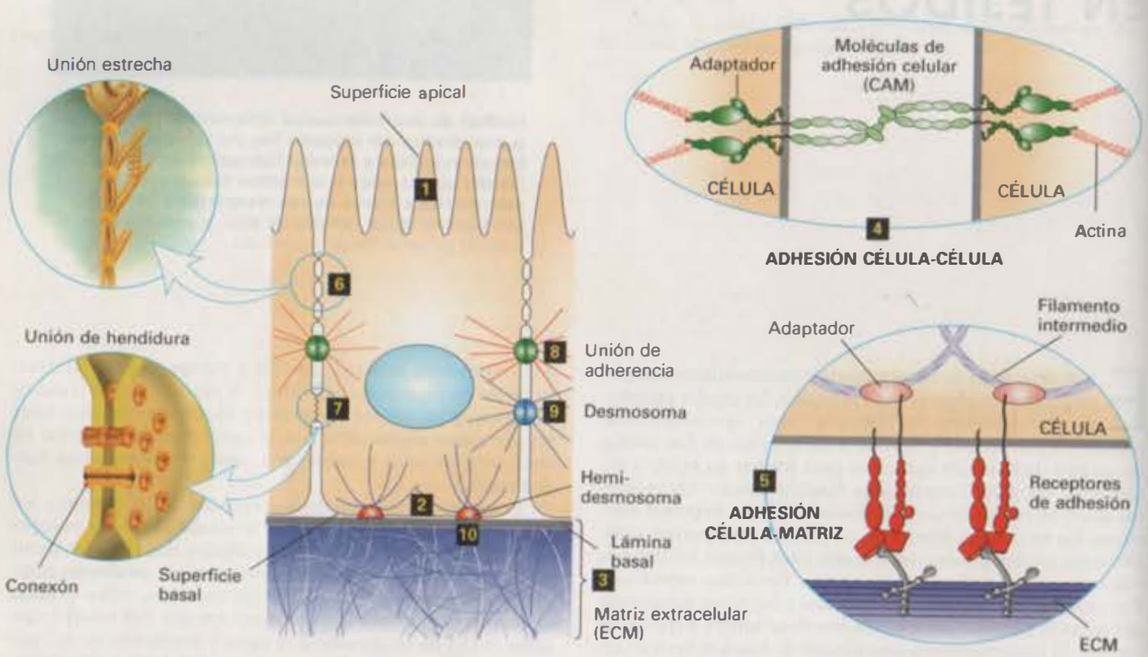
Las morfologías complejas y variadas de las plantas y los animales son un ejemplo de que la totalidad del ser es superior a la suma de sus partes individuales, descrita más técnicamente como las propiedades emergentes de un sistema complejo. Por ejemplo, la organización de raíces, tallos y hojas de las plantas permite luego obtener energía (luz solar) y carbono (CO_2) de la atmósfera, y agua y nutrientes (p. ej., minerales) del suelo. Las distintas propiedades mecánicas de los

CONTENIDO

6.1 Adhesión entre células y entre célula y matriz: una visión general
6.2 Tejidos epiteliales laminares: moléculas de unión y de adhesión
6.3 La matriz extracelular de las láminas epiteliales
6.4 La matriz extracelular de los tejidos no epiteliales
6.5 Interacciones adhesivas y células no epiteliales
6.6 Tejidos vegetales
6.7 Crecimiento y uso de los cultivos celulares

huesos rígidos, las articulaciones flexibles y los músculos contráctiles les permiten a los vertebrados moverse con eficacia y obtener un tamaño sustancial. Láminas de células epiteliales estrechamente unidas pueden actuar como barreras regulables, selectivamente permeables, que permiten la generación de compartimientos químicos y funcionalmente distintos en un organismo (p. ej., el estómago, la circulación sanguínea). Como resultado, funciones distintas y a veces opuestas (p. ej., la digestión y la síntesis) pueden desarrollarse simultánea y eficientemente dentro de un organismo. Tal compartimentalización también permite una regulación sofisticada de las diversas funciones biológicas. En muchas maneras, las funciones de los tejidos y de los órganos complejos de un organismo son análogas a las de los orgánulos y membranas en las células individuales.

El ensamblaje de distintos tejidos y su organización dentro de los órganos están determinados por las interacciones moleculares a nivel celular y no podrían ser posibles sin la expresión espacial y temporalmente regulada de un amplio conjunto de moléculas adhesivas. Las células en los tejidos pueden adherirse directamente entre sí (*adhesión entre célula y célula*) a través de proteínas integrales de membrana especializadas, denominadas **moléculas de adhesión celular (CAM)** que a menudo se agrupan para formar uniones celulares especializadas (fig. 6-1). Las células de los tejidos animales también se adhieren indirectamente (*adhesión entre célula y matriz*)



▲ Fig. 6-1. Vista esquemática de las principales interacciones adhesivas que unen las células entre sí y a la matriz extracelular. Dibujo de un corte esquemático de un tejido epitelial típico, como el intestinal. La superficie apical (superior) de estas células está empaquetada con microvellosidades digitiformes **1** que se proyectan hacia la luz intestinal y la superficie basal (abajo) **2** se apoya sobre la matriz extracelular (ECM). La ECM asociada con las células epiteliales está organizada en diversas capas interconectadas (p. ej., la lámina basal, las fibras conectoras, los tejidos conectivos), en las cuales macromoléculas interdigitantes grandes de la ECM se unen entre sí y con las células **3**. Las moléculas de adhesión celular (CAM) se unen a CAM ubicadas sobre otras células, mediando las adhesiones entre células **4**, y los receptores de adhesión se unen a diversos componentes de la ECM, mediando las adhesiones entre la célula y la matriz **5**. Ambos tipos de moléculas de adhesión de la superficie celular son proteínas integrales de membrana cuyos dominios citosólicos suelen unirse a múltiples proteínas adaptadoras intracelulares. Estas adaptadoras, directa o indirectamente, unen la CAM al citoesqueleto (filamentos intermedios o de actina) y a las vías de señalización intracelulares. Como consecuencia, la información puede ser transferida por las CAM y por las macromoléculas a las cuales se unen desde el exterior celular hacia el medioambiente intracelular, y viceversa. En algunos casos, se ensambla un agregado complejo de CAM, proteínas adaptadores y asociadas. Agregados de CAM o de receptores de adhesión localizados específicamente forman diversos tipos de uniones celulares que cumplen funciones importantes para mantener juntos los tejidos y facilitar la comunicación entre las células y su ambiente. Las uniones estrechas **6**, que yacen inmediatamente por debajo de las microvellosidades, evitan la difusión de muchas sustancias a través de los espacios extracelulares entre las células. Las uniones de hendidura **7** permiten el movimiento a través de los canales conexón de pequeñas moléculas y iones entre los citosoles de células adyacentes. Los tres tipos restantes de uniones, las uniones de adherencia **8**, las desmosomas puntuales **9** y los hemidesmosomas **10**, unen el citoesqueleto de una célula a otras células o a la ECM. (Véase V. Vasioukhin y E. Fuchs, 2001, Curr. Opin. Cell Biol. 13:76.)

a través de la unión de **receptores de adhesión** de la membrana plasmática a los componentes de la matriz extracelular circundante, una red compleja de proteínas y polisacáridos interdigitados segregada por las células en los espacios entre ellas. Estos dos tipos básicos de interacción no sólo les permite a las células agruparse para formar distintos tipos de tejidos, sino también proveer un medio para la transferencia bidireccional de información entre el exterior y el interior de las células.

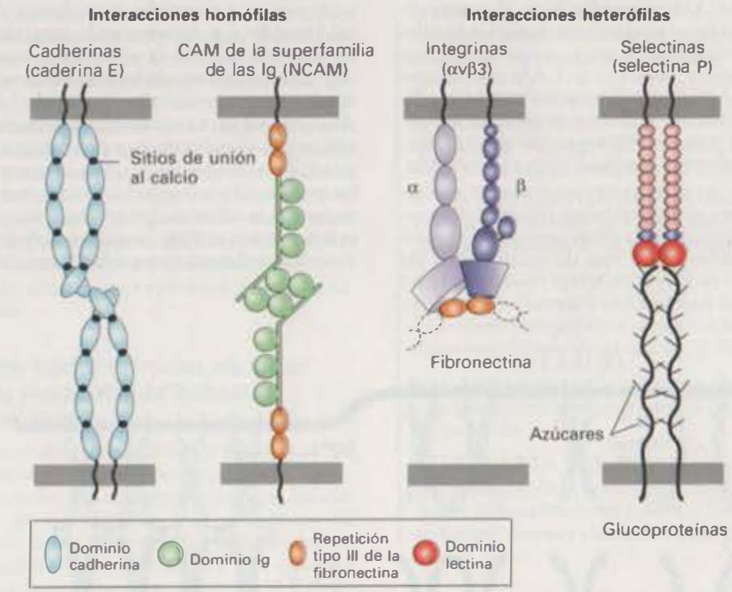
En este capítulo analizamos los distintos tipos de moléculas de adhesión y cómo interactúan. Se cree que la evolución de plantas y animales divergió antes de la aparición de los organismos multicelulares. Por ende, la organización multicelular y los medios moleculares de ensamblaje de tejidos y órganos deben haber surgido en forma independiente en los linajes de plantas y animales. No es sorprendente, entonces, que exhiban muchas diferencias en la organización y el desarrollo de los tejidos. Por esta razón, consideraremos primero la organización de los tejidos epiteliales y no epiteliales en los animales para tratar luego los tejidos de las plantas. A pesar de que la mayoría de las células en los organismos vivos existen dentro de los tejidos, nuestro entendimiento acerca de ellas depende en gran medida del estudio aislado de las células. Por lo tanto, en la última sección de este capítulo presentamos algunas características generales del trabajo con poblaciones de células separadas de los tejidos y de los organismos.

6.1 Adhesión entre células y entre célula y matriz: una visión general

Comenzamos con una breve orientación acerca de los diversos tipos de moléculas de adhesión, sus funciones principales en los organismos y sus orígenes evolutivos. En las secciones siguientes, analizaremos en detalle sus estructuras únicas y las propiedades de los variados participantes en las interacciones entre células y entre célula y matriz en los animales.

Las moléculas de adhesión celular se unen entre sí y con las proteínas intracelulares

Un gran número de CAM pertenece a una de las cuatro familias principales: las cadherinas, la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig), las integrinas y las selectinas. Como se ilustra en la estructura esquemática de la figura 6-2, numerosas CAM son mosaicos de múltiples dominios distintos, mu-



▲ Fig. 6-2. Principales familias de moléculas de adhesión celular (CAM) y receptores de adhesión. Las cadherinas E diméricas suelen formar puentes cruzados (entre sí) homófilos con las cadherinas E sobre células adyacentes. Miembros de las CAM de la superfamilia de la inmunoglobulina (Ig) pueden formar tanto conexiones homófilas (aquí mostradas) y conexiones (no entre sí) heterófilas. Las selectinas, mostradas como dímeros, contienen un dominio lectina de unión a carbohidratos que reconoce estructuras de azúcares especializados sobre las glucoproteínas (aquí mostradas) y los glucolípidos sobre células adyacentes. Las integrinas heterodiméricas (p. ej., las cadenas αv y β3) funcionan como CAM o como receptores de adhesión (aquí mostrados) que fijan grandes proteínas multiadhesivas de la matriz, como la fibronectina, de las cuales aquí se ilustra sólo una pequeña parte (véase también fig. 6-25). Nótese que las CAM a menudo forman oligómeros de mayor orden dentro del plano de la membrana plasmática. Muchas moléculas adhesivas contienen múltiples dominios distintivos, algunos de los cuales se encuentran en más de un tipo de CAM. Los dominios citoplasmáticos de estas proteínas están a menudo asociados con proteínas adaptadoras que las unen al citoesqueleto o a vías de señalización. (Véase R. O. Hynes, 1999, Trends Cell Biol. 9(12):M33 y R. O. Hynes, 2002, Cell 110:673-687.)

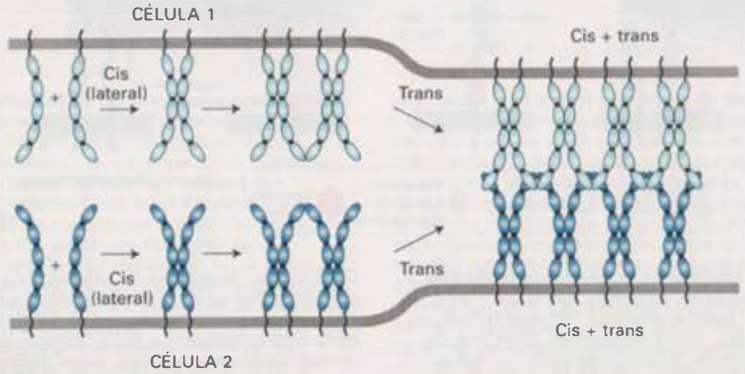
chos de los cuales pueden encontrarse en más de una clase de CAM. Se denominan "repeticiones" cuando se presentan muchas veces en la misma molécula. Algunos de estos dominios le confieren la especificidad de unión que caracteriza a una proteína en particular. Otras proteínas de membrana, cuyas estructuras no pertenecen a ninguna de las clases principales de las CAM, también participan en la adhesión entre célula y célula en varios tejidos.

A través de sus dominios extracelulares las CAM median las interacciones adhesivas entre células del mismo tipo (*adhesión homotípica*) o entre células de diferentes tipos (*adhesión heterotípica*). Una CAM sobre una célula puede unirse directamente a la misma clase de CAM en una célula adyacente (unión *homófila*) o a una clase distinta de CAM (unión *heterófila*). Las CAM pueden distribuirse ampliamente a lo largo de las regiones de las membranas plasmáticas que contactan otras células o agruparse en parches o sitios denominados uniones celulares. La adhesión entre células puede ser fuerte y bastante perdurable o relativamente débil y transitoria. Las asociaciones entre las células nerviosas en la médula espinal o entre las células metabólicas en el hígado exhiben una adhesión fuerte. Por el contrario, las células del sistema inmunitario en la sangre pueden exhibir sólo interacciones débiles de corta duración, permitiéndoles rodar a lo largo y pasar a través de la pared de un vaso sanguíneo en su camino para combatir una infección dentro de un tejido.

Los dominios de las CAM orientados hacia el citosol reclutan un grupo de proteínas adaptadoras multifuncionales (véase fig. 6-1). Estas adaptadoras actúan como conectores que, directa o indirectamente, conectan las CAM con elementos del citoesqueleto (cap. 5); también pueden reclutar moléculas intracelulares que funcionan en vías de señalización para controlar la actividad proteica y la expresión génica (caps. 13 y 14). En algunos casos, un agregado complejo de CAM, proteínas adaptadoras y otras proteínas asociadas se ensambla en la superficie interna de la membrana plasmática. Puesto que las adhesiones intercelulares están asociadas intrínsecamente con el citoesqueleto y las vías de señalización, los alrededores de la célula influyen en su forma y sus propiedades funcionales (efecto "externo-interno"); asimismo, la forma y la función celular influyen en el entorno de la célula. (efecto "interno-externo"). De este modo, la *conectividad* y la *comunicación* se relacionan íntimamente con las propiedades de las células en los tejidos.

La formación de muchas adhesiones entre células implica dos tipos de interacciones moleculares (fig. 6-3). Primero, las CAM sobre una célula se asocian lateralmente a través de sus dominios extracelulares, sus dominios citosólicos o ambos para formar homodímeros u oligómeros de orden mayor en el plano de la membrana plasmática celular; estas interacciones se denominan intracelulares, laterales o interacciones cis. Segundo, los oligómeros de las CAM de una célula se unen a la misma CAM o a una diferente sobre una célula adyacente; estas interacciones se denominan intercelulares o interacciones trans. Las interacciones trans a veces inducen interacciones cis adicionales y, como consecuencia, aún más interacciones trans.

Las interacciones adhesivas entre células varían de manera considerable según las CAM particulares que participan y el tejido. Al igual que el Velcro, se pueden generar adhesiones muy ajustadas cuando se combinan muchas interacciones en un área pequeña, pero bien definida. Más aún, la asociación de moléculas intracelulares con los dominios citosólicos de las CAM puede influir en forma espectacular en las interacciones intermoleculares de las CAM al promover sus asociaciones cis (agrupación) o alterando su conformación. Entre las numerosas variables que determinan la naturaleza de la adhesión entre dos células, está la afinidad de unión de las moléculas interactuantes (propiedades termodinámicas); las velocidades generales de "encendido" y "apagado" de las asociaciones y disociaciones para cada molécula interactuante (propiedades cinéticas); la distribución espacial (agrupación, alta o baja densidad) de las moléculas de adhesión (propiedades geométricas); los estados activos versus los estados inactivos de las CAM con respecto a la adhesión (propiedades bioquímicas); y las fuerzas externas como el flujo laminar o turbulento en las células del sistema circulatorio (propiedades mecánicas).



▲ Fig. 6-3. Modelo esquemático para la generación de adhesiones entre células. Las interacciones laterales entre las moléculas de adhesión celular (CAM) dentro de la membrana plasmática de una célula forman dímeros y oligómeros grandes. Las partes de las moléculas que participan en estas interacciones cis varían entre las diferentes CAM. Subsecuentes interacciones trans entre dominios distales de las CAM sobre células adyacentes generan una fuerte adhesión entre las células similar a la del cierre de cremallera. (Adaptado de M. S. Steinberg y P. M. McNutt, 1999, Curr. Opin. Cell Biol. 11:554.)

La matriz extracelular participa en la adhesión y en otras funciones

Algunos receptores de la superficie de las células, incluidas algunas integrinas, pueden ligar componentes de la matriz extracelular, adhiriendo indirectamente de esta forma a las células entre sí a través de su interacción con la matriz. Tres componentes abundantes de la matriz extracelular son los proteoglucanos, un tipo único de glucoproteína; el colágeno, una proteína que a menudo forma fibras; y las proteínas solubles multiadhesivas de la matriz (p. ej., la fibronectina). Los volúmenes relativos de las células con respecto a la matriz varían enormemente entre los diferentes tejidos y órganos. Cierto tejido conectivo, por ejemplo, es principalmente matriz, mientras que muchos órganos están compuestos de células densamente empaquetadas con relativamente poca matriz.

A pesar de que la matriz extracelular suele proporcionar sostén mecánico a los tejidos, también cumple otras diversas funciones. Diferentes combinaciones de componentes de la matriz extracelular la constituyen en el material ideal para propiedades específicas: fuerza en un tendón, diente o hueso; amortiguación en el cartílago y adhesión en la mayoría de los tejidos. Además, la composición de la matriz, que puede variar, según el sitio anatómico y el estado fisiológico de un tejido, le permite a la célula saber dónde está y qué debe hacer (indicios ambientales). Los cambios en los componentes de la matriz extracelular, los cuales son remodelados, degradados y resintetizados localmente en forma constante, pueden modular las interacciones de una célula con el entorno. La matriz también sirve como depósito para muchas moléculas de señalización extracelulares que controlan el crecimiento y la diferenciación celular. Además, la matriz provee un entramado sobre el cual las células pueden moverse, sobre todo en las etapas tempranas de la constitución de los tejidos. La morfogénesis –el estadio más tardío del desarrollo embrionario en el que los tejidos, órganos y partes del cuerpo se forman por movimientos y reordenamientos celulares– depende críticamente de la adhesión célula-matriz como también de la adhesión entre las células.

La diversidad de los tejidos animales depende de la evolución de moléculas de adhesión con diversas propiedades

La adhesión entre células y entre célula y matriz son responsables de la formación, composición, arquitectura y función de los tejidos animales. No es sorprendente que las moléculas de adhesión de los animales sean evolutivamente antiguas y sean algunas de las proteínas más conservadas entre los organismos multicelulares (metazoos). Las esponjas, los metazoos más primitivos, expresan ciertas CAM y moléculas multiadhesivas de la matriz extracelular cuyas estructuras son increíblemente similares a las correspondientes proteínas humanas. La evolución de organismos con tejidos y órganos complejos dependió de la evolución de diversas CAM, receptores de adhesión y moléculas de la matriz extracelular con nuevas propiedades y funciones, cuyos niveles de expresión difieren en los distintos tipos de células.

La diversidad de moléculas adhesivas se origina en gran parte en dos fenómenos que pueden generar numerosas proteínas estrechamente relacionadas, denominadas isoformas, que constituyen una familia de proteínas. En algunos casos, los diferentes miembros de una familia de proteínas son codificados por múltiples genes originados en un antepasado común mediante duplicación de genes y evolución divergente (cap. 9). Los análisis de las secuencias de genes y de cDNA pueden proporcionar evidencia sobre la existencia de tales conjuntos de genes relacionados o familia de genes. En otros casos, un único gen produce un transcripto de RNA que puede sufrir un corte y empalme alternativo para producir múltiples mRNA, cada uno de los cuales codifica una isoforma distinta (cap. 4). De ese modo, el corte y el empalme alternativo incrementa el número de proteínas que pueden ser expresadas a partir de un gen. Estos dos fenómenos contribuyen a la diversidad de algunas familias de proteínas, como las cadherinas. Las isoformas particulares de una proteína adhesiva suelen expresarse en algún tipo de célula pero no en otras, lo que da cuenta de su distribución diferencial en varios tejidos.

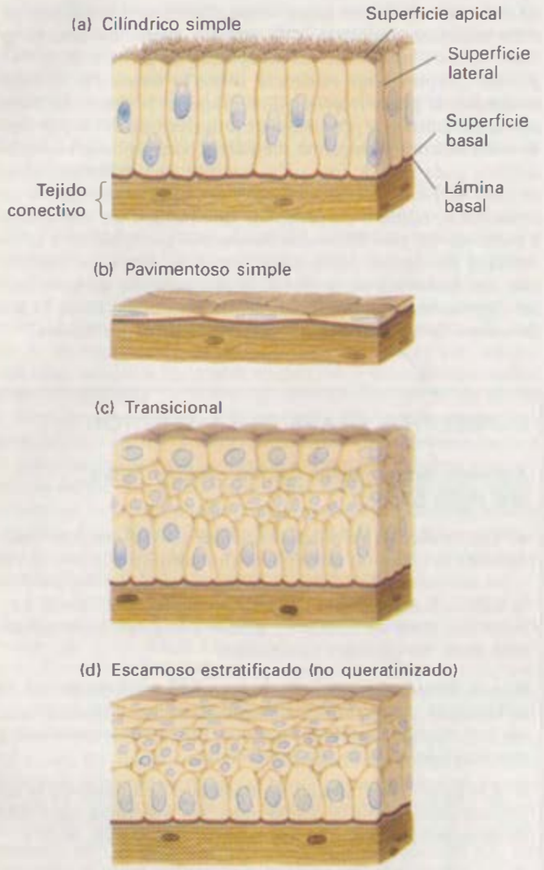
CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 6.1

Adhesión entre células y entre célula y matriz: una visión general

- Las moléculas de adhesión celular (CAM) median directamente la adhesión intercelular (homotípica y heterotípica) y los receptores de adhesión de la superficie celular median la adhesión entre célula y matriz (véase fig. 6-1). Estas interacciones unen las células en tejidos y facilitan la comunicación entre las células y su entorno.
- Los dominios citosólicos de las CAM y los receptores de adhesión se unen con proteínas adaptadoras multifuncionales que median la interacción con fibras citoesqueléticas y proteínas de señalización intracelular.
- Las principales familias de moléculas de adhesión a la superficie celular son las cadherinas, las selectinas, las CAM de la superfamilia de Ig y las integrinas (véase fig. 6-2).
- La adhesión fuerte entre células implica tanto la oligomerización cis (lateral o intracelular) de CAM como la interacción trans (intercelular) de las CAM similares (homófila) o diferentes (heterófila)(véase fig. 6-3).
- La matriz extracelular es una red compleja de proteínas y polisacáridos que contribuye a la estructura y a la función de un tejido.
- La evolución de las CAM, los receptores de adhesión y las moléculas de la matriz extracelular con estructuras y funciones especializadas permiten a las células ensamblarse para formar diversas clases de tejidos con diferentes funciones.

6.2 Tejidos epiteliales laminares: moléculas de unión y de adhesión

En general, las superficies externas e internas de los órganos están cubiertas por una capa similar a una lámina de tejido epitelial denominada epitelio. Se dice que las células que forman el tejido epitelial están *polarizadas* porque sus membranas plasmáticas están organizadas como mínimo en dos regiones separadas. Típicamente, las distintas superficies de una célula epitelial polarizada se denominan superficie apical



▲ Fig. 6-4. Tipos principales de epitelio. Las superficies apicales y basolaterales de las células epiteliales exhiben características distintivas. (a) El epitelio cilíndrico simple consta de células elongadas, incluidas las células secretoras de mucosa (en el revestimiento del estómago y el tracto cervical) y las células absorbentes (en el revestimiento del intestino delgado). (b) Epitelio escamoso simple, compuesto de varias capas de células delgadas, reviste los vasos sanguíneos (células endoteliales/endotelio) y muchas cavidades del cuerpo. (c) El epitelio transicional, compuesto de células delgadas, revisten ciertas cavidades sujetas a la expansión y contracción (p. ej., la vejiga urinaria). (d) El epitelio escamoso estratificado (no queratinizado) reviste superficies como la boca y la vagina; este recubrimiento resiste la abrasión y no suele participar en la absorción o secreción de materiales hacia el interior o el exterior de la cavidad. La lámina basal, una red fibrosa de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular, sostiene todos los epitelios y los conecta al tejido conectivo subyacente.

(arriba), basal (base o abajo) y lateral (lado) (fig. 6-4). La superficie basal suele entrar en contacto con una matriz extracelular subyacente llamada **lámina basal**, cuya composición y función se explican en la sección 6.3. A menudo, las superficies basal y lateral son similares en composición y juntas se denominan superficie basolateral. Las superficies basolaterales de la mayoría de los epitelios suelen estar del lado de la célula más cercano a los vasos sanguíneos. En los animales con sistemas circulatorios cerrados, la sangre circula a través de los vasos cuyo revestimiento interno está compuesto de células epiteliales aplanadas denominadas células endoteliales. El lado apical de las células endoteliales, que está en contacto con la sangre, se denomina superficie *luminal* y el lado basal opuesto, superficie *abluminal*.

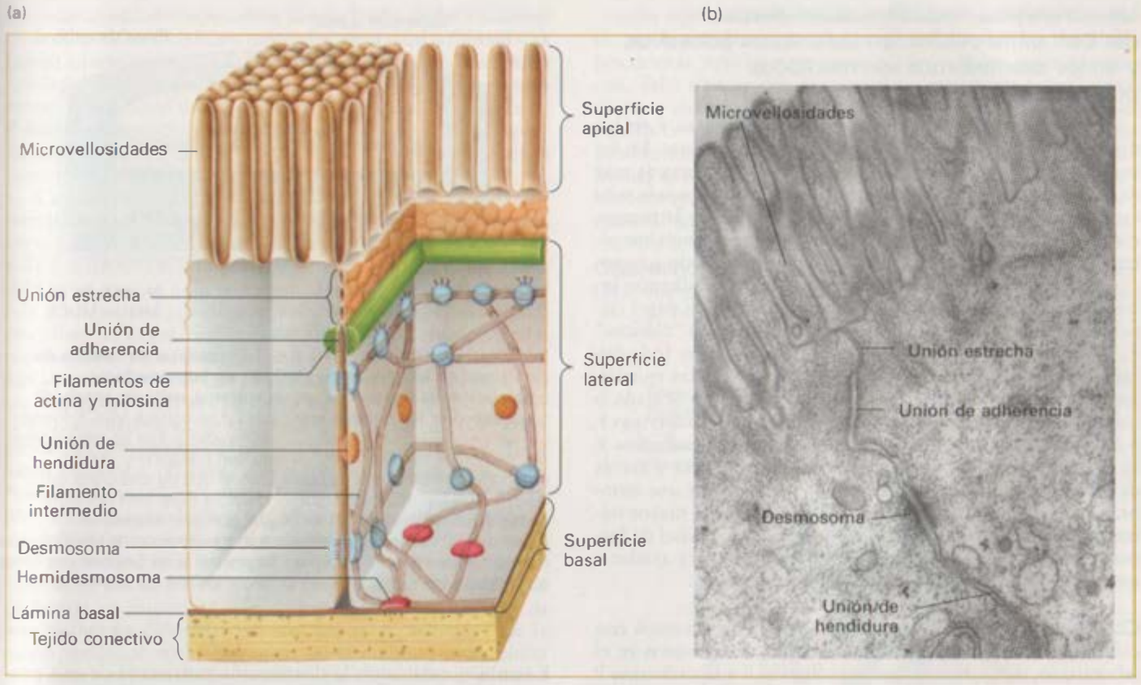
El epitelio en diferentes ubicaciones del cuerpo tiene morfologías y funciones características (véase fig 6-4). Los epitelios estratificados (multicapa) sirven como barreras y superficies protectoras (p. ej., la piel), mientras que el epitelio simple (de una única capa) a menudo mueve iones y moléculas pequeñas selectivamente desde un lado de la capa a la otra. Por ejemplo, el epitelio cilíndrico simple que reviste el estómago secreta ácido clorhídrico en la luz del estómago; un epitelio similar que reviste el intestino delgado transporta los productos de la digestión (p. ej., glucosa y aminoácidos) desde la luz del intestino a través de la superficie basolateral hasta el torrente sanguíneo (cap. 7). El epitelio cilíndrico simple que reviste el intestino delgado tiene numerosas proyecciones digitiformes (de 100 nm de diámetro) llamadas microvellosidades que se extienden desde la superficie luminal (apical) (véase fig. 5-45). La orientación erguida de una microvellosidad es mantenida por numerosas conexiones entre la membrana plasmática circundante y un haz central de microfilamentos de actina, que se extienden hacia el interior de la célula e interactúan con los filamentos intermedios de queratina (véase fig. 5-28). Las microvellosidades incrementan el área de la superficie apical y por ende el número de proteínas que puede contener, aumentando la capacidad absorbente del epitelio intestinal.

Aquí describimos las diversas uniones celulares y las CAM que desempeñan papeles clave en la constitución y el funcionamiento de las láminas epiteliales. En la sección 6.3, consideraremos los componentes de la matriz extracelular íntimamente asociados con el epitelio.

Las uniones especializadas ayudan a definir la estructura y función de las células epiteliales

Todas las células epiteliales en una lámina están conectadas entre sí y con la matriz extracelular mediante uniones celulares especializadas formadas por acumulaciones densas de CAM. Aunque cientos de interacciones individuales mediadas por CAM son suficientes para hacer que las células se adhieran, las uniones cumplen papeles especiales al impartir fuerza y rigidez a un tejido, al transmitir información entre el espacio extracelular y el espacio intracelular, al controlar el pasaje de iones y moléculas a través de las capas celulares, y al sirvir como conductos para el movimiento de iones y moléculas desde el citoplasma de una célula al de su vecino inmediato.

Tres clases principales de uniones de las células animales constituyen rasgos prominentes del epitelio intestinal (fig. 6-5; véase también fig. 6-1). Las uniones de anclaje y las uniones estrechas (también llamadas uniones oclusivas) desempeñan las tareas clave de mantener las células juntas para constituir los tejidos. Estas uniones se organizan en tres partes: las proteínas adhesivas en la membrana plasmática que conectan una célula a la otra (CAM) o a la matriz extracelular (receptores de adhesión); las proteínas adaptadoras, que conectan las CAM o



▲ Fig. 6-5. Principales tipos de uniones celulares que conectan las células epiteliales que recubren el intestino delgado. (a) Dibujo de un corte esquemático de células epiteliales intestinales. La superficie basal de las células descansa sobre una lámina basal, la superficie apical está empaquetada con microvellosidades digitiformes que se proyectan hacia la luz intestinal. Uniones estrechas, ubicadas inmediatamente por debajo de las microvellosidades, evitan la difusión de muchas sustancias entre la luz intestinal y la sangre a través del espacio extracelular entre las células. Las uniones de hendidura permiten el movimiento de moléculas pequeñas y iones entre el citosol de células adyacentes. Los restantes tres tipos de uniones –uniones de adherencia, desmosomas puntuales y hemidesmosomas– son críticos para la adhesión entre célula-célula, como entre célula-matriz y para la señalización. (b) Microfotografía electrónica de una sección delgada de células epiteliales intestinales, que muestra las ubicaciones relativas de las distintas uniones. (Parte (b) C. Jacobson et al., 2001, *Journal Cell Biol.* **152**:435-450.)

los receptores de adhesión a los filamentos citoesqueléticos y a las moléculas de señalización; y los propios filamentos citoesqueléticos. Las uniones también controlan el flujo de solutos entre las células y forman una lámina epitelial. Las uniones comunicantes o uniones de hendidura (***gap junctions***) permiten la difusión rápida de moléculas pequeñas solubles en agua entre el citoplasma de células adyacentes. Aunque están presentes en el epitelio, las uniones de hendidura también abundan en los tejidos no epiteliales y estructuralmente son muy diferentes de las uniones de anclaje y de las uniones estrechas; también guardan un parecido con las uniones entre las células vegetales. Por estas razones, trataremos sobre las uniones de hendidura al final de la sección 6.5.

De los tres tipos de uniones de anclaje presentes en las células epiteliales, dos participan en la adhesión entre células, mientras que la tercera participa en la adhesión entre la célula y la matriz. Las *uniones adhesivas*, que conectan las membranas laterales de células epiteliales adyacentes, se ubican casi siempre cerca de la superficie apical, inmediatamente por debajo de las uniones estrechas (véanse figs. 6-1 y 6-5). Un cinto circular de filamentos de actina y miosina que forman un complejo con las uniones adhesivas funciona como un cable de tensión que puede reforzar internamente la célula y controlar así su forma. Las células epiteliales y algunos otros tipos celulares, como las del músculo liso, también están fuertemente unidas por los *desmosomas*, puntos de contacto similares a botones denominados a veces desmosomas puntuales. Los *hemidesmosomas*, hallados principalmente en la superficie basal de las células epiteliales, anclan un epitelio a componentes de la matriz extracelular subyacente, de manera similar a clavos que sostienen una alfombra. Haces de filamentos intermedios, que corren paralelos a la superficie celular o a través de la célula, en lugar de los filamentos de actina, interconectan los desmosomas puntuales y los hemidesmosomas, impartiendo forma y rigidez a la célula.

Los desmosomas y los hemidesmosomas también transmiten fuerzas de fricción desde una región de una capa celular hasta el epitelio en su totalidad y proporcionan fuerza y rigidez a toda la capa de células epiteliales. Estas uniones son muy importantes para mantener la integridad de la superficie epitelial. Por ejemplo, las mutaciones que interfieren en los anclajes de la piel mediante hemidesmosomas pueden producir ampollas en las que el epitelio se desprende de su matriz basal y el líquido extracelular se acumula en la superficie basolateral, con distensión cutánea en forma de globo.

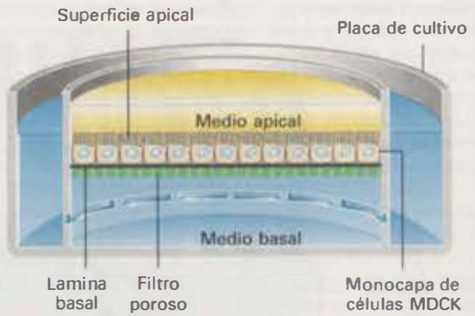
Las adhesiones homófilas dependientes del Ca^{2+} entre células, en las uniones adhesivas y en los desmosomas son mediadas por las cadherinas

Las principales CAM en las uniones adhesivas y en los desmosomas pertenecen a la familia de las cadherinas. En los vertebrados e invertebrados, esta familia de proteínas de más de 100 miembros puede ser agrupada en al menos seis subfamilias. La diversidad de las cadherinas surge de la presencia de múltiples genes de cadherina y del corte y empalme alternativo del RNA, que genera múltiples mRNA de un gen.

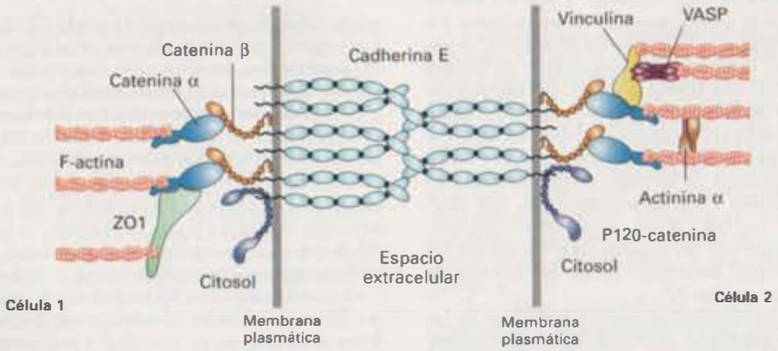
Las cadherinas son las moléculas clave en la adhesión intercelular y en la señalización celular y cumplen un papel crítico durante la diferenciación tisular. Las cadherinas "clásicas" E, P y N son las más ampliamente expresadas, sobre todo durante la diferenciación temprana. Láminas de células epiteliales polarizadas, como las que revisten el intestino delgado o los túbulos de los riñones, contienen abundantes cadherinas E a lo largo de sus superficies laterales. Aunque la cadherina E se concentra en las uniones adhesivas, está presente a través de todas las superficies laterales donde se piensa que une membranas celulares adyacentes. El cerebro contiene el mayor número de cadherinas diferentes, tal vez por la necesidad de formar muchos contactos específicos entre células para ayudar a establecer sus complejos diagramas de conexiones.

Cadherinas clásicas. Los resultados de experimentos con células L, una línea de fibroblastos de ratón cultivados en el laboratorio, demostraron que la cadherina E y la cadherina P median preferentemente las interacciones homófilas. Las células L que no expresaron cadherinas se adhieren poco entre sí o a otros tipos de células cultivadas. Cuando se introdujeron los genes que codifican la cadherina E o la cadherina P en las células L mediante el uso de técnicas que se describen en el capítulo 9, las células L resultantes diseñadas expresaron la cadherina codificada. Se descubrió que estas células L que expresan la cadherina suelen adherirse a las células que expresan el mismo tipo de moléculas de cadherina; esto es, median las interacciones homófilas. Las células L que expresan cadherina E también exhibieron la distribución polarizada de una proteína de membrana similar a la de las células epiteliales y formaron agrupaciones similares a las del epitelio, tanto entre ellas como con células epiteliales aisladas del pulmón.

La adhesividad de las cadherinas depende de la presencia de Ca^{2+} extracelular, la propiedad que da origen a su nombre (*adherencia* de calcio). Por ejemplo, la adhesión de células L genéticamente diseñadas que expresan la cadherina E se evita cuando se bañan las células en una solución (medio de cultivo) baja en Ca^{2+}. El papel de la cadherina E en la adhesión también se puede demostrar en experimentos con cultivos celulares de las



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 6-6 Los cultivos de células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) en contenedores especializados proporcionan un sistema experimental útil para estudiar las células epiteliales. Las células MDCK forman un epitelio polarizado cuando son cultivadas sobre un filtro poroso de membrana recubierto en un lado con colágeno y otros componentes de la lámina basal. Con el uso de una placa de cultivo especial mostrada aquí, el medio a cada lado del filtro (lados apical y basal de la monocapa) puede manipularse experimentalmente y monitorizarse el movimiento de las moléculas a través de la capa. Las uniones de anclaje y las uniones estrechas se forman sólo si el medio de cultivo contiene suficiente Ca^{2+}.



▲ Fig. 6-7. Constituyentes proteicos de una unión de adherencia típica. Los dominios exoplasmáticos de los dímeros de cadherina E agrupados en las uniones de adherencia sobre células adyacentes (1 y 2) forman interacciones homófilas dependientes del Ca^{2+}. Los dominios citosólicos de la cadherina E se unen de manera directa o indirecta a proteínas adaptadoras múltiples que conectan las uniones a los filamentos de actina (F-actina) del citoesqueleto y participen en las vías de señalización intracelular (p. ej., la catenina β). Grupos de proteínas adaptadoras algo distintas se ilustran en las dos células mostradas para destacar que una variedad de adaptadores pueden interactuar con las uniones de adherencia, que pueden así participar en diversas actividades. (Adaptado de V. Vasioukhin y E. Fuchs, 2001, Curr. Opin. Cell Biol. 13:76).

llamadas *células de riñón canino Madin-Darby (MDCK)*. Cuando se cultivan en recipientes especiales, estas células forman una lámina continua de una célula de grosor (monocapa) de células epiteliales de riñón polarizadas (fig. 6-6). En este sistema experimental, la adición de un anticuerpo que se une a la cadherina E evita sus interacciones homófilas, bloquea la adhesión dependientes del Ca^{2+} de células MDCK a un sustrato y la formación posterior de uniones adhesivas intracelulares.

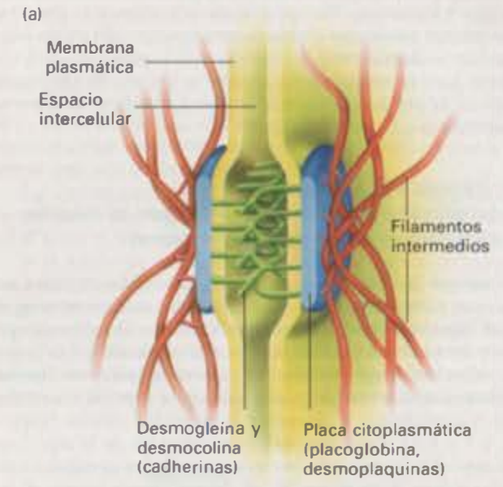
Cada cadherina clásica contiene un único dominio transmembrana, un dominio citosólico C-terminal relativamente corto y cinco dominios "cadherina" extracelulares (véase fig. 6-2). Los dominios extracelulares son necesarios para la unión del Ca^{2+} y para la adhesión mediada por cadherina entre célula y célula. Las adhesiones mediadas por cadherina implican tanto las interacciones moleculares laterales (intracelulares) como las trans (intercelulares) ya descritas (véase fig. 6-3). Los sitios de unión al Ca^{2+}, ubicados entre las repeticiones de las cadherinas confieren rigidez a los oligómeros de la cadherina. Los oligómeros de la cadherina forman entonces complejos intercelulares para generar adhesiones entre células y luego contactos laterales, que tiene como consecuencia un "cierre en cremallera" de cadherinas en grupos. Así, múltiples interacciones de baja afinidad se suman para producir una adhesión intercelular muy fuerte.

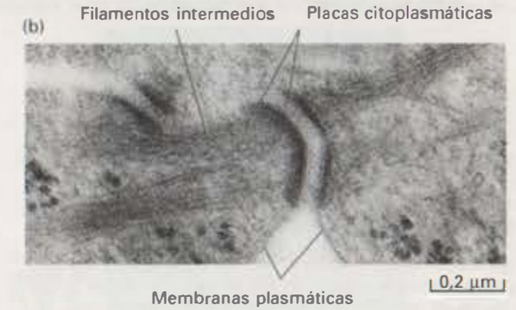
Los resultados de los experimentos de intercambio de dominios, en los cuales un dominio extracelular de un tipo de cadherina se reemplaza por el dominio correspondiente de una cadherina diferente, indican que la especificidad de la unión reside, al menos en parte, en el dominio extracelular más distal, el dominio N-terminal. En el pasado, se pensaba que la adhesión mediada por cadherina requería sólo interacciones entre las cabezas a través de los dominios N-terminales de los oligómeros de cadherina en células adyacentes, como se muestra en la figura 6-3. Sin embargo, los resultados de ciertos experimentos indican que en condiciones experimentales, al menos tres dominios de cadherina de cada molécula, no sólo los dominios N-terminales, participan por interdigitación en las asociaciones trans.

Los dominios citosólicos C-terminales de las cadherinas clásicas están conectados al citoesqueleto de actina por numerosas proteínas citosólicas adaptadoras (fig. 6-7). Estas uniones son esenciales para la adhesión fuerte, en apariencia debido primariamente a su participación en el incremento de las asociaciones laterales. Por ejemplo, la ruptura de las interacciones entre cadherinas clásicas y las cateninas α y β –dos proteínas adaptadoras comunes que unen estas cadherinas a los filamentos de actina– reduce de manera drástica las adhesiones entre células mediadas por cadherina. Esta ruptura es espontánea en las células tumorales, que a veces fallan en expresar cateninas α, y puede inducirse experimentalmente por depleción de la reserva citosólica de catenina β accesible. Los dominios citosólicos de las cadherinas también interactúan con las moléculas intracelulares de señalización, tales como la catenina β y la catenina p120. Es interesante destacar que la catenina β no sólo media las adhesiones citoesqueléticas sino que también puede translocarse al núcleo y alterar la transcripción génica (véase fig. 15-32).

Aunque las cadherinas E exhiben principalmente uniones homófilas, algunas cadherinas median interacciones heterófilas. Más importante aún, cada cadherina clásica tiene una distribución tisular característica. En el transcurso de la diferenciación, cambia la cantidad o la naturaleza de las cadherinas de la superficie celular, lo cual afecta muchos aspectos de la adhesión intercelular y la migración celular. Por ejemplo, la reorganización de tejidos durante la morfogénesis se acompaña a menudo por la conversión de células epiteliales inmóviles en células precursoras móviles para otros tejidos (células mesenquimáticas). Tales transiciones de epiteliales a mesenquimáticas se asocian con una reducción en la expresión de cadherina E. La conversión de células epiteliales para formar células cancerígenas de melanoma también está marcada por una pérdida de la actividad de las cadherinas E. La disminución resultante de las adhesiones entre células permite que las células de melanoma invadan el tejido subyacente y se propaguen a través del cuerpo.

Cadherinas desmosómicas. Un desmosoma (fig. 6-8) contiene dos proteínas cadherina especializadas, la *desmogleína*





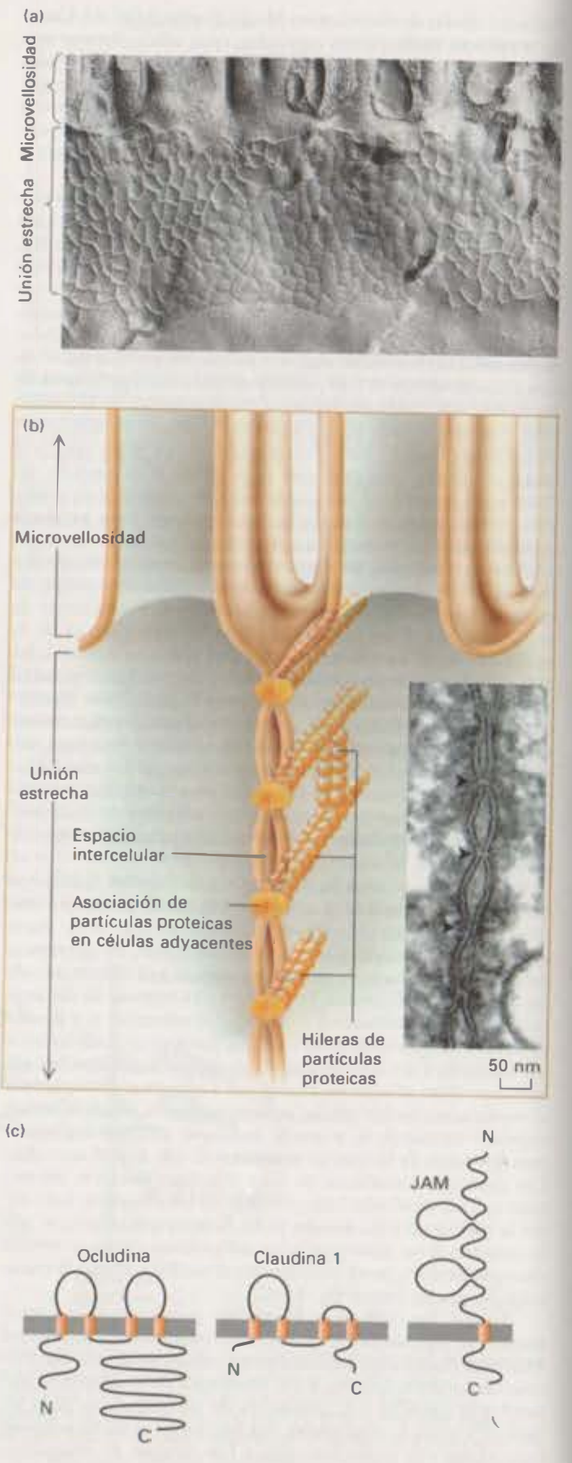
▲ Fig. 6-8. Desmosomas. (a) Modelo esquemático que muestra los componentes de un desmosoma entre las células epiteliales y las adhesiones a los lados de los filamentos intermedios de queratina, que entrelazan los interiores de las células. Las CAM transmembrana, desmogleína y desmocolina, pertenecen a la familia de las cadherinas. (b) Microfotografía electrónica de una sección delgada de un desmosoma que conecta dos queratinocitos humanos diferenciados y cultivados. Los haces de filamentos intermedios se irradian desde las dos placas citoplasmáticas teñidas de oscuro que revisten la superficie interior de las membranas plasmáticas adyacentes. (Parte [a] véase B. M. Gumbiner, 1993, Neuron 11:555 y D. R. Garrod, 1993, Curr. Opin. Cell Biol. 5: 30. Parte [b] Cortesía de R. Van Buskirk).

y la *desmocolina*, cuyos dominios citosólicos son distintos de los de las cadherinas clásicas. Los dominios citosólicos de las cadherinas desmosómicas interactúan con la placoglobina (similar en estructura a la β catenina) y la placofilina. Estas proteínas adaptadoras, que forman las placas citoplasmáticas gruesas características de los desmosomas, interactúan a su vez con los filamentos intermedios. Así, los desmosomas y las uniones adhesivas se unen a distintas fibras citoesqueléticas.

MEDICINA La cadherina desmogleína fue identificada por primera vez por una rara pero reveladora, enfermedad de la piel llamada *pénfigo vulgar*, un trastorno autoinmune. Los pacientes con enfermedades autoinmunes sintetizan anticuerpos que se unen a una proteína normal del organismo. En este caso, los autoanticuerpos rompen la adhesión entre células epiteliales y provocan ampollas en la piel y las mucosas. Se demostró que el anticuerpo predominante es específico para la desmogleína; es más, la adición de tales anticuerpos a la piel normal induce la formación de ampollas y la ruptura de la adhesión celular. ▮

Las uniones estrechas sellan las cavidades corporales y restringen la difusión de los componentes de la membrana

Para que las células epiteliales polarizadas desempeñen sus funciones como barreras y mediadoras de transporte selectivo, los líquidos extracelulares que rodean sus membranas apicales y basolaterales deben mantenerse separados. Las uniones estrechas entre células epiteliales adyacentes suelen ubicarse inmediatamente por debajo de la superficie apical y ayudan a estabilizar y mantener la polaridad celular (véanse figs. 6-1 y 6-5). Estas regiones especializadas de la membrana plasmática forman una barrera que sella las cavidades corporales, como el intestino, la luz del estómago, la sangre (p. ej., la barrera sangre-cerebro) y conducto biliar en el hígado.



▶ **Fig. 6-9. Uniones estrechas.** (a) Preparación de un corte fino congelado de la zona de unión estrecha entre dos células epiteliales del intestino. El plano de corte pasa a través de la membrana plasmática de una de las dos células adyacentes. Una red similar a un panal de crestas y surcos debajo de la microvellosidad constituye la zona de unión estrecha. (b) El dibujo esquemático muestra cómo una unión estrecha puede formarse mediante la unión de hileras de partículas de proteína en células adyacentes. En la microfotografía del recuadro, que ilustra una vista de una sección ultrafina de una unión estrecha, las células adyacentes pueden verse en estrecho contacto donde interactúan las hileras de proteínas. (c) Como se muestra en estos dibujos esquemáticos de las principales proteínas dentro de las uniones estrechas, tanto la ocludina como la claudina 1 contienen cuatro hélices transmembrana, mientras que la molécula de adhesión de unión (JAM) tiene un único dominio transmembrana y una gran región extracelular. Para más detalles véase el texto. [Parte (a) cortesía de L. A. Staehelin. Dibujo en parte (b) adaptado de L. A. Staehelin y B. E. Hull, 1978, Sci. Am. 238(5):140, y D. Goodenough, 1999, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 96:319. Fotografía en parte (b) cortesía de S. Tsukita et al., 2001, Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2:285. Dibujo en la parte (c) adaptado de S. Tsukita et al., 2001, Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2:285.]

Las uniones estrechas evitan la difusión de macromoléculas y en grado variable impiden la difusión de moléculas pequeñas solubles en agua y iones a través de los espacios entre células de una lámina epitelial. También mantienen la polaridad de las células epiteliales al prevenir la difusión de proteínas de membrana y glucolípidos (lípidos con azúcares adheridos en forma covalente) entre las regiones apicales y basolaterales de la membrana plasmática, asegurando que estas regiones contengan distintos componentes de membrana. Como consecuencia, el movimiento de muchos nutrientes a través del epitelio intestinal se realiza en gran medida a través de la *vía transcelular*. Dentro de esta vía, proteínas específicas de transporte en la membrana apical incorporan moléculas pequeñas desde la luz intestinal hacia el interior de las células; otras proteínas de transporte ubicadas en la membrana basolateral desplazan estas moléculas hacia el espacio extracelular. Este transporte transcelular se detalla en el capítulo 7.

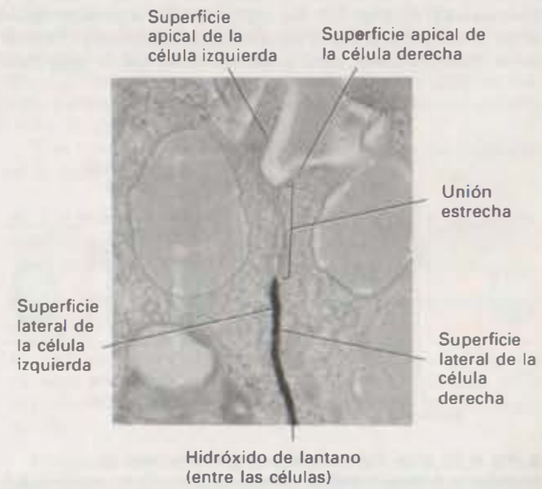
Las uniones estrechas están compuestas de bandas delgadas de proteínas de la membrana plasmática que circundan por completo una célula polarizada y están en contacto con bandas delgadas similares sobre células adyacentes. Cuando se observan secciones delgadas de las células con un microscopio electrónico, las superficies laterales de las células adyacentes parecen tocarse entre sí a intervalos y parecen fusionarse en la zona que está inmediatamente por debajo de la superficie apical (véase fig. 6-5b). En preparados de cortes por congelación, las uniones estrechas aparecen como una red de relieves entrelazados en la membrana plasmática (fig. 6-9a). Más específicamente, parecen relieves sobre la cara citosólica de la membrana plasmática de cada una de las dos células en contacto. Los surcos correspondientes se encuentran en la cara exoplasmática.

Un gran aumento revela que las hileras de partículas de proteínas de 3-4 nm de diámetro forman los relieves que se ven en las microfotografías de cortes por congelación de uniones estrechas. En el modelo de la figura 6-9b, la unión estrecha está formada por una hilera doble de estas partículas, una hilera donada por cada célula. Las dos principales proteínas integrales de membrana halladas en las uniones estrechas son la *ocludina* y la *claudina*. Al principio, los investigadores pensaron que la ocludina era el único componente proteico esencial de las uniones estrechas. Sin embargo, cuando modificaron genéticamente ratones con mutaciones que inactivaban el gen de la ocludina, el ratón tenía aún uniones estrechas morfológicamente distintivas. (Esta técnica, denominada ***knockout*** o **desactivación selectiva de genes**, se describe en el cap. 9.) Análisis posteriores condujeron al descubrimiento de la claudina. Cada una de estas proteínas tiene cuatro hélices α que atraviesan todo el espesor de la membrana (fig. 6-9c). La familia multigén de la claudina codifica numerosas proteínas homólogas (isoformas) que exhiben distintos patrones de expresión específicos de cada tejido. Se ha descubierto hace poco que un grupo de *moléculas de adhesión de las uniones (junction adhesion molecules JAM)* contribuyen a la adhesión homófila y a otras funciones de las uniones estrechas. Estas moléculas, que contienen una sola hélice α transmembrana, pertenecen a las CAM de la superfamilia de las Ig. Los dominios extracelulares de hileras de ocludina, claudina y proteínas JAM en la membrana plasmática de una célula forman enlaces muy estrechos con hileras similares de las mismas proteínas en una célula adyacente y crean un sello muy fuerte. El tratamiento de un epitelio con la proteasa tripsina destruye las uniones estrechas y avala la propuesta de que las proteínas son componentes estructurales esenciales de estas uniones.

El segmento citosólico C-terminal de la ocludina se une a los dominios PDZ de ciertas proteínas citosólicas adaptadoras grandes. Estos dominios se encuentran en diversas proteínas y median la unión al C-terminal de proteínas particulares de la membrana plasmática. Las proteínas adaptadoras de la membrana plasmática que contienen PDZ asociadas con la ocludina se unen, a su vez, a otras proteínas citoesqueléticas y de señalización y a fibras de actina. Estas interacciones parecen estabilizar la unión entre las moléculas de ocludina y claudina que es esencial para mantener la integridad de las uniones estrechas.

Un experimento simple demuestra la impermeabilidad de ciertas uniones estrechas a muchas sustancias solubles en agua. En este experimento, el hidróxido de lantano (un coloide de alto peso molecular denso a los electrones) se inyecta en un vaso sanguíneo pancreático de un animal de experimentación; algunos minutos después, las células pancreáticas acinares, que son células epiteliales especializadas, se fijan y preparan para ser observadas con el microscopio. Como se muestra en la figura 6-10, el hidróxido de lantano se difunde desde la sangre hacia el espacio que separa las superficies laterales de las células acinares adyacentes, pero no puede penetrar más allá de la unión estrecha.

La importancia del Ca^{2+} en la formación e integridad de las uniones estrechas se demostró en los estudios con células MDCK en el sistema experimental ya descrito (véase fig. 6-7). Si el medio de crecimiento en la cámara contiene concentraciones muy bajas de Ca^{2+}, las células MDCK forman una monocapa en la cual las células no están conectadas por uniones estrechas. Como resultado, los líquidos y las sales fluyen con libertad a través de la capa celular. Cuando se ha añadido suficiente Ca^{2+} al medio, las uniones estrechas se forman dentro de la hora y la capa celular se torna impermeable a



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 6-10 Las uniones estrechas evitan el pasaje de moléculas grandes a través del espacio extracelular entre las células epiteliales.** Este experimento, descrito en el texto, demuestra la impermeabilidad de las uniones estrechas de células pancreáticas al hidróxido de lantano, un coloide de alto peso molecular soluble en agua. (Cortesía de D. Friend.)

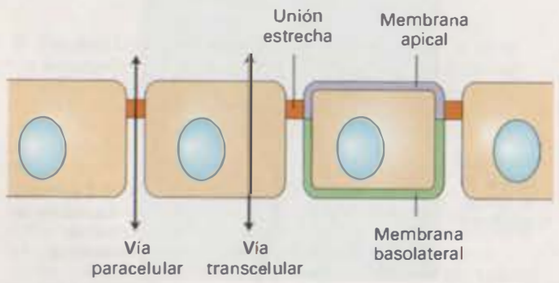
los líquidos y las sales. Por tanto se requiere el Ca^{2+} tanto para la formación de las uniones estrechas como para la adhesión mediada por cadherina entre células.

Las proteínas de la membrana plasmática no pueden difundirse en el plano de la membrana más allá de las uniones estrechas. Estas uniones también restringen los movimientos laterales de lípidos en la hojuela exoplasmática de la membrana en las regiones apical y basolateral de las células epiteliales. Más aún, la composición lipídica de la hojuela exoplasmática en esas dos regiones es distinta. Esencialmente todos los glucolípidos están presentes en la cara exoplasmática de la membrana, así como todas las proteínas están unidas a la membrana por anclas glucosilfosfatidilinositol (GPI) (véase fig. 5-15). En contraposición, los lípidos en la hojuela citosólica en las regiones apical y basolateral de las células epiteliales tienen la misma composición y parecen difundirse lateralmente desde una región de la membrana a la otra.

Las diferencias en la permeabilidad de las uniones estrechas pueden controlar el pasaje de moléculas pequeñas a través del epitelio

La barrera para la difusión provista por las uniones estrechas no es absoluta. Debido, al menos en parte, a las diferentes propiedades de las distintas isoformas de claudina localizadas en diferentes uniones estrechas, su permeabilidad a los iones, a las moléculas pequeñas y al agua varía mucho entre los tejidos epiteliales. En el epitelio con uniones estrechas "permeables", las moléculas pequeñas pueden moverse desde un lado de la capa celular hacia el otro a través de la *vía paracelular* además de la vía transcelular (fig. 6-11).

La permeabilidad de las uniones estrechas puede alterarse por vías de señalización intracelular, en especial las vías acopladas a la proteína G que implican el AMP cíclico y la proteincinasa C (cap. 13). La regulación de la permeabilidad de las uniones estrechas se suele estudiar midiendo el flujo de iones (resistencia eléctrica) o los movimientos de moléculas radiactivas o fluorescentes a través de las monocapas de las células MDCK.



▲ Fig. 6-11. Vías transcelulares y paracelulares de transporte transepitelial. El transporte transcelular requiere que la célula tome moléculas de un lado y luego las libere en el lado opuesto por medio de mecanismos analizados en los capítulos 7 y 17. En el transporte paracelular, las moléculas se mueven extracelularmente a través de las uniones estrechas, cuya permeabilidad ante moléculas pequeñas y iones depende de la composición de los componentes de la unión y del estado fisiológico de las células epiteliales. (Adaptado de S. Tsukita et al., 2001, Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2:285.)

MEDICINA

La importancia del transporte paracelular se ilustra en varias enfermedades humanas. En la hipomagnesemia hereditaria, los defectos en el gen de la *claudina 16* evita el flujo paracelular normal de magnesio a través de las uniones estrechas en el riñón. Esto produce un descenso del nivel sanguíneo de magnesio, que puede conducir a convulsiones. Más aún, una mutación en el gen de la *claudina 14* causa sordera hereditaria, aparentemente al alterar el transporte alrededor de las células ciliares de la cóclea del oído interno.

Las toxinas producidas por *Vibrio cholerae*, que provoca el cólera, y por muchas otras bacterias entéricas (del tubo digestivo) alteran la barrera de permeabilidad del epitelio intestinal cambiando la composición o la actividad de las uniones estrechas. Otras toxinas bacterianas pueden afectar la actividad de bombeo de iones de las proteínas transportadoras de membrana en las células epiteliales del intestino. Los cambios inducidos por toxinas en la permeabilidad de las uniones estrechas (transporte paracelular aumentado) y en la actividad de bomba iónica mediado por proteínas (transporte transcelular aumentado), pueden producir la pérdida masiva de los iones y de agua del interior del cuerpo hacia el interior del tubo digestivo, que a su vez conducen a la diarrea y a una posible deshidratación mortal. ▮

Muchas interacciones entre célula y matriz y algunas entre células son mediadas por integrinas

La familia de las integrinas comprende las proteínas integrales de membrana heterodiméricas que funcionan como receptores de adhesión, mediando muchas interacciones entre la célula y la matriz (véase fig. 6-2). En los vertebrados, se conocen al menos 24 heterodímeros de integrina, compuestos de 18 tipos de subunidades α y 8 tipos de subunidades β en diversas combinaciones. Una única cadena β puede interactuar con cualquiera de las múltiples cadenas α, formando integrinas que unen diferentes ligandos. Este fenómeno de *diversidad combinatoria*, que se encuentra en todo el mundo biológico, permite que un número relativamente pequeño de componentes sirvan para un gran número de funciones distintas.

En las células epiteliales, la integrina α6β4 se concentra en los hemidesmosomas y cumple un papel primordial en la adhesión de células a la matriz en la lámina basal subyacente, como se detalla en la sección 6.3. Algunas integrinas, sobre todo las expresadas por ciertas células sanguíneas, participan en las interacciones heterófilas entre células. Los miembros de esta gran familia cumplen funciones importantes en la adhesión y la señalización, tanto en los tejidos epiteliales como en los no epiteliales.

Las integrinas suelen exhibir bajas afinidades para sus ligandos con constantes de disociación K_D entre 10^{-6} y 10^{-8} mol/L. Sin embargo, las múltiples interacciones débiles generadas por la unión de cientos o miles de moléculas de integrina a sus ligandos sobre las células o en la matriz extracelular le permiten a una célula permanecer anclada firmemente al objetivo que expresa el ligando. Más aún, la debilidad de las interacciones individuales mediadas por las integrinas facilita la migración celular.

Las partes de las subunidades α y β de una molécula de integrina contribuyen al principal sitio extracelular de unión al ligando (véase fig. 6-2). La unión de ligandos a las integrinas también requiere la unión simultánea de cationes divalentes (iones cargados positivamente). Al igual que otras moléculas de adhesión de la superficie celular, la región citosólica de las integrinas interactúa con las proteínas adaptadoras que a su vez se unen al citoesqueleto y a moléculas de señalización intracelular. Aunque la mayoría de las integrinas están unidas al citoesqueleto de actina, el dominio citosólico de la cadena β4 en la integrina α6β4 de los hemidesmosomas, que es mucho más largo que los de otras integrinas β, se une a proteínas adaptadoras especializadas (p. ej., plectina) que a su vez interactúan con los filamentos intermedios basados en queratina.

Además de sus funciones de adhesión, las integrinas pueden mediar la transferencia de información de afuera hacia adentro y de adentro hacia afuera (señalización). En la señalización de afuera hacia adentro, los enlaces de las integrinas con sus ligandos extracelulares pueden, a través de proteínas adaptadoras unidas a la región citosólica de las integrinas, influir en el citoesqueleto y las vías de señalización intracelular. A la inversa, en la señalización de adentro hacia afuera, las vías de señalización intracelular pueden alterar, desde el citoplasma, la estructura de las integrinas y en consecuencia sus capacidades de adherirse a sus ligandos extracelulares y mediar las interacciones intercelulares y entre célula y matriz. Las vías de señalización mediadas por integrinas influyen en procesos tan diversos como la supervivencia celular, la proliferación celular y la muerte celular programada (cap. 22). Muchas células expresan varias integrinas diferentes que se unen al mismo ligando. Mediante regulación selectiva de la actividad de cada tipo de integrinas, estas células pueden sincronizar muy bien sus interacciones entre ellas y entre célula y matriz y el proceso de señalización asociado.

En la sección 6.5 detallamos las diversas integrinas y la regulación de sus actividades.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 6.2

Tejidos epiteliales laminares: moléculas de unión y de adhesión

- Las células polarizadas epiteliales tienen distintas superficies apical, basal y lateral. Las microvellosidades que se proyectan desde las superficies apical de muchas células epiteliales expanden considerablemente el área de su superficie.
- Tres clases principales de uniones celulares –uniones de anclaje, uniones estrechas y uniones de hendidura– ensamblan las células epiteliales para formar láminas y mediar la comunicación entre ellas (véanse figs. 6-1 y 6-5).
- Las uniones de adhesión y los desmosomas son uniones de anclaje que contienen cadherina y que unen las membranas de células adyacentes, confiriendo fuerza y rigidez a todo el tejido. Los hemidesmosomas son uniones que contienen integrina y que adhieren las células a los elementos de la matriz extracelular subyacente.
- Las cadherinas son moléculas de adhesión celular (CAM) responsables de las interacciones dependientes del Ca^{2+} entre las células de un epitelio y de otros tejidos. Promueven la adhesión fuerte intercelular al mediar las interacciones laterales e intracelulares.
- Las proteínas adaptadoras que se unen al dominio citosólico de las cadherinas y otras CAM median la asociación de moléculas citoesqueléticas y de señalización con la membrana plasmática (véase fig. 6-9) La adhesión fuerte entre células depende de la conexión de las CAM interactuantes con el citoesqueleto.
- Las uniones estrechas bloquean la difusión de proteínas y algunos lípidos en el plano de la membrana plasmática, contribuyendo a la polaridad de las células epiteliales. También limitan y regulan el flujo extracelular (paracelular) de agua y solutos desde un lado al otro del epitelio (véase fig. 6-11).
- Las integrinas son una gran familia de proteínas heterodiméricas αβ de la superficie celular que median tanto las adhesiones entre células como las de célula y matriz, al igual que la señalización de adentro hacia afuera y de afuera hacia adentro en numerosos tejidos.

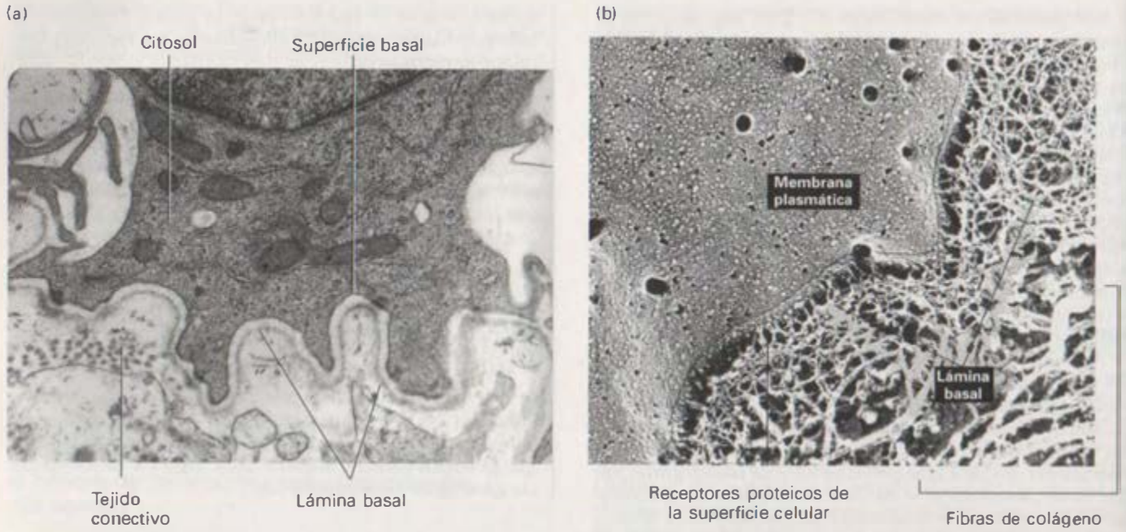
6.3 La matriz extracelular de las láminas epiteliales

En los animales, la matriz extracelular ayuda a organizar las células en tejidos y coordina las funciones celulares al activar las vías de señalización intracelular que controlan el crecimiento, la proliferación y la expresión génica celular. Muchas funciones de la matriz requieren receptores de adhesión transmembrana que se unen directamente a los componentes de la matriz extracelular y que también interactúan, a través de las proteínas adaptadoras, con el citoesqueleto. La clase principal de receptores de adhesión que median la adhesión entre célula y matriz son las integrinas, presentadas en la sección 6.2. Sin embargo, otros tipos de moléculas también funcionan como receptores importantes de adhesión en algunos tejidos no epiteliales.

Tres tipos de moléculas abundan en la matriz extracelular de todos los tejidos.

- Los **proteoglucanos** altamente viscosos, un grupo de glucoproteínas que amortiguan el contacto entre las células y unen una gran variedad de moléculas extracelulares.
- Las fibras de **colágeno**, que proveen fuerza mecánica y elasticidad.
- Las **proteínas multiadhesivas de la matriz** solubles, que se fijan e interconectan los receptores de adhesión de la superficie celular y otros componentes de la matriz extracelular.

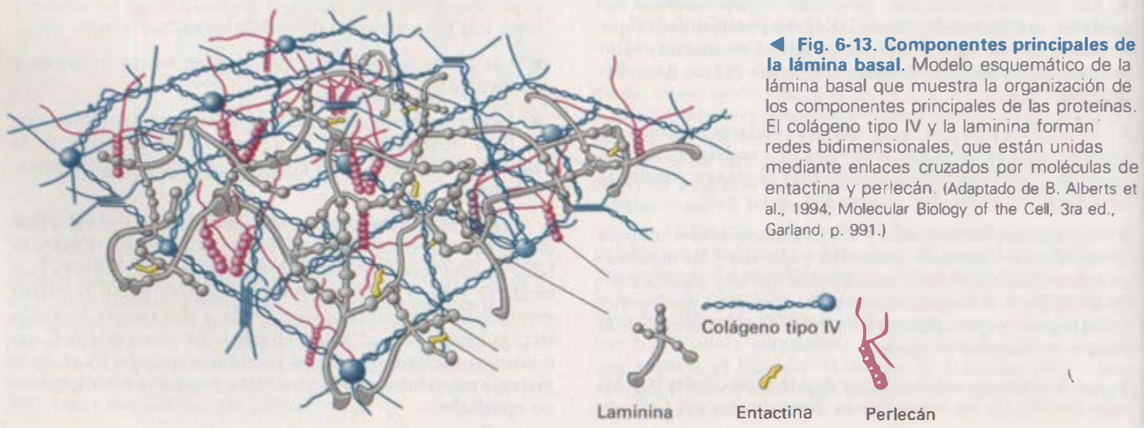
Comenzamos nuestra descripción de las estructuras y funciones de estos componentes principales de la matriz extracelular en esta sección, centrándonos en los componentes moleculares y en la organización de la lámina basal; la matriz extracelular especializada que ayuda a determinar la arquitectura general de un tejido epitelial. En la sección 6.4, extendemos nuestro abordaje a las moléculas específicas de la matriz extracelular que suelen estar presentes en los tejidos no epiteliales.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 6-12 La lámina basal separa las células epiteliales y algunas otras células de tejido conectivo. (a) Microfotografía de transmisión de electrones de una sección delgada de células (*arriba*) y del tejido conectivo subyacente (*abajo*). Puede verse cómo la capa electrón-densa de la lámina basal sigue la ondulación de la superficie basal de las células. (b) Microfotografía electrónica de una preparación de grabado profundo por congelación rápida del músculo esquelético que muestra la relación de la membrana plasmática, la lámina basal y el tejido conectivo circundante. En esta preparación, la lámina basal se revela como un entramado de proteínas filamentosas que se asocian con la membrana plasmática y con las fibras de colágeno más gruesas del tejido conectivo. [Parte (a) cortesía de P. FitzGerald. Parte (b) de D. W. Fawcett, 1981, The Cell, 2da ed., Saunders/Photo Researchers; cortesía de John Heuser.]

La lámina basal proporciona un soporte para las láminas epiteliales

En los animales, el epitelio y la mayoría de los grupos organizados de células están sostenidos o rodeados por la lámina basal, una malla laminar de componentes de la matriz extracelular generalmente de no más de 60-120 nm de espesor (fig. 6-12; véanse también figs. 6-1 y 6-4). La lámina basal está estructurada de manera diferente en los distintos tejidos. En el epitelio cilíndrico y otros epitelios (p. ej., el revestimiento intestinal, la piel), es un soporte sobre el cual se apoya una sola superficie de la célula. En otros tejidos, como el muscular o el adiposo, la lámina basal rodea cada célula. La lámina basal cumple importantes papeles en la regeneración luego del daño de los tejidos y en el desarrollo embrionario. Por ejemplo, la lámina basal ayuda a los embriones de cuatro y



◀ Fig. 6-13. Componentes principales de la lámina basal. Modelo esquemático de la lámina basal que muestra la organización de los componentes principales de las proteínas. El colágeno tipo IV y la laminina forman redes bidimensionales, que están unidas mediante enlaces cruzados por moléculas de entactina y perlecán. (Adaptado de B. Alberts et al., 1994, Molecular Biology of the Cell, 3ra ed., Garland, p. 991.)

de ocho células a adherirse juntos en una esfera. En el desarrollo del sistema nervioso, las neuronas migran a lo largo de vías de matriz extracelular que contienen componentes de la lámina basal. Por ende, la lámina basal es importante no sólo para organizar las células en tejidos sino también para repararlos y para guiar las células en migración durante la formación de los tejidos.

La mayoría de los componentes de la matriz extracelular en la lámina basal son sintetizados por las células que reposan sobre ella. Cuatro componentes proteicos ubicuos se encuentran en la lámina basal (fig. 6-13):

- El *colágeno tipo IV*, moléculas triméricas con dominios tipo bastón y globulares que forman un retículo bidimensional.
- Las *lamininas*, una familia de proteínas multiadhesivas que forman un retículo bidimensional con el colágeno tipo IV y que también se une a las integrinas.
- La *entactina* (también llamada nidógeno), una molécula tipo bastón que forma enlaces cruzados entre el colágeno tipo IV y la laminina y ayuda a incorporar otros componentes a la matriz extracelular.
- El *perlecano*, un gran proteoglucano multidominio que interconecta y se une a muchos componentes de la matriz extracelular y a moléculas de la superficie celular.

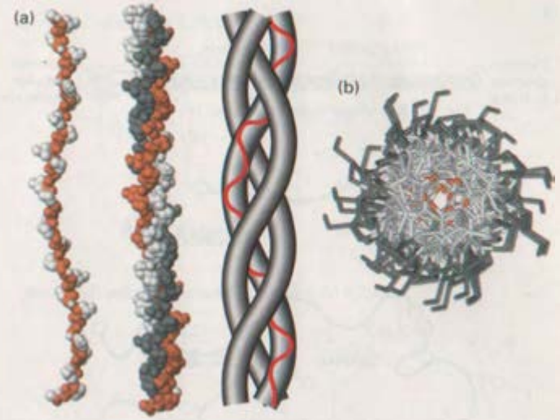
Como se representa en la figura 6-1, un lado de la lámina basal está conectado a las células por receptores de adhesión, incluida la integrina $\alpha6\beta4$ que se une a la laminina en la lámina basal. El otro lado de la lámina basal está anclado al tejido conectivo adyacente por una capa de fibras de colágeno incrustadas en una matriz rica en proteoglucanos. En el epitelio estratificado escamoso (p. ej., la piel), esta conexión está mediada por fibrillas de anclaje de colágeno tipo VII. Juntas, la lámina basal y esta capa que contiene colágeno (véase microfotografía de la pág. 197) forman la estructura denominada *membrana basal*.

El colágeno tipo IV que forma láminas es el componente estructural principal de la lámina basal

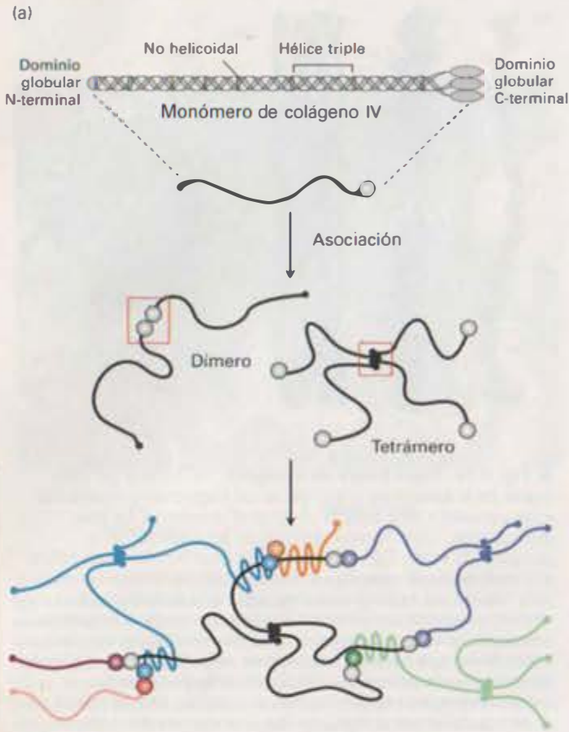
El colágeno tipo IV, el componente principal de toda lámina basal, es uno de los más de 20 tipos de colágeno que participan en la formación de la matriz extracelular en diversos tejidos. Aunque difieren en ciertos rasgos estructurales y distribución tisular, todos los colágenos son proteínas triméricas constituidas a partir de tres polipéptidos denominados cadenas de colágeno α. Las tres cadenas α pueden ser idénticas (homotriméricas) o diferentes (heterotriméricas). Una molécula trimérica de colágeno contiene uno o más segmentos de tres hebras, cada uno con una estructura helicoidal triple (fig. 6-14a). Cada hebra aportada por una de las cadenas α está formando una hélice con giro hacia la izquierda y tres de tales hebras de tres cadenas α se enrollan entre sí para formar una hélice triple con giro hacia la derecha.

La hélice triple de colágeno puede formarse debido a una abundancia poco común de tres aminoácidos; glicina, prolina y una forma modificada de la prolina llamada hidroxiprolina (véase fig. 3-12), que constituyen el motivo repetitivo Gly-X-Y característico, donde X e Y puede ser cualquier aminoácido, pero a menudo son la prolina y la hidroxiprolina y con menor frecuencia la lisina y la hidroxilisina. La glicina es esencial debido a que su cadena lateral pequeña, un átomo de hidrógeno, es el único que puede caber en el abigarrado centro de la hélice de triple hebra (fig. 6-14b). Los enlaces de hidrógeno ayudan a mantener las tres cadenas juntas. Aunque los rígidos enlaces peptidil-prolina y peptidil-hidroxiprolina no son compatibles con la formación de una hélice α clásica de hebra simple, estabilizan la hélice distintiva de colágeno de hebra triple. El grupo hidroxilo de la hidroxiprolina ayuda a mantener su anillo en una conformación que estabiliza la hélice de hebra triple.

Las propiedades características de cada tipo de colágeno se deben principalmente a diferencias en 1) el número y la longitud de los segmentos helicoidales triples de colágeno; 2) los segmentos que flanquean o interrumpen los segmentos de hélice triple y que se pliegan para formar otros tipos de estructuras tridimensionales y 3) la modificación covalente de las cadenas α (p. ej., hidroxilación, glucosilación, oxidación o el establecimiento de enlaces cruzados). Por ejemplo, las cadenas en el colágeno tipo IV, que es exclusivo de la lámina basal, se designan cadenas IVα. Los mamíferos presentan cadenas IVα homólogas, las cuales se ensamblan para formar



▲ Fig. 6-14. Triple hélice de colágeno. (a) (*Izquierda*) Vista lateral de la estructura cristalina de un fragmento polipeptídico cuya secuencia está basada en grupos repetitivos de tres aminoácidos, Gly-X-Y, característico de las cadenas de α colágeno. (*Centro*) Cada cadena se enrosca formado una hélice orientada hacia la izquierda, y tres cadenas se enrollan entre sí para formar una hélice triple orientada hacia la derecha. El modelo esquemático (*derecha*) ilustra claramente la naturaleza helicoidal triple de la estructura. (b) Vista vertical del eje de la hélice triple. Las cadenas laterales de protones de los residuos de glicina (naranja) apuntan hacia el interior del espacio extremadamente estrecho entre las cadenas polipeptídicas en el centro de la hélice triple. En las mutaciones del colágeno en las cuales otro aminoácido reemplaza la glicina, el protón de la glicina es reemplazado por grupos mayores que desorganizan el empaquetamiento de las cadenas y desestabilizan la estructura helicoidal triple. (Adaptado de R. Z. Kramer et al., 2001, J. Mol. Biol. 311(1):131.)



▲ Fig. 6-15. Estructura y ensamblaje del colágeno tipo IV. (a) Representación esquemática del colágeno tipo IV. Esta molécula de 400 nm de largo tiene un dominio globular pequeño no colagenoso en el extremo N-terminal y un gran dominio globular en el C-terminal. La hélice triple está interrumpida por segmentos no helicoidales que introducen angulaciones flexibles en la molécula. Las interacciones laterales entre los segmentos triple-helicoidales, al igual que las interacciones cabeza-cabeza y cola-cola entre los dominios globulares, forman dímeros, tetrámeros, y complejos de mayor orden, produciendo una red similar a una lámina. (b) Microfotografía electrónica del retículo de colágeno tipo IV formada in vitro. La apariencia de encaje resulta de la flexibilidad de la molécula, de las uniones de lado con lado entre los segmentos triple-helicoidales (flechas delgadas) y de las interacciones entre los dominios globulares C-terminal (flechas gruesas). [Parte (a) adaptada de A. Boutaud 2000, J. Biol. Chem. 275:30716. Parte (b) cortesía de P. Yurchenco; véase P. Yurchenco y G. C. Ruben, 1987, J. Cell Biol. 105:2559.]

una serie de colágenos tipo IV con distintas propiedades. Sin embargo, todos los subtipos de colágeno tipo IV forman una hélice triple de 400 nm de largo interrumpida alrededor de 24 veces por segmentos no helicoidales y flanqueada por dominios globulares grandes en el C-terminal de las cadenas y por dominios globulares más pequeños en el N-terminal. Las regiones no helicoidales dan flexibilidad a la molécula. A través de asociaciones laterales e interacciones que involucran los dominios globulares N-terminal y C-terminal, las moléculas de colágeno tipo IV se ensamblan para constituir una red fibrosa bidimensional irregular ramificada que forma el entramado sobre el cual se construye la lámina basal (fig. 6-15).

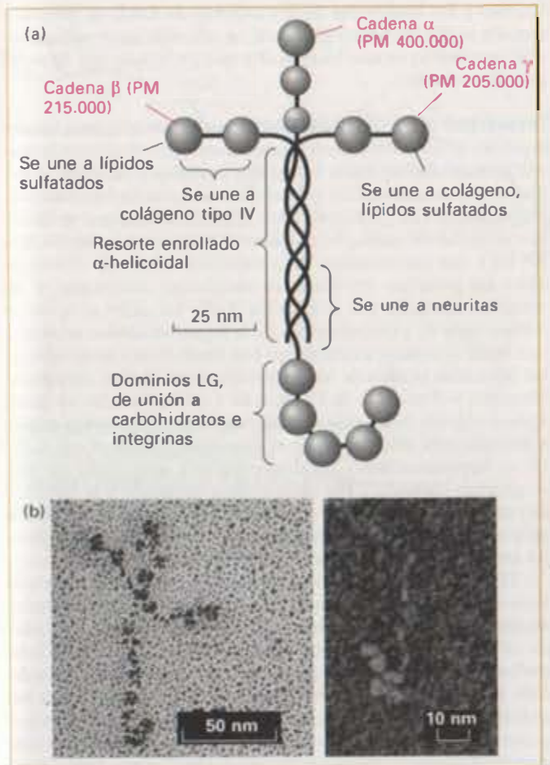
MEDICINA

En el riñón, una lámina basal doble, la membrana basal glomerular, separa el epitelio que reviste el espacio urinario del endotelio que reviste los capilares circundantes llenos de sangre. Los defectos en esta estructura, que es la responsable de la ultrafiltración de la sangre y de la formación urinaria inicial, pueden conducir a fallas renales. Por ejemplo, las mutaciones que alteran el dominio C-terminal globular de ciertas cadenas IVα se asocian con insuficiencia renal progresiva, al igual que con la pérdida de audición sensorioneural y anormalidades oculares, un trastorno conocido como *síndrome de Alport*. En el *síndrome de Goodpasture*, una enfermedad autoinmune bastante rara, en la cual el organismo se ataca a sí mismo, o se "autoataca", los anticuerpos se unen a las cadenas α3 del colágeno tipo IV halladas en la membrana basal glomerular y en los pulmones. Esta unión dispara una respuesta inmune que provoca daño celular, que se traduce en insuficiencia renal progresiva y hemorragia pulmonar. ▮

La laminina, una proteína multiadhesiva de la matriz, ayuda a establecer enlaces cruzados entre los componentes de la lámina basal

Las proteínas multiadhesivas de la matriz son moléculas largas y flexibles que contienen múltiples dominios responsables de la unión a diversos tipos de colágeno, otras proteínas de la matriz, polisacáridos, receptores de adhesión de la superficie celular y moléculas señalizadoras extracelulares (p. ej., factores de crecimiento y hormonas). Estas proteínas son importantes para organizar los otros componentes de la matriz extracelular y para regular la adhesión entre célula y matriz, la migración celular y la forma celular en los tejidos epitelial y no epitelial.

La laminina, la principal proteína multiadhesiva de la matriz de la lámina basal, es una proteína heterotrimérica con forma de cruz con un peso molecular total de 820.000 (fig. 6-16). Se idenficaron muchas isoformas de laminina que contienen cadenas polipeptídicas levemente diferentes. Los *dominios LG* globulares en el C-terminal de la subunidad α de la laminina median la unión dependiente del Ca^{2+} a carbohidratos específicos sobre ciertas moléculas de la superficie celular, como el sindecano y el dextroglucano. Los dominios LG se encuentran en una amplia variedad de proteínas y pueden mediar la unión a esteroides y proteínas al igual que a carbohidratos. Por ejemplo, los dominios LG en la cadena α de la laminina pueden mediar la unión a ciertas integrinas, incluida la integrina α6β4 sobre células epiteliales.

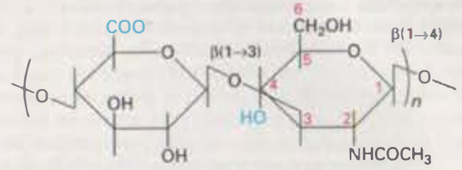


▲ Fig. 6-16. La laminina, una proteína multiadhesiva de la matriz que se encuentra en toda lámina basal. (a) Modelo esquemático que muestra la forma general, ubicación de los dominios globulares y la región de resorte enrollado en la que las tres cadenas de la laminina están unidas en forma covalente a través de varios enlaces disulfuro. Diferentes regiones de laminina unida a receptores de la superficie celular y a varios componentes de la matriz. (b) Microfotografía electrónica de una molécula de laminina intacta, que muestra su apariencia de cruz característica (*izquierda*) y los dominios de unión a carbohidratos LG cerca del C-terminal (*derecha*). [Parte (a) adaptada de G. R. Martin y R. Timpl, 1987, Ann. Rev. Cell Biol. 3:57 y K. Yamada, 1991, J. Biol. Chem. 266:12809. Parte (b) de R. Timpl et al., 2000, Matrix Biol. 19:309; fotografía de la derecha cortesía de Jürgen Engel.]

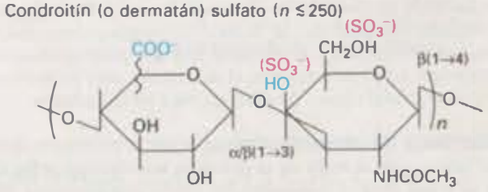
Los proteoglucanos secretados y los de la superficie celular son expresados por muchos tipos de célula

Los proteoglucanos son un subgrupo de glucoproteínas que contienen cadenas de polisacáridos unidas en forma covalente llamadas glucosaminoglucanos (GAG), que son largos polímeros lineales de disacáridos específicos repetidos. Usualmente, un azúcar es o un ácido urónico (ácido D-glucurónico o ácido L-idurónico) o D-galactosa; el otro azúcar es la *N*-acetilglucosamina o *N*-acetilgalactosamina (fig. 6-17). Uno o ambos azúcares contienen al menos un grupo aniónico (carboxilato o sulfato). Por ende, cada cadena de GAG contiene muchas cargas negativas. Los GAG se clasifican en muchos ti-

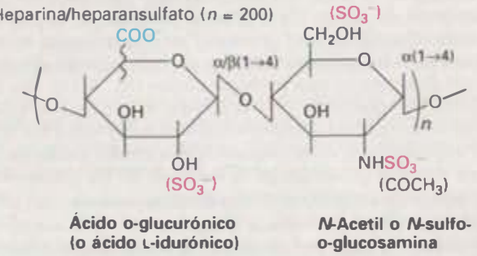
(a) Hialuronano ($n \leq 25.000$)



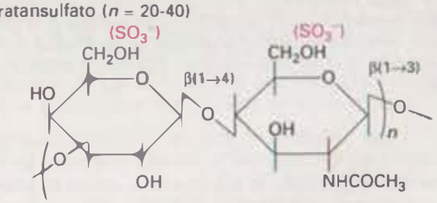
(b) Condroitín (o dermatán) sulfato ($n \leq 250$)



(c) Heparina/heparansulfato ($n \approx 200$)



(d) Queratansulfato (n = 20-40)

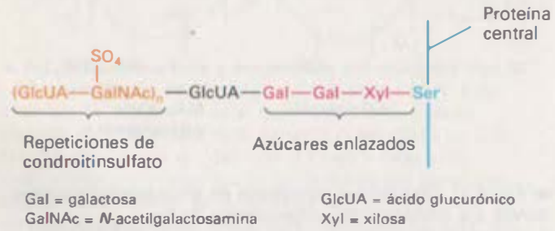


▲ Fig. 6-17. Disacáridos repetitivos de glucosaminoglucanos (GAG), los componentes polisacáridos de los proteoglucanos. Cada una de las cuatro clases de GAG está formada por polimerización de las unidades de monómeros repetidos de un disacárido en particular y de subsecuentes modificaciones, incluidas la adición de grupos sulfato e inversiones (epimerización) del grupo carboxilo sobre el carbono 5 del ácido D-glucurónico para producir ácido L-idurónico. La heparina se genera por hipersulfatación del heparansulfato, mientras que el hialuronano no está sulfatado. Se muestra el número (n) de disacáridos que se suele hallar en cada cadena de glucosaminoglucano. Las líneas representan enlaces covalentes orientados ya sea hacia arriba (ácido D-glucurónico) o hacia abajo (ácido L-idurónico) del anillo.

pos principales basados en la naturaleza de la unidad disacárido repetida: heparansulfato, condroitinsulfato, dermantansulfato, queratansulfato y el hialuronano. Una forma hipersulfatada del heparansulfato denominada heparina, producida principalmente por los mastocitos cumple un papel clave en las reacciones alérgicas. También se utiliza en medicina como anticoagulante por su capacidad para activar un inhibidor natural de la coagulación denominado antitrombina III.

Como veremos en otros capítulos, vías señalizadoras complejas dirigen la emergencia de diversos tipos de células en el lugar y el tiempo apropiados durante el desarrollo embrionario normal. La generación y el análisis de mutantes con defectos en la producción de proteoglucanos en *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), *C. elegans* (nematodo) y ratones, mostraron con claridad que los proteoglucanos desempeñan un papel crítico en el desarrollo, más probablemente como moduladores de diversas vías señalizadoras.

Biosíntesis de proteoglucanos. Con la excepción del hialuronano, que se trata en la próxima sección, todas los GAG principales surgen naturalmente como componentes de los proteoglucanos. Al igual que otras glucoproteínas secretadas y transmembrana, el núcleo de proteínas de los proteoglucanos se sintetiza sobre el retículo endoplasmático (cap. 16). Las cadenas de GAG se ensamblan sobre estos núcleos en el complejo de Golgi. Para generar cadenas de heparán o de condroitinsulfato, un "conector" de tres azúcares se adhiere primero a las cadenas laterales de hidroxilo de ciertos residuos de serina en una proteína núcleo (fig. 6-18). Por el contrario, los conectores para la adición de cadenas de queratansulfato son cadenas de oligosacáridos adheridas a los residuos de asparaginina; estos oligosacáridos unidos mediante un enlace N están presentes en la mayoría de las glucoproteínas, aunque sólo un subgrupo transporta las cadenas de GAG. Todas las cadenas de GAG se elongan por la adición alternada de monómeros de azúcar para formar las repeticiones de disacáridos características de un GAG particular; las cadenas son luego modificadas mediante uniones covalentes de moléculas pequeñas como el sulfato. Los mecanismos responsables para determinar cuáles proteínas se modifican con GAG, la secuencia de disacáridos por ser añadida, los sitios por ser sulfatados y las longitudes de las cadenas de GAG se desconocen. En todos los proteoglucanos, la relación entre polisacáridos y proteínas es mucho más alta que en la mayoría de otras glucoproteínas.

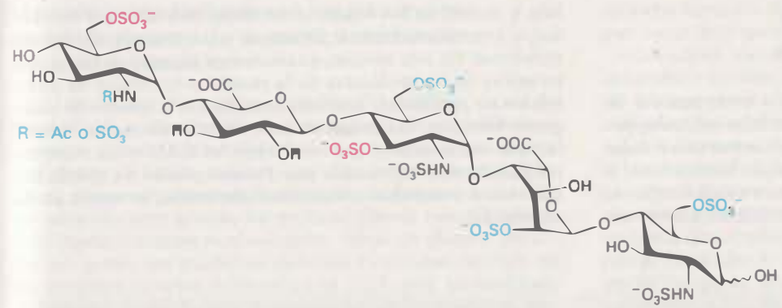


▲ Fig. 6-18. Biosíntesis de heparán y de las cadenas de condroitinsulfato de los proteoglucanos. La síntesis de una cadena de condroitinsulfato (aquí mostrada) se inicia por la transferencia de un residuo de xilosa a un residuo de serina en la proteína central, más probablemente en el complejo de Golgi, seguido por la adición secuencial de dos residuos de galactosa. Luego el ácido glucurónico y los residuos de *N*-acetilgalactosamina se añaden secuencialmente a estos azúcares enlazados y forman la cadena de condroitinsulfato. Las cadenas de heparanulfato se conectan a las proteínas centrales por el mismo trisacárido conector.

Diversidad de proteoglucanos. Los proteoglucanos constituyen un grupo muy diverso de moléculas abundantes en la matriz extracelular de todos los tejidos animales y también se expresan sobre la superficie celular. Por ejemplo, de las cinco clases principales de proteoglucanos heparansulfato, tres se localizan en la matriz extracelular (perlecano, agrina y colágeno tipo XVIII) y dos son proteínas de la superficie celular. El último incluye las proteínas integrales de membrana (sindecano) y las proteínas ancladas por glupicanos (GPI); las cadenas GAG en ambos tipos de proteoglucanos de la superfice celular se extienden hacia el espacio extracelular. Las secuencias y longitudes de las proteínas núcleo de los proteoglucanos varían considerablemente y el número de cadenas de GAG adheridas va desde apenas algunos hasta más de 100. Además, una proteína núcleo a menudo está unida a dos tipos diferentes de cadenas de GAG (p. ej. heparansulfato y condroitinsulfato), generando un proteoglucano "híbrido". Por ende, el peso molecular y la densidad de carga de una población de proteoglucanos puede expresarse sólo como un promedio; la composición y secuencia de moléculas individuales pueden diferir en forma considerable.

El perlecano, el principal proteoglucano secretado en la lámina basal, consta de una gran proteína nuclear multidominio (≈400 kDa) con tres o cuatro cadenas especializadas de GAG. Tanto la proteína como los componentes GAG del perlecano contribuyen a su capacidad para incorporarse y definir la estructura y función de la lámina basal. Debido a sus múltiples dominios con propiedades de unión distintivas, el perlecano puede establecer enlaces cruzados no sólo entre uno y otro componente de la matriz extracelular, sino también entre ciertas moléculas de la superficie celular y los componentes de la matriz extracelular.

Los sindecanos son expresados por células epiteliales y muchos otros tipos de células. Estos proteoglucanos de la superficie celular se unen a los colágenos y a las proteínas multiadhesivas de la matriz, como las fibronectinas, que se analizan en la sección 6.4. De esta manera, los proteoglucanos pueden anclar células a la matriz extracelular. Al igual que muchas proteínas integrales de membrana, el dominio citosólico de los sindecanos interactúa con el citoesqueleto de actina y en algunos casos con moléculas reguladoras intracelulares. Además, los proteoglucanos de la superficie celular unen muchos factores de crecimiento proteicos y otras moléculas señalizadoras externas, ayudando así a regular el metabolismo y las funciones celulares. Por ejemplo, en la región del hipotálamo del cerebro, los sindecanos modulan el comportamiento alimentario en respuesta a deprivación de comida (estado de ayuno). Realizan esto al intervenir en la unión de los péptidos antisaciedad con los receptores de la superficie celular que ayudan a controlar el comportamiento alimentario. En el indviduo que se alimentó, el dominio extracelular de los sindecanos con cadenas de heparansulfato se libera de la superficie mediante proteólisis, suprimiendo así la actividad de los péptidos antisaciedad y el comportamiento alimentario. En los ratones modificados genéticamente para expresar exageradamente el gen del sindecano-1 en la región del hipotálamo del cerebro y en otros tejidos, el control normal de la alimentación por péptidos antisaciedad se desequilibra, los animales comen en exceso y se vuelven obesos. En el capítulo 14 se describen otros ejemplos de proteoglucanos que interactúan con moléculas de señalización externa.



◀ Fig. 6-19. Secuencia de pentasacáridos de GAG que regula la actividad de la antitrombina III (ATIII). Grupos de secuencias modificadas de cinco residuos en la heparina con la composición mostrada aquí se unen a la ATIII y la activan, inhibiendo así la coagulación de la sangre. Los grupos sulfato en rojo son esenciales para esta función de la heparina; las modificaciones en azul pueden estar presentes, pero no son esenciales. Se piensa que otros grupos de secuencias GAG modificadas regulan la actividad de otras proteínas diana. (Cortesía de Robert Rosenberg y Balagurunathan Kuberan.)

Las modificaciones en las cadenas de glucosaminoglucanos (GAG) pueden determinar las funciones de los proteoglucanos

Como sucede con la secuencia de aminoácidos en las proteínas, la disposición de los residuos de azúcar en las cadenas de GAG y la modificación de azúcares específicos (p. ej., la adición de sulfato) en las cadenas pueden determinar su función y la de los proteoglucanos que contiene. Por ejemplo, los agrupamientos de ciertos azúcares modificados en las cadenas de GAG de los proteoglucanos de heparansulfato pueden controlar la unión de factores del crecimiento a ciertos receptores, las actividades de las proteínas en la cascada de coagulación de la sangre y la actividad de la lipoproteinlipasa, una enzima asociada con la membrana que hidroliza triglicéridos a ácidos grasos (cap. 18).

Durante muchos años, la complejidad química y estructural de los proteoglucanos representó una barrera desalentadora para el análisis de sus estructuras y el conocimiento de sus múltiples funciones. En los últimos años mediante las técnicas clásicas y las nuevas técnicas bioquímicas (p. ej., cromatografía líquida de alta presión), espectrometría de masa y genética, los investigadores han comenzado a dilucidar las estructuras y funciones detalladas de estas moléculas omnipresentes de la matriz extracelular. Los resultados de estudios en curso indican que grupos de secuencias de residuos azucarados que contienen algunas modificaciones en común, más que una única secuencia exclusiva, son los responsables de especificar distintas funciones de los GAG. Un caso puntual es un conjunto de secuencias de cinco residuos (pentasacárido) hallado en un subgrupo de GAG de heparinas que controlan la actividad de la antitrombina III (ATIII), un inhibidor de la trombina, la proteasa clave de la coagulación de la sangre. Cuando estas secuencias de pentasacáridos en la heparina son sulfatadas en dos posiciones específicas, la heparina puede activar la ATIII, inhibiendo la formación del coágulo (fig. 6-19). Muchos otros sulfatos pueden estar presentes en el pentasacárido activo en diversas combinaciones, pero no son esenciales para la actividad anticoagulante de la heparina. Aún no se conoce la razón fundamental por la cual se generan conjuntos de secuencias activas similares en lugar de una secuencia única, ni los mecanismos que controlan las vías biosintéticas de los GAG que permiten la generación de esas secuencias activas.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 6.3

La matriz extracelular de las láminas epiteliales

- La lámina basal, un fino entramado de moléculas de la matriz extracelular, separa la mayor parte del epitelio y otros grupos organizados de células del tejido conectivo adyacente. Juntas, la lámina basal y la lámina reticular de colágeno forman una estructura denominada membrana basal.
- Cuatro proteínas de la matriz extracelular se encuentran en todas las láminas basales (véase fig. 6-13); el colágeno tipo IV, la laminina (una proteína multiadhesiva de la matriz), la entactina (nidógeno) y el perlecano (un proteoglucano).
- Los receptores de adhesión de la superficie celular (p. ej. la integrina α6β4 en los hemidesmosomas) anclan la célula a la lámina basal, que a su vez está conectada a otros componentes de la matriz extracelular (véase fig. 6-1).
- Secuencias repetitivas de Gly-X-Y dan origen a la estructura de hélice triple del colágeno (véase fig. 6-14). Se distinguen los diferentes colágenos por la longitud y las modificaciones químicas de sus cadenas α y por los segmentos que interrumpen o flanquean sus regiones de hélice triple.
- Las grandes moléculas flexibles de colágeno, tipo IV interactúan de extremo a extremo y lateralmente para formar un armazón parecido a una malla al cual se pueden unir otros componentes de la matriz extracelular y receptores de adhesión (véase fig. 6-15).
- La laminina y otras proteínas multiadhesivas de la matriz son moléculas multidominio que unen múltiples receptores de adhesión y componentes de la matriz extracelular.
- Los proteoglucanos consisten en un núcleo proteico, asociado a la membrana o secretado, unido en forma covalente a una o más cadenas de glucosaminoglucanos (GAG), que son polímeros lineales de disacáridos sulfatados.
- El perlecano, un gran proteoglucano secretado presente principalmente en la lámina basal, une muchos componentes de la matriz extracelular y receptores de adhesión.
- Los proteoglucanos de la superficie celular, como los sindecanos, facilitan las interacciones entre célula y matriz y ayudan a presentar ciertas moléculas de señalización externa a sus receptores de la superficie celular.

6.4 La matriz extracelular de los tejidos no epiteliales

Hemos visto cómo las diversas CAM y los receptores de adhesión participan en el ensamblaje de células animales para formar láminas epiteliales que descansan sobre una estructura bien definida de la matriz extracelular, la lámina basal y se adhieren a ella. Las mismas moléculas, u otras similares, median y controlan las interacciones entre células o entre célula y matriz en los tejidos conectivos, musculares y nerviosos, y entre las células de la sangre y las vesículas de los alrededores. En esta sección, examinamos algunas de las características de las moléculas de la matriz extracelular de estos tejidos no epiteliales. También describimos la síntesis de colágenos fibrilares, las proteínas más abundantes en los animales. Las interacciones que involucran las CAM y los receptores de adhesión expresados por diversas células no epiteliales, que sirven a numerosas funciones distintivas, se tratan en la sección 6.5.

CUADRO 6-1 Colágenos seleccionados

Tipo	Composición molecular	Características estructurales	Tejidos representativos
COLÁGENO FIBRILAR			
I	$[\alpha1(I)]_2[\alpha2(I)]$	Fibrillas de 300 nm de largo	Piel, tendones, huesos, ligamentos, dentina, tejidos intersticiales
II	$[\alpha1(II)]_3$	Fibrillas de 300 nm de largo	Cartílago, humor vítreo
III	$[\alpha1(III)]_3$	Fibrillas de 300 nm de largo; a menudo con el tipo I	Piel, músculo, vasos sanguíneos
V	$[\alpha1(V)_2\alpha2(V)]$, $[\alpha1(V)_3]$	Fibrillas de 390 nm de largo con extensión globular en el extremo N-terminal; a menudo con el tipo I	Córnea, dientes, huesos, placenta, piel, músculo liso
COLÁGENO ASOCIADO CON FIBRILLAS			
VI	$[\alpha1(VI)][\alpha2(VI)]$	Asociación lateral con el tipo I; dominios globulares periódicos	La mayoría de los tejidos intersticiales
IX	$[\alpha1(IX)][\alpha2(IX)][\alpha3(IX)]$	Asociación lateral con el tipo II; dominios globulares N-terminal; unido a GAG	Cartílagos, humor vítreo
COLÁGENO DE ANCLAJE Y FORMADOR DE LÁMINAS			
IV	$[\alpha1(IV)]_2[\alpha2(IV)]$	Retículo bidimensional	Toda la lámina basal
VII	$[\alpha1(VII)]_3$	Fibrillas largas	Debajo de la lámina basal de la piel
XV	$[\alpha1(XV)]_3$	Proteína central del proteoglucano condroitinsulfato	Ampliamente difundido; cerca de la lámina basal de los músculos
COLÁGENO TRANSMEMBRANA			
XIII	$[\alpha1(XIII)]_3$	Proteína integral de membrana	Hemidesmosomas de la piel
XVII	$[\alpha1(XVII)]_3$	Proteína integral de membrana	Hemidesmosomas de la piel
COLÁGENO DE DEFENSA CONTRA HUÉSPEDES			
Colectinas		Oligómeros de hélice triple; dominios de lectina	Sangre, espacio alveolar
C1q		Oligómeros de hélice triple	Sangre (complemento)
Receptores recolectores (scavenger) clase A		Proteína de membrana homotrimérica	Macrófagos

FUENTES: K. Kuhn, 1987, in R. Mayne y R. Burgeson, eds., Structure an Function of Collagen Types, *Academic Press*, p. 2 y M. van der Rest y R. Garrone, 1991, *FASEB J.* 5:2814.

Los colágenos fibrilares son las principales proteínas fibrosas de la matriz extracelular del tejido conectivo

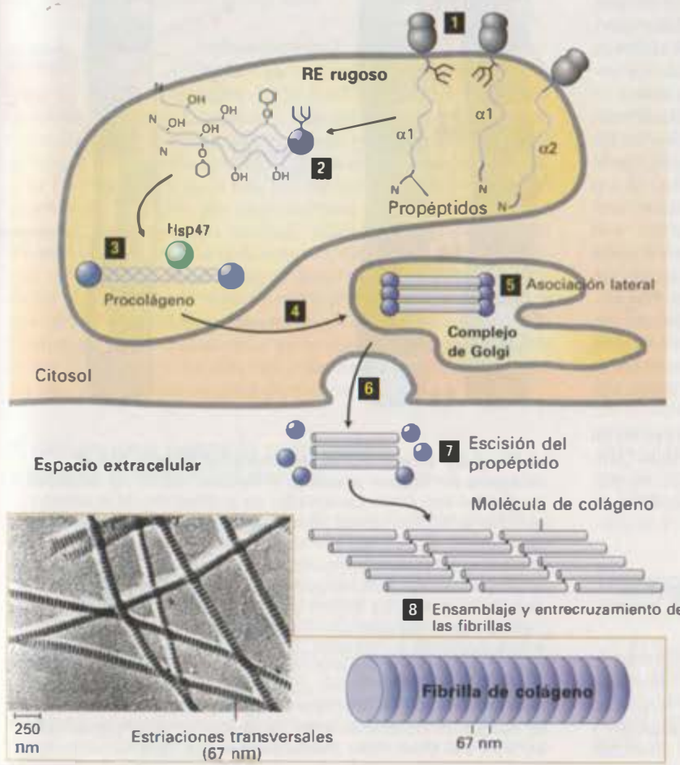
El tejido conectivo, como el tendón y el cartílago, difiere de otros tejidos sólidos en que la mayor parte de su volumen se compone de matriz extracelular más que de células. Esta matriz está repleta de fibras proteicas insolubles y contiene proteoglucanos, diversas proteínas multiadhesivas y hialuronano, un GAG no sulfatado muy grande. La proteína fibrosa más abundante en el tejido conectivo es el colágeno. Fibras de elastina parecidas a la goma, que pueden ser estiradas y relajadas, también están presentes en sitios deformables (p. ej., la piel, los tendones, el corazón). Como se verá más adelante, las fibronectinas, una familia de proteínas multiadhesivas de la matriz, forman sus propias fibrillas distintivas en la matriz de algunos tejidos conectivos. Aunque hay muchos tipos de células en los tejidos conectivos, los diversos componentes de la matriz extracelular son producidos en gran medida por células llamadas fibroblastos.

Alrededor del 80-90% del colágeno corporal está compuesto de colágenos de tipo I, II y III, ubicados principalmente en el tejido conectivo. Debido a esta abundancia en los tejidos ricos en tendones como la cola de la rata, el colágeno tipo I es fácil de aislar y fue el primero en ser caracterizado. Su unidad estructural fundamental es una hélice triple larga (300 nm), delgada (1,5 nm de diámetro) que consta de dos cadenas α1(I) y una cadena α2(I), cada una de exactamente 1.050 aminoácidos de longitud (véase fig. 6-14). Las moléculas de tres hebras se asocian para formar polímeros de orden más alto llamados *fibrillas*, que a su vez se agrupan para formar haces más grandes denominadas *fibras* de colágeno.

Las clases menores de colágenos incluyen los *colágenos asociados a fibrillas*, que conectan los colágenos fibrilares entre sí o con otros componentes de la matriz extracelular; los *colágenos formadores de láminas y de anclaje*, que forman redes bidimensionales en la lámina basal (tipo IV) y conectan la lámina basal de la piel a los tejidos conectivos subyacentes (tipo VII); los *colágenos transmembrana*, que funcionan como receptores de adhesión; y los *colágenos de defensa del huésped*, que ayudan al cuerpo a reconocer y eliminar patógenos. El cuadro 6-1 especifica ejemplos de las diversas clases de colágeno. Una observación interesante es que varios colágenos (p. ej., los tipos XVIII y XV) funcionan como proteínas centrales de los proteoglucanos.

La formación de las fibrillas de colágeno comienza en el retículo endoplasmático y se completa fuera de la célula

La biosíntesis y la secreción del colágeno siguen la vía normal para una proteína secretada, que se detalla en los capítulos 16 y 17. Las cadenas α de colágeno son sintetizadas como precursores más largos, llamados cadenas pro-α, en ribosomas adheridos al retículo endoplasmático (ER). Las cadenas pro-α atraviesan una serie de modificaciones covalentes y se pliegan para formar moléculas de *procolágeno* de hélice triples antes de ser liberadas desde las células (fig. 6-20).



◀ Fig. 6-20. Principales eventos en la biosíntesis de colágeno fibrilar. Paso **1**: Las cadenas de procolágeno se sintetizan sobre los ribosomas asociados con la membrana del retículo endoplasmático (RE) y los oligosacáridos unidos por asparagina se añaden al péptido C-terminal. Paso **2**: Los propéptidos se asocian para formar trímeros y están unidos covalentemente por enlaces disulfuro, y algunos residuos selectos en tripletes repetidos Gly-X-Y son modificados en forma covalente (ciertas prolinas y lisinas son hidroxilatadas, la galactosa [Gal] o galactosa-glucosa [hexágonos] se adhiere a algunas hidroxilisinas, las prolinas son isomerizadas cis-→trans). Paso **3**: Las modificaciones facilitan una formación parecida a la de un cierre de cremallera, la estabilización de hélices triples y la unión por la proteína chaperona Hsp47 (Cap. 16), que puede estabilizar las hélices, evitar la agregación prematura de los trímeros o ambas. Pasos **4** y **5**: Los procolágenos plegados son transportados al aparato de Golgi y a través de él, donde tienen lugar algunas asociaciones laterales para formar haces pequeños. Luego las cadenas son secretadas (paso **6**), los propéptidos N-terminal y C-terminal son eliminados (paso **7** y los trímeros se ensamblan para formar fibrillas unidas mediante enlaces covalentes cruzados (paso **8**). El escalonamiento de 67 nm de los trímeros confiere a las fibrillas un aspecto estriado en las microfotografías electrónicas (*recuadro*). (Adaptado de A. V. Persikov y B. Brodsky, 2002, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 99(3):1101-1103.)

Luego de la secreción del procolágeno de la célula, la peptidasa extracelular (es decir, la proteína-1 morfogenética ósea) elimina los péptidos N-terminal y C-terminal. Con respecto a los colágenos fibrilares, las moléculas resultantes, que consisten casi enteramente en una hélice de triple hebra, se asocian lateralmente para generar fibrillas con un diámetro de 50-200 nm. En las fibrillas, las moléculas adyacentes de colágeno están separadas por 67 nm, cerca de un cuarto de su longitud. Esta disposición escalonada produce un efecto estriado que puede verse en las microfotografías electrónicas de las fibrillas de colágeno (véase fig. 6-20, *recuadro*). Las propiedades únicas de los colágenos fibrosos (es decir, los tipos I, II, III) se deben principalmente a la formación de fibrillas.

Los segmentos cortos que no son triple hélice en ambos extremos de la cadena α de colágeno son de particular importancia en la formación de las fibrillas de colágeno. Las cadenas laterales de lisina y de hidroxilisina de estos segmentos son modificadas en forma covalente por lisil oxidasas extracelulares para formar aldehídos en lugar del grupo amino en el extremo de la cadena lateral. Estos grupos aldheídos reactivos forman enlaces cruzados covalentes con los residuos de lisina, hidroxilisina e histidina en moléculas adyacentes. Estos entrecruzamientos estabilizan el empaquetamiento lado a lado de las moléculas de colágeno y generan una fibrilla fuerte. La eliminación de los propéptidos y de los enlaces cruzados covalentes tiene lugar en el espacio extracelular para prevenir el ensamblaje potencialmente catastrófico de fibrillas dentro de la célula.

MEDICINA

Las modificaciones postraduccionales de las cadenas pro-α son cruciales para la formación de moléculas maduras de colágeno y su ensamblaje para formar fibrillas. Los defectos en estas modificaciones acarrean serias consecuencias, como experimentaron a menudo los antiguos marinos. Por ejemplo, el ácido ascórbico (vitamina C) es un cofactor esencial para la hidroxilasa responsable de añadir grupos hidroxilo a los residuos de prolina y lisina en las cadenas pro-α. En las células desprovistas de ascorbato, como en la enfermedad denominada *escorbuto*, las cadenas pro-α no están suficientemente hidroxiladas para formar procolágeno de hélice triple a temperatura corporal normal y el procolágeno que se forma no se puede agrupar para formar fibrillas normales. Sin el soporte estructural del colágeno, los vasos sanguíneos, los tendones y la piel se vuelven frágiles. Debido a que la fruta fresca en la dieta puede abastecer suficiente vitamina C para mantener la formación de colágeno normal, se proveían limas a los antiguos navegantes británicos para evitar el escorbuto, haciendo que se los conociera como "limeros".

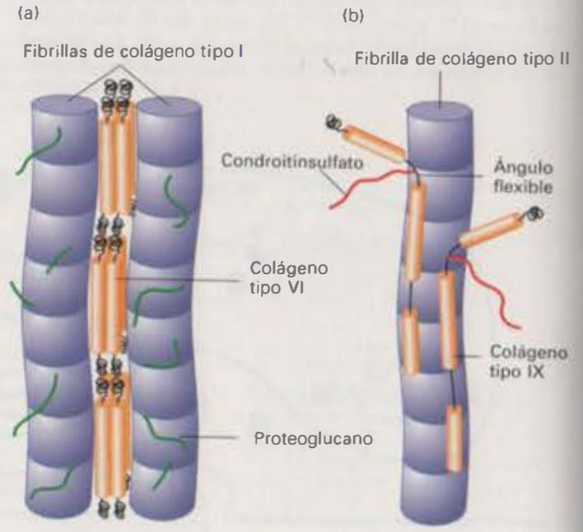
Mutaciones raras en los genes de lisil hidroxilasa provocan el síndrome de Bruck y una forma del síndrome de Ehlers-Danlos. Ambos trastornos están marcados por defectos en los tejidos conectivos, aunque sus síntomas clínicos difieren. ▮

Los colágenos tipos I y II forman diversas estructuras y se asocian con distintos colágenos no fibrilares

Los colágenos difieren en su capacidad para formar fibras y para organizar las fibras de manera tal de constituir retículos. En los tendones, por ejemplo, fibrillas largas de colágeno tipo I se agrupan lado a lado en haces paralelos y forman fibras gruesas de colágeno. Los tendones conectan los músculos a los huesos y deben soportar fuerzas enormes. Debido a que las fibras de colágeno tipo I tienen mayor fuerza extensible, los tendones pueden ser estirados sin romperse. Es más, gramo a gramo, el colágeno tipo I es más fuerte que el acero. Dos colágenos fibrilares cuantitativamente menores, el tipo V y el tipo XI, se agrupan junto con el colágeno tipo I para formar fibras, regulando así las estructuras y propiedades de las fibras. La incorporación del colágeno tipo V, por ejemplo, produce fibras de menor diámetro.

Las fibrillas de colágeno tipo I también se utilizan como barras de refuerzo en la construcción de los huesos. Los huesos y los dientes son duros y fuertes porque contienen grandes cantidades de carbonato de hidroxiapatita, un mineral cristalino que contiene calcio y fosfato. La mayoría de los huesos contienen un 70% de minerales y un 30% de proteínas, la mayor parte de las cuales es colágeno tipo I. Los huesos se forman cuando ciertas células (condrocitos y osteoblastos) secretan fibrillas de colágeno que luego son mineralizadas por deposición de cristales pequeños de carbonato de hidroxiapatita.

En muchos tejidos conectivos, el colágeno tipo VI y los proteoglucanos se unen en forma no covalente a los lados de las fibrillas tipo I y pueden unir las fibras entre sí para formar fibras de colágeno más gruesas (fig. 6-21a). El colágeno tipo VI es poco común en el sentido de que la molécula se



▲ **Fig. 6-21. Interacciones del colágeno fibroso con el colágeno no fibroso asociado a fibrillas.** (a) En los tendones, las fibrillas tipo I están orientadas en la dirección de la tensión aplicada al tendón. Los proteoglucanos y el colágeno tipo VI se unen en forma no covalente a las fibrillas, recubriendo la superficie. Las microfibrillas de colágeno tipo VI, que contienen segmentos globulares helicoidales triple, se ligan a las fibrillas tipo I y las unen para formar fibras más gruesas. (b) En el cartílago, las moléculas de colágeno tipo IX están unidas en forma covalente a intervalos regulares a lo largo de las fibrillas tipo II. Una cadena de condroitinsulfato, unida en forma covalente a la cadena α2(IX) en el ángulo flexible, se proyecta hacia afuera desde la fibrilla, como lo hace la región globular N-terminal. [Parte (a), véase R. R. Bruns et al., 1986. J. Cell Biol. 103:393. Parte (b), véase L. M. Shaw y B. Olson, 1991, Trends. Biochem. Sci. 18:191.]

compone de hélices triples relativamente cortas con dominios globulares en ambos extremos. La asociación lateral de dos monómeros de tipo VI genera un dímero "antiparalelo". La asociación extremo con extremo de estos dímeros a través de sus dominios globulares forma las "microfibrillas" tipo VI. Estas microfibrillas tienen el aspecto de cuentas en una cuerda, con regiones de hélice triple de cerca de 60 nm de largo separadas por dominios globulares de 40 nm de largo.

Las fibrillas de colágeno tipo II, el colágeno principal en el cartílago, son más pequeñas en diámetro que las de tipo I y están orientadas al azar en una matriz viscosa de proteoglucanos. Las fibrillas rígidas de colágeno imparten fuerza y compresibilidad a la matriz y les permite resistir grandes deformaciones. Esta propiedad les permite a las uniones absorber contusiones. Las fibrillas tipo II están unidas a los proteoglucanos de la matriz mediante enlaces cruzados de colágeno tipo IX, otro colágeno asociado con las fibrillas. El colágeno tipo IX y diversos tipos relacionados tienen dos o tres segmentos helicoidales triples conectados por angulaciones flexibles y por un segmento globular N-terminal (fig. 6-22b). El segmento globular N-terminal del colágeno tipo IX se extiende desde las fibrillas en el extremo de uno de sus segmentos helicoidales, como lo hace una cadena de GAG que a veces está unida a una de las cadenas de tipo IX. Se cree que estas estructuras no helicoidales que protruyen anclan las fibrillas de tipo II a los proteoglucanos y a otros componentes de la matriz. La estructura de hélice triple interrumpida del tipo IX y los colágenos relacionados evitan que se agrupen para formar fibrillas, aunque pueden asociarse con las fibrillas formadas por otros tipos de colágeno y formar enlaces cruzados covalentes sobre ellas.

MEDICINA

Ciertas mutaciones en los genes que codifican las cadenas de colágeno α1(I) o α2(I), que forman el colágeno tipo I, causan la *osteogénesis imperfecta*, o enfermedad de huesos quebradizos. Como para que la hélice triple se forme, es necesario que en cada tercera posición en una cadena de colágeno α haya una glicina (véase fig. 6-14), las mutaciones de la glicina por casi cualquier otro aminoácido son perjudiciales y dan como resultado hélices mal formadas e inestables. Una sola cadena α defectuosa, de las tres de una molécula de colágeno, puede destruir toda la estructura triple helicoidal de la molécula y su funcionamiento. Una mutación en una única copia (alelo) ya sea en el gen α1(I) o en el gen α2(I), localizadas sobre cromosomas no sexuales (autosomas), puede causar el trastorno. Por ello, esta enfermedad presenta casi siempre una herencia autosómica dominante (cap. 9). ▮

El hialuronano resiste la compresión y facilita la migración celular

El hialuronano, también llamado ácido hialurónico (HA) o hialuronano, es un GAG no sulfatado sintetizado por una enzima unida a la membrana plasmática (HA sintasa) como una repetición de disacáridos compuestos de ácido glucurónico y de *N*-acetilglucosamina (véase fig. 6-17a) y es secretado directamente al espacio extracelular. Es un componente principal de la matriz extracelular que rodea las células en migración y proliferación, en especial en los tejidos embrionarios. Además, como se describirá enseguida, el hialuronano forma la columna vertebral de agrupaciones de proteoglucanos complejas halladas en muchas matrices extracelulares, sobre todo en el cartílago. Debido a sus propiedades físicas destacadas, el hialuronano imparte rigidez y elasticidad, así como una cualidad lubricante a muchos tipos de tejidos conectivos, como las articulaciones.

Las moléculas de hialuronano varían en longitud desde algunas repeticiones de disacáridos hasta cerca de 25.000. El hialuronano típico en las articulaciones, como el codo, tiene 10.000 repeticiones para una masa total de 4×10^6 Da y una longitud de 10 μm (alrededor del diámetro de una célula pequeña). Los segmentos individuales de una molécula de hialuronano se pliegan para adquirir una conformación semejante a un bastón debido a las uniones β glucosídicas entre los azúcares y a la extensión de los enlaces de hidrógeno. La repulsión mutua entre los grupos carboxilato cargados negativamente que se proyectan hacia afuera a intervalos regulares también contribuye a estas estructuras rígidas locales. Sin embargo, globalmente el hialuronano no es un bastón largo y rígido como el colágeno fibrilar; más bien, en solución es muy flexible, curvándose y retorciéndose en diferentes conformaciones, para formar un enrollamiento aleatorio.

Debido al gran número de residuos aniónicos sobre su superficie, la molécula de hialuronano típica se une a grandes cantidades de agua y se comporta como si fuera una gran esfera hidratada con un diámetro de alrededor de 500 nm. A medida que la concentración de hialuronano aumenta, las cadenas largas comienzan a enredarse y forman un gel viscoso. Aun en concentraciones bajas, el hialuronano forma un gel hidratado; cuando se lo coloca en un espacio confinado, como en la matriz entre dos células, las moléculas largas de hialuronano tenderán a empujar hacia afuera. Este empuje crea un aumento de volumen, o *presión de turgencia*, dentro del espacio extracelular. Además, la unión de cationes por grupos COO^- sobre la superficie del hialuronano incrementa la concentración de iones y por ende la presión osmótica en el gel. Como resultado, grandes cantidades de agua son tomadas dentro de la matriz y contribuyen a la presión de turgencia. Estas fuerzas de turgencia les confieren a los tejidos conectivos su capacidad para resistir las fuerzas de compresión, a diferencia de las fibras de colágeno, que son capaces de resistir fuerzas de estiramiento.

El hialuronano está unido a la superficie de muchas células migratorias por numerosos receptores de adhesión (p. ej., uno denominado CD44) que contiene dominios de unión HA, cada uno con una conformación tridimensional similar. Debido a su naturaleza porosa, hidratada y flácida, el recubrimiento de hialuronano unido a las células parece mantenerlas separadas, dándoles libertad para moverse y proliferar. La cesación del movimiento celular y la iniciación de las uniones entre células suelen asociarse con una disminución del hialuronano y de las moléculas de unión a HA de la superficie celular y un incremento de la enzima extracelular hialuronidasa, que degrada hialuronano en la matriz. Estas funciones del hialuronano son muy importantes durante las numerosas migraciones celulares que facilitan la diferenciación y durante la liberación de una célula huevo de mamífero (ovocito) de las células de sus alrededores después de la ovulación.

La asociación de hialuronano y proteoglucanos forma agregados complejos grandes

El proteoglucano predominante en el cartílago, denominado *agrecán*, se agrupa con el hialuronano para formar agregados muy grandes, ilustrativos de las estructuras complejas que a veces forman los proteoglucanos. El esqueleto del agregado de proteoglucanos del cartílago es una molécula larga

de hialuronano a la cual se unen múltiples moléculas de agrecán, de manera fuerte, pero no covalente (fig. 6-22a). Un único agregado de agrecán, uno de los mayores complejos macromoleculares conocidos, pueden ser de más de 4 mm de longitud y puede tener un volumen más grande que el de una célula bacteriana. Estos agregados le otorgan al cartílago sus propiedades únicas similares a un gel y su resistencia a las deformaciones, esenciales para distribuir la carga en las articulaciones que soportan el peso.

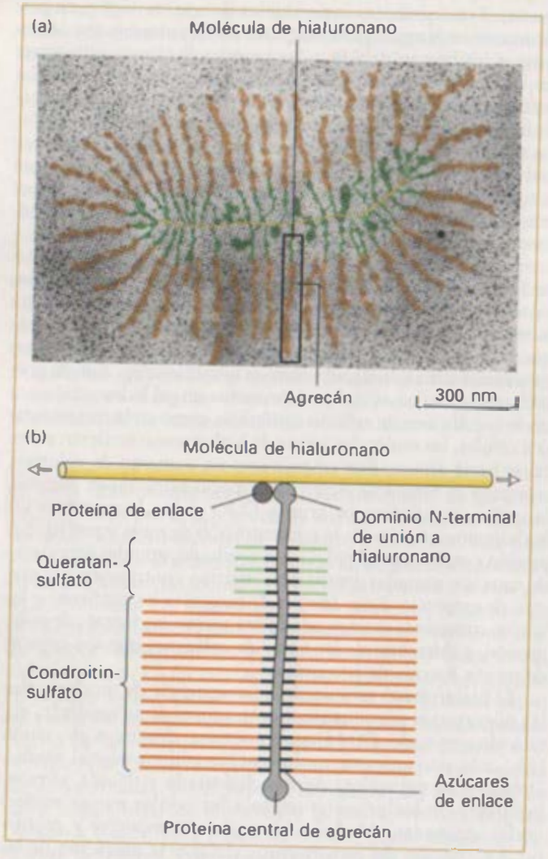


Fig. 6-22. Estructura de un agregado de proteoglucano de cartílago. (a) Microfotografía electrónica de un agregado de agrecán de cartílago epifisario bovino fetal. Las proteínas centrales de agrecán están unidas a una molécula de hialuronano a intervalos de unos 40 nm. (b) Representación esquemática de un monómero de agrecán unido al hialuronano. En el agrecán, tanto las cadenas de queratansulfato como de condroitinsulfato están adheridas a la proteína central. El dominio N-terminal de la proteína central se une de manera no covalente a una molécula de hialuronano. La unión es facilitada por una proteína de enlace, que se une tanto a la molécula de hialuronano como a la proteína central de agrecán. Cada proteína central de agrecán tiene 127 secuencias Ser-Gly a las que pueden añadirse las cadenas de GAG. El peso molecular de un monómero de agrecán es, en promedio, de 2×10^6. Todo el agregado, que puede contener más de 100 monómeros de agrecán, tiene un peso molecular de más de 2×10^8. [Parte (a), de J. A. Buckwalter y L. Rosenberg, 1983, Coll. Rel. Res. 3:489; cortesía de L. Rosenberg.]

MEDICINA

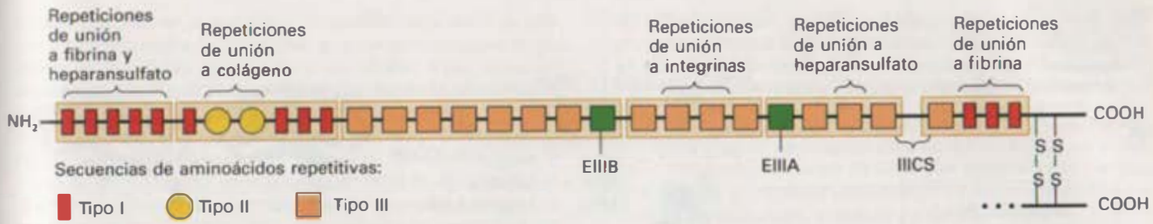
La importancia de las cadenas de GAG que son parte de diversos proteoglucanos de la matriz se ilustra por los inusuales seres humanos que tienen un defecto genético en una de las enzimas requeridas para la síntesis del dermatansulfato de GAG. Estas personas poseen numerosos defectos en los huesos, articulaciones y músculos; no crecen hasta alcanzar una estatura normal y tienen una piel arrugada, que les da una apariencia prematura de vejez. ▮

Las fibronectinas conectan muchas células a colágenos fibrosos y otros componentes matriciales

Muchos tipos diferentes de células sintetizan fibronectina, una proteína multiadhesiva de la matriz que se halla en todos los vertebrados. El descubrimiento de que la fibronectina funciona como una molécula adhesiva surgió al observar que está presente sobre la superficie de células fibroblásticas normales, que se adhieren con fuerza a las placas de petri en los experimentos de laboratorio, pero está ausente en la superficie de las células tumorales, que se adhieren débilmente. Las aproximadamente 20 isoformas de la fibronectina son generadas mediante corte y empalme alternativo del transcripto de RNA producido a partir de un único gen (véase fig. 4-15). Las fibronectinas son esenciales para la migración y diferenciación de muchos tipos celulares durante la embriogénesis. Estas proteínas también son importantes para la cicatrización de las heridas porque promueven la coagulación de la sangre y facilitan la migración de macrófagos y otras células inmunes hacia el área afectada.

Las fibronectinas ayudan a adherir células a la matriz extracelular mediante la unión a otros componentes de la matriz extracelular, sobre todo colágenos fibrosos y proteoglucanos heparansulfato, y a receptores de adhesión de la superficie celular, como las integrinas (véase fig. 6-2). A través de sus interacciones con los receptores de adhesión (como la integrina $\alpha 5\beta 1$), las fibronectinas influyen en la forma y el movimiento de las células y la organización del citoesqueleto. A la inversa, las células pueden esculpir la matriz extracelular de su entorno de acuerdo con sus necesidades, regulando su unión con la fibronectina y otros componentes de la matriz extracelular mediante receptores.

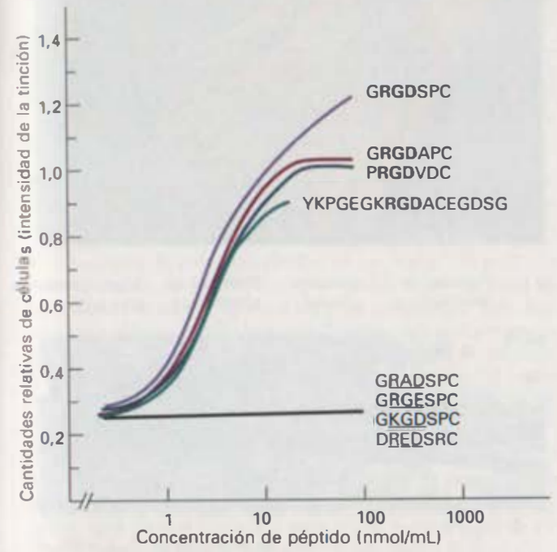
Las fibronectinas son dímeros de dos polipéptidos similares unidos en sus extremos C-terminales por dos enlaces disulfuros; cada cadena mide alrededor de 60-70 nm de largo



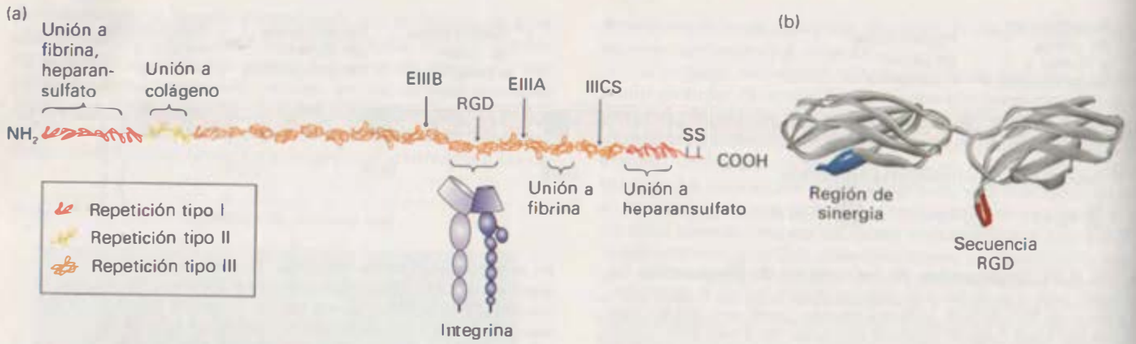
▲ **Fig. 6-23. Organización de las cadenas de fibronectina.** Se muestra sólo una de las dos cadenas presentes en la molécula dimérica de fibronectina; ambas cadenas tienen secuencias muy parecidas. Cada cadena contiene alrededor de 2.446 aminoácidos y está compuesta de tres tipos de secuencias repetitivas de aminoácidos. La fibronectina circulante carece de uno o de ambos tipos de repeticiones tipo III designadas EIIIA y EIIIB debido al corte y empalme alternativo del mRNA (véase fig. 4-15). Al menos cinco secuencias distintas pueden estar presentes en la región IIICS como resultado del corte y empalme alternativo. Cada cadena contiene seis dominios (recuadros marrón claro), algunos de los cuales contienen sitios de unión específicos para el heparansulfato, la fibrina (uno de los principales constituyentes de los coágulos de sangre), el colágeno y las integrinas de la superficie celular. El dominio de unión a integrinas es también conocido como el dominio de unión a células. (Adaptado de G. Paolella, M. Barone y F. Baralle, 1993, en M. Zern y L. Reid, eds., Extracellular Matrix, Marcel Dekker, pp. 3-24.)

y 2-3 nm de grosor. La digestión parcial de la fibronectina con bajas cantidades de proteasas y los análisis de los fragmentos mostraron que cada cadena comprende seis regiones funcionales con diferentes especificidades de unión a ligandos (fig. 6-23). A su vez, cada región contiene múltiples copias de ciertas secuencias que pueden ser clasificadas dentro de uno de tres tipos. Estas clasificaciones se designan repeticiones de fibronectina tipo I, tipo II y tipo III, basadas en las similitudes en la secuencia de aminoácidos, aunque las secuencias de dos repeticiones cualesquiera de un tipo dado no siempre son idénticas. Las repeticiones enlazadas le otorgan a la molécula el aspecto de cuentas en un collar. La combinación de las diferentes repeticiones que componen las regiones, otro ejemplo de diversidad combinatoria, le confiere a la fibronectina su capacidad para unir múltiples ligandos.

Una de las repeticiones del tipo III en la región de unión a células de la fibronectina, media la unión a ciertas integrinas. El resultado de estudios con péptidos sintéticos correspondientes a partes de estas repeticiones identificó la secuencia del tripéptido Arg-Gly-Asp, llamada *secuencia RGD*, como la secuencia mínima requerida dentro de esta repetición para el reconocimiento por aquellas integrinas. En un estudio, se evaluaron los heptapéptidos que contienen la secuencia RGD o una variación de esta secuencia por su capacidad para mediar la adhesión de células de riñón de rata a una placa de cultivo. El resultado mostró que los heptapéptidos que contienen la secuencia RGD imitaban la capacidad de las fibronectinas intactas para estimular las adhesiones mediadas por integrina, mientras que las variantes de heptapéptidos que carecían de esta secuencia eran ineficaces (fig. 6-24).

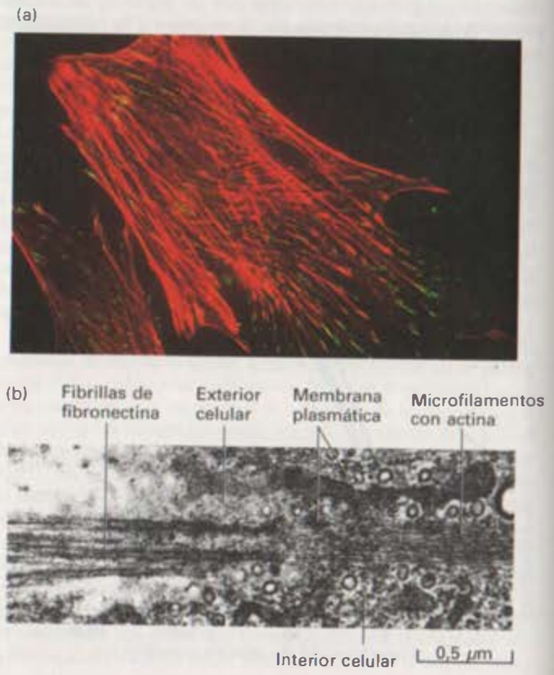


◀ **FIGURA EXPERIMENTAL 6-24 Para la adhesión de las células se requiere una secuencia de tripéptidos específica (RGD) en la región de unión a células de la fibronectina.** La región de unión a células de la fibronectina contiene una secuencia heptapeptídica de unión a integrinas, GRDSPC en el código de una única letra de los aminoácidos (véase fig. 2-13). Este heptapéptido y varias variantes fueron químicamente sintetizadas. Diferentes concentraciones de cada péptido sintético fueron añadidas a placas de poliestireno que contenían la proteína inmunoglobulina G (IgG) firmemente adherida a su superficie; los péptidos fueron luego unidos químicamente a la IgG mediante enlaces cruzados. Posteriormente, se añadieron a las placas células normales de riñón de rata cultivadas y se las incubó por 30 minutos para permitir la adhesión. Luego de extraer las células no adheridas por lavado, se determinó las cantidades relativas de células que se habían adherido firmemente tiñéndolas con un colorante y midiendo la intensidad de la tinción con un espectrofotómetro. Los gráficos indican que la adhesión celular se incrementó por encima de los niveles del entorno con concentraciones crecientes de péptidos para los péptidos que contienen la secuencia de RGD, pero no para las variantes que carecen de esta secuencia (modificación subrayada). (De M. D. Pierschbacher y E. Ruoslahti, 1984, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81: 5985.)



▲ Fig. 6-25. Modelo de la fibronectina uniéndose a la integrina a través de su repetición tipo III que contiene RGD. (a) Se muestra un modelo en escala de la fibronectina conectada por dos repeticiones tipo III a los dominios extracelulares de la integrina. Las estructuras de los dominios de la fibronectina fueron determinadas a partir de fragmentos de la molécula. Los dominios EIIIA, EIIIB y IIICS (no mostrados; véase fig. 6-23) se empalman en forma variable en la estructura en los lugares indicados por flechas. (b) Una estructura de alta resolución muestra que la secuencia de unión RGD (rojo) se extiende hacia afuera en un bucle desde su dominio compacto tipo III sobre el mismo lado de la fibronectina que la región de sinergia (azul), que también contribuye a la unión de alta afinidad con las integrinas. (Adaptado de D. J. Leahy et al., 1996, Cell 84:161.)

Sobre la base de la estructura de partes de fibronectina e integrina se realizó el ensamblaje de un modelo tridimensional de la unión de fibronectina con integrina (fig. 6-25a). En una estructura de alta resolución de la repetición tipo III de la fibronectina de unión a integrina y de su dominio tipo III colindante, la secuencia RGD se encuentra en la cima de un asa que se proyecta hacia afuera desde la molécula, en una posición que facilita la unión con las integrinas (fig. 6-25a, b). Aunque la secuencia RGD es necesaria para la unión a varias integrinas, su afinidad por las integrinas es mucho menor que la de las fibronectinas intactas o de la región de unión a células en la fibronectina. De esta forma, los rasgos estructurales cercanos a la secuencia RGD de las fibronectinas (p. ej., partes de repeticiones adyacentes, como la región sinérgica; véase fig. 6-25b) y de otras proteínas que contienen RGD incrementan su unión a ciertas integrinas. Más aún, las formas diméricas solubles simples de la fibronectina producida por el hígado o por los fibroblastos se encuentran al principio en una conformación cerrada no funcional que se une mal a las integrinas debido a que la secuencia RGD no es fácilmente accesible. La adsorción de la fibronectina a una matriz de colágeno o a la lámina basal o,



▶ FIGURA EXPERIMENTAL 6-26 Las integrinas median la unión entre la fibronectina en la matriz extracelular y el citoesqueleto. (a) Microfotografía inmunofluorescente de un fibroblasto cultivado fijado que muestra la colocalización de la integrina α5β1 y de las fibras de tensión que contienen actina. La célula fue incubada con dos tipos de anticuerpos monoclonales: un anticuerpo específico contra integrina unido a un colorante fluorescente verde y un anticuerpo específico contra actina unido a un colorante fluorescente rojo. Las fibras de tensión son largos haces de microfilamentos de actina que irradian hacia adentro desde los puntos donde la célula contacta un sustrato. En el extremo distal de estas fibras, cerca de la membrana plasmática, la coincidencia de la actina (rojo) y de la integrina unida a la fibronectina (verde) produce una fluorescencia amarilla. (b) Microfotografía electrónica de la unión de fibronectina y de las fibras de actina en un fibroblasto cultivado. Microfilamentos individuales de 7 nm que contienen actina, componentes de una fibra de tensión, terminan en la membrana celular seccionada de forma oblicua. Los microfilamentos aparecen en proximidad cercana a las fibrillas más gruesas de fibronectina densamente teñidas en el exterior de la célula. [Parte (a), de J. Duband et al., 1988, J. Cell Biol. 107:1385. Parte (b) de I. J. Singer, 1979, Cell 16:675; cortesía de I. J. Singer; copyright 1979, MIT.]

experimentalmente, a una placa de plástico de cultivo de tejidos da como resultado un cambio de conformación que incrementa su capacidad para unirse a las células. Más probablemente, este cambio de conformación incremente la accesibilidad de la secuencia RGD para la unión con integrinas.

La microscopia y otras metodologías experimentales (p. ej., experimentos bioquímicos de unión) han demostrado el papel de las integrinas en el establecimiento de enlaces cruzados entre la fibronectina y otros componentes de la matriz extracelular con el citoesqueleto. Por ejemplo, la colocalización de los filamentos citoesqueléticos de actina y las integrinas dentro de las células pueden visualizarse por microscopia fluorescente (fig. 6-26a). La unión de integrinas de la superficie celular a las fibronectinas de la matriz induce el movimiento, dependiente del citoesqueleto de actina, de algunas moléculas de integrina en el plano de la membrana. La tensión mecánica resultante debida al movimiento relativo de diferentes integrinas unidas a un dímero único de fibronectina estira la fibronectina. Este estiramiento fomenta la asociación mutua de fibronectinas para formar fibrillas multiméricas.

La fuerza necesaria para desplegar y exponer sitios funcionales de autoasociación en las fibronectinas es mucho menor que la necesaria para desestabilizar las uniones entre integrinas y fibronectinas. Por lo tanto, las moléculas de fibronectina permanecen unidas a la integrina mientras que las fuerzas mecánicas generadas por la célula inducen la formación de fibrillas. En efecto, las integrinas, a través de proteínas adaptadoras, transmiten las fuerzas intracelulares generadas por el citoesqueleto de actina a las fibronectinas extracelulares. En forma gradual, las primeras fibrillas de fibronectina maduran para formar, a través de enlaces cruzados covalentes, componentes matriciales muy estables. En algunas imágenes obtenidas por microfotografía electrónica, las fibrillas exteriores de fibronectina parecen alinearse en una línea continua con haces de fibras de actina dentro de la célula (fig. 6-26b). Estas observaciones y los resultados de otros estudios proporcionaron el primer ejemplo de un receptor de adhesión molecularmente bien definido (es decir, una integrina) que forma un puente entre el citoesqueleto intracelular y los componentes de la matriz extracelular; un fenómeno que ahora se sabe que está muy extendido.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 6.4

La matriz extracelular de los tejidos no epiteliales

- Los tejidos conectivos, como el tendón y los cartílagos, difieren de otros tejidos sólidos en que la mayor parte de su volumen se compone de matriz extracelular más que de células.
- La síntesis de colágeno fibrilar (p. ej., tipos I, II y III) comienza dentro de la célula con la modificación química de las cadenas α recién sintetizadas y su ensamblaje para formar procolágeno triple helicoidal dentro del retículo endoplasmático. Luego de la secreción, las moléculas de procolágeno se escinden, se asocian lateralmente y se unen en forma covalente mediante enlaces cruzados para formar haces llamados fibrillas, que pueden formar ensamblados más grandes denominados fibras (véase fig. 6-20).
- Los diversos colágenos se distinguen por la capacidad de sus regiones helicoidales y no helicoidales para asociarse en fibrillas para formar láminas o para unirse a otros tipos de colágeno mediante enlaces cruzados (véase cuadro 6-1).
- El hialuronano, un GAG altamente hidratado, es el componente principal de la matriz extracelular de células en migración y proliferación. Ciertos receptores de adhesión de la superficie celular unen el hialuronano a las células.
- Grandes agregados de proteoglucanos que contienen una molécula central de hialuronano unido en forma no covalente a la proteína núcleo de múltiples moléculas de proteoglucanos (p. ej., agrecán) contribuyen a las propiedades mecánicas distintivas de la matriz (véase fig. 6-22).
- Las fibronectinas son proteínas multiadhesivas abundantes de la matriz que cumplen un papel clave en la migración y diferenciación celular. Contienen sitios de unión para integrinas y componentes de la matriz extracelular (colágenos, proteoglucanos) y pueden por ende unir células a la matriz (véase fig. 6-23).
- La secuencia tripeptídica RGD (Arg-Gly-Asp), hallada en las fibronectinas y algunas otras proteínas de la matriz, es reconocida por varias integrinas.

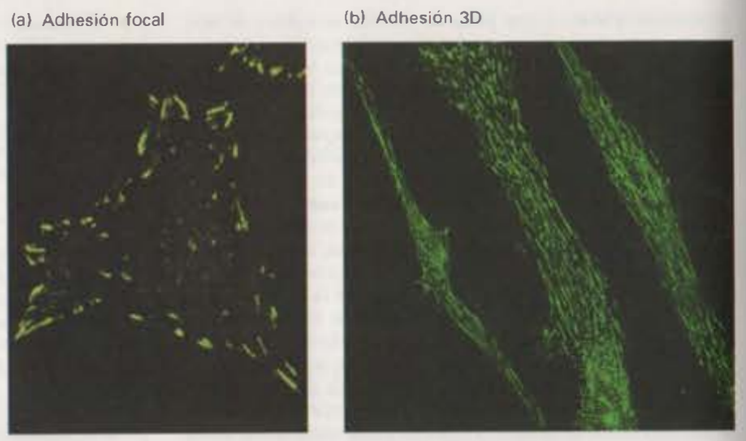
6.5 Interacciones adhesivas y células no epiteliales

Una vez formadas las interacciones adhesivas en el epitelio durante la diferenciación, suelen ser muy estables y pueden subsistir durante todo el período de vida de las células epiteliales o hasta que las células se diferencian para formar células mesenquimáticas no polarizadas débilmente asociadas, la transición epitelial-mesenquimática. Aunque esa adhesión de larga duración (no movible) existe también en los tejidos no epiteliales, las células no epiteliales pueden arrastrarse a lo largo o a través de una capa de matriz extracelular o de otras células. En esta sección, describimos diversas estructuras de la superficie celular en las células no epiteliales que median la adhesión de larga duración y las interacciones adhesivas transitorias que están especialmente adaptadas para el movimiento de las células. Los mecanismos intracelulares utilizados para generar las fuerzas mecánicas que propulsan las células y modifican sus formas se detallan en el capítulo 19.

Las estructuras adhesivas que contienen integrina conectan física y funcionalmente la matriz extracelular y el citoesqueleto en las células no epiteliales

Al igual que lo tratado en relación con el epitelio, los hemidesmosomas que contienen integrina conectan las células epiteliales a la lámina basal y, a través de proteínas adaptadoras, a filamentos intermedios del citoesqueleto (véase fig. 6-1). En las células no epiteliales, las integrinas de la membrana plasmática se agrupan también con otras moléculas en diversas estructuras adhesivas denominadas adhesiones focales, contactos focales, complejos focales, adhesiones 3D, adhesiones fibrilares y en adhesiones circulares llamadas podosomas (cap. 14). Estas estructuras se observan con facilidad por microscopia fluorescente con el uso de anticuerpos que reconocen integrinas u otras moléculas coagrupadas (fig. 6-27). Al igual que las uniones de anclaje célula-matriz celular en las células epiteliales, diversas estructuras adhesivas unen células no

▶ **FIGURA EXPERIMENTAL 6-27**
Integrinas agrupadas en estructuras adhesivas con diversas morfologías en las células no epiteliales. Se utilizaron métodos de inmunofluorescencia para detectar estructuras adhesivas (verde) sobre células cultivadas. Aquí se muestran las adhesiones focales (a) y las adhesiones 3D (b) sobre las superficies de los fibroblastos humanos. Las células fueron cultivadas directamente sobre la superficie plana de una placa de cultivo (a) o sobre una matriz tridimensional de componentes de la ECM (b). La forma, distribución y composición de las adhesiones basadas en la integrina formadas por las células varían según las condiciones del cultivo. [Parte [a], de B. Geiger et al., 2001, Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2:793. Parte [b] cortesía de K. Yamada y E. Cukierman; véase E. Cukierman et al., 201, Science 294:1708-12.]



epiteliales a la matriz extracelular; también contienen docenas de proteínas intracelulares adaptadoras y asociadas que median la fijación a los filamentos citoesqueléticos de actina y activan las señales dependientes de adhesión para el crecimiento y la movilidad celular.

Aunque se encuentran en muchas células no epiteliales, las estructuras adhesivas que contienen integrina fueron estudiadas con mayor frecuencia en los fibroblastos desarrollados en cultivos celulares sobre vidrios planos o superficies plásticas (sustrato). Estas condiciones apenas simulan el ambiente tridimensional de la matriz extracelular que suele rodear esas células in vivo. Cuando se cultivan los fibroblastos en matrices tridimensionales derivadas de células o tejidos, forman adhesiones al sustrato tridimensional de la matriz extracelular, denominadas adhesiones 3D. Estas estructuras difieren un poco en composición, forma, distribución y actividad con respecto a las adhesiones focales o fibrilares observadas en las células que crecen sobre el sustrato plano típico de los experimentos de cultivo de células. (véase fig. 6-27). Los fibroblastos cultivados con estas uniones de anclaje "más naturales" despliegan una mayor adhesión y movilidad, mayores velocidades de proliferación celular y morfologías en forma de huso más parecidas a las de los fibroblastos de los tejidos que en las células cultivadas sobre superficies planas. Estas observaciones indican que las propiedades topológicas, de composición y mecánicas (p. ej., flexibilidad) de la matriz extracelular cumplen alguna función en el control de la forma y la actividad de una célula. Probablemente, las diferencias específicas de tejido en las características de la matriz contribuyen a las propiedades celulares específicas de tejido.

CUADRO 6-2 Integrinas seleccionadas de vertebrados*

Composición de las subunidades	Distribución celular primaria	Ligandos
α1β1	Muchos tipos	Principalmente colágenos; también lamininas
α2β1	Muchos tipos	Principalmente colágenos; también lamininas
α4β1	Células hematopoyéticas	Fibronectina; VCAM-1
α5β1	Fibroblastos	Fibronectina
αLβ2	Linfocitos T	ICAM-1, ICAM-2
αMβ2	Monocitos	Proteínas séricas (p. ej., C3b, fibrinógeno, factor X); ICAM-1
αIIbβ3	Plaquetas	Proteínas séricas (p. ej., fibrinógeno, factor de von Willebrand, vitronectina); fibronectina
α6β4	Células epiteliales	Laminina

*Las integrinas están agrupadas en subfamilias que tienen una subunidad β en común. Los ligandos en rojo son CAM; todos los otros son proteínas de la matriz extracelular o proteínas séricas. Algunas subunidades pueden tener múltiples isoformas con empalmes de distintos dominios citosólicos.

FUENTE: R. O. Hynes 1992, Cell 69:11.

La diversidad de las interacciones entre integrina y ligando contribuye a numerosos procesos biológicos

Aunque la mayoría de las células expresan integrinas distintivas que unen el mismo ligando o distintos ligandos, muchas integrinas se expresan predominantemente en ciertos tipos de células. El cuadro 6-2 enumera algunas de las numerosas interacciones mediadas por integrina con componentes de la matriz extracelular o CAM. No sólo muchas integrinas unen más que un ligando, sino que muchos de sus ligandos se unen a múltiples integrinas.

Todas las integrinas parecen haber evolucionado a partir de dos antiguos subgrupos generales; los que unen moléculas que contienen RGD (p. ej., fibronectina) y los que unen laminina. Por ejemplo, la integrina α5β1 une la fibronectina, mientras que las integrinas α1β1 y α2β1 ampliamentes expresadas, así como la integrina α6β4 expresada por las células epiteliales, unen laminina. Las subunidades α de integrinas α1, α2 y varias otras contienen un dominio distintivo insertado, el *dominio I*. El dominio I en algunas integrinas (p. ej., α1β1 y α2β1) media la unión a diversos colágenos. Otras integrinas que contienen subunidades α con dominios I se expresan exclusivamente sobre leucocitos y células hematopoyéticas; estas integrinas reconocen las moléculas de adhesión celular sobre otras células, incluidos los miembros de la superfamilia de las Ig (p. ej., ICAM, VCAM), y por ende participan en la adhesión entre células.

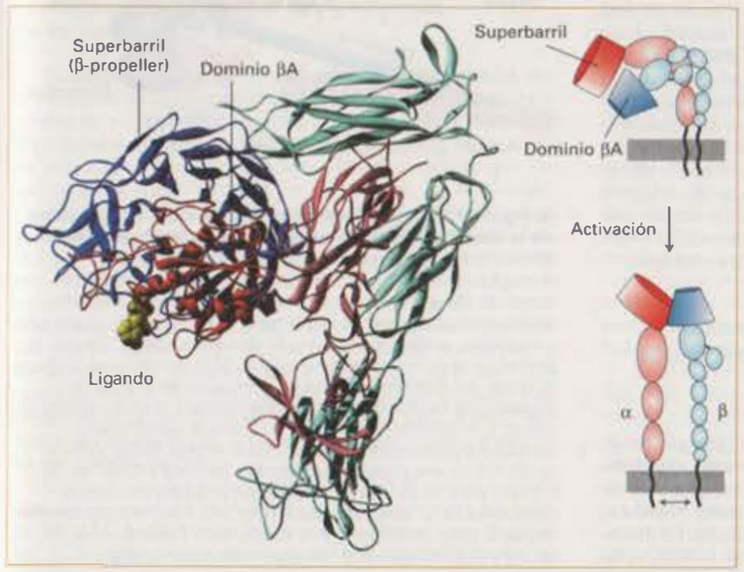
La diversidad de las integrinas y sus ligandos de la matriz extracelular permite a las integrinas participar en un amplio espectro de procesos biológicos clave, entre ellos la migración de células a sus ubicaciones correctas durante la formación del plan corporal de un embrión (morfogénesis) y en la respuesta inflamatoria. La importancia de las integrinas en diversos procesos es resaltada por los defectos exhibidos por los ratones *knockout* genéticamente modificados para tener mutaciones en cada uno de los genes de casi todas las subunidades de integrina. Estos defectos incluyen importantes anormalidades en el desarrollo, en la formación de vasos sanguíneos, en la función de los leucocitos, en la respuesta a infecciones (inflamación), en la remodelación de los huesos y en la hemostasia.

La adhesión entre célula y matriz es modulada por variaciones en la actividad de unión y por la cantidad de integrinas

Las células pueden controlar exquisitamente la fuerza de las interacciones mediadas por integrinas entre la célula y la matriz al regular la actividad de unión a ligandos de las integrinas, o su expresión. Tal regulación es crítica para el papel de estas interacciones en la migración celular y otras funciones.

Muchas, si no todas las integrinas, pueden existir en dos conformaciones: una forma de baja afinidad (inactiva) y una forma de alta afinidad (activa) (fig. 6-28). Los resultados de estudios estructurales y experimentos que investigan la unión de ligandos por integrinas proporcionaron un modelo de los cambios que tienen lugar cuando se activan las integrinas. En el estado inactivo, el heterodímero αβ se dobla, la conformación del sitio de unión al ligando en la punta de la molécula permite sólo uniones del ligando de baja afinidad y las colas citoplasmáticas C-terminales de las dos subunidades están estrechamente ligadas entre sí. En el estado activo "derecho", las alteraciones en la conformación de los dominios que forman el sitio de unión permiten una unión más fuerte (de alta afinidad) del ligando y las colas citoplasmáticas se separan.

Estos modelos estructurales también proporcionan una explicación atractiva de la capacidad de las integrinas para mediar la señalización de afuera hacia adentro y de adentro hacia afuera. La unión de ciertas moléculas de la matriz extracelular o de CAM sobre otras células a la estructura curvada de baja afinidad forzaría a la molécula a enderezarse y,



◀ **Fig. 6-28. Modelo para la activación de integrinas.** (*Izquierda*). El modelo molecular está basado en la estructura cristalina de rayos X de la región extracelular de la integrina αvβ3 en su forma inactiva, de baja afinidad ("doblada"), con la subunidad α sombreada en azul y la subunidad β sombreada en rojo. Los principales sitios de unión al ligando se encuentran en la punta de la molécula donde interactúan el dominio superbarril (β-propeller) (azul oscuro) y el dominio βA (rojo oscuro). Se muestra un ligando peptídico RGD en amarillo. (*Derecha*) Se piensa que la activación de las integrinas se debe a los cambios de conformación que incluyen el enderezamiento de la molécula, movimientos clave cerca del superbarril y los dominios βA, que incrementan la afinidad por los ligandos, y la separación de los dominios citoplasmáticos, que se traduce en interacciones alteradas con las proteínas adaptadoras. Para mayores detalles véase el texto. (Adaptado de M. Arnaout et al., 2002, Curr. Opin. Cell Biol. 14:641, y R. O. Hynes, 2002, Cell 110:673.)

en consecuencia, a separar las colas citoplasmáticas. Adaptadores intracelulares podrían "sentir" la separación de las colas y, como resultado, unirse o disociarse de ellas. Los cambios en estos adaptadores pueden alterar el citoesqueleto y activar o inhibir las vías intracelulares de señalización. Por el contrario, los cambios en el estado metabólico de las células (p. ej., en el citoesqueleto de las plaquetas que acompaña la activación de las plaquetas; véase fig. 19-5) pueden provocar que los adaptadores intracelulares se unan a las colas o se disocien de ellas y de esta forma las fuercen a separarse o asociarse. Como consecuencia, la integrina se doblará (inactivará) o se enderezará (activará), alterando su interacción con la matriz extracelular o con otras células.

La función de las plaquetas provee un buen ejemplo de cómo las interacciones entre célula y matriz son moduladas al controlar la actividad de unión de las integrinas. En su estado basal, la integrina αIIbβ3 presente sobre las membranas plasmáticas de las plaquetas no puede unirse con fuerza a sus ligandos proteicos (p. ej., fibrinógeno, fibronectina), todos los cuales participan en la formación de un coágulo de sangre, porque se encuentra en su conformación inactiva (doblada). La fijación de una plaqueta al colágeno o la trombina en un coágulo en formación induce desde el citoplasma un cambio conformacional activante en la integrina αIIbβ3 que le permite unir fuertemente las proteínas coagulantes y participar en la formación del coágulo. Las personas con defectos genéticos en las subunidades de integrina β3 son propensas al sangrado excesivo, lo que confirma el papel de esta integrina en la formación de los coágulos de sangre.

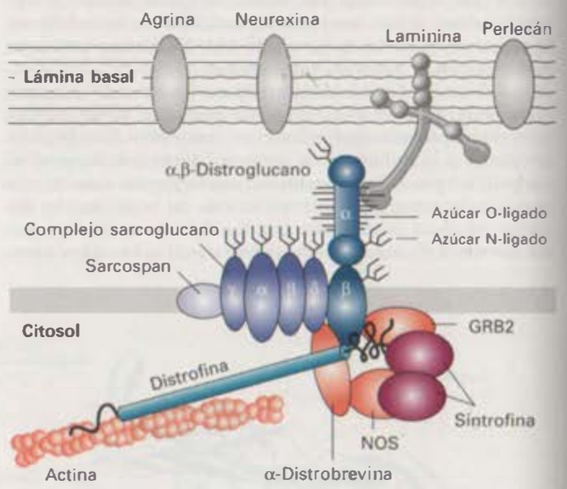
La adhesión de células a los componentes de la matriz extracelular también puede ser modulada alterando el número de moléculas de integrina expuestas sobre la superficie celular. La integrina α4β1, que se encuentra sobre muchas células hematopoyéticas (precursores de los glóbulos rojos y blancos), ofrece un ejemplo de este mecanismo regulador. Para que estas células hematopoyéticas proliferen y se diferencien, deben estar adheridas a la fibronectina sintetizada por células de sostén ("estromales") en la médula ósea. La integrina α4β1 sobre células hematopoyéticas se une a una secuencia Glu-Ile-Leu-Asp-Val (EILDV) en la fibronectina, anclando de esta manera las células a la matriz. Esta integrina también se une a una secuencia en una CAM llamada CAM-1 vascular (VCAM-1), que está presente sobre las células estromales de la médula ósea. De esta forma, las células hematopoyéticas contactan directamente las células estromales y se adhieren a la matriz. Tras su diferenciación, las células hematopoyéticas disminuyen la expresión de integrinas α4β1; se cree que la disminución resultante del número de las moléculas de integrina α4β1 sobre la superficie celular les permite a las células sanguíneas maduras desprenderse de las células estromales y matriciales de la médula ósea y entrar luego en la circulación.

Las conexiones moleculares entre la matriz extracelular y el citoesqueleto son defectuosas en la distrofia muscular

MEDICINA

La importancia de la conexión mediada por receptores entre los componentes de la matriz extracelular y el citoesqueleto se destaca por un grupo de enfermedades hereditarias con pérdida de masa muscular, denominadas colectivamente distrofias musculares. La distrofia muscular de Duchenne (DMD), el tipo más común, es un trastorno ligado al sexo que afecta a 1 de cada 3.300 varones, que produce insuficiencia cardíaca o respiratoria al final de la adolescencia o al comienzo de la adultez. La clave principal para entender la base molecular de esta enfermedad proviene del descubrimiento de que las personas con DMD portan mutaciones en el gen que codifica una proteína llamada *distrofina*. Se descubrió que esta enorme proteína es una proteína adaptadora citosólica, que se une a los filamentos de actina y a un receptor de adhesión llamado *distroglucano*. ∎

El distroglucano se sintetiza como una gran glucoproteína precursora que se escinde por proteólisis en dos subunidades. La subunidad α es una proteína periférica de membrana y la subunidad β es una proteína transmembrana cuyo dominio extracelular se asocia con la subunidad α (fig. 6-29). Los múltiples oligosacáridos O-ligados están adheridos en forma covalente a grupos hidroxilo de cadenas laterales de residuos de serina y treonina en la subunidad α. Estos oligosacáridos O-ligados se fijan a diversos componentes de la lámina basal, incluidos la proteína multiadhesiva de la matriz, laminina, y los proteoglucanos perlecano y agrina. Las neurexinas, una familia de moléculas de adhesión expresadas por las neuronas, también se unen a la subunidad α.



▲ Fig. 6-29. Modelo esquemático del complejo glucoproteico de la distrofina (DGC) en las células del músculo esquelético. El DGC comprende tres subcomplejos: el subcomplejo distroglucano α,β; el subcomplejo sarcoglucano/sarcospan de proteínas integrales de membrana; y el subcomplejo citosólico adaptador que comprende la distrofina, otras proteínas adaptadoras y moléculas señalizadoras. A través de sus azúcares *O*-ligados, el β distroglucano se une a componentes de la lámina basal, como la laminina. La distrofina –la proteína defectuosa en la distrofia muscular de Duchenne– une el β-distroglucano al citoesqueleto de actina, y la α-distrobrevina une la distrofina al subcomplejo sarcoglucano/sarcospan. La óxido nítrico sintasa (NOS) produce óxido nítrico, una molécula señalizadora gaseosa y GRB2 es un componente de las vías de señalización activadas por ciertos receptores de la superficie celular (cap. 14). Para mayores detalles véase el texto. (Adaptado de S. J. Winder, 2001, Trends Biochem. Sci. 26:118 y D. E. Michele y K. P. Campbell, 2003, J. Biol. Chem.)

El segmento transmembrana de la subunidad β del distroglucano se asocia con un complejo de proteínas integrales de membrana; su dominio citosólico une la distrofina y otras proteínas adaptadoras, al igual que diversas proteínas señalizadoras intracelulares. El gran ensamblado heterogéneo resultante, el *complejo distrofina-glucoproteína* (DGC), conecta la matriz extracelular al citoesqueleto y a las vías de señalización dentro de las células musculares (véase fig. 6-29). Por ejemplo, la enzima de señalización óxido nítrico sintetasa (NOS) está asociada a través de la sintrofina con el subcomplejo citosólico distrofina del músculo esquelético. El aumento del Ca^{2+} intracelular durante la contracción muscular activa la NOS para producir óxido nítrico (NO), que difunde al interior de las células del músculo liso que envuelven los vasos sanguíneos. A través de una vía de señalización que se describe en el capítulo 13, el NO promueve la relajación del músculo liso, conduciendo a un aumento local en el flujo de nutrientes de la sangre y de oxígeno al músculo esquelético.

Las mutaciones de la distrofina, de otros componentes del DGC, como laminina o de las enzimas que añaden azúcares O-ligados a los distroglucanos, desestabilizan la unión mediada por el DGC entre el exterior y el interior de las células musculares y provocan distrofias musculares. Además, las mutaciones de distroglucanos han mostrado reducir en gran medida la acumulación de receptores de acetilcolina en las uniones neuromusculares de las células musculares (cap. 7), que también dependen de las proteínas laminina y agrina de la lámina basal. Estos y otros posibles efectos de los defectos del DGC parecen conducir a un debilitamiento acumulativo de la estabilidad mecánica de las células musculares a medida que atraviesan la contracción y la relajación, produciendo el deterioro de las células y la distrofia muscular.

La adhesión entre células independiente de Ca^{2+} en los tejidos neuronales y en otros tejidos es mediada por CAM de la superfamilia de inmunoglobulinas

Numerosas proteínas transmembrana caracterizadas por la presencia de múltiples dominios inmunoglobulina (repeticiones) en su región extracelular constituyen las CAM de la superfamilia de las Ig, o IgCAM. El dominio Ig es un motivo proteico común, que contiene 70-110 residuos, que inicialmente fue identificado en los anticuerpos, las inmunoglobulinas que unen antígenos. Los genomas de seres humanos, de *D. melanogaster* y de *C. elegans* incluyen alrededor de 765, 165 y 64 genes, respectivamente, que codifican las proteínas que contienen dominios Ig. Los dominios inmunoglobulina se encuentran en una amplia variedad de proteínas de la superficie celular incluidos los receptores de las células T producidos por los linfocitos y muchas proteínas que participan en las interacciones adhesivas. Entre las IgCAM están las CAM neurales; las CAM intercelulares (ICAM), que cumplen funciones en el movimiento de los leucocitos para formar tejidos; y las moléculas de adhesión a uniones (JAM), presentes en las uniones estrechas.

Como lo implican sus nombres, las CAM neurales tienen una importancia particular para el tejido nervioso. Un tipo, las NCAM, median principalmente las interacciones homófilas. Expresadas por primera vez durante la morfogénesis, las NCAM desempeñan un papel importante en la diferenciación de las células musculares, nerviosas y gliales. Su papel en la adhesión celular se demostró directamente mediante la inhibición de la adhesión con anticuerpos anti-NCAM. Numerosas isoformas de NCAM, codificadas por un único gen, se generan mediante corte y empalme alternativo del mRNA y por las diferencias en la glucosilación. Otras CAM neurales (p. ej., L1-CAM) son codificadas por genes diferentes. En los seres humanos, las mutaciones en diferentes partes del gen de L1-CAM causan diversas neuropatologías (p. ej., retardo mental, hidrocefalia congénita y espasticidad).

Una NCAM comprende una región extracelular con cinco repeticiones Ig y dos repeticiones de fibronectina tipo III, un único segmento que atraviesa la membrana y un segmento citosólico que interactúa con el citoesqueleto (véase fig. 6-2). En contraste, la región extracelular de la L1-CAM tiene seis repeticiones Ig y cuatro repeticiones de fibronectina tipo III. Al igual que con las cadherinas, las interacciones cis (intracelulares) y trans (transcelulares) probablemente cumplen funciones en la adhesión mediada por IgCAM (véase fig. 6-3).

La adhesión covalente de múltiples cadenas de ácido siálico, un derivado de azúcares cargado negativamente, a las NCAM altera sus propiedades adhesivas. En los tejidos embrionarios como el cerebro, el ácido polisiálico constituye tanto como el 25% de la masa de las NCAM. Debido tal vez a la repulsión entre los numerosos azúcares cargados negativamente en estas NCAM, los contactos entre célula y célula son bastante transitorios, se arman y desarman una propiedad necesaria para el desarrollo del sistema nervioso. Por el contrario, las NCAM de los tejidos adultos contienen sólo un tercio de ácido siálico, lo que permite adhesiones más estables.

El movimiento de los leucocitos hacia el interior de los tejidos depende de una secuencia precisa de diversas combinaciones de interacciones adhesivas

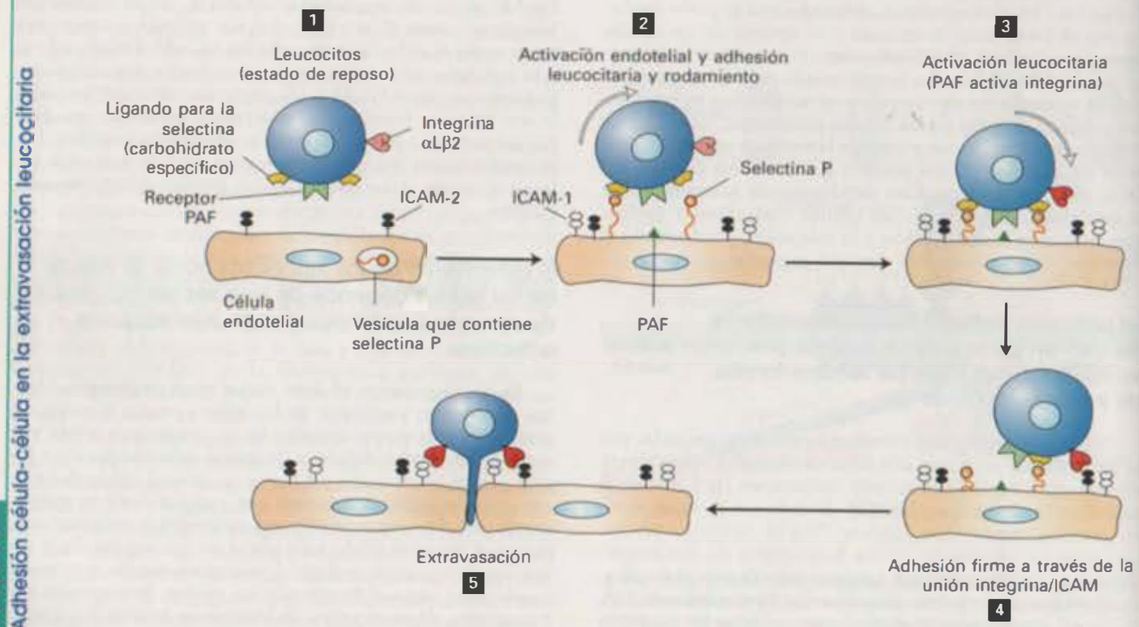
En los organismos adultos, varios tipos de glóbulos blancos (leucocitos) participan en la defensa contra la infección causada por invasores extraños (p. ej., bacterias y virus) y el daño de los tejidos debido a trauma o inflamación. Para luchar contra la infección y hacer a un lado el tejido dañado, estas células deben desplazarse con rapidez desde la sangre, donde circulan como células no adheridas y relativamente inactivas, hacia el tejido subyacente en los lugares de la infección, inflamación o daño. Conocemos mucho acerca del movimiento hacia el interior de los tejidos, denominado *extravasación*, de cuatro tipos de leucocitos: neutrófilos, que liberan varias proteínas antibacterianas; monocitos, los precursores de los macrófagos, que pueden fagocitar y destruir partículas extrañas; y los linfocitos T y B, las células reconocedoras de antígenos del sistema inmunitario.

La extravasación requiere la formación y ruptura sucesivas de los contactos intercelulares entre los leucocitos de la sangre y las células del endotelio que revisten los vasos. Algunos de estos contactos están mediados por selectinas, una familia de las CAM que median las interacciones entre las células vasculares y los leucocitos. Un participante clave en estas interacciones es la *selectina P*, localizada en la superficie de las células del endotelio orientadas hacia la sangre. Todas las selectinas contienen un *dominio de lectina* dependiente del

Ca^{2+}, localizado en el extremo distal de la región extracelular de la molécula y que reconoce los oligosacáridos en las glucoproteínas o en los glucolípidos (véase fig. 6-2). Por ejemplo, el principal ligando de las selectinas P y E es un oligosacárido llamado *antígeno x sialilo de Lewis*, parte de oligosacáridos más largos abundantes en las glucoproteínas y los glucolípidos de los leucocitos.

La figura 6-30 ilustra la secuencia básica de las interacciones intercelulares que conduce a la extravasación de leucocitos. Diversas señales inflamatorias liberadas en áreas de infección o inflamación provocan primero la activación del endotelio. La selectina P expuesta sobre la superficie de células endoteliales activadas media las adhesiones débiles con los leucocitos circulantes. Debido a la fuerza del flujo de sangre y las rápidas velocidades de "encendido" y "apagado" de la unión de la selectina P a sus ligandos, estos leucocitos "atrapados" se desplazan a una velocidad menor, pero no son detenidos y literalmente ruedan a lo largo de la superficie del endotelio. Entre las señales que promueven la activación del endotelio están las *quimocinas*, un grupo de proteínas pequeñas secretadas (8-12 kDa) producidas por una amplia variedad de células, incluidas las células endoteliales y los leucocitos.

Para que tengan lugar las adhesiones fuertes entre las células endoteliales activadas y los leucocitos, las integrinas que contienen β2 sobre las superficies de los leucocitos también deben estar activadas por quimocinas u otras señales de activación local, como el factor activador de plaquetas (PAF). El factor activador de plaquetas es poco común porque es un fosfolípido, más que una proteína; está expuesto sobre la superficie de células endoteliales activadas al mismo tiempo que está expuesta la selectina P. La unión de PAF u otros activadores a sus receptores sobre los leucocitos conduce a la activación de las integrinas de los leucocitos para llevarlas a su forma de alta afinidad (véase fig. 6-28). (La mayoría de los receptores para las quimocinas y los PAF son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G analizada en el capítulo 13.) Luego las integrinas activadas sobre los leucocitos se unen a cada una de las dos IgCAM sobre la superficie de células endoteliales: ICAM-2, que se expresa de manera constitutiva, e ICAM-1. ICAM-1, cuya síntesis, junto con la de la selectina E y la selectina P es inducida por activación, no suele contribuir demasiado a la adhesión celular endotelial del leucocito inmediatamente después de la activación, sino más bien participa con posterioridad en casos de inflamación crónica. La adhesión fuerte resultante mediada por las interacciones de la integrina ICAM independiente del CA^{2+} conduce a la cesación del rodamiento y a la dispersión de leucocitos sobre la superficie del endotelio; pronto, las células adheridas se mueven entre las células endoteliales adyacentes y dentro del tejido subyacente.



▲ Fig. 6-30. Secuencia de las interacciones entre células que conducen a la unión fuerte de leucocitos a células endoteliales activadas y a la extravasación subsecuente. Paso 1: En ausencia de inflamación o infección, los leucocitos y las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos se encuentran en estado de reposo. Paso 2: Las señales inflamatorias liberadas sólo en áreas de inflamación o infección, o ambas, activan las células endoteliales en reposo para mover las selectinas, secuestradas en vesículas, a la superficie celular. Las selectinas expuestas median la unión débil de los leucocitos al interactuar con ligandos de carbohidrato sobre los leucocitos. La activación del endotelio también provoca la síntesis del factor activador de plaquetas (PAF) y de ICAM-1, ambos expresados sobre la superficie celular. Los PAF y otros activadores generalmente secretados, incluidas las quimocinas, inducen luego cambios en las formas de los leucocitos y la activación de integrinas de los leucocitos, como αLβ2, que es expresada por los linfocitos T (3). La unión fuerte entre las integrinas activadas sobre los leucocitos y las CAM sobre el endotelio (p. ej., ICAM-2 e ICAM-1) provoca la adhesión firme (4) y el movimiento subsiguiente (extravasación) hacia el tejido subyacente (5). Para mayores detalles véase el texto. (Adaptado de R. O. Hynes y A. Lander, 1992 Cell 68:303.)

La figura 6-30 ilustra la secuencia básica de las interacciones intercelulares que conduce a la extravasación de leucocitos. Diversas señales inflamatorias liberadas en áreas de infección o inflamación provocan primero la activación del endotelio. La selectina P expuesta sobre la superficie de células endoteliales activadas media las adhesiones débiles con los leucocitos circulantes. Debido a la fuerza del flujo de sangre y las rápidas velocidades de "encendido" y "apagado" de la unión de la selectina P a sus ligandos, estos leucocitos "atrapados" se desplazan a una velocidad menor, pero no son detenidos y literalmente ruedan a lo largo de la superficie del endotelio. Entre las señales que promueven la activación del endotelio están las *quimocinas*, un grupo de proteínas pequeñas secretadas (8-12 kDa) producidas por una amplia variedad de células, incluidas las células endoteliales y los leucocitos.

Para que tengan lugar las adhesiones fuertes entre las células endoteliales activadas y los leucocitos, las integrinas que contienen β2 sobre las superficies de los leucocitos también deben estar activadas por quimocinas u otras señales de activación local, como el factor activador de plaquetas (PAF). El factor activador de plaquetas es poco común porque es un fosfolípido, más que una proteína; está expuesto sobre la superficie de células endoteliales activadas al mismo tiempo que está expuesta la selectina P. La unión de PAF u otros activadores a sus receptores sobre los leucocitos conduce a la activación de las integrinas de los leucocitos para llevarlas a su forma de alta afinidad (véase fig. 6-28). (La mayoría de los receptores para las quimocinas y los PAF son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G analizada en el capítulo 13.) Luego las integrinas activadas sobre los leucocitos se unen a cada una de las dos IgCAM sobre la superficie de células endoteliales: ICAM-2, que se expresa de manera constitutiva, e ICAM-1. ICAM-1, cuya síntesis, junto con la de la selectina E y la selectina P es inducida por activación, no suele contribuir demasiado a la adhesión celular endotelial del leucocito inmediatamente después de la activación, sino más bien participa con posterioridad en casos de inflamación crónica. La adhesión fuerte resultante mediada por las interacciones de la integrina ICAM independiente del CA^{2+} conduce a la cesación del rodamiento y a la dispersión de leucocitos sobre la superficie del endotelio; pronto, las células adheridas se mueven entre las células endoteliales adyacentes y dentro del tejido subyacente.

La adhesión selectiva de leucocitos al endotelio cerca de los sitios de infección o inflamación depende así de la aparición y activación secuencial de varias CAM diferentes sobre las superficies de las células en interacción. Diferentes tipos de leucocitos expresan integrinas específicas que contienen la subunidad β2: por ejemplo, la αLβ2; por los linfocitos T y la αMβ2 por los monocitos, los precursores circulantes de los macrófagos tisulares. No obstante, todos los leucocitos se movilizan al interior de los tejidos por el mismo mecanismo general representado en la figura 6-30.

Muchas de las CAM utilizadas para dirigir la adhesión de leucocitos son compartidas entre diferentes tipos de leucocitos y tejidos diana. A pesar de ello, a menudo un único tipo de leucocitos se dirige a un tejido en particular. Se propuso un modelo de tres pasos para dar cuenta de la especificidad de tipo celular de tales interacciones entre leucocitos y células del endotelio. Primero, la activación del endotelio promueve fijaciones reversibles, transitorias y en principio relativamente débiles (p. ej., las interacciones de las selectinas y sus ligandos carbohidrato). Sin señales locales adicionales de activación, el leucocito continuará avanzando con rapidez. Segundo, las células en la vecindad inmediata del sitio de la infección o la inflamación liberan o expresan señales químicas sobre su superficie (p. ej., quimocinas, PAF) que activan sólo subgrupos especiales de leucocitos adheridos transitoriamente. Tercero, CAM dependientes de la activación adicionales (p. ej., las integrinas) involucran a sus compañeros de unión, lo que conduce a una fuerte adhesión sostenida. Sólo si las combinaciones apropiadas de CAM, compañeros de unión y señales de activación participan en el orden correcto en un sitio específico, un leucocito dado se adherirá con firmeza. Este ejemplo adicional de diversidad combinatoria e interacciones cruzadas permite una económica explotación de un pequeño grupo de CAM para diversas funciones corporales.

MEDICINA

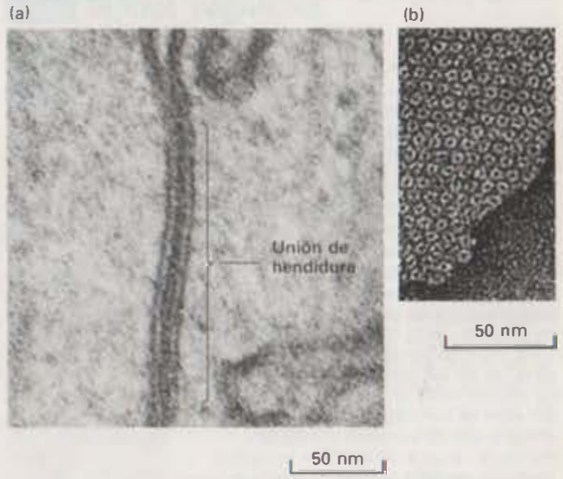
La *deficiencia de adhesión de los leucocitos* es causada por un defecto genético en la síntesis de la subunidad de integrina β2. Las personas con este trastorno son susceptibles de padecer infecciones bacterianas repetidas porque sus leucocitos no pueden extravasarse en forma apropiada y, por ende, luchar contra la infección dentro del tejido.

Algunos virus patógenos han desarrollado mecanismos para explotar en su propio beneficio las proteínas de la superficie celular que participan en la respuesta normal a la inflamación. Por ejemplo, muchos de los virus RNA que provocan el resfrío común (rinovirus) se unen a las células y entran en ellas a través de las ICAM-1, y los receptores de quimocina pueden ser sitios de entrada importantes para el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) que provoca el SIDA.

Las uniones de hendidura compuestas de conexinas les permiten a las moléculas pequeñas pasar entre las células adyacentes

Las primeras microfotografías electrónicas de casi todas las células animales que estaban en contacto revelaban sitios de contacto intercelulares con una hendidura intracelular característica (fig. 6-31a). Esta característica motivó a los primeros morfologistas a llamar a estas regiones uniones de hendidura. En retrospectiva, la característica más importante de estas uniones no es la hendidura en sí, sino un conjunto bien definido de partículas cilíndricas que cruzan la hendidura y componen poros que conectan los citoplasmas de células adyacentes; de ahí su nombre alternativo de uniones *intercitoplasmáticas*. En el epitelio, las uniones de hendidura se distribuyen a lo largo de las superficies laterales de células adyacentes (véanse figs. 6-1 y 6-5).

En muchos tejidos (p. ej., el hígado), grandes cantidades de partículas cilíndricas individuales se reunen en parches. Esta propiedad permitió a los investigadores separar las uniones de hendidura de otros componentes de la membrana plasmática. Cuando se purifica la membrana plasmática y luego se la corta en fragmentos pequeños, se generan algunos trozos que contienen principalmente parches de uniones de hendidura. Debido a su contenido de proteínas relativamente alto, estos fragmentos tienen una densidad más alta que la mayor parte de la membrana plasmática y pueden ser purificados en un gradiente de densidad en equilibrio (véase fig. 5-37). Cuando



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 6-31 Las uniones de hendidura tienen un aspecto característico en las microfotografías electrónicas. (a) En esta delgada sección a través de una unión de hendidura que conecta dos células de hígado de rata, las dos membranas plasmáticas están estrechamente asociadas a lo largo de un tramo de varios cientos de nanómetros, separadas por una "hendidura" de 2-3 nm. (b) Numerosas partículas aproximadamente hexagonales son visibles en esta vista perpendicular de la cara citosólica de una región de la membrana plasmática rica en uniones de hendidura. Cada partícula se alinea con una partícula similar sobre una célula adyacente y forma un canal que conecta las dos células. [Parte (a) cortesía de D. Goodenough. Parte (b) cortesía de N. Gilula.]

estas preparaciones se visualizan en un corte transversal, las uniones de hendidura aparecen como disposiciones de partículas hexagonales que encierran canales llenos de agua (fig. 6-31b). Tales preparaciones puras de las uniones de hendidura permitieron el análisis funcional y biofísico detallado de estas estructuras.

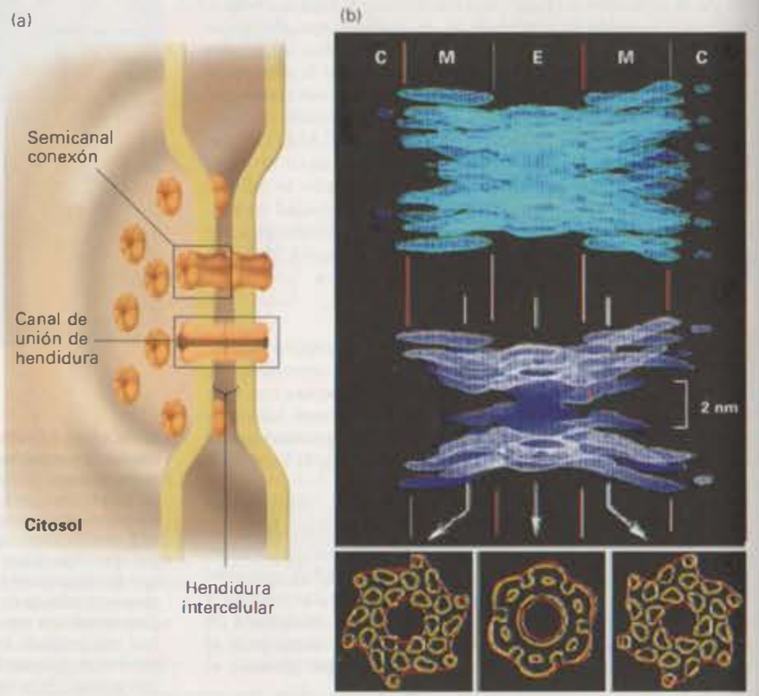
El tamaño eficaz de los poros de las uniones de hendidura se puede medir al inyectar una célula con colorante fluorescente unido covalentemente a moléculas de varios tamaños y observar con un microscopio de fluorescencia si el colorante pasa hacia las células circundantes. Las uniones de hendidura entre las células de los mamíferos permiten el pasaje de moléculas tan grandes como 1,2 nm de diámetro. En los insectos, estas uniones son permeables a moléculas de hasta 2 nm de diámetro. En general, las moléculas menores de 1.200 Da pasan libremente y las mayores de 2.000 Da no; el pasaje de moléculas de tamaño intermedio es variable y limitado. Por ello, los iones, muchos precursores de macromoléculas celulares de bajo peso molecular, los productos del metabolismo intermedio y las moléculas señalizadoras intracelulares pequeñas pueden pasar de una célula a otra a través de las uniones de hendidura.

En el tejido nervioso, algunas neuronas están conectadas mediante uniones de hendidura a través de las cuales los iones pasan con rapidez, permitiendo por lo tanto la transmisión inmediata de señales eléctricas. La transmisión de impulsos a través de estas conexiones, denominadas sinapsis eléctricas, es casi mil veces más veloz que las de las sinapsis químicas (cap. 7). Las uniones de hendidura están también presentes en muchos tejidos no neuronales donde ayudan a integrar las actividades eléctricas y metabólicas de numerosas células. En el corazón, por ejemplo, las uniones de hendidura pasan con rapidez señales iónicas entre las células musculares y contribuyen, por ende, a las contracciones coordinadas de las células cardíacas durante cada latido, al ser estimuladas eléctricamente. Como se analizará en el capítulo 13, algunas señales hormonales extracelulares inducen la producción y liberación de moléculas intracelulares señalizadoras pequeñas denominadas segundos mensajeros (p. ej., el AMP cíclico y el Ca^{2+}) que regulan el metabolismo celular. Debido a que los segundos mensajeros pueden ser transferidos entre células a través de las uniones de hendidura, la estimulación hormonal de una célula puede disparar una respuesta coordinada de la misma célula y de muchas de sus vecinas. Tal señalización mediada por uniones de hendidura cumple una función importante, por ejemplo, en la secreción de enzimas digestivas por el páncreas y en las ondas de contracción muscular coordinadas (peristalsis) en el intestino. Otro ejemplo vívido del transporte mediado por uniones de hendidura es el fenómeno del *acoplamiento metabólico*, o *cooperación metabólica*, en el cual una célula transfiere nutrientes o metabolitos intermedios a una célula vecina incapaz de sintetizarlos por sí misma. Las uniones de hendidura cumplen papeles críticos en el desarrollo de células huevo en el ovario al mediar el movimiento tanto de metabolitos y moléculas señal entre un ovocito y las células granulosas circundantes, así como entre las células granulosas vecinas.

Un modelo actual de la estructura de la unión de hendidura se muestra en la figura 6-32. Las uniones de hendidura de los vertebrados están compuestas de conexinas, una familia de proteínas transmembrana estructuralmente emparentadas con pesos moleculares entre 25.000 y 60.000. Una familia de proteínas completamente diferente, las inexinas, forman las uniones de hendidura en los invertebrados. Cada partícula hexagonal de vertebrados consta de 12 moléculas de conexina: 6 de las moléculas están dispuestas dentro de un semicanal conexón –un cilindro hexagonal en una membrana plasmática– y se unen a un semicanal conexón en la membrana celular adyacente, formando el canal acuoso continuo entre las células. Cada molécula de conexina atraviesa cuatro veces la membrana plasmática; una hélice α transmembrana conservada de cada subunidad aparentemente reviste el canal acuoso.

Existen más de 20 genes diferentes de conexina en los vertebrados y en diferentes tipos de células se expresan distintos grupos de conexinas. Algunas células expresan una conexina única; en consecuencia, sus canales de uniones de hendidura son homotípicos y están constituidos por conexones idénticos. Sin embargo, la mayoría de las células expresa al menos dos conexinas; estas proteínas distintas se agrupan para formar conexones heterooligoméricos, que a su vez forman canales de uniones de hendidura heterotípicos. Esta diversidad en la composición de los canales conduce a diferencias en la permeabilidad de los canales para diversas moléculas. Por ejemplo, los canales constituidos por una isoforma de la conexina de 43 kDa, la Cx43, son más de cien veces más permeables al ADP y al ATP que los constituidos por Cx32 (32 kDa). Más aún, la permeabilidad de las uniones de hendidura puede alterarse por cambios en el pH extracelular y la concentración de Ca^{2+}, al igual que por la fosforilación de la conexina, proporcionando numerosos mecanismos para regular el transporte a través de ellas.

La generación de ratones mutantes con mutaciones inactivantes en los genes de conexina resaltó la importancia de las conexinas en una amplia variedad de sistemas celulares. Por ejemplo, los ratones con la Cx43 defectuosa exhiben numerosas alteraciones incluida la maduración defectuosa del oocito debido a la comunicación disminuida a través de las uniones de hendidura entre las células granulosas del ovario.



▶ Fig. 6-32. Estructura molecular de las uniones de hendidura. (a) Modelo esquemático de una unión de hendidura, que comprende un conjunto de canales entre dos membranas plasmáticas separadas por un intervalo de alrededor de 2-3 nm. Ambas membranas contienen semicanales de conexón, cilindros de seis moléculas de conexina con forma de clava. Dos conexones se unen en el intervalo entre las células para formar un canal de unión de hendidura, de 1,5-2,0 nm de diámetro, que conecta los citosoles de las dos células. (b) Densidad de electrones de un canal recombinante de unión de hendidura determinado por cristalografía de electrones. Aquí se muestran vistas laterales de la estructura completa (*arriba*) y la misma estructura con varias cadenas eliminadas para mostrar el interior del canal (*centro*); abajo hay cortes transversales perpendiculares a través de la unión de hendidura entre las bicapas de la membrana y dentro de ella. Parece haber 24 hélices α transmembrana por semicanal de conexón, concordante con que cada una de las seis subunidades de conexina tiene cuatro hélices α. La parte más estrecha del canal es de 1,5 nm de diámetro. M: bicapa de la membrana; E: intervalo extracelular; C: citosol. [Parte (b) de V. M. Unger et al., 1999, Science 283:1176.]

La generación de ratones mutantes con mutaciones inactivantes en los genes de conexina resaltó la importancia de las conexinas en una amplia variedad de sistemas celulares. Por ejemplo, los ratones con la Cx43 defectuosa exhiben numerosas alteraciones incluida la maduración defectuosa del oocito debido a la comunicación disminuida a través de las uniones de hendidura entre las células granulosas del ovario.

MEDICINA

Las mutaciones en diversos genes de conexina se relacionan con enfermedades humanas, entre ellas, la sordera neurosensorial (Cx26 y Cx31), las cataratas o las malformaciones del corazón (Cx43, Cx46 y Cx50) y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth ligada al cromosoma X (Cx32), caracterizada por una degeneración progresiva de los nervios periféricos. ▮

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 6.5

Interacciones adhesivas y células no epiteliales

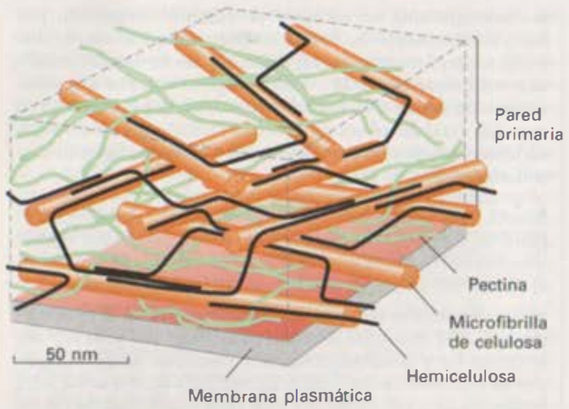
- Muchas células no epiteliales tienen agregados que contienen integrinas (p. ej., adhesiones focales, adhesiones 3D, podosomas) que conectan física y funcionalmente las células a la matriz extracelular y facilitan el envío de señales de adentro hacia afuera y de afuera hacia adentro.
- Las integrinas existen en dos conformaciones que difieren en la afinidad por los ligandos y las interacciones con las proteínas adaptadoras citosólicas (véase fig. 6-28).
- Distroglucano, un receptor de adhesión expresado por las células musculares, forma un gran complejo con la distrofina, otras proteínas adaptadoras y las moléculas señalizadoras (véase fig. 6-29). Este complejo conecta el citoesqueleto de actina a la matriz circundante y proporciona al músculo estabilidad mecánica. Las mutaciones en diversos componentes de este complejo causan distintos tipos de distrofia muscular.
- Las moléculas de adhesión de las células neurales, que pertenecen a las CAM de la familia de las inmunoglobulinas (Ig), median la adhesión independiente del Ca^{2+} entre células, predominantemente en el tejido nervioso y muscular.
- La interacción secuencial y combinatoria de diversos tipos de CAM (p. ej., las selectinas, las integrinas y las ICAM) es crítica para la adhesión fuerte y específica de distintos tipos de leucocitos a las células endoteliales en respuesta a las señales locales inducidas por infección o inflamación (véase fig. 6-30).
- Las uniones de hendidura están constituidas por múltiples copias de proteínas conexina, ensambladas para formar un canal transmembrana que interconecta el citoplasma de dos células adyacentes (véase fig. 6-32). Moléculas pequeñas y iones pueden pasar a través de las uniones de hendidura, permitiendo el acoplamiento metabólico y eléctrico de células adyacentes.

6.6 Tejidos vegetales

PLANTAS

Nos centramos ahora en el ensamblado de células vegetales para formar tejidos. La organización estructural de las plantas suele ser más simple que la de los animales. Por ejemplo, las plantas tienen sólo cuatro tipos de células, que en las plantas maduras forman cuatro clases básicas de tejidos: el *tejido dérmico* interactúa con el medio ambiente; el *tejido vascular* transporta agua y sustancias disueltas (p. ej., azúcares, iones); el *tejido de sostén* que constituye uno de los sitios principales del metabolismo; y el *tejido esporógeno* forma los órganos reproductivos. Los tejidos vegetales están organizados en apenas cuatro tipos principales de sistemas de órganos; los *tallos* tienen funciones de soporte y transporte; las *raíces* proveen anclaje y absorben y mantienen nutrientes; las *hojas* son los sitios de la fotosíntesis; y las *flores* encierran las estructuras reproductivas. Así, en los niveles celular, tisular y de los órganos, las plantas suelen ser menos complejas que la mayoría de los animales.

Más aún, a diferencia de los animales, las plantas no reemplazan o reparan las células o los tejidos viejos o dañados; simplemente forman nuevos órganos. Lo más importante para este capítulo y, a diferencia de los animales, es que pocas células en las plantas están en contacto directo entre ellas a través de moléculas incorporadas en sus membranas plasmáticas. En cambio, las células vegetales están casi siempre rodeadas por una pared celular rígida que está en contacto con las paredes de células adyacentes (fig. 6-33). También a diferencia de las células animales, una célula vegetal rara vez cambia su posición en el organismo en relación con otras células. Estos rasgos de los vegetales y su organización han determinado los mecanismos moleculares distintivos por los cuales sus células forman tejidos. ▮



▲ Fig. 6-33. Representación esquemática de la pared celular de una cebolla. La celulosa y la hemicelulosa se disponen al menos en tres capas en una matriz de polímeros de pectina. El tamaño de los polímeros y sus separaciones están dibujadas a escala. Para simplificar el diagrama, la mayor parte de los enlaces cruzados de la hemicelulosa y otros constituyentes de la matriz (p. ej., extensina, lignina) no se muestran. (Adaptado de M. McCann y K. R. Roberts, 1991, en C. Lloyd, ed., The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form, Academic Press, p.126.)

La pared de la célula vegetal es un laminado de fibrillas de celulosa en una matriz de glucoproteínas

La pared de la célula vegetal es de alrededor de 0,2 µm de espesor y recubre por completo el exterior de la membrana plasmática de la célula vegetal. Esta estructura cumple algunas de las funciones de la matriz extracelular producida por las células animales, a pesar de que las dos estructuras están compuestas de macromoléculas totalmente diferentes y tienen una organización distinta. Al igual que la matriz extracelular, la pared de la célula vegetal conecta las células para formar tejidos, le indica a la célula que crezca y se divida, y controla la forma de los órganos. Como la matriz extracelular ayuda a definir las formas de las células animales, la pared celular define la forma de las células vegetales. Cuando la pared celular de las células vegetales se degrada mediante enzimas hidrolíticas, quedan células esféricas encerradas por una membrana plasmática. En el pasado, la pared celular vegetal se consideraba una caja rígida inanimada; ahora es reconocida como una estructura dinámica que cumple una función importante para controlar la diferenciación de las células vegetales durante la embriogénesis y el crecimiento.

Debido a que la principal función de la pared de una célula vegetal es soportar la presión de turgencia osmótica de la célula, la pared está construida para tener fuerza lateral. Está dispuesta en capas de microfibrillas de celulosa: haces de polímeros largos y lineales extensamente unidos por enlaces hidrógeno, compuestos de glucosas unidas entre sí mediante uniones β glucosídicas. Las microfibrillas de celulosa están incrustadas en una matriz compuesta de *pectina*, un polímero del ácido D-galacturónico y otros monosacáridos, y de *hemicelulosa*, un polímero corto y muy ramificado de varios monosacáridos de cinco y seis carbonos. La fuerza mecánica de la pared celular depende de los enlaces cruzados de las microfibrillas con las cadenas de hemicelulosa (véase fig. 6-33). Las capas de microfibrillas evitan que la pared celular se estire lateralmente. Las microfibrillas de celulosa se sintetizan en la cara exoplasmática de la membrana a partir de UDP-glucosa y ADP-glucosa formados en el citosol. La enzima polimerizante, llamada *celulosa sintasa*, se mueve dentro del plano de la membrana plasmática a medida que se forma la celulosa, en direcciones determinadas por el citoesqueleto de microtúbulos subyacente.

A diferencia de la celulosa, la pectina y la hemicelulosa son sintetizadas en el aparato de Golgi y transportadas a la superficie celular donde forman un retículo entrecruzado que ayuda a unir las paredes de células adyacentes entre sí y les da un soporte elástico. Cuando se las purifica, las pectinas unen agua y forman un gel en presencia de Ca^{2+} y iones borato; de ahí el uso de pectinas en muchas comidas procesadas. Tanto como el 15% de la pared celular puede estar compuesta de *extensina*, una glucoproteína que contiene abundante hidroxiprolina y serina. La mayoría de los residuos de hidroxiprolina están unidos a cadenas cortas de arabinosa (un monosacárido de cinco carbonos), y los residuos de serina están unidos a la galactosa. El carbohidrato da cuenta de casi el 65% del peso de la extensina, y su esqueleto proteico forma una hélice tipo bastón extendida con los hidroxilos o los carbohidratos O-ligados que se proyectan hacia afuera. La *lignina* –un polímero complejo insoluble de residuos fenólicos– se asocia con la celulosa y es un material que añade fuerza. Al igual que los proteoglucanos del cartílago, la lignina resiste las fuerzas de compresión sobre la matriz.

La pared celular es un filtro selectivo cuya permeabilidad está controlada en gran medida por las pectinas de la pared de la matriz. Mientras que el agua y los iones se difunden con libertad a través de las paredes celulares, la difusión de grandes moléculas, incluidas las proteínas mayores de 20 kDa, es limitada. Esta limitación puede dar cuenta de por qué muchas hormonas vegetales son moléculas pequeñas solubles en agua, que pueden difundirse a través de la pared celular e interactuar con los receptores de la membrana plasmática de las células vegetales.

La pérdida de rigidez de la pared celular permite la elongación de las células vegetales

Debido a que la pared celular que rodea una célula vegetal evita que ésta se expanda, su estructura debe volverse más blanda cuando la célula crece. La cantidad, tipo y dirección del crecimiento de la célula vegetal están regulados por pequeñas moléculas de hormonas (p. ej., el ácido indoleacético) denominadas *auxinas*. El debilitamiento de la pared celular inducido por las auxinas permite la expansión de la vacuola intracelular por incorporación de agua y conduce a la elongación de la célula. Podemos apreciar la magnitud de este fenómeno al considerar que, si todas las células de un árbol de secuoya fueran reducidas al tamaño típico de las células hepáticas, el árbol tendría una altura máxima de apenas un metro.

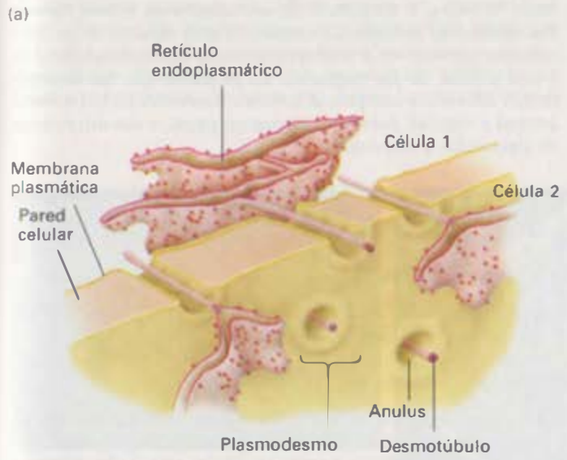
La pared celular sufre los cambios más importantes en el meristema de una raíz o en la punta de un brote. Estos son sitios donde las células se dividen y se expanden. Las células meristemáticas jóvenes están conectadas por paredes celulares delgadas primarias, que pueden ablandarse y estirarse para permitir la elongación celular. Cuando ésta cesa, la pared celular suele estar engrosada, ya sea por secreción de macromoléculas adicionales hacia el interior de la pared primaria o, más a menudo, por la formación de una pared celular secundaria compuesta de varias capas. La mayor parte de la célula finalmente degenera, dejando la pared celular sólo en tejidos maduros como el xilema: los tubos que conducen las sales y el agua desde las raíces a través de los tallos hasta las hojas (véase fig. 8-45). Las propiedades únicas de la madera y de las fibras vegetales, como el algodón, se deben a las propiedades moleculares de las paredes celulares en los tejidos de origen.

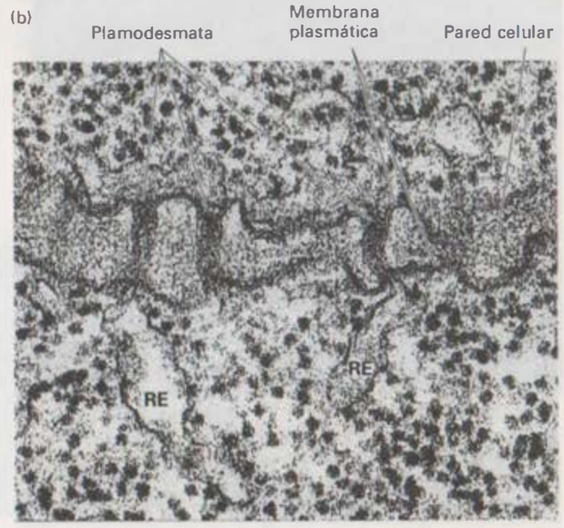
Los plasmodesmos conectan directamente el citosol de células adyacentes en las plantas superiores

Las células vegetales se pueden comunicar directamente a través de uniones intercelulares especializadas denominadas **plasmodesmos**, que se extienden a través de la pared celular. Al igual que las uniones de hendidura, los plasmodesmos son canales abiertos que conectan el citosol de una célula con el de la adyacente. El diámetro del canal lleno de citosol es de 30-60 nm, y los plasmodesmos pueden atravesar paredes celulares de un espesor máximo de 90 nm. La densidad de los plasmodesmos varía según la planta y el tipo de célula, e incluso las células meristemáticas más pequeñas tienen más de 1.000 interconexiones con sus vecinas.

Las moléculas menores de 1.000 Da, incluidos diversos componentes metabólicos y de señalización, suelen difundir a través de los plasmodesmos. Sin embargo, el tamaño del canal a través del cual pasan las moléculas está muy regulado. En algunas circunstancias, el canal está cerrado con fuerza; en otras, está abierto lo suficiente como para permitir el pasaje de moléculas mayores de 10.000 Da. Entre los factores que afectan la permeabilidad de los plasmodesmos está la concentración citosólica de Ca^{2+}, un incremento en el Ca^{2+} citosólico inhibe de manera reversible el movimiento de moléculas a través de estas estructuras.

Aunque los plasmodesmos y las uniones de hendidura se asemejan funcionalmente entre sí, sus estructuras difieren en dos aspectos significativos (fig. 6-34). Las membranas plasmáticas de las células vegetales adyacentes se fusionan para formar un canal continuo, el *anillo*, en cada plasmodesmo, mientras que las membranas de las células en una unión de hendidura no son continuas entre sí. Además, una extensión del retículo endoplasmático llamada *desmotúbulo* pasa a través del anillo, lo que conecta el citosol de células vegetales adyacentes. Muchos tipos de moléculas se diseminan de célula a célula a través de los plasmodesmos, incluidas las proteínas, los ácidos nucleicos, los productos metabólicos y los virus de las plantas. Las moléculas solubles pasan a través del anillo citosólico, mientras que las moléculas unidas a la membrana pueden pasar de una célula a otra a través del desmotúbulo.



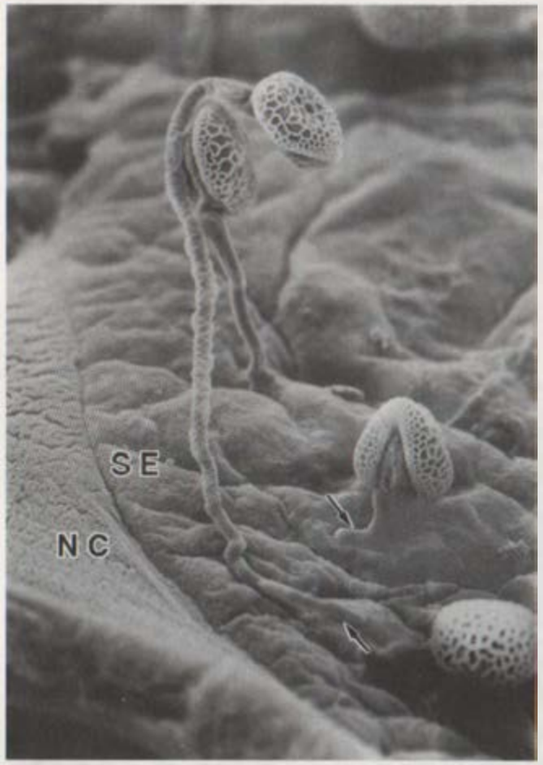


▲ Fig. 6-34. Estructura de un plasmodesmo. (a) Modelo esquemático de un plasmodesmo que muestra los desmotúbulos, una extensión del retículo endoplasmático, y el anillo, un canal revestido por la membrana plasmática lleno de citosol que interconecta los citosoles de células adyacentes. No se representa el complejo de compuerta que llena el canal y controla el transporte de materiales a través del plasmodesmo. (b) Microfotografía electrónica de una sección delgada de la célula vegetal y la pared celular que contiene múltiples plasmodesmos. RE, retículo endoplasmático. (E. H. Newcomb y W. P. Wering/Biological Photo Service.)

Sólo unas pocas moléculas adhesivas han sido identificadas en las plantas

El análisis sistemático del genoma de *Arabidopsis* y los análisis bioquímicos y genéticos de otras especies de plantas no proveen evidencia de la existencia de homólogos vegetales de la mayoría de las CAM, los receptores de adhesión y los componentes de la matriz extracelular de los animales. Este descubrimiento no es sorprendente, dada la naturaleza espectacularmente diferente de las interacciones entre células y entre células y matriz/pared en animales y vegetales.

Entre las proteínas de tipo adhesivo aparentemente exclusivas de los vegetales existen cinco cinasas asociadas con las paredes (*wall-associated kinases*, WAK) y proteínas similares a las WAK expresadas en la membrana plasmática de las células de *Arabidopsis*. Las regiones extracelulares de estas proteínas contienen múltiples repeticiones del factor de crecimiento epidérmico (EGF), que pueden participar directamente en la unión a otras moléculas. Algunas WAK han mostrado unirse a las proteínas ricas en glicina de la pared celular, mediando así los contactos entre la membrana y la pared. Estas proteínas de *Arabidopsis* tienen un dominio transmembrana único y un dominio tirosincinasa citosólico intracelular, que puede participar en las vías de señalización de manera similar a las tirosincinasas receptoras tratadas en el capítulo 14.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 6-35 Ensayo in vitro para identificar moléculas requeridas para la adherencia de tubos de polen a la matriz estilar. En este ensayo, la matriz estilar extracelular recolectada de los estilos del lirio (SE) o una matriz artificial es secada sobre membranas de nitrocelulosa (NC). Tubos de polen que contienen esperma se añaden luego y se evalúa su unión a la matriz secada. En esta microfotografía de barrido electrónico, las puntas de los tubos de polen (flechas) pueden verse uniéndose a la matriz estilar secada. Este tipo de ensayo mostró que la adherencia del polen depende de la adhesina del estigma/estilar rica en cisteína (SCA) y de una pectina que se une a la SCA. (De G. Y. Jauh et al., 1997, Sex Plant Reprod. 10:173.)

El resultado de ensayos de unión in vitro combinados con estudios in vivo y el análisis de mutantes vegetales han identificado diversas macromoléculas en la matriz extracelular importantes para la adhesión. Por ejemplo, la adhesión normal del polen, que contiene células espermáticas, con el estigma o el estilo del órgano reproductor femenino del lirio de Pascua requiere una proteína rica en cisteína denominada adhesina de estigma/estilo rica en cisteína (SCA) y una pectina especializada que se puede unir a la SCA (fig. 6-35).

La interrupción del gen que codifica la glucuroniltransferasa 1, una enzima clave en la biosíntesis de la pectina, ha proporcionado una ilustración llamativa de la importancia de las pectinas en la adhesión intracelular en los meristemas vegetales. Las moléculas de pectina especializadas suelen ayudar a mantener a las células en los meristemas fuertemente juntas. Cuando son cultivadas como un grupo de células relativamente indiferenciadas, denominadas callos, las células meristemáticas normales se adhieren con fuerza y pueden diferenciarse en células productoras de clorofila, dándole al callo un color verde. Por último el callo generará brotes. Por el contrario, las células mutantes con un gen inactivado de glucuroniltransferasa 1 son grandes, se asocian débilmente entre sí y no suelen diferenciarse, formando un callo amarillo. La introducción de un gen normal de glucuroniltransferasa 1 en las células mutantes mediante métodos analizados en el capítulo 9 restablece su capacidad para adherirse y diferenciarse normalmente.

La identificación de pocas moléculas adhesivas vegetales hasta la fecha, a diferencia de las numerosas y bien definidas moléculas adhesivas animales, puede deberse a las dificultades técnicas en el trabajo con la matriz extracelular y la pared celular de los vegetales. Es probable que las interacciones adhesivas cumplan diferentes funciones en la biología animal y vegetal, debido al menos en parte, a sus diferencias en desarrollo y fisiología.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 6.6

Tejidos vegetales

- La integración de células en tejidos en las plantas es fundamentalmente distinta de la constitución de los tejidos animales, debido sobre todo a que cada célula vegetal está rodeada por una pared relativamente rígida.
- La pared celular vegetal está constituida por capas de microfibrillas de celulosa incrustadas en una matriz de hemicelulosa, pectina, extensina y otras moléculas menos abundantes.
- La celulosa, un largo polímero lineal de glucosa, se ensambla en forma espontánea para formar microfibrillas estabilizadas por enlaces de hidrógeno.
- La pared celular define la forma de una célula vegetal y restringe su elongación. El debilitamiento de la pared celular inducido por auxina permite la elongación.
- Las células vegetales adyacentes pueden comunicarse a través de los plasmodesmos, que permiten a las moléculas pequeñas pasar entre las células (véase fig. 6-34).
- Las plantas no producen homólogos de las moléculas adhesivas comunes halladas en los animales. Sólo algunas moléculas adhesivas exclusivas de los vegetales han sido bien documentadas hasta la fecha.

6.7 Crecimiento y uso de los cultivos celulares

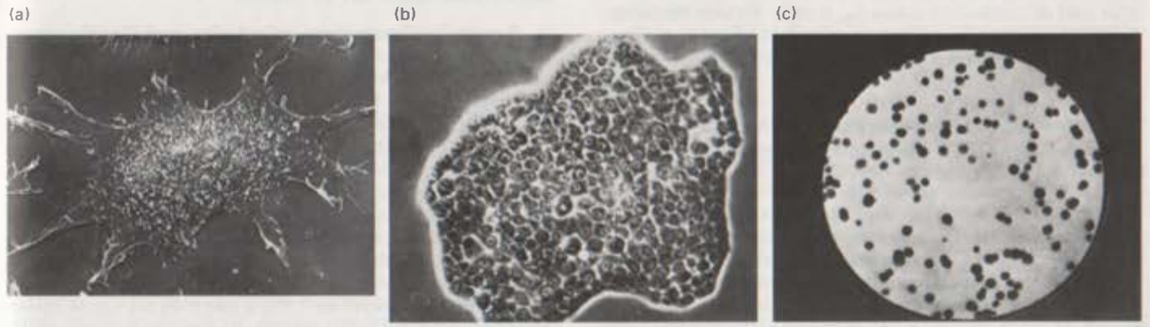
Muchas restricciones técnicas obstaculizan los estudios sobre células específicas o subconjuntos de células en plantas y animales intactos. Una alternativa es el uso de órganos intactos que son extraídos de los animales y perfundidos con una solución amortiguadora apropiada para mantener su integridad fisiológica y su función. Estos sistemas de perfusión de órganos han sido muy utilizados por los fisiólogos. Sin embargo, la organización de los órganos, aun de los que están aislados, es lo suficientemente compleja como para presentar numerosos problemas de investigación acerca de muchos aspectos fundamentales de la biología celular. Por ende, los biólogos celulares y moleculares a menudo conducen estudios experimentales sobre células aisladas de un organismo mantenidas en condiciones que permiten su supervivencia y crecimiento, un procedimiento conocido como *cultivo*.

Las células cultivadas poseen diversas ventajas sobre los organismos intactos para la investigación de la biología celular. Primero, la mayoría de los tejidos animales y vegetales se componen de diversos tipos de células, mientras que pueden ser cultivadas células de un único tipo específico con propiedades homogéneas. Segundo, las condiciones experimentales (p. ej., la composición del medioambiente extracelular) puede controlarse mejor en un cultivo que en un organismo intacto. Tercero, en muchos casos una única célula puede ser cultivada más rápidamente hasta formar una colonia de muchas células idénticas, un proceso denominado clonación celular, o simplemente clonación (fig. 6-36). La cepa de células resultante, que es genéticamente homogénea, se denomina clon. Esta técnica simple, utilizada con muchas bacterias, levaduras y tipos celulares de mamíferos, facilita el aislamiento de clones de células genéticamente distintas.

Una desventaja importante de las células cultivadas es que no se encuentran en su ambiente normal y por ende sus actividades no están reguladas por otras células y tejidos, como ocurre en un organismo intacto. Por ejemplo, la insulina producida por el páncreas tiene un efecto enorme en el metabolismo de la glucosa del hígado; sin embargo, este mecanismo regulador normal no opera en una población purificada de células del hígado (denominadas hepatocitos) cultivadas. Además, como ya se describió, la distribución tridimensional de las células y de la matriz extracelular alrededor de una célula influye en su forma y comportamiento. Debido a que el ambiente inmediato de las células cultivadas difiere radicalmente de su ambiente "normal", sus propiedades pueden verse afectadas de diversas formas. Por ello, es necesario ser prudente antes de sacar conclusiones acerca de las propiedades normales de la célula en tejidos complejos y organismos sólo sobre la base de experimentos con células cultivadas aisladas.

El cultivo de células animales requiere medios ricos en nutrientes y superficies sólidas especiales

A diferencia de la mayoría de las células bacterianas, que pueden ser cultivadas con bastante facilidad, las células animales requieren para el cultivo exitoso muchos nutrientes especializados y a menudo placas con recubrimientos especiales. Para permitir la supervivencia y el funcionamiento normal de células o tejidos cultivados, la temperatura (37° C para las células animales), el pH, la fuerza iónica y el acceso a nutrientes esenciales deben simular lo más cerca posible las condiciones dentro de un organismo intacto. Las células animales aisladas se colocan en un líquido rico en nutrientes, el medio de cultivo, dentro de placas de plástico o frascos especialmente tratados. Los cultivos se mantienen en incubadoras en las cuales pueden controlarse la temperatura, la atmósfera y la humedad. Para reducir las posibilidades de contaminación con hongos, a menudo se añaden antibióticos al me-



▲ Fig. 6-36. Células de mamífero cultivadas visualizadas con tres aumentos. (a) Célula de ratón adherida a una placa de petri plástica, vista a través de un microscopio electrónico de barrido. (b) Colonia aislada de células humanas HeLa de alrededor de 1 mm de diámetro, producidas a partir de una única célula luego de dos semanas de crecimiento. (c) Luego que las células inicialmente introducidas en una placa de petri de 6 cm de diámetro han crecido por varios días y luego de ser teñidas, las colonias individuales pueden ser fácilmente visualizadas y contadas con facilidad. Todas las células en una colonia son la progenie de una célula precursora única y, por ende, son genéticamente idénticas. [Parte (a) cortesía de N. K. Weller. Parte (b) y (c) cortesía de T.T. Puck.]

dio de cultivo. Para protegerlo aún más contra la contaminación, los investigadores suelen transferir células entre placas, añadir reactivos al medio de cultivo y manipular los especímenes dentro de gabinetes especiales que contienen aire circulante que es filtrado para remover microorganismos y otros contaminantes transportados por el aire.

Los medios para cultivar células animales deben estar suplementados con histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina; ninguna célula de animales vertebrados adultos puede sintetizar estos nueve aminoácidos esenciales. Además, la mayoría de las células cultivadas requieren otros tres aminoácidos (cisteína, glutamina y tirosina) que son sintetizados sólo por células especializadas en los animales intactos. Los otros componentes necesarios de un medio para el cultivo de células animales son vitaminas, sales diversas, ácidos grasos, glucosa y suero –el líquido remanente luego de permitir la coagulación de las partes no celulares de la sangre (el plasma). El suero contiene diversos factores proteicos necesarios para la proliferación de células de mamífero en un cultivo. Estos factores incluyen la hormona polipeptídica insulina; la transferrina, que proporciona hierro en una forma bioaccesible; y numerosos factores del crecimiento. Además, ciertos tipos celulares requieren factores del crecimiento especializados no presentes en el suero. Por ejemplo, las células hematopoyéticas requieren eritropoyetina y los linfocitos T requieren interleucina 2 (cap. 14). Algunos tipos de células de mamífero se pueden cultivar en un medio químicamente definido, libre de suero, que contenga aminoácidos, glucosa, vitaminas y sales, además de ciertos oligoelementos, factores de crecimiento proteicos específicos y otros componentes.

A diferencia de las células bacterianas y de las levaduras, que pueden ser cultivadas en suspensión, la mayoría de las células animales crecen sólo sobre superficies sólidas. Esto resalta la importancia de las moléculas de adhesión celular. Muchos tipos de células pueden crecer sobre vidrio o sobre plásticos especialmente tratados con grupos cargados negativamente sobre la superficie (p. ej., SO_3^{2-}). Las células secretan componentes de la matriz extracelular (ECM), que se adhieren a estas superficies, y luego se adhieren y crecen sobre la matriz secretada. Una única célula cultivada sobre una placa de vidrio o de plástico prolifera para formar una masa visible, o *colonia*, que contiene miles de células genéticamente idénticas en 4-14 días, según la velocidad de crecimiento (véase fig. 6-36c). Algunas células sanguíneas especializadas y células tumorales se pueden mantener o cultivar en suspensión como células individuales.

Los cultivos celulares primarios y las cepas celulares tienen un período de vida limitado

Por lo general, se utilizan los tejidos animales normales (p. ej., la piel, el riñón, el hígado) o embriones enteros para establecer *cultivos celulares primarios*. Para preparar células de tejidos para un cultivo primario, se deben romper las interacciones entre célula y célula y entre célula y matriz. Para ello, los fragmentos de tejidos son tratados con una combinación de una proteasa (p. ej., la tripsina o la enzima que hidroliza colágeno, colagenasa, o ambas) y un quelante de catión divalente (p. ej., EDTA) que reduce el nivel de Ca^{2+} o Mg^{2+} del medio. Luego las células liberadas son ubicadas en placas en un medio rico en nutrientes complementado con suero, donde pueden adherirse a la superficie y entre sí. La misma solución de proteasa/quelante se utiliza para extraer las células adheridas de placas de cultivo para estudios bioquímicos o de subcultivo (transferencia a otra placa).

A menudo, los fibroblastos del tejido conectivo se dividen en cultivo más velozmente que las otras células de un tejido y se convierten en el tipo de células predominantes en el cultivo primario, a menos que se tome especial precaución de extraerlas cuando se aíslan otros tipos de células. Ciertas células de la sangre, el bazo o la médula ósea se adhieren mal, si es que lo hacen de algún modo, a una placa de cultivo, pero no obstante crecen bien. En el cuerpo, estas células *no adherentes* se mantienen en suspensión (en la sangre) o son débilmente adherentes (en la médula ósea y en el bazo). Como estas células suelen provenir de estadios inmaduros en el desarrollo de células sanguíneas diferenciadas, son muy útiles para estudiar la diferenciación normal de las células sanguíneas y el desarrollo anormal de las leucemias.

Cuando se cultivan las células extraídas de un embrión o de un animal adulto, la mayoría de las que son adherentes se dividirán un número finito de veces y luego cesa su crecimiento (senectud celular, fig. 6-38a). Por ejemplo, los fibroblastos fetales humanos se dividen alrededor de 50 veces antes de que cese su crecimiento. Comenzando con 10^6 células, 50 duplicaciones pueden producir $10^6 \times 2^{50}$, o más de 10^{20} células, el equivalente al peso de cerca de 10^5 personas. Sólo una pequeñísima fracción de estas células suele utilizarse en un experimento. Por ello, si bien su vida es limitada, un único cultivo, si se mantiene con cuidado, puede ser estudiado durante varias generaciones. Este linaje de células originado a partir de un cultivo primario inicial se denomina una cepa celular.

Las cepas celulares se pueden congelar en un estado de animación suspendida y almacenar por períodos extensos a la temperatura del nitrógeno líquido, siempre que se utilice un preservativo que prevenga la formación de cristales de hielo dañinos. Aunque algunas células no sobreviven el descongelamiento, muchas sobreviven y reanudan el crecimiento. La investigación con cepas celulares se simplifica por la capacidad de congelarlas y descongelarlas con éxito en un período posterior para el análisis experimental.

Las células transformadas proliferan indefinidamente en un cultivo

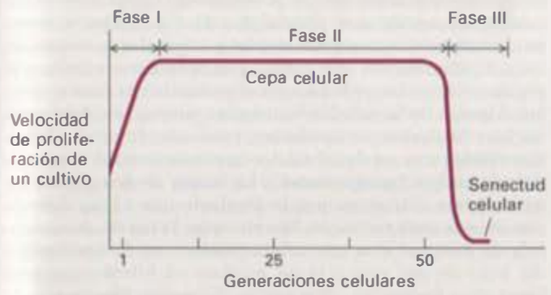
Para poder clonar células individuales, modificar el comportamiento celular o seleccionar mutantes, los biólogos a menudo buscan mantener los cultivos celulares por mucho más de 100 duplicaciones. Tal crecimiento prolongado es exhibido por células derivadas de algunos tumores. Además, células excepcionales en una población de células primarias que atraviesan ciertos cambios genéticos espontáneos, denominadas transformaciones oncogénicas, son capaces de crecer en forma indefinida. Se dice que estas células son transformadas oncogénicamente o *transformadas*. Un cultivo de células con un período de vida indefinido se considera inmortal y se lo denomina línea celular.

La línea celular HeLa, la primera línea celular humana, se obtuvo originariamente en 1952 a partir de un tumor maligno (carcinoma) del cuello uterino. Aunque los cultivos celulares primarios de células humanas normales rara vez se transforman en una línea celular, las células de los roedores suelen hacerlo. Luego de que las células de roedores se desarrollan en un cultivo durante muchas generaciones, el cultivo cae en senectud (fig. 6-37b). Durante este período, la mayoría de las células detiene su crecimiento, pero a menudo una célula transformada que se divide con rapidez surge espontáneamente y ocupa o crece por encima del cultivo. Una línea celular derivada de tal variante transformada proliferará de manera indefinida si se le proporcionan los nutrientes necesarios.

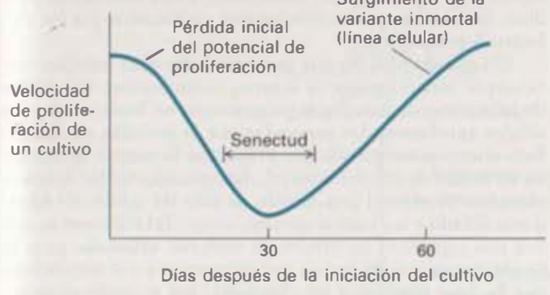
Sin importar la fuente, las células de las líneas inmortales a menudo tienen cromosomas con estructuras anormales. Además, el número de cromosomas en tales líneas suele ser más grande que el de la célula normal del cual surgieron, y el número de cromosomas se expande y contrae a medida que la célula continúa dividiéndose en el cultivo. Una excepción notoria es la línea del ovario de hámster chino (CHO) y sus derivados, que tienen menos cromosomas que sus hámsters progenitores. Se dice que las células con un número anormal de cromosomas son *aneuploides*.

La mayoría de las líneas celulares han perdido algunas o muchas de las funciones características de las células diferenciadas de las cuales fueron derivadas. Estas células relativamente indiferenciadas son malos modelos para investigar las funciones normales de tipos especiales de células. Lo mejor a este respecto son varias líneas celulares más diferenciadas que exhiben muchas propiedades de las células normales no transformadas. Estas líneas incluyen el tumor de hígado (hepatoma), la línea HepG2, que sintetiza la mayoría de las proteínas del suero producidas por las células normales del hígado (hepatocitos). Otro ejemplo consiste en células de una cierta línea de fibroblastos cultivados, que en ciertas condiciones experimentales se comportan como células precursoras de los músculos, o mioblastos. Estas células pueden ser inducidas a fusionarse para formar miotubos, que se asemejan a las células musculares diferenciadas multinucleadas y a sintetizar muchas de las proteínas especializadas asociadas con la contracción. El resultado de estudios con esta línea celular ha proporcionado información valiosa acerca de la diferenciación del músculo (cap. 22). Por último, como ya dijimos, la línea celular MDCK retiene muchas propiedades de las células epiteliales altamente diferenciadas y en los cultivos forma láminas epiteliales bien definidas (véase fig. 6-6).

(a) Células humanas



(b) Células murinas

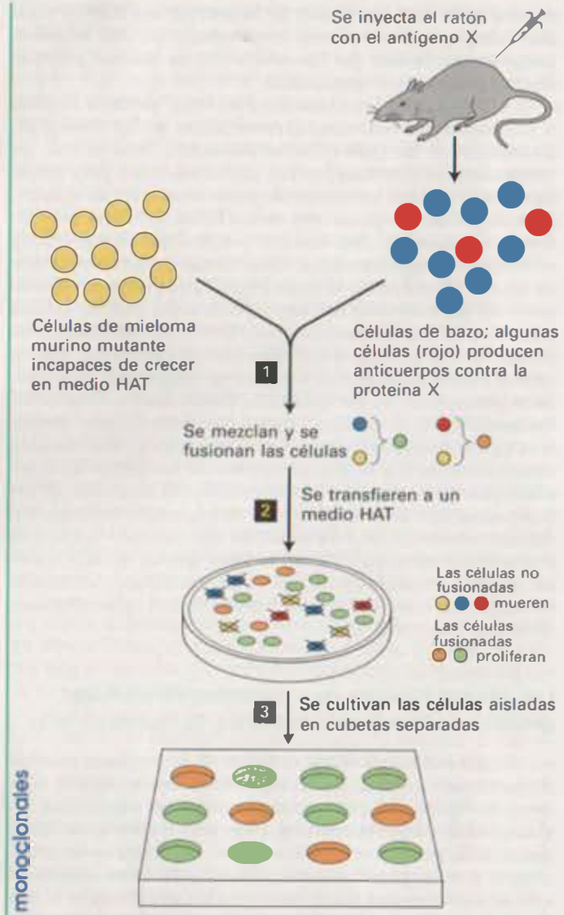


▲ Fig. 6-37. Etapas en el establecimiento de un cultivo celular. (a) Cuando las células aisladas de un tejido humano son cultivadas inicialmente, algunas células mueren y otras (principalmente los fibroblastos) comienzan a crecer; en general, la velocidad de crecimiento se incrementa (fase I). Si las células remanentes son cultivadas, diluidas y vueltas a colocar en placas una y otra vez, la línea celular continúa dividiéndose a un ritmo constante por alrededor de 50 generaciones celulares (fase II), luego de las cuales la velocidad de crecimiento celular cae rápidamente. En el período resultante (fase III), todas las células en el cultivo dejan de crecer (senectud). (b) En un cultivo preparado a partir de las células de ratón o de otro roedor, la muerte celular inicial (no mostrada) está acoplada con el surgimiento de células saludables en crecimiento. A medida que estas células en división son diluidas y se les permite continuar proliferando, comienzan pronto a perder su potencial de crecimiento y la mayoría deja de crecer (es decir, el cultivo cae en la senectud). Muy pocas células sobreviven y continúan dividiéndose hasta que su progenie prolifera sobrepasando el cultivo. Estas células constituyen la línea celular, que crecerá de manera indefinida si está apropiadamente diluida y alimentada con nutrientes: se dice que tales células son inmortales.

Las células híbridas denominadas hibridomas producen abundantes anticuerpos monoclonales

Además de servir como modelos de investigación acerca de la función celular, las células cultivadas se pueden convertir en "fábricas" para producir proteínas específicas. En el capítulo 9 describimos cómo lograrlo mediante la introducción de genes que codifican insulina, factores de crecimiento y otras proteínas terapéuticamente útiles dentro de células bacterianas o eucariontes. Aquí consideramos el uso de células cultivadas especiales para generar anticuerpos monoclonales, que son herramientas experimentales muy utilizadas y cada vez más en medicina para propósitos terapéuticos y de diagnóstico.

Para entender el desafío de generar anticuerpos monoclonales, debemos revisar brevemente cómo los mamíferos producen anticuerpos. Cada linfocito B normal en un mamífero es capaz de producir un único tipo de anticuerpo dirigido contra (puede unirse a) una estructura química específica (llamada un determinante o epítopo) sobre una molécula de antígeno. Si a un animal se lo inyecta con un antígeno, se estimula el crecimiento de los linfocitos B y la secreción por parte de éstos de los anticuerpos que reconocen el antígeno. Cada linfocito B activado por el antígeno forma un clon de células en el bazo o los ganglios linfáticos, con cada célula del clon produciendo exactamente el mismo anticuerpo; es decir, un anticuerpo monoclonal. Debido a que la mayoría de los antígenos naturales contienen múltiples epítopos, la exposición de un animal a un antígeno suele estimular la formación de varios clones distintos de linfocitos B, cada uno de los cuales produce un anticuerpo diferente. La mezcla resultante de anticuerpos que reconocen diferentes epítopos sobre el mismo antígeno se dice que es *policlonal*. Tales anticuerpos policlonales circulan en la sangre y pueden ser aislados como un



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 6-38 Utilización de células fusionadas y selección para obtener hibridomas productores de anticuerpo monoclonal contra una proteína específica. Paso 1: las células de mieloma inmortales que carecen de HGPRT, una enzima requerida para el crecimiento en un medio de selección HAT, son fusionadas con células normales de bazo productoras de anticuerpos de un animal que fue inmunizado con el antígeno X. Las células del bazo pueden producir HGPRT. Paso 2: Cuando se siembran en un medio HAT, las células no fusionadas no proliferan; tampoco lo hacen las células mutantes de mieloma, porque son incapaces de producir purinas a través de una vía metabólica "de rescate" dependiente de HGPRT (véase fig. 6-41), ni las células del bazo, porque tienen un período limitado de vida en cultivo. Así, solo las células fusionadas formadas a partir de una célula de mieloma y una célula de bazo pueden sobrevivir en un medio HAT, proliferando para formar clones denominados hibridomas. Cada hibridoma produce un anticuerpo único. Paso 3: El análisis de clones individuales identifica aquellos que reconocen al antígeno X. Luego de que un hibridoma que produce un anticuerpo deseado ha sido identificado, el clon puede ser cultivado para producir grandes cantidades de ese anticuerpo.

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación técnica: Preparación de anticuerpos monoclonales

grupo y utilizados para diversos experimentos. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales son requeridos para muchos tipos de experimentos o de aplicaciones médicas. Lamentablemente, la purificación bioquímica de un tipo cualquiera de anticuerpo monoclonal de la sangre no es posible, debido en parte a que la concentración de cualquier anticuerpo es bastante baja.

Por su período de vida limitado, los cultivos primarios de linfocitos B normales tienen utilidad limitada para la producción de anticuerpos monoclonales. Por ello, el primer paso en la producción de un anticuerpo monoclonal es generar células inmortales productoras de anticuerpos. Esta inmortalidad se logra al fusionar linfocitos B normales de un animal inmunizado con linfocitos inmortales transformados denominados *células de mieloma*. Durante la fusión celular, las membranas plasmáticas de dos células se fusionan, permitiendo que sus citosoles y organelas se entremezclen. El tratamiento con ciertas glucoproteínas virales o el producto químico polietilenglicol estimulan la fusión celular. Algunas de las células fusionadas pueden dividirse y sus núcleos finalmente se combinan, produciendo *células híbridas* viables con un único núcleo que contiene los cromosomas de ambos "progenitores". La fusión de dos células genéticamente diferentes puede producir una célula híbrida con nuevas características. Por ejemplo, la fusión de una célula de mieloma con una célula productora de anticuerpos del bazo de una rata o ratón produce un híbrido que prolifera para formar un clon que se denomina hibridoma. Al igual que las células de mieloma, las células de hibridoma crecen con rapidez y son inmortales. Cada hibridoma produce los anticuerpos monoclonales codificados por su linfocito B progenitor.

El segundo paso en este procedimiento para producir anticuerpos monoclonales es separar, o seleccionar, las células de hibridoma de las células progenitoras no fusionadas y las células autofusionadas generadas por la reacción de fusión. Esta selección suele realizarse al incubar la mezcla de células en un medio de cultivo especial, denominado *medio de selección*, que permite el crecimiento de sólo las células de hibridoma debido a sus nuevas características. Tal selección se realiza con rapidez si las células de mieloma utilizadas para la fusión tienen una mutación que bloquea una vía metabólica, que las hace sensibles a ser eliminadas por el medio de selección lo que no ocurre con su pareja de fusión, los linfocitos que no tienen esa mutación. En las células híbridas inmortales, el gen funcional del linfocito puede proveer el producto faltante debido a la mutación en la célula de mieloma, y por ello las células de hibridoma, pero no las células de mieloma, serán capaces de crecer en el medio de selección. Como los linfocitos utilizados en la fusión no están inmortalizados y no se dividen con rapidez, sólo las células de hibridoma proliferarán rápidamente en el medio de selección y pueden por ende ser rápidamente aisladas a partir de la mezcla inicial de células.

La figura 6-38 ilustra el procedimiento para generar y seleccionar hibridomas. En este caso, los linfocitos B normales están fusionados con las células de mieloma que no pueden crecer en un medio HAT, el medio de selección más utilizado en la producción de hibridomas. Sólo los híbridos de mieloma y linfocito pueden sobrevivir y crecer por un período extenso en el medio HAT por razones que describiremos brevemente. Así, el medio de selección permite la separación de las células de hibridoma respecto de ambos tipos de célula progenitora y de cualquier célula autofusionada. Por último, se estudia cada hibridoma seleccionado para determinar la producción del anticuerpo deseado; luego se cultiva algunos de los clones que producen ese anticuerpo en gran escala, para obtener así una cantidad sustancial del anticuerpo monoclonal puro.

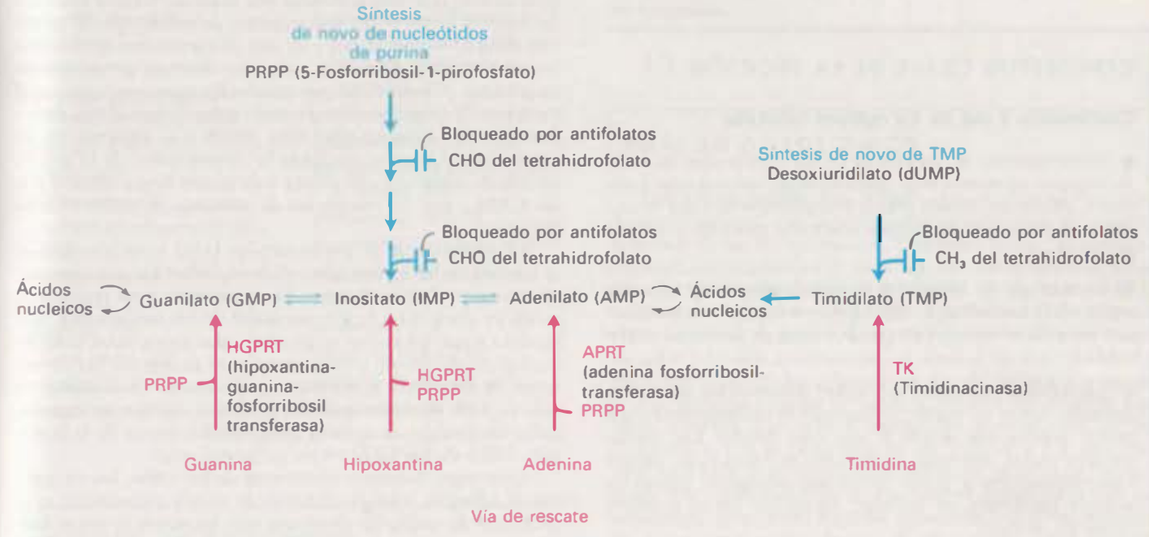


Los anticuerpos monoclonales suelen emplearse en la cromatografía de afinidad para aislar y purificar proteínas de mezclas complejas (véase fig. 3-34c). También se los puede utilizar para marcar y por ende ubicar una proteína particular en células específicas de un órgano y dentro de células cultivadas con el uso de técnicas de microscopia de inmunofluorescencia (véanse figs. 6-25a y 6-27) o en fracciones celulares específicas con el uso de un inmunocoagulante (véase fig. 3-35). Los anticuerpos monoclonales también se vuelven herramientas importantes de diagnóstico y terapéutica en medicina. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se unen a proteínas tóxicas (toxinas) secretadas por patógenos bacterianos y las inactivan, se utilizan para tratar enfermedades provocadas por estos patógenos. Otros anticuerpos monoclonales son específicos de las proteínas de la superficie celular expresadas por cierto tipo de células tumorales; se han desarrollado complejos químicos de tales anticuerpos monoclonales con fármacos tóxicos o simplemente los mismos anticuerpos para la quimioterapia del cáncer. ▮

El medio HAT suele utilizarse para aislar células híbridas

Los principios que subyacen a la selección HAT son importantes para entender no sólo cómo se aíslan las células de hibridoma sino también para comprender otros varios métodos de selección utilizados con frecuencia, incluida la selección de las células ES usadas en la generación de ratones knockout (cap. 9). El medio HAT contiene *h*ipoxantina (una purina), *a*minopterina y *t*imidina. La mayoría de las células animales pueden sintetizar los nucleótidos de purina y pirimidina a partir de compuestos más simples de carbono y nitrógeno (fig. 6-39, *arriba*). Los antagonistas del ácido fólico ametopterina y aminopterina interfieren en la donación de metilo y grupos formilo por el ácido tetrahidrofólico en los estadios tempranos de la síntesis de glicina, monofosfatos de nucleósidos de purina y monofosfatos de timidina. Estos fármacos son denominados *antifolatos* porque bloquean las reacciones de tetrahidrofolato, una forma activa de ácido fólico.

Sin embargo, muchas células son resistentes a los antifolatos porque contienen enzimas que pueden sintetizar los nucleótidos necesarios a partir de bases de purina y timidina (fig. 6-39, *abajo*). Dos enzimas clave en estas *vías de rescate de nucleótidos* son las timidinacinasa (TK) y la hipoxantinguanina fosforibosil transferasa (HGPRT). Las células que producen estas enzimas pueden crecer sobre un



▲ Fig. 6-39. Vías de novo y de salvataje para la síntesis de nucleótidos. Las células animales pueden sintetizar los nucleótidos de purina (AMP, GMP, IMP) y el timidilato (TMP) a partir de componentes más simples por las vías de novo (azul). Éstas requieren la transferencia de un grupo formilo o metilo ("CHO") desde una forma activada de tetrahidrofolato (p. ej., N^5, N^{10}-metilenatetrahidrofolato), como se muestra en la parte superior del diagrama. Los antifolatos, como la aminopterina y la ametopterina, bloquean la reactivación de tetrahidrofolato, impidiendo la síntesis de purina y timidilato. Muchas células animales pueden usar vías de rescate (rojo) para incorporar bases de purina o nucleósidos y timidina. Si estos precursores están presentes en el medio, las células normales crecerán aún en presencia de antifolatos. Las células cultivadas que carecen de una de las enzimas –HGPRT, APRT o TK– de las vías de rescate no sobrevivirán en un medio que contenga antifolatos.

medio HAT, que contiene purinas y timidinas rescatables, mientras que las que carecen de una de ellas no pueden hacerlo.

Se pueden aislar las células con una mutación TK que evita la producción de la enzima funcional TK porque estas células son resistentes a la 5-bromodesoxiuridina. Las células que contienen TK convierten este compuesto en 5-bromodesoxiuridina monofosfato, que luego es convertido en un nucleósido trifosfato por otras enzimas. El trifosfato análogo es incorporado al DNA por la DNA polimerasa, donde ejerce sus efectos tóxicos. Esta vía está bloqueada en los mutantes TK^-, y por ende éstos son resistentes a los efectos tóxicos de la 5-bromodesoxiuridina. En forma similar, las células que carecen de la enzima HGPRT, como las líneas celulares de mieloma $HGPRT^-$ utilizadas para producir hibridomas, se pueden aislar ya que son resistentes al análogo tóxico de la guanina, la 6-tioguanina.

Las células normales pueden crecer en un medio HAT porque, a pesar de que la aminopterina en el medio bloquea la síntesis de novo de purinas y TMP, la timidina en el medio es transportada hacia el interior de la célula y convertida en TMP por las TK y la hipoxantina es transportada y convertida en purinas utilizables por la HGPRT. Por otro lado, ni las células TK^- ni las $HGPRT^-$ pueden proliferar en un medio HAT dado que carecen de una enzima de la vía de rescate. Sin embargo, los híbridos formados por la fusión de estos dos mutantes transportarán un gen *TK* normal a partir del progenitor $HGPRT^-$ y un gen normal *HGPRT* del progenitor TK^-. De esta manera, los híbridos producirán ambas enzimas funcionales de la vía de rescate y crecerán en un medio HAT.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 6.7

Crecimiento y uso de los cultivos celulares

- El crecimiento de las células de los vertebrados en cultivo requiere un medio rico, que contenga aminoácidos esenciales, vitaminas, ácidos grasos y péptidos o factores de crecimiento proteicos; los últimos son frecuentemente provistos por el suero.
- La mayoría de las células de vertebrados cultivadas crecerán sólo cuando estén adheridas a un sustrato cargado negativamente revestido con componentes de la matriz extracelular.
- Las células primarias, derivadas directamente de tejidos animales tienen un potencial limitado de crecimiento en cultivo y pueden dar origen a una cepa celular. Las células transformadas, derivadas de tumores animales o que surgen espontáneamente a partir de células primarias, crecen de manera indefinida en cultivos, formando líneas celulares (véase fig. 6-37).
- La fusión de una célula de mieloma inmortal y un linfocito B único produce una célula híbrida que puede proliferar indefinidamente, formando un clon denominado hibridoma (véase fig. 6-38). Como cada linfocito B individual produce anticuerpos específicos para un determinante antigénico (epítopo), un hibridoma produce sólo el anticuerpo monoclonal sintetizado por su célula progenitora original de linfocito B.
- El medio HAT suele utilizarse para aislar células de hibridomas y otros tipos de células híbridas.

PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO

Un conocimiento más profundo de la integración de las células en tejidos en los organismos complejos derivará del conocimiento y de las técnicas provenientes de casi todas las subdisciplinas de la biología celular y molecular: la bioquímica, la biofísica, la microscopía, la genética, la genómica, la proteómica y la biología del desarrollo. Un importante conjunto de preguntas para el futuro tiene que ver con los mecanismos por los cuales las células detectan las fuerzas mecánicas sobre ellas y sobre la matriz extracelular, al igual que la influencia sobre sus interacciones y disposiciones tridimensionales. Una pregunta relacionada es cómo esta información se utiliza para controlar la estructura y función celular y tisular. Las tensiones pueden inducir diferentes patrones de expresión génica y de crecimiento celular y pueden alterar en gran medida el metabolismo celular y las respuestas al estímulo extracelular. La investigación futura puede darnos un entendimiento mucho más sofisticado de los papeles de la organización tridimensional de las células y los componentes de la matriz extracelular en el control de las estructuras y la actividad de los tejidos.

Numerosas preguntas se relacionan con la señalización intracelular de las CAM y de los receptores de adhesión. Tal señalización debe estar integrada con otras vías de señalización celular que son activadas por diversas señales externas (p. ej., los factores del crecimiento) de modo que la célula responda apropiadamente y de una única manera coordinada frente a muchos diferentes estímulos internos y externos simultáneos. ¿Cómo están construidos los circuitos lógicos que permiten la comunicación cruzada entre diversas vías de señalización? ¿Cómo integran esos circuitos la información de estas vías? ¿Cómo es mediada la combinación de la señalización de adentro hacia afuera y de afuera hacia adentro por las CAM y por los receptores de adhesión reunidos en esos circuitos?

La importancia de las secuencias GAG especializadas en el control de las actividades celulares, sobre todo las interacciones entre algunos factores de crecimiento y sus receptores, es ahora clara. Con la identificación de los mecanismos biosintéticos por los cuales se generan estas estructuras complejas y el desarrollo de herramientas para manipular las estructuras de los GAG y ensayar sus funciones en sistemas de cultivo y en animales intactos, podemos esperar un espectacular incremento de nuestra comprensión acerca de la biología celular de los GAG en los próximos años.

Una rasgo distintivo estructural de las CAM, los receptores de adhesión y las proteínas de la matriz extracelular es la presencia de múltiples dominios que imparten diversas funciones a una única cadena polipeptídica. Se está casi siempre de acuerdo en que tales proteínas multidominio surgieron de manera evolutiva mediante el ensamblaje de distintas secuencias de DNA codificadoras de los diferentes dominios. Los genes codificadores de múltiples dominios proporcionan la oportunidad de generar una enorme diversidad funcional y secuencial mediante corte y empalme alternativo y mediante el uso de promotores alternativos dentro del gen. Así, a pesar de que el número de genes independientes en el genoma humano parece sorprendentemente pequeño en comparación con otros organismos, se pueden producir muchas más moléculas de proteínas distintas de las que se pueden predecir a partir del número de genes. Tal diversidad parece sobre todo adecuada para la generación de proteínas que toman parte en la especificación de conexiones adhesivas en el sistema nervioso, especialmente en el cerebro. En efecto, varios grupos de proteínas expresadas por las neuronas parecen tener justo esa diversidad combinatoria de estructura. Ellas incluyen las protocadherinas, una familia de cadherinas con 70 proteínas codificadas por gen; las neurexinas, que comprenden más de 1.000 proteínas codificadas por tres genes; y las Dscams, miembros de la superfamilia de las IgCAM codificadas por un gen de *Drosophila* que tiene el potencial para expresar 38.016 proteínas distintas debido al corte y empalme alternativo. Un objetivo continuo para el trabajo futuro será describir y entender la base molecular de las adhesiones –las "conexiones"– entre célula y célula y entre célula y matriz en el sistema nervioso y cómo estas conexiones en última instancia permiten el control neuronal complejo y, más aún, el intelecto requerido para comprender la biología celular molecular.

PALABRAS CLAVE

anticuerpo monoclonal *237*
cadherina *199*
cepa celular *236*
colágeno asociado a fibrillas *217*
colágeno fibrilar *217*
complejo glucoproteico distrofina (DGC) *227*
conexina *231*
epitelio *201*
fibronectina *220*
glucosaminoglucano (GAG) *213*
hialuronano *217*
hibridoma *238*
integrina *199*
lámina basal *202*
laminina *221*
línea celular *236*
matriz extracelular *199*
medio HAT *238*
molécula de adhesión celular (CAM) *198*
moléculas de adhesión celular de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgCAM) *227*
pared celular *231*
plasmodesmo *233*
proteína multiadhesiva de la matriz *209*
proteoglucano *209*
receptores de adhesión *199*
secuencia RGD *221*
selectina *199*
sindecano *214*
unión estrecha *202*
uniones de anclaje *202*
vía paracelular *208*

REVISIÓN DE CONCEPTOS

1. Usando ejemplos específicos describa los dos fenómenos que dan origen a la diversidad de las moléculas adhesivas.

2. Se sabe que las cadherinas median las interacciones homófilas entre células. ¿Qué es una interacción homófila y cómo puede ser demostrada experimentalmente para las E-cadherinas?

3. ¿Cuál es la función normal de las uniones estrechas? ¿Qué puede pasarle a un tejido cuando las uniones estrechas no cumplen su función apropiadamente?

4. ¿Qué es el colágeno y cómo se sintetiza? ¿Cómo sabemos que el colágeno se requiere para la integración de los tejidos?

5. Usted ha sintetizado un oligopéptido que contiene una secuencia RGD rodeada por otros aminoácidos. ¿Cuál es el efecto de este péptido cuando es añadido a un cultivo celular de fibroblastos sobre una capa de fibronectina absorbida al plato de cultivo de tejido? ¿Por qué ocurre esto?

6. La coagulación de la sangre es una función crucial para la supervivencia de los mamíferos. ¿Cómo conducen las propiedades multiadhesivas de la fibronectina al reclutamiento de plaquetas en los coágulos de sangre?

7. Utilizando los modelos estructurales, explique cómo las integrinas median la señalización de afuera hacia adentro y de adentro hacia afuera.

8. ¿Cómo dan origen a la distrofia muscular de Duchenne los cambios en las conexiones moleculares entre la matriz extracelular y el citoesqueleto?

9. ¿Cuál es la diferencia entre una cepa celular, una línea celular y un clon?

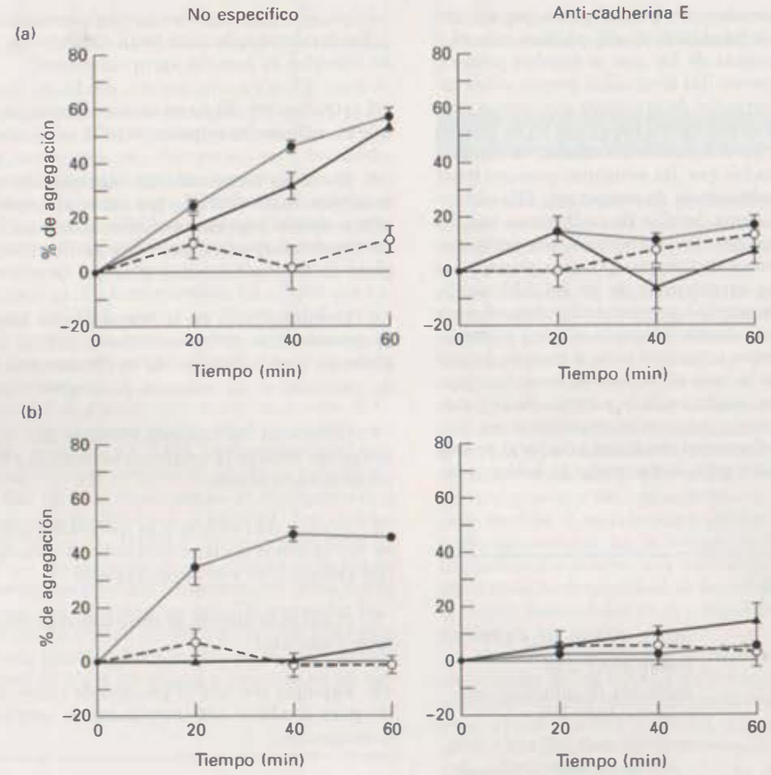
10. Explique por qué el proceso de fusión celular es necesario para producir anticuerpos monoclonales utilizados para investigación.

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los investigadores han aislado dos isoformas mutantes de la cadherina E que hipotéticamente funcionan de manera diferente de las de tipo salvaje. Una línea celular de carcinoma mamario cadherina E negativa fue transfectada con los genes A (parte a en la figura) y B (parte b) (diamantes) de la cadherina E mutante y el gen de la cadherina E de tipo silvestre (círculos negros) y comparadas con células no transfectadas (círculos abiertos) en un ensayo de agregación. En este ensayo, las células primero son disociadas por tratamiento con tripsina y luego se las deja agregar en solución por unos minutos. Las células agregadas provenientes de los mutantes A y B se presentan en los paneles a y b respectivamente. Para demostrar que la adhesión observada fue mediada por cadherina, las células fueron pretratadas con un anticuerpo no específico (panel izquierdo) o con un anticuerpo monoclonal anti-cadherina E, bloqueador de la función (panel derecho).

a. ¿Por qué las células transfectadas con el gen de tipo silvestre de cadherina-E tienen una mayor agregación que las células control no transfectadas?

b. A partir de estos datos, ¿qué puede decirse acerca de la función de los mutantes A y B?



c. ¿Por qué la adición del anticuerpo monoclonal anti-cadherina E, bloquea la agregación, pero no el anticuerpo no específico?

d. ¿Qué podría ocurrir a la capacidad de agregación de las células transfectadas con el gen silvestre de cadherina E si el ensayo se realiza en un medio bajo en Ca^{2+}?

BIBLIOGRAFÍA

Adhesión entre células y entre célula y matriz: una visión general

Gumbiner, B. M. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. Cell 84:345-357.

Hynes, R. O.1999. Cell adhesion: old and new questions. Trends Cell Biol. 9(12):M33-M337. Millennium issue.

Hynes, R. O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell 110:673-687.

Jamora, C., and E. Fuchs. 2002. Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. Nature Cell Biol. 4(4):E101-E108.

Juliano, R. L. 2002. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 42:283-323.

Leahy, D. J. 1997. Implications of atomic resolution structures for cell adhesion. Ann. Rev. Cell Devel. Biol. 13:363-393.

Tejidos epiteliales laminares: moléculas de unión y de adhesión

Boggon, T. J., et al. 2002. C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. Science 296:1308-1313.

Clandinin, T. R., and S. L. Zipursky. 2002. Making connections in the fly visual system. Neuron 35:827-841.

Conacci-Sorrell, M., J. Zhurinsky, and A. Ben-Ze'ev. 2002. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. J. Clin. Invest. 109:987-991.

Fuchs, E., and S. Raghavan. 2002. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. Nature Rev. Genet. 3(3):199-209.

Leckband, D. 2002. The structure of the C-cadherin ectodomain resolved. Structure (Camb). 10:739-740.

Pierschbacher, M. D., and E. Ruoslahti. 1984. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. Nature 309(5963):30-33.

Schöck, F., and N. Perrimon. 2002. Molecular mechanisms of epithelial morphogenesis. Ann. Rev. Cell Devel. Biol. 18:463-493.

Shimaoka, M., J. Takagi, and T. A. Springer. 2002. Conformational regulation of integrin structure and function. Ann. Rev. Bophys. Biomol. Struc. 31:485-516.

Tsukita, S., M. Furuse, and M. Itoh. 2001. Multifunctional strands in tight junctions. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2:285-293.

Xiong, J. P., et al. 2001. Crystal structure of the extracellular segment of integrin αVβ3. Science 294:339-345.

La matriz extracelular de las láminas epiteliales

Boutaud, A., et al. 2000. Type IV collagen of the glomerular basement membrane: evidence that the chain specificity of network assembly is encoded by the noncollagenous NC1 domains. J. Biol. Chem. 275:30716-30724.

Esko, J. D., and U. Lindahl. 2001. Molecular diversity of heparan sulfate. J. Clin. Invest. 108:169-173.

Hohenester, E., and J. Engel. 2002. Domain structure and organisation in extracellular matrix proteins. Matrix Biol. 21(2): 115-128.

Nakato, H., and K. Kimata. 2002. Heparan sulfate fine structure and specificity of proteoglycan functions. Biochim. Biophys. Acta 1573:312-318.

Perrimon, N., and M. Bernfield. 2001. Cellular functions of proteoglycans: an overview. Semin. Cell Devel. Biol. 12(2):65-67.

Rosenberg, R. D., et al. 1997. Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system: specific structures emerge but how is synthesis regulated? J. Clin. Invest. 99:2062-2070.

La matriz extracelular de los tejidos no epiteliales

Kramer, R. Z., J. Bella, B. Brodsky, and H. M. Berman. 2001. The crystal and molecular structure of a collagen-like peptide with a biologically relevant sequence. J. Mol. Biol. 311:131-147.

Mao, J. R., and J. Bristow. 2001. The Ehlers-Danlos syndrome: on beyond collagens. J. Clin. Invest. 107:1063-1069.

Shaw, L. M., and B. R. Olsen. 1991. FACIT collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices. Trends Biochem. Sci. 16(5):191-194.

Weiner, S., W. Traub, and H. D. Wagner. 1999. Lamellar bone: structure-function relations. J. Struc. Biol. 126:241-255.

Interacciones adhesivas y células no epiteliales

Bartsch, U. 2003. Neural CAMs and their role in the development and organization of myelin sheaths. Front. Biosci. 8:D477-D490.

Brummendorf, T., and V. Lemmon. 2001. Immunoglobulin superfamily receptors: cis-interactions, intracellular adapters and alternative splicing regulate adhesion. Curr. Opin. Cell Biol. 13:611-618.

Cukierman, E., R. Pankov, and K. M. Yamada. 2002. Cell interactions with three-dimensional matrices. Curr. Opin. Cell Biol. 14:633-639.

Durbeej, M., and K. P. Campbell. 2002. Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. Curr. Opin. Genet. Devel. 12:349-361.

Geiger, B., A. Bershadsky, R. Pankov, and K. M. Yamada. 2001. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2:793-805.

Hobbie, L., et al. 1987. Restoration of LDL receptor activity in mutant cells by intercellular junctional communication. Science 235:69-73.

Lawrence, M. B., and T. A. Springer. 1991. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. Cell 65:859-873.

Lo, C. Gap junctions in development and disease. Ann. Rev. Cell. Devel. Biol. 10.1146/annurev.cellbio.19.111301.144309. (Expected to be published in 2003.)

Reizes, O., et al. 2001. Transgenic expression of syndecan-1 uncovers a physiological control of feeding behavior by syndecan-3. Cell 106:105-116.

Somers, W. S., J. Tang, G. D. Shaw, and R. T. Camphausen. 2000. Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. Cell 103:467-479.

Stein, E., and M. Tessier-Lavigne. 2001. Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by Slit through a Robo/DCC receptor complex. Science 291:1928-1938.

Tejidos vegetales

Delmer, D. P., and C. H. Haigler. 2002. The regulation of metabolic flux to cellulose, a major sink for carbon in plants. Metab. Eng. 4:22-28.

Iwai, H., N. Masaoka, T. Ishii, and S. Satoh. 2000. A pectin glucuronyltransferase gene is essential for intercellular attachment in the plant meristem. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 99:16319-16324.

Lord, E. M. 2003. Adhesion and guidance in compatible pollination. J. Exp. Bot. 54(380):47-54.

Lord, E. M., and J. C. Mollet. 2002. Plant cell adhesion: a bioassay facilitates discovery of the first pectin biosynthetic gene. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 99:15843-15845.

Lord, E. M., and S. D. Russell. 2002. The mechanisms of pollination and fertilization in plants. Ann. Rev. Cell Devel. Biol. 18: 81-105.

Pennell, R. 1998. Cell walls: structures and signals. Curr. Opin. Plant Biol. 1:504-510.

Ross, W. Whetten, J. J. MacKay, and R. R. Sederoff. 1998. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49:585-609.

Zambryski, P., and K. Crawford. 2000. Plasmodesmata: gatekeepers for cell-to-cell transport of developmental signals in plants. Ann. Rev. Cell Devel. Biol. 16:393-421.

Crecimiento y uso de los cultivos celulares

Davis, J. M., ed. 1994. Basic Cell Culture: A Practical Approach. IRL Press.

Goding, J. W. 1996. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry, and Immunology, 3d ed. Academic Press.

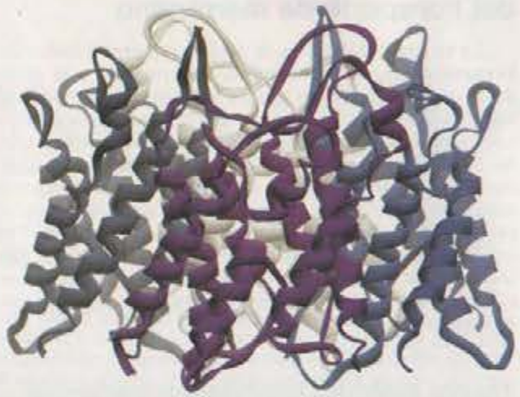
Kohler, G., and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256:495-497.

Shaw, A. J., ed. 1996. Epithelial Cell Culture. IRL Press.

Tyson, C. A., and J. A. Frazier, eds. 1993. Methods in Toxicology. Vol. 1 (Part A): In Vitro Biological Systems. Academic Press. Describes methods for growing many types of primary cells in culture.

7

TRANSPORTE DE IONES Y MOLÉCULAS PEQUEÑAS A TRAVÉS DE LAS MEMBRANAS CELULARES



La acuaporina, el canal del agua, consta de cuatro polipéptidos transmembrana idénticos.

La membrana plasmática es una barrera permeable selectiva entre la célula y el ambiente extracelular. Sus propiedades de permeabilidad aseguran que las moléculas esenciales como los iones, la glucosa, los aminoácidos y los lípidos entren fácilmente en la célula, los intermediarios metabólicos permanezcan en ella y los compuestos de desecho la abandonen. En pocas palabras, la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática le permite a la célula mantener un ambiente interno constante. En el capítulo 5 aprendimos acerca de los componentes y la organización estructural de las membranas celulares. Los movimientos de casi todas las moléculas y iones a través de las membranas celulares son mediados por las **proteínas transportadoras de la membrana** inmersas en la bicapa fosfolipídica. Debido a que diferentes tipos celulares requieren distintas mezclas de compuestos de bajo peso molecular, la membrana plasmática de cada tipo de célula contiene un conjunto específico de proteínas transportadoras que solo permiten que pasen ciertos iones y moléculas. De manera similar, los orgánulos dentro de la célula a menudo poseen ambientes internos diferentes del que tiene el citosol circundante y las membranas de los orgánulos contienen proteínas transportadoras específicas que mantienen esta diferencia.

Comenzamos nuestro abordaje revisando algunos principios generales del transporte a través de las membranas y distinguiendo tres clases principales de proteínas de transporte. En secciones siguientes, describimos la estructura y el funcionamiento de ejemplos específicos de cada clase y mostramos cómo los miembros de familias de proteínas transportadoras homólogas tienen propiedades diferentes que les permiten a los diversos tipos de células funcionar de manera apropiada. También explicamos cómo las combinaciones específicas de proteínas transportadoras en diferentes membranas subcelulares permiten a las células llevar a cabo procesos fisiológicos esenciales, incluidos el mantenimiento del pH citosólico, la acumulación de sacarosa y sales en las vacuolas vegetales, y el flujo de agua dirigido en plantas y en animales. Las células epiteliales, como las que revisten el intestino delgado, transportan iones, azúcares y otras moléculas pequeñas y agua desde un lado al otro. Veremos cómo, para ello, sus membranas plasmáticas están organizadas en, al menos, dos regiones separadas, cada una con su propio juego de proteínas de transporte. Las últimas dos secciones del capítulo se centran en las proteínas de transporte que permiten a las células nerviosas generar y conducir el tipo de señales eléctricas denominadas **potencial de acción** a lo largo de toda su longitud y transmitir estas señales a otras células, induciendo un cambio en las propiedades eléctricas de las células receptoras.

CONTENIDO

7.1 Panorama general del transporte de membrana
7.2 Bombas impulsadas por ATP y el ambiente iónico intracelular
7.3 Canales iónicos no regulados y potencial de membrana en reposo
7.4 Cotransporte mediante simportadores y antiportadores
7.5 Movimientos del agua
7.6 Transporte transepitelial
7.7 Canales iónicos regulados por voltaje y propagación de potenciales de acción en las células nerviosas
7.8 Neurotransmisores receptores y proteínas transportadoras en la transmisión de señales en las sinapsis

7.1 Panorama general del transporte de membrana

La bicapa fosfolipídica, la unidad estructural básica de las biomembranas, es esencialmente impermeable a la mayoría de las células solubles en agua, a los iones y a la propia agua. Luego de describir los factores que influyen en la permeabilidad de las membranas lipídicas, compararemos brevemente las tres clases principales de proteínas de membrana que incrementan la permeabilidad de las biomembranas. Examinaremos además el funcionamiento de los tipos más simples de proteínas de transporte para ilustrar las características básicas del transporte mediado por proteínas. Por último, describiremos dos sistemas experimentales comunes utilizados en el estudio de las propiedades funcionales de las proteínas de transporte.

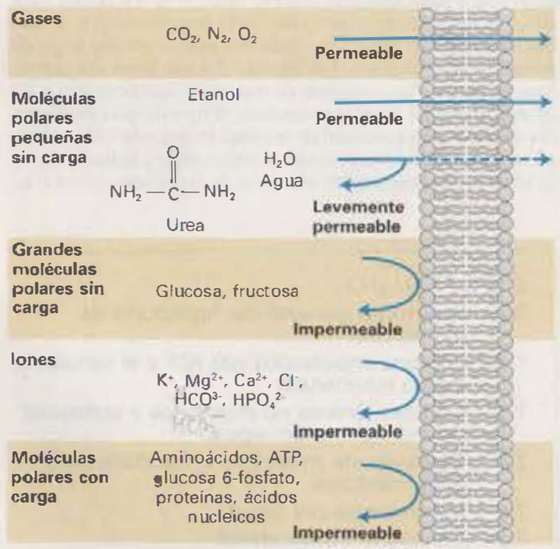
Algunas moléculas atraviesan las membranas por difusión pasiva

Los gases, como el O_2 y el CO_2, y moléculas polares pequeñas no cargadas, como la urea y el etanol, pueden moverse con rapidez por **difusión pasiva** (**simple**) a través de una membrana artificial compuesta de fosfolípidos puros o fosfolípidos y colesterol (fig. 7-1). Estas moléculas pueden también difundirse a través de las membranas celulares sin la ayuda de proteínas transportadoras. No se gasta energía metabólica porque el movimiento va desde una concentración alta de moléculas hasta una baja, es decir, a favor de su gradiente de concentración químico. Como se mencionó en el capítulo 2, tales reacciones de transporte son espontáneas debido a que tienen un valor positivo ΔS (incremento de la entropía) y por ende un ΔG negativo (disminución de la energía libre).

La velocidad relativa de difusión de cualquier sustancia a través de una bicapa fosfolipídica pura es proporcional a su gradiente de concentración a través de la capa y a su hidrofobicidad y tamaño; las moléculas cargadas también son afectadas por un potencial eléctrico a través de la membrana (véase más adelante). Cuando una bicapa fosfolipídica separa dos compartimientos acuosos, la permeabilidad de las membranas puede determinarse con facilidad si se añade una cantidad pequeña de material radiactivo a un compartimiento y se mide su velocidad de aparición en el otro compartimiento. Cuanto mayor sea el gradiente de concentración de la sustancia, más rápida será la velocidad de difusión a través de la bicapa.

La hidrofobicidad de una sustancia se mide por su coeficiente de partición K, la constante de equilibrio para su partición entre aceite y agua. Cuanto más alto es el coeficiente de partición de una sustancia, más soluble es ésta en lípido. El primer paso limitante de la velocidad en el transporte por difusión pasiva es el movimiento de una molécula desde una solución acuosa hacia el interior hidrófobo de la bicapa fosfolipídica, que se asemeja al aceite en sus propiedades químicas. Por esta razón, mientras más hidrófoba es una molécula, más rápido se difundirá a través de una bicapa fosfolipídica pura. Por ejemplo, la dietilurea, con un grupo etilo (CH_3CH_2—) adherido a cada átomo de nitrógeno de urea, tiene una K de 0,01, mientras que la urea tiene una K de 0,0002 (véase fig. 7-1). La dietilurea, que es 50 veces (0,01/0,0002) más hidrófoba que la urea, se difundirá a través de la bicapa fosfolipídica de la membrana alrededor de 50 veces más rápidamente que la urea. También entra en la célula alrededor de 50 veces más rápidamente que la urea. Asimismo, los ácidos grasos con cadenas de hidrocarburos más largas son más hidrófobos que los que tienen cadenas más cortas y se difundirán con mayor rapidez a través de una bicapa fosfolipídica pura en otras concentraciones.

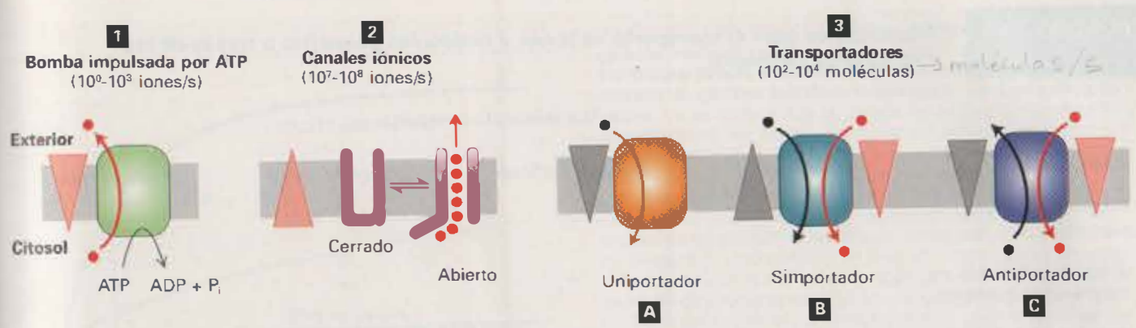
Si una sustancia transportada lleva una carga neta, su movimiento está influido tanto por su gradiente de concentración como por el **potencial de membrana**, el potencial eléctrico (voltaje) a través de la membrana. La combinación de estas dos fuerzas, denominadas **gradiente electroquímico**, determina las direcciones de transporte energéticamente favorables de una molécula cargada a través de una membrana. El potencial eléctrico que existe a través de la mayoría de las membranas celulares es el resultado de un pequeño desequilibrio en la concentración de iones cargados positiva y negativamente en los dos lados de la membrana. En las secciones 7.2 y 7.3 analizamos cómo surge y se mantiene este desequilibrio iónico y el potencial resultante.



▲ **Fig. 7-1. Permeabilidad relativa de una bicapa fosfolipídica pura a diversas moléculas.** Una bicapa es permeable a las moléculas hidrófobas pequeñas y a las moléculas polares pequeñas no cargadas, levemente permeable al agua y a la urea, y esencialmente impermeable a los iones y moléculas polares.

Las proteínas de membrana median el transporte de la mayoría de las moléculas y de todos los iones a través de las biomembranas

Como se evidencia a partir de la figura 7-1, muy pocas moléculas y ningún ion pueden cruzar una bicapa fosfolipídica pura a velocidades apreciables por difusión pasiva. Así, el transporte de la mayoría de las moléculas hacia adentro y hacia afuera de las células requiere la asistencia de proteínas de membrana especializadas. Aun el transporte de moléculas con un coeficiente de partición relativamente grande (p. ej., el agua y la urea) es acelerado con frecuencia por proteínas



▲ **Fig. 7-2. Vista general de las proteínas transportadoras de la membrana.** Los gradientes están indicados por triángulos con la punta apuntando hacia la concentración o el potencial eléctrico más bajo, o ambos. **1** Las bombas utilizan la energía liberada por la hidrólisis de ATP para impulsar el movimiento de iones específicos (círculos rojos) o moléculas pequeñas en contra de sus gradientes electroquímicos. **2** Los canales permiten el movimiento de iones específicos (o agua) a favor de su gradiente electroquímico. Los transportadores, que se clasifican en tres grupos, facilitan el movimiento de moléculas pequeñas o iones específicos. Los uniportadores transportan un único tipo de molécula a favor de su gradiente de concentración **3A**. Las proteínas cotransportadoras (simportadores **3B** y antiportadores **3C**) catalizan el movimiento de una molécula en *contra* de su gradiente de concentración (círculos negros), conducidas por movimientos de uno o más iones a favor de un gradiente electroquímico (círculos rojos). Las diferencias en los mecanismos de transporte de estas tres clases principales de proteínas dan cuenta de sus velocidades variables de movimientos del soluto.

específicas porque su transporte por difusión pasiva no es lo suficientemente rápido para cumplir las necesidades celulares.

Todas las proteínas de transporte son proteínas transmembrana que contienen múltiples segmentos que atraviesan la membrana y que generalmente son hélices α. Se piensa que, al formar una vía recubierta de proteínas a través de la membrana, las proteínas de transporte permiten la movilización de sustancias hidrófilas sin entrar en contacto con el interior hidrófobo de la membrana. Aquí presentamos los diversos tipos de proteínas transportadoras tratadas en este capítulo (fig. 7-2).

Las *bombas impulsadas por ATP* (o simplemente bombas) son ATPasas que utilizan la energía de la hidrólisis de ATP para movilizar iones o moléculas pequeñas a través de una membrana *en contra* de un gradiente de concentración química o un potencial eléctrico o ambos. Este proceso, conocido como **transporte activo**, es un ejemplo de una reacción química acoplada (cap. 2). En este caso, el transporte "cuesta arriba" de iones o de moléculas pequeñas en contra del gradiente electroquímico, con requerimiento de energía, está acoplado a la hidrólisis de ATP, con liberación de energía. La reacción general –la hidrólisis de ATP y el movimiento "cuesta arriba" de iones o moléculas pequeñas– es energéticamente favorable.

Las *proteínas canal* transportan agua o tipos específicos de iones y moléculas hidrófilas pequeñas *a favor* de su concentración o del gradiente de potencial eléctrico. Este transporte asistido por proteínas se denomina **difusión facilitada**. Las proteínas canal forman un pasaje hidrófilo a través de la membrana por la cual se mueven simultáneamente múltiples moléculas de agua o iones, en una única fila a gran velocidad. Algunos canales de iones están abiertos la mayor parte del tiempo; son los canales *no regulados*. Sin embargo, la mayoría de los canales iónicos se abren sólo en respuesta a señales químicas o eléctricas específicas; son los canales *regulados*.

Los *transportadores* movilizan diversos iones y moléculas a través de las membranas celulares. Se han identificado tres tipos de transportadores. Los *uniportadores* transportan un único tipo de moléculas a favor de su gradiente de concentración mediante difusión facilitada. La glucosa y los aminoácidos cruzan la membrana plasmática hacia el interior de la mayoría de las células de mamíferos con la ayuda de los uniportadores. Por el contrario, los *antiportadores* y los *simportadores* acoplan el movimiento de un tipo de ion o molécula en *contra* de su gradiente de concentración con el movimiento de uno o más iones diferentes *a favor* de su gradiente de concentración. Estas proteínas a menudo son llamadas *cotransportadoras*, en alusión a su capacidad para transportar dos solutos diferentes simultáneamente.

Al igual que las bombas de ATP, las cotransportadoras median las reacciones en las cuales una reacción energéticamente desfavorable (p. ej., movimientos de moléculas "cuesta arriba") está acoplada a una reacción energéticamente favorable. Sin embargo, la naturaleza de la reacción de abastecimiento de energía que conduce el transporte activo por estas dos clases de proteína difiere. Las bombas de ATP utilizan energía proveniente de la hidrólisis de ATP, mientras que las cotransportadoras utilizan la energía almacenada en un gradiente electroquímico. Este último proceso se denomina **transporte activo secundario**.

En el cuadro 7-1 se resumen los cuatro mecanismos por los cuales las moléculas pequeñas y los iones son transportados a través de las membranas celulares. En este capítulo nos centramos en las propiedades y la función de las proteínas de membrana que median los tres mecanismos de transporte dependientes de las proteínas. Los cambios conformacionales son esenciales para el funcionamiento de todas las proteínas transportadoras. Las bombas impulsadas por ATP y los transportadores atraviesan un ciclo de cambio conformacional exponiendo un sitio de unión (o sitios) hacia un lado de la membrana en una conformación y hacia el otro lado en una segunda conformación. Como cada uno de los ciclos induce el movimiento de sólo una (o algunas) molécula del sustrato,

CUADRO 7-1 Mecanismos para el transporte de iones y moléculas pequeñas a través de las membranas celulares

	Mecanismo de transporte			
Propiedad	**Difusión pasiva**	**Difusión facilitada**	**Transporte activo**	**Cotransportador***
Requiere proteínas específicas	–	+	+	+
Soluto transportado en contra de su gradiente	–	–	+	+
Acoplado a la hidrólisis de ATP	–	–	+	–
Conducido por movimiento de un ion cotransportado a favor de su gradiente	–	–	–	+
Ejemplos de moléculas transportadas	O_2, CO_2, hormonas esteroides, muchos fármacos	Glucosa y aminoácidos (uniportadores); iones y agua (canales)	Iones, pequeñas moléculas hidrófilas, lípidos (bombas impulsadas por ATP)	Glucosa y aminoácidos (simportadores); diversos iones y sacarosa (antiportadores)

*También denominado *transporte activo secundario*.

estas proteínas se caracterizan por velocidades de transporte relativamente lentas que van desde 10^0 hasta 10^4 iones o moléculas por segundo (véase fig. 7-2). Los canales iónicos cambian entre un estado cerrado y un estado abierto, pero muchos iones pueden pasar a través de un canal abierto sin ningún otro cambio conformacional. Por esta razón, los canales se caracterizan por velocidades de transporte muy rápidas, por encima de 10^8 iones por segundo.

Varias características distinguen el transporte uniporte de la difusión pasiva

El movimiento de la glucosa mediado por proteínas y de otras moléculas hidrófilas pequeñas a través de una membrana, conocido como transporte **uniporte**, exhibe las siguientes propiedades distintivas.

1. La velocidad de difusión facilitada por los uniportadores es mucho más alta que la difusión pasiva a través de una bicapa fosfolipídica.

2. Debido a que las moléculas transportadas nunca entran en el núcleo hidrófobo de la bicapa fosfolipídica, el coeficiente de partición *K* es irrelevante.

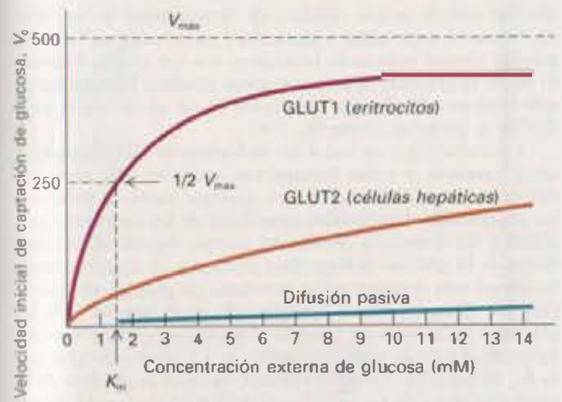
3. El transporte ocurre a través de un número limitado de moléculas **uniportadoras**, en lugar de *por toda la bicapa fosfolipídica*. En consecuencia, hay una velocidad de transporte máxima $V_{máx}$ que se logra cuando el gradiente de concentración a través de la membrana es muy grande y cada uniportador está trabajando a su máxima velocidad.

4. El transporte es específico. Cada uniportador transporta sólo una única especie de molécula o un único grupo de moléculas estrechamente relacionadas. Una medida de la afinidad de un transportador por su sustrato es K_m, que es la concentración de sustrato a la cual el transporte es la mitad del máximo.

Estas propiedades también se aplican al transporte mediado por otras clases de proteínas representadas en la figura 7-2.

Uno de los uniportadores mejor comprendidos es el transportador de glucosa GLUT1 que se encuentra en la membrana plasmática de los eritrocitos. Las propiedades de GLUT1 y de muchas otras proteínas de transporte de los eritrocitos maduros han sido muy estudiadas. Estas células, que carecen de núcleo y de otros orgánulos internos, son esencialmente "bolsas" de hemoglobina que contienen algunas proteínas intracelulares y una única membrana; la membrana plasmática (véase fig. 5-3a). Como la membrana plasmática del eritrocito puede ser aislada con alta pureza, el aislamiento y la purificación de una proteína de transporte a partir de eritrocitos maduros es un procedimiento directo.

La figura 7-3 muestra que la glucosa tomada por los eritrocitos y las células del hígado exhiben características cinéticas de una reacción simple catalizada por enzimas que involucra un único sustrato. La cinética de las reacciones de transporte mediadas por otros tipos de proteínas es más complicada que para los uniportadores. Sin embargo, todas las reacciones de transporte asistidas por proteínas suceden con mayor rapidez que la permitida por la difusión pasiva, son específicas para cada sustrato, como se refleja en los valores más bajos de K_m para algunos sustratos que para otros, y exhiben una velocidad máxima ($V_{máx}$).



◀ FIGURA EXPERIMENTAL 7-3 La incorporación celular de glucosa mediada por las proteínas GLUT exhibe una cinética enzimática simple y excede en gran medida la velocidad de entrada de glucosa calculada únicamente mediante difusión pasiva. La velocidad inicial de incorporación de glucosa (medida en micromoles por mililitro de células por hora) en los primeros segundos se grafica con relación a la concentración creciente de glucosa en el medio extracelular. En este experimento, la concentración inicial de glucosa en las células es siempre cero. Tanto el GLUT1, expresado por los eritrocitos, como el GLUT2, expresado por las células del hígado, incrementan en gran medida la velocidad de incorporación de glucosa (curvas roja y naranja) en comparación con la asociada con la difusión pasiva (curva azul) en todas las concentraciones externas. Al igual que las reacciones catalizadas por enzimas, la incorporación de glucosa facilitada por GLUT1 exhibe una velocidad máxima ($V_{máx}$). La K_m es la concentración a la cual la velocidad de la incorporación de glucosa es la mitad de la máxima. El GLUT2, con una K_m de alrededor de 20 mM, tiene una afinidad por la glucosa mucho menor que el GLUT1, con una K_m de alrededor de 1,5 mM.

El uniportador GLUT1 transporta glucosa hacia el interior de la mayoría de las células de mamíferos

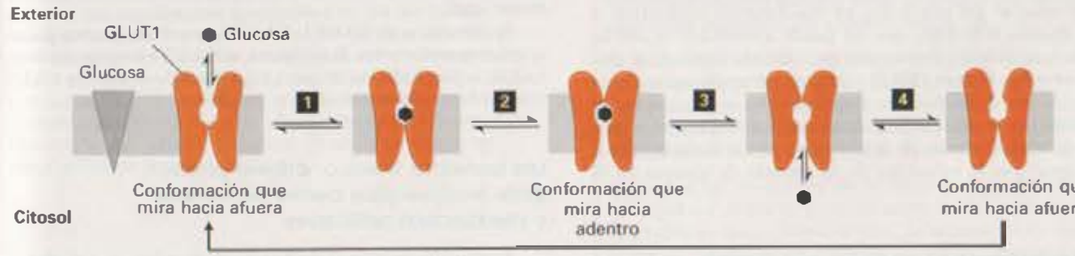
La mayoría de las células de mamíferos utilizan la glucosa de la sangre como fuente principal de energía celular y la mayoría expresa GLUT1. Puesto que la concentración de glucosa suele ser mayor en el medio extracelular (sangre en el caso de los eritrocitos) que en la célula, el GLUT1 cataliza la entrada neta de glucosa desde el medio extracelular hacia el interior de la célula. En estas condiciones, la $V_{máx}$ se alcanza a altas concentraciones externas de glucosa.

Al igual que otros uniportadores, el GLUT1 alterna entre dos estados conformacionales: en uno, un sitio de fijación para glucosa está orientado hacia el exterior de la membrana; en el otro, está orientado hacia el interior. La figura 7-4 ilustra la secuencia de lo que sucede durante el transporte unidireccional de glucosa desde el exterior de la célula hacia el interior del citosol. El GLUT1 también puede catalizar la salida neta de glucosa desde el citosol hacia el exterior del medio extracelular cuando la concentración de glucosa es más alta en el interior de la célula que en el exterior.

La cinética del transporte unidireccional de la glucosa desde el exterior de una célula hacia el interior a través de GLUT1 puede describirse con el mismo tipo de ecuación utilizada para describir una reacción química catalizada por enzimas. Para mayor simplicidad, asumamos que el sustrato glucosa, S, está presente inicialmente sólo en el exterior de la membrana. En este caso, podemos escribir:

$$S_{afuera} + GLUT1 \underset{}{\overset{K_m}{\rightleftharpoons}} S_{afuera} - GLUT1 \overset{V_{max}}{\rightleftharpoons} S_{adentro} + GLUT1$$

donde S_{afuera} – GLUT1 representa GLUT1 en la conformación orientada hacia afuera con una glucosa fijada. Por una derivación similar a la utilizada para llegar a la ecuación de Michaelis-Menten en el capítulo 3, podemos derivar la



▲ Fig. 7-4. Modelo de transporte uniporte mediante GLUT1. En una conformación, los sitios fijadores de glucosa se orientan hacia afuera; en la otra, se orientan hacia adentro. La fijación de la glucosa al sitio orientado hacia afuera (paso 1) desencadena un cambio conformacional en el transportador que orienta el sitio de fijación hacia el interior del citosol (paso 2). Luego la glucosa es liberada hacia el interior de la célula (paso 3). Por último, el transportador sufre un cambio conformacional inverso, regenerando el sitio de fijación orientado hacia afuera (paso 4). Si la concentración de glucosa es más alta en el interior de la célula que en el exterior, el ciclo funcionará a la inversa (paso 4 → paso 1), y produce el movimiento de la glucosa desde adentro hacia afuera. Los cambios conformacionales reales probablemente son más pequeños que los representados aquí.

siguiente expresión para v, la velocidad inicial de transporte para S hacia el interior de la célula catalizada por GLUT1:

$$v = \frac{V_{máx}}{1 + \frac{K_m}{C}} \qquad (7\text{-}1)$$

donde C es la concentración de S_{afuera} (inicialmente, la concentración de $S_{adentro} = 0$). La $V_{máx}$, la velocidad de transporte cuando todas las moléculas del GLUT1 contienen una S fijada, tiene lugar a una concentración de S_{afuera} infinitamente alta. Mientras más bajo es el valor de K_m, más fuertemente se fija el sustrato al transportador y es mayor la velocidad de transporte a una concentración fija del sustrato. La ecuación 7-1 describe la curva para la incorporación de glucosa por los eritrocitos mostrada en la figura 7-3 al igual que las curvas similares para otros uniportadores.

Para el GLUT1 en la membrana del eritrocito, la K_m para el transporte de glucosa es 1,5 milimolar (mM); en esta concentración casi la mitad de los transportadores con sitios de fijación orientados hacia afuera tendrían una glucosa fijada y el transporte ocurriría al 50% de la velocidad máxima. Debido a que la glucosa de la sangre es de 5 mM, el transportador de glucosa del eritrocito funciona al 77% de la velocidad máxima, como se desprende de la figura 7-3. El GLUT1 y el muy similar GLUT3 se expresan en los eritrocitos y en otras células que necesitan incorporar glucosa desde la sangre continuamente a altas velocidades; la velocidad de la incorporación de glucosa por esas células permanecerá alta sin importar los pequeños cambios en la concentración de la glucosa de la sangre.

Además de la glucosa, los azúcares isoméricos D-manosa y D-galactosa, que difieren de la D-glucosa en la configuración en tan sólo un átomo de carbono, son transportados por GLUT1 a velocidades mensurables. Sin embargo, la K_m para la glucosa (1,5 mM) es mucho menor que la K_m para la D-manosa (20 mM) o para la D-galactosa (30 mM). El GLUT1 es bastante específico, y tiene una afinidad mucho mayor (indicada por una menor K_m) por el sustrato normal D-glucosa que por otros sustratos.

El GLUT1 es el 2% de las proteínas en la membrana plasmática de los eritrocitos. Después que la glucosa es transportada al interior del eritrocito, es rápidamente fosforilada y forma glucosa 6-fosfato, que no puede abandonar la célula. Por esta reacción, el primer paso en el metabolismo de la glucosa (véase fig. 8-4) es rápido y la concentración intracelular de glucosa no se incrementa a medida que la glucosa es incorporada por la célula. En consecuencia, se mantiene el gradiente de concentración de la glucosa a través de la membrana, al igual que la velocidad de la entrada de glucosa en la célula.

El genoma humano codifica una familia de proteínas GLUT transportadoras de azúcar

El genoma humano codifica 12 proteínas, GLUT-1–GLUT12, que son altamente homólogas en secuencia, y se piensa que todas contienen 12 hélices α que atraviesan la membrana. Estudios detallados acerca de GLUT1 demostraron que los residuos de aminoácidos en las hélices α transmembrana son predominantemente hidrófobos; sin embargo, muchas hélices cargan residuos de aminoácidos (p. ej., serina, treonina, asparagina y glutamina) cuyas cadenas laterales pueden formar enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo sobre la glucosa. Se cree que estos residuos forman los sitios fijadores de glucosa orientados hacia afuera en el interior de la proteína (véase fig. 7-4).

Las estructuras de todas las isoformas de GLUT son bastante similares y todas transportan azúcares. No obstante, sus expresiones diferenciales en diversos tipos de células y las propiedades funcionales específicas de las isoformas permiten a las diferentes células del cuerpo regular el metabolismo de la glucosa independientemente y al mismo tiempo mantener una concentración constante de glucosa en la sangre. Por ejemplo, GLUT2, expresado en el hígado y en las células β secretoras de insulina del páncreas, tiene una K_m aproximada de 20 mM, alrededor de 13 veces más alta que la K_m de GLUT1. Como resultado, cuando la glucosa de la sangre se eleva de su nivel basal de 5 mM a 10 mM más o menos después de una comida, la velocidad de entrada de glucosa casi se duplicará en las células que expresan GLUT2, mientras que apenas se incrementará en las células que expresan GLUT1 (véase fig. 7-3). En el hígado, el "exceso" de glucosa en el interior de la célula es almacenado en forma del polímero **glucógeno**. En las células β de los islotes pancreáticos, el aumento de glucosa dispara la secreción de la hormona **insulina**, que a su vez disminuye la glucosa de la sangre al incrementar la incorporación de glucosa y el metabolismo en los músculos y al inhibir la producción de glucosa en el hígado.

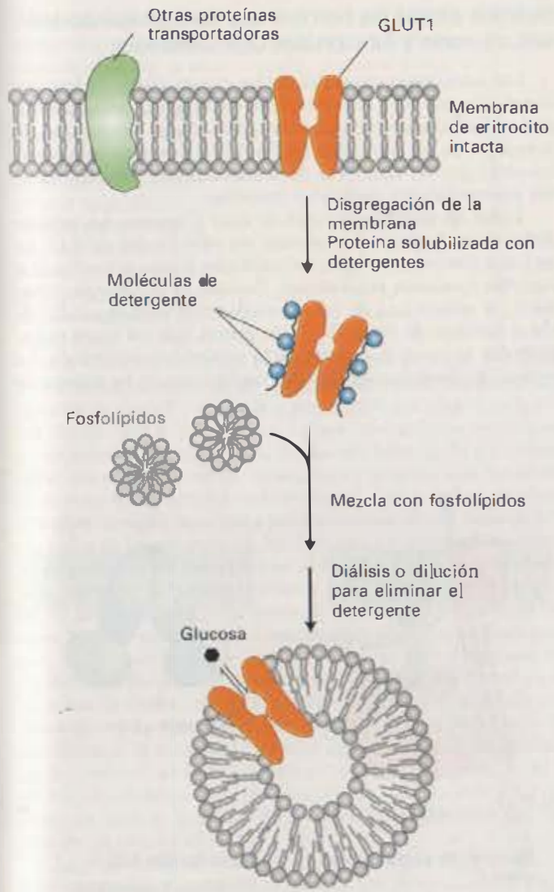
Otra isoforma de GLUT, el GLUT4, sólo se expresa en las células grasas y musculares, las células que responden a la insulina incrementan su incorporación de glucosa y eliminan así la glucosa de la sangre. En ausencia de insulina, el GLUT4 se encuentra en las membranas intracelulares, no sobre las membranas plasmáticas y, obviamente, es incapaz de facilitar la incorporación de glucosa. Por un proceso detallado en el capítulo 15, la insulina provoca la fusión de estas membranas internas ricas en GLUT4 con la membrana plasmática, lo que incrementa el número de moléculas de GLUT4 sobre la superficie celular y, por ende, la velocidad de incorporación de glucosa. Los defectos en este proceso, uno de los mecanismos principales por los cuales la insulina disminuye la glucosa de la sangre, conducen a la diabetes, una enfermedad caracterizada por un nivel de glucosa en sangre continuamente alto.

A diferencia de GLUT1–GLUT4, que transportan glucosa en concentraciones fisiológicas, el GLUT5 transporta fructosa. Las propiedades de otros miembros de la familia GLUT aún no han sido estudiadas en detalle.

Las proteínas transportadoras pueden estar enriquecidas dentro de células y membranas artificiales

Aunque las proteínas de transporte pueden ser aisladas de las membranas y purificadas, las propiedades funcionales de estas proteínas sólo pueden estudiarse cuando están asociadas con una membrana. La mayoría de las membranas celulares contienen muchos tipos diferentes de proteínas transportadoras, pero la concentración relativamente baja de alguna en particular dificulta los estudios funcionales de una única proteína. A fin de facilitar esos estudios, los investigadores utilizan dos procedimientos de enriquecimiento en una proteína de transporte de interés de manera que ésta predomine en la membrana.

En un procedimiento habitual, una proteína transportadora específica es extraída y purificada; la proteína purificada es luego reincorporada en bicapas fosfolipídicas puras de membranas, como los **liposomas** (fig. 7-5). En forma alternativa, el gen que codifica una proteína transportadora



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 7-5 Los liposomas que contienen un solo tipo de proteína transportadora son muy útiles para estudiar las propiedades funcionales de las proteínas transportadoras. Aquí, todas las proteínas integrales de la membrana del eritrocito son solubilizadas por un detergente no iónico, como el octilglucósido. La proteína transportadora de glucosa GLUT1, un uniportador, puede ser purificada mediante cromatografía en una columna que contiene un anticuerpo monoclonal específico y luego incorporada a los liposomas compuestos de fosfolípidos puros.

específica puede ser expresado en altos niveles en un tipo de célula que no suele expresarla. La diferencia en el transporte de una sustancia por la célula transfectada y por la no transfectada se debe a la proteína transportadora expresada. En estos sistemas, las propiedades funcionales de las diversas proteínas de membrana pueden examinarse sin ambigüedad.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 7.1

Panorama general del transporte de membrana

- La membrana plasmática regula el tránsito de moléculas hacia el interior y el exterior de la célula.
- A excepción de los gases (p. ej., O_2 y CO_2) y las moléculas hidrófobas pequeñas, la mayoría de las moléculas no pueden difundirse a través de la bicapa fosfolipídica a velocidades suficientes para satisfacer las necesidades celulares.
- Tres clases de proteínas transmembrana median el transporte de iones, azúcares, aminoácidos y otros metabolitos a través de las membranas celulares: las bombas impulsadas por ATP, los canales y los transportadores (véase fig. 7-2).
- En el transporte activo, una proteína transportadora se acopla con el movimiento de un sustrato en contra de su gradiente de concentración para la hidrólisis del ATP.
- En la difusión facilitada, una proteína de transporte asiste en el movimiento de un sustrato específico (molécula o ion) a favor de su gradiente de concentración.
- En el transporte activo secundario, o cotransporte, una proteína de transporte acopla el movimiento de un sustrato contra su gradiente de concentración al movimiento de un segundo sustrato a favor de su gradiente de concentración (véase cuadro 7-1).
- El transporte de un soluto a través de una membrana, catalizado por proteínas, se produce mucho más velozmente que la difusión pasiva, exhibe una $V_{máx}$ cuando el número de moléculas transportadoras están saturadas con sustrato y es altamente específico del sustrato (véase fig. 7-3).
- Se piensa que las proteínas uniportadoras, como los transportadores de glucosa (GLUT), cambian entre dos estados conformacionales, uno en el cual el sitio fijador de sustrato está orientado hacia afuera y uno en el cual el sitio de fijación está orientado hacia el interior (véase fig. 7-4).
- Todos los miembros de la familia de proteínas GLUT transportan azúcares y tienen estructuras similares. Las diferencias en sus valores de Km, la expresión en diferentes tipos de células y las especificidades del sustrato son importantes para el metabolismo apropiado del azúcar en el cuerpo.
- Dos sistemas experimentales comunes para el estudio de las funciones de las proteínas de transporte son los liposomas que contienen una proteína de transporte purificada (véase fig. 7-5) y las células transfectadas con el gen que codifica una proteína transportadora en particular.

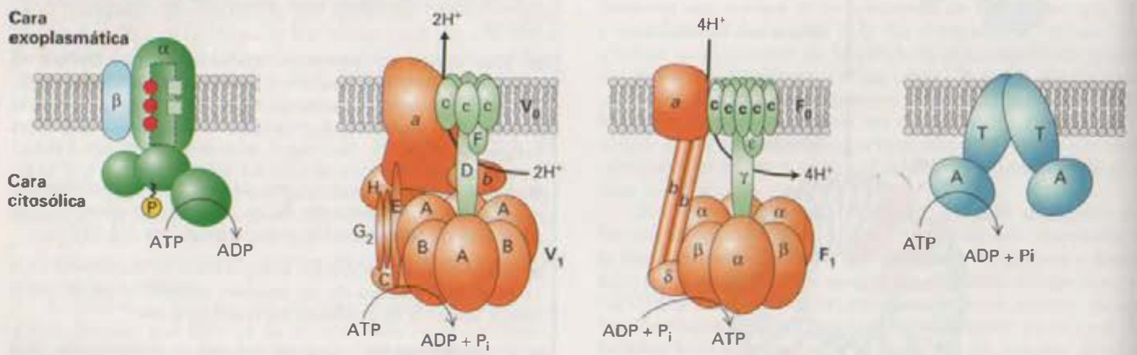
7.2 Bombas impulsadas por ATP y el ambiente iónico intracelular

Veremos ahora las bombas impulsadas por ATP, que transportan iones y diversas moléculas pequeñas contra sus gradientes de concentración. Todas las bombas impulsadas por ATP son proteínas transmembrana con uno o más sitios de fijación para el ATP ubicados sobre la cara citosólica de la membrana. Aunque estas proteínas suelen ser denominadas *ATPasas*, normalmente no hidrolizan el ATP en ADP y P, a menos que los iones u otras moléculas sean transportados en forma simultánea. Debido a este ceñido acoplamiento entre la hidrólisis y el transporte del ATP, la energía almacenada en el enlace fosfoanhidrido no se disipa sino que más bien se utiliza para mover iones u otras moléculas "cuesta arriba" contra un gradiente electroquímico.

Distintas clases de bombas exhiben propiedades estructurales y funcionales características

Las estructuras generales de las cuatro clases de bombas impulsadas por ATP se representan en la figura 7-6, con ejemplos específicos de cada clase listados abajo. Nótese que los miembros de las tres clases (P, F y V) transportan sólo iones, mientras que los miembros de la superfamilia ABC transportan principalmente moléculas pequeñas.

Todas las *bombas de iones de clase P* poseen dos subunidades α catalíticas que contienen un sitio fijador de ATP. La mayoría también tiene dos subunidades β más pequeñas que cumplen funciones reguladoras. Durante el proceso de transporte, al menos una de las subunidades α es fosforilada (de ahí el nombre de clase "P") y se piensa que los iones transportados se mueven a través de la subunidad fosforilada. La secuencia alrededor del residuo fosforilado es homóloga en



Bombas clase P
Membrana plasmática de plantas, hongos, bacterias (bomba de H^+)
Membrana plasmática de eucariontes superiores (bomba de Na^+/K^+)
Membrana plasmática apical de estómago de mamíferos (bomba de H^+/K^+)
Membrana plasmática de todas las células eucariontes (bomba de Ca^{2+})
Membrana de retículo sarcoplasmático en células musculares (bomba de Ca^{2+})

Bombas de clase V
Membrana vacuolares en plantas, levaduras, otros hongos
Membrana lisosómica y endosómica en células animales
Membrana plasmática de osteoclastos y algunas células tubulares de riñón

Bombas de protones de clase F
Membrana plasmática bacteriana
Membrana mitocondrial interna
Membrana tilacoidal de cloroplastos

Superfamilia ABC
Membrana plasmática bacteriana (transportadores de aminoácidos, azúcares y péptidos)
Membrana plasmática de mamíferos (transportadores de fosfolípidos, fármacos lipófilos pequeños, colesterol y otras moléculas pequeñas)

▲ Fig. 7-6. Las cuatro clases de proteínas transportadoras impulsadas por ATP. La ubicación de bombas específicas se indica debajo de cada clase. Las bombas de clase P están compuestas de una subunidad catalítica α, que es fosforilada como parte del ciclo de transporte. Una subunidad β, presente en algunas de estas bombas, puede regular el transporte. Las bombas de clase F y de clase V no forman intermediarios de fosfoproteínas y transportan sólo protones. Sus estructuras son similares y contienen proteínas similares, pero ninguna de sus subunidades están relacionadas con las de las bombas de clase P. Las bombas de clase V acoplan la hidrólisis de ATP al transporte de protones en contra de su gradiente de concentración, mientras que las bombas de clase F suelen funcionar en la dirección contraria, utilizan la energía de una concentración de protones o un gradiente electroquímico para sintetizar ATP. Todos los miembros de la gran superfamilia de proteínas ABC contienen dos dominios transmembrana (T) y dos dominios citosólicos de unión a ATP (A), que acoplan la hidrólisis de ATP al movimiento del soluto. Estos dominios centrales están presentes como subunidades separadas en algunas proteínas ABC (representadas aquí), pero están fusionadas formando un único polipéptido en otras proteínas ABC. (Véase T. Nishi y M. Forgac, 2002, Nature Rev. Mol. Cell Biol. 3:94; G. Chang y C. Roth, 2001, Science 293:1793; C. Toyoshima et al., 2000, Nature 405:647; D. McIntosh, 2000, Nature Struc. Biol. 7:532; y T. Elston, H. Wang y G. Oster, 1998, Nature 391:510.)

diferentes bombas. Esta clase incluye la Na^+/K^+-ATPasa de la membrana plasmática, que mantiene la baja concentración citosólica de Na^+ y la alta concentración citosólica de K^+, típicas de las células animales. Ciertas Ca^{2+}-ATPasas bombean iones Ca^{2+} fuera del citosol hacia el medio externo; otras bombean Ca^{2+} desde el citosol hacia el interior del retículo endoplasmático o hacia el interior del RE especializado denominado *retículo sarcoplasmático*, que se encuentra en las células musculares. Otro miembro de la clase P, hallado en las células secretoras de ácido del estómago de los mamíferos, transporta protones (iones H^+) hacia el exterior e iones K^+ hacia el interior de la célula. La bomba de H^+ que genera y mantiene el potencial eléctrico de la membrana en las células vegetales, micóticas y bacterianas también pertenece a esta clase.

Las estructuras de las bombas iónicas de *clase F* y *clase V* son similares entre sí, pero no están emparentadas con las bombas de clase P y son más complicadas que ellas. Las bombas de clases F y V contienen varias subunidades citosólicas y transmembrana diferentes. Todas las bombas V y F conocidas transportan sólo protones, en un proceso que no involucra una fosfoproteína intermediaria. Las bombas de clase V suelen cumplir funciones para mantener el pH bajo de las vacuolas de las plantas, de los lisosomas y de otras vesículas acídicas en las células animales al bombear protones desde la cara citosólica a la exoplasmática de la membrana en contra de un gradiente electroquímico de protones. Las bombas de clase F se encuentran en las membranas plasmáticas bacterianas, en la mitocondria y en los cloroplastos. A diferencia de las bombas de clase V, las de clase F suelen funcionar para impulsar la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i a través del movimiento de protones desde la cara exoplasmática hacia la citosólica de la membrana a favor del gradiente electroquímico de protones. Debido a su importancia en la síntesis de ATP en los cloroplastos y en la mitocondria, las bombas de protones de clase F, llamadas ATP sintasas, se describen por separado en el capítulo 8.

La clase final de bombas impulsadas por ATP contiene más miembros y es más diversa que las otras clases. Conocidas como la superfamilia ABC (*ATP-binding cassette*), esta clase incluye varias proteínas transportadoras diferentes halladas en organismos que van desde las bacterias hasta los seres humanos. Cada proteína ABC es específica de un único sustrato o grupo de sustratos emparentados, que pueden ser iones, azúcares, aminoácidos, fosfolípidos, péptidos, polisacáridos o incluso proteínas. Todas las proteínas transportadoras ABC comparten una organización estructural que consiste en cuatro dominios "centrales": dos dominios transmembrana (T), que forman el corredor a través del cual las moléculas transportadas cruzan la membrana, y dos dominios (A) citosólicos fijadores de ATP. En algunas proteínas ABC, sobre todo en las bacterias, los dominios centrales están presentes en cuatro polipéptidos separados; en otros, están fusionados para formar uno o dos polipéptidos multidominio.

Las bombas iónicas impulsadas por ATP generan los gradientes iónicos a través de las membranas celulares y los mantienen

Por lo general, la composición iónica específica del citosol difiere apreciablemente de la del líquido extracelular circundante. En casi todas las células –incluidas las microbianas, las vegetales y las animales– el pH citosólico se mantiene cerca de 7,2 sin importar el pH extracelular. También, la concentración citosólica de K^+ es mucho más alta que la de Na^+. Además, tanto en los invertebrados como en los vertebrados, la concentración de K^+ es de 20 a 40 veces mayor en las células que en la sangre, mientras que la concentración de Na^+ es de 8 a 12 veces menor en las células que en la sangre (cuadro 7-2). Parte del Ca^{2+} del citosol está unido a los grupos cargados negativamente del ATP y a otras moléculas, pero es la concentración de Ca^{2+} libre no unido la que es crítica para sus funciones en las vías de señalización y en la contracción muscular. La concentración de Ca^{2+} libre en el citosol suele ser menor de 0,2 micromolar (2×10^{-7} M), mil o más veces menor que la de la sangre. Las células vegetales y de muchos microorganismos mantienen concentraciones citosólicas de K^+ similarmente altas y concentraciones bajas de Ca^{2+} y Na^+ aun si son cultivadas en soluciones salinas muy diluidas.

Las bombas de iones tratadas en esta sección son, en gran medida, las encargadas de establecer y mantener los gradientes iónicos habituales a través de las membranas plasmática e intracelular. Al llevar a cabo estas funciones, las células gastan una energía considerable. Por ejemplo, más del 25% del

CUADRO 7-2 Concentraciones extracelulares e intracelulares típicas de iones

Ion	Célula (mM)	Sangre (mM)
AXÓN DE CALAMAR (INVERTEBRADO)*		
K^+	400	20
Na^+	50	440
Cl^-	40-150	560
Ca^{2+}	0,0003	10
X^{-}†	300-400	5-10
CÉLULA DE MAMÍFERO (VERTEBRADO)		
K^+	139	4
Na^+	12	145
Cl^-	4	116
HCO_3^-	12	29
X^-	138	9
Mg^{2+}	0,8	1,5
Ca^{2+}	< 0,0002	1,8

* El gran axón del nervio del calamar ha sido muy utilizado en los estudios de los mecanismos de conducción de los impulsos eléctricos.
†X^- representa las proteínas, las cuales tienen una carga neta negativa al pH neutro de la sangre y de las células.

ATP producido por las células nerviosas y del riñón se utiliza para el transporte de iones, y los eritrocitos humanos consumen más del 50% de su ATP disponible para sus propósitos; en ambos casos, la mayoría de este ATP se utiliza para impulsar la bomba de Na^+/K^+.

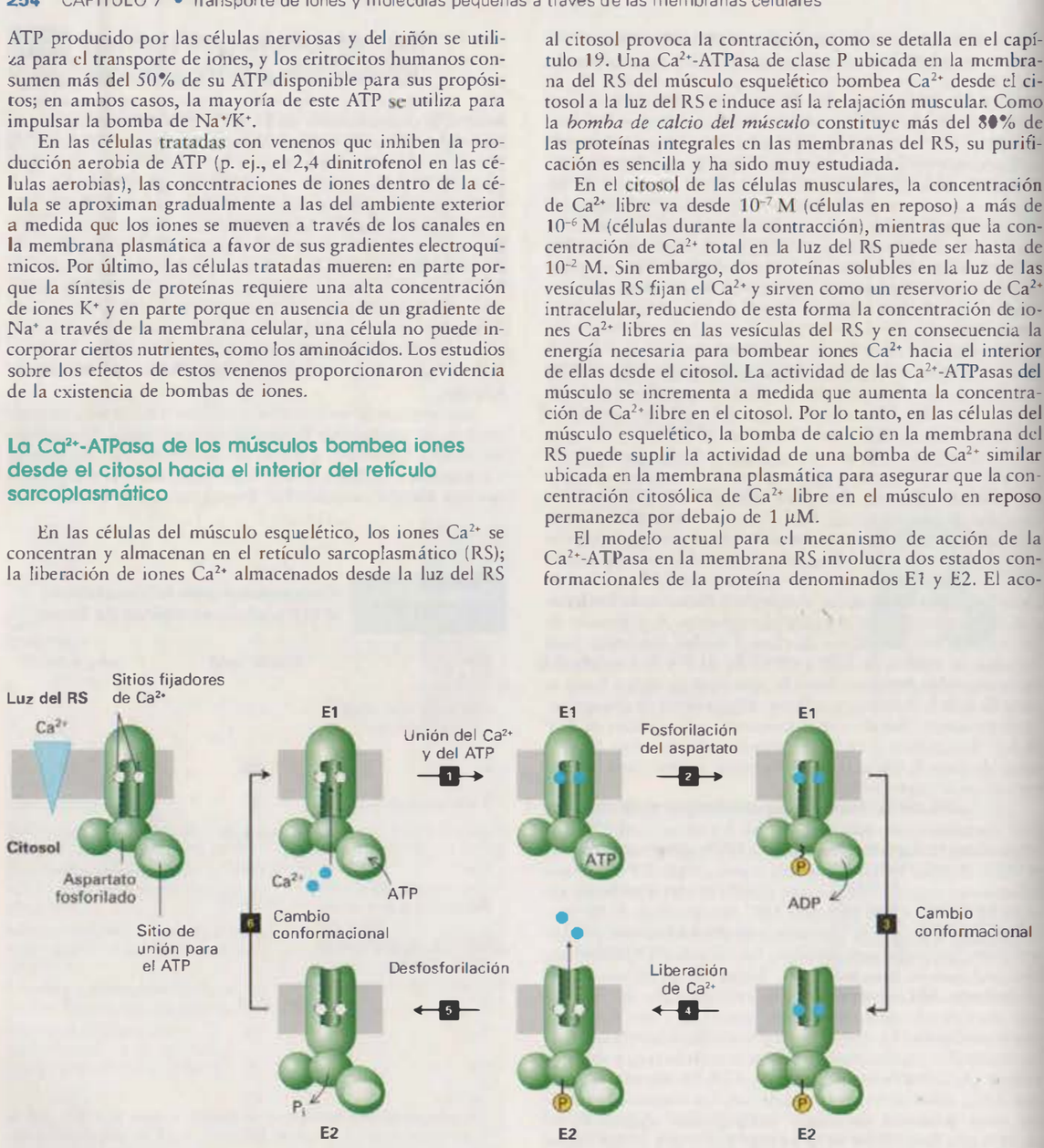
En las células tratadas con venenos que inhiben la producción aerobia de ATP (p. ej., el 2,4 dinitrofenol en las células aerobias), las concentraciones de iones dentro de la célula se aproximan gradualmente a las del ambiente exterior a medida que los iones se mueven a través de los canales en la membrana plasmática a favor de sus gradientes electroquímicos. Por último, las células tratadas mueren: en parte porque la síntesis de proteínas requiere una alta concentración de iones K^+ y en parte porque en ausencia de un gradiente de Na^+ a través de la membrana celular, una célula no puede incorporar ciertos nutrientes, como los aminoácidos. Los estudios sobre los efectos de estos venenos proporcionaron evidencia de la existencia de bombas de iones.

La Ca^{2+}-ATPasa de los músculos bombea iones desde el citosol hacia el interior del retículo sarcoplasmático

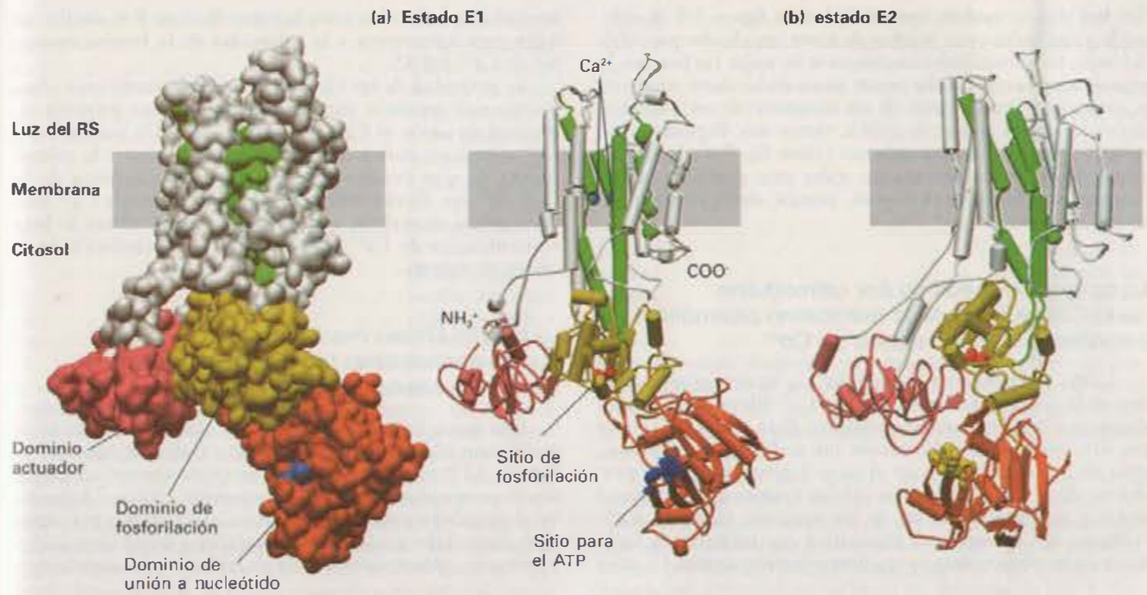
En las células del músculo esquelético, los iones Ca^{2+} se concentran y almacenan en el retículo sarcoplasmático (RS); la liberación de iones Ca^{2+} almacenados desde la luz del RS al citosol provoca la contracción, como se detalla en el capítulo 19. Una Ca^{2+}-ATPasa de clase P ubicada en la membrana del RS del músculo esquelético bombea Ca^{2+} desde el citosol a la luz del RS e induce así la relajación muscular. Como la *bomba de calcio del músculo* constituye más del 80% de las proteínas integrales en las membranas del RS, su purificación es sencilla y ha sido muy estudiada.

En el citosol de las células musculares, la concentración de Ca^{2+} libre va desde 10^{-7} M (células en reposo) a más de 10^{-6} M (células durante la contracción), mientras que la concentración de Ca^{2+} total en la luz del RS puede ser hasta de 10^{-2} M. Sin embargo, dos proteínas solubles en la luz de las vesículas RS fijan el Ca^{2+} y sirven como un reservorio de Ca^{2+} intracelular, reduciendo de esta forma la concentración de iones Ca^{2+} libres en las vesículas del RS y en consecuencia la energía necesaria para bombear iones Ca^{2+} hacia el interior de ellas desde el citosol. La actividad de las Ca^{2+}-ATPasas del músculo se incrementa a medida que aumenta la concentración de Ca^{2+} libre en el citosol. Por lo tanto, en las células del músculo esquelético, la bomba de calcio en la membrana del RS puede suplir la actividad de una bomba de Ca^{2+} similar ubicada en la membrana plasmática para asegurar que la concentración citosólica de Ca^{2+} libre en el músculo en reposo permanezca por debajo de 1 μM.

El modelo actual para el mecanismo de acción de la Ca^{2+}-ATPasa en la membrana RS involucra dos estados conformacionales de la proteína denominados E1 y E2. El acoplamiento de la hidrólisis de ATP con el bombeo de iones abarca varios pasos que deben suceder en un orden definido, como se muestra en la figura 7-7. Cuando la proteína se encuentra en la conformación E1, dos iones Ca^{2+} se fijan a dos sitios de unión de alta afinidad accesible desde el lado citosólico y un ATP se fija a un sitio sobre la superficie citosólica (paso 1). El ATP unido se hidroliza a ADP en una reacción que requiere Mg^{2+}, y el fosfato liberado es transferido a un residuo de aspartato específico en la proteína, formando el enlace acilfosfato de alta energía que se simboliza E1 ~ P (paso 2). La proteína sufre luego un cambio conformacional que genera E2, que tiene dos sitios de unión al Ca^{2+} de baja afinidad accesibles a la luz del RS (paso 3). La energía libre de la hidrólisis del enlace aspartilfosfato en E1 ~ P es mayor que el del E2 – P, y esta reducción en la energía libre del enlace aspartilfosfato impulsa el cambio conformacional de E1→E2. Los iones Ca^{2+} se disocian espontáneamente desde los sitios de baja afinidad para entrar en la luz del RS (paso 4), tras lo cual el enlace aspartilfosfato es hidrolizado (paso 5). La desfosforilación impulsa el cambio conformacional E2→E1 (paso 6) y E1 está listo para transportar más iones Ca^{2+}.



▲ Fig. 7-7. Modelo del mecanismo de acción de la Ca^{2+}-ATPasa en la membrana del RS de las células del músculo esquelético. Se representa sólo una de las dos subunidades catalíticas α de esta bomba de clase P. E1 y E2 son las conformaciones alternativas de la proteína en la cual los sitios de fijación para el Ca^{2+} son accesibles a las caras citosólicas y exoplasmáticas, respectivamente. Una secuencia ordenada de pasos (1-6), como se diagrama aquí, es esencial para acoplar la hidrólisis de ATP y el transporte de iones Ca^{2+} a través de la membrana. En la figura, ~P indica un enlace acilo fosfato de alta energía; –P indica un enlace fosfoéster de baja energía. Debido a la afinidad del Ca^{2+} por los sitios fijadores orientados hacia el citosol en E1 es mil veces más grande que la afinidad del Ca^{2+} para los sitios orientados hacia el lado exoplasmático en E2, esta bomba transporta Ca^{2+} unidireccionalmente desde el citosol a la luz del RS. Para más detalles véanse el texto y la figura 7-8. (Véase C. Toyoshima et al., 2000, Nature 405:647; P. Zhang et al., 1998, Nature 392:835 y W. P. Jencks, 1989, J. Biol. Chem. 264:18855.)



▲ Fig. 7-8. Estructura de la subunidad catalítica α de la Ca^{2+}-ATPasa muscular. (a) Modelos tridimensionales de la proteína en el estado E1 basado en la estructura determinada por cristalografía de rayos X. Hay 10 hélices α transmembrana, cuatro de las cuales (verde) contienen residuos que estudios de mutagénesis sitioespecíficos han identificado como participantes de la fijación de Ca^{2+}. Los segmentos citosólicos forman tres dominios: el dominio de unión a nucleótidos (naranja), el dominio de fosforilación (amarillo) y el dominio actuador (rosa) que conecta las dos hélices que atraviesan la membrana. (b) Modelo hipotético de la bomba en el estado E2, basado en una estructura de baja resolución determinada por microscopia electrónica de cristales congelados de la proteína pura. Nótese las diferencias entre los estados E1 y E2 en las conformaciones de los dominios de unión a nucleótidos y actuador; estos cambios probablemente impulsen los cambios conformacionales de las hélices α que atraviesan la membrana (verde) que constituyen los sitios de unión al Ca^{2+}, convirtiéndolos desde uno en los que los sitios de unión al Ca^{2+} son accesibles a la cara citosólica (estado E1) a uno en el cual son accesibles a la cara exoplasmática (estado E2). (Adaptado de C. Xu, 2002, J. Mol. Biol. 316:201 y D. McIntosh, 2000, Nature Struc. Biol. 7:532.)

Numerosa evidencia apoya el modelo representado en la figura 7-7. Por ejemplo, se ha aislado la bomba del músculo con fosfato unido a un residuo de aspartato y los estudios espectroscópicos detectaron alteraciones sutiles en la conformación proteica durante la conversión E1→E2. Se cree que las 10 hélices α que atraviesan la membrana en la subunidad catalítica forman el canal a través del cual los iones Ca^{2+} se mueven y en estudios de mutagénesis se han identificado aminoácidos en cuatro de estas hélices que formarían los dos sitios de unión al Ca^{2+} (fig. 7-8). La microscopia crioelectrónica y la cristalografía de rayos X de la proteína en diferentes estados conformacionales también revelaron que la mayor parte de la subunidad catalítica consiste en dominios citosólicos globulares involucrados en la unión de ATP, la fosforilación de aspartato y la transducción de la energía liberada por la hidrólisis del aspartilfosfato en cambios conformacionales en la proteína. Estos dominios están conectados por un "pedículo" al dominio inmerso en la membrana.

Todas las bombas de iones de clase P, cualquiera que sea el ion que transportan, son fosforiladas durante el proceso de transporte sobre un residuo de aspartato altamente conserva-

do. Por ello, el modelo operacional en la figura 7-7 es aplicable a casi todas estas bombas de iones impulsadas por ATP. Además, las subunidades catalíticas α de todas las bombas P examinadas hasta la fecha tienen pesos moleculares similares y, como deducimos a partir de sus secuencias de aminoácidos derivadas de los clones de cDNA, tienen una disposición similar de hélices α transmembrana (véase fig. 7-8). Estos hallazgos sugieren con firmeza que todas estas proteínas evolucionaron de un precursor común, aunque ahora transportan distintos iones.

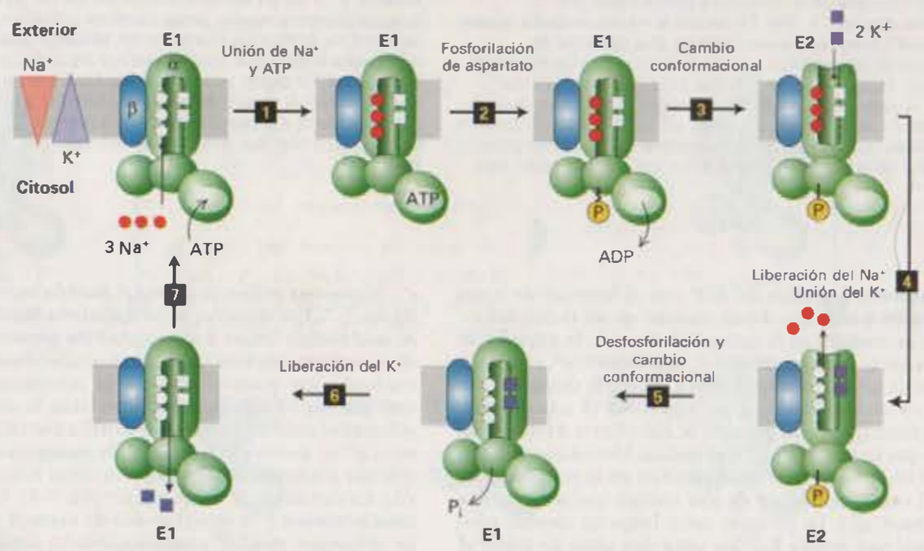
La activación mediada por calmodulina de la Ca^{2+}-ATPasa de la membrana plasmática conduce a la salida rápida de Ca^{2+}

Como se explica en el capítulo 13, incrementos pequeños en la concentración de iones de Ca^{2+} libres en el citosol disparan diversas respuestas celulares. Para que el Ca^{2+} cumpla funciones en la señalización intracelular, la concentración de iones Ca^{2+} libres en el citosol debe mantenerse por debajo de 0,1 – 0,2 μM. Las células animales, de las levaduras y probablemente las de los vegetales expresan Ca^{2+} ATPasas de la membrana plasmática que transportan Ca^{2+} fuera de la célula contra su gradiente electroquímico. La subunidad α catalítica de estas bombas de clase P es similar en estructura y secuencia a la subunidad de la bomba muscular de Ca^{2+} del RS.

La actividad de las Ca^{2+}-ATPasas de la membrana plasmática está regulada por la calmodulina, una proteína citosólica de unión al Ca^{2+} (véase fig. 3-28). Un aumento del Ca^{2+} citosólico induce la fijación de estos iones a la calmodulina, lo que desencadena la activación alostérica de la Ca^{2+}-ATPasa. Como resultado, la salida de iones Ca^{2+} desde la célula se acelera, y se restablece rápidamente la baja concentración de Ca^{2+} citosólico libre característica de la célula en reposo.

La Na^+/K^+-ATPasa mantiene las concentraciones intracelulares de Na^+ y K^+ en las células animales

Una segunda bomba de iones de clase P presente en la membrana plasmática de todas las células animales es la Na^+/K^+-ATPasa. Esta bomba es un tetrámero de subunidades de composición $\alpha_2\beta_2$. (El experimento clásico 7.1 describe el descubrimiento de esta enzima.) El pequeño polipéptido β glucosilado ayuda a las subunidades α recién sintetizadas a plegarse apropiadamente en el retículo endoplasmático,



▲ Fig. 7-9. Modelo del mecanismo de acción de la Na^+/K^+-ATPasa en la membrana plasmática. Sólo una de las dos subunidades catalíticas de esta bomba de clase P está representada. No se sabe si sólo una o ambas subunidades en una única molécula de ATPasa transporta iones. El bombeo de iones por la Na^+/K^+-ATPasa involucra fosforilación, desfosforilación y cambios conformacionales similares a los de la Ca^{2+}-ATPasa muscular (véase fig. 7-7). En este caso, la hidrólisis del intermediario E2 – P impulsa el cambio conformacional de E2 → E1 y el transporte concomitante de dos iones (K^+) hacia el interior. Los iones Na^+ están indicados por círculos rojos; los iones K^+, por cuadrados púrpura; los enlaces acilfosfato, por ~P, los enlaces fosfoéster de baja energía, por –P. (Véase K. Sweadner y C. Donnet, 2001, Biochem. J. 356:6875, para detalles de la estructura de las subunidades α.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación general: Interconversiones energéticas biológicas

pero no parece estar involucrado directamente en el bombeo de iones. La secuencia de aminoácidos y la estructura secundaria predicha de la subunidad α catalítica son muy similares a las de la Ca^{2+}-ATPasa del músculo del RS (véase fig. 7-8). En particular, la Na^+/K^+-ATPasa tiene un pedículo sobre la cara citosólica que conecta los dominios que contienen los sitios de unión al ATP y el aspartato fosforilado al dominio inserto en la membrana. El proceso global de transporte mueve tres iones Na^+ hacia afuera y dos iones K^+ hacia el interior de la célula por cada molécula de ATP hidrolizada.

El mecanismo de acción de la Na^+/K^+-ATPasa, esquematizado en la figura 7-9, es similar al de la bomba de calcio muscular, excepto que los iones son bombeados en ambas direcciones a través de la membrana. En su conformación E1, la Na^+/K^+-ATPasa tiene tres sitios fijadores de Na^+ de alta afinidad y dos sitios fijadores de K^+ de baja afinidad accesibles a la superficie citosólica de la proteína. La K_m para la fijación de Na^+ a estos sitios citosólicos es 0,6 mM, un valor considerablemente más bajo que la concentración intracelular de Na^+ de ≈12 mM; como resultado, los iones Na^+ normalmente ocuparán por completo estos sitios. Por el contrario, la afinidad de los sitios de fijación de K^+ es lo suficientemente baja como para que los iones K^+, transportados hacia el interior a través de la proteína, se disocien de E1 hacia el citosol a pesar de la alta concentración intracelular de K^+. Durante la transición E1→E2, los tres iones Na^+ fijados se vuelven accesibles a la cara exoplasmática y simultáneamente se reduce la afinidad de los tres sitios de fijación de Na^+. Los tres iones Na^+ transportados hacia afuera a través de la proteína y ahora unidos a los sitios Na^+ de baja afinidad expuestos a la cara exoplasmática, se disocian de uno a la vez hacia el medio extracelular a pesar de la alta concentración extracelular de Na^+. La transición a la conformación E2 también genera dos sitios K^+ de alta afinidad accesibles a la cara exoplasmática. Como la K_m para la fijación de K^+ a estos sitios (0,2 mM) es más baja que la concentración extracelular de K^+ (4 mM), estos sitios se llenarán de iones K^+. De manera similar, durante la transición E2→E1, los dos iones K^+ fijados son transportados hacia el interior y luego liberados dentro del citosol.

Ciertos fármacos (p. ej., ouabaína y digoxina) se fijan al dominio exoplasmático de la Na^+/K^+-ATPasa de la membrana plasmática e inhiben específicamente la actividad de su ATPasa. La interrupción resultante en el balance de Na^+/K^+ de las células es una evidencia firme del papel crítico de esta bomba de iones en el mantenimiento de los gradientes normales de concentración de Na^+ y K^+.

Las H^+-ATPasas de clase V bombean protones a través de las membranas lisosómicas y vacuolares

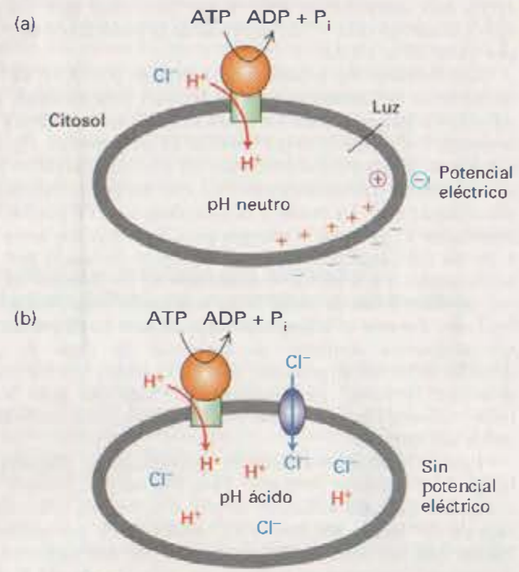
Todas las ATPasas de clase V transportan sólo iones H^+. Estas bombas de protones, presentes en las membranas de los lisosomas, endosomas y vacuolas vegetales, funcionan para acidificar la luz de estos orgánulos. El pH de la luz lisosómica puede medirse con precisión en las células vivas mediante el uso de partículas marcadas con un marcador fluorescente sensible al pH. Después de que estas partículas son fagocitadas por las células y transferidas a los lisosomas, se puede calcular el pH lisosómico a partir del espectro de la fluorescencia emitida. El mantenimiento del gradiente de protones 100 o más veces mayor entre la luz lisosómica (pH ≈ 4,5 – 5,0) y el citosol (pH ≈ 7,0) depende de la producción de ATP por parte de la célula.

Las bombas de protones impulsadas por ATP de las membranas de lisosomas y vacuolas han sido aisladas, purificadas e incorporadas en liposomas. Como se ilustra en la figura 7-6 (centro), estas bombas de protones de clase V contienen dos dominios definidos: un dominio hidrófilo (V_1) y un dominio transmembrana (V_0) con múltiples subunidades en cada uno. La unión y la hidrólisis de ATP por las subunidades V_1 proveen la energía para bombear los iones H^+ a través del canal conductor de protones formado por las subunidades c y a en V_0. A diferencia de las bombas de iones de clase P, las de clase V no son fosforiladas y desfosforiladas durante el transporte de protones. Las bombas estructuralmente similares de protones de clase F, que describiremos en el próximo capítulo, suelen operar en la dirección "inversa" para generar ATP más que para bombear protones y su mecanismo de acción es comprendido en todos sus detalles.

Para acidificar una vesícula intracelular se requiere el bombeo de algunos protones. Para entender el porqué, recordemos que una solución de pH 4 tiene una concentración de 10^{-4} moles por litro o 10^{-7} moles de H^+ por mililitro. Puesto que hay $6{,}02 \times 10^{23}$ moléculas por mol (número de Avogadro), entonces un mililitro de solución de pH 4 contiene $6{,}02 \times 10^{16}$ iones H^+. Así, a pH 4, un lisosoma esférico primario con un volumen de $4{,}18 \times 10^{-15}$ mL (diámetro de 0,2 μm) contendrá 252 protones.

Por sí mismas, las bombas de protones impulsadas por ATP no pueden acidificar la luz de un orgánulo (o el espacio extracelular) porque estas bombas son *electrogénicas*; es decir, un movimiento neto de carga eléctrica tiene lugar durante el transporte. El bombeo de apenas algunos protones provoca la acumulación de iones H^+ cargados positivamente sobre la cara exoplasmática (interior) de la membrana del orgánulo. Por cada H^+ bombeado de un lado al otro, un ion negativo (p. ej., OH^- o Cl^-) será "dejado atrás" sobre la cara citosólica, provocando allí una acumulación de iones cargados negativamente. Estos iones con carga opuesta se atraen unos a otros sobre caras opuestas de la membrana y generan una separación de cargas, o potencial eléctrico, a través de la membrana. A medida que más y más protones son bombeados, el exceso de cargas positivas sobre la cara exoplasmática repele otros iones H^+, lo que evita el bombeo de protones adicionales antes de que se establezca un gradiente significativo de concentración de H^+ transmembrana (fig. 7-10a). De hecho, ésta es la forma como las bombas de H^+ de clase P generan un potencial citosólico negativo a través de las membranas plasmáticas vegetales y de levaduras.

Para que la luz de un orgánulo o un espacio extracelular (p. ej., la luz del estómago) se acidifique, el movimiento de protones debe estar acompañado ya sea por 1) el movimiento de un número igual de aniones (p. ej., Cl^-) en la misma dirección o por 2) el movimiento de igual número de un catión diferente en la dirección opuesta. El primer proceso tiene lugar en los lisosomas y las vacuolas vegetales cuyas membranas contienen H^+-ATPasas de clase V y canales aniónicos a través de los cuales se mueven los iones acompañantes Cl^- (fig. 7-10b). El segundo proceso tiene lugar en el revestimiento del estómago, que contiene una H^+/K^+-ATPasa de clase P que no es electrogénica y que bombea un H^+ hacia el exterior y un K^+ hacia el interior. La operación de este bombeo se describe en capítulos posteriores.



▲ Fig. 7-10. Efecto del bombeo de protones por las bombas de iones de clase V sobre los gradientes de concentración de H^+ y los gradientes de potencial eléctrico a través de las membranas celulares. (a) Si un orgánulo intracelular sólo contiene bombas de clase V, el bombeo de protones genera un potencial eléctrico a través de la membrana, positivo del lado luminal, pero sin cambio significativo en el pH intraluminal. (b) Si la membrana del orgánulo también contiene canales del Cl^-, los aniones siguen pasivamente a los protones bombeados y se produce una acumulación de iones H^+ (pH luminal bajo) pero no de potencial eléctrico a través de la membrana.

Las permeasas bacterianas son proteínas ABC que introducen diversos nutrientes desde el medio ambiente

Como ya se dijo, todos los miembros de la gran y variada superfamilia ABC de proteínas transportadoras contienen dos dominios transmembrana (T) y dos dominios citosólicos de unión a ATP (A) (véase fig 7-6). Los dominios T, cada uno constituido por seis hélices α que atraviesan la membrana, forman la vía a través de la cual la sustancia transportada (sustrato) atraviesa la membrana y determina la especificidad del sustrato de cada proteína ABC. Las secuencias de los dominios A son ≈ 30-40% homólogas en todas las membranas de esta superfamilia, lo que indica un origen evolutivo común. Algunas proteínas ABC contienen también una subunidad exoplasmática de unión al sustrato adicional o subunidad reguladora.

La membrana plasmática de muchas bacterias contiene numerosas *permeasas* pertenecientes a la superfamilia ABC. Estas proteínas utilizan la energía liberada por hidrólisis de ATP para transportar aminoácidos específicos, azúcares, vitaminas o incluso péptidos hacia el interior celular. Puesto que las bacterias suelen crecer en cultivos o en el agua de estanques donde la concentración de nutrientes es baja, estas proteínas transportadoras ABC le permiten a la célula transportar nutrientes en contra de gradientes de concentración sustanciales. Las permeasas bacterianas son casi siempre inducibles; es decir, la cantidad de una proteína transportadora en la membrana celular está regulada tanto por la concentración de nutrientes en el medio como por las necesidades metabólicas de la célula.

En la histidinpermeasa de *E. coli*, una proteína bacteriana ABC típica, los dos dominios transmembrana y los dos dominios citosólicos fijadores de ATP están formados por cuatro subunidades separadas. En las bacterias gramnegativas, como *E. coli*, la membrana externa contiene porinas que las hace altamente permeables a la mayoría de las moléculas pequeñas (véase fig. 5-14). Una proteína soluble fijadora de histidina se ubica en el espacio periplasmático entre la membrana exterior y la membrana plasmática. Esta proteína soluble se une con fuerza a la histidina y la dirige a las subunidades T de la permeasa, a través de la cual la histidina cruza la membrana plasmática impulsada por la hidrólisis de ATP. Las células mutantes de *E. coli* que son defectuosas en todas las subunidades de histidinpermeasa o en la proteína fijadora soluble son incapaces de transportar histidina hacia el interior celular, pero pueden transportar otros aminoácidos cuya incorporación es facilitada por otras proteínas de transporte. Tales análisis genéticos proporcionan evidencia sólida de que la histidinpermeasa y las proteínas ABC similares cumplen la función de transportar diversos solutos hacia el interior de las células bacterianas.

Se conocen alrededor de 50 bombas ABC de moléculas pequeñas en los mamíferos

El descubrimiento de la primera proteína ABC eucariote provino de estudios sobre células tumorales y células cultivadas que exhibieron resistencia a varios fármacos con estructuras químicas no relacionadas. Tales células expresaron finalmente niveles elevados de una *proteína transportadora de resistencia a múltiples fármacos (multidrug-resistance, MDR)* conocida como *MDR1*. Esta proteína utiliza la energía derivada de la hidrólisis de ATP para transportar diversos fármacos desde el citosol hacia el medio extracelular. El gen *Mdr1* está amplificado en las células frecuentemente resistentes a los múltiples fármacos, lo que da como resultado un exceso de producción de la proteína MDR1.

La mayoría de los fármacos transportados por la MDR1 son moléculas hidrófobas pequeñas que se difunden desde el medio a través de la membrana plasmática, sin ayuda de las proteínas de transporte, hacia el citosol celular, donde bloquean diversas funciones celulares. Dos de estos fármacos son la colchicina y la vinblastina, que bloquean el ensamblaje de microtúbulos. La salida de tales fármacos impulsada por ATP mediante la MDR1 reduce sus concentraciones en el citosol. Como resultado, se requiere una concentración extracelular de fármaco mucho mayor para matar las células que expresan la MDR1 que para aquellas que no lo hacen. Que la MDR1 es una bomba de moléculas pequeñas impulsada por ATP se demostró con los liposomas que contienen la proteína purificada (véase fig. 7-5). La actividad ATPasa de estos liposomas aumenta por la acción de diferentes fármacos de manera dependiente de la dosis correspondiente con su capacidad para ser transportada por la MDR1.

Se reconocen alrededor de 50 proteínas transportadoras ABC diferentes en los mamíferos (véase cuadro 18-2), que se

expresan con abundancia en el hígado, los intestinos y los riñones, sitios donde los productos tóxicos naturales y de desecho son extraídos del cuerpo. Los sustratos para estas proteínas ABC incluyen azúcares, aminoácidos, colesterol, péptidos, proteínas, toxinas y xenobióticos. Así, lo más probable es que la función normal de la MDR1 sea transportar diversas toxinas naturales y metabólicas hacia la bilis, la luz intestinal o la orina en formación. Durante el curso de su evolución, la MDR1 parece haber adquirido la capacidad para transportar fármacos cuyas estructuras son similares a las de estas toxinas endógenas. Los tumores derivados de los tipos celulares que expresan MDR, como los hepatomas (cánceres hepáticos), suelen ser resistentes a casi todos los agentes quimioterápicos y por ende son difíciles de tratar, debido tal vez a que exhiben un incremento de la expresión de la proteína MDR1 o de la emparentada MDR2.

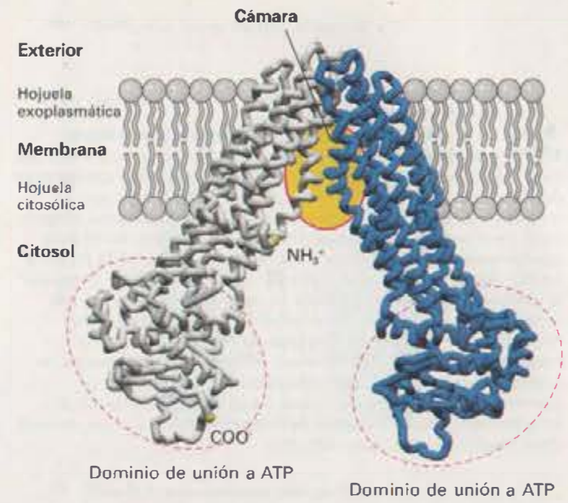
MEDICINA

Varias enfermedades genéticas humanas se asocian con las proteínas ABC defectuosas. La adrenoleucodistrofia (ligada al cromosoma X), por ejemplo, se caracteriza por una proteína transportadora ABC defectuosa (ABCD1) que se localiza en las membranas de los peroxisomas. Esta proteína suele regular la entrada de ácidos grasos de cadenas muy largas hacia el interior de los peroxisomas, donde son oxidados; en su ausencia estos ácidos grasos se acumulan en el citosol y provocan daño celular. La enfermedad de Tangiers se caracteriza por una deficiencia de la proteína ABC de la membrana plasmática (ABCA1) que transporta fosfolípidos y posiblemente colesterol (cap. 18).

Un ejemplo final es la fibrosis quística, causada por una mutación en el gen que codifica el *regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR)*. Esta proteína transportadora de Cl^- se expresa en las membranas apicales de las células epiteliales en el pulmón, las glándulas sudoríparas, el páncreas y otros tejidos. Por ejemplo, la proteína CFTR es importante para la reabsorción de Cl^- en las células de las glándulas sudoríparas y los bebés con fibrosis quística, si se los lame, a menudo son "salados". Un incremento en el AMP cíclico (cAMP), una molécula señalizadora intracelular pequeña, provoca la fosforilación de CFTR y estimula el transporte de Cl^- por esas células en las personas sanas, pero no en las que padecen fibrosis quística porque tienen una proteína CFTR defectuosa. (El papel del cAMP en numerosas vías señalizadoras se analiza en el cap. 13.) La secuencia y la estructura pronosticada de la proteína CFTR, basada en el análisis del gen clonado, son muy similares a las de la proteína MDR1, excepto por la presencia de un dominio adicional, el dominio regulador (R), sobre la cara citosólica. Más aún, la actividad transportadora de Cl^- de la proteína CFTR se acentúa por la unión de ATP. Dada su similitud con otras proteínas ABC, la CFTR también funcionaría como una bomba impulsada por ATP de alguna molécula aún no identificada. ▮

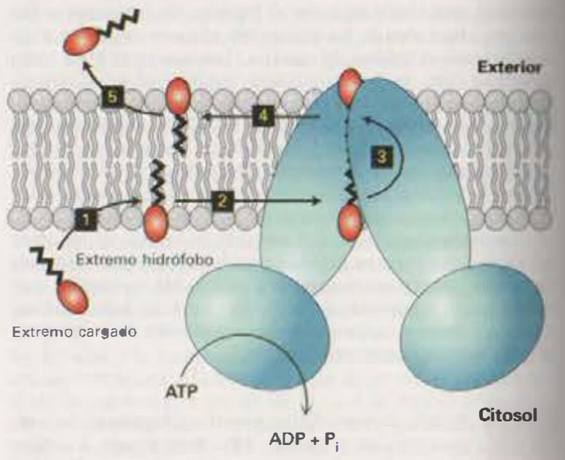
Las proteínas ABC que transportan sustratos solubles en lípidos podrían operar por un mecanismo de flipasas

Los sustratos de MDR1 de los mamíferos son principalmente moléculas planas solubles en lípidos con una o más cargas positivas; todas compiten entre sí por el transporte mediante la MDR1, lo que sugiere que se fijan al mismo sitio o sitios sobre la proteína. A diferencia de las proteínas bacterianas ABC, los cuatro dominios de MDR1 están fusionados en una única proteína de PM 170.000. La estructura tridimensional recientemente determinada de una proteína transportadora de lípidos homóloga de *E. coli* revela que la molécula tiene forma de V, con el ápice en la membrana y los brazos que contienen los sitios de fijación de ATP proyectándose hacia el citosol (fig. 7-11).



▲ Fig. 7-11. Modelo estructural de la flipasa de lípidos de *E. coli*, una proteína ABC homóloga a la MDR1 de los mamíferos. La proteína con forma de V encierra una "cámara" dentro de la bicapa donde hipotéticamente los sustratos fijados son proyectados a través de la membrana, como se representa en la figura 7-12. Cada subunidad idéntica en esta proteína homodimérica tiene un dominio transmembrana, que comprende seis hélices α y un dominio citosólico donde tiene lugar la fijación de ATP. (Adaptado de G. Chang y C. Roth, 2001, Science 293:1793.)

Aunque el mecanismo de transporte por la MDR1 y por proteínas ABC similares no fue demostrado en forma definitiva, un probable candidato es el *modelo de flipasa*, representado en la figura 7-12. De acuerdo con este modelo, la MDR1 "lanza o pasa" una molécula del sustrato cargado desde el citosol hacia la hojuela exoplasmática, una reacción energéticamente desfavorable impulsada por la actividad ATPasa acoplada de la proteína. La sustentación del modelo de transporte de la flipasa a través de la MDR1 proviene de la MDR2, una proteína homóloga presente en la región de la membrana plasmática del hepatocito que se orienta hacia el conducto biliar. Como se detalla en el capítulo 18, se ha demostrado que la MDR2 proyecta los fosfolípidos desde la hojuela de la membrana plasmática orientada hacia el citosol hacia la hojuela exoplasmática, lo que genera un exceso de fosfolípidos en la hojuela exoplasmática; estos fosfolípidos son excretados luego hacia el interior del conducto biliar y forman una parte esencial de la bilis.



▶ **Fig. 7-12. Modelo de flipasa del transporte mediante MDR1 y proteínas ABC similares.** Paso 1: La porción hidrófoba (negro) de una molécula del sustrato se mueve espontáneamente desde el citosol hacia el interior de la hojuela de la bicapa fosfolipídica que mira al citosol, mientras que el extremo cargado (rojo) permanece en el citosol. Paso 2: El sustrato se difunde lateralmente hasta encontrar y fijarse a un sitio sobre la proteína MDR1 dentro de la bicapa. Paso 3: La proteína luego "traspasa" la molécula cargada del sustrato hacia el interior de la hojuela exoplasmática, una reacción energéticamente desfavorable impulsada por la hidrólisis acoplada de ATP por el dominio citosólico. Pasos 4 y 5: Una vez en la cara exoplasmática, el sustrato nuevamente puede difundirse lateralmente en la membrana y por último se mueve hacia la fase acuosa en el exterior de la célula. (Adaptado de P. Borst, N. Zelcer y A. van Helvoort, 2000. Biochim. Biophis. Acta 1486:128.)

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 7.2

Bombas impulsadas por ATP y el ambiente iónico intracelular

- Cuatro clases de proteínas transmembrana acoplan la energía liberada por la hidrólisis de ATP con el transporte de sustancias contra su gradiente de concentración que requiere energía: las bombas de clases P, V y F, y las proteínas ABC (véase fig. 7-6).
- La acción combinada de las Na^+/K^+-ATPasas de clase P en la membrana plasmática y las Ca^{2+}-ATPasas homólogas en la membrana plasmática o en el retículo sarcoplasmático crea el medio iónico típico de las células animales; alto K^+, bajo Ca^{2+} y bajo Na^+ en el citosol; bajo K^+, alto Ca^{2+} y alto Na^+ en el líquido extracelular.
- En las bombas de clase P, la fosforilación de la subunidad α (catalítica) y un cambio en los estados conformacionales son esenciales para el acoplamiento de la hidrólisis de ATP para el transporte de iones H^+, Na^+, K^+ o Ca^{2+} (véanse figs. 7-7 y 7-9).
- Las ATPasas de clases V y F, que transportan exclusivamente protones, son grandes complejos de múltiples subunidades con un canal conductor de protones en el dominio transmembrana y sitios de fijación de ATP en el dominio citosólico.
- Las bombas de H^+ de clase V en las membranas lisosómicas y endosómicas animales y en las membranas vacuolares vegetales son las encargadas de mantener un pH menor dentro de los orgánulos que en el citosol circundante (véase fig. 7-10b).
- Todos los miembros de la diversa y gran superfamilia ABC de las proteínas transportadoras contienen cuatro dominios centrales: dos dominios transmembrana, que forman una vía para el movimiento de solutos y determina la especificidad de sustrato, y dos dominios citosólicos fijadores de ATP (véase fig. 7-11).
- La superfamilia ABC incluye permeasas bacterianas para aminoácidos y azúcares y alrededor de 50 proteínas de mamíferos (p. ej., MDR1, ABCA1) que transportan una amplia variedad de sustratos que incluyen toxinas, fármacos, fosfolípidos, péptidos y proteínas.
- De acuerdo con el modelo de flipasas de la actividad MDR, una molécula del sustrato se difunde hacia la hojuela citosólica de la membrana plasmática, luego es proyectada o lanzada hacia la hojuela exoplasmática en un proceso impulsado por ATP y, finalmente, se difunde desde la membrana hacia el espacio extracelular (véase fig. 7-12).

7.3 Canales iónicos no regulados y potencial de membrana en reposo

Además de las bombas iónicas impulsadas por ATP, que transportan iones contra sus gradientes de concentración, la membrana plasmática contiene canales proteicos que les permite a los principales iones celulares (Na^+, K^+, Ca^{2+} o Cl^-) pasar a través de ellos a diferentes velocidades a favor de sus gradientes de concentración. Los gradientes iónicos de concentración generados por las bombas y los movimientos selectivos de iones a través de los canales constituyen el mecanismo principal por el cual se genera una diferencia en el voltaje, o potencial eléctrico, a través de la membrana plasmática. La magnitud de este potencial eléctrico suele ser de 70 milivoltios (mV), con el interior de la célula siempre negativo con respecto al exterior. Este valor no parece demasiado alto hasta que pensamos en el grosor de la membrana plasmática (3,5 nm). Así, el gradiente de voltaje a través de la membrana plasmática es de 0,07 V por $3{,}5 \times 10^{-7}$ cm o ¡200.000 voltios por centímetro! (Para apreciar lo que esto significa, piense que las líneas de transmisión de alto voltaje para la electricidad utilizan gradientes de alrededor de 200.000 voltios por kilómetro.)

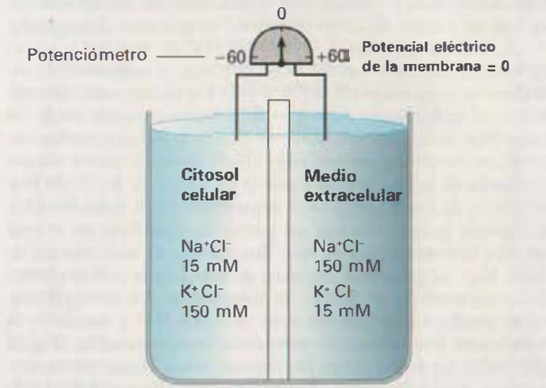
Los gradientes iónicos y el potencial eléctrico a través de la membrana plasmática desempeñan un papel en numerosos procesos biológicos. Como ya se dijo, el aumento de la concentración citosólica de Ca^{2+} es una señal reguladora importante, que inicia la contracción en las células musculares y dispara la secreción de las enzimas digestivas en las células pancreáticas exocrinas. En muchas células animales, la fuerza combinada del gradiente de concentración del Na^+ y el potencial eléctrico de la membrana conduce a la captación de aminoácidos y otras moléculas contra sus gradientes de concentración por proteínas simporte y antiporte (véase sección 7.4). Además, la conducción de potenciales de acción por las células nerviosas depende de la apertura y el cierre de canales de iones en respuesta a cambios en el potencial de la membrana (véase sección 7.7).

Aquí comentaremos el origen del potencial eléctrico de la membrana en las células en reposo, cómo los canales iónicos median el movimiento selectivo de iones a través de la membrana y las técnicas experimentales útiles para caracterizar las propiedades funcionales de los canales proteicos.

El movimiento selectivo de iones crea una diferencia de potencial eléctrico transmembrana

Para explicar cómo puede originarse un potencial eléctrico a través de la membrana plasmática, primero veremos un conjunto de sistemas experimentales simplificados en los cuales una membrana separa una solución de 150 mM de NaCl/15 mM de KCl, en el lado derecho, de una de 15 mM NaCl/150 mM de KCl en el lado izquierdo. Un potenciómetro (voltímetro) está conectado a ambas soluciones para medir cualquier diferencia en el potencial eléctrico a través de la membrana. Si la membrana es impermeable a todos los iones, ninguno fluirá a través de ella y no se generará potencial eléctrico, como se muestra en la figura 7-13a.

Ahora supóngase que la membrana contiene canales proteicos para Na^+ que acomodan los iones Na^+ pero excluyen los iones K^+ y Cl^- (fig. 7-13b). Los iones Na^+ tienden a moverse a favor de su gradiente de concentración desde el lado derecho al izquierdo, dejando un exceso de iones Cl^- negativos en comparación con los iones Na^+ positivos en el lado derecho y generando un exceso de iones Na^+ positivos comparados con los iones Cl^- en el lado izquierdo. El exceso de Na^+ en la izquierda y el de Cl^- en la derecha permanecen cerca de las respectivas superficies de la membrana porque el exceso de cargas positivas en un lado de la membrana es atraído al exceso de cargas negativas en el otro lado. La separación



▶ **FIGURA EXPERIMENTAL 7-13 La generación de un potencial eléctrico transmembrana (voltaje) depende del movimiento selectivo de iones a través de una membrana semipermeable.** En este sistema experimental, una membrana separa una solución NaCl 15 mM/KC 150 mM (*izquierda*) de una solución NaCl 150 mM/KCl 15 mM (*derecha*); estas concentraciones de iones son similares a las del citosol y la sangre, respectivamente. Si la membrana que separa las dos soluciones es impermeable a todos los iones (a), ningún ion puede moverse a través de ella y no se registra ninguna diferencia del potencial eléctrico en el potenciómetro que conecta las dos soluciones. Si la membrana es selectivamente permeable sólo al Na^+ (b) o al K^+ (c), entonces la difusión de iones a través de sus respectivos canales conduce a la separación de cargas a través de la membrana. En el equilibrio, el potencial de membrana provocado por la separación de cargas se vuelve igual al potencial de Nernst E_{Na} o E_K registrado en el potenciómetro. Para más explicaciones véase el texto.

resultante de cargas a través de la membrana constituye un potencial eléctrico, o voltaje, con el lado derecho de la membrana con un exceso de carga negativa con respecto al izquierdo.

A medida que más y más iones Na^+ se mueven a través de los canales atravesando la membrana, la magnitud de esta diferencia de carga (es decir, voltaje) se incrementa. Sin embargo, el movimiento continuo de derecha a izquierda de los iones Na^+ es finalmente inhibido por la repulsión mutua entre el exceso de cargas positivas (Na^+) acumuladas en el lado izquierdo de la membrana y por la atracción de los iones Na^+ al exceso de cargas negativas acumulado en el lado derecho. El sistema pronto alcanza un punto de equilibrio en el cual los dos factores opuestos que determinan el movimiento de iones Na^+ –el potencial eléctrico de membrana y el gradiente de concentración de iones– se compensan. En el equilibrio, no se produce movimiento neto de iones Na^+ a través de la membrana. Por ende, esta membrana *semipermeable*, al igual que todas las membranas biológicas, actúa como un *capacitor* –un dispositivo que consiste en una lámina delgada de material no conductor (el interior hidrófobo) rodeado a ambos lados por un material eléctrico conductor (los grupos cabeza polares de los fosfolípidos y los iones en la solución acuosa circundante)– que puede almacenar cargas positivas en un lado y cargas negativas en el otro.

Si una membrana es permeable sólo a los iones Na^+, entonces en el equilibrio el potencial eléctrico medible a través de la membrana es igual al potencial del sodio en equilibrio en voltios, E_{Na}. La magnitud de E_{Na} está dada por la *ecuación de Nernst*, que deriva de los principios básicos de la fisicoquímica:

$$E_{Na} = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{[Na_i]}{[Na_r]} \qquad (7\text{-}2)$$

donde R (la constante de gases) = 1,987 cal/(grado · mol) o 8,28 joules/(grado · mol); T (la temperatura absoluta en grados Kelvin) = 293 K a 20 °C; Z (la carga, también llamada la valencia) en este caso igual a +1; F (la constante de Faraday) 23.062 cal/(mol · V), o 96.000 coulombios/(mol · V); y $[Na_i]$ y $[Na_r]$ son las concentraciones de Na^+ en los lados izquierdo y derecho, respectivamente, en el equilibrio. A 20 °C, la ecuación 7-2 se reduce a:

$$E_{Na} = 0{,}059 \log_{10} \frac{[Na_i]}{[Na_r]} \qquad (7\text{-}3)$$

Si $[Na_i]/[Na_r]$ = 0,1, una relación de concentraciones diez veces mayor, como en la figura 7-13b, entonces la E_{Na} = –0,059 V (o –59 mV), con el lado derecho negativo con respecto al izquierdo.

Si la membrana es permeable sólo a los iones K^+ y no a los iones Na^+ o Cl^-, entonces una ecuación similar describe el potencial de equilibrio del potasio E_K:

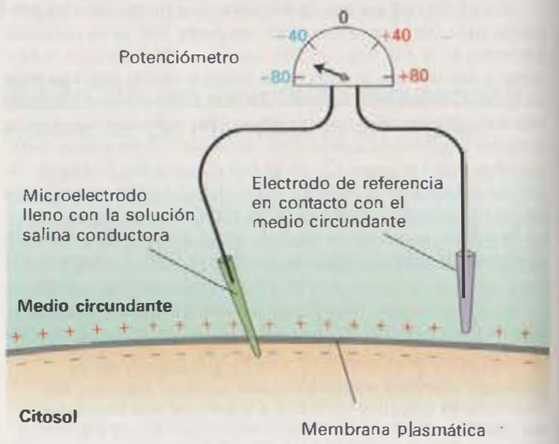
$$E_K = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{[K_i]}{[K_r]} \qquad (7\text{-}4)$$

La *magnitud* del potencial eléctrico de la membrana es el mismo (59 mV para una diferencia de diez veces en la concentración de iones), excepto que el lado derecho es ahora *positivo* con respecto al izquierdo (fig. 7-13c), opuesta a la polaridad obtenida a través de la membrana selectivamente permeable a los iones Na^+.

El potencial de membrana en las células animales depende en gran medida de los canales del K^+ en reposo

Las membranas plasmáticas de las células animales contienen muchos canales del K^+ abiertos, pero pocos canales de Na^+, Cl^- o Ca^{2+} abiertos. Como resultado, el principal movimiento iónico a través de la membrana plasmática es el del K^+ desde el interior hacia el exterior, impulsado por el gradiente de concentración de K^+, dejando un exceso de carga negativa en el interior y creando un exceso de carga positiva en el exterior, de manera similar a la de los sistemas experimentales mostrados en la figura 7-13c. Así, el flujo hacia afuera de iones K^+ a través de estos canales, llamados **canales del K^+ en reposo**, es el determinante principal del potencial de membrana negativo del interior. Al igual que todos los canales, éstos alternan entre un estado cerrado y uno abierto, pero puesto que su apertura y su cierre no son afectados por el potencial de membrana o por moléculas señalizadoras pequeñas, estos canales se denominan *no regulados*. Los diversos canales regulados, analizados en secciones posteriores, se abren sólo en respuesta a ligandos específicos o a cambios en el potencial de la membrana.

Cuantitativamente, el potencial de membrana en reposo habitual de –70 mV es cercano, pero menor en magnitud, al potencial de equilibrio del potasio calculado a partir de la ecuación de Nernst debido a la presencia de algunos canales abiertos del Na^+. Estos canales abiertos del Na^+ permiten el flujo neto de iones Na^+ hacia adentro, haciendo la cara citosólica de la membrana plasmática más positiva, esto es, menos negativa, que lo predicho por la ecuación de Nernst para el K^+. El gradiente de concentración de K^+ que conduce el flujo de iones a través de los canales del K^+ en reposo es generado por la Na^+/K^+-ATPasa ya descrita (véase fig. 7-9). En ausencia de esta bomba, o cuando está inhibida, el gradiente de concentración no puede mantenerse y la magnitud del potencial de la membrana cae finalmente a cero.



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 7-14 Se puede medir el potencial eléctrico a través de la membrana plasmática de las células vivas.** Un microelectrodo, construido al llenar un tubo de vidrio de diámetro extremadamente pequeño con un líquido conductor como una solución de KCl se inserta en una célula de manera tal que la membrana superficial se sella por sí misma alrededor de los electrodos. Un electrodo de referencia es ubicado en el baño del medio circundante. Un potenciómetro que conecta los dos electrodos registra el potencial, en este caso –60 mV. Sólo se registra una diferencia de potencial cuando el microelectrodo se inserta dentro de la célula; no se registra potencial si el microelectrodo está en el líquido del baño.

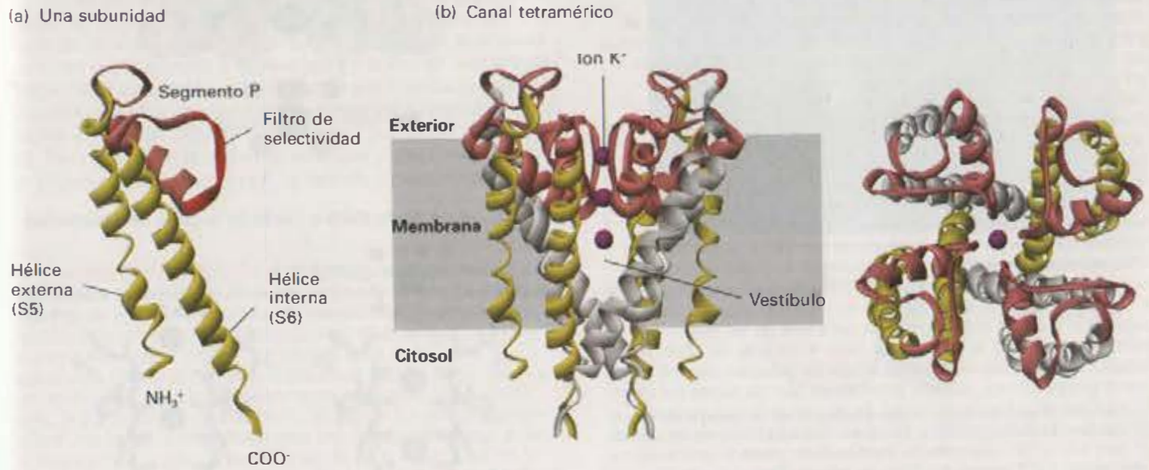
Aunque los canales del K^+ en reposo desempeñan un papel predominante en la generación del potencial eléctrico a través de la membrana de las células animales, no es el caso en las células vegetales ni en las de los hongos. El potencial de membrana negativo del interior en estas células es generado mediante el transporte de iones H^+ hacia afuera de la célula por las bombas de protones de clase P (véase fig. 7-10a).

El potencial a través de la membrana plasmática de las células grandes puede ser medido con un microelectrodo insertado dentro de la célula y un electrodo de referencia ubicado en el líquido extracelular. Ambos se conectan a un potenciómetro capaz de medir diferencias pequeñas de potencial (fig. 7-14). En casi todas las células, el interior (la cara citosólica) de la membrana celular es negativo respecto del exterior; los potenciales de membrana típicos abarcan entre –30 y –70 mV. El potencial a través de la membrana superficial de la mayoría de las células animales no suele variar con el tiempo. Por el contrario, las neuronas y las células musculares –los tipos principales de células eléctricamente activas– sufren cambios controlados en los potenciales de membranas que comentaremos más adelante.

Los canales iónicos contienen un filtro selectivo formado a partir de hélices α transmembrana y segmentos P conservados

Todos los canales iónicos exhiben especificidad por iones particulares: los canales del K^+ permiten entrar a los iones K^+ pero no a los iones Na^+ estrechamente emparentados, mientras que los canales del Na^+ admiten Na^+ pero no K^+. La determinación de la estructura tridimensional de un canal del K^+ bacteriano reveló por primera vez cómo se logra esta exquisita selección de iones. A medida que se determinaron las secuencias de otros canales de K^+, Na^+ y Ca^{2+}, se evidenció que esas proteínas comparten una estructura común y probablemente evolucionaron a partir de un único tipo de proteína canal.

Al igual que otros canales del K^+, los canales bacterianos del K^+ están constituidos por cuatro subunidades idénticas dispuestas simétricamente alrededor de un poro central (fig. 7-15). Cada subunidad contiene dos hélices α que atraviesan la membrana (S5 y S6) y un segmento P corto (dominio formador del poro) que penetra parcialmente la bicapa. En el canal tetramérico del K^+, las ocho hélices α transmembrana (dos de cada subunidad) forman una "tienda invertida", lo que genera una cavidad llena de agua llamada el vestíbulo en la porción central del canal. Cuatro asas extendidas que son parte de los segmentos P forman el verdadero *filtro de selectividad de ion* en la parte estrecha del poro cerca de la superficie exoplasmática por encima del vestíbulo.



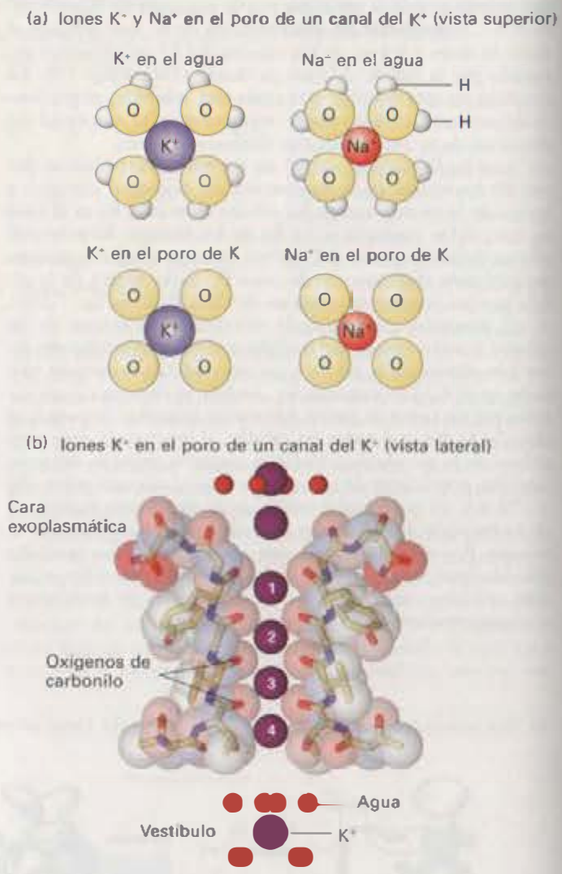
▲ **Fig. 7-15. Estructura del canal del K^+ en reposo de la bacteria *Streptomyces lividans*.** Todas las proteínas canal del K^+ son tetrámeros que comprenden cuatro subunidades idénticas cada una de las cuales contiene dos hélices α que atraviesan la membrana, denominadas por convención S5 y S6 (amarillo), y un segmento P o poro, más corto (rosa). (a) Una de las subunidades, vista de lado, con características estructurales clave indicadas. (b) El canal tetramérico completo visto de lado (*izquierda*) y la parte superior, o extremo extracelular (*derecha*). Los segmentos P están localizados cerca de la superficie exoplasmática y conectan las hélices α S5 y S6; consisten en una "torre pequeña" no helicoidal, que reviste la parte superior del poro; una hélice α corta; y un asa extendida que se proyecta hacia la parte más estrecha del poro y forma el filtro de selectividad de iones. Este filtro permite pasar el K^+ (esferas púrpuras), pero no otros iones. Bajo el filtro está la cavidad central o vestíbulo revestido por las hélices α interiores o S6. Las subunidades en los canales del K^+ regulados, que se abren y cierran en respuesta a estímulos específicos, contienen hélices transmembrana adicionales no representadas aquí.
(Véase Y. Zhou et al., 2001 Nature 414:43.)

Varios tipos de evidencia sustentan el papel de los segmentos P en la selección de iones. Primero, la secuencia de aminoácidos del segmento P es altamente homóloga en todos los canales del K^+ conocidos y diferente de la de otros canales iónicos. Segundo, la mutación de aminoácidos en este segmento altera la capacidad de un canal del K^+ para distinguir el Na^+ del K^+. Por último, reemplazar el segmento P de un canal bacteriano de K^+ por el segmento homólogo de un canal del K^+ de mamífero produce una proteína quimérica que exhibe una selectividad normal para el K^+ por encima de otros iones. Por ende, se cree que todos los canales de K^+ utilizan el mismo mecanismo para distinguir el K^+ por encima de otros iones.

La capacidad del filtro de selectividad iónica de los canales del K^+ para seleccionar el K^+ en lugar de Na^+ se debe principalmente a los oxígenos de los carbonilos del esqueleto de los residuos de glicina ubicados en una secuencia Gly-Tyr-Gly que se halla en una posición análoga en el segmento P en todos los canales del K^+ conocidos. A medida que un ion K^+ entra en el angosto filtro de selectividad, pierde el agua de hidratación pero se une a ocho oxígenos del esqueleto carbonilo, dos del asa extendida en cada segmento P que reviste el canal (fig. 7-16a, *izquierda*). Como resultado, se necesita una energía de activación relativamente baja para el pasaje de iones K^+ a través del canal. Debido a que un ion de Na^+ deshidratado es demasiado pequeño para unirse a los ocho oxígenos del carbonilo que revisten el filtro de selectividad, la energía de activación para el pasaje de iones Na^+ es relativamente alta (fig. 7-16a, *derecha*). Esta diferencia en las energías de activación favorece el pasaje de los iones K^+ por encima de los Na^+ en un factor de mil. Los iones calcio son demasiado grandes para pasar a través de un canal del K^+ con sus moléculas de agua unidas o sin ellas.

Recientes estudios de cristalografía de rayos X revelan que el canal contiene iones K^+ dentro del filtro de selectividad aun cuando está cerrado; sin estos iones el canal probablemente colapsaría. Se cree que estos iones están presentes en las posiciones 1 y 3 o en las 2 y 4, cada una encajonada por ocho átomos de oxígeno del carbonilo (fig. 7-16b y c). Los iones K^+ se mueven simultáneamente a través del canal de manera que cuando el ion sobre la cara exoplasmática que ha sido parcialmente despojado del agua de hidratación se mueve hacia la posición 1, el ion en la posición 2 salta a la posición 3 y el que está en la posición 4 abandona el canal (fig. 7-16c).

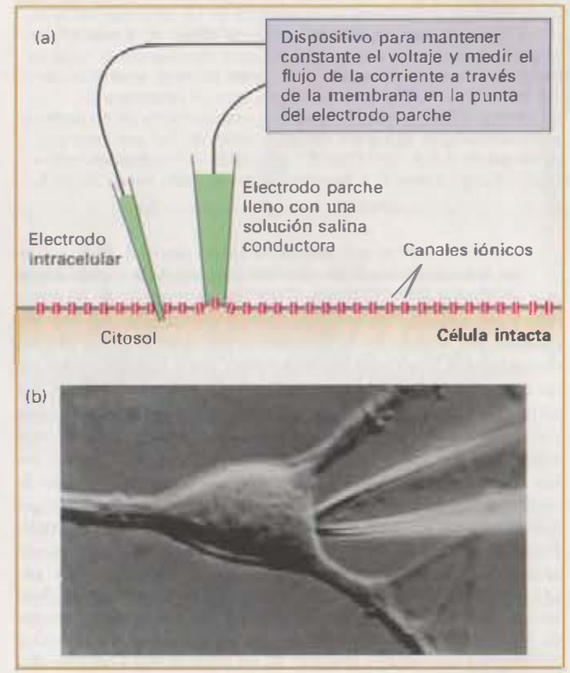
Aunque las secuencias de aminoácidos de los segmentos P en los canales del Na^+ y el K^+ difieren en cierta medida, son lo suficientemente similares para sugerir que la estructura general de los filtros de selectividad de iones en ambos tipos de canales es comparable. Presumiblemente, el diámetro del filtro en los canales del Na^+ es lo suficientemente pequeño para permitir que los iones Na^+ deshidratados se fijen a los oxígenos de carbonilo del esqueleto, pero excluya los iones K^+ más grandes para que no entren.



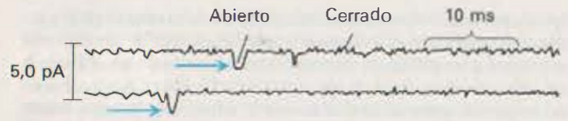
▶ Fig. 7-16. Mecanismos de selectividad y transporte de iones en los canales del K^+ en reposo. (a) Diagramas esquemáticos de iones K^+ y Na^+ hidratados en solución y en el poro de un canal del K^+. A medida que los iones K^+ pasan a través del filtro de selectividad, pierden las moléculas de agua unidas y en su lugar pasan a estar coordinados con ocho oxígenos carbonilo del esqueleto, cuatro de los cuales, tal como se muestra, son parte de los aminoácidos conservados en el asa que reviste el canal de cada segmento P. Los iones Na^+ más pequeños no pueden coordinarse perfectamente con estos oxígenos y por lo tanto pasan a través del canal sólo en raras ocasiones. (b) Mapa de densidad de electrones de alta resolución obtenido por cristalografía de rayos X que muestra los iones K^+ (esferas púrpuras) al pasar a través de los filtros de selectividad. Sólo se muestran dos de las subunidades diagonalmente opuestas de los canales. Dentro del filtro de selectividad, cada ion K^+ interactúa con los ocho átomos de oxigeno carbonilo (bastones rojos) que revisten el canal, dos de cada una de las cuatro subunidades, como si imitaran las ocho moléculas de agua de hidratación. (c) Interpretación del mapa de densidad electrónica que muestra los dos estados alternativos por los cuales los iones K^+ se mueven a través del canal. En el estado 1, moviéndose desde la cara exoplasmática del canal hacia adentro, se ve un ion K^+ con sus ocho moléculas de agua unidas, iones K^+ en las posiciones 1 y 3 dentro del filtro de selectividad y un ion K^+ completamente hidratado dentro del vestíbulo. Durante el movimiento del K^+ cada ion en el estado 1 se mueve un paso hacia adentro, formando el estado 2. Así, en el estado 2, el ion K^+ en el lado exoplasmático del canal ha perdido cuatro de sus ocho moléculas de agua, el ion en la posición 1 en el estado 1 se ha movido a la posición 2 y el ion en la posición 3 en el estado 1 se ha movido a la posición 4. Al ir del estado 2 al estado 1 el K^+ en la posición 4 se mueve hacia el vestíbulo y toma ocho moléculas de agua, mientras que otro ion K^+ hidratado se mueve hacia el interior de la abertura del canal y los otros iones K^+ se mueven hacia abajo un paso. [Parte (a) adaptada de C. Armstrong, 1998, Science 280:56. Partes (b) y (c) adaptadas de Y. Zhou et al., 2001, Nature 414:43.]

La técnica del pinzamiento zonal de membrana *(patch clamp)* permite la medición de los movimientos iónicos a través de canales individuales

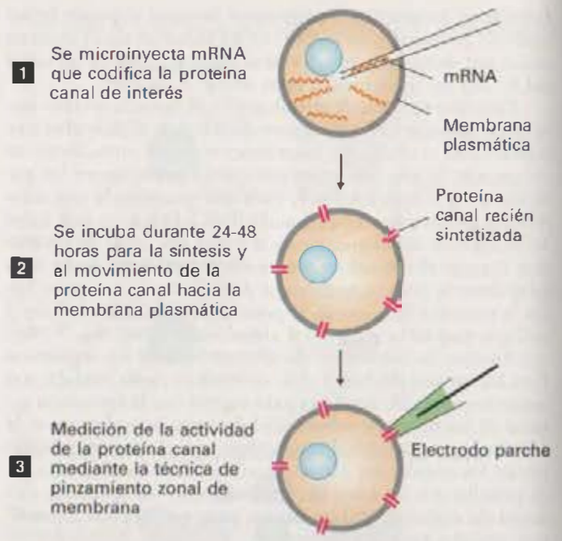
La técnica del patch clamp permite a los investigadores estudiar la apertura, el cierre, la regulación y la conductancia iónica de un *único* canal iónico. En esta técnica, el movimiento de iones hacia adentro o hacia afuera a través de una porción pequeña de membrana se cuantifica a partir de la cantidad de corriente eléctrica necesaria para mantener el potencial de membrana a un valor "fijado" (con grapas) particular (fig. 7-17a, b). Para preservar la electroneutralidad y mantener constante el potencial de membrana, la entrada de cada ion positivo (p. ej., un ion Na^+) en una célula a través de un canal en el parche de membrana es balanceada por la adición de un electrón al citosol a través de un microelectrodo insertado en el citosol; un aparato electrónico mide el número de electrones (corriente) requerido para contrabalancear la entrada de iones a través de los canales de membrana. A la inversa, la salida de cada ion positivo de la célula (p. ej., un ion K^+) es balanceada por la extracción de un electrón del citosol. La técnica del patch-clamp puede emplearse sobre células enteras o porciones de membrana aisladas para medir los efectos de diferentes sustancias y concentraciones iónicas sobre el flujo de iones (fig. 7-17c).



▶ FIGURA EXPERIMENTAL 7-17 El flujo de corriente a través de canales individuales de iones se puede medir mediante la técnica de pinzamiento zonal de membrana *(patch clamp)*. (a) Disposición experimental básica para medir el flujo de corriente a través de canales iónicos individuales en la membrana plasmática de una célula viva. El electrodo parche, lleno con una solución salina conductora de corriente, se aplica, con succión leve, a la membrana plasmática. La punta de 0,5 µm de diámetro cubre una región que contiene sólo uno o algunos canales iónicos. El segundo electrodo se inserta a través de la membrana en el citosol. Un dispositivo de registro mide el flujo de corriente sólo a través de los canales de la porción de membrana plasmática (parche). (b) Microfotografía del cuerpo celular de una neurona cultivada y la punta de una pipeta que toca la membrana celular. (c) Diferentes configuraciones de pinzamiento zonal de membrana. Las porciones de membrana separadas aisladas son la mejor configuración para estudiar los efectos sobre los canales de diferentes concentraciones de iones y solutos, como las hormonas extracelulares y los segundos mensajeros intracelulares (p. ej., cAMP). [Parte (b) de B. Sakmann, 1992, Neuron 8:613 (conferencia del Nobel), también publicada en E. Neher y B. Sakmann, 1992, Sci Am 266(3):44. Parte (c) adaptada de B. Hille, 1992, Ion Channels of Excitable Membranes, 2da ed., Sinauer Associates, p. 85.]



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 7-18 El flujo de iones a través de canales del Na^+ individuales puede calcularse a partir de los trazados de la técnica de pinzamiento zonal de membrana. Dos porciones de membrana invertidas de membrana plasmática muscular fueron despolarizadas hasta un potencial levemente menor que el potencial de membrana en reposo. El electrodo parche contenía NaCl. Los pulsos transitorios de corriente eléctrica en picoamperes (pA), registrados como grandes desviaciones hacia abajo (flechas azules) indican la apertura de un canal del Na^+ y el movimiento de iones Na^+ hacia adentro a través de la membrana. Las desviaciones menores en la corriente representan el ruido de fondo. La corriente promedio a través de un canal abierto es de 1,6 pA o $1{,}6 \times 10^{-12}$ amperios. Puesto que un amperio = 1 coulombio (C) de carga por segundo, esta corriente es equivalente al movimiento de alrededor de 9.900 iones de Na^+ por canal por milisegundo $(1{,}6 \times 10^{-12}$ C/s$)(10^{-3}$ s/ms$)(6 \times 10^{23}$ moléculas/mol$) \div$ 96.500 C/mol. (Véase F. J. Sigworth y E. Neher, 1980, Nature 287:447).



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 7-19 El ensayo de expresión en ovocito es útil para comparar la función de formas normales y mutantes de una proteína canal. Primero un ovocito folicular de rana es tratado con colagenasa para eliminar las células foliculares circundantes, dejando un ovocito desnudo que es microinyectado con mRNA que codifica la proteína canal en estudio. (Adaptado de T. P. Smith, 1988, Trends Neurosci. 11:250.)

Los trazados obtenidos con los detectores de patch-clamp que se muestran en la figura 7-18 ilustran el uso de esta técnica para estudiar las propiedades de los canales del Na^+ regulados por voltaje en la membrana plasmática de las células musculares. Como analizaremos luego, estos canales suelen estar cerrados en las células musculares en reposo y se abren por estimulación nerviosa. Las porciones de membrana muscular, cada una con un canal del Na^+, fueron ajustadas a un voltaje algo menor que el potencial de membrana en reposo. En estas circunstancias, pulsos transitorios de corriente cruzan la membrana a medida que los canales del Na^+ individuales se abren y luego se cierran. Cada canal puede estar tanto totalmente abierto o completamente cerrado. A partir de estos trazados, es posible determinar el tiempo durante el cual un canal está abierto y la entrada de iones que lo atraviesa. Para los canales medidos en la figura 7-18, el flujo es de alrededor de 10 millones de iones Na^+ por canal por segundo, un valor típico para los canales iónicos. El reemplazo del NaCl dentro de la pipeta parche (correspondiente al exterior de la célula) por KCl o cloruro de colina suprime la corriente a través de los canales, confirmando que sólo conducen iones Na^+.

Los canales iónicos nuevos pueden ser caracterizados por una combinación de expresión de ovocitos y la técnica del patch clamp

La clonación de genes humanos que causan enfermedades y la secuenciación del genoma humano han identificado muchos genes que codifican proteínas canal putativas, incluidas 67 proteínas canal de K^+ putativas. Una forma de caracterizar la función de estas proteínas es transcribir un cDNA clonado en un sistema libre de células para producir el correspondiente mRNA. La inyección de este mRNA en ovocitos de rana y las mediciones por patch clamp de las proteínas canal recién sintetizadas pueden a menudo revelar su función (fig. 7-19). El enfoque experimental es especialmente útil porque los ovocitos de ranas normalmente no expresan proteínas canal, por lo que sólo el canal en estudio está presente en la membrana. Además, debido al gran tamaño de los ovocitos de rana, los estudios de patch clamp son técnicamente más fáciles de realizar sobre ellos que sobre células más pequeñas.

MEDICINA

Este enfoque permitió comprender el defecto subyacente a la enfermedad poliquística del riñón, el trastorno más común de un único gen que conduce a la insuficiencia renal. Las mutaciones en cualquiera de las dos proteínas, PKD1 o PKD2 producen los síntomas clínicos de la enfermedad poliquística del riñón, en la cual los quistes llenos de líquido se acumulan en todo el organismo. La secuencia de aminoácidos de la PDK2 concuerda con su cualidad de proteína canal de iones y contiene un segmento P conservado. Cuando se expresa en los ovocitos, la PDK2 media el transporte de iones Na^+, K^+ y Ca^{2+}. En cambio, la secuencia de PKD1 difiere sustancialmente de la secuencia de las proteínas canal y tiene un dominio extracelular largo que probablemente se fija a un componente de la matriz extracelular. La coexpresión de PKD1 con PKD2 en los ovocitos de rana modifica la actividad de la PDK2. Estas observaciones proveyeron el primero, aunque parcial, entendimiento molecular de la formación de quistes característico de la enfermedad poliquística del riñón y también sugirieron que algunas proteínas canal pueden estar reguladas de manera compleja. En efecto, la mayoría de las proteínas canal de Na^+ y K^+ están asociadas con otras proteínas transmembrana o citosólicas que regularían su apertura, cierre o conductividad de iones. ■

La entrada de Na^+ en las células de mamíferos tiene una variación de la energía libre (ΔG) negativa

Como ya se mencionó, dos fuerzas gobiernan el movimiento de iones a través de membranas selectivamente permeables: el voltaje y el gradiente de concentración de iones. La sumatoria de estas fuerzas, que pueden actuar en la misma dirección o en direcciones opuestas, constituye el gradiente electroquímico. Para calcular el **cambio en la energía libre** ΔG correspondiente al transporte de cualquier ion a través de una membrana es necesario considerar la contribución independiente de cada una de las fuerzas para el gradiente electroquímico.

Por ejemplo, cuando el Na^+ se mueve desde afuera hacia adentro de la célula, el cambio en la energía libre generado a partir del gradiente de concentración de Na^+ está dado por

$$\Delta G_c = RT \ln \frac{[Na_{adentro}]}{[Na_{afuera}]} \qquad (7\text{-}5)$$

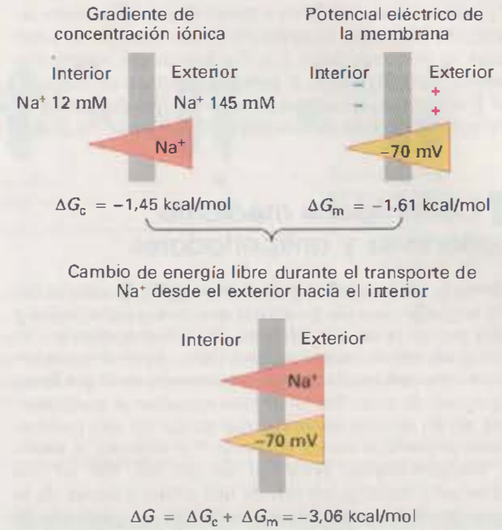
En las concentraciones de $Na_{adentro}$ y Na_{afuera} mostradas en la figura 7-20, típicas de muchas células de mamíferos, ΔG_c, el cambio en la energía libre debido al gradiente de concentración, es –1,45 kcal para el transporte de 1 mol de iones Na^+ desde el exterior hacia el interior de la célula, suponiendo que no hay un potencial eléctrico de membrana. El cambio en la energía libre generado a partir del potencial eléctrico de la membrana está dado por

$$\Delta G_m = FE \qquad (7\text{-}6)$$

donde F es la constante de Faraday y E es el potencial eléctrico de membrana. Si E = –70 mV, entonces ΔG_m, el cambio de energía libre debido al potencial de membrana, es de – 1,61 kcal para el transporte de 1 mol de iones Na^+ desde afuera hacia adentro de la célula, suponiendo que no hay un gradiente de concentración de Na^+. Puesto que ambas fuerzas actúan de hecho sobre los iones Na^+, el ΔG total es la suma de los dos valores parciales:

$$\Delta G = \Delta G_c + \Delta G_m = (-1{,}45) + (-1{,}61) = -3{,}06 \text{ kcal/mol}$$

En este ejemplo, el gradiente de concentración de Na^+ y el potencial eléctrico de la membrana contribuyen de modo casi igual al ΔG total para el transporte de los iones Na^+. Puesto que el ΔG es < 0, el movimiento de iones Na^+ hacia adentro es termodinámicamente favorable. Como se verá en la siguiente sección, ciertas proteínas de cotransporte utilizan el movimiento del Na^+ hacia adentro para impulsar cuesta arriba el movimiento de otros iones y varios tipos de moléculas pequeñas hacia adentro y afuera de las células animales. El rápido y energéticamente favorable movimiento de iones Na^+ a través de los canales regulados del Na^+ también es crítico para generar potenciales de acción en las células nerviosas y musculares.



▲ Fig. 7-20. Fuerzas transmembrana que actúan sobre los iones Na^+. Al igual que con todos los iones, el movimiento de iones Na^+ a través de la membrana plasmática está gobernado por la suma de dos fuerzas separadas: el gradiente de concentración iónica y el potencial eléctrico de la membrana. A las concentraciones internas y externas de Na^+ típicas de las células de los mamíferos, estas fuerzas suelen actuar en la misma dirección, haciendo energéticamente favorable el movimiento de iones Na^+ hacia adentro.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 7.3

Canales iónicos no regulados y potencial de membrana en reposo

- A través de las membranas plasmáticas de todas las células existe un potencial eléctrico interno negativo (voltaje) de 50–70 mV.
- En las células animales, el potencial de membrana es generado principalmente por el movimiento de iones K^+ a través de los canales del K^+ en reposo hacia el medio externo. A diferencia de los canales iónicos más comunes, que se abren sólo en respuesta a diversas señales, estos canales del K^+ no regulados están generalmente abiertos.
- En las plantas y en los hongos, el potencial de membrana es mantenido por el bombeo, impulsado por ATP, de protones desde el citosol hacia el exterior de la célula.
- Los canales del K^+ están constituidos por cuatro subunidades idénticas, cada una de las cuales tiene al menos dos hélices α conservadas que atraviesan la membrana y un segmento P no helicoidal que tapiza el poro iónico (véase fig. 7-15).
- La especificidad iónica de las proteínas canal de K^+ se debe principalmente a la coordinación del ion selecto con los átomos de oxígeno carbonilo de aminoácidos específicos en los segmentos P, disminuyendo así la energía de activación para el pasaje selectivo del K^+ comparado con otros iones (véase fig. 7-16).
- Las técnicas de pinzamiento zonal de membrana *(patch clamp)*, que permiten la medición de los movimientos de iones a través de canales individuales, se utilizan para determinar la conductividad iónica de un canal y los efectos de diversas señales sobre su actividad (véase fig. 7-17).
- Las técnicas de recombinación de DNA y de patch clamp permiten la expresión y la caracterización funcional de las proteínas canal en los ovocitos de rana (véase fig. 7-19).

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación general: Interconversiones energéticas biológicas

■ El gradiente electroquímico a través de una membrana semipermeable determina la dirección del movimiento de iones mediante las proteínas canal. Las dos fuerzas que constituyen el gradiente electroquímico, el potencial eléctrico de membrana y el gradiente de concentración de iones, pueden actuar en la misma dirección o en direcciones opuestas (véase fig. 7-20).

7.4 Cotransporte mediante simportadores y antiportadores

Además de las bombas impulsadas por ATP, las células tienen una segunda clase de proteínas que transportan iones y moléculas pequeñas, como la glucosa y los aminoácidos en contra de un gradiente de concentración. Como ya se dijo, los cotransportadores utilizan la energía almacenada en el gradiente electroquímico de iones Na^+ o H^+ para impulsar el movimiento cuesta arriba de otra sustancia, que puede ser una molécula orgánica pequeña o un ion diferente. Por ejemplo, el movimiento energéticamente favorable de un ion Na^+ (el ion cotransportado) hacia el interior de una célula a través de la membrana plasmática, impulsado tanto por su gradiente de concentración como por el gradiente de voltaje transmembrana, puede ser acoplado al movimiento de la molécula transportada (p. ej., glucosa) en contra de su gradiente de concentración. Una característica importante de tal cotransporte es que ninguna de las dos moléculas puede moverse sola; el movimiento de ambas moléculas juntas es obligatorio o *acoplado*.

Los cotransportadores comparten algunos rasgos con los uniportadores, como las proteínas GLUT. Los dos tipos de transportadores exhiben ciertas similitudes estructurales, operan a velocidades equivalentes y sufren cambios conformacionales cíclicos durante el transporte de sus sustratos. Difieren en que los uniportadores pueden acelerar el transporte termodinámicamente favorable sólo a favor de un gradiente de concentración, mientras que los cotransportadores pueden aprovechar la energía de una reacción acoplada favorable para transportar activamente moléculas en contra de un gradiente de concentración.

Cuando la molécula transportada y el ion cotransportado se mueven en la misma dirección, el proceso se denomina simporte; cuando se mueven en direcciones opuestas, se llama antiporte (véase fig. 7-2). Algunos cotransportadores transportan sólo iones positivos (cationes), mientras otros transportan sólo iones negativos (aniones). Un ejemplo importante de un cotransportador de cationes es el *antiportador* Na^+/H^+, que saca H^+ de células acopladas a la entrada energéticamente favorable de Na^+. Un ejemplo de una cotransportador de aniones es la *proteína antiportadora de aniones AE1*, que cataliza el intercambio uno a uno de Cl^- y HCO_3^- a través de la membrana plasmática. Sin embargo, otros cotransportadores median el movimiento de cationes y aniones juntos. En esta sección, describimos el funcionamiento y el papel fisiológico de varios simportadores y antiportadores ampliamente distribuidos.

Los simportadores ligados al Na^+ transportan aminoácidos y glucosa hacia el interior de las células animales en contra de gradientes altos de concentración

La mayoría de las células del cuerpo transportan glucosa desde la sangre a favor de su gradiente de concentración, utilizando una u otra proteína GLUT para facilitar este transporte. Sin embargo, ciertas células, como las que revisten el intestino delgado y los túbulos de los riñones, necesitan transportar glucosa desde la luz intestinal o formar orina en contra de un gradiente de concentración muy grande. Estas células utilizan un *simportador de dos Na^+/una glucosa*, una proteína que acopla la entrada de una molécula de glucosa a la entrada de dos iones Na^+:

$$2\ Na^+_{afuera} + glucosa_{afuera} \rightleftharpoons 2\ Na^+_{adentro} + glucosa_{adentro}$$

Cuantitativamente, el cambio de la energía libre para el transporte simporte de dos iones Na^+ y una molécula de glucosa puede escribirse

$$\Delta G = RT \ln \frac{[glucosa_{adentro}]}{[glucosa_{afuera}]} + 2RT \ln \frac{[Na^+_{adentro}]}{[Na^+_{afuera}]} + 2FE \quad (7\text{-}7)$$

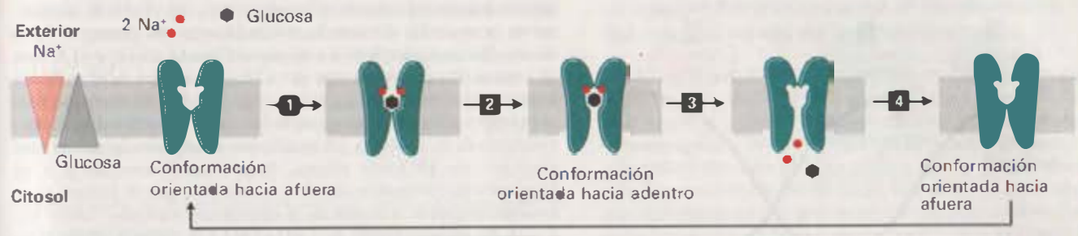
Por ende, la ΔG para la reacción general es la suma de los cambios en la energía libre generados por el gradiente de concentración de glucosa (1 molécula transportada) el gradiente de concentración de Na^+ (2 iones Na^+ transportados) y el potencial de la membrana (2 iones Na^+ transportados). En el equilibrio, $\Delta G = 0$. Como se ilustra en la figura 7-20, la energía libre liberada por el movimiento de Na^+ hacia el interior de células de mamíferos a favor de su gradiente electroquímico tiene una variación de la energía libre ΔG de alrededor de – 3 kcal por mol de Na^+ transportado. Así, la ΔG para el transporte de dos moles de Na^+ hacia el interior es de alrededor de –6 kcal. Al sustituir este valor en la ecuación 7-7 y poniendo $\Delta G = 0$, vemos que

$$0 = RT \ln \frac{[glucosa_{adentro}]}{[glucosa_{afuera}]} - 6\ kcal$$

y podemos calcular que en el equilibrio, la razón $glucosa_{adentro}/glucosa_{afuera} = \approx 30.000$. Así, el flujo hacia adentro de dos moles de Na^+ puede generar una concentración intracelular de glucosa que es ≈30.000 veces mayor que la concentración externa. Si sólo entrara un ion Na^+ (ΔG de –3 kcal/mol) por molécula de glucosa, entonces la energía disponible podría generar un gradiente de concentración de glucosa (adentro > afuera) de sólo alrededor de 170 veces. Por lo tanto, acoplando el transporte de dos iones Na^+ al transporte de una glucosa, el simportador dos Na^+/una glucosa permite a las células acumular una altísima concentración de glucosa relativa a su concentración externa.

Se cree que el simportador de dos Na^+/una glucosa contiene 14 hélices α transmembrana con el N- y el C- terminal que se extiende hacia el citosol. Una proteína truncada recombinante que consiste en sólo cinco hélices α transmembrana C-terminales puede transportar glucosa independientemente del Na^+ a través de la membrana plasmática, *a favor* de su gradiente de concentración. Esta porción de la molécula funciona de esta manera como un uniportador de glucosa. La porción N-terminal de la proteína, incluidas las hélices 1–9, se requiere para acoplar la fijación de Na^+ e influir en el transporte de glucosa en contra de su gradiente de concentración.

La figura 7-21 representa el modelo actual de transporte por simportadores de Na^+/glucosa. Este modelo implica cambios conformacionales en la proteína análogos a los que ocurren en los transportadores uniportadores, como el GLUT1, que no requiere un ion cotransportado (véase fig. 7-4). Se necesita la fijación de todos los sustratos a sus sitios sobre el dominio extracelular antes de que la proteína sufra la modificación conformacional que cambia la orientación hacia afuera de los sitios de fijación del sustrato a la orientación hacia



▲ Fig. 7-21. Modelo operacional del mecanismo para el simportador de dos Na^+/una glucosa. La unión simultánea de Na^+ y glucosa a la conformación con los sitios de unión orientados hacia afuera (paso 1) genera una segunda conformación con sitios orientados hacia adentro (paso 2). La disociación del ion Na^+ y de la glucosa hacia el interior del citosol (paso 3) le permite a la proteína volver a su conformación original orientada hacia afuera (paso 4), lista para transportar sustratos adicionales. (Véase M. Panayotova-Heiermann et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:20324, para detalles de la estructura y función de ésta y de transportadoras relacionadas.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación general: Interconversiones energéticas biológicas

adentro; esto asegura que el transporte hacia adentro de la glucosa y de los iones Na^+ esté acoplado.

El antiportador ligado al Na^+ exporta Ca^{2+} desde las células del músculo cardíaco

En las células del músculo cardíaco, un *antiportador de tres Na^+/un Ca^{2+}*, más que la Ca^{2+}-ATPasa de la membrana plasmática antes tratada, desempeña un papel principal en el mantenimiento de una baja concentración de Ca^{2+} en el citosol. La reacción de transporte mediada por este *antiportador de cationes* puede escribirse

$$3\ Na^+_{afuera} + Ca^{2+}_{adentro} \rightleftharpoons 3\ Na^+_{adentro} + Ca^{2+}_{afuera}$$

Nótese que se requiere el movimiento de tres iones Na^+ para impulsar la salida de un ion Ca^{2+} desde el citosol con una $[Ca^{2+}]$ de $\approx 2 \times 10^{-7}$ M al medio extracelular con una de $[Ca^{2+}]$ de $\approx 2 \times 10^{-3}$ M, un gradiente de alrededor de 10.000 veces. Al igual que en otras células musculares, un aumento de la concentración citosólica de Ca^{2+} en el músculo cardíaco desencadena la contracción. Al disminuir el Ca^{2+} citosólico, el funcionamiento del antiportador Na^+/Ca^{2+} reduce la fuerza de la contracción del músculo cardíaco.

MEDICINA

La Na^+/K^+-ATPasa en la membrana plasmática de las células cardíacas, al igual que de otras células del cuerpo, crea el gradiente de concentración de Na^+ necesario para la salida de Ca^{2+} por el antiportador de Ca^{2+} ligado al Na^+. Como ya se mencionó, la inhibición de la Na^+/K^+-ATPasa por los fármacos ouabaina y digoxina disminuye la concentración citosólica de K^+ y, más importante aún, incrementa el Na^+ citosólico. El gradiente electroquímico reducido de Na^+ resultante a través de la membrana provoca que el antiportador de Ca^+ ligado al Na^+ funcione en forma menos eficiente. Como resultado, salen menos iones Ca^{2+} y la concentración citosólica de Ca^+ se incrementa, provocando la contracción más fuerte del músculo. A causa de su capacidad para incrementar la fuerza de las contracciones del músculo cardíaco, los inhibidores de la Na^+/K^+-ATPasa son muy utilizados en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva. ■

Varios cotransportadores regulan el pH citosólico

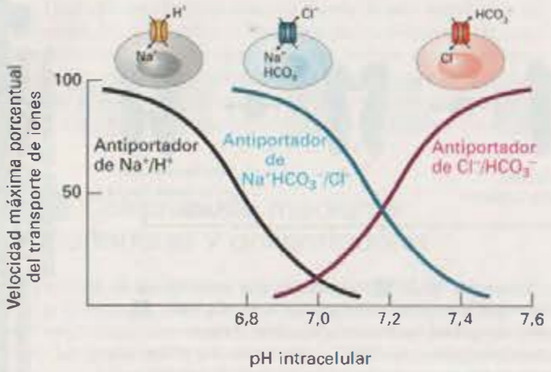
El metabolismo anaerobio de la glucosa produce ácido láctico y el aerobio produce CO_2, que es hidratado para formar ácido carbónico (H_2CO_3). Estos ácidos débiles se disocian y producen iones H^+ (protones); si este exceso de protones no fuera eliminado de las células, el pH citosólico disminuiría en forma precipitada y pondría en peligro el funcionamiento celular. Dos tipos de proteínas cotransportadoras ayudan a eliminar algo del "exceso" de protones generado durante el metabolismo de las células animales. Una es un *antiportador Na^+ HCO_3^-/Cl^-*, que ingresa un ion Na^+ a favor de su gradiente de concentración, junto con un HCO_3^-, en intercambio con la salida de un Cl^- en contra de su gradiente de concentración. La enzima citosólica *anhidrasa carbónica* cataliza la disociación de los iones HCO_3^- ingresados en CO_2 y un ion OH^- (hidroxilo):

$$HCO_3^- \rightleftharpoons CO_2 + OH^-$$

El CO_2 se difunde fuera de la célula y los iones OH^- se combinan con los protones intracelulares, formando agua. Por ello, la acción general de este transportador es consumir los iones H^+ citosólicos, incrementando el pH citosólico. También es importante para elevar el pH citosólico el *antiportador Na^+/H^+* que acopla la entrada de un ion Na^+ en la célula a favor de su gradiente de concentración con la salida de un ion H^+.

En ciertas circunstancias, el pH citosólico puede aumentar más allá del rango normal de 7,2–7,5. Para afrontar el exceso de iones OH^- asociados con el pH elevado, muchas células animales utilizan un *antiportador de aniones* que cataliza el intercambio uno a uno de HCO_3^- y Cl^- a través de la membrana plasmática. A pH alto, este *antiportador Cl^-/HCO_3^-* saca HCO_3^- (que puede ser visto como un "complejo" de OH^- y CO_2) en intercambio del Cl^-, disminuyendo así el pH citosólico. El transporte de Cl^- a favor de su gradiente de concentración ($Cl^-_{medio} > Cl^-_{citosol}$) propulsa la reacción.

La actividad de estas tres proteínas antiportadoras depende del pH y proporciona a las células un mecanismo bien afinado para controlar el pH citosólico (fig. 7-22). Los dos antiportadores que funcionan para incrementar el pH citosólico



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 7-22 La actividad de las proteínas transportadoras de la membrana que regula el pH citosólico de las células de los mamíferos cambia con el PH. La dirección del transporte de iones se indica arriba de la curva para cada proteína. Para mayores detalles véase el texto. (Véase S. L. Alper et al., 2001, J Pancreas 2:171 y S. L. Alper, 1991, Ann. Rev. Physiol. 53:549.)

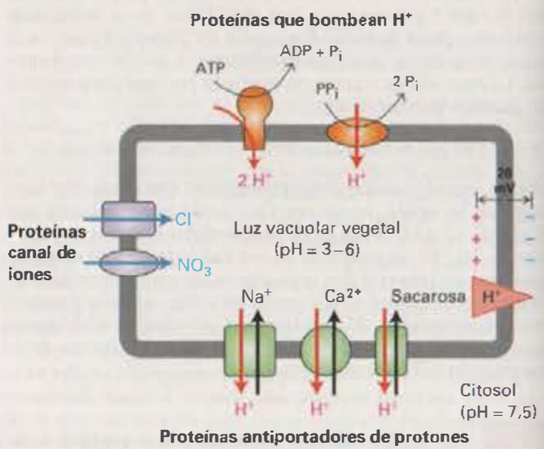
son activados cuando el pH del citosol cae. En forma similar, un aumento del pH por encima de 7,2 estimula al antiportador Cl^- / HCO_3^-, y conduce a una salida más rápida de HCO_3^- y a una disminución del pH citosólico. De esta manera, el pH citosólico de las células en proliferación se mantiene muy cercano a 7,4.

Numerosas proteínas transportadoras permiten que las vacuolas vegetales acumulen metabolitos y iones

La luz de las vacuolas vegetales es mucho más ácida (pH 3 a 6) que el citosol (pH 7,5). La acidez de las vacuolas es mantenida por una bomba de protones impulsada por ATP de clase V (véase fig. 7-6) y por una bomba impulsada por PP_i que es exclusiva de los vegetales. Estas dos bombas, ubicadas en la membrana vacuolar, transportan iones H^+ hacia la luz vacuolar en contra de un gradiente de concentración. La membrana vacuolar también contiene canales de Cl^- y NO_3^- que transportan estos aniones desde el citosol hacia el interior de la vacuola. La entrada de estos aniones en contra de sus gradientes de concentración es impulsada por el potencial positivo interno generado por las bombas de H^+. El funcionamiento combinado de estas bombas de protones y canales de aniones produce un potencial eléctrico positivo interno de alrededor de 20 mV a través de la membrana vacuolar y también de un gradiente de pH sustancial (fig. 7-23).

El gradiente electroquímico de protones a través de la membrana vacuolar de los vegetales es utilizado de la misma manera que el gradiente electroquímico de Na^+ a través de la membrana plasmática de la célula animal: para impulsar la incorporación o expulsión de iones y moléculas pequeñas por diversos antiportadores. En la hoja, por ejemplo, el exceso de sacarosa generado durante la fotosíntesis en el día se almacena en la vacuola; durante la noche la sacarosa almacenada se mueve hacia el citoplasma y es metabolizada a CO_2 y H_2O con la generación concomitante de ATP a partir del ADP y P_i. Un *antiportador protones/sacarosa* en la membrana vacuolar funciona para acumular sacarosa en las vacuolas vegetales. El movimiento de la sacarosa hacia adentro es impulsado por el movimiento de H^+ hacia afuera, lo que es favorecido por su gradiente de concentración (luz > citosol) y por el potencial citosólico negativo a través de la membrana vacuolar (véase fig. 7-23). La incorporación de Ca^{2+} y Na^+ a la vacuola desde el citosol en contra de su gradiente de concentración es mediado de manera similar por los antiportadores de protones. ▮

El conocimiento acerca de las proteínas transportadoras en las membranas vacuolares vegetales puede ayudar a incrementar la producción agrícola en los suelos muy salinos (NaCl) que se encuentran en todo el mundo. Puesto que la mayoría de los cultivos útiles para la agricultura no pueden crecer en esos suelos, durante mucho tiempo los científicos agrícolas han buscado la forma de obtener plantas tolerantes a la sal por métodos tradicionales de cultivo. Con la disponibilidad del gen clonado que codifica el antiportador Na^+/H^+, ahora es posible producir plantas transgénicas que expresan en exceso esta proteína transportadora, conduciendo a una mayor captación y secuestro de Na^+ en la



▲ Fig. 7-23. Concentración de iones y sacarosa por la vacuola vegetal. La membrana vacuolar contiene dos tipos de bombas de protones (naranja): una H^+-ATPasa de clase-V (*izquierda*) y una bomba de protones de hidrólisis de pirofosfato (*derecha*) que difiere de todas las otras proteínas transportadoras de iones y probablemente es exclusiva de las plantas. Estas bombas generan un pH luminal bajo al igual que un potencial eléctrico interno positivo a través de la membrana vacuolar debido al bombeo de iones H^+ hacia adentro. El potencial interno positivo impulsa el movimiento de Cl^- y NO_3^- desde el citosol a través de proteínas canal distintas (violeta). Los antiportadores de protones (verde), impulsados por el gradiente de H^+ acumulan Na^+, Ca^{2+} y sacarosa dentro de la vacuola. (Según P. Rea y D. Sanders, 1987, Physiol. Plant 71:131; J. M. Maathuis y D. Sanders, 1992, Curr. Opin. Cell Biol. 4:661; P. A. Rea et al., 1992, Trends Biochem. Sci. 17:348.)

vacuola. Por ejemplo, las plantas de tomate transgénicas que sobreexpresan el antiportador vacuolar Na^+/H^+ crecen, florecen y producen frutos en presencia de concentraciones de NaCl en el suelo que matan a las plantas de tipo silvestre. Es interesante que, aunque las hojas de estas plantas de tomate transgénicas acumulan grandes cantidades de sal, el fruto tiene muy baja concentración salina. ▮

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 7.4

Cotransporte mediante simportadores y antiportadores

- Los cotransportadores utilizan la energía liberada por el movimiento de un ion (por lo general H^+ o Na^+) a favor de su gradiente electroquímico para impulsar la entrada o salida de una molécula pequeña o un ion diferente en contra de su gradiente de concentración.
- Las células que recubren el intestino delgado y los túbulos del riñón expresan proteínas simportadores que acoplan la entrada energéticamente favorable de Na^+ a la entrada de glucosa y aminoácidos en contra de su gradiente de concentración (véase fig. 7-21).
- En las células musculares cardíacas, la salida de Ca^{2+} está acoplada a la entrada de Na^+ e impulsada por ella mediante un antiportador de cationes, el cual transporta tres iones Na^+ hacia adentro por cada ion Ca^{2+} que sale.
- Dos cotransportadores que están activos a pH bajo ayudan a mantener el pH citosólico muy cercano a 7,4 en las células animales a pesar de la producción metabólica de ácido carbónico y láctico. Uno, un antiportador de Na^+/H^+, extrae el exceso de protones. El otro, un cotransportador de $Na^+HCO_3^-/Cl^-$, ingresa HCO_3^-, que se desasocia en el citosol para dar iones H^- que elevan el pH.
- Un antiportador de Cl^-/HCO_3^- que se encuentra activo a pH alto tiene la función de transportar hacia afuera HCO_3^- cuando el pH citosólico se eleva por encima de lo normal y causa una disminución del pH.
- La incorporación de sacarosa, Na^+, Ca^{2+} y otras sustancias dentro de las vacuolas de los vegetales es llevada a cabo por antiportadores de protones en la membrana vacuolar. Los canales iónicos y las bombas de protones en la membrana son críticos para generar un gradiente de concentración de protones lo suficientemente grande para impulsar la acumulación de iones y metabolitos en las vacuolas por estos antiportadores de protones (véase fig. 7-23).

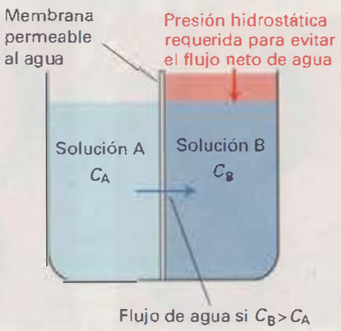
7.5 Movimientos del agua

En esta sección describimos los factores que influyen en los movimientos del agua hacia adentro y afuera de las células, una característica importante en la vida de plantas y animales. La siguiente sección está dedicada a otros fenómenos de transporte que son críticos en los procesos fisiológicos esenciales, y se centra en la distribución asimétrica de ciertas proteínas transportadoras en las células epiteliales. Veremos cómo esto permite la absorción de nutrientes desde la luz intestinal y la acidificación de la luz gástrica.

La presión osmótica causa el movimiento del agua a través de las membranas

El agua tiende a moverse a través de una membrana semipermeable desde una solución de baja concentración de soluto hacia una de alta concentración, proceso denominado ósmosis o flujo osmótico. En otras palabras, puesto que las soluciones con una alta concentración de soluto disuelto tienen una concentración de agua más baja, el agua se moverá espontáneamente de una solución de alta concentración de agua hacia una de baja concentración. Por lo tanto, ósmosis es equivalente a "difusión" de agua. La presión osmótica se define como la presión hidrostática requerida para detener el flujo neto de agua a través de una membrana que separa soluciones de composición diferente (fig. 7-24). En este contexto, la "membrana" podría ser una capa de células o una membrana plasmática que es permeable al agua, pero no a los solutos. La presión osmótica es directamente proporcional a la diferencia en la concentración del número total de moléculas de soluto a cada lado de la membrana. Por ejemplo, una solución de NaCl 0,5 M es realmente de 0,5 M de iones Na^+ y 0,5 M de iones Cl^- y tiene la misma presión osmótica que una solución 1 M de glucosa o sacarosa.

Las bicapas fosfolipídicas puras son esencialmente impermeables al agua, pero la mayoría de las membranas celulares contienen proteínas canales de agua que facilitan el movimiento rápido de agua hacia adentro y afuera de las células. Tal movimiento de agua a través de la capa epitelial que recubren los túbulos de los riñones de los vertebrados es responsable de la concentración de la orina. Si esto no pasara, excretaríamos varios litros de orina por día. En las plantas superiores, el agua y los minerales son absorbidos desde la tierra a través de las raíces y se mueven hacia arriba de la planta a través de tubos conductores (el xilema); la pérdida de agua de la planta, sobre todo por evaporación por las hojas, conduce estos movimientos de agua. El movimiento de agua a través de la membrana plasmática también determina el volu-



▲ Fig. 7-24. Presión osmótica. Las soluciones A y B están separadas por una membrana que es permeable al agua pero impermeable a todos los solutos. Si C_B (la concentración total de solutos de la solución B) es mayor que C_A, el agua tenderá a fluir a través de la membrana desde la solución A a la solución B. La presión osmótica π entre las soluciones es la presión hidrostática que tendría que aplicarse a la solución B para evitar este flujo de agua. De la ecuación de van't Hoff, la presión osmótica está dada por $\pi = RT(C_B - C_A)$, donde R es la constante de gas y T es la temperatura absoluta.

men celular, que debe ser regulado para evitar daños a las células. En todos los casos, la presión osmótica es la fuerza que impulsa el movimiento de agua en los sistemas biológicos.

Diferentes células tienen diversos mecanismos para controlar su volumen

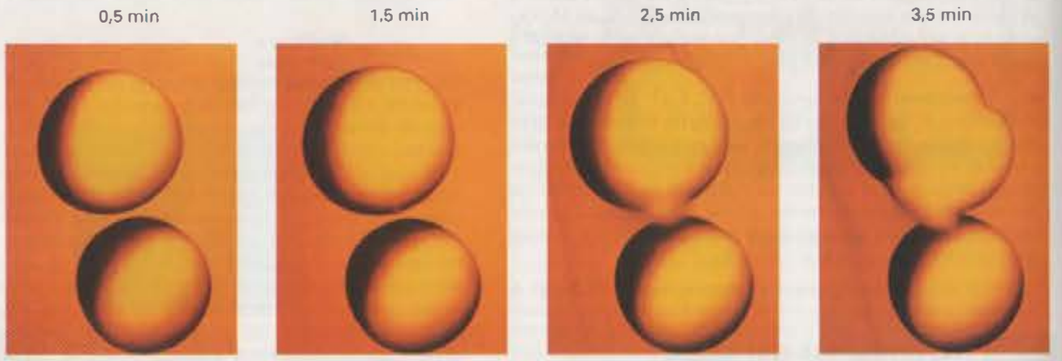
Cuando se colocan en una solución hipotónica (es decir, una en la cual la concentración de solutos es *inferior* a la del citosol), las células animales se dilatan debido al flujo osmótico de agua hacia el interior. Cuando se las coloca en una solución hipertónica (es decir, una en la cual la concentración de solutos es *superior* a la del citosol), las células animales se contraen a medida que el agua del citosol deja la célula por flujo osmótico. En consecuencia, las células animales cultivadas deben ser mantenidas en un medio isotónico, que tiene una concentración de solutos idéntica a la del citosol de la célula (véase fig. 5-18).

No obstante, aun en un ambiente isotónico, las células animales enfrentan un problema en el mantenimiento de su volumen dentro de un espectro limitado, evitando así la lisis. Las células no sólo contienen gran número de macromoléculas cargadas y metabolitos pequeños que atraen iones de carga opuesta desde el exterior, sino que también hay una fuga lenta de iones extracelulares, sobre todo Na^+ y Cl^-, hacia el interior a favor de sus gradientes de concentración. En ausencia de algunos mecanismos compensatorios, la osmolaridad del citosol podría aumentar más allá de la del líquido que lo rodea, causando un flujo osmótico de agua hacia el interior y la eventual lisis de la célula. Para evitarlo, las células animales transportan hacia afuera activamente iones inorgánicos. La extracción neta de cationes por la bomba de Na^+/K^+ impulsada por ATP (3 Na^+ hacia afuera por 2 K^+ hacia adentro) desempeña el papel principal en este mecanismo para evitar la dilatación de la célula. Si las células cultivadas son tratadas con un inhibidor que previene la producción de ATP, se dilatan y finalmente estallan, lo que demuestra la importancia del transporte activo en el mantenimiento del volumen de la célula.



A diferencia de las células animales, las vegetales, las de las algas, las de los hongos y de las bacterias están rodeadas por una pared celular rígida. Debido a la pared celular, el flujo osmótico de ingreso de agua que tiene lugar cuando estas células están situadas en una solución hipotónica (aun en agua pura) conduce a un incremento de la presión intracelular, pero no del volumen de la célula. En las células de las plantas, la concentración de solutos (p. ej.: azúcares y sales) suele ser más alta en la vacuola que en el citosol, que a su vez tiene una concentración de solutos más alta que la del espacio extracelular. La presión osmótica, llamada *presión de turgencia*, generada por la entrada de agua en el citosol y luego en la vacuola, empuja al citosol y a la membrana plasmática contra la resistente pared celular. La elongación de la célula durante el crecimiento tiene lugar por una pérdida localizada, inducida por hormonas, de una región de la pared celular, seguida por un flujo de agua hacia adentro de la vacuola, lo que incrementa su tamaño.

A pesar de que la mayoría de los protozoos (como las células animales) no tienen una pared celular rígida, muchos contienen una vacuola contráctil que les permite evitar la lisis osmótica. Una vacuola contráctil toma agua del citosol y, a diferencia de la vacuola de las plantas, descarga periódicamente su contenido a través de la fusión con la membrana plasmática. De esa manera, aunque el agua entra continuamente en la célula protozoaria por flujo osmótico, la vacuola contráctil evita que se acumule demasiada agua en la célula y la dilate hasta el punto de explosión.



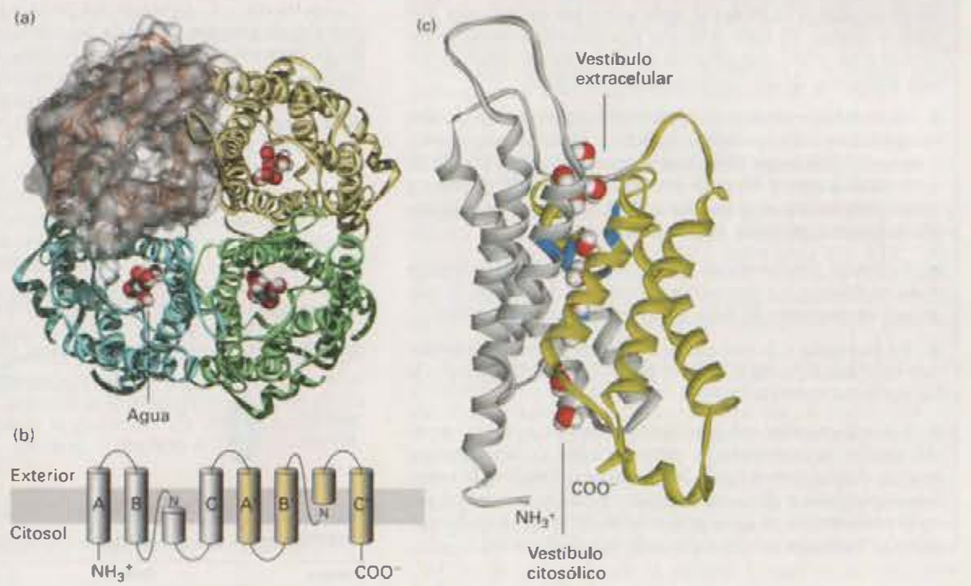
▲ FIGURA EXPERIMENTAL 7-25 La expresión de acuaporinas por los ovocitos de rana incrementa su permeabilidad al agua. Los ovocitos de rana, que normalmente no expresan acuaporina, fueron microinyectados con mRNA codificador de acuaporina. Estas fotografías muestran los ovocitos control (la célula de abajo en cada panel) y los microinyectados (la célula de arriba en cada panel) a los tiempos indicados después de la transferencia desde una solución salina isotónica (0,1 mM) a una solución salina hipotónica (0,035 M). El volumen de los ovocitos control permanece sin cambios porque son poco permeables al agua. En cambio, los ovocitos microinyectados que expresan la acuaporina se hincharon debido al flujo osmótico de agua hacia adentro, lo que indica que la acuaporina es una proteína canal de agua. (Cortesía de Gregory M. Preston y Peter Agre, Universidad de Johns Hopkins, Escuela de Medicina.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Los ovocitos de rana que expresan acuaporina estallan en solución hipotónica

Las acuaporinas aumentan la permeabilidad del agua de la membrana celular

Como acabamos de ver, los pequeños cambios en la fuerza osmótica extracelular provocan que muchas células animales se dilaten o se contraigan con rapidez. En cambio, los ovocitos y huevos de rana no se dilatan cuando están en agua estancada de muy baja fuerza osmótica aun cuando su concentración interna de sal (principalmente KCl) es comparable con la de otras células (≈150 mM KCl). Estas observaciones condujeron a los investigadores a sospechar que las membranas plasmáticas de los eritocitos y otros tipos de células, pero no los ovocitos de rana, contienen proteínas canales de agua que aceleran el flujo osmótico. Los resultados experimentales detallados en la figura 7-25 demuestran que la proteína de la superficie celular del eritrocito conocida como *acuaporina* funciona como un canal de agua.

En su forma funcional, la acuaporina es un tetrámero de subunidades idénticas de 28 kDa (fig. 7-26a). Cada subunidad contiene seis hélices α que atraviesan la membrana y forman un poro central a través del cual se mueve el agua (fig. 7-26b, c). En su centro la entrada selectiva de agua de ≈2 nm de largo, o poro, es de apenas 0,28 nm de diámetro, lo cual es algo mayor que el diámetro de la molécula de agua. Las propiedades de tamiz molecular de la constricción están determinadas por varios residuos de aminoácidos hidrófilos conservados cuyas cadenas laterales y grupos carbonilo se extienden hacia el interior de la mitad del canal. Varias moléculas de agua se mueven simultáneamente dentro del canal, cada una de las cuales secuencialmente forma enlaces de hidrógeno específicos y desplaza a otras moléculas de agua corriente abajo. La formación de enlaces de hidrógeno entre el átomo de oxígeno del agua y los grupos amino de las cadenas laterales garantiza que sólo pase agua a través del canal; ni siquiera los protones pueden pasar a través de éste.



▲ Fig. 7-26. Estructura de la proteína canal de agua acuaporina. (a) Modelo estructural de la proteína tetramétnca que comprende cuatro subunidades idénticas. Cada subunidad forma un canal de agua, como se ve en esta vista del extremo desde la superficie exoplasmática. Uno de los monómeros se muestra con una superficie molecular en la cual se puede ver la entrada del poro. (b) Diagrama esquemático de la topología de una subunidad de acuaporina individual con relación a la membrana. Tres pares de hélices α transmembrana homólogas (A y A', B y B', C y C') están orientadas en la dirección opuesta con respecto a la membrana y están conectadas por dos bucles hidrófilos que contienen hélices cortas que no atraviesan la membrana y residuos de asparagina (N) conservados. Los bucles se doblan dentro de la cavidad formada por las seis hélices transmembrana, encontrándose en el medio para formar parte de la entrada selectiva de agua. (c) Vista lateral del poro en una subunidad de acuaporina individual, en la cual muchas moléculas de agua (oxígenos rojos e hidrógenos blancos) son vistas dentro de la entrada selectiva de agua de 2 nm de largo que separa los vestíbulos citosólico y extracelular llenos de agua. La entrada contiene arginina altamente conservada y residuos de histidina, así como dos residuos de asparagina (azul) cuyas cadenas laterales forman enlaces de hidrógeno con el agua transportada. (Los residuos clave de la entrada están resaltados en azul.) El agua transportada también forma enlaces de hidrógeno con la cadena principal del grupo carbonilo de un residuo de cisteína. La disposición de estos enlaces de hidrógeno y el estrecho diámetro de 0,28 nm del poro evitan el pasaje de protones (p. ej., H_3O^+) u otros iones. (Según H. Sui et al., 2001, Nature 414:872. Véase también T. Zeuthen, 2001, Trends Biochem. Sci. 26:77 y K. Murata et al., 2000 Nature 407:599.)

MEDICINA

Como es el caso para los transportadores de glucosa, los mamíferos expresan una familia de acuaporinas. La acuaporina 1 abunda en los eritrocitos; la homóloga acuaporina 2 se encuentra en las células epiteliales del riñón que reabsorben agua de la orina. Las mutaciones inactivantes en ambos alelos del gen de la acuaporina 2 causan diabetes, una enfermedad caracterizada por la excreción de grandes volúmenes de orina diluida. Estos descubrimientos establecieron la etiología de la enfermedad y demostraron que el nivel de la acuaporina 2 es limitante de la velocidad del transporte de agua por parte del riñón. Otros miembros de la familia de las acuaporinas transportan moléculas que contienen hidroxilo, como el glicerol en lugar del agua. ▮

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 7.5

Movimientos del agua

- La mayoría de las membranas biológicas son semipermeables, más permeables al agua que a los iones o más que a otros solutos. El agua se mueve por ósmosis a través de las membranas desde una solución de baja concentración de soluto hacia una de alta concentración de soluto.
- Las células animales se dilatan o se contraen cuando son colocadas en soluciones hipotónicas o hipertónicas, respectivamente. Mediante el mantenimiento del balance osmótico normal dentro y fuera de las células, la Na^+/K^+-ATPasa y otras proteínas transportadoras de iones de la membrana plasmática controlan el volumen de la célula.
- La pared celular rígida que rodea las células vegetales evita su dilatación y permite la generación de presión de turgencia en respuesta al flujo osmótico de ingreso de agua.
- En respuesta a la entrada de agua, los protozoos mantienen su volumen celular normal por extrusión de agua desde las vacuolas contráctiles.
- Las acuaporinas son proteínas canales de agua que específicamente incrementan la permeabilidad de las biomembranas al agua (véase fig. 7-26). La acuaporina 2 en la membrana plasmática de ciertas células del riñón es esencial para la reabsorción de agua proveniente de la orina en formación; su ausencia conduce a una forma de diabetes.

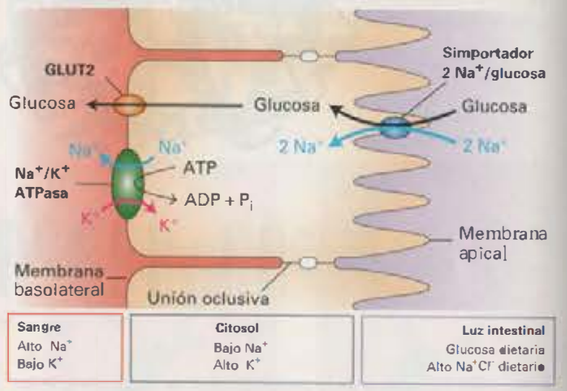
7.6 Transporte transepitelial

Vimos en el capítulo 6 que varios tipos de regiones especializadas de la membrana plasmática, denominadas *uniones celulares*, conectan las células epiteliales formando el recubrimiento laminar de los intestinos y de otras superficies corporales (véase fig. 6-5). Lo que nos concierne aquí son las uniones oclusivas, que evitan que los materiales solubles en agua a un lado del epitelio se muevan hacia el otro lado a través del espacio extracelular. Por esta razón, la absorción de nutrientes desde la luz intestinal ocurre mediante el ingreso de moléculas desde el lado luminal de las células epiteliales intestinales y su salida hacia el lado orientado hacia la sangre (sérico), un proceso de dos etapas llamado *transporte transcelular*.

Una célula epitelial intestinal, como todas las células epiteliales, se dice que está polarizada debido a que los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática contienen diferentes conjuntos de proteínas. Estos dos están separados por las uniones oclusivas entre células. La porción apical de la membrana plasmática, orientada hacia la luz intestinal, está especializada para la absorción de azúcar, aminoácidos y otras moléculas que son producidas a partir de la comida por diversas enzimas digestivas. Numerosas proyecciones digitiformes (100 nm de diámetro) llamadas microvellosidades incrementan enormemente el área de la superficie apical y de ese modo el número de proteínas transportadoras que puede contener, y mejoran la capacidad de absorción de la célula.

Se requieren múltiples proteínas transportadoras para mover glucosa y aminoácidos a través del epitelio

La figura 7-27 describe las proteínas que median la absorción de glucosa desde la luz intestinal hacia la sangre. En la primera etapa de este proceso, un simportador dos Na^+/una glucosa, ubicado en las membranas de las microvellosidades, ingresa glucosa en contra de su gradiente de concentración, desde la luz intestinal a través de la superficie apical de las células epiteliales. Como ya vimos, este



▲ Fig. 7-27. Tansporte transcelular de glucosa desde la luz intestinal hasta la sangre. La Na^+/K^+-ATPasa en la superficie basolateral de la membrana genera gradientes de concentración de Na^+ y K^+. El movimiento hacia afuera de los iones K^+ a través de los canales no regulados K^+ (no mostrados) genera un potencial de membrana negativo en el interior. Tanto el gradiente de concentración de Na^+ como el potencial de membrana se utilizan para conducir la incorporación de glucosa desde la luz intestinal mediante el simportador dos-Na^+/una-glucosa ubicado en la superficie apical de la membrana. La glucosa deja la célula a través de difusión facilitada catalizada por GLUT2, un uniportador de glucosa ubicado en la membrana basolateral.

simportador acopla el movimiento hacia adentro, enérgicamente desfavorable, de una molécula de glucosa al transporte hacia adentro, enérgicamente favorable, de dos iones Na^+(véase fig.7-21). En el equilibrio dinámico, todos los iones Na^+ transportados desde la luz intestinal hacia la célula durante el simporte de Na^+/glucosa, o el proceso similar de simporte de Na^+/aminoácido, son bombeados hacia afuera a través de la membrana basolateral, la cual enfrenta el tejido subyacente. De esa manera se mantiene la baja concentración intracelular de Na^+. La Na^+/K^+-ATPasa que realiza esto se encuentra exclusivamente en la membrana basolateral de las células epiteliales del intestino. El funcionamiento coordinado de estas dos proteínas transportadoras permite movimientos ascendentes de glucosa y aminoácidos desde el intestino hacia la célula. Esta primera etapa en el transporte transcelular es potenciada en última instancia por la hidrólisis de ATP por la Na^+/K^+-ATPasa.

En la segunda etapa, la glucosa y los aminoácidos concentrados dentro de las células intestinales por los simportadores son transportados hacia la sangre a favor de su gradiente de concentración por medio de proteínas uniportadoras en la membrana basolateral. En el caso de la glucosa, este movimiento es mediado por GLUT2 (véase fig. 7-27). Como ya notamos, esta isoforma de GLUT tiene una afinidad por la glucosa bastante baja pero incrementa sustancialmente su velocidad de transporte cuando el gradiente de glucosa a través de la membrana asciende (véase fig. 7-3).

El resultado neto de este proceso de dos etapas es el movimiento de iones Na^+, glucosa y aminoácidos desde la luz intestinal a través del epitelio hacia el medio extracelular que rodea la superficie basolateral de las células epiteliales intestinales. Las uniones oclusivas entre las células epiteliales evitan que estas moléculas se difundan nuevamente hacia la luz intestinal y finalmente se dirigen a la sangre. El aumento de la presión osmótica creado por el transporte transcelular de sal, glucosa y aminoácidos a través del epitelio intestinal extrae agua desde la luz intestinal hacia el medio extracelular que rodea la superficie basolateral. En cierto sentido, las sales, la glucosa y los aminoácidos "llevan" el agua junto con ellos.

La terapia de rehidratación simple depende del gradiente osmótico creado por la absorción de glucosa y Na^+

MEDICINA

El entendimiento de la ósmosis y la absorción intestinal de sal y glucosa forma la base para una terapia simple que salva millones de vidas cada año, sobre todo en los países menos desarrollados. En estos países, el cólera y otros agentes patógenos intestinales son la causa principal de muerte en los niños pequeños. Una toxina liberada por la bacteria activa la secreción de cloruro por parte de las células epiteliales intestinales en la luz intestinal; el agua sigue osmóticamente, y la pérdida masiva de agua resultante provoca diarrea, deshidratación y finalmente la muerte. La curación no sólo demanda la eliminación de la bacteria con antibióticos, sino también la *rehidratación*: reposición del agua perdida desde la sangre y de otros tejidos.

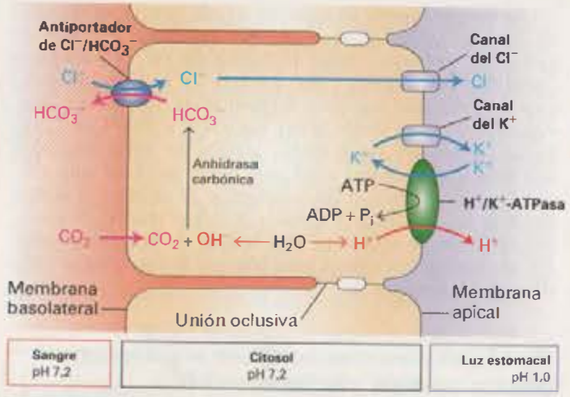
La simple ingesta de agua no ayuda porque es excretada desde el tubo digestivo casi tan rápidamente como ingresa. Sin embargo, como acabamos de ver, el transporte coordinado de glucosa y Na^+ a través del epitelio intestinal crea un gradiente osmótico transepitelial, forzando el movimiento de agua desde la luz intestinal a través de la capa de células. De esa manera, darle a los niños afectados una solución de azúcar y sal para beber (pero no solo azúcar o agua) provoca el flujo osmótico de agua en la sangre desde la luz intestinal y permite la rehidratación. Soluciones similares de azúcar/sal son la base de bebidas populares usadas por los atletas para obtener azúcar y agua rápida y eficientemente. ▮

Las células parietales acidifican el contenido gástrico mientras mantienen un pH citosólico neutro

El estómago de los mamíferos contiene una solución 0,1 M de ácido clorhídrico (HCl). Este medio fuertemente ácido mata a muchos agentes patógenos ingeridos y desnaturaliza muchas proteínas ingeridas antes de que éstas sean degradadas por las enzimas proteolíticas (p. ej., la pepsina) que funcionan con pH ácido. El ácido clorhídrico es secretado en el estómago por células epiteliales especializadas denominadas *células parietales* (también conocidas como *células oxínticas*) en el revestimiento gástrico. Estas células contienen una *H^+/K^+-ATPasa* en su membrana apical, que enfrenta a la luz gástrica y genera un gradiente que aumenta millones de veces la concentración de H^+: pH =1,0 en la luz estomacal y pH = 7,0 en el citosol celular. Esta proteína transportadora es una bomba de iones de clase P impulsada por ATP, similar en estructura y función a las Na^+/K^+-ATPasas de la membrana plasmática ya comentada. Las numerosas mitocondrias en las células parietales producen abundante ATP para ser usado por la H^+/K^+-ATPasa.

Si las células parietales simplemente liberaran iones H^+ a cambio de iones K^+, la pérdida de protones podría conducir a un aumento en la concentración de iones OH^- en el citosol y por ende a un incremento importante en el pH citosólico. (Recordar que $[H^+] \times [OH^-]$ siempre es una constante, $10^{-14}\ M^2$.) Las células parietales evitan este aumento en el pH citosólico en conjunción con la acidificación de la luz estomacal utilizando antiportadores Cl^-/HCO_3^- en la membrana basolateral para eliminar el "exceso" de iones OH^- en el citosol hacia la sangre. Como ya se dijo, este anión antiportador se activa a un pH citosólico alto (véase fig.7-22).

Todo el proceso por el cual las células parietales acidifican la luz estomacal se ilustra en la figura 7-28. En una reacción catalizada por anhidrasa carbónica el "exceso" de OH^- citosólico se combina con el CO_2 que se difunde hacia adentro desde la sangre y forma HCO_3^-. Catalizado por el antiportador de anión basolateral, este ion bicarbonato es transportado a través de la membrana basolateral (y finalmente dentro de la sangre) a cambio de un ion Cl^-. Los iones Cl^- salen luego a través de los canales del Cl^- en la membrana apical y entran en la luz estomacal. Para preservar la electroneutralidad, cada ion Cl^- que se mueve hacia la luz estomacal a través de la membrana apical es acompañado por un ion K^+ que se mueve hacia afuera a través de un canal del K^+ separado. De esta manera el exceso de iones K^+ bombeados hacia adentro



▲ Fig. 7-28. Acidificación de la luz estomacal por las células parietales del recubrimiento gástrico. La membrana apical de las células parietales contiene una H^+/K^+-ATPasa (una bomba de clase P), así como proteínas canal de Cl^- y K^+. Nótese el transporte cíclico del K^+ a través de la membrana apical: los iones K^+ son bombeados hacia adentro por la H^+/K^+-ATPasa y salen a través de un canal del K^+. La membrana basolateral contiene una antiportador de aniones que intercambia HCO_3^- e iones Cl^-. El funcionamiento combinado de estas cuatro proteínas transportadoras diferentes y de la anhidrasa carbónica acidifica la luz estomacal mientras mantiene el pH neutro y la electroneutralidad del citosol. Para más detalles véase el texto.

por la H^+/K^+-ATPasa retorna a la luz estomacal y se mantiene así la concentración normal de K^+ intracelular. El resultado neto es la secreción de igual cantidad de iones H^+ y Cl^- (p. ej.; HCl) dentro de la luz estomacal, mientras que el pH del citosol permanece neutro y los iones OH^- en exceso, al igual que el HCO_3^-, son transportados hacia la sangre.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 7.6

Transporte transepitelial

- Los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática de las células epiteliales contienen diferentes proteínas transportadoras y llevan a cabo diversos procesos de transporte.
- En la célula epitelial intestinal, el funcionamiento coordinado de los simportadores ligados al Na^+ en la membrana apical con la Na^+/K^+-ATPasa y los uniportadores en la membrana basolateral median el transporte transcelular de aminoácidos y glucosa desde la luz intestinal hacia la sangre (véase fig. 7-27).
- La acción coordinada de la anhidrasa carbónica y cuatro proteínas transportadoras diferentes les permiten a las células parietales del revestimiento gástrico secretar HCl^- en la luz mientras mantienen su pH citosólico cercano a la neutralidad (véase fig. 7-28).

7.7 Canales iónicos regulados por voltaje y propagación de potenciales de acción en las células nerviosas

En la sección anterior vimos cómo diferentes proteínas transportadoras trabajan juntas para absorber nutrientes a través del epitelio intestinal y acidificar el estómago. Sin embargo, el sistema nervioso provee el ejemplo más notable de la interacción de diversos canales iónicos, transportadores y bombas de iones en la ejecución de funciones fisiológicas. Las **neuronas** (células nerviosas) y determinadas células musculares están especializadas para generar y conducir un tipo particular de impulso eléctrico, el **potencial de acción**. Esta alteración del potencial eléctrico a través de la membrana celular es causada por la apertura y el cierre de ciertos canales iónicos regulados por voltaje.

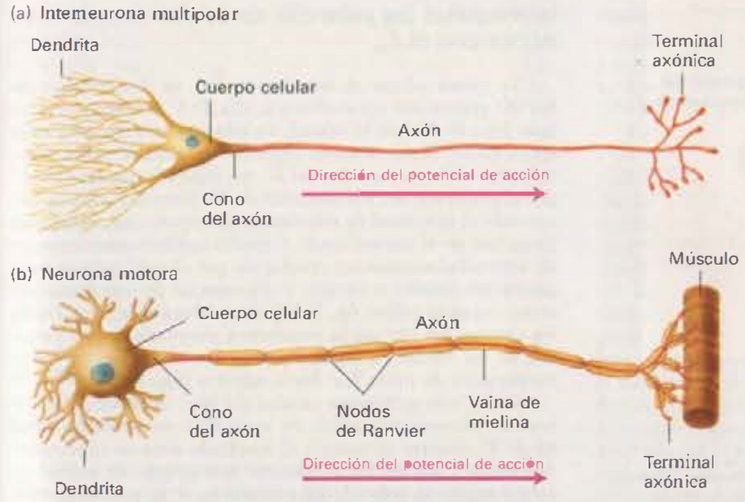
En esta sección, veremos primero algunas de las propiedades clave de las neuronas y los potenciales de acción, que se mueven a lo largo del axón muy rápidamente. Luego describimos cómo funcionan los canales regulados por voltaje responsables de propagar potenciales de acción en las neuronas. En la siguiente sección, examinaremos cómo el arribo de un potencial de acción de la terminal del axón provoca la secreción de sustancias químicas denominadas **neurotransmisores**. Esas moléculas, a su vez, se unen a receptores en las células adyacentes y provocan cambios en el potencial de membrana de estas células. De esa manera, las señales eléctricas llevan información dentro de una célula nerviosa, mientras las señales químicas transmiten información desde una neurona a otra o desde una neurona a un músculo u otra célula diana.

Regiones especializadas de las neuronas llevan a cabo diferentes funciones

A pesar de que la morfología de diversos tipos de neuronas difiere en algunos aspectos, todas contienen cuatro regiones distintas con funciones diferentes: el cuerpo celular, el axón, las terminales del axón y las dendritas (fig. 7-29).

El *cuerpo celular* contiene el núcleo y es el sitio de síntesis de prácticamente todas las proteínas neuronales y las membranas. Si bien algunas proteínas se sintetizan en las dendritas, ninguna lo hace en los axones o en las terminales axónicas. Los procesos especiales de transporte que involucran microtubúlos mueven a las proteínas y a las membranas desde sus sitios de síntesis en el cuerpo celular a lo largo del axón hasta las terminales (cap. 20).

Los axones, cuyo diámetro varía de un micrómetro en ciertos nervios del cerebro humano a un milímetro en la fibra gigante del calamar, están especializados para la conducción de potenciales de acción. Un potencial de acción es una serie de variaciones súbitas en el voltaje, o de manera equivalente el potencial eléctrico, a través de la membrana plasmática. Cuando una neurona se encuentra en estado de reposo (no estimulada), el potencial eléctrico a través de la membrana axonal es aproximadamente de –60 mV (con el interior negativo con respecto al exterior); este *potencial de reposo* es similar al del potencial de la membrana en la mayoría de las células no neuronales. En el pico de un potencial de acción, el potencial de la membrana puede alcanzar

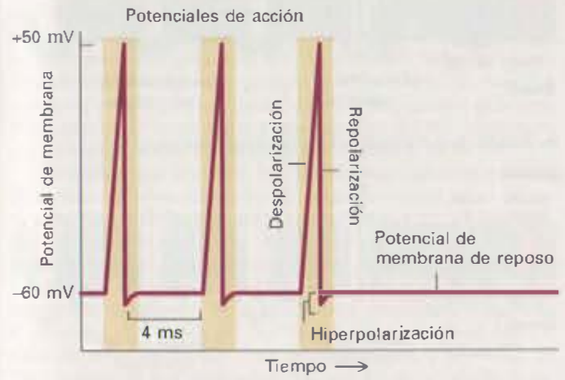


◀ Fig. 7-29. Morfología típica de dos tipos de neuronas de mamíferos. Los potenciales de acción surgen en el cono del axón y son conducidos hacia la terminal axonal. (a) Una interneurona multipolar tiene dendritas profusamente ramificadas, que en las sinapsis *reciben* señales de varios cientos de otras neuronas. Un único axón largo que se ramifica lateralmente en su terminal *transmite* las señales a otras neuronas. (b) Una neurona motora que inerva una célula muscular tiene por lo general un único axón largo que se extiende desde el cuerpo celular a la célula efectora. En las neuronas motoras de los mamíferos, una vaina de mielina aislante cubre todas las partes del axón excepto los nodos de Ranvier y las terminales axonales.

valores de +50 mV (con el interior positivo), un cambio neto de ≈110 mV.

Esta despolarización de la membrana es seguida de una despolarización rápida y el potencial de la membrana retorna al valor de reposo (fig. 7-30).

Un potencial de acción se origina en el *cono de inicio del axón*, la unión del axón y el cuerpo celular, y es conducido activamente a lo largo del axón hasta las *terminales axónicas*, pequeñas ramificaciones del axón que forman las sinapsis, o conexiones, con otras células. Los potenciales de acción

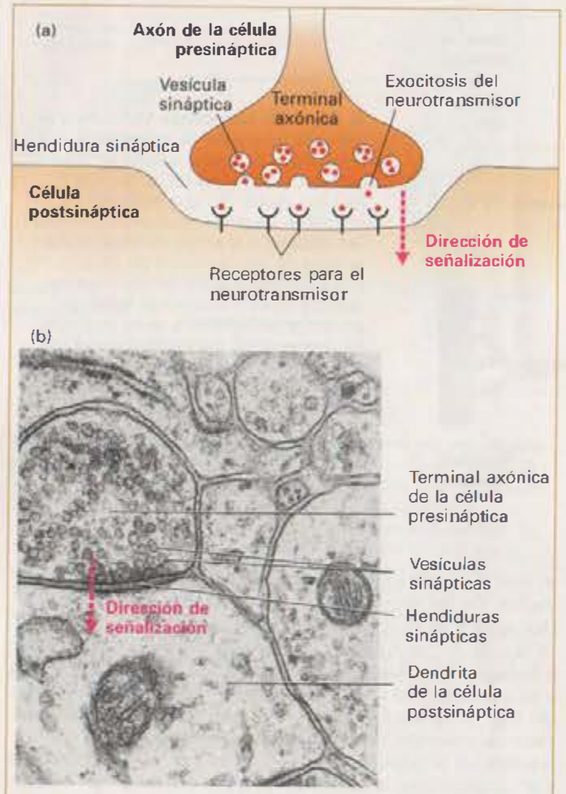


▲ FIGURA EXPERIMENTAL 7-30 El registro de un potencial de membrana del axón a lo largo del tiempo revela la amplitud y la frecuencia de los potenciales de acción. Un potencial de acción es una despolarización súbita y transitoria de la membrana, seguida por la repolarización hasta llegar al potencial de reposo de alrededor de –60 mV. El potencial de membrana del axón puede medirse con un electrodo pequeño insertado en su interior (véase fig. 7-14). Este registro del potencial de membrana del axón en esta neurona muestra que genera un potencial de acción aproximadamente cada 4 milisegundos.

se mueven a velocidades superiores a los 100 metros por segundo. En los seres humanos, por ejemplo, los axones pueden tener más de un metro de largo y aún así a un potencial de acción le toma apenas unos pocos milisegundos moverse a lo largo de su longitud. El arribo de un potencial de acción a una terminal del axón conduce a la apertura de los canales del Ca^{2+} sensibles al voltaje y al ingreso de Ca^{2+}, lo que provoca un aumento localizado en la concentración del Ca^{2+} citosólico en la terminal del axón. A su vez, el aumento en el Ca^{2+} desencadena la fusión de vesículas pequeñas que contienen neurotransmisores con la membrana plasmática, liberando neurotransmisores desde esta *célula presináptica* hacia el interior de la hendidura, el espacio estrecho que la separa de las *células postsinápticas* (fig. 7-31).

A los neurotransmisores les toma cerca de 0,5 milisegundos (ms) difundirse a través de la hendidura sináptica y unirse a un receptor sobre las células postsinápticas. La unión de neurotransmisores desencadena la apertura o el cierre de canales iónicos específicos en la membrana plasmática de células postsinápticas, conduciendo a cambios en el potencial de la membrana en este punto. Un único axón en el sistema nervioso central puede formar sinapsis con muchas neuronas e inducir respuestas simultáneas en todas ellas.

La mayoría de las neuronas tienen múltiples **dendritas**, que se extienden hacia afuera del cuerpo celular y están especializadas para recibir señales químicas desde las terminales de los axones de otras neuronas. Las dendritas convierten estas señales en impulsos eléctricos pequeños y los conducen hacia el cuerpo celular. Los cuerpos celulares neuronales pueden también formar sinapsis y por ende recibir señales. En el sistema nervioso central, particularmente, las neuronas tienen dendritas extremadamente largas con ramificaciones complejas. Esto les permite formar sinapsis con un gran número de otras neuronas y recibir señales de ellas, quizá más de un millar (véase fig. 7-29a). La despolarización o hiperpolarización generada en las dendritas o en el cuerpo celular se disemina al cono de inicio del axón. Si la despolarización de la membrana en ese punto es lo suficientemente grande, se originará un potencial de acción y será conducido activamente a lo largo del axón.



▲ **Fig. 7-31. Sinapsis química.** (a) Una estrecha región –la hendidura sináptica– separa las membranas plasmáticas de las células presinápticas y postsinápticas. El arribo de potenciales de acción a una sinapsis provoca la liberación de neurotransmisores (círculos rojos) por la célula presináptica, su difusión a través de la hendidura sináptica y su unión a receptores específicos sobre la membrana plasmática de la célula postsináptica. Estas señales generalmente despolarizan la membrana postsináptica (haciendo el potencial interno menos negativo), e inducen un potencial de acción en él. (b) La microfotografía electrónica muestra una dendrita haciendo sinapsis con una terminal axonal llena de vesículas sinápticas. En la región sináptica, la membrana plasmática de la célula presináptica está especializada para la exocitosis de la vesícula; las vesículas sinápticas que contienen un neurotransmisor se aglomeran en estas regiones. La membrana opuesta de la célula postsináptica (en este caso, una neurona) contiene receptores para el neurotransmisor. [Parte (b) de C. Raine et al., eds., 1981, Basic Neurochemistry, 3ra ed., Little, Brown, p. 32.]

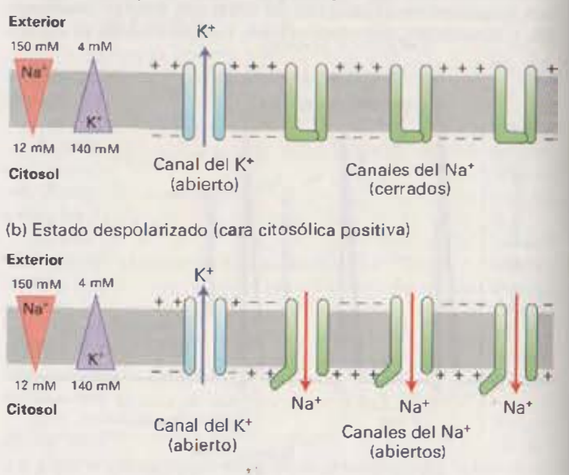
De esta manera, las neuronas utilizan los cambios en el potencial de la membrana, los potenciales de acción, para conducir señales a lo largo de sus longitudes, y las moléculas pequeñas, los neurotransmisores, para enviar señales de una célula a otra.

La magnitud del potencial de acción es cercana al E_{Na}

Ya vimos cómo el funcionamiento de las bombas de Na^+/K^+ genera una concentración alta de K^+ y una concentración baja de Na^+ en el citosol, en relación con las del medio extracelular. El movimiento siguiente de iones K^+ hacia afuera a través de los canales del K^+ no regulados es conducido por el gradiente de concentración de K^+ (citosol > medio), generando el potencial de membrana en reposo. La entrada de iones Na^+ en el citosol desde el medio también está favorecida termodinámicamente, conducida por el gradiente de concentración (medio > citosol) y el potencial de membrana interno negativo (véase fig. 7-20). Sin embargo, la mayoría de los canales del Na^+ en la membrana plasmática están cerrados en las células en reposo, por lo que puede ocurrir poco movimiento de iones Na^+ hacia adentro (fig. 7-32a).

Si se abren suficientes canales del Na^+, la afluencia de iones Na^+ abrumará la salida de iones K^+ a pesar de los canales de K^+ abiertos en reposo. El resultado sería un movimiento *neto* de cationes hacia adentro, que genera un exceso de cargas positivas sobre la cara citosólica y un exceso correspondiente de cargas negativas (debido a los iones Cl^- "dejados atrás" en el medio extracelular luego de la afluencia de iones Na^+) sobre la cara extracelular (fig. 7-32b). En otras palabras, la membrana plasmática se despolariza a tal extremo que la cara interna se vuelve positiva.

La magnitud del potencial de membrana en el pico de despolarización en un potencial de acción es muy cercana al potencial de equilibrio del Na^+ dado por la ecuación de Nernst (ecuación 7-2), como se esperaría si la apertura de los canales del Na^+ regulados por voltaje fuese responsable de generar potenciales de acción. Por ejemplo, el valor del pico medido del potencial de acción para el axón gigante del calamar es de 35 mV, que es cercano al valor calculado del E_{Na} (55 mV) basado en concentraciones de Na^+ de 440 mM afuera y 50 mM adentro. La relación entre la magnitud del potencial de acción y la concentración de iones Na^+ adentro y afuera de la célula ha sido confirmada experimentalmente. Por ejemplo, si la concentración de iones Na^+ en la solución en la cual se encuentra el axón de calamar es reducida a un tercio de lo normal, la magnitud de la despolarización es reducida en 40 mV, alrededor de lo predicho.



▲ **Fig. 7-32. Despolarización de la membrana plasmática debido a la apertura de canales del Na^+ regulados.** (a) En las neuronas en reposo, los canales del K^+ no regulados están abiertos, pero los canales del Na^+ regulados, más numerosos, están cerrados. El movimiento de iones K^+ hacia afuera establece el potencial de membrana interno negativo característico de la mayoría de las células. (b) La apertura de canales regulados del Na^+ permite la entrada de suficientes iones de Na^+ para provocar una inversión del potencial de la membrana. Para más detalles véase el texto.

La apertura y el cierre secuencial de los canales del Na^+ y el K^+ regulados por voltaje generan potenciales de acción

El ciclo de despolarización, hiperpolarización y regreso al valor de reposo de la membrana que constituye un potencial de acción dura 1–2 milisegundos y puede suceder cientos de veces por segundo en una neurona típica (véase fig. 7-30). Estos cambios cíclicos en el potencial de membrana son el resultado de la apertura y el cierre secuencial primero de los *canales del Na^+ regulados por voltaje* y luego de los *canales del K^+ regulados por voltaje*. El papel de estos canales en la generación de potenciales de acción fue dilucidado en los estudios clásicos realizados sobre el axón gigante del calamar, en el cual pueden insertarse múltiples microelectrodos sin que se provoque daño a la integridad de la membrana plasmática. Sin embargo, el mismo mecanismo básico es utilizado por todas las neuronas.

Los canales del Na^+ regulados por voltaje. Como comentamos recién, los canales del Na^+ regulados por voltaje están cerrados en las neuronas en reposo. Una despolarización pequeña de la membrana provoca un cambio conformacional en estas proteínas canal que abre una entrada sobre la superficie citosólica del poro y permite que los iones Na^+ pasen a través del poro hacia la célula. Mientras más grande es la despolarización de la membrana, más canales del Na^+ regulados por voltaje se abren y más iones Na^+ entran.

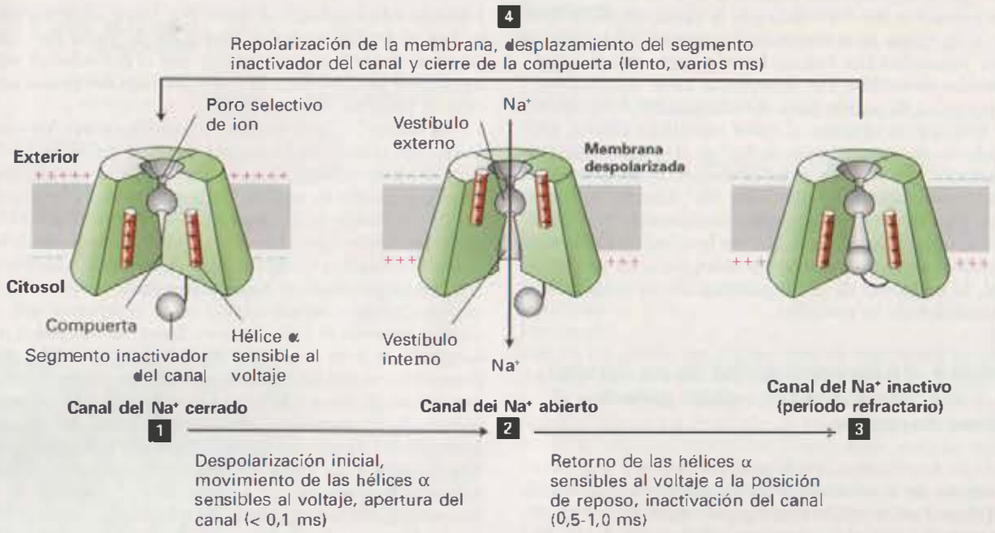
A medida que los iones Na^+ fluyen hacia adentro a través de canales abiertos, el exceso de cargas positivas sobre la cara citosólica y las cargas negativas sobre la cara exoplasmática se difunden una corta distancia desde el sitio inicial de despolarización. Esta extensión *pasiva* de las cargas positivas y negativas despolariza (hace el interior menos negativo) los segmentos adyacentes de la membrana plasmática y provoca la apertura de canales del Na^+ regulados por voltaje adicionales en estos segmentos y un incremento en la afluencia de Na^+. A medida que más iones Na^+ entran en la célula, el interior de la membrana celular se vuelve más despolarizada, provocando la apertura de aún más canales del Na^+ regulados por voltaje y aún más despolarización de la membrana, lo que pone en movimiento una entrada explosiva de iones Na^+. Por una fracción de un milisegundo, la permeabilidad de esta región de la membrana para el Na^+ se torna enormemente mayor que la del K^+, y el potencial de membrana se aproxima al E_{Na}, el potencial de equilibrio para una membrana permeable sólo a los iones Na^+. Sin embargo, a medida que el potencial de la membrana se aproxima al E_{Na}, el movimiento adicional neto de iones Na^+ hacia adentro cesa, puesto que el gradiente de concentración de iones Na^+ (afuera > adentro) es ahora contrarrestado por el potencial de membrana interno positivo E_{Na}. El valor del pico del potencial de acción es parecido al valor de E_{Na}.

La figura 7-33 representa esquemáticamente los rasgos estructurales críticos de los canales del Na^+ regulados por voltaje y los cambios conformacionales que provocan su apertura y cierre. En el estado de reposo, un segmento de la proteína sobre la cara citosólica –la "*compuerta*"– obstruye el poro central y evita el pasaje de iones. Una despolarización pequeña de la membrana desencadena el movimiento de hélices α sensores de voltaje con cargas positivas hacia la superficie exoplasmática, causan un cambio conformacional en la compuerta que abre el canal y permiten el flujo de iones. Luego de alrededor de 1 milisegundo, se evita un mayor flujo de ingreso de Na^+ mediante el movimiento del *segmento inactivador del canal* hacia el interior del canal abierto. Mientras la membrana permanezca despolarizada, el segmento que inactiva el canal permanece en la apertura del canal; durante este *período refractario*, el canal está inactivo y no puede ser abierto nuevamente. Unos pocos milisegundos después que se restablece el potencial de reposo interno negativo, el segmento inactivador del canal se balancea afuera del poro, el canal retorna al estado cerrado de reposo y es apto una vez más para ser abierto por despolarización.

Canales del K^+ regulados por voltaje. La repolarización de la membrana que sucede durante el período refractario se debe en gran medida a la apertura de los canales del K^+ regulados por voltaje. El flujo incrementado hacia afuera de K^+ desde el citosol elimina el exceso de cargas positivas desde la cara citosólica de la membrana plasmática (p. ej., la hace más negativa), restableciendo así el potencial de reposo negativo interno. En realidad, por un instante la membrana se hiperpolariza, por lo que el potencial se aproxima al E_K, que es más negativo que el potencial de reposo (véase fig. 7-30).

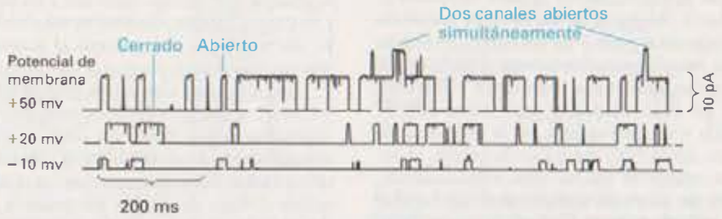
La apertura de los canales del K^+ regulados por voltaje es inducida por la gran despolarización del potencial de acción. A diferencia de los canales del Na^+ regulados por voltaje, la mayoría de los tipos de canales del K^+ permanecen abiertos mientras la membrana está despolarizada y se cierran solo cuando el potencial de membrana retorna a un valor negativo interno. Puesto que los canales del Na^+ regulados por voltaje se abren levemente después de la despolarización original, en la cumbre del potencial de acción, a veces son llamados *canales del K^+ retrasados*. Finalmente, todos los canales de K^+ y de Na^+ regulados por voltaje regresan a su estado cerrado de reposo. Los únicos canales abiertos en esta condición inicial son los del K^+ no regulados que generan el potencial de la membrana en reposo, que pronto regresa a su valor normal (véase fig. 7-32a).

Los trazados obtenidos por patch clamp en la figura 7-34 revelan las propiedades esenciales de los canales del K^+ regulados por voltaje. En este experimento, los segmentos pequeños de una membrana plasmática neuronal fueron mantenidos "con abrazaderas" a diferentes potenciales, y se midió el flujo de cargas eléctricas a través del parche debido al flujo de iones de K^+ a través de los canales abiertos. En el voltaje de despolarización de –10 mV, los canales en el parche de la membrana se abrieron con poca frecuencia y permanecieron abiertos sólo por algunos milisegundos, como se juzgó por el número y la amplitud de los "trazos ascendentes" en el registro. Además, el flujo de iones a través de ellos es bastante escaso, como se midió por el paso de la corriente eléctrica a través de cada canal pequeño abierto (la



▲ Fig. 7-33. Modelo del funcionamiento del canal del Na^+ regulado por voltaje. Cuatro dominios transmembrana en la proteína contribuyen al poro central a través del cual se mueven los iones. Los componentes críticos que controlan el movimiento de iones Na^+ se muestran en las vistas parcialmente recortadas que representan tres de los cuatro dominios transmembrana. **1** En el estado cerrado, en reposo, las hélices α sensibles al voltaje, que tienen cadenas laterales cargadas positivamente cada tercer residuo, son atraídas a las cargas negativas sobre el lado citosólico de la membrana en reposo. Esto mantiene el segmento de la compuerta en una posición que bloquea el canal y evita la entrada de iones Na^+. **2** En respuesta a una despolarización pequeña, las hélices sensibles al voltaje rotan de manera similar a la de un tornillo hacia la superficie exterior de la membrana y provocan un cambio conformacional inmediato en el segmento de la compuerta que abre el canal. **3** Las hélices sensibles al voltaje retornan rápidamente a la posición de reposo y el segmento inactivador del canal se mueve hacia el interior del canal abierto, que evita el pasaje de más iones. **4** Una vez que la membrana es repolarizada, el segmento inactivador del canal se desplaza desde la abertura del canal y la compuerta se cierra; la proteína revierte al estado cerrado de reposo desde el cual se puede volver a abrir por despolarización. (Véase W.A. Catterall, 2001, Nature 409:988; M. Zhou et al., 2001, Nature 411:657; y B. A. Yi y L. Y. Jan, 2000, Neuron 27:423.)

altura del trazo). Despolarizar la membrana más allá de +20 mV provoca que estos canales se abran con el doble de frecuencia. También, más iones K^+ se mueven a través de cada canal abierto (la altura de los trazos es mayor) porque la fuerza que conduce los iones K^+ citosólicos hacia afuera es mayor en un potencial de la membrana de +20 mV que de −10 mV. Despolarizar la membrana más allá de +50 mV, el valor en el pico de un potencial de acción, provoca la apertura de más canales del K^+ y también incrementa el flujo de K^+ a través de ellos. Por ende, al abrirse durante el pico del potencial de acción, estos canales del K^+ permiten el movimiento de iones K^+ hacia afuera y la repolarización del potencial de la membrana mientras que los canales del Na^+ regulados por voltaje están cerrados e inactivados.



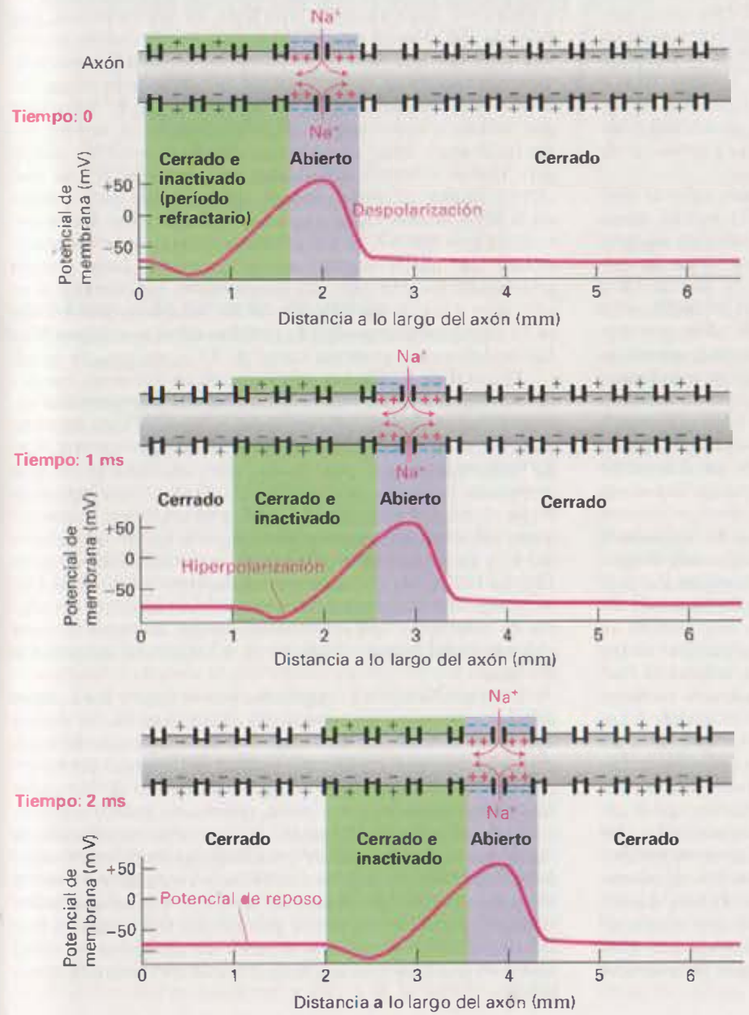
▲ FIGURA EXPERIMENTAL 7-34 La probabilidad de apertura de un canal y el flujo de corriente a través de canales del K^+ individuales regulados por voltaje se incrementan con la extensión de la despolarización de la membrana. Estos trazados de la técnica de patch clamp se obtuvieron de porciones de membrana plasmática neuronal fijadas en tres potenciales diferentes, +50, +20 y −10 mV. Las desviaciones de arriba en la corriente indican la apertura de los canales del K^+ y el movimiento de los iones K^+ hacia afuera (desde la cara citosólica hacia la exoplasmática) a través de la membrana. El aumento de la despolarización de la membrana (es decir, la fijación del voltaje) desde −10 mV a +50 mV incrementa la probabilidad de que un canal se abra, el tiempo en que permanece abierto y la cantidad de corriente eléctrica (número de iones) que lo atraviesa. (De B. Pallota et al., 1981, Nature 293:471, según modificaciones de B. Hille, 1992, Ion Channels of Excitable Membranes, 2d ed., Sinauer Associates, p. 122.)

Se han aislado más de 100 proteínas canales del K^+ regulados por voltaje de los seres humanos y otros vertebrados. Como veremos más adelante, todas estas proteínas canales tienen una estructura general similar, pero exhiben diferentes dependencias de voltaje, conductividades, cinética de canal y otras proteínas funcionales. Sin embargo, muchas se abren sólo ante voltajes fuertemente despolarizantes, una propiedad requerida para la generación de las máximas características de despolarización del potencial de acción antes del comienzo de la repolarización de la membrana.

Los potenciales de acción se propagan unidireccionalmente sin disminución

La generación de un potencial de acción recién descrita se relaciona con los cambios que suceden en una porción pequeña de la membrana plasmática neuronal. En el pico del potencial de acción, la propagación pasiva de la despolarización de la membrana es suficiente para despolarizar un segmento colindante de la membrana. Esto provoca que se abran algunos canales del Na^+ regulados por voltaje en esta región, lo que aumenta la extensión de la despolarización y provoca una apertura explosiva de más canales del Na^+ y la generación de un potencial de acción. Esta despolarización pronto desencadena la apertura de canales del K^+ regulados por voltaje y la restauración del potencial de reposo. De esta manera, el potencial de acción se propaga como una onda expansiva lejos de su sitio inicial sin disminución.

Ya se dijo que durante el período refractario los canales del Na^+ regulados por voltaje permanecen inactivos por varios milisegundos. Estos canales previamente abiertos no pueden abrirse durante este período aun si la membrana está despolarizada debido a la propagación pasiva. Como se ilustra en la figura 7-35, la incapacidad de los canales del Na^+ para reabrirse durante el período refractario asegura



◀ Fig. 7-35. Conducción unidireccional de un potencial de acción debido a la inactivación transitoria de canales del Na^+ regulados por voltaje. En el tiempo 0, un potencial de acción (rojo) se encuentra en la posición de 2 mm sobre el axón; los canales del Na^+ en esta posición están abiertos y son una corriente hacia adentro. El exceso de iones Na^+ se difunde en ambas direcciones en el interior de la membrana, esparciendo pasivamente la despolarización. Como los canales del Na^+ en la posición de 1 mm aún están inactivados (verde), no pueden aún ser reabiertos por la despolarización pequeña causada por la difusión pasiva; en cambio, los canales del Na^+ en la posición de 3 mm comienzan a abrirse. Cada región de la membrana es refractaria (inactiva) durante unos pocos milisegundos luego de que un potencial de acción ha pasado. De esta manera, la despolarización en el sitio de 2 mm en el momento 0 dispara sólo el potencial de acción corriente abajo; al cabo de 1 ms un potencial de acción pasa por la posición 3 mm y a los 2 ms, por la posición 4 mm.

que los potenciales de acción se propaguen sólo en una dirección, desde el cono de inicio del axón donde se originan hasta la terminal del axón. Esta propiedad de los canales del Na^+ también limita el número de los potenciales de acción por segundo que una neurona puede conducir. La reapertura de los canales del Na^+ "corriente arriba" de un potencial de acción (p. ej., más cercano al cuerpo celular) también está retrasada por la hiperpolarización que resulta de la apertura de los canales del K^+ abiertos por voltaje.

Las células nerviosas pueden conducir muchos potenciales de acción en ausencia de ATP

Es importante notar que la despolarización de la membrana, característica de un potencial de acción, resulta de los movimientos de sólo un número pequeño de iones de Na^+ hacia el interior de una neurona y no afecta significativamente el gradiente de concentración intracelular. Una célula nerviosa típica tiene alrededor de 10 canales del Na^+ regulados por voltaje por micrómetro cuadrado (μm^2) de la membrana plasmática. Puesto que cada canal pasa ≈ 5.000–10.000 iones durante el milisegundo en que está abierto (véase fig. 7-18), un máximo de 10^5 iones por μm^2 de membrana plasmática se moverán hacia adentro durante cada potencial de acción.

Para evaluar el efecto de este flujo de iones sobre la concentración citosólica de Na^+ de 10 mM (0,01 mol/L), típica de un axón en reposo, nos concentraremos sobre un segmento de axón de un micrómetro (μm) de largo y 10 μm de diámetro. El volumen de este segmento es de 78 μm^3 o $7{,}8 \times 10^{-14}$ litros y contiene $4{,}7 \times 10^8$ iones Na^+: (10^{-2} mol/L) ($7{,}8 \times 10^{-14}$ L) (6×10^{23} Na^+/mol). El área superficial de este segmento del axón es de 31 μm^2, y durante el pasaje de un potencial de acción entrarán 10^5 iones Na^+ por μm^2 de membrana. Por ende, este influjo de Na^+ incrementa el número de iones Na^+ en este segmento por sólo una parte en 150: ($4{,}7 \times 10^8$) ÷ ($3{,}1 \times 10^6$). Asimismo, la repolarización de la membrana debido a la salida de iones K^+ a través de los canales del K^+ regulados por voltaje no cambia significativamente la concentración intracelular de K^+.

Debido a que tan pocos iones de Na^+ y K^+ se mueven a través de la membrana plasmática durante cada potencial de acción, la bomba de Na^+/K^+ que mantiene los gradientes normales de iones no desempeña ningún papel directo en impulsar la conducción. Cuando esta bomba es inhibida experimentalmente mediante el dinitrofenol u otro inhibidor de producción de ATP, las concentraciones de Na^+ y K^+ se vuelven gradualmente las mismas adentro y afuera de la célula, y el potencial de la membrana desciende a cero. Esta eliminación de los gradientes electroquímicos de Na^+ y K^+ sucede de manera muy lenta en las neuronas grandes del calamar pero toma alrededor de 5 minutos en las neuronas más pequeñas de los mamíferos. En cualquier caso, los gradientes electroquímicos son independientes del suministro de ATP a lo largo de los breves lapsos requeridos para que las células nerviosas generen y conduzcan potenciales de acción. Puesto que los movimientos iónicos durante cada potencial de acción involucran sólo una minúscula fracción de los iones de K^+ y de Na^+, una célula nerviosa puede disparar cientos o hasta miles de veces en ausencia de ATP.

Todos los canales iónicos regulados por voltaje tienen estructuras similares

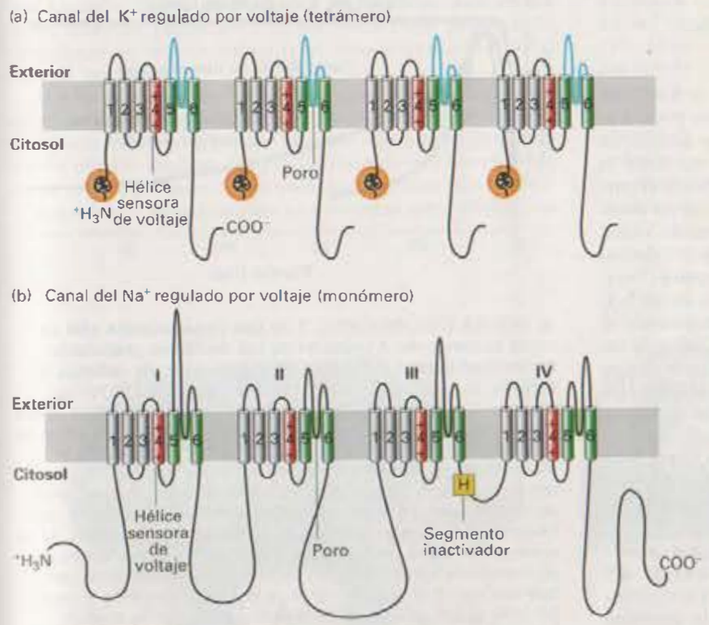
Habiendo explicado cómo el potencial de acción es dependiente de la apertura y del cierre regulados de los canales regulados por voltaje, veamos una disección molecular de estas proteínas admirables. Luego de describir la estructura básica de estos canales, nos centramos en tres preguntas:

- ¿Cómo sensan estas proteínas los cambios en el potencial de membrana?
- ¿Cómo es traducido este cambio en la apertura del canal?
- ¿Qué provoca que estos canales se vuelvan inactivos poco después de su apertura?

El gran adelanto inicial en el conocimiento de los canales de iones regulados por voltaje provino de los análisis de moscas de la fruta (*Drosophila melanogaster*) que portaban la mutación *shaker*. Estas moscas temblaban intensamente bajo anestesia con éter, lo que reflejaba una pérdida del control motor y un defecto en ciertas neuronas motoras que tienen un potencial de acción anormalmente prolongado. Este fenotipo sugirió que la mutación *Shaker* provocó un defecto en los canales del K^+ regulados por voltaje que evita que se abran de manera normal inmediatamente bajo despolarización. Para mostrar que el gen *Shaker* silvestre codificaba un canal del K^+, se usó cDNA *Shaker* silvestre clonado como molde para producir mRNA *Shaker* en un sistema de células libre. La expresión de este mRNA en los ovocitos de rana y en las mediciones de patch clamp en la proteína canal recién sintetizada mostró que sus propiedades funcionales eran idénticas a las de los canales del K^+ regulados por voltaje en la membrana neuronal, lo que demostró que el gen *Shaker* codifica esta proteína canal de K^+.

El canal de K^+ Shaker y la mayoría de los otros canales del K^+ regulados por voltaje identificados son proteínas tetraméricas compuestas de cuatro subunidades idénticas dispuestas en la membrana alrededor de un poro central. Cada subunidad está construida por seis hélices α que atraviesan la membrana, designadas S1–S6, y un segmento P (fig. 7-36a). Las hélices S5 y S6 y el segmento P son estructural y funcionalmente homólogos a los de los canales del K^+ y en reposo no regulados ya analizados (véase fig. 7-15). La hélice S4, que contiene numerosos residuos de lisina y arginina cargados positivamente, actúa como un sensor de voltaje; la "esfera" N-terminal que se extiende hacia el interior del citosol desde S1 es el segmento inactivador del canal.

Los canales del Na^+ regulados por voltaje y los canales del Ca^{2+} son proteínas monoméricas organizadas en cuatro dominios homólogos, I-IV (fig. 7-36b). Cada uno de estos dominios es similar a una subunidad de un canal del K^+ regulado por voltaje. Sin embargo, a diferencia de los canales del K^+ regulados por voltaje, que tienen cuatro segmentos que inactivan el canal, los canales monoméricos regulados por voltaje tienen un único segmento inactivador del canal. Excepto por esta diferencia estructural menor y sus permeabilidades iónicas variables, se piensa que todos los canales iónicos regulados por voltaje funcionan en forma similar y evolucionaron a partir de una proteína canal ancestral que contenía seis hélices α que atraviesan la membrana.



◀ Fig. 7-36. Representaciones esquemáticas de las estructuras secundarias de los canales del Na^+ y los canales del K^+ regulados por voltaje. (a) Los canales del K^+ regulados por voltaje están compuestos de cuatro subunidades idénticas, cada una con 600-700 aminoácidos y seis hélices α que atraviesan la membrana, S1-S6. El extremo N-terminal de cada subunidad, localizado en el citosol, forma un dominio globular (esfera naranja) esencial para la inactivación del canal abierto. Las hélices S5 y S6 (verde) y el segmento P (azul) son homólogos a los de los canales del K^+ no regulados en reposo, pero cada subunidad contiene cuatro hélices α transmembrana adicionales. Una de ellas, la S4 (rojo), es la hélice α sensora de voltaje. (b) Los canales de Na^+ regulados por voltaje son monómeros que contienen 1800-2000 aminoácidos organizados en cuatro dominios transmembrana (I-IV) similares a las subunidades de los canales del K^+ regulados por voltaje. El único segmento inactivador del canal, ubicado en el citosol entre los dominios III y IV, contiene un motivo hidrófobo conservado (H). Los canales del Ca^{2+} regulados por voltaje tienen una estructura general similar. La mayoría de los canales de iones regulados por voltaje también contienen subunidades (β) reguladoras no representadas aquí. [Parte (a) adaptada de C. Miller, 1992, Curr. Biol. 2:573, y H. Larsson et al., 1996, Neuron 16:387. Parte (b) adaptada de W. A. Catterall, 2001, Nature 409:988.]

Las hélices α S4 sensoras de voltaje se mueven en respuesta a la despolarización de la membrana

Mediciones eléctricas sensibles sugieren que la apertura de un canal del Na^+ o del K^+ regulado por voltaje está acompañada por el movimiento de 10 a 12 cargas positivas unidas a la proteína desde la superficie citosólica a la exoplasmática de la membrana; en forma alternativa, una cantidad mayor de cargas puede moverse una corta distancia a través de la membrana. El movimiento de estas cargas reguladoras (o sensores de voltaje) bajo la fuerza del campo eléctrico dispara un cambio conformacional en la proteína que abre el canal. Las cuatro hélices α S4 transmembrana sensibles al voltaje, a menudo llamadas *hélices reguladoras*, están presentes en todos los canales regulados por voltaje y suelen tener una lisina o arginina cargada positivamente cada tercero o cuarto residuo. En el estado cerrado de reposo, la mitad C-terminal de cada hélice S4 es expuesta al citosol; cuando la membrana se despolariza, estos aminoácidos se mueven hacia afuera, probablemente rotan 180° y quedan expuestos a la superficie exoplasmática del canal (véase fig. 7-33).

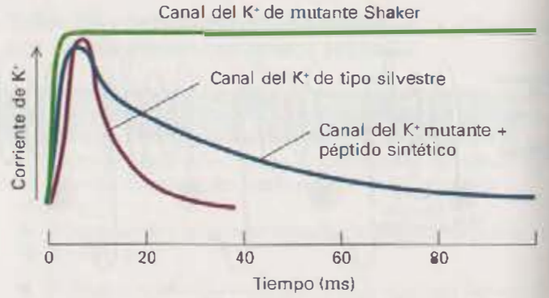
Los estudios de canales del K^+ con los mutantes Shaker apoyan este modelo para el funcionamiento de la hélice S4 en la detección de voltaje. Cuando uno o más residuos de arginina o lisina en la hélice S4 del canal del K^+ Shaker fueron reemplazados con residuos neutros o acídicos, se movieron menos cargas positivas que las normales a través de la membrana en respuesta a la despolarización de la membrana, lo que indica que los residuos de arginina y lisina en la hélice S4 efectivamente se movieron a través de la membrana. En otros estudios, las proteínas mutantes Shaker en las que diversos residuos de S4 fueron convertidos a cisteína fueron analizadas para su reactividad con un agente químico modificador de cisteína soluble en agua que no puede atravesar la membrana. Sobre la base de si las cisteínas reaccionaban con el agente añadido a un lado u otro de la membrana, los resultados indicaron que en estado de reposo los aminoácidos cerca del C-terminal de la hélice S4 en la cara citosólica, luego de que la membrana está despolarizada, algunos de estos mismos aminoácidos quedaron expuestos a la superficie exoplasmática del canal. Estos experimentos demostraron directamente los movimientos de la hélice S4 a través de la membrana, como se esquematiza en la figura 7-33 para los canales del Na^+ regulados por voltaje.

Se cree que la propia compuerta comprende el N-terminal de las cuatro hélices S5 y el C-terminal de las cuatro hélices S6 (véase fig. 7-36). Por analogía con el canal del K^+, los extremos de estas hélices muy probablemente se reúnen justo por debajo del filtro real de selectividad de iones, bloqueando así el poro en el estado cerrado (véase fig. 7-15). Los estudios cristalográficos de rayos X de los canales bacterianos indican que en el estado abierto, los extremos de estas hélices se han movido hacia afuera, dejando en el medio un agujero suficiente para que los iones se muevan a través de él. De esta manera, las compuertas probablemente están compuestas de los extremos de las hélices S5 y S6 orientados hacia el citosol. Sin embargo, ya que la estructura molecular de los canales regulados por voltaje no ha sido determinada hasta la fecha, no sabemos aún cómo este posible cambio conformacional es inducido por movimientos de las hélices sensoras de voltaje.

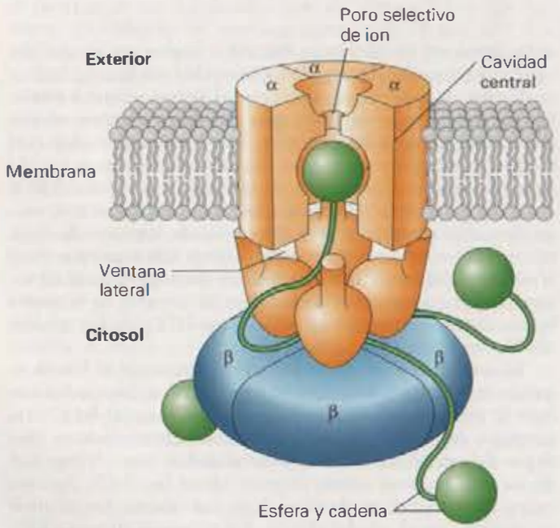
El movimiento del segmento inactivador del canal hacia el interior del poro abierto bloquea el flujo de iones

Una característica importante de la mayoría de los canales regulados por voltaje es la inactivación; es decir, poco después de la apertura se cierran espontáneamente y forman un canal inactivo que no se reabrirá hasta que se repolarice la membrana. En el estado de reposo, las esferas globulares cargadas en el N-terminal de las cuatro subunidades en un canal del K^+ regulado por voltaje están libres en el citosol. Varios milisegundos después de que el canal es reabierto por despolarización, una esfera se mueve a través de una abertura ("ventana lateral") entre dos de las subunidades y se fija en un bolsillo hidrófobo en la cavidad central del poro, bloqueando el flujo de iones K^+ (fig. 7-37). Tras algunos milisegundos, la esfera es desplazada desde el poro y la proteína se revierte a su estado cerrado de reposo. Los dominios esfera y cadena en los canales del K^+ son funcionalmente equivalentes al segmento inactivador del canal en los canales del Na^+.

Los resultados experimentales ilustrados en la figura 7-38 demuestran que la inactivación de los canales del K^+ depende de los dominios esfera, sucede después de la apertura del canal y no requiere que el dominio esfera esté unido covalentemente a la proteína canal. En otros experimentos, los canales del K^+ mutantes que carecen de porciones de cadena de ≈40 residuos que conectan la esfera a la hélice S1 fueron expresados en los ovocitos de rana. Las mediciones de la actividad del canal por patch clamp mostraron que mientras más corta es la cadena, más rápidamente es la inactivación, como si una esfera adherida a una cadena más corta pudiera moverse hacia el interior del canal abierto más rápidamente. A la inversa, la adición de aminoácidos al azar para alargar la cadena normal reduce la velocidad de inactivación del canal.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 7-38 Los experimentos con un canal mutante del K^+ carente de los dominios globulares N-terminal avalan el modelo de inactivación de cadenas y esferas. El canal de K^+ Shaker de tipo silvestre y una forma mutante que carece de los aminoácidos que componen la esfera N-terminal fueron expresados en ovocitos de *Xenopus*. Luego se monitorizó la actividad de los canales mediante la técnica de pinzamiento zonal de membrana. Cuando los parches de membrana fueron despolarizadas desde –0 a +30 mV, el canal de tipo silvestre se abrió por ~5 ms y luego se cerró (curva roja), mientras que el canal mutante se abrió normalmente, pero no se pudo cerrar (curva verde). Cuando a la cara citosólica del parche de membrana se le añadió un péptido de la esfera sintetizado químicamente, el canal mutante se abrió normalmente y luego se cerró (curva azul). Esto demostró que el péptido añadido inactivó el canal luego de que se abriera y de que la esfera no tenía que estar adosada a la proteína para que funcionara. (De W. N. Zagotta et al., 1990, *Science* 250:568.)



▲ Fig. 7-37. Modelo de esferas y cadenas para la inactivación de los canales del K^+ regulados por voltaje. Vista de corte tridimensional del canal en el estado inactivo. El dominio globular (esfera verde) en la terminal de una subunidad se ha movido a través de una ventana lateral para bloquear el poro central. Además de las cuatro subunidades α (naranja) que forman el canal, estas proteínas canal también tienen cuatro subunidades reguladoras β (azul). Para más detalles véase el texto. (Adaptado de R. Aldrich, 2001, Nature 411:643 y M. Zhou et al., 2001, Nature 411:657.)

El único segmento inactivador en los canales del Na^+ regulados por voltaje contiene un motivo hidrófobo conservado compuesto de isoleucina, fenilalanina, metionina y treonina (véase fig. 7-36b). Al igual que el dominio más largo esfera y cadena en los canales del K^+, este segmento se pliega en el poro conductor de Na^+ y lo bloquea hasta que la membrana se repolariza (véase fig. 7-33).

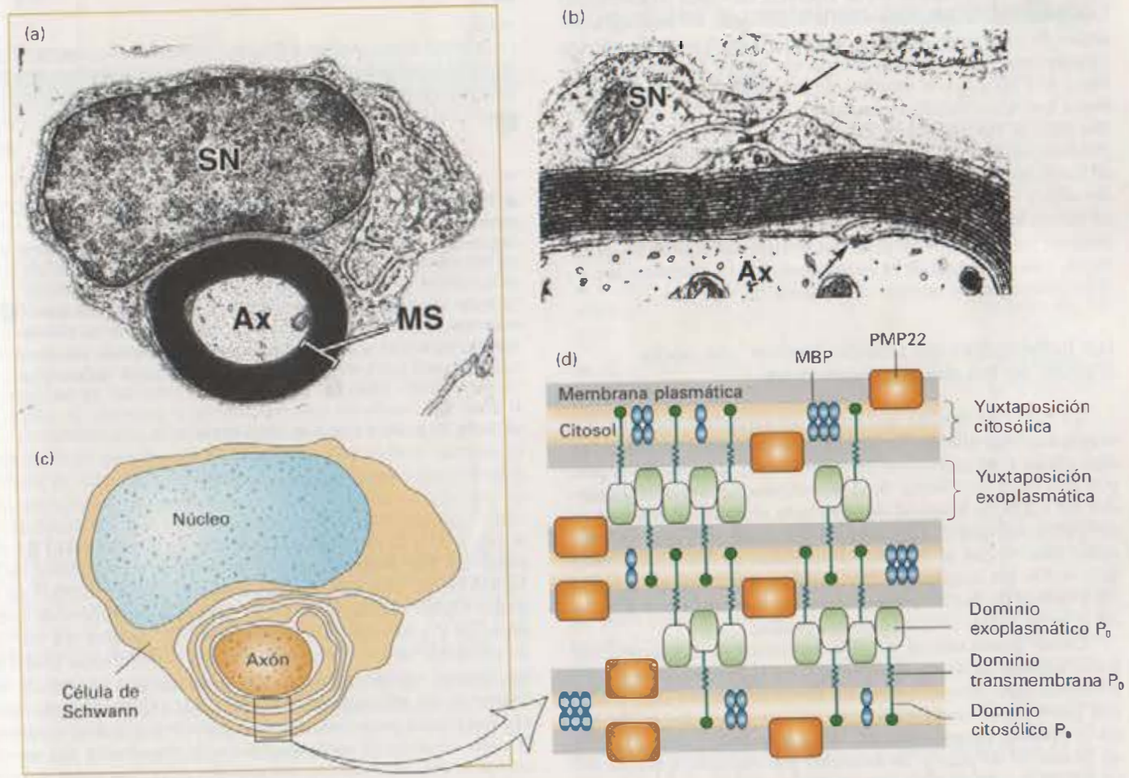
La mielinización incrementa la velocidad de conducción del impulso

Como ya vimos, los potenciales de acción pueden moverse a lo largo de un axón sin disminución a velocidades superiores a 1 metro por segundo. Pero estas altas velocidades son aún insuficientes para permitir los movimientos complejos típicos de los animales. En los seres humanos, por ejemplo, los cuerpos celulares de las neuronas motoras que inervan los músculos de las piernas están localizados en la médula espinal y los axones son de alrededor de un metro de longitud. Las contracciones coordinadas de los músculos requeridas para caminar, correr y realizar movimientos similares serían imposibles si a un potencial de acción le tomara un segundo moverse desde la médula espinal a lo largo del axón de una neurona motora hasta un músculo de una pierna. La presencia de una **vaina de mielina** alrededor de un axón incrementa la velocidad de conducción del impulso de 10-100 metros

por segundo. Como resultado, en una neurona motora humana típica, un potencial de acción puede viajar por un axón de 1 metro de largo y estimular un músculo para contraerse en 0,01 segundos.

En las neuronas mielinizadas, la velocidad de conducción de un potencial de acción es aproximadamente proporcional al diámetro del axón, porque un axón más grueso tendrá un mayor número de iones que pueden difundirse. El cerebro humano está abarrotado de neuronas mielinizadas relativamente pequeñas. Si estas neuronas no estuvieran mielinizadas, sus diámetros axonales tendrían que incrementarse alrededor de 10 mil veces para lograr las mismas velocidades de conducción de las neuronas mielinizadas. Por lo tanto, el cerebro de los vertebrados, con sus neuronas densamente apiñadas, nunca podría haber evolucionado sin la mielina.

La vaina de mielina es una pila de láminas de membrana plasmática producida por una célula glial que se envuelve alrededor del axón (fig. 7-39). En el sistema nervioso periférico, estas células gliales se denominan *células de Schwann*. En el sistema nervioso central, se denominan *oligodendrocitos*.



▲ Fig. 7-39. Formación y estructura de una vaina de mielina en el sistema nervioso periférico. Los axones mielinizados están rodeados por una capa aislante de membranas comprimidas. (a) Microfotografía electrónica de un corte transversal de un axón (Ax) rodeado por una vaina de mielina (MS) y una célula de Schwann (SN). (b) A mayores aumentos esta membrana en espiral especializada aparece como una serie de capas, o lamelas, de bicapas fosfolipídicas. En esta imagen, se evidencia la terminal de las envolturas interna y externa (*flechas*). (c) A medida que una célula de Schwann se envuelve repetidamente alrededor del axón, todos los espacios entre sus membranas plasmáticas, citosólica y exoplasmática, se reducen. Finalmente todo el citosol es forzado a salir y se forma una estructura compacta de membranas plasmáticas apiladas: la vaina de mielina. (d) Las dos proteínas de membrana más abundantes, la P_0 y la PMP22, en la mielina periférica son expresadas sólo por las células de Schwann. El dominio exoplasmático de una proteína P_0, que tiene un plegamiento inmunoglobulina, se asocia con dominios similares de las proteínas P_0 en la superficie opuesta de la membrana, de este modo "cierra como una cremallera" las superficies de las membranas exoplasmáticas en yuxtaposición estrecha. Estas interacciones son estabilizadas mediante la unión de un residuo de triptófano en la punta del dominio exoplasmático a los lípidos en la membrana opuesta. La yuxtaposición estrecha de las caras citosólicas de la membrana puede resultar de la unión de la cola citosólica de cada proteína P_0 a los fosfolípidos en la membrana opuesta. La PMP22 puede también contribuir a la compactación de la membrana. La proteína básica de la mielina (MBP), una proteína citosólica, permanece entre las membranas estrechamente yuxtapuestas a medida que el citosol es implantado hacia afuera. [Partes (a) y (b) cortesía de Grahame Kidd, Lerner Research Institute. Parte (d) adaptada de L. Shapiro et al., 1996, Neuron 17:435 y E. J. Arroyo y S. S. Scherer, 2000, Histochem. Cell Biol. 113:1.]

Tanto en los vertebrados como en algunos invertebrados, las células gliales acompañan los axones a lo largo de su longitud, pero la especialización de estas células gliales para formar mielina tiene lugar predominantemente en los vertebrados. Las células gliales de los vertebrados que luego formarán mielina tienen en su superficie una glucoproteína asociada con la mielina y otras proteínas que se unirán a los axones adyacentes y desencadenarán la formación de mielina.

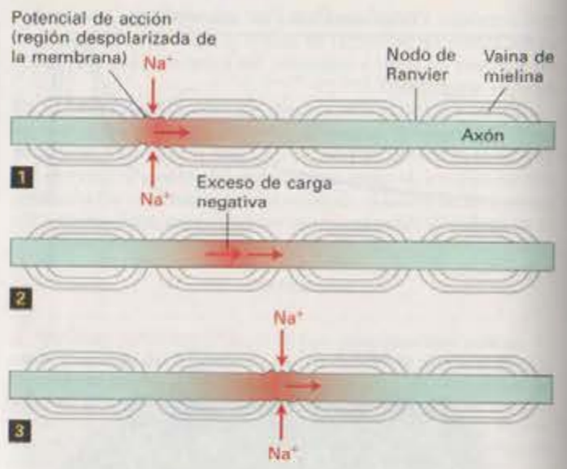
La figura 7-39d ilustra la formación y la estructura básica de una vaina de mielina, que contiene componentes citosólicos y de la membrana. Una membrana de mielina, como todas las biomembranas, tiene una estructura de bicapa fosfolipídica básica, pero contiene muchos menos tipos de proteínas que las halladas en la mayoría de otras membranas. Dos proteínas predominan en la membrana de mielina alrededor de los axones periféricos: la P_0, la cual provoca que las membranas plasmáticas adyacentes se apilen fuertemente juntas, y la *PMP22*. Los estudios de inactivación de genes en ratones han identificado recientemente a la PMP22 como esencial para la mielinización. En el sistema nervioso central, una proteína de membrana diferente y un proteolípido funcionan en conjunto de manera similar a la P_0. La principal proteína citosólica en todas las vainas de mielina es la *proteína básica de mielina* (MBP). Los ratones que contienen la mutación *shiverer* en el gen MBP padecen problemas neurológicos severos, una evidencia de la importancia de la miclinización en el funcionamiento normal del sistema nervioso.

Los potenciales de acción "saltan" de nodo a nodo en los axones mielinizados

La vaina de mielina que rodea un axón está formada por muchas células gliales. Cada región de la mielina formada por una célula glial individual es separada de la siguiente región por una zona amielínica de la membrana del axón de alrededor de 1 µm de longitud denominada el *nodo de Ranvier* (o simplemente, nodo). La membrana axonal sólo está en contacto directo con el líquido extracelular en los nodos. Más aún, todos los canales del Na^+ regulados por voltaje y todas las bombas de Na^+/K^+, que mantienen los gradientes iónicos en el axón, están ubicados en los nodos.

Como consecuencia de esta localización, el movimiento hacia adentro de iones Na^+ que genera el potencial de acción puede suceder sólo en los nodos libres de mielina (fig. 7-40). Los iones positivos citosólicos en exceso generados en un nodo durante la despolarización de la membrana asociada con un potencial de acción se difunden pasivamente a través del citosol del axón al siguiente nodo con muy poca pérdida o atenuación, puesto que no pueden cruzar la membrana axonal mielinizada. Esto provoca una despolarización en un nodo para propagarse rápidamente al próximo, permitiendo, en efecto, que el potencial de acción "salte" de un nodo a otro. Este fenómeno explica por qué la velocidad de conducción de las neuronas mielinizadas es aproximadamente la misma que la de las neuronas no mielinizadas de diámetro mucho mayor. Por ejemplo, un axón mielinizado de vertebrado de 12 µm y un axón de calamar no mielinizado de 600 µm de diámetro conducen impulsos a 12 m/s.

Varios factores contribuyen a la aglomeración de los canales del Na^+ regulados por voltaje y a las bombas de Na^+/K^+ en los nodos de Ranvier. Estas dos proteínas de transporte interactúan con las dos proteínas citoesqueléticas, anquirina y espectrina, similares a las de la membrana del eritrocito (véase fig. 5-31). El dominio extracelular de la subunidad β1 del canal del Na^+ también se une al dominio extracelular de la Nr-CAM, un tipo de proteína adhesiva que se localiza en el nodo. Como resultado de estas múltiples interacciones entre proteína y proteína, la concentración de canales del Na^+ es de alrededor de cien veces más alta en la membrana nodal de los axones mielinizados que en la membrana axonal de las neuronas no mielinizadas. Además, las células gliales secretan hormonas proteicas que de alguna manera desencadenan la aglomeración de estas proteínas de membrana del nervio en los nodos. Por último, las uniones estrechas entre el axón y la membrana plasmática de la célula en las uniones paranodales inmediatamente adyacentes a los nodos pueden evitar la difusión de los canales del Na^+ y las bombas de Na^+/K^+ lejos de los nodos.



▲ **Fig. 7-40. Conducción de potenciales de acción en los axones mielinizados.** Debido a que los canales del Na^+ regulados por voltaje están ubicados en la membrana axonal en los nodos de Ranvier, el ingreso de los iones Na^+ asociados con un potencial de acción puede tener lugar sólo en los nodos. Cuando se genera un potencial de acción en un nodo (paso 1), el exceso de iones positivos en el citosol, que no se puede mover hacia afuera a través de la vaina, se difunde rápidamente a lo largo del axón, causando suficiente despolarización en el siguiente nodo (paso 2) para inducir un potencial de acción en él (paso 3). Mediante este mecanismo el potencial de acción salta de un nodo a otro a lo largo del axón.

MEDICINA

Una enfermedad neurológica prevaleciente en los adultos es la esclerosis múltiple (EM), caracterizada por espasmos y debilidad en una o más extremidades, disfunción de la vejiga, pérdidas sensoriales locales y alteraciones visuales. Este trastorno –el prototipo de la *enfermedad desmielinizante*– es causado por la pérdida desigual de mielina en áreas del cerebro y la médula espinal. En los pacientes con EM, la conducción de los potenciales de acción mediante las neuronas desmielinizadas está lentificada y los canales del Na^+ se esparcen hacia afuera desde los nodos, bajando su concentración nodal. Se desconoce la causa de la enfermedad, pero parece involucrar la producción de autoanticuerpos (anticuerpos que se unen a las proteínas normales del cuerpo) que reaccionan con las proteínas básicas de la mielina o la secreción de proteasas que destruyen las proteínas de la mielina.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 7.7

Canales iónicos regulados por voltaje y propagación de potenciales de acción en las células nerviosas

- Los potenciales de acción son despolarizaciones súbitas de la membrana seguidas por una repolarización rápida. Se originan en el cono de inicio del axón y se mueven a lo largo del axón hacia las terminales del axón, donde el impulso eléctrico es transmitido a otras células por sinapsis (véanse figs. 7-29 y 7-31).
- Un potencial de acción es el resultado de la apertura y del cierre secuenciales de los canales del Na^+ y del K^+ regulados por voltaje.
- La apertura de los canales del Na^+ regulados por voltaje permite el ingreso de iones Na^+ por alrededor de 1 ms, provocando una súbita y gran despolarización de un segmento de la membrana. Los canales luego se cierran y se vuelven incapaces de abrirse (refractarios) durante varios milisegundos, evitando mayor flujo de Na^+ adicional (véase fig. 7-33).
- A medida que el potencial de acción alcanza su pico, la apertura de canales del K^+ regulados por voltaje permite la salida de iones K^+, lo cual repolariza y luego hiperpolariza la membrana. A medida que estos canales se cierran, la membrana retorna a su potencial de reposo (véase fig. 7-30).
- El exceso de cationes citosólicos asociados con un potencial de acción generado en un punto sobre un axón se esparce pasivamente al segmento adyacente, desencadenando la apertura de los canales del Na^+ regulados por voltaje y el movimiento del potencial de acción a lo largo del axón.
- Debido al período refractario absoluto de los canales del Na^+ regulados por voltaje y la breve hiperpolarización resultante de la salida de K^+, el potencial de acción se propaga sólo en una dirección hacia el terminal del axón.
- Los canales del Na^+ y del K^+ regulados por voltaje son proteínas monoméricas que contienen cuatro dominios estructural y funcionalmente similares a cada una de las subunidades en los canales tetraméricos del K^+ regulados por voltaje.
- Cada dominio o subunidad en los canales de cationes regulados por voltaje contiene seis hélices α transmembrana y un segmento P no helicoidal que forma el poro de selectividad de ion (véase fig. 7-36).
- La apertura de los canales regulados por voltaje resulta de los movimientos hacia afuera de las hélices α S4 cargadas positivamente en respuesta a una despolarización de magnitud suficiente.
- El cierre y la inactivación de los canales de cationes regulados por voltaje resulta de los movimientos de un segmento citosólico hacia el interior de un poro abierto (véase fig. 7-37).
- La mielinización, que incrementa la velocidad de conducción de los impulsos más de cien veces, permite el empaquetamiento estrecho de las neuronas característico del cerebro de los vertebrados.
- En las neuronas mielinizadas, los canales del Na^+ regulados por voltaje están concentrados en los nodos de Ranvier. La despolarización en un nodo se propaga con rapidez al próximo con poca atenuación de manera que el potencial de acción "salte" de un nodo a otro (véase fig. 7-40).

7.8 Neurotransmisores, receptores y proteínas transportadoras en la transmisión de señales en las sinapsis

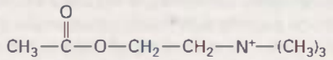
Como ya se dijo, las sinapsis son las uniones donde las neuronas liberan un neurotransmisor químico que actúa sobre una célula diana postsináptica, donde puede haber otra neurona o célula muscular o glandular (véase fig. 7-31). En esta sección, estudiamos varios temas clave relativos a la transmisión de impulsos:

- Cómo los neurotransmisores se almacenan en *vesículas sinápticas* unidas a la membrana en las terminales de los axones.
- Cómo la llegada de un potencial de acción al extremo de un axón en una célula presináptica desencadena la secreción de neurotransmisores.
- Cómo la unión de neurotransmisores por receptores sobre las células postsinápticas conduce a cambios en sus potenciales de membrana.
- Cómo los neurotransmisores son eliminados de la hendidura sináptica después de estimular a las células postsinápticas.

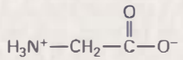
Los receptores de neurotransmisores se pueden agrupar en dos clases generales: los canales iónicos regulados por ligando, que se abren inmediatamente al unirse el neurotransmisor, y los receptores acoplados a proteína G. Los neurotransmisores que se unen a esta última clase de receptores inducen la apertura o el cierre de una proteína canal iónico *diferente* durante un período de segundos o minutos. Estos receptores de neurotransmisores "lentos" se analizarán en el capítulo 13 junto con los receptores acoplados a proteína G que unen diferentes tipos de ligandos y modulan la actividad de proteínas citosólicas además de canales iónicos. Aquí analizamos la estructura y la función del *receptor nicotínico de acetilcolina* que se encuentra en muchas sinapsis entre células musculares y neuronas. Es el primer canal iónico regulado por ligando que fue purificado, clonado y caracterizado a nivel molecular; este receptor provee un paradigma para otros canales iónicos regulados por neurotransmisores.

Los neurotransmisores son transportados en vesículas sinápticas por proteínas antiportadoras ligadas a H^+

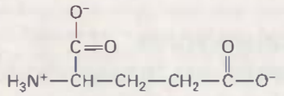
Numerosas moléculas pequeñas funcionan como un neurotransmisor en diversas sinapsis. Con la excepción de la ace-



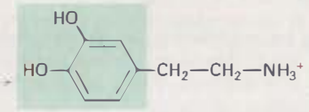
Acetilcolina



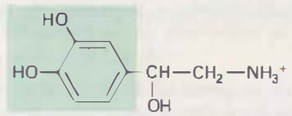
Glicina



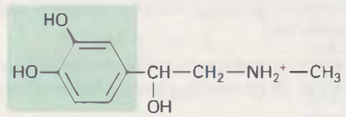
Glutamato



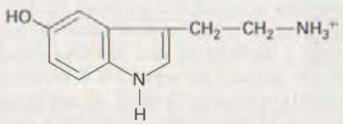
Dopamina
(derivado de la tirosina)



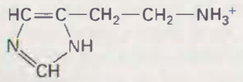
Noradrenalina (derivado de la tirosina)



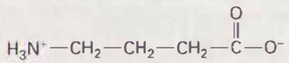
Adrenalina
(derivado de la tirosina)



Serotonina, o 5-hidroxitriptamina
(derivado del triptófano)



Histamina
(derivado de la histidina)

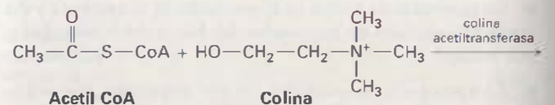


Ácido γ-aminobutírico o GABA
(derivado del glutamato)

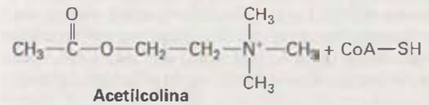
tilcolina, los neurotransmisores que se muestran en la figura 7-41 son aminoácidos. Los nucleótidos, como el ATP y los nucleósidos correspondientes, que carecen de grupos fosfatos, también funcionan como neurotransmisores. Cada neurona suele producir sólo un tipo de neurotransmisor.

Todos los neurotransmisores "clásicos" se sintetizan en el citosol y se transportan al interior de las vesículas sinápticas unidas a la membrana en las terminales de los axones, donde son almacenados. Estas vesículas miden 40-50 nm de diámetro y su luz tiene un pH bajo, generado por la acción de una bomba de protones de clase V en la vesícula de la membrana. Similar a la acumulación de metabolitos en las vacuolas de las plantas (véase fig. 7-23), este gradiente de concentración de protones (luz de la vesícula > citosol) impulsa el ingreso del neurotransmisor en la vesícula mediante antiportadores de H^+/ligando específico.

Por ejemplo, la acetilcolina se sintetiza a partir de acetil coenzima A (acetil CoA), un intermediario en la degradación de la glucosa y los ácidos grasos, y colina en una reacción catalizada por la colina acetiltransferasa:



Acetil CoA **Colina**



Acetilcolina

Las vesículas sinápticas incorporan y concentran acetilcolina desde el citosol en contra del gradiente de concentración, utilizando un antiportador H^+/acetilcolina de la membrana de la vesícula. Curiosamente, el gen que codifica este antiportador está contenido dentro del primer intrón del gen que codifica la colina acetiltransferasa, un mecanismo conservado a través de la evolución para asegurar la expresión coordinada de estas dos proteínas. Para incorporar otros neurotransmisores a las vesículas sinápticas se usan diferentes proteínas antiportadoras H^+/neurotransmisores.

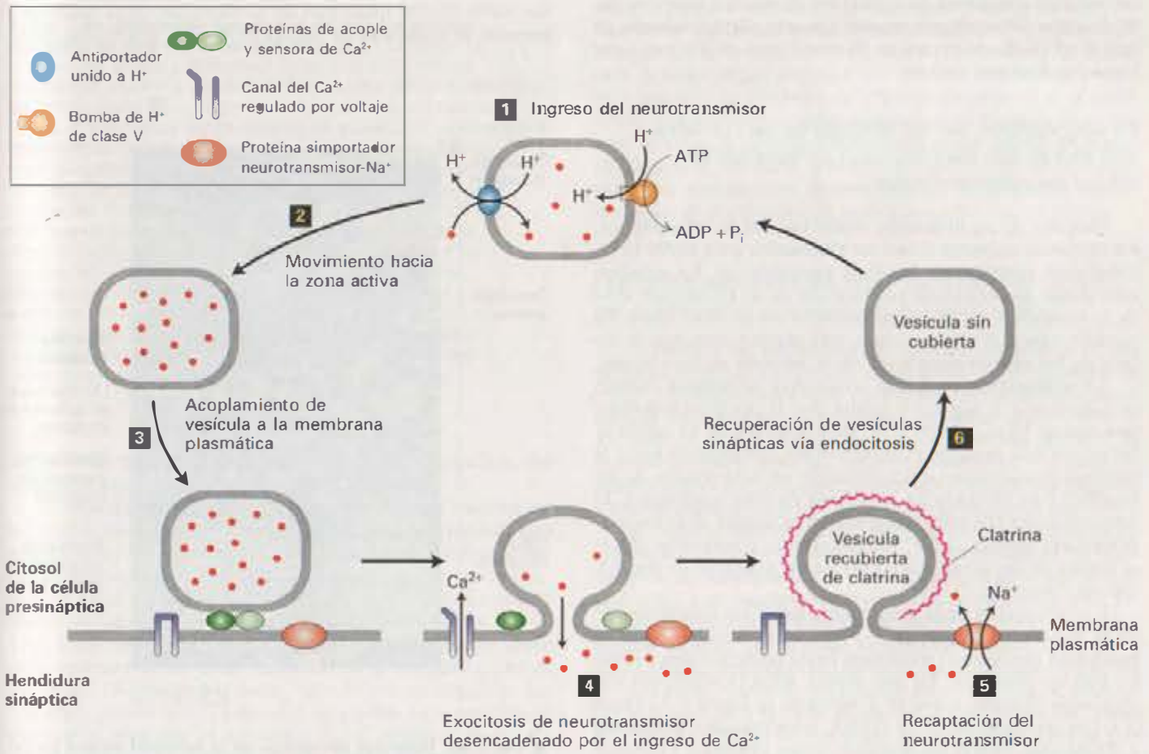
La entrada de Ca^{2+} a través de los canales del Ca^{2+} regulados por voltaje desencadena la liberación de neurotransmisores

Los neurotransmisores son liberados por **exocitosis,** un proceso en el cual las vesículas sinápticas llenas de neurotransmisores se fusionan con la membrana axonal, liberando sus contenidos en la hendidura sináptica. La exocitosis de los neurotransmisores desde las vesículas sinápticas involucra la selección de vesículas y episodios de fusión similares a los que tienen lugar durante el transporte intracelular de proteínas secretadas y de la membrana plasmática (cap. 17). Dos características críticas para la sinapsis difieren de otras vías secretorias: a) la secreción está estrechamente acoplada al arribo de un potencial de acción en las terminales axonales, y b) las vesículas sinápticas son recicladas localmente en las terminales del axón luego de la fusión con la membrana plasmática. La figura 7-42 muestra el ciclo completo por el cual las vesículas sinápticas se llenan con neurotransmisores, liberan su contenido y son recicladas.

◀ Fig. 7-41. Estructuras de varias moléculas pequeñas que funcionan como neurotransmisores. A excepción de la acetilcolina, todos son aminoácidos (glicina y glutamato) o derivados de los aminoácidos indicados. Los tres transmisores sintetizados a partir de la tirosina, que contienen el núcleo catecol (resaltado en azul) se denominan catecolaminas.

La despolarización de la membrana plasmática, en sí misma, es incapaz de inducir la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática. Para desencadenar la fusión vesicular, un potencial de acción debe ser convertido en una señal química: a saber, un aumento localizado en la concentración citosólica del Ca^{2+}. Los transductores de las señales eléctricas son *canales del Ca^{2+} regulados por voltaje* localizados en la región de la membrana plasmática adyacente a las vesículas sinápticas. La despolarización de la membrana debido al arribo de un potencial de acción abre estos canales y permite el ingreso de iones Ca^{2+} desde el medio extracelular hacia el interior de la terminal del axón. Este flujo de iones aumenta la concentración citosólica de Ca^{2+} cerca de las vesículas sinápticas desde < 0,1 μM, valor característico del estado de reposo, hasta 1-100 μM. La unión del Ca^{2+} a las proteínas que conectan la vesícula sináptica con la membrana plasmática induce la fusión de la membrana y la exocitosis del neurotransmisor. La salida siguiente de iones Ca^{2+} adicionales por las bombas del Ca^{2+} impulsadas por ATP en la membrana plasmática disminuye rápidamente el nivel citosólico del Ca^{2+} al del estado de reposo, permitiéndole a la terminal del axón responder al arribo de otro potencial de acción.

Un experimento simple demuestra la importancia de los canales del Ca^{2+} regulados por voltaje en la liberación de neurotransmisores. Una preparación de neuronas en un medio que contiene Ca^{2+} es tratada con tetradotoxina, una droga que bloquea los canales del Na^+ regulados por voltaje y por lo tanto impide la conducción de potenciales de acción. Co-



▲ Fig. 7-42. Ciclo de neurotransmisores y de vesículas sinápticas en las terminales axonales. El ciclo completo aquí representado toma típicamente alrededor de 60 segundos. Nótese que varias proteínas transportadoras participan en el llenado de vesículas sinápticas con neurotransmisores (círculos rojos), su liberación por exocitosis y la reincorporación subsiguiente desde la hendidura sináptica. Una vez que las proteínas de membrana de la vesícula sináptica (p. ej., bombas, antiportadoras y proteínas de fusión necesarias para la exocitosis) son específicamente recuperadas por endocitosis en las vesículas recubiertas de clatrina, el recubrimiento de clatrina es despolimerizado, produciendo vesículas que pueden ser llenadas con neurotransmisor. A diferencia de la mayoría de los neurotransmisores, la acetilcolina no es reciclada. Para más detalles véase el texto. (Véase T. Südhof y R. Jahn, 1991, Neuron 6:665; K. Takei et al., 1996, J. Cell Biol. 133:1237, y V. Murthy y C. Stevens, 1998, Nature 392:497.)

mo era lo esperado, ningún neurotransmisor es secretado al medio de cultivo. Si la membrana axonal se despolariza artificialmente de manera que el medio ≈ 100 mM KCl, los neurotransmisores se liberan desde las células debido al ingreso de Ca^{2+} a través de los canales del Ca^{2+} regulados por voltaje abiertos. En efecto, los experimentos de patch clamp muestran que los canales del Ca^{2+} regulados por voltaje se abren transitoriamente ante la despolarización de la membrana.

Dos grupos *(pool)* de vesículas sinápticas llenas de neurotransmisores están presentes en las terminales; las "adosadas" a la membrana plasmática, que pueden ser exocitadas rápidamente y las que están en reserva en la *zona activa* cerca de la membrana plasmática. Cada aumento de Ca^{2+} desencadena la exocitosis de alrededor del 10% de las vesículas adosadas. Las proteínas de membrana exclusivas de las vesículas sinápticas son luego internalizadas específicamente mediante endocitosis, casi siempre a través de los mismos tipos de vesículas revestidas de clatrina utilizadas para recuperar otras proteínas de la membrana plasmática por otros tipos de células. Luego de que las vesículas endocitadas pierden su recubrimiento de clatrina, son llenadas rápidamente de nuevo con neurotransmisores. La capacidad de muchas neuronas para disparar 50 veces por segundo es una clara evidencia de que el reciclado de proteínas de membrana vesiculares tiene lugar con bastante rapidez.

La señalización en las sinapsis es usualmente terminada por degradación o recaptación de los neurotransmisores

Después de su liberación desde una célula presináptica, los neurotransmisores deben ser eliminados para evitar la estimulación continua de la célula postsináptica. La señalización puede ser terminada por difusión de un transmisor lejos de la hendidura sináptica, pero éste es un proceso lento. En cambio, uno o dos mecanismos más rápidos terminan la acción de los neurotransmisores en la mayoría de las sinapsis.

La señalización mediante acetilcolina se termina cuando es hidrolizada a acetato y colina por la *acetilcolinesterasa*, una enzima localizada en la hendidura sináptica. La colina liberada en esta reacción es transportada nuevamente hacia la terminal axonal presináptica mediante un simportador de colina/Na^+ y es utilizada en la síntesis de más acetilcolina. El funcionamiento de este transportador es similar al de los simportadores ligados al Na^+ utilizados para transportar glucosa dentro de las células en contra de un gradiente de concentración (véase fig. 7-21).

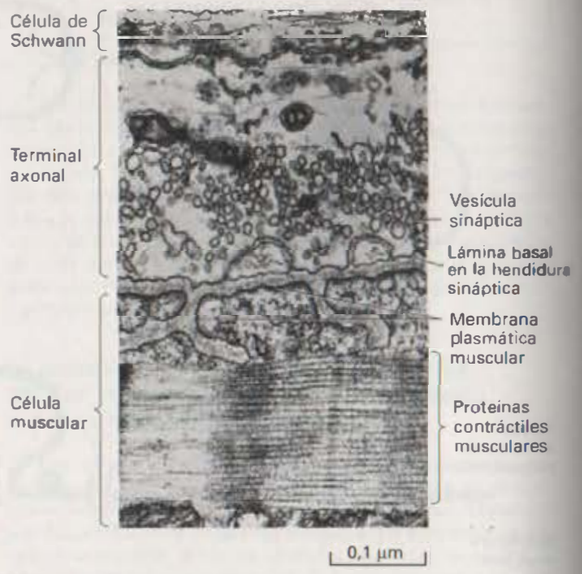
Con excepción de la acetilcolina, todos los neurotransmisores mostrados en la figura 7-41 son eliminados desde la hendidura mediante el transporte hacia las terminales axonales que los liberaron. De este modo, estos transmisores son reciclados intactos, como se muestra en la figura 7-42 (paso 5). Los transportadores de GABA, noradrenalina, dopamina y serotonina, fueron los primeros en ser clonados y estudiados. Estas cuatro proteínas transportadoras son simportadoras ligadas al Na^+. Presentan un 60-70% de identidad en sus secuencias de aminoácidos y se cree que cada una contiene 12 hélices α transmembrana. Al igual que con otros simportadores de Na^+, los movimientos del Na^+ hacia el interior de la célula a favor de su gradiente electroquímico provee la energía para la recaptación del neurotransmisor. A fin de mantener la electroneutralidad, el Cl^- a menudo es transportado por un canal de iones junto con el Na^+ y el neurotransmisor.

MEDICINA

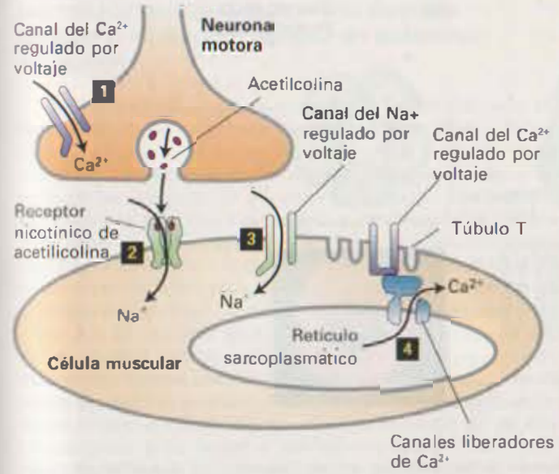
La cocaína inhibe los transportadores para la noradrenalina, la serotonina y la dopamina. La unión de la cocaína al transportador de dopamina inhibe la recaptación de dopamina, prolongando así la señalización en sinapsis cerebrales clave; en efecto, el transportador de dopamina es el principal "receptor de cocaína" del cerebro. Los agentes terapéuticos, como los fármacos antidepresivos fluoxetina (Prozac®) e imipramina, bloquean la recaptación de serotonina y el antidepresivo tricíclico desipramina bloquea la recaptación de noradrenalina. ▮

La apertura de los canales de cationes regulados por acetilcolina conduce a la contracción muscular

La acetilcolina es el neurotransmisor en las sinapsis entre las neuronas motoras y las células musculares, a menudo denominadas *uniones neuromusculares*. Una única terminal axonal de una neurona motora de rana puede contener un millón o más vesículas sinápticas, cada una de las cuales posee 1000-10.000 moléculas de acetilcolina; estas vesículas a menudo se acumulan en hileras en la zona activa (fig. 7-43).



▲ Fig. 7-43. Vesículas sinápticas en la terminal axonal cerca de la región donde se libera el neurotransmisor. En esta sección longitudinal a través de una unión neuromuscular, la lámina basal yace en la hendidura sináptica que separa la neurona de la membrana muscular, donde está extensamente plegada. Los receptores de acetilcolina están concentrados en la membrana muscular postsináptica en la parte superior y parte hacia debajo de los laterales de los pliegues de la membrana. Una célula de Schwann rodea la terminal del axón. (De J. E. Heuser y T. Reese, 1977, en E. R. Kandel, ed., The Nervous System, vol. 1 Handbook of Physiology, Williams & Wilkins, p. 266.)



▲ Fig. 7-44. Activación secuencial de canales iónicos regulados en una unión neuromuscular. El ambo de un potencial de acción a la terminal de una neurona motora presináptica induce la apertura de los canales del Ca^{2+} regulados por voltaje (paso 1) y la posterior liberación de acetilcolina, que induce la apertura de los receptores de acetilcolina regulados por ligando en la membrana plasmática muscular (paso 2). El ingreso consecuente del Na^+ produce una despolanzación localizada de la membrana y conduce a la apertura de los canales del Na^+ regulados por voltaje y la generación de un potencial de acción (paso 3). Cuando la extensión de la despolarización alcanza los túbulos T, es percibida por los canales del Ca^{2+} regulados por voltaje en la membrana plasmática. Esto conduce a la apertura de los canales y a la liberación del Ca^{2+} almacenado desde el retículo sarcoplasmático, hacia el citosol (paso 4). El aumento del Ca^{2+} citosólico resultante provoca la contracción muscular mediante los mecanismos detallados en el capítulo 19.

Tal neurona puede formar sinapsis con una única célula del músculo esquelético en varios cientos de puntos.

El receptor nicotínico de acetilcolina, que se expresa en las células musculares, es un canal regulado por ligando que admite tanto K^+ como Na^+. El efecto de la acetilcolina sobre este receptor puede determinarse mediante estudios con la técnica de patch clamp sobre porciones aisladas con el exterior afuera de membranas plasmáticas musculares (véase fig. 7-17c). Estas mediciones demostraron que la acetilcolina induce la apertura de un canal catiónico en el receptor capaz de transmitir 15.000-30.000 iones Na^+ o K^+ por milisegundo. Sin embargo, puesto que el potencial de reposo de la membrana plasmática muscular es cercano a E_K, el potencial de equilibrio del potasio, la apertura de los canales receptores de acetilcolina produce un pequeño aumento en la salida de iones K^+; por otra parte los iones Na^+ entran en la célula muscular conducidos por el gradiente electroquímico de Na^+.

El incremento simultáneo en la permeabilidad a los iones de Na^+ y K^+ que siguen a la fijación de la acetilcolina produce una despolarización neta de alrededor de −15 mV respecto del potencial del músculo en reposo de −85 a −90 mV. Como se muestra en la figura 7-44, esta despolarización localizada de la membrana plasmática muscular desencadena la apertura de los canales del Na^+ regulados por voltaje, que conduce a la generación y conducción de un potencial de acción en la superficie de la membrana de la célula muscular mediante el mismo mecanismo descrito para las neuronas. Cuando la despolarización de la membrana alcanza los túbulos T, invaginaciones especializadas de la membrana plasmática, afecta a los canales del Ca^{2+} en la membrana plasmática aparentemente sin causar su apertura. De alguna manera esto induce la apertura de canales de liberación de Ca^{2+} adyacentes en la membrana del retículo sarcoplasmático. El consiguiente flujo de iones Ca^{2+} almacenados en el retículo sarcoplasmático hacia el citosol incrementa la concentración de Ca^{2+} citosólico lo suficiente para inducir la contracción muscular.

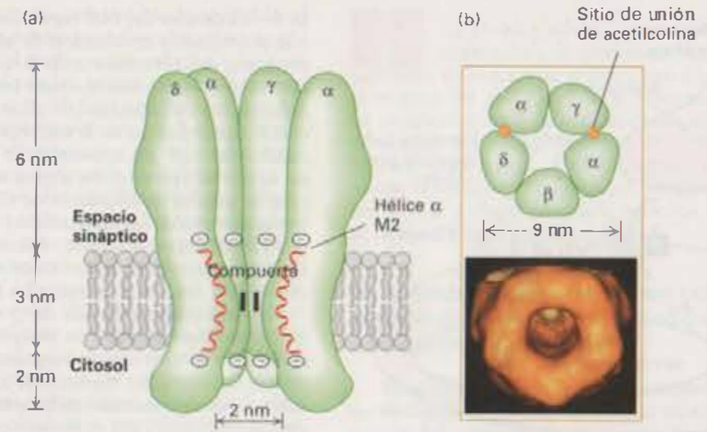
El monitoreo cuidadoso del potencial de membrana de la membrana muscular en una sinapsis con una neurona motora colinérgica ha demostrado despolarizaciones de ≈2 ms intermitentes, espontáneas y fortuitas de alrededor de 0,5-1,0 mV en ausencia de estimulación de la neurona motora. Cada una de estas despolarizaciones es causada por la liberación espontánea de acetilcolina a partir de una única vesícula sináptica. En efecto, la demostración de tan pequeña despolarización espontánea condujo a la noción de la liberación cuántica de acetilcolina (luego aplicada a otros neurotransmisores) y, por ende, a la hipótesis de la exocitosis vesicular en las sinapsis. La liberación de una vesícula sináptica que contiene acetilcolina produce la apertura de alrededor de 3000 canales iónicos en la membrana postsináptica, mucho menos que el número necesario para alcanzar la despolarización umbral que induce un potencial de acción. Sin duda, la estimulación de la contracción muscular por una neurona motora requiere la liberación casi simultánea de acetilcolina de numerosas vesículas sinápticas.

Las cinco subunidades en el receptor nicotínico de acetilcolina contribuyen al canal iónico

El receptor de acetilcolina del músculo esquelético es una proteína pentamérica con una composición de subunidades de $\alpha_2\beta\gamma\delta$. Las subunidades α, β, γ y δ tienen una homología de secuencia considerable; en promedio, alrededor del 35-40% de los residuos en dos subunidades cualesquiera son similares. El receptor completo tiene una simetría pentamérica y el canal catiónico real es un poro central ahusado revestido por segmentos homólogos de cada una de las cinco subunidades (fig. 7-45).

El canal se abre cuando el receptor une cooperativamente dos moléculas de acetilcolina en los sitios ubicados en las interfaces de las subunidades αδ y αγ. Una vez que la acetilcolina está unida a un receptor, el canal se abre en microsegundos. Estudios de medición de la permeabilidad de distintos cationes pequeños sugieren que el canal iónico abierto mide, en su parte más estrecha, alrededor de 0,65-0,80 nm de diámetro, de acuerdo con estimaciones de microfotografías electrónicas. Esto sería suficiente para permitir el pasaje tanto de iones Na^+ como K^+ con sus cubiertas de moléculas de agua unidas. De esta manera, el receptor de acetilcolina probablemente transporta iones hidratados, a diferencia de los canales del Na^+ y del K^+, que permiten sólo el pasaje de iones no hidratados (véase fig. 7-16).

Aunque se desconocen los detalles moleculares de la estructura del canal iónico central, gran parte de la evidencia indica que está revestido por cinco hélices α M2 transmembrana, una por cada una de las cinco subunidades. Las hélices M2 están compuestas en gran parte de aminoácidos polares hidrófobos no cargados, pero los residuos de glutamato cargados negativamente están ubicados en cada extremo, cerca

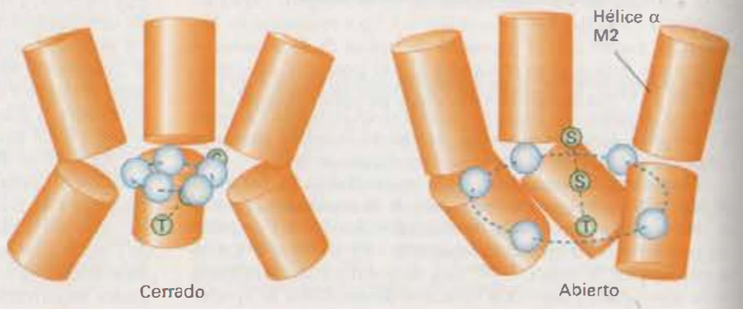


▲ Fig. 7-45. Estructura tridimensional del receptor nicotínico de acetilcolina. (a) Modelo de un corte esquemático del receptor pentamérico de la membrana; para mayor claridad, la subunidad β no se muestra. Cada subunidad contiene una hélice α M2 (rojo) orientada hacia el poro central. Las cadenas laterales de aspartato y glutamato en ambos extremos de las hélices M2 forman dos anillos de cargas negativas que ayudan a excluir los aniones del canal y atraer cationes hacia él. La compuerta, que se abre ante la unión de acetilcolina, está dentro del poro. (b) *Arriba*: Corte transversal de la cara exoplasmática del receptor que muestra la disposición de las subunidades alrededor del poro central. Los dos sitios de unión de la acetilcolina están ubicados a unos 3 nm de la superficie de la membrana. *Abajo*: Vista desde la parte superior hacia el interior de la entrada sináptica del canal. La entrada similar a la de un túnel se estrecha abruptamente a una distancia de alrededor de 6 nm. Estos modelos se basan en información de secuencia de aminoácidos, en imágenes generadas por computadoras promediando microfotografías electrónicas de alta resolución y en información de mutaciones específicas del sitio. [Parte (b) de N. Unwin, 1993, Cell 72, y Neuron, [suppl.], p. 31.]

de las caras de la membrana y varios residuos de serina y treonina están cerca del centro. Se han expresado en los ovocitos de rana receptores mutantes de acetilcolina en los cuales un único glutamato o aspartato cargado negativamente en una hélice M2 es reemplazado por una lisina cargada positivamente. Las mediciones por patch clamp indican que tales proteínas alteradas pueden funcionar como canales, pero el número de iones que las atraviesan durante el estado abierto está reducido. Cuanto mayor sea el número de residuos de glutamato o aspartato mutados (en una o en múltiples hélices M2), más disminuirá la conductividad de iones. Estos hallazgos sugieren que los residuos de glutamato o aspartato forman un anillo de cargas negativas sobre la superficie externa del poro que ayuda a descartar aniones y a atraer iones Na^+ o K^+ a medida que entran en el canal. Un anillo similar de cargas negativas que reviste la superficie citosólica del poro también ayuda a seleccionar cationes para el pasaje (véase fig. 7-45).

Los dos sitios de fijación de acetilcolina en el dominio extracelular del receptor se encuentran a ≈ 4 a 5 nm del centro del poro. En consecuencia, la unión de la acetilcolina debe desencadenar cambios conformacionales en las subunidades del receptor que pueden provocar la apertura del canal a cierta distancia desde el sitio de unión. Los receptores de membranas postsinápticas aisladas pueden quedar atrapados en el estado abierto o cerrado mediante el congelamiento rápido en nitrógeno líquido. Las imágenes de estas preparaciones sugieren que las cinco hélices M2 rotan en relación con el eje vertical del canal durante la apertura y el cierre (fig. 7-46).

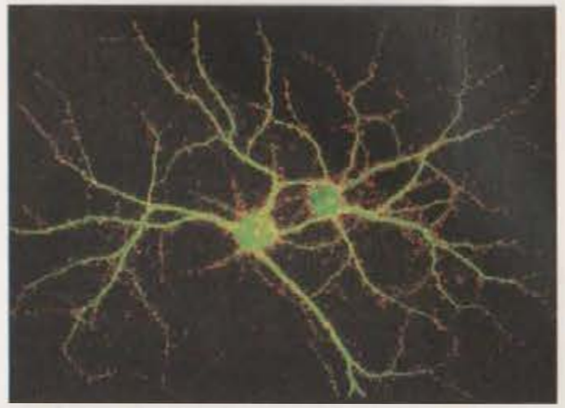
▶ Fig. 7-46. Modelos esquemáticos de las hélices M2 que revisten el poro en los estados cerrado y abierto. En el estado cerrado, el pliegue en el centro de cada hélice M2 apunta hacia adentro, constriñendo la vía de paso, cuyo perímetro está indicado por las esferas celestes. En el estado abierto, los pliegues rotan a un lado, de manera que las hélices están más separadas. Las esferas verdes denotan los grupos hidroxilo residuos de serina (S) y treonina (T) en el centro de las hélices M2; en el estado abierto éstos son paralelos al eje del canal y les permiten a los iones fluir. (Adaptado de N. Unwin, 1995, Nature 373:37.)



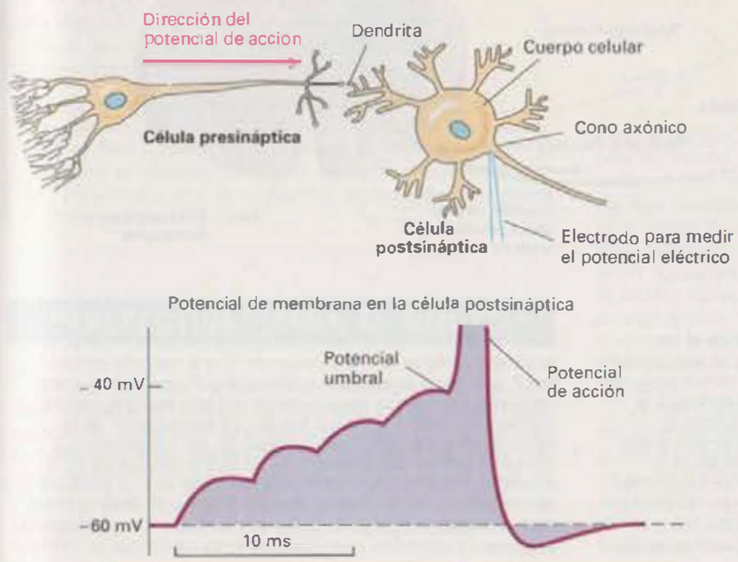
Las células nerviosas toman una decisión de todo o nada para generar un potencial de acción

En las uniones neuromusculares, virtualmente cada potencial de acción en la neurona motora presináptica desencadena un potencial de acción en la célula muscular postsináptica. La situación en las sinapsis entre neuronas, sobre todo en las que están en el cerebro, es mucho más compleja porque la neurona postsináptica recibe señales de muchas neuronas presinápticas (fig. 7-47). Los neurotransmisores liberados de las neuronas presinápticas pueden unirse a un *receptor excitador* sobre la neurona postsináptica, abriendo así un canal que admite iones Na^+ o tanto iones Na^+ como K^+. El receptor de acetilcolina recién tratado es uno de los muchos receptores excitadores y la apertura de estos canales iónicos conduce a la despolarización de la membrana plasmática postsináptica, promoviendo la generación de un potencial de acción. En cambio, la unión de un neurotransmisor a un *receptor inhibidor* sobre la célula postsináptica provoca la apertura de los canales del K^+ o del Cl^-, conduciendo a una salida adicional de iones K^+ desde el citosol o al ingreso de iones Cl^-. En cualquier caso, el flujo de iones tiende a hiperpolarizar la membrana plasmática, lo que inhibe la generación de un potencial de acción en la célula postsináptica.

Una única neurona puede ser afectada simultáneamente por señales recibidas en múltiples sinapsis excitadoras e inhibidoras. La neurona integra continuamente estas señales y determina si generar o no un potencial de acción. En este proceso, las diversas despolarizaciones e hiperpolarizaciones pequeñas generadas en las sinapsis se mueven a lo largo de la membrana plasmática desde las dendritas al cuerpo celular y luego al cono de inicio axonal, donde se suman. Un potencial de acción se genera donde sea que la membrana en el cono de inicio axonal se torna despolarizada a un cierto voltaje llamado el *potencial umbral* (fig. 7-48). Por ende, un potencial de acción es generado de una manera en la que es todo o nada: la despolarización que alcanza el umbral conduce siempre a un potencial de acción, mientras que cualquier despolarización que no alcanza el potencial de umbral nunca la induce.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 7-47 Una microfotografía fluorescente de dos interneuronas revela que muchas otras neuronas entran en sinapsis con ellas. Estas células, de la región del hipocampo del cerebro, fueron teñidas con dos anticuerpos fluorescentes: uno específico para la proteína asociada con microtúbulos MAP2 (verde), que se encuentra solo en las dendritas y los cuerpos celulares, y la otra específica para la sinaptotagmina (naranja-rojo), una proteína hallada en las terminales axonales presinápticas. Los numerosos puntos naranja-rojo, que representan las terminales axonales presinápticas de las neuronas que no son visibles en este campo, indican que estas interneuronas reciben señales de muchas otras células. (Cortesía de O. Mundigl y P. deCamilli.)



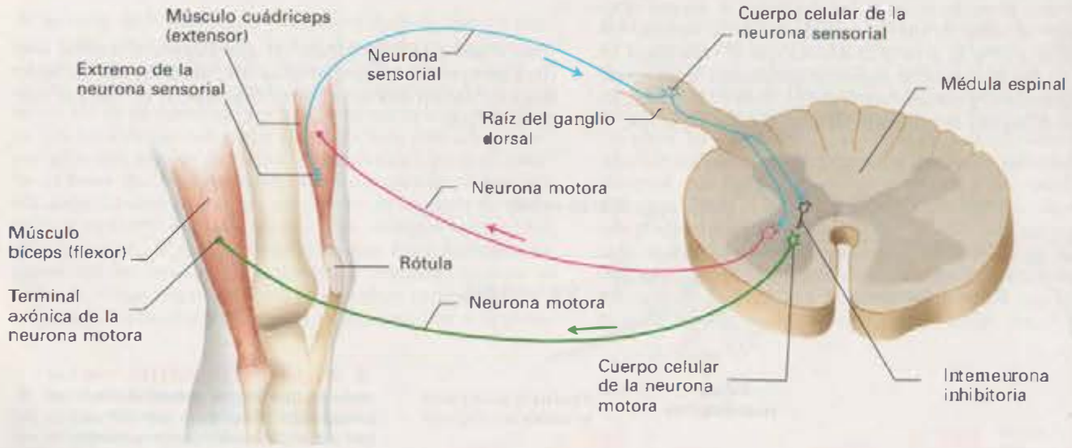
◀ FIGURA EXPERIMENTAL 7-48 Las señales que llegan deben alcanzar el potencial umbral para generar un potencial de acción en una célula postsináptica. En este ejemplo, la neurona presináptica genera un potencial de acción cada 4 milisegundos. La llegada de cada potencial de acción a la sinapsis produce un pequeño cambio en el potencial de membrana en el cono axonal de la célula postsináptica, en este ejemplo una despolarización de ≈5 mV. Cuando múltiples estímulos producen que la membrana de esta célula postsináptica se despolarice hasta el potencial umbral, aquí de aproximadamente –40 mV, se induce en ella un potencial de acción.

Que la neurona genere un potencial de acción en el cono de inicio del axón depende del balance del ritmo, la amplitud y la localización de las diversas señales que recibe; este cómputo de la señal difiere para cada tipo de neurona. En cierto sentido, cada neurona es una pequeña computadora que promedia todas las activaciones del receptor y las alteraciones eléctricas sobre su membrana y decide si dispara un potencial de acción y lo conduce a lo largo del axón. Un potencial de acción siempre tendrá la misma *magnitud* en cualquier neurona. La *frecuencia* con la cual se generan los potenciales de acción en una neurona es un parámetro importante de su capacidad para enviar señales a otras células.

El sistema nervioso utiliza circuitos de señalización compuestos de múltiples neuronas

En los animales multicelulares complejos, como los insectos y los mamíferos, diversos tipos de neuronas forman circuitos señalizadores. En el tipo simple de circuitos, denominado *arco reflejo*, las interneuronas conectan múltiples neuronas sensoriales y motoras, permitiéndole a una neurona sensorial afectar a múltiples neuronas motoras y a una neurona motora ser afectada por múltiples neuronas sensoriales; en este sentido las interneuronas integran y amplifican los reflejos. Por ejemplo, el reflejo patelar en los seres humanos involucra un arco reflejo complejo en el cual un músculo es estimulado a contraerse mientras otro es inhibido a hacerlo (fig. 7-49). Tal circuito permite a un organismo responder a una señal mediante la acción coordinada de juegos de músculos que juntos logran un único propósito.

Sin embargo, estos circuitos de señalización simples no explican directamente las funciones cerebrales de orden más alto, como el razonamiento, el cálculo y el desarrollo de la memoria. En el cerebro, las neuronas típicas reciben señales de hasta otras mil neuronas, y por otra parte pueden dirigir señales químicas a muchas otras. El rendimiento del sistema nervioso depende de las propiedades de sus circuitos, es decir, las conexiones o interconexiones. Los aspectos complejos del sistema nervioso, como la visión y la conciencia, no pueden ser entendidos en un nivel celular aislado sino de las redes de células nerviosas que pueden ser estudiadas por técnicas de análisis de sistemas. El sistema nervioso cambia constantemente; las alteraciones en el número y la naturaleza de las interconexiones entre las neuronas individuales suceden, por ejemplo, en el desarrollo de nuevas memorias.



▲ Fig. 7-49. El arco reflejo del tirón de rodilla en el ser humano. El posicionamiento y el movimiento de la articulación de la rodilla son logrados por dos músculos que tienen acciones opuestas; la contracción del músculo cuádriceps endereza la pierna, mientras que la contracción del músculo bíceps la flexiona. La respuesta del tirón de rodilla, una extensión súbita de la pierna, es estimulada por un golpe justo debajo de la rótula. El golpe estimula directamente las neuronas sensoriales (azul) ubicadas en el tendón del músculo cuádriceps. El axón de cada neurona sensorial se extiende desde el tendón hasta el cuerpo celular en la raíz de un ganglio dorsal. El axón sensorial luego continúa hacia la espina dorsal, donde se ramifica y establece sinapsis con dos neuronas 1) una neurona motora (rojo) que inerva el músculo cuádriceps y 2) una interneurona inhibidora (negro) que hace sinapsis con una neurona motora (verde) inervando el músculo bíceps. La estimulación de la neurona sensorial provoca la contracción del cuádriceps y, a través de la neurona inhibidora, la inhibición simultánea de la contracción del músculo bíceps. El resultado es una extensión de la pierna en la articulación de la rodilla. Cada célula ilustrada aquí en realidad representa un nervio, es decir, una población de neuronas.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 7.8

Neurotransmisores, receptores y proteínas transportadoras en la transmisión de señales en las sinapsis

- Los receptores de los neurotransmisores están dentro de dos clases: los canales iónicos regulados por ligando, que permiten el pasaje de iones cuando están abiertos, y los receptores asociados con proteínas G, que están unidos a un canal de iones diferente.
- En las sinapsis los impulsos son transmitidos por los neurotransmisores liberados desde la terminal del axón de la célula presináptica y la unión subsiguiente a receptores específicos sobre la célula postsináptica (véase fig. 7-31).
- Los neurotransmisores de bajo peso molecular (p. ej., la acetilcolina, la dopamina, la adrenalina) son transportados desde el citosol hacia las vesículas sinápticas por antiportadores ligados a H^+. Las bombas de protones de clase V mantienen el pH intravesicular bajo que conduce al ingreso del neurotransmisor en contra de un gradiente de concentración.
- El arribo de un potencial de acción a una terminal axonal presináptica abre los canales del Ca^{2+} regulados por voltaje, lo que lleva a un aumento localizado en el nivel citosólico de Ca^{2+} que desencadena la exocitosis de las vesículas sinápticas. Después de la liberación del neurotransmisor, las vesículas son captadas por endocitosis y recicladas (véase fig. 7-42).
- El funcionamiento coordinado de cuatro canales iónicos regulados en la sinapsis de una neurona motora y de una célula muscular estriada conduce a la liberación de acetilcolina de la terminal axonal, la despolarización de la membrana muscular, la generación de un potencial de acción y luego la contracción (véase fig. 7-44).
- El receptor nicotínico de acetilcolina, un canal de cationes regulado por ligando, contiene cinco subunidades, cada una de las cuales tiene una hélice α transmembrana (M2) que reviste el canal (véase fig. 7-45).
- Una neurona postsináptica genera un potencial de acción sólo cuando la membrana plasmática en el cono de inicio del axón es despolarizada hasta el potencial umbral mediante la sumatoria de despolarizaciones e hiperpolarizaciones pequeñas provocadas por la activación de múltiples receptores neuronales (véase fig. 7-48).

PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO

En este capítulo explicamos ciertos aspectos de la fisiología humana en cuanto a la acción de las proteínas transportadoras específicas de membrana. Este enfoque fisiológico molecular tiene muchas aplicaciones médicas. Aún hoy, inhibidores o activadores específicos de los canales, bombas y transportadores constituyen la mayor clase de fármacos. Por ejemplo, un inhibidor de la H^+/K^+-ATPasa gástrica que acidifica el estómago es el fármaco más utilizado para tratar las úlceras gástricas. Los inhibidores de las proteínas canal en el riñón son muy utilizados para controlar la hipertensión (presión arterial elevada). Al bloquear la reabsorción de agua desde la orina en formación hacia la sangre, estos fármacos reducen el volumen de sangre y por ende la presión arterial. Los bloqueantes de los canales del calcio se emplean para controlar la intensidad de las contracciones cardíacas. Las proteínas simportadoras ligadas al Na^+ utilizadas por las células nerviosas para la reincorporación de neurotransmisores son inhibidas específicamente por muchas drogas de abuso (p. ej., cocaína) y medicamentos antidepresivos (p. ej., Prozac®).

Con la finalización del proyecto genoma humano, estamos en condiciones de conocer las secuencias de todas las proteínas transporte de membrana humanas. Ya sabemos que las mutaciones en muchas de ellas causan enfermedades. Por ejemplo, la mutación en un canal del Na^+ regulado por voltaje que se expresa en el corazón produce la fibrilación ventricular y los infartos. Las mutaciones en otros canales del Na^+, expresadas principalmente en el cerebro, provocan epilepsia y convulsiones febriles. En algunos casos los mecanismos moleculares son conocidos. Un tipo de mutaciones con sentido alterado (*missense*) en un canal del Na^+ que causa epilepsia afecta la dependencia de voltaje de la apertura y el cierre de canales; otra lentifica la inactivación del canal en potenciales de despolarización, prolongando la entrada de Na^+. Los estudios en las formas mutantes de estas y otras proteínas de transporte de membrana expresadas en ratones continúan proporcionando claves de su papel en la fisiología y la enfermedad en los seres humanos.

La expansión de este conocimiento básico permitirá a los investigadores identificar nuevos tipos de compuestos que inhiben o activan sólo una de estas proteínas de transporte de membrana y no sus homólogos. Sin embargo, un reto importante es entender el papel de una proteína transportadora individual en cada uno de los diversos tejidos en los cuales está expresada. Como un ejemplo, un fármaco que inhibe un canal de iones en particular en las neuronas motoras puede ser útil para el tratamiento del dolor crónico, pero si este canal también se expresa en ciertas áreas del cerebro, su inhibición puede tener acciones serias no deseadas ("efectos secundarios").

Un entendimiento real de la función de las células nerviosas requiere el conocimiento de las estructuras tridimensionales de muchos canales, receptores de neurotransmisores y otras proteínas de membrana. La determinación de la estructura del primer canal del K^+ regulado por voltaje debería iluminar el mecanismo de cierre, apertura e inactivación del canal que también podría aplicarse a otros canales regulados por voltaje. Asimismo, los receptores nicotínicos de acetilcolina, glutamato, GABA y receptores de glicina son canales de iones regulados por ligando, pero se discute si todos tienen la misma estructura general en la membrana. La resolución de este asunto también requerirá el conocimiento de sus estructuras tridimensionales, que, además, podría explicarnos cómo la unión de neurotransmisores conduce a la apertura del canal.

¿Cómo logra una neurona su larga y ramificada estructura? ¿Por qué una parte de la neurona se vuelve una dendrita y otra un axón? ¿Por qué ciertas proteínas de membrana clave se aglomeraron en puntos particulares: receptores de neurotransmisores en densidades postsinápticas en las dendritas, canales del Ca^{2+} en la terminal axónica y canales del Na^+ en las neuronas mielinizadas en los nodos de Ranvier? Estas pre-

guntas acerca de la forma de las células y del objetivo de las proteínas también se aplican a otros tipos de células, pero la diversidad morfológica de distintos tipos de neuronas los torna particularmente intrigantes en el sistema nervioso. El desarrollo de cultivos puros de tipos específicos de neuronas que mantienen sus propiedades normales permitiría estudiar muchos de estos problemas por técnicas de biología celular molecular. Quizá las preguntas más difíciles conciernen a la formación de sinapsis específicas dentro del sistema nervioso; es decir, ¿cómo una neurona "sabe" establecer sinapsis con un tipo de célula y no con otra? Investigaciones en curso acerca del desarrollo del sistema nervioso, que comentaremos brevemente en el capítulo 15, empiezan a proporcionar respuestas más completas acerca del cableado complejo entre las neuronas y cómo se relacionan con la función del cerebro.

PALABRAS CLAVE

antiportador *268*
canales del K^+ en reposo *262*
canal regulado *247*
cotransportador *268*
despolarización *274*
difusión facilitada *247*
difusión pasiva *246*
gradiente electroquímico *246*
hipertónica *272*
hipotónica *272*
isotónica *272*
Na^+/K^+-ATPasa *256*
neurotransmisor *276*
potencial de acción *245*
potencial de membrana *246*
superfamilia ABC *253*
simportador *268*
sinapsis *277*
técnica de pinzamiento zonal de membrana *(patch clamp) 265*
transporte activo *247*
transporte transcelular *274*
uniones oclusivas *274*
uniporte *248*
vaina de mielina *284*

REVISIÓN DE CONCEPTOS

1. La unidad estructural básica de las biomembranas es la bicapa fosfolipídica. El ácido acético y el etanol están compuestos cada uno de dos carbonos, hidrógeno y oxígeno, y ambos entran en las células por difusión pasiva. A pH 7, uno es mucho más permeable a la membrana que el otro. ¿Cuál es el más permeable y por qué? Explique cómo la permeabilidad de cada uno es alterada cuando el pH es reducido a 1,0, un valor típico del estómago.

2. Los uniportadores y los canales de iones mantienen la difusión facilitada a través de las membranas. Aunque ambas son ejemplo de difusión facilitada, las velocidades del movimiento de iones a través de un canal son aproximadamente 10^4 a 10^5 veces más rápidas que la de moléculas a través de un uniportador. ¿Qué diferencia mecánica clave da como resultado esta gran diferencia en la velocidad de transporte?

3. Nombre las tres clases de transportadores. Explique cuál de estas clases es capaz de mover glucosa o bicarbonato ($HC●_3^-$), por ejemplo, en contra de un gradiente electroquímico. En el caso del bicarbonato, pero no de la glucosa, el ΔG del proceso de transporte tiene dos términos. ¿Qué son estos dos términos y por qué el segundo no se aplica a la glucosa? ¿Por qué suelen tomarse los cotransportadores como ejemplo de transporte activo secundario?

4. La GLUT1, hallada en la membrana plasmática de los eritrocitos, es un ejemplo clásico de un uniportador. Diseñe un conjunto de experimentos para probar que la GLUT1 es en efecto un uniportador específico de la glucosa más que un uniportador específico de la galactosa o de la manosa. La glucosa es un azúcar de 6 carbonos mientras que la ribosa es un azúcar de 5 carbonos. A pesar de este menor tamaño, la ribosa no es transportada eficientemente por la GLUT1. ¿Cómo se puede explicar esto?

5. Nombre las cuatro clases de bombas impulsadas por ATP que producen un transporte activo de iones y moléculas. Indique cuál de estas clases transporta sólo iones y cuál transporta principalmente moléculas pequeñas. En el caso de una clase de estas bombas impulsadas por ATP, el descubrimiento inicial de la clase provino de estudiar no el transporte de un sustrato natural sino de sustratos artificiales utilizados como agentes quimioterapéuticos contra el cáncer. ¿Qué piensan ahora los investigadores que pueden ser ejemplos comunes de los sustratos naturales de esta clase particular de bombas impulsadas por ATP?

6. El proyecto de secuenciación del genoma continúa, y para un número de organismos cada vez mayor, se conoce la secuencia completa del genoma de estos organismos. ¿Cómo esta información nos permite declarar el número total de transportadores o bombas de un tipo dado en los seres humanos o en el ratón? Muchos de los transportadores o de las bombas cuya secuencia ha sido identificada son proteínas "huérfanas", en el sentido de que su sustrato natural o papel fisiológico no se conoce. ¿Cómo es posible esto y cómo podría establecerse el papel fisiológico de una proteína huérfana?

7. Como dijimos en la sección "Perspectivas para el futuro", inhibidores o activadores de canales específicos, bombas y transportadores constituyen la mayor clase de fármacos producidos por la industria farmacéutica. La contracción del músculo esquelético es provocada por la elevación de la concentración de Ca^{2+} en el citosol. ¿Cuál es el efecto esperado en la contracción muscular de un fármaco en la inhibición selectiva de la Ca^{2+}-ATPasa de clase P del retículo sarcoplasmático (RS)?

8. El potencial de membrana en las células animales, pero no en las vegetales, depende en gran medida de los canales del K^+ en reposo. ¿Cómo contribuyen estos canales al potencial de reposo? ¿Por qué se considera que estos canales son no regulados? ¿Cómo estos canales logran la selectividad de K^+ o de Na^+?

9. La técnica del patch clamp puede utilizarse para medir las propiedades conductivas de canales iónicos individuales. Describa cómo se puede utilizar esta técnica para determinar si el gen que codifica un canal del K^+ putativo realmente codifica para un canal de K^+ o de Na^+.

10. Los vegetales usan el gradiente electroquímico a través de la vacuola de la membrana para impulsar la acumulación de sales y azúcares en el orgánulo, lo cual crea un estado hipertónico. ¿Por qué esto no lleva a la explosión de la célula vegetal? ¿Cómo la Na^+/K^+-ATPasa de la membrana plasmática permite a las células animales evitar la lisis osmótica aun bajo condiciones isotónicas?

11. Los movimientos de glucosa de un lado a otro del epitelio intestinal son un ejemplo importante de transporte transcelular. ¿Cómo impulsa este proceso la Na^+/K^+-ATPasa? ¿Por qué las uniones estrechas son esenciales para este proceso? Los suplementos de rehidratación, como las bebidas deportivas, incluyen un azúcar y una sal. ¿Por qué ambos son importantes para la rehidratación?

12. Nombre las tres fases de un potencial de acción. Describa para cada una la base molecular subyacente y el ion involucrado. ¿Por qué se aplica el término *canal regulado por voltaje* a los canales del Na^+ involucrados en la generación de un potencial de acción?

13. La mielinización incrementa la velocidad de propagación del potencial de acción a lo largo del axón. ¿Qué es la mielinización? La mielinización provoca la acumulación de canales del Na^+ regulados por voltaje y de bombas de Na^+ / K^+ en los nodos de Ranvier a lo largo del axón. Explique las consecuencias del incremento del espacio entre los nodos de Ranvier en un factor de 10 para la propagación del potencial de acción.

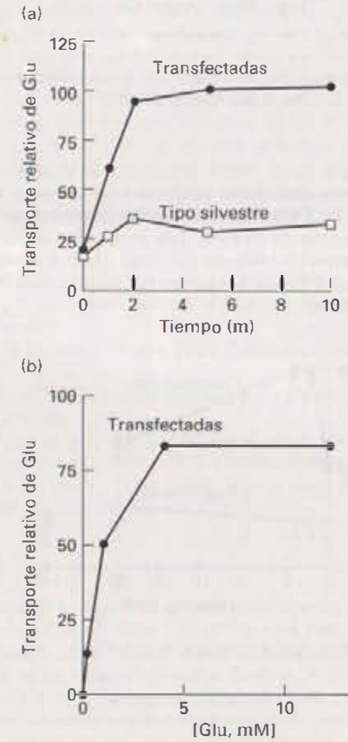
14. Compare el papel de los antiportadores ligados al H^+ en la acumulación de neurotransmisores en las vesículas sinápticas y la sacarosa en la vacuola vegetal. La acetilcolina es un neurotransmisor común liberado en la sinapsis. Explique las consecuencias para la activación de la actividad de la acetilcolina esterasa en las sinapsis entre músculo y nervio.

15. Las neuronas, sobre todo las del cerebro, reciben múltiples señales excitadoras e inhibidoras. ¿Cuál es el nombre de la extensión de la neurona en la cual se reciben esas señales? ¿Cómo integra la neurona estas señales para determinar si generar un potencial de acción o no?

ANÁLISIS DE LOS DATOS

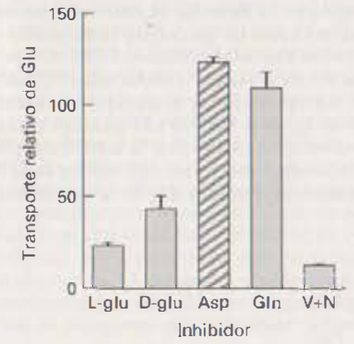
Imagine que está evaluando candidatos para el transportador de glutamato residente en la membrana de vesículas sinápticas del cerebro. El glutamato es un neurotransmisor importante. Usted conduce una búsqueda minuciosa de bases de datos de proteínas y bibliografía y encuentra que la proteína EAT-4 de *Caenorhabditis elegans* tiene muchas de las propiedades esperadas de un transportador de glutamato del cerebro. La proteína es presináptica en *C. elegans* y sus mutaciones están asociadas con defectos glutamatérgicos. Por comparación de secuencias, el homólogo mamífero es la BNP1. Se sabe que los transportadores de tipo I relacionados transportan aniones orgánicos.

a. Para determinar si la BNP1 media el transporte de glutamato dentro de las vesículas sinápticas, usted transfecta cDNA de BNP1 a las células PC12, que carecen de la proteína BNP1 endógena detectable. Luego prepara una población de microvesículas sinápticas tipo vesículas desde células transfectadas y no transfectadas. Las propiedades de transporte del glutamato de las vesículas aisladas se muestran en la figura en la derecha. ¿Cómo indican estos resultados la incorporación de glutamato dependiente de transportadores en las vesículas celulares PC12 de tipo silvestre transfectadas frente a las no transfectadas? ¿Cuál es la K_m aparente del transportador de glutamato? Los textos informan valores de K_m de ~ 10-100 μM para los transportadores de aminoácidos excitadores de la membrana plasmática. ¿Es la K_m observada comparable con la idea de la BNP1 como transportador de aminoácidos de la membrana plasmática?



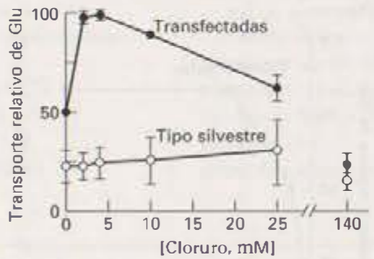
Efecto de la transfección de BNP1 sobre la captación de glutamato por vesículas de la célula PC12.

b. Usted luego decide evaluar la especificidad de la BNP1 para aminoácidos individuales y si la captación de glutamato es dependiente o no del gradiente eléctrico predicho. Para estos experimentos, se monta una serie de mezclas de incubación con diversos aminoácidos como competidores y separadamente una mezcla con valinomicina (V) y nigericina (N) para disipar selectivamente el gradiente eléctrico. Basado en los datos mostrados en la siguiente figura, el transportador dependiente de BNP1, ¿presenta las propiedades esperadas? ¿Por qué los aminoácidos elegidos son las elecciones lógicas para competidores potenciales?



Efecto de los aminoácidos competidores y valinomicina más nigericina (V + N) sobre el transporte por BNP1.

c. Como prueba final, usted determina la dependencia de BNP1 sobre la concentración de cloruro. Se sabe que el transporte vesicular de glutamato exhibe una dependencia bifásica de la concentración de cloruro. Los resultados de su experimento se muestran en la figura de abajo. ¿Indican estos datos una dependencia bifásica de cloruro? ¿Cómo podría explicarse tal dependencia?



Dependencia de cloruro del transporte por BNP1.

d. Usted concluye, a partir de los datos, que la BNP1 es la transportadora de glutamato de la vesícula sináptica. ¿Cómo podría probar, en las células PC12, si las mutaciones modeladas en la proteína EAT-4 de *C. elegans* fueron importantes en la proteína de mamífero?

BIBLIOGRAFÍA

Panorama general del transporte de membrana

Hruz, P. W., and M. M. Mueckler. 2001. Structural analysis of the GLUT1 facilitative glucose transporter (review). Mol. Memb. Biol. 18:183-193.

Malandro, M., and M. Kilberg. 1996. Molecular biology of mammalian amino acid transporters. Ann. Rev. Biochem. 66:305-336.

Mueckler, M. 1994. Facilitative glucose transporters. Eur. J Biochem. 219:713-725.

Bombas impulsadas por ATP y el ambiente iónico intracelular

Borst, P., N. Zelcer, and A. van Helvoort. 2000. ABC transporters in lipid transport. Biochim. Biophys. Acta 1486:128-144.

Carafoli, E., and M. Brini. 2000. Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. Curr. Opin. Chem. Biol. 4:152-161.

Davies, J., F. Chen, and Y. Ioannou. 2000. Transmembrane molecular pump activity of Niemann-Pick C1 protein. Science 290:2295-2298.

Doige, C. A., and G. F. Ames. 1993. ATP-dependent transport systems in bacteria and humans: relevance to cystic fibrosis and multidrug resistance. Ann. Rev. Microbiol. 47:291-319.

Gottesman, M. M. 2002. Mechanisms of cancer drug resistance. Ann. Rev Med. 53:615-627.

Gottesman, M. M., and S. V. Ambudkar. 2001. Overview: ABC transporters and human disease. J. Bioenerg Biomemb. 33:453-458.

Higgins, C. F., and K. J. Linton. 2001. Structural biology. The xyz of ABC transporters. Science 293:1782-1784.

Holmgren, M., et al. 2000. Three distinct and sequential steps in the release of sodium ions by the Na^+/K^+-ATPase. Nature 403:898-901.

Jencks, W. P. 1995. The mechanism of coupling chemical and physical reactions by the calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum and other coupled vectorial systems. Biosci. Rept. 15:283-287.

Nishi, T., and M. Forgac. 2002. The vacuolar (H^+)-ATPases—nature's most versatile proton pumps. Nature. Rev. Mol. Cell Biol. 3:94-103.

Ostedgaard, L. S., O. Baldursson, and M. J. Welsh. 2001. Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl channel by its R domain. J. Biol. Chem. 276:7689-7692.

Raggers, R. J., et al. 2000. Lipid traffic: the ABC of transbilayer movement. Traffic 1:226-234.

Rea, P. A., et al. 1992. Vacuolar H^+-translocating pyrophosphatases: a new category of ion translocase. Trends Biochem. Sci 17:348-353.

Sweadner, K. J., and C. Donnet. 2001. Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca(2+)-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. Biochem. J. 356:685-704.

Toyoshima, C., M. Nakasako, H. Nomuta, and H. Ogawa. 2000. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. Nature 405:647-655.

Xu, C., W, J. Rice, W. He, and D. L. Stokes. 2002. A structural model for the catalytic cycle of Ca(2+)-ATPase. J. Mol. Biol. 316: 201-211.

Canales iónicos no regulados y potencial de membrana en reposo

Clapham, D. 1999. Unlocking family secrets: K^+ chanel transmembrane domains. Cell 97:547-550.

Cooper, E. C., and L. Y. Jan. 1999. Ion channel genes and human neurological disease: recent progress, prospects, and challenge Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 96:4759-4766.

Dutzler R., et al. 2002. X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. Nature 415:287-294.

Gulbis, J. M., M. Zhou, S. Mann, and R. MacKinnon. 2000. Structure of the cytoplasmic beta subunit-T1 assembly of voltage-dependent K^+ channels. Science 289:123-127.

Hanaoka, K., et al. 2000. Co-assembly of polycystin-1 and –2 produces unique cation-permeable currents. Nature 408:990-994.

Hille, B. 2001. Ion Channels of Excitable Membranes, 3d ed. Sinauer Associates.

Montell, C., L. Birnbaumer, and V. Flockerzi. 2002. The TRP channels, a remarkably functional family. Cell 108:595-598.

Neher E. 1992. Ion channels for communication between and within cells. Nobel Lecture reprinted in Neuron 8:605-612 and Science 256:498-502.

Neher, E., and B. Sakmann. 1992. The patch clamp technique. Sci. Am. 266(3):28-35.

Nichols, C., and A. Lopatin. 1997. Inward rectifier potassium channels. Ann. Rev Physiol. 59:171-192.

Yi, B. A., et al. 2001. Controlling potassium channel activities: interplay between the membrane and intracellular factors. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 98:11016-11023.

Zhou, M., J. H. Morais-Cabral, S. Mann, and R. MacKinnon. 2001. Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. Nature 411:657-661.

Zhou, Y., J. Morais-Cabral, A. Kaufman, and R. MacKinnon. 2001. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K^+ channel-Fab complex at 2 Å resolution. Nature 414:43-48.

Cotransporte mediante simportadores y antiportadores

Alper, S. L., M. N. Chernova, and A. K. Stewart. 2001. Regulation of Na^+-independent Cl^-/HCO^- exchangers by pH. J. Pancreas 2:171-175.

Barkla, B., and O. Pantoja. 1996. Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. Ann. Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47:159-184.

Orłowski, J., and S. Grinstein. 1997. Na^+/H^+ exchangers of mammalian cells. J. Biol. Chem. 272:22373-22376.

Shrode, L. D., H. Tapper, and S. Grinstein. 1997. Role of intracellular pH in proliferation, transformation, and apoptosis. J. Bioenerg. Biomemb. 29:393-399.

Wakabayashi, S., M. Shigekawa, and J. Pouyssegur. 1997. Molecular physiology of vertebrate Na^+/H^+ exchangers. Physiol. Rev 77:51-74.

Wright, E. M. 2001. Renal Na(+)-glucose cotransporters. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 280:F10-F18.

Wright, E. M., and D. D. Loo. 2000. Coupling between Na^+, sugar, and water transport across the intestine. Ann. NY Acad. Sci. 915:54-66.

Zhang, H-X., and E. Blumwald. 2001. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. Nature Biotech. 19:765-769.

Movimientos del agua

Agre, P., M. Bonhivers, and M. Borgina. 1998. The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems. J. Biol. Chem. 273:14659.

Engel, A., Y. Fujiyoshi, and P. Agre. 2000. The importance of aquaporin water channel protein structures. EMBO J. 19:800-806.

Maurel, C. 1997. Aquaporins and water permeability of plant membranes. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:399-430.

Nielsen, S., et al. 2002. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. Physiol. Rev 82:205-244.

Schultz, S. G. 2001. Epithelial water absorption: osmosis orcotransport? Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 98:3628-3630.

Sui, H., et al. 2001. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. Nature 414:872-878.

Verkman, A. S. 2000. Physiological importance of aquaporins: lessons from knockout mice. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 9:517-522.

Transporte transepitelial

Cereijido, M., J. Valdés, L. Shoshani, and R. Conteras. 1998. Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity. Ann. Rev. Physiol. 60:161-177.

Goodenough, D. A. 1999. Plugging the leaks. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 96:319.

Mitic, L., and J. Anderson. 1998. Molecular architecture of tight junctions. Ann. Rev Physiol. 60:121-142.

Schultz, S., et al., eds. 1997. Molecular Biology of Membrane Transport Disorders. Plenum Press.

Canales iónicos regulados por voltaje y propagación de potenciales de acción en las células nerviosas

Aldrich, R. W. 2001. Fifty years of inactivation. Nature 411:643-644.

Armstrong, C., and B. Hille. 1998. Voltage-gated ion channels and electrical excitability. Neuron 20:371-380.

Catterall, W. A. 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. Neuron 26:13-25.

Catterall, W. A. 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. Ann. Rev. Cell Dev Biol: 16:521-555.

Catterall, W. A. 2001. A 3D view of sodium channels. Nature 409:988-989.

del Camino, D., and G. Yellen. 2001. Tight steric closure at the intracellular activation gate of a voltage-gated K(+) channel. Neuron 32:649-656.

Doyle, D. A., et al. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity. Science 280:69-77.

Hille, B. 2001. Ion Channels of Excitable Membranes, 3d ed. Sinauer Associates.

Jan, Y. N., and L. Y. Jan. 2001. Dendrites. Genes Dev 15:2627-2641.

Miller, C. 2000. Ion channel surprises: prokaryotes do it again! Neuron 25:7-9.

Sato, C., et al. 2001. The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities. Nature 409:1047-1051.

Yi, B. A., and L. Y. Jan. 2000. Taking apart the gating of voltage-gated K^+ channels. Neuron 27:423-425.

Mielina

Arroyo, E. J., and S. S. Scherer. 2000. On the molecular architecture of myelinated fibers. Histochem. Cell Biol. 113:1-18.

Pedraza, L., J. K. Huang, and D. R. Colman. 2001. Organizing principles of the axoglial apparatus. Neuron 30:335-344.

Salzer J. L. 1997. Clustering sodium channels at the node of Ranvier: close encounters of the axon-glia kind. Neuron 18:843-846.

Trapp, B. D., and G. J. Kidd. 2000. Axo-glial septate junctions. The maestro of nodal formation and myelination? J- Cell Biol. 150:F97-F100.

Neurotransmisores receptores y proteínas transportadoras en la transmisión de señales en las sinapsis

Amara, S. G., and M. J. KuhaL 1993. Neurotransinitter transporters: recent progress. Ann. Rev. Neurosci. 16:73-93.

Bajjalieh S. M., and R. H. Scheller. 1995. The biochemistry of neurotransmitter secretion. J. Biol. Chem. 270:1971-1974.

Betz, W., and J. Angleson. 1998. The synaptic vesicle cycle. Ann. Rev Physiol. 60:347-364.

Brejc, K., et al. 2001. Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. Nature 411:269-276.

Fernandez, J. M. 1997. Cellular and molecular mechanics by atomic force microscopy: capturing the exocytotic fusion pore in vivo? Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 94:9-10.

Ikeda, S. R. 2001. Signal transduction. Calcium channels—link locally, act globally. Science 294:318-319.

Jan, L. Y., and C. F. Stevens. 2000. Signaling mechanisms: a decade of signaling. Curr. Opin. Neurobiol. 10:625-630.

Karlin, A.2002. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. Nature Rev. Neurosci. 3:102-114.

Kavanaugh, M. P. 1998. Neurotransmitter transport: models in flux. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 95:12737-12738.

Lin, R. C., and R. H. Scheller. 2000. Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 16:19-49.

Neher, E. 1998. Vesicle pools and Ca^{2+} microdo-mains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. Neuron 20:389-399.

Reith, M., ed. 1997. Neurotransmitter Transporters: Structure Function, and Regulation. Humana Press.

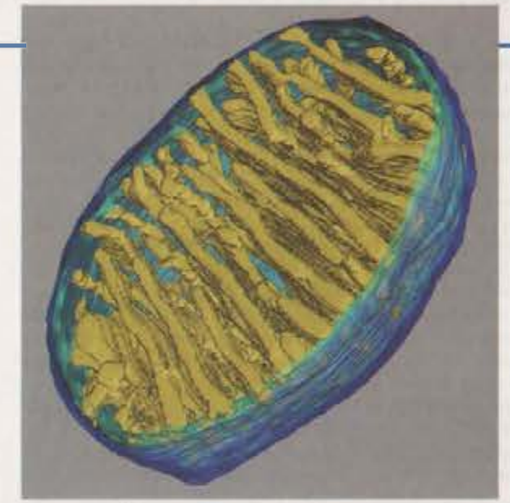
Sakmann, B. 1992. Elementary steps in synaptic transmission revealed by currents through single ion channels. Nobel Lecture reprinted in EMBO J. 11:2002-2016 and Science 256:503-512.

Sudhof, T. C. 1995. The synaptic vesicle cycle: a cascade o protein-protein interactions. Nature 375:645-653.

Usdin, T. B., L. E. Eiden, T. I. Bonner, and J. D. Erickson. 1995. Molecular biology of the vesicular ACh transporter. Trends Neurosci 18:218-224.

8

ENERGÉTICA CELULAR



Modelo generado por computadora de una sección de una mitocondria del cerebro de pollo, basado en un tomograma electrónico tridimensional. (T. Frey y C. Mannella, 2000, Trends Biochem. Sci. 25:319.)

La molécula más importante para capturar y transferir la energía libre en los sistemas biológicos es el adenosintrifosfato o ATP (véase fig. 2-24). Las células utilizan la energía liberada durante la hidrólisis del enlace fosfoanhidrido terminal de "alta energía" del ATP para impulsar muchos procesos energéticamente desfavorables. Los ejemplos incluyen la síntesis de proteínas a partir de aminoácidos y ácidos nucleicos a partir de nucleótidos (cap. 4), el transporte de moléculas contra un gradiente de concentración mediante bombas impulsadas por ATP (cap. 7), la contracción del músculo (cap. 19) y el movimiento (agitación) de cilios (cap. 20). Aunque en las células aparecen otras moléculas de alta energía, el ATP es la "moneda" universal de la energía química; se encuentra en organismos de todos los tipos y debe de haber existido en las primeras formas de vida.

Este capítulo se centra en cómo las células generan el enlace fosfoanhidrido de alta energía del ATP a partir del ADP y del fosfato inorgánico (HPO_4^{2-}). Esta reacción endergónica, que es la inversa de la hidrólisis de ATP y requiere una aporte de 7,3 kcal/mol para proceder, puede escribirse como

$$P_i^{2-} + H^+ + ADP^{3-} \longrightarrow ATP^{4-} + H_2O$$

donde P_i^{2-} representa el fosfato inorgánico (HPO_4^{2-}). La energía para propulsar esta reacción es producida principalmente mediante dos procesos: la oxidación acrobia, que tiene lugar en casi todas las células, y la fotosíntesis, que sólo se realiza en las células de las hojas de las plantas y de ciertos organismos unicelulares.

En la oxidación aerobia, los ácidos grasos y los azúcares, sobre todo la glucosa, se metabolizan a dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O), y la energía liberada se convierte en la energía química de los enlaces fosfoanhidridos en el ATP. En las células animales y en la mayoría de otras células no fotosintéticas, el ATP se genera principalmente por estos procesos. El paso inicial de la oxidación de la glucosa, llamada glucólisis, tiene lugar en el citosol tanto en eucariontes como en procariontes y no requiere oxígeno (O_2). Los pasos finales, que requieren oxígeno, generan la mayor parte del ATP. En los eucariontes, estas últimas etapas de la oxidación aerobia se producen en la mitocondria; en los procariontes, que contienen sólo una membrana plasmática y carecen de orgánulos internos, muchos de los pasos finales se realizan sobre la membrana plasmática. Las etapas finales del metabolismo de los ácidos grasos a veces ocurren en la mitrocondria y generan ATP; sin embargo, en la mayoría de las células eucariontes los ácidos grasos son metabolizados a CO_2 y H_2O en los perixosomas sin producción de ATP.

En la fotosíntesis, la energía de la luz es convertida en energía química de los enlaces fosfoanhidridos del ATP y almacenada en los enlaces químicos de los carbohidratos (sobre todo sacarosa y almidón). Durante la fotosíntesis

CONTENIDO

8.1 Oxidación de la glucosa y de los ácidos grasos a CO_2
8.2 Transporte de electrones y generación de la fuerza protón-motriz
8.3 Generación de la fuerza protón-motriz para procesos que requieren energía
8.4 Etapas de la fotosíntesis y pigmentos que absorben luz
8.5 Análisis molecular de los fotosistemas
8.6 Metabolismo del CO_2 durante la fotosíntesis

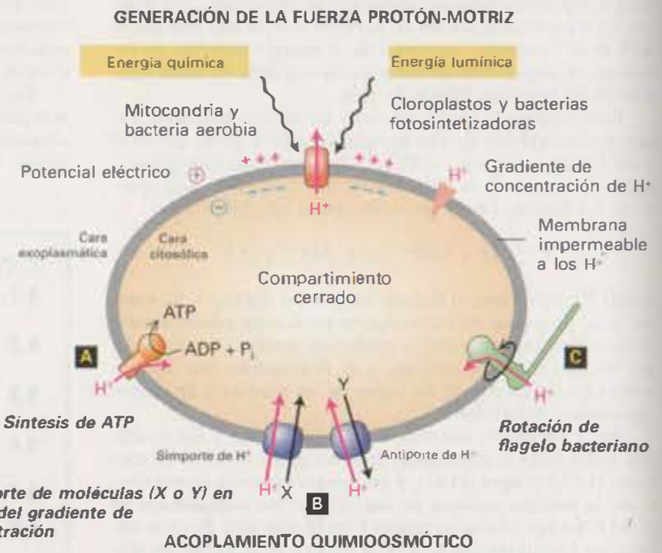
también se forma oxígeno. En las plantas y las algas unicelulares eucariontes, la fotosíntesis tiene lugar en los cloroplastos. Diversos procariontes también realizan la fotosíntesis sobre sus membranas plasmáticas o sus invaginaciones por un mecanismo similar al de los cloroplastos. El oxígeno generado durante la fotosíntesis es la fuente de casi todo el oxígeno del aire y los carbohidratos producidos son las fuentes esenciales de energía para casi todos los organismos no fotosintéticos. Las bacterias que viven en los respiraderos del océano profundo, donde no hay luz solar, refutan la idea popular de que ésta es la fuente de energía esencial para todos los organismos de la Tierra. Estas bacterias obtienen energía para convertir dióxido de carbono en carbohidratos y otros constituyentes celulares mediante oxidación de compuestos inorgánicos reducidos disueltos en los respiraderos de gas.

A primera vista, la fotosíntesis y la oxidación acrobia parecen tener poco en común. Sin embargo, un descubrimiento revolucionario de la biología celular es que las bacterias, las mitocondrias y los cloroplastos utilizan el mismo mecanismo básico, llamado quimioósmosis (o acoplamiento quimioosmótico), para generar ATP a partir de ADP y P_i. En la quimioósmosis, un gradiente de concentración de protones (H^+) y un potencial eléctrico (gradiente de voltaje) a través de la membrana, denominado en conjunto **fuerza protón-motriz**, conduce un proceso que requiere energía, como la síntesis de ATP (fig. 8-1, *abajo*).

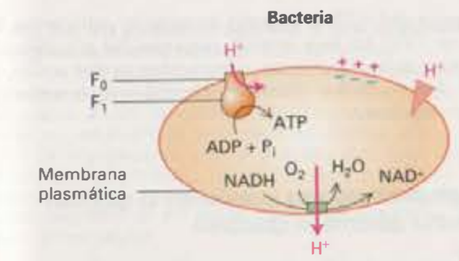
La quimioósmosis puede tener lugar sólo en compartimientos limitados por membrana que son impermeables a los H^+. La fuerza protón-motriz es generada por el movimiento gradual de electrones de los estados altos de energía a los estados bajos de energía a través de transportadores de electrones unidos a la membrana. En la mitocondria y en las células bacterianas no fotosintéticas, los electrones del NADH (producido durante el metabolismo de azúcares, ácidos grasos y otras sustancias) son transferidos al O_2, el principal aceptor de electrones. En la membrana tilacoidea de los cloroplastos, la energía absorbida de la luz arranca los electrones del agua (con formación de O_2) y potencia sus movimientos a otros transportadores de electrones, en especial el $NADP^+$; finalmente estos electrones son donados al CO_2 para sintetizar carbohidratos. Sin embargo, todos estos sistemas contienen algunos transportadores similares que acoplan el transporte de electrones al bombeo de protones a través de la membrana –siempre desde la cara citosólica a la cara exoplasmática– y generan, por lo tanto, la fuerza protón-motriz (fig. 8-1, *arriba*). Invariablemente, la cara citosólica tiene un potencial eléctrico negativo relativo a la cara exoplasmática.

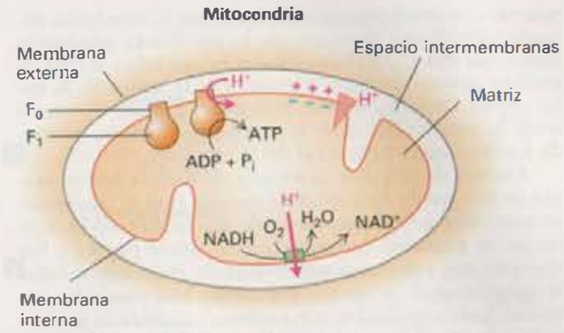
Por otra parte, las mitocondrias, los cloroplastos y las bacterias utilizan en esencia el mismo tipo de proteína de membrana, el complejo F_0F_1, para sintetizar ATP. El complejo F_0F_1, ahora denominado ATP sintasa, es un miembro de la clase F de bombas de protones impulsadas por ATP (véase fig. 7-6). En todos los casos, la ATP sintasa se ubica con el dominio globular F_1, que cataliza la síntesis de ATP, sobre la cara citosólica de la membrana (fig. 8-2). Los protones siempre fluyen a través de la ATP sintasa desde la cara exoplasmática de la membrana hacia la citosólica, impulsados por una combinación entre el gradiente de concentración de protones ($[H^+]_{exoplasmática} > [H^+]_{citosólica}$) y el potencial eléctrico de membrana (cara exoplasmática positiva con respecto a la cara citosólica).

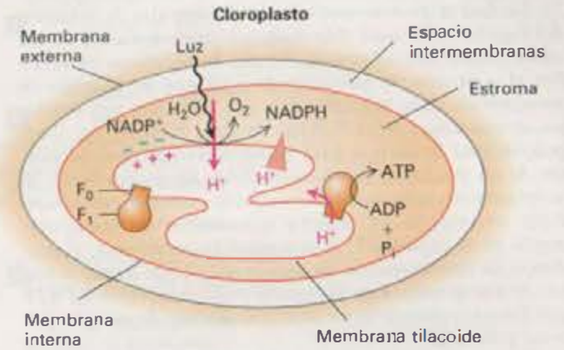
Estas similitudes entre las mitocondrias, los cloroplastos y las bacterias tienen sin duda un origen evolutivo. En las bacterias tanto la fotosíntesis como la fosforilación oxidativa ocurren en la membrana plasmática. Los análisis de las secuencias y la transcripción del DNA mitocondrial y de los cloroplastos (caps. 10 y 11) han dado origen a la hipótesis popular de que estos orgánulos surgieron al principio de la evolución de las células eucariontes por endocitosis de bacterias capaces de efectuar la fosforilación oxidativa o la fotosíntesis, respectivamente (fig. 8-3). De



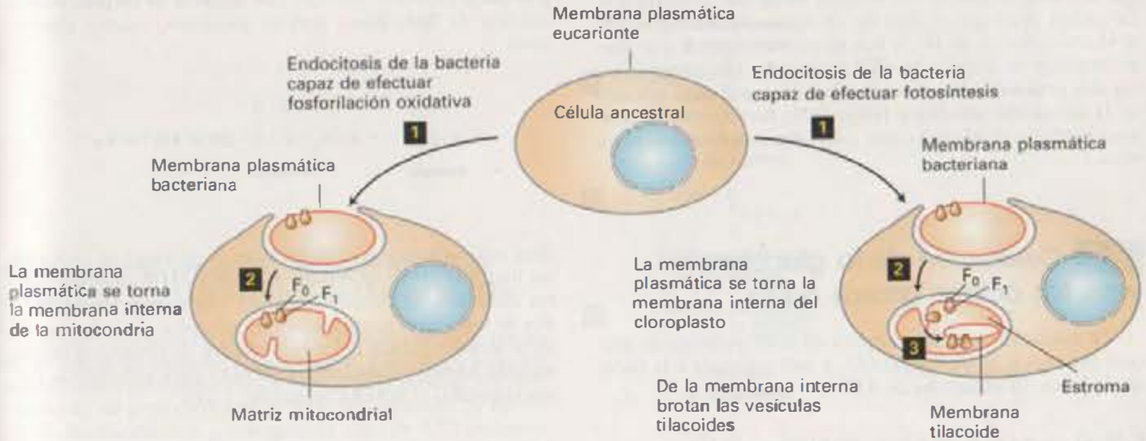
▶ Fig. 8-1. Vista general de la generación y utilización de la fuerza protón-motriz. Se genera un gradiente de concentración de protones y un gradiente de voltaje transmembrana, denominados en conjunto *fuerza protón-motriz*, durante la fotosíntesis y la oxidación aerobia de componentes de carbono en la mitocondria y en las bacterias aerobias. En el acoplamiento quimioosmótico, la fuerza protón-motriz impulsa procesos que requieren energía, como la síntesis de ATP (A), el transporte de metabolitos a través de la membrana en contra de su gradiente de concentración (B) o la rotación de flagelos bactenanos (C).







▲ Fig. 8-2. Orientación de la membrana y dirección del movimiento de protones durante la síntesis de ATP acoplada quimioosmóticamente en bacterias, mitocondrias y cloroplastos. La superficie de la membrana que mira hacia el área sombreada es la cara citosólica: la superficie que mira hacia un área no sombreada es la cara exoplasmática. Nótese que la cara citosólica de la membrana plasmática bacteriana, la cara matricial de la membrana mitocondrial interna y la cara estromal de la membrana tilacoide son equivalentes. Durante el transporte de electrones, los protones siempre son bombeados desde la cara citosólica a la cara exoplasmática, creando un gradiente de concentración de protones (cara exoplasmática > cara citosólica) y un potencial eléctrico (cara citosólica negativa y cara exoplasmática positiva) a través de la membrana. Durante la síntesis acoplada de ATP, los protones fluyen en la dirección inversa (a favor de su gradiente electroquímico) a través de la ATP sintasa (complejo F_0F_1), los cuales sobresalen de la cara citosólica en todos los casos.



▲ Fig. 8-3. Origen evolutivo de la mitocondria y los cloroplastos de acuerdo con la hipótesis endosimbiótica. Las superficies de la membrana que enfrentan el área sombreada son caras citosólicas; las superficies de la membrana que enfrentan el área no sombreada son caras exoplasmáticas. La endocitosis de una bacteria por una célula eucarionte ancestral generaría un orgánulo con dos membranas: la externa derivada de la membrana plasmática eucarionte y la interna de la membrana bacteriana. La subunidad F_1 de la ATP sintasa, localizada en la cara citosólica de la membrana bacteriana, se orientaría luego hacia la matriz de la mitocondria *(izquierda)* o el cloroplasto en evolución *(derecha)*. La brotación de vesículas desde la membrana plasmática interna del cloroplasto, tal y como sucede durante el desarrollo de los cloroplastos en las plantas contemporáneas, generaría las vesículas tilacoides con la subunidad F_1 que permanece sobre la cara citosólica, orientada hacia la estroma del cloroplasto.

acuerdo con esta *hipótesis endosimbionte*, la membrana mitocondrial interna derivaría de la membrana plasmática bacteriana con el dominio globular F_1 aun sobre la cara citosólica apuntando hacia el espacio de la matriz de la mitocondria. En forma similar, el dominio globular F_1 estaría sobre la cara citosólica de la membrana tilacoide orientada hacia el espacio estromal del cloroplasto.

Además de impulsar la síntesis de ATP, la fuerza protón-motriz puede proporcionar energía para el transporte de moléculas pequeñas a través de una membrana en contra de un gradiente de concentración (véase fig. 8-1). Por ejemplo, una proteína simportadora de H^+/azúcar cataliza la incorporación de lactosa por ciertas bacterias y los antiportadores impulsados por protones catalizan la acumulación de iones y sacarosa por las vacuolas vegetales (cap. 7). La fuerza protón-motriz también impulsa la rotación del flagelo bacteriano. (Sin embargo, el movimiento de los cilios eucariontes es impulsado por la hidrólisis de ATP.) Por el contrario, la hidrólisis de ATP por las bombas de protones de clase V impulsadas por ATP, que son similares en estructura a las bombas de clase F (véase fig. 7-6), proporciona la energía para transportar protones en contra de un gradiente de concentración. De esta manera, el acoplamiento quimioosmótico ilustra un importante principio introducido en nuestro tratamiento del transporte activo en el capítulo 7: *el potencial de membrana, el gradiente de concentración de protones (y otros iones) a través de una membrana y los enlaces fosfoanhidridos del ATP son formas equivalentes e interconvertibles de energía química potencial.*

En esta breve introducción, hemos visto que durante la fotosíntesis se produce oxígeno y carbohidratos, mientras que durante la oxidación aerobia éstos son consumidos. En ambos procesos, el flujo de electrones crea un gradiente electroquímico de H^+, o fuerza protón-motriz, que puede impulsar la síntesis de ATP. Conforme examinamos estos dos procesos a nivel molecular, centrándonos primero en la oxidación aerobia y luego en la fotosíntesis, se tornará evidente el sorprendente paralelismo que existe entre ellos.

8.1 Oxidación de la glucosa y de los ácidos grasos a CO_2

La oxidación aerobia completa de cada molécula de glucosa produce 6 moléculas de $C\bullet_2$ y está acoplada a la síntesis de hasta 30 moléculas de ATP:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 + 30\,P_i^{2-} + 30\,ADP^{3-} + 30\,H^+ \longrightarrow 6\,CO_2 + 30\,ATP^{4-} + 36\,H_2O$$

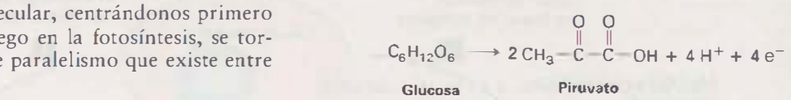
La glucólisis, el paso inicial del metabolismo de la glucosa, tiene lugar en el citosol y no involucra O_2 molecular. Ésta produce una cantidad pequeña de ATP y el componente de tres carbonos llamado *piruvato*. En las células aerobias, el piruvato formado en la glucólisis es transportado hacia el interior de la mitocondria, donde es oxidado por el O_2 hasta formar CO_2. A través del acoplamiento quimíoosmótico, la oxidación del piruvato en la mitocondria genera la mayor parte del ATP producido durante la conversión de glucosa en CO_2. En esta sección, tratamos las vías bioquímicas que oxidan la glucosa y los ácidos grasos a $C\bullet_2$ y H_2O; el destino de los electrones liberados se describe en la sección siguiente.

Las enzimas citosólicas convierten la glucosa en piruvato durante la glucólisis

Un conjunto de 10 enzimas citosólicas solubles en agua catalizan las reacciones que constituyen la *vía glucolítica*, en la cual una molécula de glucosa es convertida en dos moléculas de piruvato (fig. 8-4). Todos los intermediarios metabólicos entre la glucosa y el piruvato son componentes fosforilados solubles en agua.

Durante la glucólisis se forman cuatro moléculas de ATP a partir del ADP por medio de la **fosforilación a nivel del sustrato**, la cual es catalizada por enzimas en el citosol (reacciones 7 y 10). A diferencia de la formación de ATP en las mitocondrias y los cloroplastos, en la fosforilación a nivel del sustrato no participa ninguna fuerza protón-motriz de protones. Al comienzo de la vía glucolítica, se consumen dos moléculas de ATP; una por la adición de un residuo de fosfato a la glucosa en la reacción catalizada por la *hexocinasa* (reacción 1) y otra por la adición de un segundo fosfato a la fructosa 6-fosfato en la reacción catalizada por la *fosfofructocinasa-1* (reacción 3). Por lo tanto, la glucólisis produce una ganancia neta de sólo dos moléculas de ATP por molécula de glucosa.

La ecuación química balanceada para la conversión de glucosa a piruvato muestra que también se forman cuatro átomos de hidrógeno (cuatro protones, cuatro electrones):



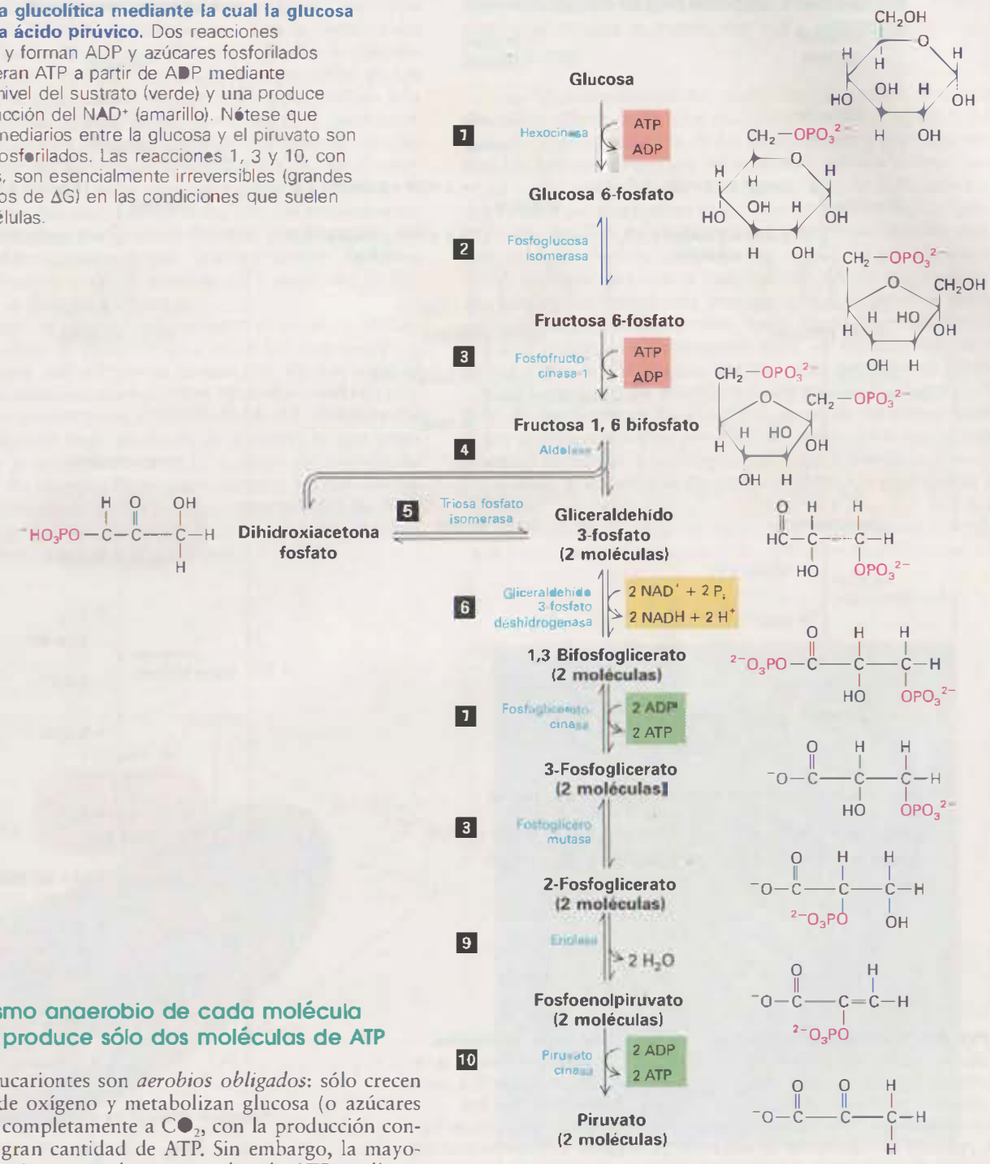
(Por conveniencia, aquí mostramos el piruvato en su forma no ionizada, ácido pirúvico, aunque a pH fisiológico estaría disociado en su mayor parte.) Los cuatro electrones y dos de los cuatro protones son transferidos a dos moléculas de la forma oxidada del transportador de electrones **nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺)** para producir la forma reducida, el **NADH** (véase fig. 2-26):

$$2\,H^+ + 4\,e^- + 2\,NA\bullet^+ \longrightarrow 2\,NADH$$

La reacción que generan estos átomos de hidrógeno y la transferencia al NAD^+ es catalizada por la *gliceraldheído-3-fosfato deshidrogenasa* (véase fig. 8-4, reacción 6). La ecuación química general para esta primera etapa del metabolismo de la glucosa es

$$C_6H_{12}O_6 + 2\,NAD^+ + 2\,ADP^{3-} + 2\,P_i^{2-} \longrightarrow 2\,C_3H_4O_3 + 2\,NADH + 2\,ATP^{4-}$$

▶ Fig. 8-4. Vía glucolítica mediante la cual la glucosa es degradada a ácido pirúvico. Dos reacciones consumen ATP y forman ADP y azúcares fosforilados (rojo); dos generan ATP a partir de ADP mediante fosforilación a nivel del sustrato (verde) y una produce NADH por reducción del NAD^+ (amarillo). Nótese que todos los intermediarios entre la glucosa y el piruvato son componentes fosforilados. Las reacciones 1, 3 y 10, con flechas simples, son esencialmente irreversibles (grandes valores negativos de ΔG) en las condiciones que suelen existir en las células.

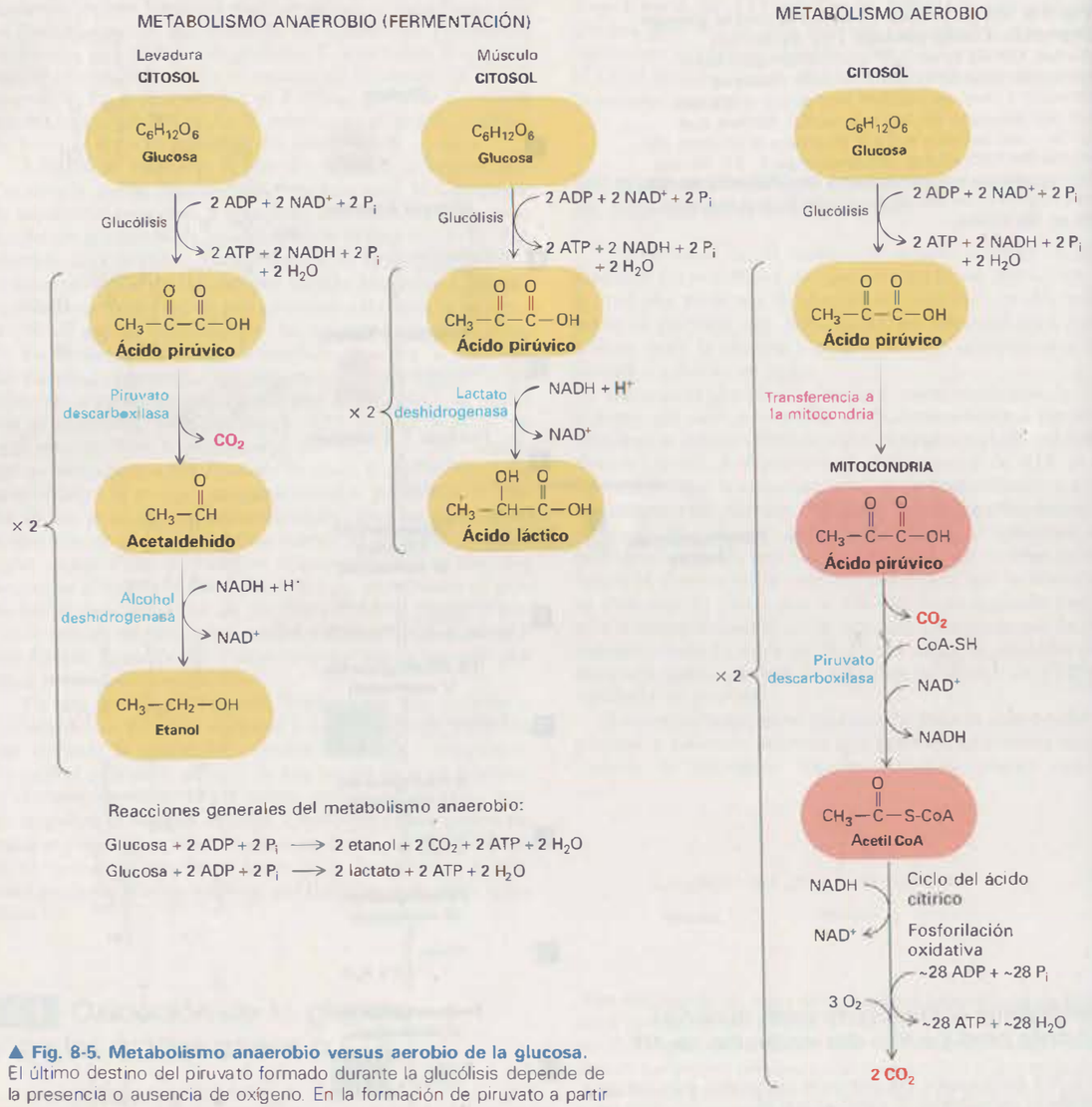


El metabolismo anaerobio de cada molécula de glucosa produce sólo dos moléculas de ATP

Muchos eucariontes son *aerobios obligados*: sólo crecen en presencia de oxígeno y metabolizan glucosa (o azúcares relacionados) completamente a $C\bullet_2$, con la producción concomitante de gran cantidad de ATP. Sin embargo, la mayoría de los eucariontes puede generar algo de ATP mediante metabolismo anaerobio. Algunos eucariontes son *anaerobios facultativos*: crecen tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Por ejemplo, los anélidos, los moluscos y algunas levaduras pueden vivir y crecer durante días sin oxígeno.

En ausencia de oxígeno, los anaerobios facultativos convierten la glucosa en uno o más componentes de dos o tres carbonos, que son casi siempre liberados al medio circundante. Por ejemplo, las levaduras degradan glucosa hasta dos moléculas de piruvato mediante la glucólisis y generan una ganancia neta de dos ATP. En este proceso se forman dos moléculas de NADH a partir de NAD^+ por molécula de glucosa. En ausencia de oxígeno, las levaduras convierten el piruvato en una molécula de etanol y una de CO_2; en estas reacciones dos moléculas de NADH son oxidadas a NAD^+ por cada dos piruvatos convertidos a etanol y regeneran así el abastecimiento de NAD^+ (fig. 8-5a, *izquierda*). Esta degradación anaerobia de la glucosa, llamada *fermentación*, es la base de la producción de cerveza y de vino.

Durante la contracción prolongada de las células musculares esqueléticas de los mamíferos, cuando el oxígeno se vuel-



Reacciones generales del metabolismo anaerobio:

Glucosa + 2 ADP + 2 P_i ⟶ 2 etanol + 2 CO_2 + 2 ATP + 2 H_2O

Glucosa + 2 ADP + 2 P_i ⟶ 2 lactato + 2 ATP + 2 H_2O

Reacción general de metabolismo aerobio:

Glucosa + 6 O_2 + ~30 ADP + ~30 P_i ⟶ 6 CO_2 + 36 H_2O + ~30 ATP

▲ Fig. 8-5. Metabolismo anaerobio versus aerobio de la glucosa. El último destino del piruvato formado durante la glucólisis depende de la presencia o ausencia de oxígeno. En la formación de piruvato a partir de glucosa, se reduce una molécula de NAD^+ (por adición de dos electrones) a NADH por cada molécula de piruvato formado (véase fig. 8-4, reacción 6). (*Izquierda*) En ausencia de oxígeno, dos electrones son transferidos desde cada molécula de NADH a una molécula aceptora para regenerar el NAD^+, el cual es requerido para la continuación de la glucólisis. En las levaduras, el acetaldehído es el aceptor y el etanol el producto. Este proceso se denomina *fermentación alcohólica*. Cuando el oxígeno es limitado en las células musculares, el NADH reduce el piruvato para formar ácido láctico, regenerando el NAD^+. (*Derecha*) En presencia de oxígeno, el piruvato es transportado a la mitocondria. Primero es convertido por la piruvato deshidrogenasa a una molécula de CO_2 y una de ácido acético; este último se une a la coenzima A (CoA-SH) para formar acetil CoA, concomitante con la reducción de una molécula de NAD^+ a NADH. El metabolismo posterior del acetil CoA y el NADH genera aproximadamente 28 moléculas adicionales de ATP por molécula de glucosa oxidada.

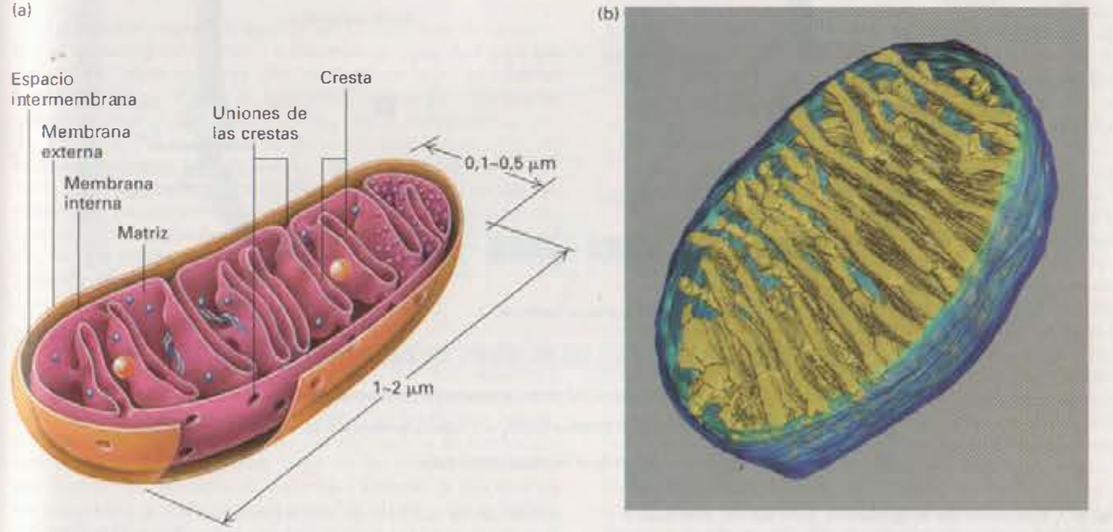
ve limitado, las células musculares fermentan la glucosa a dos moléculas de ácido láctico; nuevamente con la producción neta de sólo dos moléculas de ATP por molécula de glucosa (fig. 8-5a, *derecha*). El ácido láctico, que causa dolor en los músculos y las articulaciones, se secreta en gran medida a la sangre, algo pasa al hígado, donde es reoxidado a piruvato y luego metabolizado a CO_2 aeróbicamente o convertido en glucosa. Gran parte del lactato se metaboliza a CO_2 en el corazón, que tiene gran perfusión sanguínea y puede continuar el metabolismo aerobio en momentos en que los músculos esqueléticos en ejercitación secretan lactato. Las bacterias del ácido láctico (los organismos que "echan a perder" la leche) y otras procariontes también generan ATP mediante la fermentación de la glucosa a lactato.

Sin embargo, en presencia de oxígeno el piruvato formado en la glucólisis es transportado hacia las mitocondrias, donde es oxidado por el O_2 para formar CO_2 en una serie de reacciones de oxidación denominadas **respiración celular** (fig. 8-5b). Estas reacciones generan alrededor de 28 moléculas de ATP adicionales por cada molécula de glucosa, lo que supera por mucho la producción de ATP a partir del metabolismo anaerobio de glucosa. Para comprender el funcionamiento de las mitocondrias como fábricas generadoras de ATP, describiremos primero sus estructuras y luego las reacciones que emplean para degradar el piruvato.

Las mitocondrias poseen dos membranas distintas desde el punto de vista estructural y funcional

Las mitocondrias están entre los orgánulos más grandes de la célula, cada una del tamaño similar al de la bacteria *E. coli*. La mayoría de las células eucariontes contienen muchas mitocondrias, que en conjunto pueden ocupar hasta el 25% del volumen del citoplasma. Son lo suficientemente grandes para ser observadas con un microscopio óptico, pero los detalles de su estructura pueden verse sólo con el microscopio electrónico (véase fig. 5-26). La membrana externa define el perímetro exterior liso de las mitocondrias. En cambio, la membrana interna posee numerosas invaginaciones denominadas *crestas*. Estas membranas definen dos compartimientos submitocondriales: el *espacio intermembrana* entre la membrana externa y la membrana interna con sus crestas, y la *matriz*, o compartimiento central (fig. 8-6). El fraccionamiento y la purificación de estas membranas y los compartimientos permitieron determinar sus composiciones proteicas y fosfolipídicas y localizar cada reacción catalizada por enzimas en una membrana o un espacio específico.

La membrana externa contiene *porinas* mitocondriales, una proteína canal transmembrana similar en estructura a las

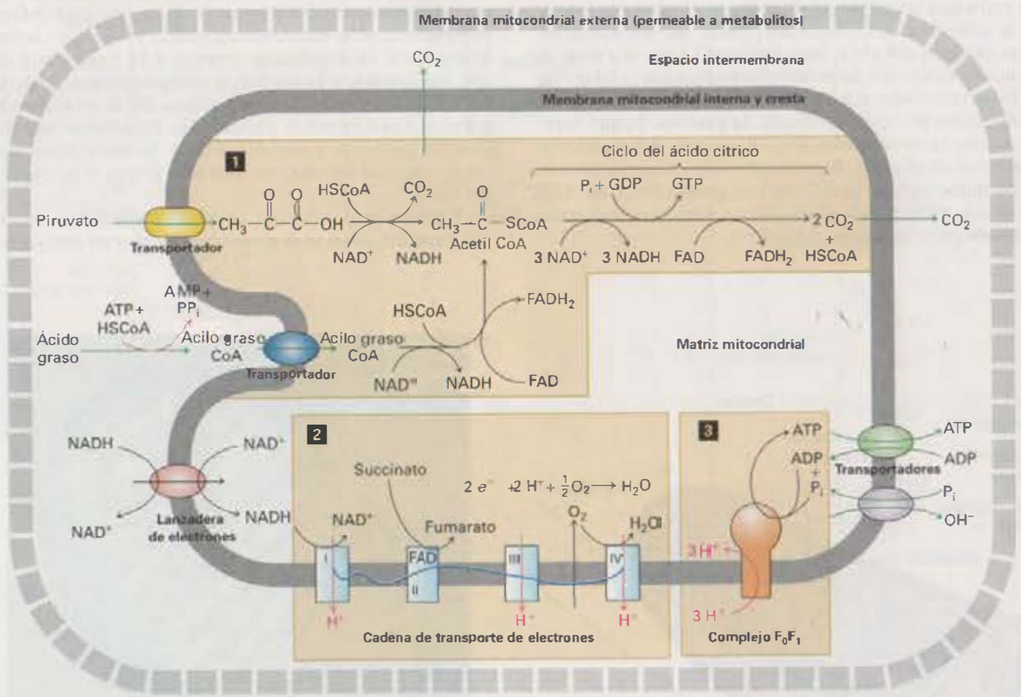


▲ Fig. 8-6. Estructura interna de una mitocondria. (a) Esquema que muestra las principales membranas y compartimientos. Las crestas forman láminas y tubos por invaginación de la membrana interna y se conectan a la membrana interna a través de estructuras tubulares uniformes relativamente pequeñas llamadas *uniones de las crestas*. El espacio intermembrana parece continuo con el lumen de cada cresta. Los complejos F_0F_1 (esferas pequeñas rojas), que sintetizan ATP, son partículas intramembrana que protruyen desde la cresta y la membrana interna hacia la matriz. La matriz contiene DNA mitocondrial (hebra azul), ribosomas (esferas azules pequeñas) y gránulos (esferas amarillas grandes). (b) Modelo generado por computadora de una sección de una mitocondria del cerebro de pollo. Este modelo está basado en una tomografía tridimensional electrónica calculada a partir de una serie de microfotografías electrónicas bidimensionales registradas a intervalos angulares regulares. Esta técnica es análoga a una tomografía tridimensional de rayos X o escaneo CAT. Nótense las crestas fuertemente apiñadas (amarillo-verdosas), la membrana interna (celeste) y la membrana externa (azul oscuro). [Parte (a) cortesía de T. Frey; parte (b) de T. Frey y C. Mannella, 2000, Trends Biochem. Sci. 25:319.]

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Mitocondria reconstruida por tomografía electrónica

porinas bacterianas (véase fig. 5-14). Los iones y la mayoría de las moléculas pequeñas (hasta unos 5000 Da) pueden pasar rápidamente a través de estos canales proteicos. Aunque el flujo de metabolitos a través de la membrana externa puede limitar la velocidad de oxidación mitocondrial, la membrana interna y las crestas son las principales barreras de permeabilidad entre el citosol y la matriz mitocondrial.

Los estudios de congelación y fractura indican que las crestas mitocondriales contienen muchas partículas intramembrana ricas en proteínas. Algunas son los complejos F_0F_1 que sintetizan ATP; otras cumplen funciones en el transporte de electrones hacia el O_2 desde el NADH u otros transportadores de electrones. Diversas proteínas transportadoras localizadas en su membrana interna y en las crestas permiten que moléculas, de otra manera impermeables, como el ADP y el P_i, pasen desde el citosol a la matriz y que otras moléculas, como el ATP, puedan moverse desde la matriz hacia el citosol. Las proteínas constituyen el 76% del peso total de la membrana interna; una fracción más alta que la de cualquier otra membrana celular. La cardiolipina (el difosfatidilglicerol), un lípido concentrado en la membrana interna, reduce suficientemente la permeabilidad de la membrana a los protones, de manera que se puede establecer una fuerza protón-motriz a través de ella.



1 Piruvato deshidrogenasa, ciclo del ácido cítrico y metabolismo de los ácidos grasos

2 Transporte de electrones desde el NADH y $FADH_2$ al oxígeno; generación de la fuerza protón-motriz

3 Síntesis de ATP por el F_0F_1 utilizando la fuerza protón-motriz

▲ Fig. 8-7. Resumen de la oxidación aerobia del piruvato y de los ácidos grasos en la mitocondria. La membrana externa es libremente permeable a todos los metabolitos, pero se necesitan transportadoras específicas (óvalos coloreados) en la membrana interna para ingresar piruvato (amarillo), ADP (verde) y P_i (violeta) a la matriz y sacar ATP (verde). El NADH generado en el citosol no es transportado directamente a la matriz porque la membrana interna es impermeable al NAD^+ y al NADH; en cambio, un sistema de lanzadera (rojo) transporta electrones desde el NADH citosólico al NAD^+ en la matriz. El O_2 se difunde hacia la matriz y el CO_2 se difunde hacia afuera. Etapa 1: Los grupos acilos grasos son transferidos desde el acilo graso CoA y transportados a través de la membrana interna mediante un transportador especial (óvalo azul) y luego reunido al CoA en el lado de la matriz. El piruvato es convertido a acetil CoA con la formación de NADH y los ácidos grasos (unidos al CoA) son también convertidos a acetil CoA con la formación de NADH y $FADH_2$. La oxidación del acetil CoA en el ciclo del ácido cítrico genera NADH y FADH. Etapa 2: los electrones de estas coenzimas reducidas son transferidos por complejos de transporte de electrones (rectángulos azules) al O_2 concomitantemente con el transporte de iones H^+ desde la matriz al espacio intermembrana, lo que genera la fuerza protón-motriz. Los electrones del NADH fluyen directamente desde el complejo I al complejo III sorteando el complejo II. Etapa 3: la ATP sintasa, el complejo F_0F_1 (anaranjado), encausa la fuerza protón-motriz para sintetizar ATP. Las flechas azules indican el flujo de electrones; las flechas rojas, los movimientos transmembrana de protones y las flechas verdes, el transporte de metabolitos.

La membrana mitocondrial interna, las crestas y la matriz son los sitios de la mayoría de las reacciones que involucran la oxidación del piruvato y los ácidos grasos a CO_2 y H_2O y la síntesis acoplada de ATP a partir de ADP y P_i. Estos procesos comprenden numerosos pasos pero pueden subdividirse en tres grupos de reacciones, cada una de las cuales tiene lugar en una membrana o espacio definido de la mitocondria (fig. 8-7):

1. La oxidación del piruvato y de los ácidos grasos a CO_2 acoplada a la reducción de NAD^+ a NADH, y de **flavina adenina dinucleótido** (**FAD**), otro transportador de electrones oxidado, a $FADH_2$ (véase fig. 2-26). Estos transportadores de electrones a menudo se denominan *coenzimas*. NAD^+, NADH, FAD y $FADH_2$ pueden difundirse y no están unidos permanentemente a las proteínas. La mayoría de las reacciones ocurren en la matriz; dos son catalizadas por enzimas de la membrana interna orientada hacia la matriz.

2. La transferencia de electrones desde el NADH y el $FADH_2$ al O_2 y la regeneración de los transportadores de electrones oxidados NAD^+ y FAD. Estas reacciones se producen en la membrana interna y están acopladas a la generación de una fuerza protón-motriz a través de ella.

3. La utilización de la energía almacenada en el gradiente electroquímico de protones para la síntesis de ATP por el complejo F_0F_1 en la membrana interna.

Las crestas expanden muchísimo la superficie de la membrana mitocondrial interna y aumentan su capacidad para generar ATP (véase fig. 8-6). Por ejemplo, en las mitocondrias hepáticas típicas, el área de la membrana interna incluidas las crestas es alrededor de cinco veces la de la membrana externa. De hecho, el área total de todas las membranas internas mitocondriales en las células del hígado es alrededor de 17 veces la de la membrana plasmática. Las mitocondrias del corazón y de los músculos esqueléticos contienen tres veces más crestas que las halladas en las mitocondrias típicas del hígado, lo que refleja tal vez una mayor demanda de ATP por parte de las células musculares.

PLANTAS

En las plantas, los carbohidratos almacenados, sobre todo en forma de almidón, son hidrolizados a glucosa. La glucólisis produce luego piruvato, que es transportado a la mitocondria, como en las células animales. La oxidación mitocondrial del piruvato y la formación concomitante de ATP tienen lugar en las células fotosintéticas durante los períodos de oscuridad cuando la fotosíntesis no es posible, y todo el tiempo en las raíces y otros tejidos no fotosintéticos. ▮

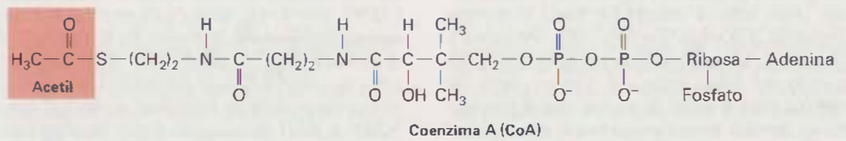
El acetil CoA derivado del piruvato es oxidado para producir CO_2 y coenzimas reducidas en la mitocondria

Inmediatamente después de que el piruvato es transportado desde el citosol a través de la membrana mitocondrial a la matriz, reacciona con la coenzima A y forma CO_2 y el intermediario acetil CoA (fig. 8-8). Esta reacción, catalizada por la *piruvato deshidrogenasa*, es muy exergónica ($\Delta G^{\circ\prime}$ = –8,0 kcal/mol) y esencialmente irreversible. Nótese que durante la reacción de la piruvato deshidrogenasa, el NAD^+ se reduce y se forma NADH; en cambio, durante las reacciones catalizadas por la lactato deshidrogenasa y la alcohol deshidrogenasa, el NADH se oxida y se forma NAD^+ (véase fig. 8-5).

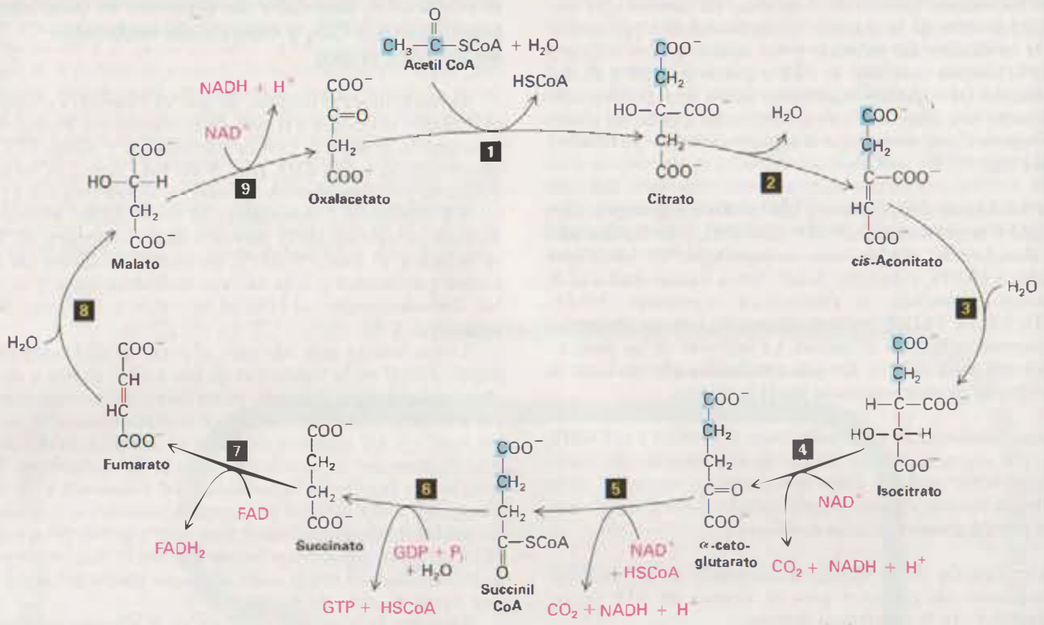
Como se verá más adelante, el acetil CoA desempeña un papel central en la oxidación de los ácidos grasos y de muchos aminoácidos. Además, es un intermediario en numerosas reacciones biosintéticas, como la transferencia de un grupo acetilo a los residuos de lisina en las proteínas histonas y al N-terminal de muchas proteínas de mamíferos. También es un precursor biosintético del colesterol y de otros esteroides y del farnesil y grupos relacionados que forman las anclas lipídicas utilizadas para unir algunas proteínas (p. ej., Ras) a las membranas (véase fig. 5-15). Sin embargo, en la mitocondria en respiración, el grupo acetilo del acetil CoA casi siempre se oxida a CO_2.

La etapa final en la oxidación de la glucosa conlleva un grupo de nueve reacciones en las cuales el grupo acetilo del acetil CoA se oxida a CO_2. Estas reacciones operan en un ciclo que se conoce con diversos nombres: **ciclo del ácido cítrico, ciclo de los ácidos tricarboxílicos** y ciclo de **Krebs.** El resultado neto es que por cada grupo acetilo que entra en el ciclo como acetil CoA, se producen dos moléculas de CO_2.

Como se ilustra en la figura 8-9, el ciclo comienza con la condensación del grupo acetilo de dos carbonos desde el acetil CoA con la molécula de cuatro carbonos *oxalacetato* para producir el *ácido cítrico* de seis carbonos. La conversión en dos pasos de citrato a isocitrato (reacciones 2 y 3) la realiza una única enzima multifunción. En ambas reacciones 4 y 5, se libera una molécula de CO_2. La reacción 5, catalizada por la enzima α-cetoglutarato deshidrogenasa, también conduce a la reducción de NAD^+ a NADH. Esta reacción es químicamente similar a la catalizada por la piruvato deshidrogenasa, y de hecho, estos dos grandes complejos enzimáticos tienen estructura y mecanismos similares. La reducción de NAD^+ a NADH también se produce durante las reacciones 4 y 9; por lo tanto, por cada vuelta del ciclo se generan tres moléculas de NADH. En la reacción 7, se transfieren dos electrones y dos protones al FAD, y producen la forma reducida de esta coenzima, $FADH_2$. En la reacción 6, la hidrólisis del



▲ Fig. 8-8. Estructura del acetil CoA. Este compuesto es un intermediario importante en la oxidación aerobia del piruvato, los ácidos grasos y muchos aminoácidos. También contribuye con grupos acetilo en numerosas vías biosintéticas.



▲ Fig. 8-9. Ciclo del ácido cítrico, en el cual los grupos acetilo transferidos desde el acetil CoA son oxidados a CO_2. En la reacción 1, un residuo acetilo de dos carbonos del acetil CoA se condensa con la molécula de cuatro carbonos, oxalacetato, para formar la molécula citrato de seis átomos de carbonos. En las reacciones restantes (2-9) cada molécula de citrato es finalmente reconvertida a oxalacetato y pierde dos moléculas de CO_2 en el proceso. En cada vuelta del ciclo, se eliminan cuatro pares de electrones de los átomos de carbono y se forman tres moléculas de NADH y una molécula de $FADH_2$. Los dos átomos de carbonos que ingresan en el ciclo con el acetil CoA están resaltados en azul hasta el succinil CoA. En el succinato y el fumarato, que son moléculas simétricas, ya no pueden ser específicamente identificados. Los estudios de marcación con isótopos han mostrado que estos átomos de carbono *no* se pierden en la vuelta del ciclo en el cual entran; en promedio uno se perderá como CO_2 durante la siguiente vuelta del ciclo y el otro en vueltas subsiguientes.

enlace tioéster de alta energía en el succinil CoA está acoplada a la síntesis de un GTP mediante fosforilación a nivel del sustrato (GTP y ATP son interconvertibles). La reacción 9, la final, también regenera el oxalacetato, por lo que el ciclo puede comenzar nuevamente. Nótese que el O_2 molecular no participa en el ciclo del ácido cítrico.

La mayoría de las enzimas y las moléculas pequeñas que participan en el ciclo del ácido cítrico son solubles en solución acuosa y se localizan en la matriz mitocondrial. Éstas incluyen la CoA, el acetil CoA, el succinil CoA, el NAD^+ y el NADH, al igual que seis de las ocho enzimas del ciclo. La *succinato deshidrogenasa* (reacción 7) y la *α-cetoglutarato deshidrogenasa* (reacción 5) son proteínas integrales de la membrana interna, con sus sitios activos orientados hacia la matriz. Cuando las mitocondrias son rotas por vibración ultrasónica suave o por lisis osmótica, las seis enzimas no adheridas a las membranas en el ciclo del ácido cítrico se liberan como un complejo multiproteína muy grande. Se piensa que el producto de reacción de una enzima pasa directamente a la siguiente enzima sin difundirse a través de la solución. Sin embargo, se necesita mucho trabajo para determinar la estructura de este complejo enzimático tal como existe en la célula.

Puesto que la glucólisis de una molécula de glucosa genera dos moléculas de acetil CoA, las reacciones en la vía glucolítica y en el ciclo del ácido cítrico producen seis moléculas de CO_2, diez moléculas de NADH y dos moléculas de $FADH_2$ por molécula de glucosa (cuadro 8-1). Aunque estas reacciones también generan cuatro enlaces fosfoanhidridos de alta energía en la forma de dos moléculas de ATP y dos moléculas de GTP, representan sólo una pequeña fracción de la energía disponible liberada en la oxidación aerobia completa de la glucosa. La energía restante se almacena en las coenzimas reducidas NADH y $FADH_2$.

La síntesis de la mayor parte del ATP generado en la oxidación aerobia está acoplada a la reoxidación de NADH y $FADH_2$ por el O_2 en un proceso gradual que comprende la cadena respiratoria, también denominada *cadena de transporte de electrones*. Aunque el O_2 molecular no participa en ninguna reacción del ciclo del ácido cítrico, en ausencia de O_2 el ciclo pronto deja de funcionar a medida que el suministro de NAD^+ y FAD disminuye. Antes de detallar el transporte de electrones y la formación acoplada de ATP, veremos cómo se regenera el suministro de NAD en el citosol y luego la oxidación de ácidos grasos a CO_2.

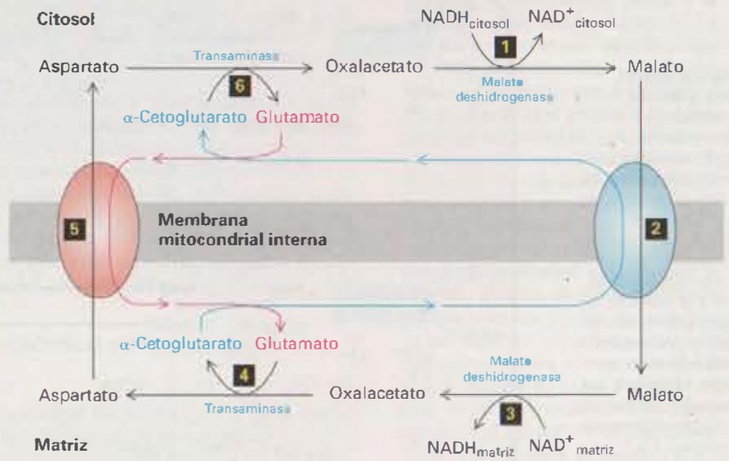
CUADRO 8-1 Resultado neto de la vía glucolítica y ciclo del ácido cítrico

Reacción	Moléculas de CO_2 producidas	Moléculas de NAD^+ reducidas a NADH	Moléculas de FAD reducidas a $FADH_2$
1 molécula de glucosa a 2 moléculas de piruvato	0	2	0
2 piruvatos a 2 moléculas de acetil CoA	2	2	0
2 acetil CoA a 4 moléculas de CO_2	4	6	2
Total	6	10	2

Los transportadores de la membrana mitocondrial interna permiten la incorporación de electrones a partir del NADH citosólico

Para que la oxidación aerobia continúe, el NADH producido durante la glucólisis en el citosol debe ser oxidado a NAD^+. Como sucede con el NADH generado en la matriz mitocondrial, los electrones del NADH citosólico son transferidos en última instancia al O_2 a través de la cadena respiratoria, en forma concomitante con la generación de una fuerza protón-motriz. Aunque la membrana mitocondrial interna es impermeable al NADH en sí, varias *lanzaderas de electrones* (*shuttle*) pueden transferir electrones desde el NADH citosólico al de la matriz.

En la figura 8-10 se representa el funcionamiento de lanzadera más difundido: *el transportador de malato-aspartato*. Dos proteínas antiportadoras de la membrana mitocondrial interna, un antiportador malato/α-cetoglutarato y un antiportador glutamato/aspartato, que permiten el transporte de sus sustratos hacia adentro y afuera de la matriz son críticas pa-



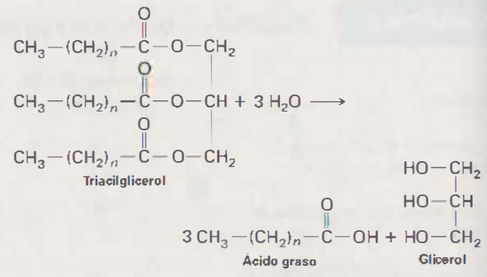
▲ Fig. 8-10. Lanzadera del malato. Esta serie de reacciones cíclicas transfiere electrones desde el NADH en el citosol (espacio intermembrana) a través de la membrana mitocondrial interna, que es impermeable al NADH. Paso 1: la malato deshidrogenasa citosólica transfiere electrones desde el NADH citosólico al oxalacetato, formando malato. Paso 2: un antiportador (óvalo azul) en la membrana mitocondrial interna transporta el malato hacia el interior de la matriz a cambio del α-cetoglutarato. Paso 3: la malato deshidrogenasa mitocondrial convierte el malato de nuevo a oxalacetato, reduciendo el NAD^+ en la matriz a NADH en el proceso. Paso 4: el oxalacetato, que no puede cruzar directamente la membrana interna, es convertido a aspartato por adición de un grupo amino a partir del glutamato. En esta reacción en la matriz, catalizada por transaminasa, el glutamato es convertido a α-cetoglutarato. Paso 5: un segundo antiportador (óvalo rojo) envía el aspartato hacia el citosol a cambio de glutamato. Paso 6: una transaminasa citosólica convierte el aspartato a oxalacetato y se completa el ciclo. Las flechas azules y rojas reflejan el movimiento del α-cetoglutarato y del glutamato, respectivamente. En el paso 4 el glutamato es desaminado a α-cetoglutarato, el cual es transportado al citosol por un antiportador (paso 2); en el paso 6, el α-cetoglutarato es aminado, reconvirtiéndolo a glutamato, el cual es transportado a la matriz por el antiportador en el paso 5.

ra la lanzadera. Como el oxalacetato, un componente de la lanzadera, no puede cruzar directamente la membrana interna, es convertido a aminoácido aspartato en la matriz y a malato en el citosol. El efecto neto de las reacciones que constituyen la lanzadera malato-aspartato es la oxidación del NADH citosólico a NAD^+ y la reducción del NAD^+ matricial a NADH:

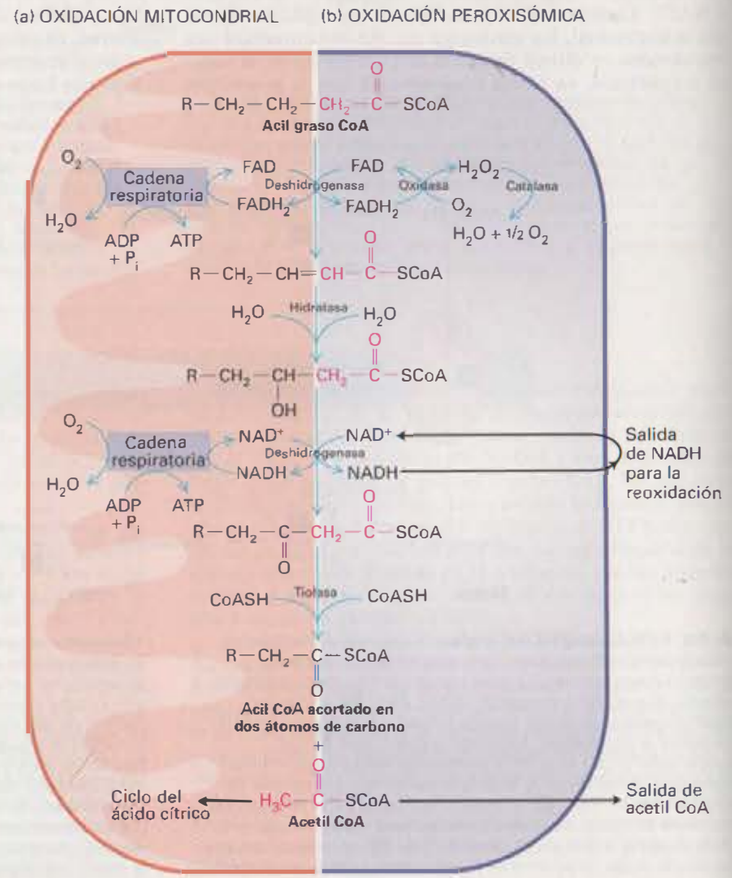
$$NADH_{citosol} + NAD^+_{matriz} \longrightarrow NAD^+_{citosol} + NADH_{matriz}$$

La oxidación mitocondrial de los ácidos grasos está acoplada a la formación de ATP

Los ácidos grasos están almacenados como triacilgliceroles, principalmente como gotitas en las células adiposas (almacenadoras de grasas). En respuesta a hormonas como la adrenalina, los triacilgliceroles se hidrolizan en el citosol a ácidos grasos libres y glicerol:



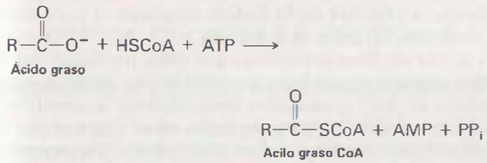
Los ácidos grasos liberados en la sangre son incorporados y oxidados por la mayoría de las otras células y constituyen la mayor fuente de energía para muchos tejidos, sobre todo el músculo cardíaco. En los seres humanos, la oxidación de las grasas es cuantitativamente más importante que la de la glucosa como fuente de ATP. La oxidación de 1 g de triacilglicerol



▶ Fig. 8-11. Oxidación de los ácidos grasos en las mitocondrias y en los peroxisomas. Tanto en la oxidación mitocondrial (a) como en la oxidación peroxisomal (b), cuatro reacciones idénticas catalizadas por enzimas (mostradas abajo del centro de la figura) convierten una molécula de acilo graso CoA en acetil CoA y en un acilo graso CoA acortado en dos átomos de carbono. De manera concomitante (en las reacciones que se dirigen a la izquierda del centro para la mitocondria y a la derecha del centro para los peroxisomas), una molécula de FAD es reducida a $FADH_2$ y una molécula de NAD^+ es reducida a NADH. El ciclo se repite en el acil CoA acortado hasta que los ácidos grasos con un número par de átomos de carbono son convertidos completamente a acetil CoA. En las mitocondrias, los electrones del $FADH_2$ y el NADH entran en la cadena respiratoria y finalmente son utilizados para generar ATP; el acetil CoA generado es oxidado en el ciclo del ácido cítrico, resultando en la síntesis de ATP adicional. Debido a que los peroxisomas carecen de los complejos transportadores de electrones que componen la cadena respiratoria y las enzimas del ciclo del ácido cítrico, la oxidación de los ácidos grasos en estos orgánulos no producen ATP. (Adaptado de D. L. Nelson y M. M. Cox, Lehninger Principles of Biochemistry, 3d ed., 2000, Worth Publishers.)

a CO_2 genera alrededor de seis veces más ATP que la oxidación de 1 g de glucógeno hidratado, la forma polimérica de almacenamiento de la glucosa en los músculos y el hígado. Los triglicéridos son más eficientes para el almacenamiento de energía porque están en la forma anhidrida y están mucho más reducidos (tienen más hidrógenos) que los carbohidratos y, por ende, producen mayor energía cuando son oxidados.

En el citosol, los ácidos grasos libres se esterifican con la coenzima A para formar un acilo graso CoA en una reacción exergónica acoplada a la hidrólisis de ATP a AMP y PP_i (pirofosfato inorgánico):



La hidrólisis subsiguiente de PP_i a dos moléculas de fosfato (P_i) impulsa esta reacción hasta el final. Luego el grupo acilo graso es transferido a la carnitina y movido a través de la membrana mitocondrial interna por una proteína transportadora de acilcarnitina (véase fig. 8-7, óvalo azul); en el lado de la matriz, el grupo acilo graso se libera de la carnitina y se vuelve a unir a otra molécula de CoA.

Cada molécula de un acilo graso CoA en la mitocondria se oxida en una secuencia cíclica de cuatro reacciones en la cual todos los átomos de carbono se convierten a acetil CoA con la generación de NADH y $FADH_2$ (fig. 8-11a). Por ejemplo, la oxidación mitocondrial de cada molécula del ácido esteárico de 18 carbonos, $CH_3(CH_2)_{16}COOH$, produce nueve moléculas de acetil CoA y ocho moléculas de NADH y $FADH_2$ cada una. Al igual que con el acetil CoA generado a partir del piruvato, estos grupos acetilo entran en el ciclo del ácido cítrico y se oxidan a CO_2. Los electrones de las coenzimas reducidas producidas en la oxidación del acilo graso CoA en el ciclo del ácido cítrico se mueven a través de la cadena respiratoria hacia el O_2. Este movimiento de electrones está asociado con la generación de una fuerza protón-motriz que es utilizada para impulsar la síntesis de ATP, como ya se describió para la oxidación del piruvato (véase fig. 8-7).

La oxidación peroxisómica de ácidos grasos no genera ATP

La oxidación mitocondrial de ácidos grasos es la mayor fuente de ATP en las células hepáticas de los mamíferos y los bioquímicos en un momento creyeron que era así en todos los tipos de células. Sin embargo, se descubrió que en las ratas tratadas con clofibrato, una droga utilizada para reducir el nivel de lipoproteínas de la sangre, se incrementaba la velocidad de oxidación de ácidos grasos y el número de peroxisomas en las células del hígado. Estas observaciones sugirieron que los peroxisomas, al igual que las mitocondrias, pueden oxidar los ácidos grasos. Estos pequeños orgánulos, ≈0,2-1 μm de diámetro, revestidos por una única membrana (véase fig. 5-21), están presentes en todas las células de los mamíferos excepto en los eritrocitos; también se encuentran en las células de las plantas, las levaduras y, probablemente, en la mayoría de las demás células eucariontes.

En la actualidad, el perixosoma es reconocido como el orgánulo principal en el que se oxidan los ácidos grasos en la mayoría de los tipos de células. En efecto, las cadenas de ácidos grasos muy largas que contienen alrededor de más de 20 grupos CH_2 sólo se degradan en los peroxisomas; en las células de los mamíferos, los ácidos grasos de longitud mediana que contienen de 10-20 grupos CH_2 pueden degradarse tanto en los perixosomas como en las mitocondrias. A diferencia de la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, que está acoplada a la generación de ATP, la oxidación peroxisómica no está conectada a la formación de ATP y la energía liberada se convierte en calor.

La vía de reacción por la cual los ácidos grasos se degradan a acetil CoA en los peroxisomas es similar a la utilizada en las mitocondrias del hígado (fig. 8-11b). Sin embargo, los peroxisomas carecen de una cadena respiratoria y los electrones del $FADH_2$ producidos durante la oxidación de los ácidos grasos son transferidos de inmediato al O_2 por las *oxidasas*, con la regeneración de FAD y la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Además de las oxidasas, los peroxisomas contienen abundante *catalasa*, que descompone con rapidez el H_2O_2, un metabolito altamente citotóxico. El NADH producido durante la oxidación de los ácidos grasos sale y se reoxida en el citosol. Los peroxisomas también carecen del ciclo del ácido cítrico, por lo que el acetil CoA generado durante la degradación peroxisómica de los ácidos grasos no puede oxidarse más; en cambio, es transportado al citosol para ser usado en la síntesis de colesterol y otros metabolitos.

MEDICINA

Antes de degradarse en el perixosoma, los ácidos grasos deben primero ser transportados al orgánulo desde el citosol. Los ácidos grasos de longitud mediana son esterificados con la coenzima A en el citosol; los acilo grasos CoA resultantes luego son transportados a los perixosomas por un transportador específico. Sin embargo, los ácidos grasos de cadena muy larga entran en el perixosoma mediante otro transportador y son esterificados con CoA una vez en su interior. En la enfermedad genética humana adrenoleucodistrofia (ALD) ligada al cromosoma X, la oxidación peroxisómica de ácidos grasos de cadena muy larga es específicamente defectuosa, mientras que la oxidación de ácidos grasos de longitud mediana es normal. El trastorno peroxisómico más común, la ALD, está marcado por niveles elevados de ácidos grasos de cadena muy larga en el plasma y en los tejidos. Los pacientes con la forma más grave de ALD no son afectados hasta la mitad de la infancia, cuando aparecen alteraciones neurológicas graves seguidas por la muerte al cabo de pocos años. En los últimos tiempos, se ha identificado y clonado mediante las técnicas descritas en el capítulo 9 el gen defectuoso en los pacientes con ALD. Los análisis de secuencia muestran que el gen codifica una proteína de transporte ABC (ABCD1) localizada en las membranas peroxisómicas y se piensa que media la entrada de ácidos grasos de cadenas muy largas en los orgánulos. ▮

La velocidad de oxidación de la glucosa se ajusta para satisfacer las necesidades de ATP de la célula

Todas las reacciones catalizadas por enzimas y las vías metabólicas son reguladas por las células de manera de pro-

ducir las cantidades necesarias de metabolitos, pero no un exceso. La función primaria de la oxidación de glucosa a CO_2 a través de la vía glucolítica, la reacción de la piruvato deshidrogenasa, y el ciclo del ácido cítrico es producir NADH y $FADH_2$, cuya oxidación en la mitocondria genera ATP. El funcionamiento de la vía glucolítica y del ciclo del ácido cítrico es regulado continuamente, sobre todo por mecanismos alostéricos, para satisfacer las necesidades de ATP de la célula (véase cap. 3 para los principios generales del control alostérico).

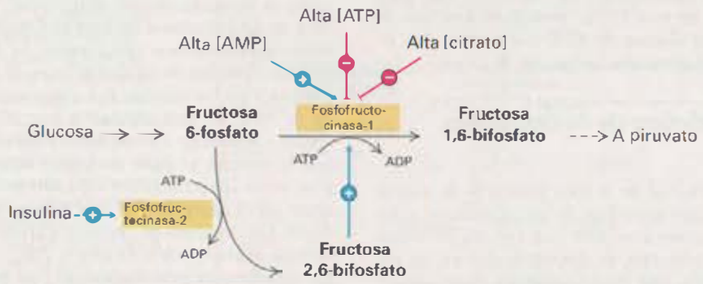
Tres enzimas glucolíticas controladas alostéricamente desempeñan un papel clave para regular toda la vía glucolítica (véase fig. 8-4). La *hexocinasa* (paso 1) es inhibida por el producto de su reacción, la glucosa 6-fosfato. La *piruvato cinasa* (paso 10) es inhibida por ATP, por lo que la glucólisis disminuye su velocidad si hay demasiado ATP presente. La tercera enzima, la *fosfofructocinasa-1*, que convierte la fructosa 6-fosfato en fructosa 1,6-bifosfato (paso 3), es la principal enzima limitante de velocidad de la vía glucolítica. Emblemática por su papel crítico para regular la velocidad de la glucólisis, esta enzima es controlada alostéricamente por varias moléculas (fig. 8-12).

La fosfofructocinasa-1 es *inhibida* alostéricamente por el ATP y *activada* alostéricamente por el AMP. Como resultado, la velocidad de la glucólisis es muy sensible al cambio de energía de la célula, reflejada en la relación ATP:AMP. La inhibición alostérica de la fosfofructocinasa-1 por el ATP puede parecer rara, puesto que el ATP también es un sustrato de esta enzima. Pero la afinidad del sitio de unión al sustrato para el ATP es mucho mayor (tiene una K_m menor) que la del sitio alostérico. Por ende, en bajas concentraciones, el ATP se une al sitio catalítico pero no al sitio alostérico inhibidor y la catálisis enzimática se realiza casi a velocidades máximas. En altas concentraciones, el ATP también se une al sitio alostérico e induce un cambio adaptativo que reduce la afinidad de la enzima por el otro sustrato, la fructosa 6-fosfato y por ende inhibe la velocidad de esta reacción y la velocidad general de la glucólisis.

Otro activador alostérico importante de la fosfofructocinasa-1 es la *fructosa 2,6-bifosfato*. Este metabolito se forma a partir de la fructosa 6-fosfato por la *fosfofructocinasa 2*, una enzima diferente de la fosfofructocinasa-1. La fructosa 6-fosfato acelera la formación de la fructosa 2,6 bifosfato, la cual, a su vez, activa a la fosfofructocinasa-1. Este tipo de control, por analogía con el control de retroalimentación, se conoce como *activación de anterocontrol (feed-forward activation)* en la cual la abundancia de un metabolito (aquí, fructosa 6-fosfato) induce una aceleración de su metabolismo. La fructosa 2-6 bifosfato activa alostéricamente a la fosfofructocinasa-1 en las células del hígado, disminuye el efecto inhibidor de altos niveles de ATP e incrementa la afinidad de la fosfofructocinasa-1 para uno de sus sustratos, la fructosa 6-fosfato.

Las tres enzimas glucolíticas que están reguladas por moléculas alostéricas catalizan reacciones con grandes valores negativos de $\Delta G^{\circ\prime}$ (reacciones esencialmente irreversibles en condiciones ordinarias). Por lo tanto, estas enzimas son muy adecuadas para regular toda la vía glucolítica. Un control adicional lo ejerce la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, que cataliza la reducción de NAD^+ a NADH (véase fig. 8-4, paso 6). Si el NADH citosólico se acumula debido a una lentificación de la oxidación mitocondrial, esta reacción se torna más lenta por acción de masa. Como veremos más adelante, la oxidación mitocondrial del NADH y el $FADH_2$, producida en la vía glucolítica y en el ciclo del ácido cítrico, también está estrechamente controlada para producir la cantidad apropiada de ATP requerida por la célula.

El metabolismo de la glucosa es controlado de manera diferente en diversos tejidos de mamíferos para satisfacer las necesidades metabólicas de los organismos como totalidad. Durante los períodos de inanición de carbohidratos, por ejemplo, el glucógeno del hígado se convierte directamente en glucosa 6-fosfato (sin involucrar a la hexocinasa). En estas condiciones, hay una reducción en los niveles de fructosa 2,6 bifosfato y una actividad reducida de la fosfofructocinasa-1 (véase fig. 8-12). Como resultado, la glucosa 6-fosfato derivada del glucógeno no se metaboliza a piruvato; en su lugar, es convertida a glucosa por una fosfatasa y se libera en la sangre para nutrir el cerebro y los glóbulos rojos, que dependen principalmente de la glucosa como combustible energético. (El cap. 13 contiene una explicación más detallada del control hormonal del metabolismo de la glucosa en el hígado y en los músculos.) En todos los casos, la actividad de estas enzimas reguladas es controlada por el nivel de metabolitos de moléculas pequeñas, casi siempre por interacciones alostéricas o por fosforilación y desfosforilación mediada por hormonas.



▲ Fig. 8-12. Control alostérico del metabolismo de la glucosa en el citosol a nivel de la fructosa 6-fosfato. La enzima reguladora clave en la glucólisis, la fosfofructocinasa-1, es alostéricamente activada por el AMP y la fructosa 2-6-bifosfato, que están elevados cuando las reservas de energía de la célula son bajas. La enzima es inhibida por el ATP y por el citrato, que están elevados cuando la célula activamente oxida glucosa a CO_2. La fosfofructocinasa-2 (PFK2) es una enzima bifuncional: su actividad de cinasa forma fructosa 2,6-bifosfato a partir de la fructosa 6 fosfato, y su actividad de fosfatasa cataliza la reacción inversa. La insulina, liberada por el páncreas cuando los niveles de glucosa de la sangre son altos, promueve la actividad de la cinasa de PFK2 y por ende estimula la glucólisis. Con glucosa baja en la sangre, el glucagón es liberado por el páncreas y promueve la actividad de la fosfatasa de PFK2 en el hígado, reduciendo indirectamente la velocidad de la glucólisis. Describimos el papel de la insulina y del glucagón en el control integrado de los niveles de glucosa en sangre en el capítulo 15.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 8.1

Oxidación de la glucosa y de los ácidos grasos a CO_2

- En el citosol de las células eucariontes, la glucosa se convierte en piruvato a través de la vía glucolítica, con la formación neta de dos ATP y la reducción neta de dos moléculas de NAD^+ a NADH (véase fig. 8-4). El ATP es formado por dos reacciones de fosforilación a nivel del sustrato en la conversión de gliceraldehído 3-fosfato a piruvato.
- En condiciones anaerobias, las células pueden metabolizar piruvato a lactato o a etanol más CO_2 (en el caso de la levadura), con la reoxidación de NADH. En condiciones aerobias, el piruvato es transportado a la mitocondria, donde la piruvato deshidrogenasa lo convierte en acetil CoA y CO_2 (véase fig. 8-5).
- La mitocondria tiene una membrana externa permeable y una membrana interna, que es el sitio de transporte de electrones y de la síntesis de ATP.
- En cada vuelta del ciclo del ácido cítrico, el acetil CoA se condensa con la molécula de cuatro carbonos oxalacetato para formar el citrato de seis carbonos, el cual es convertido nuevamente a oxalacetato por una serie de reacciones que liberan dos moléculas de CO_2 y generan tres moléculas de NADH, una molécula de $FADH_2$ y una de GTP (véase fig. 8-9).
- Aunque el NADH citosólico generado durante la glucólisis no puede entrar directamente en la mitocondria, la lanzadera de malato aspartato transfiere indirectamente los electrones desde el citosol a la matriz mitocondrial y regenera, de esta manera, el NAD^+ citosólico para la glucólisis continuada.
- El flujo de electrones desde el NADH y el $FADH_2$ al O_2, a través de una serie de transportadores de electrones en la membrana mitocondrial interna está acoplado al bombeo de protones a través de la membrana interna (véase fig. 8-7). La fuerza protón-motriz resultante impulsa la síntesis de ATP y genera la mayor parte del ATP resultante de la oxidación aerobia de la glucosa.
- La oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria produce acetil CoA, que entra en el ciclo del ácido cítrico y las coenzimas reducidas NADH y $FADH_2$. La oxidación subsiguiente de estos metabolitos está acoplada a la formación de ATP.
- En la mayoría de las células eucariontes, la oxidación de los ácidos grasos, sobre todo los de cadenas muy largas, tiene lugar principalmente en los perixosomas y no está unida a la producción de ATP; la energía liberada se convierte en calor.
- La velocidad de oxidación de la glucosa a través de la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico es controlada por la inhibición o estimulación de diversas enzimas, según las necesidades de ATP de la célula. Esta compleja regulación coordina las actividades de la vía glucolítica y del ciclo del ácido cítrico y produce el almacenamiento de la glucosa (como glucógeno) o grasa cuando el ATP es abundante.

8.2 Transporte de electrones y generación de la fuerza protón-motriz

Como se dijo en la sección anterior, la mayoría de la energía libre liberada durante la oxidación de la glucosa a CO_2 es retenida en las coenzimas reducidas NADH y $FADH_2$ generadas durante la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico. Durante la respiración, se liberan electrones desde el NADH y el $FADH_2$ y finalmente son transferidos al O_2, para formar H_2O de acuerdo con las siguientes reacciones generales:

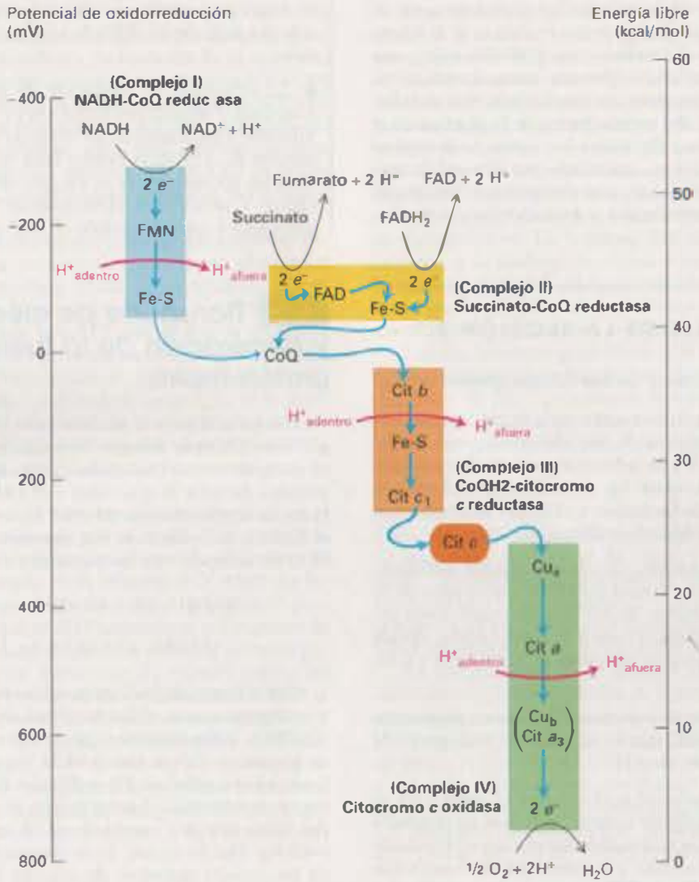
$$NADH + H^+ + {}^1/_2\, O_2 \longrightarrow NAD^+ + H_2O$$

$$FADH_2 + {}^1/_2\, O_2 \longrightarrow FAD + H_2O$$

Los valores de $\Delta G^{\circ\prime}$ para estas tres reacciones fuertemente exergónicas son –52,6 kcal/mol (NADH) y -43,4 kcal/mol ($FADH_2$). Cabe recordar que la conversión de una molécula de glucosa a CO_2 a través de la vía glucolítica y el ciclo del ácido cítrico produce 10 moléculas de NADH y 2 de $FADH_2$ (véase cuadro 8-1). La oxidación de estas coenzimas reducidas tiene una $\Delta G^{\circ\prime}$ total de –613 kcal/mol [10 (–52,6) + 2 (-43,4)]. Por lo tanto, de la energía libre potencial presente en los enlaces químicos de glucosa (–680 kcal/mol), alrededor del 90% se conserva en las coenzimas reducidas.

La energía liberada durante la oxidación de una única molécula de NADH o $FADH_2$ por el O_2 es suficiente para conducir la síntesis de varias moléculas de ATP a partir de ADP y P_i, una reacción con una $\Delta G^{\circ\prime}$ de +7,3 kcal/mol. La mitocondria maximiza la producción de ATP al transferir electrones desde el NADH y el $FADH_2$ a través de una serie de transportadores, de los cuales todos excepto uno son componentes integrales de la membrana interna. Esta transferencia de electrones paso a paso a través de la cadena respiratoria (transportadora de electrones) permite liberar la energía libre del NADH y el $FADH_2$ en cantidades pequeñas y almacenarla como la fuerza protón-motriz.

Durante el transporte de electrones desde el NADH al O_2, los protones de la matriz mitocondrial son bombeados en diversos sitios a través de la membrana mitocondrial interna; este transporte "cuesta arriba" genera un gradiente de concentración de protones a través de la membrana interna (fig. 8-13). Como la membrana externa es libremente permeable a los protones, mientras que la membrana interna no lo es, este bombeo provoca que el pH de la matriz mitocondrial sea más alto (esto es, la concentración de H^+ es más baja) que el del citosol y el del espacio intermembrana. También se produce un potencial eléctrico a través de la membrana interna como resultado del bombeo de H^+ cuesta arriba desde la matriz,



▲ Fig. 8-13. Cambios en el potencial de oxidorreducción y la energía libre durante el flujo gradual de electrones a través de la cadena respiratoria. Las flechas azules indican el flujo de electrones; las flechas rojas, la translocación de protones a través de la membrana mitocondrial interna. Cuatro grandes complejos multiproteína localizados en la membrana interna contienen varios grupos prostéticos transportadores de electrones. La coenzima Q (CoQ) y el citocromo *c* transportan los electrones entre los complejos. Los electrones pasan a través de los complejos multiproteicos desde los que están a un potencial de reducción menor con respecto a los que tienen un potencial mayor (más positivo) (escala izquierda), con una reducción correspondiente en la energía libre (escala derecha). La energía liberada a medida que los electrones fluyen a través de tres de los complejos es suficiente para impulsar el bombeo de iones H^+ a través de la membrana y establecer una fuerza protón-motriz.

la cual se torna negativa con respecto al espacio intermembrana. Por lo tanto, la energía libre liberada durante la oxidación del NADH o el $FADH_2$ se almacena como un potencial eléctrico y un gradiente de concentración de protones —colectivamente, la fuerza protón-motriz— a través de la membrana interna. El movimiento de protones a través de la membrana interna nuevamente hacia la matriz impulsado por esta fuerza está acoplado a la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i por la ATP sintasa (véase fig. 8-7).

La síntesis de ATP a partir de ADP y P_i, conducida por la transferencia de electrones desde el NADH o el $FADH_2$ al O_2, es la principal fuente de ATP en las células aerobias no fotosintéticas. Numerosos datos indican que en las mitocondrias y las bacterias, este proceso, denominado **fosforilación oxidativa**, depende de la generación de una fuerza protón-motriz a través de la membrana interna, mientras el transporte de electrones, el bombeo de protones y la formación de ATP ocurren simultáneamente. En el laboratorio, por ejemplo, la adición de O_2 y un sustrato oxidable como el piruvato o el succinato a las mitocondrias intactas aisladas produce la síntesis neta de ATP si la membrana mitocondrial interna está intacta. En presencia de cantidades mínúsculas de detergente que debilitan las membranas, el transporte de electrones y la oxidación de estos metabolitos por el O_2 aún tiene lugar, pero no se sintetiza ATP. En estas condiciones, no se puede mantener ningún gradiente de concentración de protones transmembrana ni un potencial eléctrico de membrana.

En esta sección comentamos la magnitud de la fuerza protón-motriz, luego los componentes de la cadena respiratoria y el bombeo de protones a través de la membrana interna. En la siguiente sección describiremos la estructura de la ATP sintasa y cómo utiliza la fuerza protón-motriz para sintetizar el ATP. También veremos cómo se controla la oxidación mitocondrial del NADH y el $FADH_2$ para satisfacer las necesidades celulares de ATP.

La fuerza protón-motriz en la mitocondria se debe principalmente a un gradiente de voltaje a través de la membrana interna

Como vimos, la fuerza protón-motriz (pmf) es la suma de un gradiente transmembrana de concentración de protones (pH) y del potencial eléctrico, o gradiente de voltaje. La contribución relativa de los dos componentes a la pmf depende de la permeabilidad de la membrana a los iones diferentes de los H^+. Un gradiente de voltaje significativo puede desarrollarse sólo si la membrana es poco permeable a otros cationes y aniones, como lo es la membrana mitocondrial interna. En este caso, el gradiente de voltaje que se desarrolla (p. ej., el exceso de iones H^+ sobre la cara intermembrana y el exceso de aniones sobre la cara matricial) pronto evita el movimiento adicional de protones, por lo que sólo se genera un gradiente pequeño de pH. Por el contrario, un gradiente de pH significativo puede desarrollarse sólo si la membrana también es permeable a un anión importante (p. ej., Cl^-) o si los iones H^+ son intercambiados por otro catión (p. ej., K^+). En ambos casos, el movimiento de protones no conduce a un gradiente de voltaje a través de la membrana porque siempre existe una concentración igual de iones positivos y negativos en cada lado de la membrana. Ésta es la situación en la membrana tilacoidea del cloroplasto durante la fotosíntesis, como trataremos más adelante. Comparada con los cloroplastos, entonces, una gran porción de la pmf en la mitocondria se debe al potencial eléctrico de la membrana y el gradiente verdadero de pH es más pequeño.

Puesto que una diferencia de una unidad de pH representa una diferencia de diez veces en la concentración de H^+, un gradiente de pH de una unidad a través de la membrana es equivalente a un potencial eléctrico de 59 mV a 20°C de acuerdo con la ecuación de Nernst (cap. 7). Por lo tanto, podemos definir la fuerza protón-motriz como

$$\text{pmf} = \Psi \left(\frac{RT}{F} \times \Delta\text{pH} \right) = \Psi - 59\ \Delta\text{pH}$$

donde R es la constante de los gases de 1,987 cal/(grado·mol), T es la temperatura (en grados Kelvin), F es la constante de Faraday [23,062 cal/(V·mol)] y Ψ es el potencial eléctrico transmembrana; el Ψ y la pmf son medidos en milivoltios. Las mediciones sobre mitocondrias que respiran han mostrado que el potencial eléctrico Ψ a través de la membrana interna es −160 mV (negativo dentro de la matriz) y que el ΔpH es ≈1,0 (equivalente a ≈60mV). Por ende, la pmf total es −220 mV, con el potencial eléctrico transmembrana responsable de alrededor del 73%.

Puesto que las mitocondrias son demasiado pequeñas para implantarles electrodos, no puede determinarse por medición directa el potencial eléctrico y el gradiente de pH a través de la membrana mitocondrial interna. Sin embargo, los investigadores pueden medir el pH interno mediante la inclusión de colorantes fluorescentes sensibles al pH dentro de las vesículas formadas con la membrana mitocondrial interna. También pueden determinar el potencial eléctrico por adición de iones $^{42}K^+$ radiactivos y trazas de valinomicina a una suspensión de mitocondrias que respiran. Aunque la membrana interna suele ser impermeable a los K^+, la valinomicina es un ionóforo, una pequeña molécula soluble en lípidos que puede unir selectivamente un ion específico (en este caso K^+) en su interior hidrófilo y transportarlo a través de la membrana, que de otro modo es impermeable. En presencia de valinomicina, los $^{42}K^+$ se equilibran a través de la membrana interna de una mitocondria aislada de acuerdo con el potencial eléctrico; cuanto más negativo sea el lado matricial de la membrana, más $^{42}K^+$ se acumulará en la matriz.

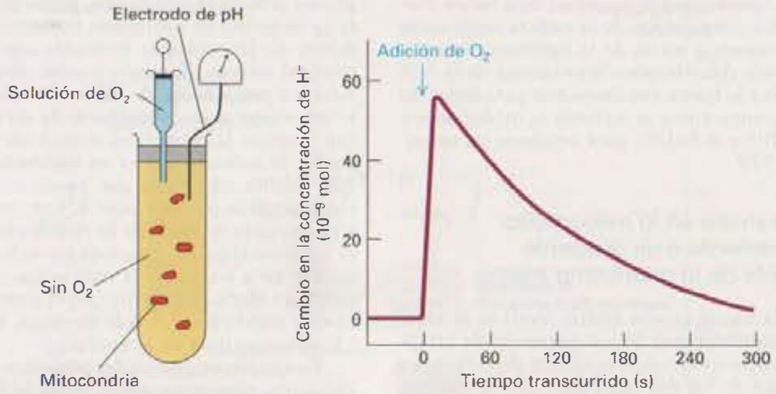
La adición de cantidades pequeñas de valinomicina y K^+ radiactivo tiene poco efecto sobre la fosforilación oxidativa producida en una suspensión de mitocondrias que respiran. En el equilibrio, la concentración medida de iones K^+ radiactivos en la matriz $[K_{adentro}]$ es alrededor de 500 veces más grande que la del medio circundante $[K_{afuera}]$. La sustitución de este valor en la ecuación de Nernst muestra que el potencial eléctrico E (en mV) a través de la membrana interna de la mitocondria que respira es −160 mV, con el interior negativo:

$$E = -59 \log \frac{[K_{adentro}]}{[K_{afuera}]} = -59 \log 500 = -160\ \text{mV}$$

El transporte de electrones en la mitocondria está acoplado a la translocación de protones

El acoplamiento entre el transporte de electrones desde el NADH (o $FADH_2$) al O_2 y el transporte de protones a través de la membrana mitocondrial interna, lo cual genera la fuerza protón-motriz, también puede demostrarse experimentalmente con mitocondrias aisladas (fig. 8-14). Tan pronto se añade el O_2 a una suspensión de mitocondrias, el medio exterior de la mitocondria se vuelve ácido. Durante el transporte de electrones desde el NADH al O_2, se translocan protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana; puesto que la membrana externa es libremente permeable a los protones, el pH del medio externo disminuye por un breve tiempo. La cuantificación del cambio medido en el pH indica que alrededor de 10 protones son transportados hacia afuera de la matriz por cada par de electrones transferidos desde el NADH al O_2.

Cuando se repite este experimento con el succinato en lugar del NADH como sustrato reducido, el medio afuera de la mitocondria nuevamente se vuelve ácido, pero en menor magnitud. Cabe recordar que la oxidación del succinato a fumarato en el ciclo del ácido cítrico genera $FADH_2$ (véase fig. 8-9). Los electrones del $FADH_2$ tienen menos energía potencial (43,4 kcal/mol) que los electrones del NADH (52,6 kcal/mol), por lo tanto el $FADH_2$ transfiere electrones a la cadena respiratoria en un punto posterior al que lo hace el NADH. Como resultado, el transporte de electrones desde el $FADH_2$ (o el succinato) produce la translocación de menos protones desde la matriz y, por ende, un menor cambio en el pH (véase fig. 8-13).



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 8-14 La transferencia de electrones desde el NADH o el $FADH_2$ hacia el O_2 está acoplada al transporte de protones a través de la membrana mitocondrial. Si se añade NADH a una suspensión de mitocondrias carentes de O_2, no se oxida el NADH. Cuando se añade una cantidad pequeña de O_2 al sistema (flecha), el pH del medio circundante disminuye bruscamente, un cambio que corresponde a un *incremento* en los protones fuera de la mitocondria. (La presencia de gran cantidad de valinomicina y K^+ en la reacción disipa el gradiente de voltaje generado por la translocación de H^+, de manera que todos los iones H^+ bombeados contribuyen al cambio del pH.) Por lo tanto, la oxidación de NADH por el O_2 está acoplada al movimiento de protones hacia afuera de la matriz. Una vez que el O_2 se agota, el exceso de protones vuelve a entrar lentamente en la mitocondria (impulsando la síntesis de ATP) y el pH del medio extracelular retorna a su valor inicial.

Los electrones fluyen desde el $FADH_2$ y el NADH al O_2 a través de una serie de cuatro complejos multiproteicos

Ahora examinaremos más de cerca el movimiento energéticamente favorecido de los electrones desde el NADH y el $FADH_2$ al aceptor de electrones definitivo, el O_2. En la mitocondria que respira, cada molécula de NADH libera dos electrones a la cadena respiratoria; estos electrones reducen en última instancia un átomo de oxígeno (media molécula de O_2) para formar una molécula de agua:

$$NADH \longrightarrow NAD^+ + H^+ + 2\ e^-$$

$$2\ e^- + 2\ H^+ + 1/2\ \bullet_2 \longrightarrow H_2\bullet$$

A medida que los electrones se mueven desde el NADH al $\bullet_2$, su potencial declina en 1,14 V, lo cual corresponde a 26,2 kcal/mol de electrones transferidos, o ≈53 kcal/mol para un par de electrones. Como vimos, mucha de esta energía se conserva en la fuerza protón-motriz generada a través de la membrana mitocondrial interna.

Cada uno de los cuatro complejos multiproteicos en la cadena respiratoria atraviesa la membrana mitocondrial interna y contiene varios *grupos prostéticos* que participan en el movimiento de los electrones. Estas moléculas orgánicas pequeñas no peptídicas o iones metálicos están fuerte y específicamente asociadas con los complejos multiproteicos (cuadro 8-2). Antes de considerar las funciones de cada complejo, examinaremos varios de estos transportadores de electrones.

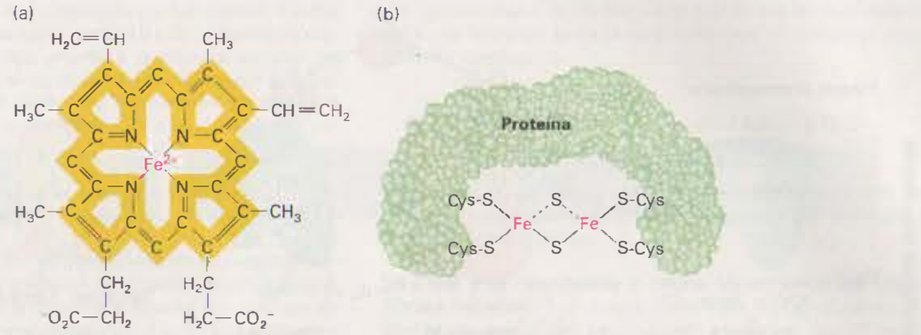
Varios tipos de *hemo*, un grupo prostético que contiene hierro similar al que está en la hemoglobina y la mioglobina, están unidos fuerte o covalentemente a las proteínas mitocondriales y forman los citocromos (fig. 8-15a). El flujo de electrones a través de los citocromos se produce por oxidación y reducción de los átomos de Fe en el centro de la molécula hemo:

$$Fe^{3+} + e^- \rightleftharpoons Fe^{2+}$$

CUADRO 8-2 Grupos prostéticos transportadores de electrones en la cadena respiratoria

Componente proteico	Grupos prostéticos*
(Complejo I) NADH-CoQ reductasa	FMN Fe-S
(Complejo II) Succinato-Co● reductasa	FAD Fe-S
(Complejo III) Co●H_2-citocromo *c* reductasa	Hemo b_L Hemo b_H Fe-S Hemo c_1
Citocromo *c*	Hemo *c*
(Complejo IV) Citocromo *c* oxidasa	Cu_a^{2+} Hemo *a* Cu_b^{2+} Hemo a_3

* No se incluye la coenzima Q, un transportador de electrones que no está permanentemente unido a un complejo de proteínas.
FUENTE: J. W. De Pierre y L. Ernster, 1977, Ann Rev Biochem 46:201.

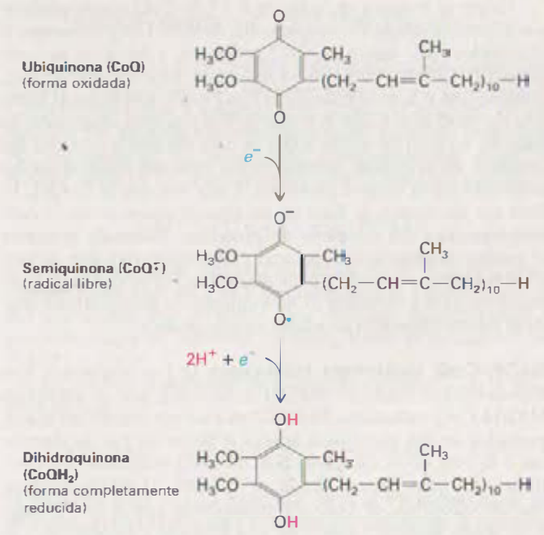


▲ Fig. 8-15. Grupos prostéticos hemo de hierro-azufre en la cadena (de transporte de electrones) respiratoria. (a) Porción hemo de los citocromos b_L y b_H, que son componentes del complejo CoQH_2-citocromo *c* reductasa. El mismo anillo de porfirina (amarillo) está presente en todos los hemos. Los sustituyentes químicos adheridos al anillo de porfirina difieren en los otros citocromos de la cadena respiratoria. Todos los hemos aceptan y liberan un electrón a la vez. (b) Grupo dimérico de hierro-azufre (2Fe-2S). Cada átomo de Fe está unido a cuatro átomos de S: dos son azufres inorgánicos y dos están en las cadenas laterales de cisteína de la proteína asociada. (Nótese que sólo los dos átomos inorgánicos de S son contados en la fórmula química.) Todos los grupos de Fe-S aceptan y liberan un electrón a la vez.

En la cadena respiratoria, los electrones se mueven a través de los citocromos en el siguiente orden: *b*, c_1, *c*, *a* y a_3 (véase fig. 8-13). Los diversos citocromos tienen grupos hemo y ligandos axiales ligeramente distintos, lo cual genera diferentes ambientes para el ion Fe. Por lo tanto, cada citocromo tiene un potencial de reducción diferente, o tendencia a aceptar un electrón; una propiedad importante que dicta el flujo unidireccional de los electrones a lo largo de la cadena. Como el anillo hemo de los citocromos consiste en átomos unidos por enlaces dobles y simples alternados, existen numerosas formas resonantes y el electrón extra no está localizado en los átomos de carbono y de nitrógeno hemo al igual que en el ion Fe. Todos los citocromos, excepto el citocromo *c*, son componentes de los complejos multiproteicos de la membrana mitocondrial interna. Aunque el citocromo *c* comprende un complejo hemo-proteína, se mueve libremente por difusión en el espacio intermembrana.

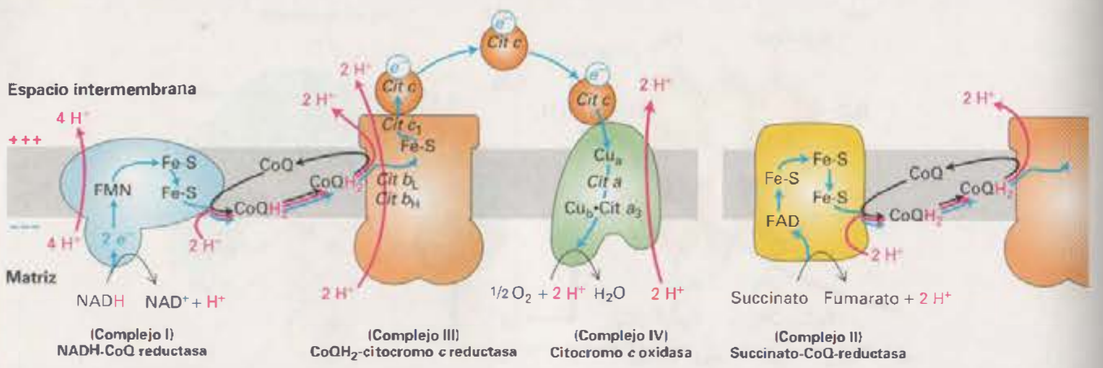
Los *grupos de hierro-azufre* son grupos prostéticos no hémicos que contienen hierro; consisten en átomos de Fe unidos a átomos inorgánicos de S y a átomos de S sobre residuos de cisteína sobre una proteína (fig. 8-15b). Algunos átomos de Fe del grupo llevan una carga +2; otros tienen una carga +3. Sin embargo, la carga neta de cada átomo de Fe en realidad está entre +2 y +3 porque los electrones en las órbitas más externas están dispersos entre los átomos de Fe y se mueven con rapidez de un átomo a otro. Los grupos de hierro azufre aceptan y liberan electrones de uno a la vez; el electrón adicional también se dispersa sobre todos los átomos de Fe del grupo.

La *coenzima* ● (CoQ), también denominada *ubiquinona*, es el único transportador de electrones en la cadena respiratoria que no es un grupo prostético unido a una proteína. Es un transportador de átomos de hidrógeno, es decir, protones más electrones. La forma de quinona oxidada de la CoQ puede aceptar un único electrón para formar una semiquinona, un radical libre cargado denotado CoQ^-. La adición de un segundo electrón y dos protones a la Co●$^-$ forma la dihidroubiquinona (CoQH_2), la forma completamente reducida (fig. 8-16). Tanto la CoQ como la CoQH_2 son solubles en fosfolípidos y se difunden con libertad en la membrana mitocondrial interna.



▲ Fig. 8-16. Formas oxidada y reducida de la coenzima Q (CoQ), la cual transporta dos protones y dos electrones. Debido a su larga "cola" hidrocarbonada de unidades de isopreno, la CoQ es soluble en el núcleo hidrófobo de las bicapas fosfolipídicas y es muy móvil. La reducción de la CoQ a la forma completamente reducida, $\bullet H_2$, tiene lugar en dos pasos con la formación de un intermediario radical libre semirreducido llamado *semiquinona*.

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación focalizada: Transporte de electrones



▲ Fig. 8-17. Vista general de los complejos multiproteicos, grupos prostéticos unidos y transportadores móviles asociados de la cadena respiratoria. Las flechas azules indican el flujo de electrones; las flechas rojas indican la translocación de protones. (*Izquierda*) Vía desde el NADH. Un total de 10 protones son translocados por par de electrones que fluyen desde el NADH hacia el O_2. Los protones liberados en el espacio matricial durante la oxidación del NADH por la NADH-CoQ reductasa son consumidos en la formación de agua a partir del O_2 por la citocromo *c* oxidasa, por lo que no hay una translocación neta de protones a partir de esas reacciones. (*Derecha*) Vía del succinato. Durante la oxidación del succinato a fumarato y la reducción de la CoQ por el complejo succinato-CoQ reductasa, no se translocan protones a través de la membrana. El resto del transporte de electrones desde el $CoQH_2$ procede por la misma vía que en el diagrama izquierdo. Por lo tanto, por cada par de electrones transportados desde el succinato al O_2, se translocan seis protones desde la matriz hacia el interior del espacio intermembrana. La coenzima Q y el citocromo *c* funcionan como transportadores móviles en el transporte de electrones desde el NADH y el succinato. Para más detalles véase el texto.

Como se muestra en la figura 8-17, la CoQ acepta electrones liberados desde el complejo (I), NADH-CoQ reductasa y el complejo (II), succinato-CoQ reductasa, y los dona al complejo (III), $CoQH_2$–citocromo *c* reductasa. Más importante aún, la reducción y la oxidación de la CoQ están acopladas al bombeo de protones. Cada vez que la CoQ acepta electrones, lo hace en un sitio de unión sobre la cara citosólica (matriz) del complejo de proteínas, siempre capta protones desde el medio orientado hacia la cara citosólica. Cada vez que la $CoQH_2$ libera sus electrones, lo hace en un sitio de unión sobre la cara exoplasmática del complejo de proteínas, liberando protones al medio exoplasmático (espacio intermembrana). Por lo tanto, el transporte de cada par de electrones por la CoQ está acoplado en forma obligada al movimiento de dos protones desde el medio citosólico al medio exoplasmático.

NADH-CoQ reductasa (complejo I) Los electrones son transportados desde el NADH a la CoQ por el complejo NADH-CoQ reductasa. El NAD^+ es exclusivamente un transportador de dos electrones: acepta o libera un par de electrones a la vez. En el complejo NADH-CoQ reductasa, los electrones primero fluyen desde el NADH al FMN (flavina mononucleótido), un cofactor relacionado con el FAD, luego a un grupo de hierro azufre de una proteína y finalmente a la CoQ (véase fig. 8-17). El FMN, al igual que el FAD, puede aceptar dos electrones, pero lo hace de a un electrón a la vez.

La reacción general catalizada por este complejo es

$$\underset{\text{(Reducido)}}{NADH} + \underset{\text{(Oxidado)}}{CoQ} + 2\,H^+ \longrightarrow \underset{\text{(Oxidado)}}{NAD^+} + \underset{}{H^+} + \underset{\text{(Reducido)}}{CoQH_2}$$

Cada electrón transportado atraviesa una caída de potencial de ≈360 mV, equivalente a una $\Delta G^{\circ\prime}$ de -16,6 kcal/mol para los dos electrones transportados (véase fig. 8-13). Mucha de esta energía liberada es utilizada por el complejo NADH-CoQ reductasa para transportar cuatro protones a través de la membrana interna por molécula de NADH oxidada.

Succinato-CoQ reductasa (complejo II) La succinato deshidrogenasa, la enzima que oxida una molécula de succinato a fumarato en el ciclo del ácido cítrico, es un componente integral del complejo succinato-CoQ reductasa. Los dos electrones liberados en la conversión del succinato a fumarato se transfieren primero al FAD, luego a un transportador con hierro-azufre y finalmente a la CoQ (véase fig. 8-17). La reacción general catalizada por este complejo es

$$\underset{\text{(Reducido)}}{\text{Succinato}} + \underset{\text{(Oxidado)}}{CoQ} \longrightarrow \underset{\text{(Oxidado)}}{\text{fumarato}} + \underset{\text{(Reducido)}}{CoQH_2}$$

Aunque la $\Delta G^{\circ\prime}$ para esta reacción es negativa, la energía liberada es insuficiente para el bombeo de protones. Por consiguiente, el complejo succinato-CoQ reductasa no transloca protones a través de la membrana y no se genera ninguna fuerza protón-motriz en esta parte de la cadena respiratoria.

$CoQH_2$–citocromo *c* reductasa (complejo III) La $CoQH_2$ generada por el complejo I o por el complejo II dona dos electrones al complejo $CoQH_2$–citocromo *c* reductasa y regenera la CoQ oxidada. De manera concomitante, se liberan dos protones tomados en la cara citosólica hacia el espacio intermembrana, lo que genera parte de la fuerza protón-motriz. Dentro del complejo III, los electrones liberados primero se transfieren al grupo de hierro-azufre de una proteína dentro del complejo III y luego a dos citocromos de tipo *b* (b_L y b_H) o al citocromo c_1. Por último, los dos electrones se transfieren a dos moléculas de la forma oxidada del citocromo *c*, una proteína periférica soluble en agua que se difunde en el espacio intermembrana (véase fig. 8-17). Por cada par de electrones transferidos, la reacción general catalizada por el complejo $CoQH_2$–citocromo *c* reductasa es

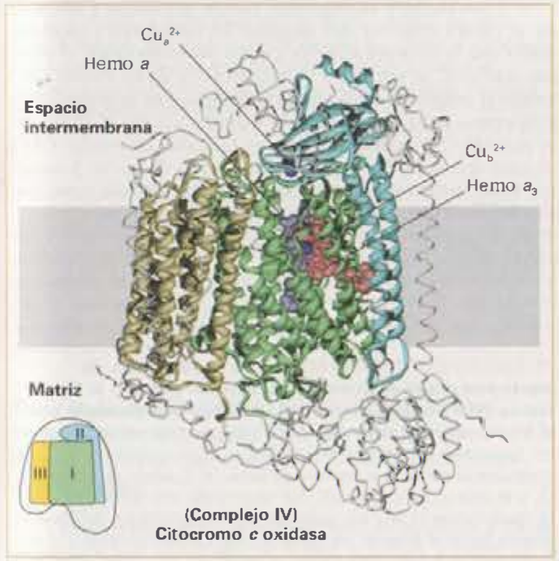
$$\underset{\text{(Reducido)}}{CoQH_2} + 2\ \underset{\text{(Oxidado)}}{\text{Cit } c^{3+}} \longrightarrow \underset{\text{(Oxidado)}}{CoQ} + 2\,H^+ + 2\ \underset{\text{(Reducido)}}{\text{Cit } c^{2+}}$$

La $\Delta G^{\circ\prime}$ para esta reacción es lo suficientemente negativa como para translocar dos protones adicionales desde la matriz mitocondrial a través de la membrana interna por cada par de electrones transferidos; esto involucra el ciclo Q protón-motriz que se comenta más adelante.

Citocromo *c* oxidasa (complejo IV) El citocromo *c*, luego de haber sido reducido por el complejo $CoQH_2$–citocromo *c* reductasa, transporta electrones, uno a la vez, al complejo citocromo *c* oxidasa (fig. 8-18). Dentro de este complejo, los electrones son transferidos, siempre de a uno, primero a un par de iones de cobre llamados Cu_a^{2+}, luego al citocromo *a*, después a otro complejo de ion cobre (Cu_b^{2+}), al citocromo a_3 y finalmente al O_2, el aceptor final de electrones, produciendo H_2O. Por cada par de electrones transferidos, la reacción general catalizada por el complejo citocromo *c* oxidasa es

$$\underset{\text{(Reducido)}}{2\ \text{Cit } c^{2+}} + 2\,H^+ + {}^1/_2\,O_2 \longrightarrow \underset{\text{(Oxidado)}}{2\ \text{Cit } c^{3+}} + H_2O$$

Durante el transporte de cada par de electrones a través del complejo citocromo *c* oxidasa, se translocan dos protones a través de la membrana.



▲ Fig. 8-18. Estructura molecular del centro del complejo citocromo *c* oxidasa en la membrana mitocondrial interna. La citocromo *c* oxidasa mitocondrial contiene 13 subunidades diferentes, pero el centro catalítico de la enzima consiste en sólo tres subunidades: I (verde), II (azul) y III (amarillo). La función de las subunidades restantes (blanco) no se conoce. Las citocromo *c* oxidasa bacterianas contienen sólo las tres subunidades catalíticas. Los grupos hemos *a* y a_3 se muestran como modelos tridimensionales violeta y anaranjado, respectivamente; los tres átomos de cobre son esferas azul oscuro. (Adaptado de T. Tsukihara et al., 1996, *Science* 272:1136.)

La CoQ y el citocromo *c* como lanzaderas de electrones móviles Los cuatro complejos transportadores de electrones recién descritos tienen movilidad lateral en la membrana mitocondrial interna; más aún, están presentes en cantidades desiguales y no forman contactos estables los unos con los otros. Estas propiedades imposibilitan la transferencia directa de electrones desde un complejo al siguiente. En cambio, los electrones son transportados desde un complejo a otro por difusión de la CoQ en la membrana y por el citocromo *c* en el espacio intermembrana, como se representa en la figura 8-17.

Los potenciales de reducción de los transportadores de electrones favorecen el flujo de electrones desde el NADH hacia el O_2

Como vimos en el capítulo 2, el **potencial de reducción** *E* para una reacción de reducción parcial

$$\text{Molécula oxidada} + e^- \rightleftharpoons \text{Molécula reducida}$$

es una medida de la constante de equilibrio de la reacción parcial. A excepción de los citocromos *b* en el complejo $CoQH_2$-citocromo *c* reductasa, el potencial estándar de reducción $E^{\circ\prime}$ de estos transportadores de la cadena respiratoria mitocondrial se incrementa constantemente desde el NADH hasta el O_2. Por ejemplo, para la reacción parcial

$$NAD^+ + H^+ + 2\,e^- \rightleftharpoons NADH$$

el valor del potencial estándar de reducción es –320 mV, equivalente a una $\Delta G^{\circ\prime}$ de +14,8 kcal/mol para la transferencia de dos electrones. Por lo tanto, esta reacción parcial tiende a proceder hacia la izquierda, es decir, hacia la oxidación del NADH a NAD^+.

En cambio, el potencial de reducción estándar para la reacción parcial

$$\text{Citocromo } c_{ox}\ (Fe^{3+}) + e^- \rightleftharpoons \text{Citocromo } c_{red}\ (Fe^{2+})$$

es +220 mV ($\Delta G^{\circ\prime}$ = –5,1 kcal/mol) para la transferencia de un electrón. Por lo tanto, esta reacción parcial tiende a proceder hacia la derecha, es decir, hacia la reducción del citocromo *c* (Fe^{3+}) al citocromo *c* (Fe^{2+}).

La reacción final en la cadena respiratoria, la reducción de O_2 a H_2O

$$2\,H^+ + {}^1/_2\,O_2 + 2e^- \longrightarrow H_2O$$

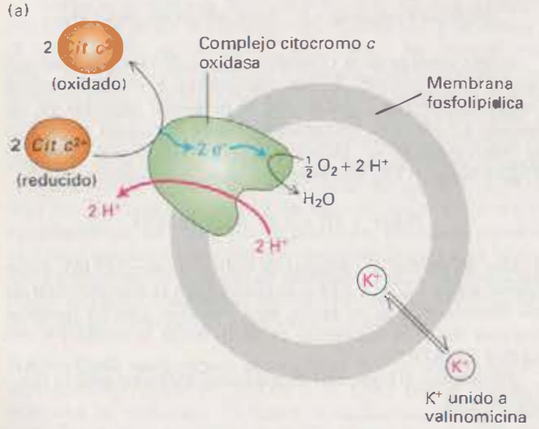
tiene un potencial estándar de reducción de +816 mV ($\Delta G^{\circ\prime}$ de –37,8 kcal/mol para la transferencia de dos electrones), el

más positivo en toda la serie; por ende esta reacción también tiende a proceder hacia la derecha.

Como se ilustra en la figura 8-13, el incremento constante en los valores de $E^{\circ\prime}$ y la disminución correspondiente en los valores de $\Delta G^{\circ\prime}$ de los transportadores en la cadena respiratoria favorecen el flujo de electrones desde el NADH y el succinato hacia el oxígeno.

La CoQ y tres complejos transportadores de electrones bombean protones hacia afuera de la matriz mitocondrial

Los complejos multiproteicos responsables del bombeo de protones acoplado al transporte de electrones fueron identificados al extraer selectivamente las membranas mitocondriales con detergentes, aislando cada uno de los complejos casi puros y luego preparando vesículas fosfolipídicas artificiales (véase fig. 7-5). Cuando a estos liposomas se añade un donador apropiado y un aceptor de electrones adecuado, tendrá lugar un cambio en el pH del medio si los complejos incluidos transportan electrones (fig. 8-19). Estudios de este tipo indican que el complejo NADH-CoQ reductasa transloca cuatro protones por par de electrones transportados, mientras que el complejo citocromo *c* oxidasa transloca dos protones por par de electrones transportado (o, de manera equivalente, por cada dos moléculas de citocromo *c* oxidada).

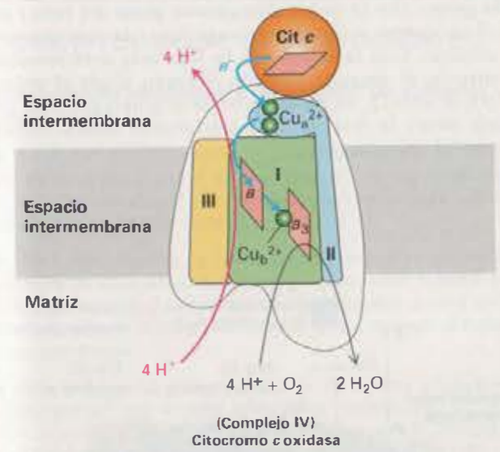


Los datos actuales sugieren que se transporta un total de 10 protones desde el espacio matricial a través de la membrana mitocondrial interna por cada par de electrones transferido del NADH al O_2 (véase fig. 8-17). Puesto que el complejo succinato-CoQ reductasa no transporta protones, sólo seis protones son transportados a través de la membrana por cada par de electrones transferido desde el succinato (o $FADH_2$) al O_2. Se conoce poco acerca del acoplamiento del flujo de electrones y la translocación de protones por el complejo NADH-CoQ reductasa. Se sabe más acerca del funcionamiento del complejo citocromo *c* oxidasa, que trataremos aquí. Los movimientos acoplados de electrones y protones mediados por el complejo $CoQH_2$–citocromo *c* reductasa, que involucra un mecanismo único, se describen por separado.

Después que el citocromo *c* es reducido por el complejo QH_2–citocromo *c* reductasa, es reoxidado por el complejo citocromo *c* oxidasa, el cual transfiere electrones al oxígeno. Como ya se dijo, la citocromo *c* oxidasa contiene tres iones cobre y dos grupos hemo (véase fig. 8-18). El flujo de electrones a través de estos transportadores se representa en la figura 8-20. Cuatro moléculas de citocromo *c* reducido se unen, una a la vez, a un sitio sobre la subunidad II de la oxidasa. Se transfiere un electrón desde el hemo de cada citocromo *c*, primero al Cu_a^{2+} fijado a la subunidad II, luego al hemo *a* unido a la subunidad I y finalmente al Cu_b^{2+} y al hemo a_3 que compone el centro reductor del oxígeno.

La oxidación y la reducción cíclica del hierro y el cobre en el centro reductor del oxígeno del citocromo *c* oxidasa, junto con la incorporación de cuatro protones desde el espacio matricial, se acoplan a la transferencia de los cuatro electrones al oxígeno y a la formación de agua. Los intermediarios propuestos en la reducción del oxígeno incluyen el anión peróxido (O_2^{2-}) y probablemente los radicales hidroxilo (OH·) al igual que complejos atípicos de átomos de hierro y oxígeno. Estos intermedios serían dañinos para la célula si escaparan del centro de reacción, pero rara vez lo hacen.

◀ FIGURA EXPERIMENTAL 8-19 La transferencia de electrones desde el citocromo *c* reducido (Cit c^{2+}) al O_2 a través del complejo citocromo *c* oxidasa está asociado con el transporte de protones. El complejo oxidasa se incorpora a los liposomas con el sitio de unión para el citocromo c posicionado sobre la superficie externa. (a) Cuando se añade el O_2 y el citocromo *c* reducido, los electrones son transferidos al O_2 para formar H_2O y los protones son transportados desde el interior hacia el exterior de las vesículas. La valinomicina y el K^+ se añaden al medio para disipar el gradiente de voltaje generado por la translocación de H^+, que de otra manera reduciría el número de protones que se mueven a través de la membrana. (b) El monitoreo del pH del medio revela una caída abrupta en el pH tras la adición de O_2. A medida que el citocromo c reducido se oxida completamente, los protones se filtran de nuevo hacia las vesículas y el pH del medio retorna a su valor inicial. Las mediciones muestran que se transportan dos protones por cada átomo de O reducido. Dos electrones son necesarios para reducir un átomo de O, pero el citocromo *c* transfiere sólo un electrón; por ende se oxidan dos moléculas de Cit c $^{2+}$ por cada O reducido. (Adaptado de B. Reynafarje et al., 1986, *J. Biol. Chem.* 261:8254.)



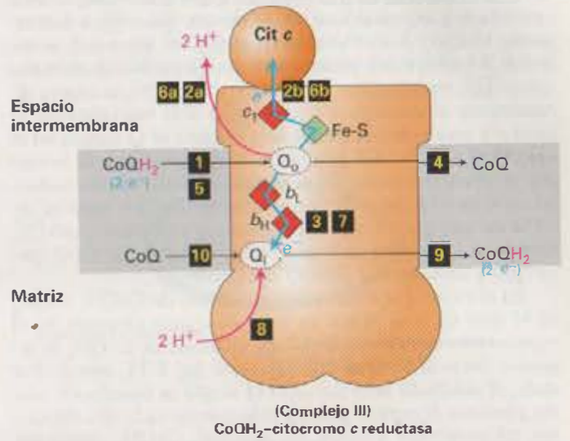
▲ Fig. 8-20. Descripción esquemática del complejo de la citocromo *c* oxidasa que muestra la vía del flujo de electrones desde el citocromo *c* reducido hacia el O_2. Los grupos hemo están representados por diamantes rosados. Las flechas azules indican el flujo de electrones. Cuatro electrones, liberados secuencialmente desde cuatro moléculas de citocromo *c* reducido, junto con cuatro protones de la matriz, se combinan con una molécula de O_2 para formar dos moléculas de agua. Adicionalmente, por cada electrón transferido desde el citocromo *c* al oxígeno, un protón es transportado desde la matriz al espacio intermembrana, o un total de cuatro por cada molécula de O_2 reducido a dos moléculas de H_2O.

Por cada cuatro electrones transferidos desde el citocromo *c* reducido a través de la citocromo *c* oxidasa (es decir, por cada molécula de O_2 reducido a dos moléculas de H_2O), se translocan cuatro protones desde el espacio matricial al espacio intermembrana (dos protones por par de electrones). Sin embargo, el mecanismo de translocación de estos protones no se conoce.

El ciclo Q incrementa el número de protones translocados a medida que los electrones fluyen a través del complejo $CoQH_2$–citocromo *c* reductasa

Experimentos como el representado en la figura 8-19 demostraron que se translocan cuatro protones a través de la membrana por par de electrones transportado desde la $CoQH_2$ a través del complejo $CoQH_2$–citocromo *c* reductasa. Por ende, este complejo transporta dos protones por electrón transferido, mientras que el complejo citocromo *c* oxidasa transporta sólo un protón por electrón transferido. Un mecanismo evolutivamente conservado, llamado *ciclo* Q, da cuenta del transporte de dos protones por un electrón por el complejo $CoQH_2$–citocromo *c* reductasa.

La $CoQH_2$ es generada por los complejos NADH-CoQ reductasa y succinato-CoQ reductasa y, como veremos, por el mismo complejo $CoQH_2$ –citocromo *c* reductasa. En todos los casos, una molécula del pool de $CoQH_2$ reducido en la membrana se une al sitio Q_o en el *lado (exterior) del espacio intermembrana* del complejo $CoQH_2$–citocromo *c* reductasa (fig. 8-21, paso 1). Una vez unido a este sitio, la $CoQH_2$ libera dos protones hacia el espacio intermembrana (paso 2a); esto representa dos de los cuatro protones bombeados por par de electrones transferido. El funcionamiento del ciclo Q conduce al bombeado de los otros dos pro-



En el sitio Q_o: 2 $CoQH_2$ + 2 Cit c^{3+} ⟶ 2 CoQ + 2 Cit c^{2+} + 2 e^- + 4 $H^+_{(afuera)}$
({4 H^+, 4 e^-}) ({2 e^-})

En el sitio Q_i: CoQ + 2 e^- + 2 $H^+_{(lado\ matricial)}$ ⟶ $CoQH_2$
({2 H^+, 2 e^-})

Ciclo neto de la Q (sumatoria de reacciones en Q_o y Q_i):

$CoQH_2$ + 2 Cit c^{3+} + 2 $H^+_{(lado\ matricial)}$ ⟶ CoQ + 2 Cit c^{2+} + 4 $H^+_{(afuera)}$
({2 H^+, 2 e^-}) ({2 e^-})

Por cada 2 e^- transferidos a través del complejo III hacia el citocromo *c*, se liberan 4 H^+ al espacio intermembrana

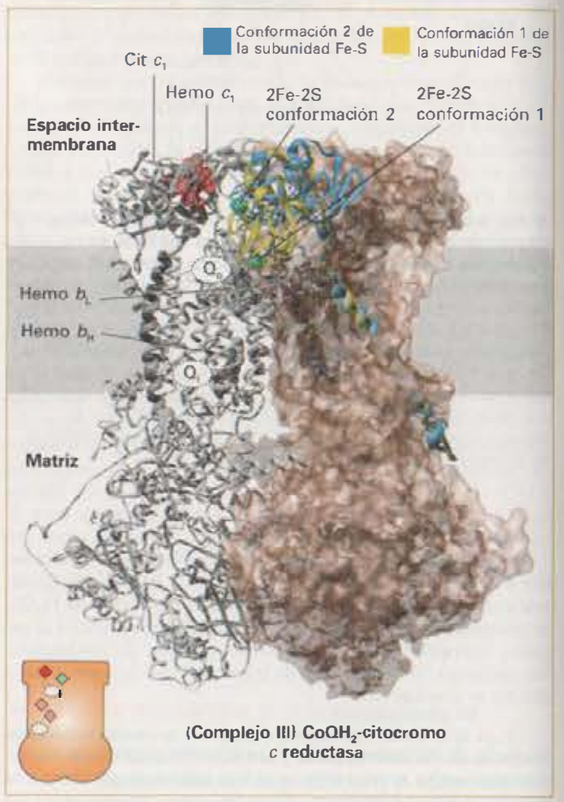
▲ Fig. 8-21. Ciclo Q. La $CoQH_2$ se une al sitio Q_o sobre el espacio intermembrana (lado externo) del complejo CoQ-citocromo *c* reductasa y la CoQ se une al sitio Qi sobre el lado (interno) de la matriz. Un electrón desde la $CoQH_2$ unido al Q_o viaja directamente al citocromo *c* vía un grupo de Fe-S y el citocromo *c*1. Los otros electrones se mueven a través de los citocromos *b* a la CoQ en el sitio Q_i y forman la semiquinona parcialmente reducida (Q^-). Simultáneamente, la $CoQH_2$ libera sus dos protones al espacio intermembrana. La CoQ ahora en el sitio Q_o se disocia y una segunda $CoQH_2$ se une allí. Al igual que antes, un electrón se mueve directamente al citocromo *c*1 y el otro a la Q^- en el sitio Q_i y forma, junto con dos protones tomados del espacio de la matriz, la $CoQH_2$, la cual luego se disocia. El resultado neto es que cuatro protones son translocados desde la matriz al espacio intermembrana por cada par de electrones transportados a través del complejo $CoQH_2$-citocromo *c* reductasa (abajo). Para más detalles véase el texto. (Adaptado de B. Trumpower, 1990, *J. Biol. Chem.* 265:11409 y E. Darrouzet et al., 2001, *Trends Biochem. Sci.* 26:445.)

tones. Para entender este ciclo, primero es necesario centrarse en los destinos de los dos electrones liberados por la $CoQH_2$ en el sitio Q_o. Uno de los dos electrones de la $CoQH_2$ es transportado, a través de una proteína de hierro azufre y del citocromo c_1, directamente al citocromo *c* (paso 2b). El otro electrón liberado de la $CoQH_2$ se mueve a través de los citocromos b_L y b_H y reduce parcialmente una molécula oxidada de CoQ unida al sitio Q_i sobre el *lado (interno) matricial* del complejo, formando un anión semiquinona Q^- de la CoQ (paso 3).

Tras la pérdida de dos protones y dos electrones, la ahora oxidada CoQ en el sitio Q_o se disocia (paso 4) y una segunda $CoQH_2$ se une al sitio (paso 5). Al igual que antes, la $CoQH_2$ libera dos protones en el espacio intermembrana (paso 6a), mientras que un electrón del $CoQH_2$ se mueve directamente al citocromo *c* (paso 6b) y el otro electrón se mueve a través de los citocromos *b* hasta el Q^- unido en el sitio Q_i (paso 7). Allí la adición de dos protones de la matriz produce una molécula de $CoQH_2$ completamente reducida en el sitio Q_i (paso 8). Esta molécula $CoQH_2$ luego se disocia del complejo $CoQH_2$–citocromo *c* reductasa (paso 9), liberando el Q_i para unir una nueva molécula de CoQ (paso 10) y comenzar el ciclo Q nuevamente.

En el ciclo Q se oxidan dos moléculas de $CoQH_2$ a CoQ en el sitio Q_o y se libera un total de cuatro protones en el espacio intermembrana, pero una molécula de $CoQH_2$ se regenera desde la CoQ al sitio Q_i (véase fig. 8-21, *abajo*). Por ende, el resultado *neto* del ciclo Q es que se translocan cuatro protones al espacio intermembrana por cada dos electrones transportados a través del complejo $CoQH_2$–citocromo *c* reductasa y aceptados por dos moléculas de citocromo *c*. Todos los protones translocados derivan de la matriz, tomados ya sea por el complejo NADH-CoQ reductasa o por el complejo $CoQH_2$–citocromo *c* reductasa durante la reducción de la CoQ. A pesar de que parece engorroso, el ciclo Q incrementa el número de protones bombeados por par de electrones que se mueven a través del complejo $CoQH_2$-citocromo *c* reductasa. El ciclo Q se halla en todas las plantas y animales al igual que en las bacterias. Su formación en un estadio muy temprano de la evolución celular debe de haber sido esencial para el éxito de todas las formas de vida como un modo de convertir la energía potencial de la coenzima Q reducida en la máxima fuerza protón-motriz a través de una membrana.

Aunque el modelo presentado en la figura 8-21 es compatible con numerosos estudios espectroscópicos y de mutagénesis sobre el complejo $CoQH_2$-citocromo *c* reductasa, plantea numerosas incógnitas. Por ejemplo, ¿cómo se liberan los dos electrones de la $CoQH_2$ en el sitio Q_o dirigidos a diferentes aceptores (citocromos c_1 y b_L)? Estudios previos implicaron un grupo de hierro azufre (2Fe-2S) en la transferencia de electrones, uno a la vez, desde el $CoQH_2$ en el sitio Q_o al citocromo c_1. Sin embargo, la estructura tridimensional del complejo $CoQH_2$ citocromo *c* reductasa recién determinada, que es una proteína dimérica, sugirió en un principio que el grupo 2Fe-2S está posicionado demasiado lejos del sitio Q_o para que un electrón "salte" a él. Los investigadores descubrieron luego que la subunidad que contiene al grupo 2Fe-2S tiene una bisagra flexible que le permite existir en dos estados conformacionales (fig. 8-22). En una conformación, el grupo 2Fe-2S está lo suficientemente cercano al sitio Q_o para captar un electrón desde la $CoQH_2$ allí unido. El movimiento de bisagra luego posiciona el grupo 2Fe-2S lo suficientemente cerca del hemo sobre el citocromo c_1 para que tenga lugar la transferencia del electrón. Con la subunidad Fe-S en esta conformación alternativa, el segundo electrón liberado desde el enlace $CoQH_2$ al sitio Q_o no puede moverse al grupo 2Fe-2S y tiene que tomar la ruta termodinámicamente menos favorable para el citocromo b_L.



▲ Fig. 8-22. Conformaciones tridimensionales alternativas de la subunidad Fe-S del complejo CoQ-citocromo *c* reductasa. En el complejo dimérico, los citocromos b_L y b_H están asociados con una subunidad y el grupo 2Fe-2S con la otra subunidad. La subunidad que contiene el grupo 2Fe-2S se muestra en sus dos estados conformacionales alternativos, que difieren principalmente en la porción de la proteína hacia el espacio intermembrana. En una conformación (amarillo), el grupo 2Fe-2S (verde) está posicionado cerca del sitio Q_o sobre el lado intermembrana de la proteína, capaz de tomar un electrón de la $CoQH_2$. En la conformación alternativa, (azul), el grupo 2Fe-2S está localizado de forma adyacente al hemo c_1 sobre el citocromo c_1 y es capaz de transferir un electrón a éste. (Adaptado de Z. Zhang et. al., 1998, *Nature* 392:678; véase también E. Darrouzet et al., 2001 *Trends Biochem. Sci.* 26:445.)

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 8.2

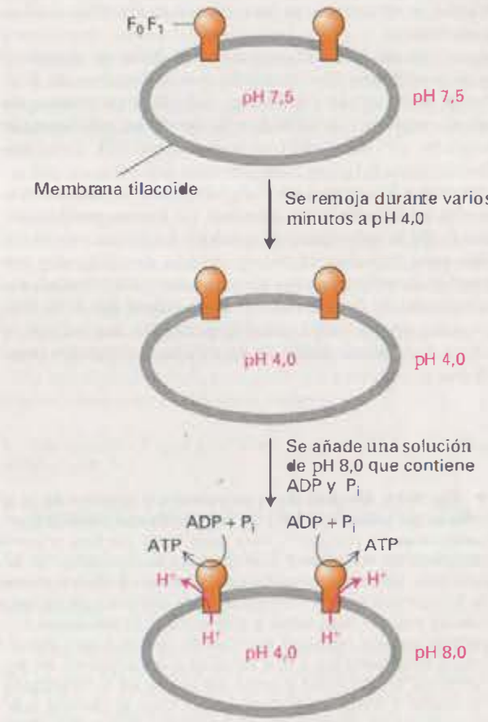
Transporte de electrones y generación de la fuerza protón-motriz

- La fuerza protón-motriz es una combinación de un gradiente de concentración de protones (pH) (cara exoplasmática > cara citosólica) y un potencial eléctrico (cara citosólica negativa) a través de una membrana.
- En la mitocondria, la fuerza protón-motriz es generada al acoplar el flujo electrónico de protones del NADH y el $FADH_2$ hacia el O_2 al transporte de protones cuesta arriba desde la matriz a través de la membrana interna al espacio intermembrana.
- Los principales componentes de la cadena respiratoria mitocondrial son cuatro complejos multiproteicos de la membrana interna: NADH-CoQ reductasa (I), succinato CoQ reductasa (II), $CoQH_2$ citocromo *c* reductasa (III) y citocromo *c* oxidasa (IV). El último complejo transfiere electrones al O_2 para formar H_2O.
- Cada complejo contiene uno o más grupos prostéticos; grupos de hierro-azufre, flavinas, grupos hemo y iones de cobre (véase cuadro 8-2). El citocromo *c*, que contiene hemo y la coenzima Q (CoQ) son transportadores móviles de electrones.
- Cada transportador de electrones acepta un electrón o un par de electrones de un transportador con un potencial de reducción menos positivo y transfiere el electrón a un transportador con un potencial de reducción más positivo. De esta manera los potenciales de reducción de los transportadores de electrones favorecen el flujo unidireccional de electrones desde el NADH y el $FADH_2$ al O_2 (véase fig. 8-13).
- Un total de 10 iones H^+ se translocan desde la matriz a través de la membrana interna por cada par de electrones que fluye desde el NADH al O_2 (véase fig. 8-17).
- El ciclo Q permite translocar cuatro protones (en lugar de dos) por par de electrones que se mueven a través del complejo $CoQH_2$-citocromo *c* reductasa (véase fig. 8-21).

8.3 Generación de la fuerza protón-motriz para procesos que requieren energía

La hipótesis de que una fuerza protón-motriz a través de la membrana mitocondrial interna es la fuente inmediata de energía para la síntesis de ATP fue propuesta en 1961 por Peter Mitchell. Casi todos los investigadores que trabajan en la fosforilación oxidativa y en la fotosíntesis se opusieron al principio a esta hipótesis. Prefirieron un mecanismo similar a la bien dilucidada fosforilación a nivel del sustrato de la glucólisis, en la cual la oxidación de una molécula del sustrato está directamente asociada con la síntesis de ATP. Por analogía, se pensó que el transporte de electrones a través de las membranas de los cloroplastos en las mitocondrias generaba un intermediario que contenía un enlace químico de alta energía (p. ej., un fosfato unido a una enzima por un enlace éster), el cual era luego utilizado para convertir P_i y ADP a ATP. Sin embargo, a pesar de los intensos esfuerzos de parte de numerosos investigadores, el intermediario nunca fue identificado.

Para obtener la evidencia definitiva que apoyara el papel de la fuerza protón-motriz en la síntesis de ATP hubo que esperar el surgimiento de nuevas técnicas para purificar y reconstituir membranas y proteínas de membrana de los orgánulos. El experimento con vesículas tilacoides de los cloroplastos, que contienen partículas F_0F_1, esquematizado en la figura 8-23, fue uno de los varios en demostrar que el complejo F_0F_1 es una enzima generadora de ATP y que la generación de ATP depende del movimiento de protones a favor



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 8-23 La síntesis de ATP por F_0F_1 depende de un gradiente de pH a través de la membrana. Las vesículas tilacoides de los cloroplastos aislados que contienen partículas F_0F_1 fueron equilibradas en la oscuridad con una solución amortiguadora a pH 4,0. Cuando el pH en el lumen tilacoide se hizo 4,0, las vesículas fueron mezcladas rápidamente con una solución a pH 8,0 que contenía ADP y P_i. Una brusca síntesis de ATP acompañó al movimiento transmembrana de protones conducido por el gradiente de concentración de H^+ 10.000 veces superior (10^{-4} M contra 10^{-8} M). En experimentos similares en los que se utilizaron preparaciones "al revés" de vesículas mitocondriales, un potencial eléctrico de membrana generado artificialmente también condujo a la síntesis de ATP.

de un gradiente electroquímico. Con la aceptación general del mecanismo quimioosmótico de Mitchell, los investigadores centraron su atención en la estructura y el funcionamiento del complejo F_0F_1.

Algunas proteínas de la membrana plasmática bacteriana catalizan el transporte de electrones y la síntesis acoplada de ATP

Aunque las bacterias carecen de membranas internas, las bacterias aerobias llevan a cabo la fosforilación oxidativa mediante los mismos procesos que tienen lugar en la mitocondria eucarionte. Las enzimas que catalizan las reacciones de la vía glucolítica y del ciclo del ácido cítrico están presentes en el citosol de las bacterias; las enzimas que oxidan el NADH a NAD^+ y transfieren los electrones al O_2, el aceptor final de electrones, se localizan en la membrana plasmática bacteriana.

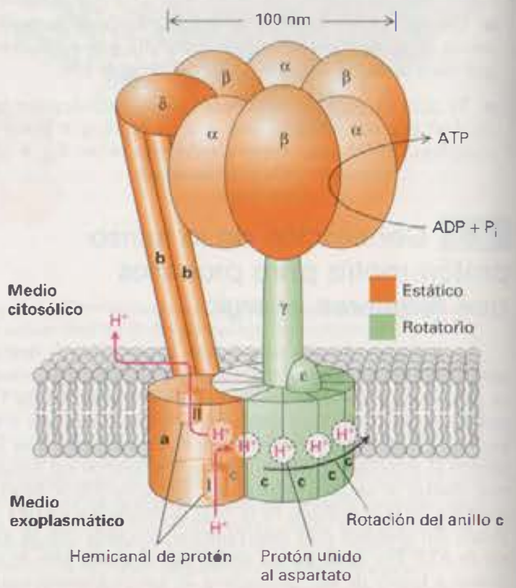
El movimiento de electrones a través de estos transportadores de membrana está asociado con el bombeo de protones fuera de la célula (véase fig. 8-2). El movimiento de protones de regreso a la célula, a favor de su gradiente de concentración, está asociado con la síntesis de ATP. Los complejos bacterianos F_0F_1 son esencialmente idénticos en estructura y función a los complejos F_0F_1 mitocondriales, pero son más simples para purificar y estudiar. La fuerza protón-motriz a través de la membrana plasmática bacteriana también se emplea para impulsar la incorporación de nutrientes como los azúcares utilizando los simportadores de protón/azúcar y la rotación de flagelos bacterianos (véase fig. 8-1). Como ya vimos, una bacteria aerobia primitiva fue tal vez la progenitora de la mitocondria en las células eucariontes (véase fig. 8-3).

La ATP sintasa comprende dos complejos multiproteicos denominados F_0 y F_1

El complejo F_0F_1, o ATP sintasa, tiene dos componentes principales, que son proteínas multiméricas (fig. 8-24). El componente F_0 contiene tres tipos de proteínas integrales de membrana, designadas **a**, b y **c**. En las bacterias y en las mitocondrias de levadura la composición más frecuente de la subunidad es $\mathbf{a}_1\mathbf{b}_2\mathbf{c}_{10}$, pero los complejos F_0 de las mitocondrias animales tienen 12 subunidades c y las de los cloroplastos tienen 14. En todos los casos las subunidades **c** componen un anillo con forma de rosquilla en el plano de la membrana. Las subunidades **a** y b están rígidamente conectadas entre sí pero no al anillo de subunidades c.

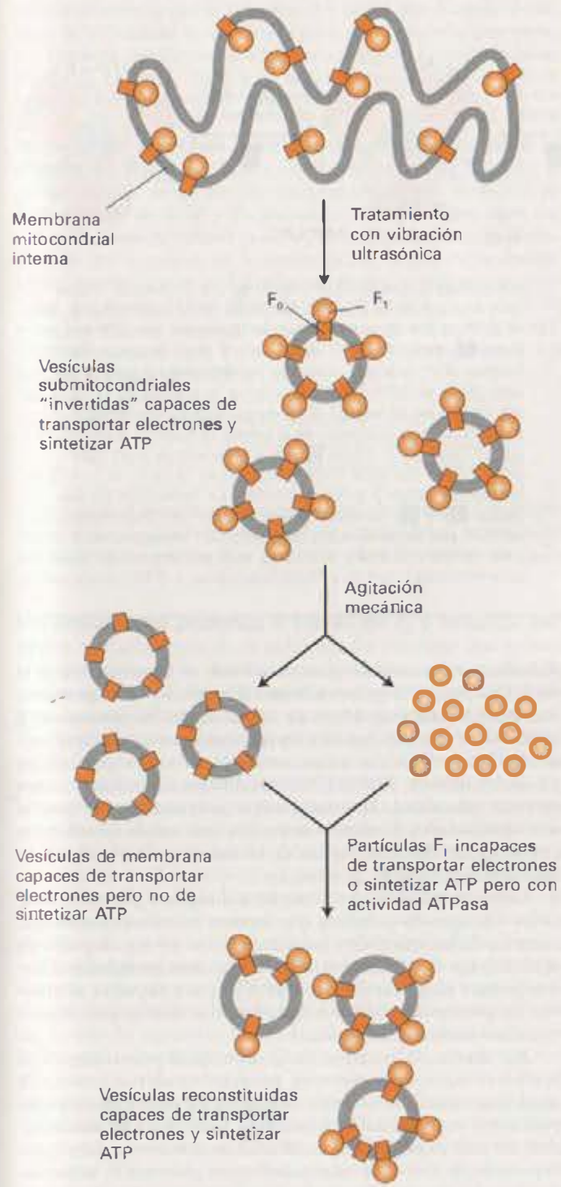
La porción F_1 es un complejo soluble en agua de cinco polipéptidos distintos con la composición $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$. La parte inferior de la subunidad F_1 γ es un resorte enrollado que encaja en el centro del anillo de subunidades c de F_0 y aparece adherido rígidamente a éste. La subunidad F_1 ε está adherida a γ y también forma contactos rígidos con varias de las subunidades c de F_0. Las subunidades F_1 α y β se asocian en orden alternado para formar un hexámero, αβαβαβ, o hexámero $(\alpha\beta)_3$, que reposa encima de la larga subunidad γ simple. La subunidad F_1 δ está permanentemente unida a una de las subunidades α F_1 y también a la subunidad b de F_0. De esta manera, las subunidades F_0 **a** y **b**, la subunidad δ y el hexámero $(\alpha\beta)_3$ del complejo F_1 forman una estructura rígida anclada a la membrana. Las subunidades **b** tipo bastón forman un "inductor" que evita que el hexámero $(\alpha\beta)_3$ se mueva mientras reposa sobre la subunidad γ (véase fig. 8-24).

Cuando la ATP sintasa está inmersa en una membrana, el componente F_1 forma una protuberancia que se proyecta desde la cara citosólica. Como se demuestra en el experimento representado en la figura 8-25, las vesículas submitocondria-



▶ Fig. 8-24. Modelo de la estructura y función de la ATP sintasa (el complejo F_0F_1) de la membrana plasmática bacteriana. La porción F_0 está constituida por tres proteínas integrales de membrana: una copia de **a**, dos copias de **b** y en promedio 10 copias de **c** dispuestas en un anillo en el plano de la membrana. Dos hemicanales de protones se sitúan en la interfaz entre la subunidad **a** y el anillo **c**. El hemicanal I permite que los protones se muevan, uno a la vez, desde el medio exoplasmático y que se unan al aspartato-61 en el centro de la subunidad **c** cerca del centro de la membrana. El hemicanal II (luego de la rotación del anillo **c**) permite que los protones se disocien desde el aspartato y se muevan hacia el medio citosólico. La porción F_1 contiene tres copias cada una de las subunidades α y β que forman el hexámero apoyado encima de la subunidad γ individual con forma de bastón, que está insertada en el anillo c de F_0. La subunidad ε está rígidamente adherida a la subunidad γ y también a varias de las subunidades c. La subunidad δ conecta permanentemente una de las subunidades α en el complejo F_1 a la subunidad **b** del F_0. De esta manera, las subunidades **a** y **b** del F_0 y la subunidad δ del F_1 y el hexámero $(\alpha\beta)_3$ forman una estructura rígida anclada en la membrana (anaranjada). Durante el flujo de protones, el anillo **c** y las subunidades adheridas ε y γ de F_1 rotan como una unidad (verde) y provocan los cambios conformacionales en las subunidad β de F_1 que conducen a la síntesis del ATP. (Adaptado de M. J. Schnitzer, 2001, *Nature* 410:278, y P. D. Boyer, 1999, *Nature* 402:247.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación localizada: Síntesis de ATP



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 8-25 Las partículas mitocondriales F_1 son requeridas para la síntesis de ATP, pero no para el transporte de electrones. Las vesículas "al revés" de la membrana que carecen de F_1 y retienen los complejos de transporte de electrones se preparan como se ha indicado. Aunque estas pueden transferir electrones desde el NADH hacia el O_2, no pueden sintetizar ATP. La subsiguiente adición de partículas de F_1 reconstituye la estructura nativa de la membrana y restablece la capacidad para la síntesis de ATP. Cuando se desprenden de la membrana, las partículas F_1 exhiben actividad de ATPasa.

les a las cuales se les extrae el F_1 por agitación mecánica no pueden catalizar la síntesis de ATP; cuando las partículas F_1 se reasocian con estas vesículas, otra vez se tornan completamente activas en la síntesis de ATP. Debido a que el F_1 separado de las membranas es capaz de catalizar la hidrólisis de ATP, ha sido denominado ATPasa F_1; sin embargo su función en las células es sintetizar ATP. Examinaremos cómo lo hace en la sección siguiente.

La rotación de la subunidad γ de F_1, conducida por los movimientos de protones a través de F_0, impulsa la síntesis de ATP

Cada una de las tres subunidades β en el complejo F_0F_1 completo puede unir ADP y P_i y catalizar la síntesis de ATP. Sin embargo, la asociación entre el flujo de protones y la síntesis de ATP debe ser indirecta, puesto que los sitios de unión a nucleótido sobre las subunidades β de F_1, donde tiene lugar la síntesis de ATP, se encuentran a 9-10 nm de la superficie de la membrana mitocondrial. El modelo más ampliamente aceptado para la síntesis de ATP por el complejo F_0F_1 –el *mecanismo de cambio de afinidad de unión*– propone precisamente esa asociación indirecta (fig. 8-26).

De acuerdo con este mecanismo, la energía liberada por el movimiento "cuesta abajo" de protones a través de F_0 impulsa directamente la rotación del anillo de la subunidad c junto con sus subunidades γ y ε (véase fig. 8-24). La subunidad γ actúa como una leva o un eje rotativo, cuyos movimientos dentro del F_1 provocan cambios cíclicos en la conformación de las subunidades β. Como se esquematiza en la figura 8-26, la rotación de la subunidad γ en relación con el hexámero fijo $(\alpha\beta)_3$ provoca que el sitio de unión al nucleótido de cada subunidad β realice un ciclo a través de tres estados conformacionales en el siguiente orden:

1. Un estado ● que une muy poco el ATP y débilmente el ADP y el P_i.

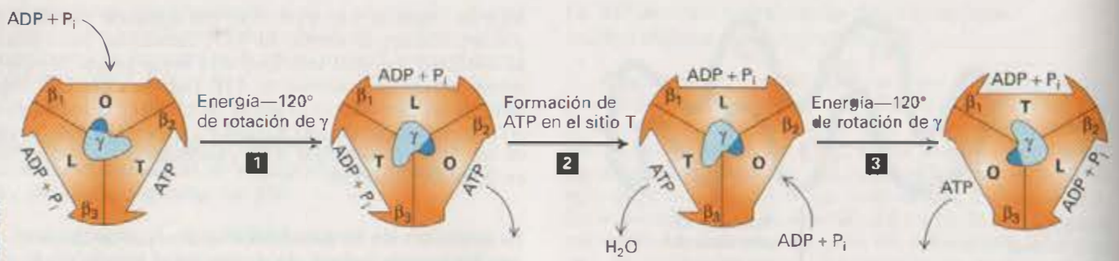
2. Un estado L que une el ADP y el P_i con mayor fuerza.

3. Un estado T que une el ADP y el P_i tan apretadamente que forman ATP de manera espontánea y que une al ATP con mucha fuerza.

Una rotación final de γ retorna las subunidades β al estado ●, por ende libera ATP y comienza el ciclo nuevamente. El ATP o el ADP también se fija a los sitios alostéricos o reguladores sobre las tres subunidades α; esta unión modifica la velocidad de la síntesis de ATP de acuerdo con el nivel de ATP y ADP en la matriz, pero no participa directamente en la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i.

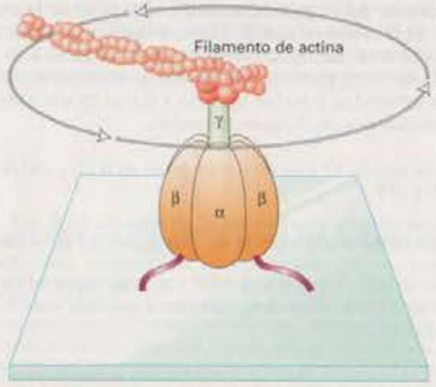
Diversos tipos de evidencia avalan el mecanismo de cambio de afinidad de unión, que ahora suele aceptarse. Primero, estudios bioquímicos demostraron que una de las tres subunidades β sobre partículas F_1 aisladas puede unir fuertemente el ADP y el P_i y luego formar ATP, el cual permanece fuertemente unido. El ΔG medido para esta reacción es cercano a cero, lo que indica que una vez que el ADP y el P_i están fijados a lo que ahora se llama el estado T de una subunidad β, forman ATP espontáneamente. Más importante aún, la disociación del ATP unido de la subunidad β sobre partículas de F_1 aisladas ocurre de manera lentísima. Este hallazgo sugiere que la disociación de ATP tendría que ser im-

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación focalizada: Síntesis de ATP



▲ Fig 8-26. Mecanismo de cambio en la afinidad de unión en la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i por el complejo F_0F_1. Esta vista mira desde la parte superior de F_1 respecto del plano de la superficie de la membrana (véase fig. 8-24). Cada una de las subunidades β de F_1 se alternan entre tres estados conformacionales que difieren en su afinidad por el ATP, el ADP y el P_i. Paso **1**: Después de que el ADP y el P_i se unen a una de las tres subunidades β (aquí, arbitrariamente designadas β_1) cuyo sitio de unión a nucleótidos se encuentra en la conformación O (abierta), el flujo de protones impulsa una rotación de 120° de la subunidad γ (con relación a las subunidades β fijas). Esto provoca un incremento de la afinidad de unión de la subunidad β_1 por el ADP y el P_i a L (bajo), un incremento de la afinidad de unión de la subunidad β_3 por el ADP y el P_i de L a T (fuerte), y una disminución de la afinidad de unión de la subunidad β_2 por el ATP de T a O, que provoca la liberación del ATP unido. Paso **2**: El ADP y el P_i en el sitio T (aquí la subunidad β_3) forman ATP, una reacción que no requiere un aporte de energía, y el ADP y el P_i se unen a la subunidad β_2, que se encuentra en el estado O. Esto genera un complejo F_1 idéntico al que comenzó el proceso (*izquierda*) excepto que está rotado 120°. Paso **3**: Otra rotación de γ en 120° provoca los cambios conformacionales O → L → T → O en las subunidades β arriba descritas. La repetición de los pasos **1**, y **2**, conduce a la formación de tres moléculas de ATP por cada rotación de γ de 360°. (Adaptado de P. Boyer, 1989 *FASEB J.* 3:2164 y Y. Zhou et. al., 1997, *Proc. Nat'l. Acad. Sci* USA 94:10583.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Rotación del filamento de actina unido a la ATP sintasa



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 8-27 La rotación de la subunidad γ del complejo F_1 con relación al hexámero $(\alpha\beta)_3$ puede observarse con el microscopio. Los complejos F_1 fueron diseñados para que contengan subunidades β con una secuencia His_6 adicional, lo que hace que se adhieran a una placa de vidrio cubierta con un reactivo metálico que se une a la histidina. La subunidad γ de los complejos F_1 diseñados fue unida en forma covalente a un filamento de actina marcado con fluorescencia. Cuando se los observó en el microscopio de fluorescencia, los filamentos de actina rotaban en sentido antihorario en pasos de 120° en presencia de ATP, impulsado por la hidrólisis de ATP catalizada por las subunidades β. (Adaptado de H. Noji 1997, Nature 386:299 y R Yasuda et al., 1998 Cell 93:1117. Véase también K. Nishio et al., 2002, *Proc. Nat'l. Acad. Sci* 97:13448, para otra forma de demostrar la rotación de las subunidades α y β con relación al anillo de subunidades **c**.)

pulsada por un cambio conformacional en la subunidad β, el cual, a su vez, sería provocado por el movimiento de protones.

Análisis cristalográficos de rayos X del hexámero (α β) arribaron a una conclusión sorprendente: aunque las tres subunidades son idénticas en secuencia y estructura general, los sitios de unión de ADP/ATP tienen diferentes conformaciones en cada subunidad. La conclusión más razonable fue que las tres subunidades β rotaron entre los tres estados conformacionales, con diferentes sitios de unión al nucleótido, en una reacción dependiente de energía.

En otros estudios, los complejos intactos F_0F_1 fueron tratados con agentes químicos que forman enlaces cruzados que unen en forma covalente las subunidades γ y ε y el anillo de subunidades c. La observación de que esos complejos tratados podían sintetizar ATP o usar ATP para impulsar el bombeo de protones indica que las proteínas unidas por enlaces cruzados suelen rotar juntas.

Por último, la rotación de la subunidad γ con relación al hexámero $(\alpha\beta)_3$ fijo, como se propuso en el mecanismo de cambio de unión, se observó directamente en el ingenioso experimento representado en la figura 8-27. En una modificación de este experimento en el cual se adhirieron partículas diminutas de oro a la subunidad γ, se observaron velocidades de rotación de 134 revoluciones por segundo. Recordando que se piensa que la hidrólisis de 3 ATP impulsa una revolución (véase fig. 8-26), este resultado es cercano a la velocidad, determinada experimentalmente, de la hidrólisis de ATP por los complejos F_0F_1: alrededor de 400 ATP por segundo. En un experimento relacionado, una subunidad γ conectada a una subunidad ε y a un anillo de subunidades c fue vista rotar con relación al hexámero $(\alpha\beta)_3$ fijo. La rotación de la subunidad γ en estos experimentos fue impulsada por la hidrólisis de ATP, la inversa del proceso normal en el cual el movimiento de protones a través del complejo F_0 conduce la rotación de la subunidad γ. Sin embargo, estas observaciones establecieron que la subunidad γ, junto con el anillo c unido y la subunidad ε, en efecto gira, conduciendo, por ende, los cambios conformacionales requeridos en las subunidades β para la unión de ADP y P_i, seguidos por la síntesis y la liberación subsiguiente de ATP.

Número de protones translocados requeridos para la síntesis de ATP. Un cálculo simple indica que se requiere el pasaje de más de un protón para sintetizar una molécula de ATP a partir de ADP y P_i. Aunque el ΔG para esta reacción en condiciones normales es de +7,3 kcal/mol, a la concentración de los reactivos en la mitocondria, el ΔG es probablemente mayor (+10 a +12 kcal/mol). Podemos calcular la cantidad de energía libre liberada por el pasaje de 1 mol de protones a favor de un gradiente electroquímico de 220 mV (0,22 V) a partir de la ecuación de Nernst, poniendo $n = 1$ y midiendo el ΔE en voltios:

$$\Delta G \text{ (cal/mol)} = -nF\Delta E = -(23{,}062 \text{ cal}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1})\,\Delta E$$
$$= (23{,}062 \text{ cal}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1})(0{,}22 \text{ V})$$
$$= -5.074 \text{ cal/mol, o } -5{,}1 \text{ kcal/mol}$$

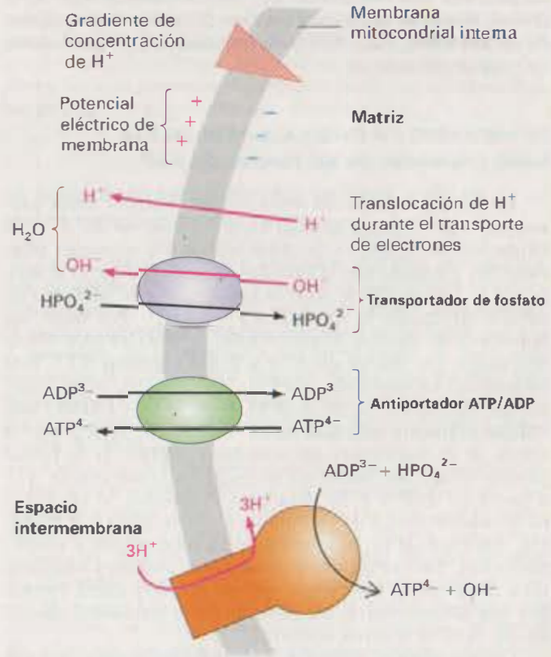
Puesto que el movimiento cuesta abajo de 1 mol de protones libera apenas algo más de 5 kcal de energía libre, se requiere el pasaje de al menos dos protones para la síntesis de cada molécula de ATP a partir del ADP y el P_i.

Movimiento de protones a través de F_0 y rotación del anillo c. Cada copia de la subunidad c contiene dos hélices α que atraviesan la membrana y forman una horquilla. Se piensa que un residuo de aspartato, Asp61, en el centro de una de estas hélices participa en el movimiento de protones. Las modificaciones químicas de este aspartato por el veneno diciclohexilcarbodiimida o su mutación a alanina bloquea específicamente el movimiento de protones a través de F_0. De acuerdo con un modelo actual, dos hemicanales de protones se sitúan en la interfaz entre la subunidad a y el anillo c (véase fig. 8-24). Se cree que los protones se mueven de a uno a la vez a través del hemicanal I desde el medio exoplasmático y se unen a la cadena lateral carboxilada sobre el Asp61 de una subunidad c. La unión de un protón a este aspartato produciría un cambio conformacional en la subunidad c, provocando que se mueva con relación a la subunidad a fija o, de manera equivalente, que rote en el plano de la membrana. Esta rotación traería la subunidad c adyacente, con su cadena lateral de aspartato ionizada, al canal I, permitiendo por ende que reciba un protón y, en consecuencia, se mueva con relación a la subunidad a. La rotación continua del anillo c, debido a la unión de protones a las subunidades c adicionales, alinearía finalmente la primera subunidad c que contiene un Asp61 con el segundo hemicanal (II), que está conectado al citosol. Entonces, el protón sobre el residuo aspartilo podría disociarse (formando un aspartato ionizado) y moverse hacia el medio citosólico.

Puesto que la subunidad γ de F_1 está adherida con fuerza al anillo c de F_0, la rotación del anillo c asociado con el movimiento de protones provoca la rotación de la subunidad γ. De acuerdo con el mecanismo de cambio de fijación, una rotación de 120° de γ impulsa la síntesis de un ATP (véase fig. 8-26). De esta manera la rotación completa de 360° del anillo c generaría tres ATP. En *E. coli*, en la cual la composición de F_0 es $a_1b_1c_{10}$, el movimiento de 10 protones impulsa una rotación completa y, por lo tanto, la síntesis de tres ATP. Este valor coincide con los datos experimentales acerca del flujo de protones durante la síntesis de ATP y proporciona evidencia indirecta para el modelo que acopla el movimiento de protones a la rotación del anillo c representado en la figura 8-24. El F_0 de los cloroplastos contiene 14 subunidades c por anillo y sería necesario para la síntesis de tres ATP el movimiento de 14 protones. No está claro por qué estos complejos, que por otra parte serían similares al F_0F_1, han evolucionado para tener proporciones diferentes de H^+:ATP.

El intercambio de ATP-ADP a través de la membrana mitocondrial interna es impulsado por la fuerza protón-motriz

Además de impulsar la síntesis de ATP, la fuerza protón-motriz a través de la membrana mitocondrial interna también impulsa el intercambio de ATP formado por fosforilación oxidativa dentro de la mitocondria por el ADP y el P_i del citosol. Este intercambio, requerido para que continúe la fosforilación oxidativa, es mediado por dos proteínas de la membrana interna: un *transportador de fosfato* (antiportador HPO_4^{2-}/OH^-) y un *antiportador ATP/ADP* (fig. 8-28).



▲ Fig. 8-28. Sistema de transporte de fosfato y ATP/ADP de la membrana mitocondrial interna. La acción coordinada de dos antiportadores (violeta y verde) se traduce en la incorporación de un ADP^{3-} y un HPO_4^{2-} en intercambio por un ATP^{4-}, un proceso impulsado por la translocación hacia afuera de un protón durante el transporte de electrones. La membrana externa no se muestra aquí porque es permeable a moléculas menores de 5000 Da.

El transportador fosfato cataliza la entrada de un HPO_4^{2-} asociado con la exportación de un OH^-. De igual forma, el antiportador ATP/ADP permite que una molécula de ADP entre sólo si una molécula de ATP sale simultáneamente. El antiportador ATP/ADP, un dímero de dos subunidades de 30.000-Da, constituye el 10-15% de la proteína en la membrana interna, por lo que es una de las proteínas mitocondriales más abundantes. El funcionamiento de los dos antiportadores juntos produce un flujo de un ADP y un P_i hacia adentro y un flujo de un ATP junto con un OH^- hacia afuera. Cada OH^- transportado hacia afuera se combina con un protón, translocado durante el transporte de electrones al espacio intermembrana, para formar H_2O. Esto impulsa toda la reacción en la dirección de la salida de ATP y de la entrada de ADP y P_i.

Debido a que algunos de los protones translocados fuera de la mitocondria durante el transporte de electrones proveen la energía (al combinarse con el OH^- transportado hacia afuera) para el intercambio de ATP-ADP, menos protones están disponibles para la síntesis de ATP. Se estima que por cada cuatro protones translocados hacia afuera, tres se utilizan para sintetizar una molécula de ATP y uno, para impulsar la salida de ATP desde la mitocondria a cambio de ADP y P_i. Este gasto de energía del gradiente de concentración de protones para sacar ATP desde la mitocondria a cambio de ADP y P_i asegura una alta relación de ATP con respecto al ADP en el citosol, donde se utiliza la hidrólisis del enlace fosfoanhidrido de alta energía del ATP para impulsar muchas reacciones que requieren energía.

La velocidad de oxidación mitocondrial suele depender de los niveles de ADP

De hecho, cuando las mitocondrias aisladas están provistas de NADH (o $FADH_2$), O_2 y P_i, pero no de ADP, la oxidación de NADH y la reducción de O_2 terminan rápidamente, a medida que la cantidad de ADP endógeno se agota por la formación de ATP. Si luego se añade ADP, se restablece enseguida la oxidación de NADH. Por ende, las mitocondrias pueden oxidar $FADH_2$ y NADH sólo mientras existe una fuente de ADP y P_i para generar ATP. Este fenómeno, denominado *control respiratorio*, tiene lugar porque la oxidación de NADH, succinato o $FADH_2$ está obligatoriamente asociada con el transporte de protones a través de la membrana mitocondrial interna. Si la fuerza protón-motriz resultante no se disipa en la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i (o para otro propósito), el gradiente de la concentración de protones transmembrana y el potencial eléctrico de la membrana se incrementarán a niveles muy altos. En este punto, el bombeo de protones adicionales a través de la membrana interna requiere tanta energía que por último cesará, bloqueando así la oxidación asociada del NADH u otros sustratos.

Ciertos venenos, llamados desacoplantes, tornan la membrana mitocondrial interna permeable a los protones. Un ejemplo es el producto químico soluble en lípidos 2,4-dinitrofenol (DNP), que puede fijar y liberar protones de manera reversible y transportarlos a través de la membrana interna desde el espacio intermembrana hacia la matriz. Como resultado, el DNP disipa la fuerza protón-motriz realizando un cortocircuito en el gradiente de concentración de protones transmembrana y en el potencial eléctrico de la membrana. Los desacoplantes como el DNP suprimen la síntesis de ATP y vencen el control respiratorio, lo que permite que se produzca la oxidación de NADH culquiera que sea el nivel de ADP. La energía liberada por la oxidación de NADH en presencia de DNP se convierte en calor.

La mitocondria de la grasa parda contiene un desacoplante de la fosforilación oxidativa

El *tejido de la grasa parda*, cuyo color se debe a la abundancia de mitocondrias, está especializado en la generación de calor. En cambio, el *tejido de la grasa blanca* lo está en el almacenamiento de grasa y contiene relativamente pocas mitocondrias.

La membrana interna de las mitocondrias de la grasa parda contiene *termogenina*, una proteína que funciona como un desacoplante natural de la fosforilación oxidativa. Al igual que los desacoplantes sintéticos, la termogenina disipa la fuerza protón-motriz a través de la membrana mitocondrial interna y convierte la energía liberada por la oxidación de NADH en calor. La termogenina es un transportador de protones, no un canal de protones y transporta protones a través de la membrana a una velocidad que es un millón de veces más lenta que la de los canales iónicos típicos. Su secuencia de aminoácidos es similar a la del antiportador mitocondrial ATP/ADP y funciona a una velocidad que es característica de otros transportadores (véase fig. 7-2).

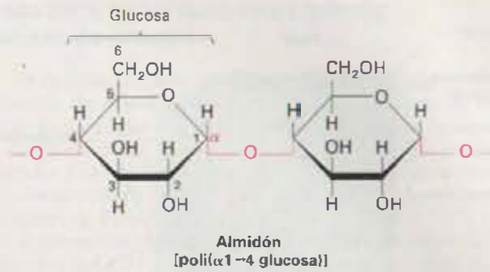
Las condiciones ambientales regulan la cantidad de termogenina en las mitocondrias de la grasa parda. Por ejemplo, durante la adaptación de las ratas al frío, la capacidad de sus tejidos para generar calor se incrementa por la inducción de la síntesis de termogenina. En los animales adaptados al frío, la termogenina puede constituir más del 15% del total de proteínas en la membrana mitocondrial interna.

Los seres humanos adultos poseen poca grasa parda, pero los niños tienen gran cantidad. En los recién nacidos, la termogénesis producida en las mitocondrias de la grasa parda es vital para la supervivencia, al igual que lo es en los mamíferos en hibernación. En mamíferos marinos y otros animales naturalmente aclimatados al frío, las mitocondrias de las células musculares contienen termogenina; como resultado, gran parte de la fuerza protón-motriz se utiliza para generar calor y mantener, por lo tanto, la temperatura corporal.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 8.3

Generación de la fuerza protón-motriz para procesos que requieren energía

- El complejo multiproteico F_0F_1 cataliza la síntesis de ATP a medida que los protones fluyen de regreso a través de la membrana mitocondrial interna (membrana plasmática en las bacterias) a favor de su gradiente electroquímico de protones.
- El F_0 contiene un anillo de 10-14 subunidades c rígidamente unido a la subunidad γ con forma de bastón y a la subunidad ε del F_1. Apoyada encima de la subunidad γ se encuentra la protuberancia hexamérica de F_1 [$(\alpha\beta)_3$], la cual se proyecta hacia el interior de la matriz mitocondrial (el citosol en las bacterias). Las tres subunidades β son los sitios de síntesis de ATP (véase fig. 8-24).
- El movimiento de protones a través de la membrana por medio de dos hemicanales en la interfaz de la subunidad F_0 a y el anillo c impulsa la rotación del anillo c con sus unidades F_1 ε y γ adheridas.
- La rotación de la subunidad F_1 γ induce cambios en la conformación de los sitios de unión a los nucleótidos en las subunidades F_1 β (véase fig. 8-26). Por medio de este mecanismo de cambio de unión, las subunidades β fijan el ADP y el P_i, y los condensan para formar ATP al que luego liberan.
- La fuerza protón-motriz también impulsa la captación de P_i y ADP desde el citosol en intercambio con ATP mitocondrial y OH^-, reduciendo de esta manera parte de la energía disponible para la síntesis de ATP.
- La oxidación mitocondrial del NADH y la reducción del O_2 continuas son dependientes de la cantidad suficiente de ADP presente. Este fenómeno, denominado *control respiratorio*, es un mecanismo importante para coordinar la oxidación y la síntesis de ATP en la mitocondria.
- En la grasa parda, la membrana mitocondrial interna contiene termogenina, un transportador de protones que convierte la fuerza protón-motriz en calor. Ciertas sustancias químicas (p. ej., el DNP) ejercen el mismo efecto, desacoplando la fosforilación oxidativa del transporte de electrones.



▲ **Fig. 8-29. Estructura del almidón.** Este gran polímero de la glucosa y el disacárido sacarosa (véase fig. 2-17) son los principales productos finales de la fotosíntesis. Ambos están constituidos por azúcares de seis carbonos.

8.4 Etapas de la fotosíntesis y pigmentos que absorben luz

Ahora dirigiremos nuestra atención a la fotosíntesis, el segundo proceso principal para la síntesis de ATP. En las plantas la fotosíntesis tiene lugar en los cloroplastos, grandes orgánulos ubicados casi siempre en las células de las hojas. Los principales productos finales son dos carbohidratos que son polímeros de los azúcares hexosa (de seis carbonos): la sacarosa, un disacárido de glucosa-fructosa (véase fig. 2-17) y el almidón de las hojas, un gran polímero de glucosa insoluble que es el principal carbohidrato de almacenamiento en las plantas superiores (fig. 8-29). El almidón se sintetiza y almacena en los cloroplastos. La sacarosa se sintetiza en el citosol a partir de precursores de tres carbonos generados en el cloroplasto; es transportada a los tejidos vegetales no fotosintéticos (no verdes, p. ej., raíces y semillas), los cuales, para obtener energía, metabolizan la sacarosa por medio de las vías descritas en las secciones anteriores. La fotosíntesis en las plantas, al igual que en las algas eucariontes unicelulares y en varias bacterias fotosintéticas (p. ej., la cianobacteria y los proclorofitos), también genera oxígeno. La reacción general de la fotosíntesis generadora de oxígeno,

$$6\ CO_2 + 6\ H_2O \longrightarrow 6\ CO_2 + C_6H_{12}O_6$$

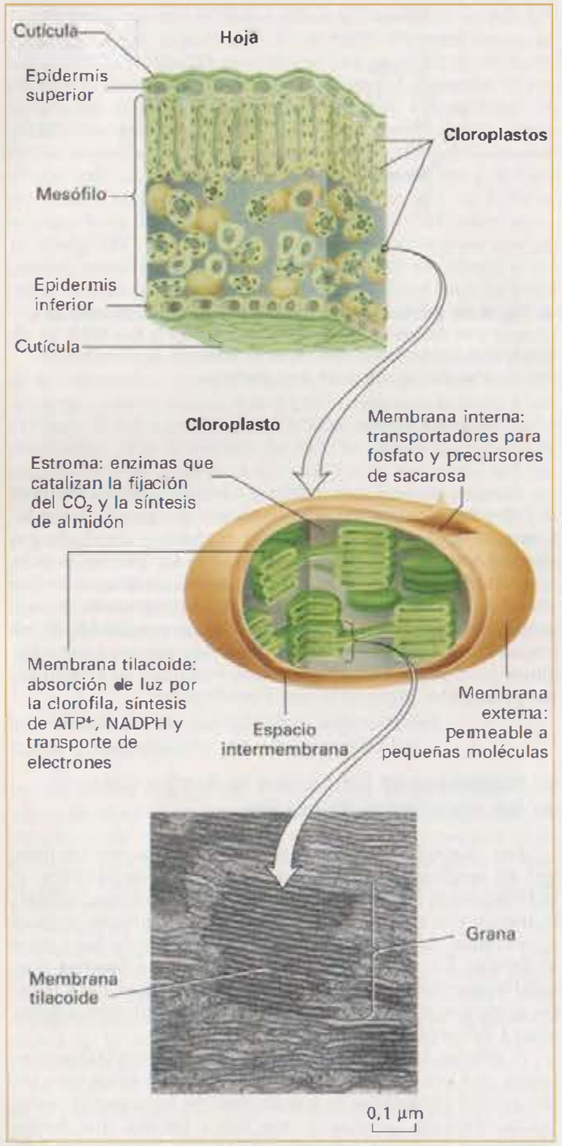
es la inversa de la reacción general por la cual los carbohidratos son oxidados a CO_2 y H_2O.

Aunque las bacterias verdes y violetas también realizan la fotosíntesis, utilizan un proceso que no genera oxígeno. Como se trata en la sección 8.5, el análisis detallado del sistema fotosintético en estas bacterias ha proporcionado mayor comprensión acerca de las primeras etapas de los procesos más comunes de la fotosíntesis generadora de oxígeno. En esta sección, describimos las generalidades de las etapas en la fotosíntesis generadora de oxígeno e introducimos los componentes principales, incluidas las clorofilas, los principales pigmentos que absorben luz.

La fotosíntesis en las plantas se lleva a cabo en las membranas tilacoides

Los cloroplastos están limitados por dos membranas, que no contienen clorofila y no participan directamente en la fotosíntesis (fig. 8-30). Al igual que en las mitocondrias, la membrana externa de los cloroplastos contiene porinas y, por ende, es permeable a los metabolitos de bajo peso molecular. La membrana interna forma una barrera permeable que contiene proteínas transportadoras para regular el movimiento de los metabolitos hacia adentro y hacia afuera del orgánulo.

A diferencia de las mitocondrias, los cloroplastos contienen una tercera membrana –la *membrana tilacoide*– sobre la cual tiene lugar la fotosíntesis. Se cree que la membrana tilacoide constituye una única lámina que forma numerosas vesículas pequeñas aplanadas interconectadas, las tilacoides, dispuestas en pilas denominadas *granas* (véase fig. 8-30). Los espacios dentro de todas las tilacoides constituyen un único compartimiento continuo, el *lumen del tilacoide*. La membrana tilacoide contiene numerosas proteínas integrales de membrana a la cual están unidos varios grupos prostéticos importantes y pigmentos que absorben la luz, de los cuales el más notable es la clorofila. La síntesis de carbohidratos se produce en la *estroma*, la fase soluble entre la membrana tilacoide y la membrana interna. En las bacterias fotosintéticas, extensas invaginaciones de la membrana plasmática forman un conjunto de membranas internas, también denominadas *membranas tilacoides*, donde tiene lugar la fotosíntesis.

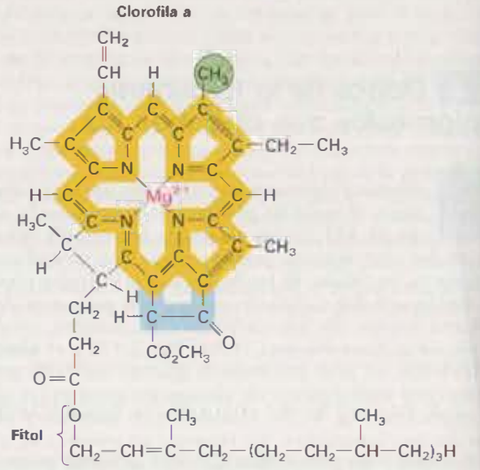


▲ Fig. 8-30. Estructura celular de una hoja y un cloroplasto. Al igual que las mitocondrias, los cloroplastos de las plantas están limitados por una doble membrana separada por un espacio intermembrana. La fotosíntesis tiene lugar sobre la membrana tilacoide, la cual forma una serie de vesículas aplanadas (tilacoides) que encierran un único espacio luminal interconectado. El color verde de las plantas se debe al color verde de la clorofila, que se localiza en la membrana tilacoide. Una grana es una pila de tilacoides adyacentes. La estroma es el espacio encerrado por la membrana interna y rodea las tilacoides. (Microfotografía cortesía de Katherine Esau, Universidad de California, Davis.)

Tres de las cuatro etapas de la fotosíntesis se producen sólo durante la iluminación

El proceso fotosintético en las plantas puede dividirse en cuatro etapas, cada una localizada en un área definida del cloroplasto: 1) absorción de luz, 2) transporte de electrones que conduce a la formación de O_2 a partir del H_2O, a la reducción de $NADP^+$ a NADPH y a la generación de una fuerza protón-motriz, 3) síntesis de ATP y 4) conversión de CO_2 en carbohidratos, comúnmente denominada fijación del carbono. Las cuatro etapas de la fotosíntesis están fuertemente acopladas y controladas de manera de producir la cantidad de carbohidratos requerida por la planta. Todas las reacciones en las etapas 1-3 están catalizadas por proteínas de la membrana tilacoide. Las enzimas que incorporan CO_2 a los intermediarios químicos y luego los convierten a almidón son constituyentes solubles de la estroma del cloroplasto. Las enzimas que forman la sacarosa a partir de los intermediarios de tres carbonos se encuentran en el citosol.

Etapa 1: absorción de luz. El paso inicial de la fotosíntesis es la absorción de luz por las clorofilas unidas a las proteínas de las membranas tilacoides. Al igual que el componente hemo de los citocromos, las clorofilas consisten en un anillo de porfirina adherido a una larga cadena lateral de hidrocarburos (fig. 8-31). A diferencia de los hemos, las clorofilas con-



▲ Fig. 8-31. Estructura de la clorofila *a*, el principal pigmento que atrapa la energía luminosa. El grupo CH_3 (verde) es reemplazado por un grupo CHO en la clorofila *b*. En el anillo de porfirina (amarillo), los electrones están deslocalizados entre tres de los cuatro anillos centrales y los átomos que los interconectan en la molécula. En la clorofila, un ion Mg^{2+}, en lugar de un ion Fe^{3+}, se encuentra en el centro del anillo de porfirina y un anillo adicional de cinco miembros (azul) está presente; en los demás aspectos, su estructura es similar a la del hemo hallada en las moléculas, como la hemoglobina y los citocromos (véase la fig. 8-15a). La "cola" hidrocarbonada de fitol facilita la unión de la clorofila a las regiones hidrófobas de las proteínas de unión a la clorofila.

tienen un ion de Mg^{2+} central (en lugar de un átomo de Fe) y tienen un anillo adicional de cinco miembros. La energía de la luz absorbida se utiliza para eliminar electrones desde un donador poco inclinado a hacerlo (agua, en las plantas verdes), para formar oxígeno,

$$2\ H_2O \xrightarrow{\text{luz}} O_2 + 4\ H^+ + 4\ e^-$$

y luego para transferir los electrones a un *aceptor de electrones primario*, una quinona designada Q, similar a la CoQ.

Etapa 2: transporte de electrones y generación de una fuerza protón-motriz. Los electrones se mueven desde el aceptor primario de electrones, la quinona, a través de una serie de transportadores de electrones hasta que alcanzan el aceptor final de electrones, por lo general la forma oxidada de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato ($NADP^+$), reduciéndolo a NADPH. (La estructura del NADP es idéntica a la del NAD excepto por un grupo fosfato adicional. Ambas moléculas ganan y pierden electrones de la misma manera; véase fig. 2-26a.) El transporte de electrones en la membrana tilacoide está acoplado al movimiento de protones desde la estroma al lumen del tilacoide, formando un gradiente de pH a través de la membrana ($pH_{lumen} < pH_{estroma}$). Este proceso es análogo a la generación de una fuerza protón-motriz a través de la membrana mitocondrial interna durante el transporte de electrones (véase fig. 8-2).

Por lo tanto, la reacción general de las etapas 1 y 2 puede resumirse como

$$2\ H_2O + 2\ NADP^+ \xrightarrow{\text{luz}} 2\ H^+ + 2\ NADPH + O_2$$

Etapa 3: síntesis de ATP. Los protones se mueven en contra de su gradiente de concentración desde el lumen del tilacoide hacia la estroma a través del complejo F_0F_1 (ATP sinrasa), el cual acopla el movimiento de protones a la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i. El mecanismo por el cual el F_0F_1 del cloroplasto utiliza la fuerza protón-motriz para sintetizar ATP es idéntico al utilizado por la ATP sintasa en la membrana mitocondrial interna y en la membrana plasmática bacteriana (véanse figs. 8-24 y 8-26).

Etapa 4: fijación del carbono. El ATP y el NADPH generados por la segunda y la tercera etapa de la fotosíntesis proporcionan la energía y los electrones para impulsar la síntesis de polímeros de azúcares de seis carbonos a partir de CO_2 y H_2O. La ecuación química general balanceada se escribe

$$6\ CO_2 + 18\ ATP^{4-} + 12\ NADPH + 12\ H_2O \longrightarrow$$
$$C_6H_{12}O_6 + 18\ ADP^{3-} + 18\ P_i^{2-} + 12\ NADP^+ + 6\ H^+$$

Las reacciones que generan el ATP y el NADPH utilizados en la fijación del carbono son directamente dependientes de la energía luminosa; por ende las etapas 1-3 se denominan *reacciones luminosas* de la fotosíntesis. Las reacciones de la etapa 4 son indirectamente dependientes de la energía luminosa; a veces se las llama *reacciones oscuras* de la fotosíntesis porque pueden tener lugar en la oscuridad, utilizando los suministros de ATP y NADPH generados por la energía luminosa. Sin embargo, las reacciones de la etapa 4 no están confinadas a la oscuridad; de hecho, se producen principalmente durante la iluminación.

Cada fotón de luz tiene una cantidad definida de energía

La mecánica cuántica establece que la luz, una forma de radiación electromagnética, tiene propiedades tanto de ondas como de partículas. Cuando la luz interactúa con la materia, se comporta como paquetes separados de energía (*cuantos*) llamados *fotones*. La energía de un fotón, ε, es proporcional a la frecuencia de la onda luminosa: $\varepsilon = h\gamma$, donde h es la constante de Planck ($1{,}58 \times 10^{-34}$ cal·s, o $6{,}63 \times 10^{-34}$ J·s) y γ es la frecuencia de la onda luminosa. Es costumbre en biología referirse más a la longitud de la onda luminosa, λ, que a su frecuencia γ. Las dos están relacionadas por la simple ecuación $\gamma = c \div \lambda$, donde c es la velocidad de la luz (3×10^{10} cm/s en el vacío). Nótese que los fotones de longitudes de onda *más cortas* tienen energías *más altas*.

También, la energía en 1 mol de fotones puede denotarse por $E = N\varepsilon$, donde N es el número de Avogadro ($6{,}02 \times 10^{23}$ moléculas o fotones/mol). Así,

$$E = Nh\gamma = \frac{Nhc}{\lambda}$$

La energía de la luz es considerable, como podemos calcular para la luz con una longitud de onda de 550 nm (550×10^{-7} cm) típica de la luz solar:

$$E = \frac{(6{,}02 \times 10^{23}\ \text{fotones/mol})\ (1{,}58 \times 10^{-34}\ \text{cal·s})\ (3 \times 10^{10}\ \text{cm/s})}{550 \times 10^{-7}\ \text{cm}}$$

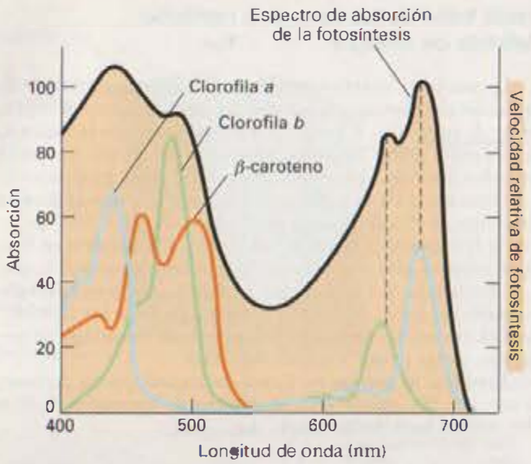
$$= 51.881\ \text{cal/mol}$$

o alrededor de 52 kcal/mol. Esto es suficiente energía para sintetizar varios moles de ATP a partir de ADP y P_i si toda la energía fuera utilizada para este propósito.

Los fotosistemas comprenden un centro de reacción y complejos asociados de recolección de luz

La absorción de energía luminosa y su conversión en energía química tiene lugar en complejos multiproteicos llamados fotosistemas. Hallados en todos los organismos fotosintéticos, tanto eucariontes como procariontes, los fotosistemas constan de dos componentes estrechamente conectados: un *centro de reacción*, donde ocurren los pasos primarios de la fotosíntesis, y un complejo de antenas compuesto de numerosos complejos proteicos, denominados *complejos de captación de luz* (light-harvesting-complexes, *LHC*), que capturan la energía luminosa y la transmiten al centro de reacción.

Tanto los centros de reacción como las antenas contienen moléculas de pigmentos fuertemente unidos que absorben la luz. La clorofila *a* es el principal pigmento que participa en la fotosíntesis, presente en los centros de reacción y en las antenas. Además de la clorofila *a*, las antenas contienen otros pigmentos que absorben la luz: la *clorofila b* en las plantas vasculares y los *carotenoides* tanto en las plantas como en las bacterias fotosintéticas. Los carotenoides constan de largas cadenas hidrocarbonadas con enlaces simples y dobles alternados; son similares en estructura al pigmento visual retiniano, que absorbe luz en el ojo (cap. 7). La presencia de diversos pigmentos de la antena, los cuales absor-



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 8-32 La velocidad de la fotosíntesis es mayor a las longitudes de onda de la luz absorbida por tres pigmentos. El espectro de acción de la fotosíntesis en las plantas, es decir, la capacidad de la luz de diferentes longitudes de onda para sustentar la fotosíntesis, se muestra en negro. El espectro de absorción para los tres pigmentos fotosintéticos presentes en las antenas de los fotosistemas vegetales se muestra en color. Cada espectro de absorción muestra cómo la luz de diferentes longitudes de onda es absorbida por uno de los pigmentos. Una comparación del espectro de acción con el espectro de absorción individual sugiere que la fotosíntesis a 680 nm se debe principalmente a la luz absorbida por la clorofila *a*; a 650 nm, a la luz absorbida por la clorofila *b*; y a longitudes de onda más cortas, a la luz absorbida por las clorofilas *a* y *b* y por pigmentos carotenoides, incluido el β caroteno.

ben luz de diferentes longitudes de onda, extiende enormemente el rango de luz que puede absorberse y utilizarse para la fotosíntesis.

Una de las evidencias más importantes sobre la participación de las clorofilas y los carotenoides en la fotosíntesis es que el espectro de absorción de estos pigmentos es similar al espectro de acción de la fotosíntesis (fig. 8-32). Este último es una medida de la capacidad relativa de la luz de diferentes longitudes de onda para sustentar la fotosíntesis.

Cuando la clorofila *a* (u otra molécula cualquiera) absorbe luz visible, la energía luminosa absorbida eleva la clorofila *a* a un estado energético (excitado) más alto. Este difiere del estado basal (no excitado) sobre todo en la distribución de los electrones alrededor de los átomos de C y N del anillo de porfirina. Los estados excitados son inestables y retornan al estado basal mediante uno de varios procesos competentes. Para las moléculas de clorofila *a* disueltas en solventes orgánicos, como el etanol, las principales reacciones que disipan el estado excitado de energía son la emisión de luz (fluorescencia y fosforescencia) y la emisión térmica (calor). Cuando la misma clorofila *a* está unida al único medio ambiente proteico del centro de reacción, la disipación de la energía del estado excitado tiene lugar por un proceso bastante diferente que es la clave de la fotosíntesis.

El transporte fotoelectrónico desde el centro de reacción energizado de la clorofila *a* produce una separación de cargas

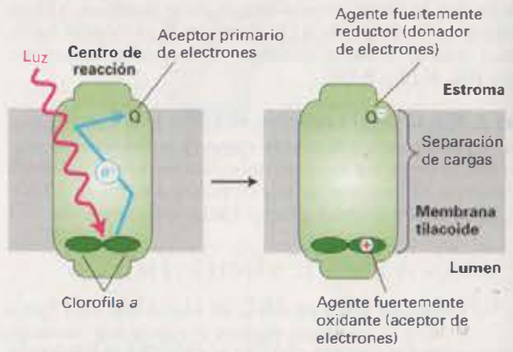
La absorción de un fotón de luz de longitud de onda ≈680 nm por la clorofila *a* incrementa su energía en 42 kcal/mol (el primer estado excitado). Esta molécula energizada de clorofila *a* en un centro de reacción de una planta dona rápidamente un electrón a un aceptor intermediario y el electrón pasa rápidamente al principal aceptor de electrones, la quinona Q, sobre la superficie estromal de la membrana tilacoide. La transferencia de electrones conducida por la luz, denominada transporte fotoelectrónico, depende del medio ambiente único de las clorofilas y del aceptor dentro del centro de reacción. El transporte fotoelectrónico, que tiene lugar casi siempre que un fotón es absorbido, deja una carga positiva sobre la clorofila *a* cercana a la superficie luminal y genera un aceptor reducido cargado negativamente (Q^-) cerca de la superficie estromal (fig. 8-33).

El Q^- producido por el transporte foroelectrónico es un agente reductor poderoso con una fuerte tendencia a transferir un electrón a otra molécula y finalmente al $NADP^+$. La clorofila a^+ cargada positivamente, un agente muy oxidante, atrae un electrón de un donador electrónico sobre la superficie luminal para regenerar la clorofila *a* original. En las plantas, el poder oxidante de cuatro moléculas de clorofila a^+ se utiliza, por medio de intermediarios, para eliminar cuatro electrones de 2 moléculas de H_2O unidas a un sitio sobre la superficie luminal para formar O_2:

$$2\ H_2O + 4\ \text{clorofilas}\ a^+ \longrightarrow 4\ H^+ + O_2 + 4\ \text{clorofilas}\ a$$

Estos reductores y oxidantes biológicos potentes proporcionan la energía necesaria para conducir todas las reacciones subsiguientes de la fotosíntesis: el transporte de electrones, la síntesis de ATP y la fijación de CO_2.

La clorofila *a* también absorbe luz de longitud de onda restringida más corta que 680 nm (véase fig. 8-32). Esta absorción eleva la molécula a uno de los diversos estados excitados más altos, que decaen a los 10^{-12} segundos (1 picosegundo, ps) al primer estado excitado con pérdida de la energía adicional en forma de calor. Dado que el transporte fotoelectrónico y la separación de cargas resultante suceden sólo desde el primer estado excitado de la clorofila *a* del centro de reacción, la producción cuántica –cantidad de fotosíntesis por fotón absorbido– es la misma para todas las longitudes de onda de la luz visible más corta (y, por ende, de energía más alta) que 680 nm.



▲ Fig. 8-33. Transporte fotoelectrónico, el evento principal de la fotosíntesis. Después de la absorción de un fotón de luz, uno de los pares especiales excitados de las moléculas de clorofila *a* en el centro de reacción (*izquierda*) dona un electrón a una molécula aceptora débilmente unida, la quinona Q, sobre la superficie estromal de la membrana tilacoide y crea una separación de carga a través de la membrana, (*derecha*). El electrón no puede retornar con facilidad a través del centro de reacción para neutralizar la clorofila *a* cargada positivamente.

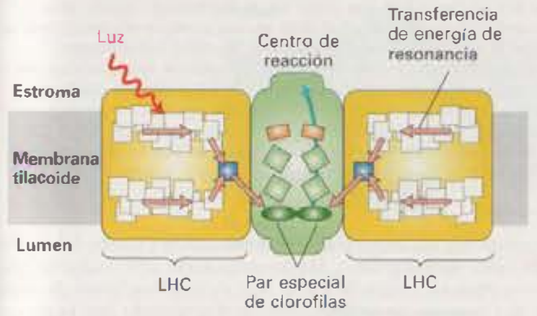
TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación focalizada: Fotosíntesis

Los complejos de recolección de luz incrementan la eficiencia de la fotosíntesis

Aunque las moléculas de clorofila *a* dentro del centro de reacción son capaces de absorber luz directamente e iniciar la fotosíntesis, suelen ser energizadas indirectamente por la energía transferida desde los complejos de captación de luz (LHC) de una antena asociada. Aun a la máxima intensidad de luz encontrada por los organismos fotosintéticos (luz tropical del mediodía), cada molécula de clorofila *a* del centro de reacción absorbe sólo un fotón por segundo, lo cual no basta para sostener la fotosíntesis lo suficiente para cubrir las necesidades de la planta. La participación de los LHC incrementa enormemente la eficiencia de la fotosíntesis, sobre todo a intensidades de luz más típicas, al aumentar la absorción de luz de 680 nm y al extender el rango de longitudes de ondas luminosas que pueden ser absorbidas por otros pigmentos de las antenas.

Los fotones pueden ser absorbidos por cualquiera de las moléculas de pigmento en un LHC. Luego la energía absorbida se transfiere rápidamente (en < 10^{-9} segundos) a una de las dos moléculas de clorofila *a* "par especial" en el centro de reacción asociado, en donde promueve la principal separación de cargas fotosintéticas (véase fig. 8-33). Las proteínas LHC mantienen las moléculas de pigmento en la orientación precisa y en la posición óptima para la absorción de luz y la transferencia de energía, maximizando así el proceso muy veloz conocido como *transferencia de energía de resonancia* desde los pigmentos de la antena a las clorofilas del centro de reacción. Estudios recientes sobre uno de los dos fotosistemas en las cianobacterias, que son similares a los de las plantas superiores, sugieren que la energía de la luz absorbida es primero encauzada a una clorofila "puente" en cada LHC y luego al par especial de clorofilas del centro de reacción (fig. 8-34). Sin embargo, las estructuras moleculares de LHC de las plantas y las cianobacterias son completamente diferentes de las de las bacterias verdes y violetas, aun cuando ambos tipos contienen carotenoides y clorofilas en una disposición geométrica arracimada dentro de la membrana.

Aunque las clorofilas de la antena del LHC pueden transferir energía luminosa absorbida de un fotón, no pueden liberar un electrón. Como vimos recién, esta función reside en las dos clorofilas del centro de reacción. Para comprender su capacidad liberadora de electrones, examinaremos la estructura y función del centro de reacción en los fotosistemas bacterianos y vegetales en la siguiente sección.



▲ Fig. 8-34. Transferencia de energía desde los complejos de captación de luz a los centros de reacción asociados del fotosistema I de las cianobacterias. El complejo multiproteico de captación de luz une 90 moléculas de clorofila (blanco y azul) y otras 31 moléculas pequeñas, todas mantenidas en una disposición geométrica específica para la óptima absorción de la luz. De las seis moléculas de clorofila (verde) en el centro de reacción, dos constituyen el par especial de clorofilas (óvalos) que pueden iniciar el transporte de fotoelectrones cuando son excitados (flechas azules). La transferencia de energía de resonancia (flechas rojas) concentra rápidamente la energía de la luz absorbida en una de las dos clorofilas "puente" (azul) y desde allí a las clorofilas en el centro de reacción. (Adaptado de W. Kühlbrandt, 2001, *Nature* 411:896, y P. Jordan et al., 2001, *Nature* 411:909.)

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 8.4

Etapas de la fotosíntesis y pigmentos que absorben luz

- Los principales productos finales de la fotosíntesis en las plantas son el oxígeno y los polímeros de azúcares de seis carbonos (almidón y sacarosa).
- Las reacciones de captura de luz y generadoras de ATP de la fotosíntesis tienen lugar en la membrana tilacoide localizada dentro de los cloroplastos. La membrana externa permeable y la membrana interna que rodean los cloroplastos no participan en la fotosíntesis (véase fig. 8-30).
- En la etapa 1 de la fotosíntesis, la luz es absorbida por moléculas de clorofila *a*, unidas a las proteínas del centro de reacción en la membrana tilacoide. Las clorofilas energizadas ceden un electrón a una quinona sobre el lado opuesto de la membrana, creando una separación de carga (véase fig. 8-33). En las plantas verdes, las clorofilas cargadas positivamente extraen luego electrones del agua y forman oxígeno.
- En la etapa 2, los electrones son transportados desde la quinona reducida a través de los transportadores en la membrana tilacoide hasta que alcanzan el aceptor de electrones final, por lo general el $NADP^+$, reduciéndolo a NADPH. El transporte de electrones se asocia con el movimiento de protones a través de la membrana desde la estroma hacia el lumen del tilacoide y forma un gradiente de pH (fuerza protón-motriz) a través de la membrana tilacoide.
- En la etapa 3, el movimiento de protones a favor de su gradiente electroquímico a través de los complejos F_0F_1 impulsa la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i.
- En la etapa 4, el ATP y el NADPH generados en las etapas 2 y 3 proporcionan la energía y los electrones para conducir la fijación de CO_2 y la síntesis de carbohidratos. Estas reacciones tienen lugar en la estroma del tilacoide y en el citosol.

■ Asociados con cada centro de reacción existen múltiples complejos de recolección de luz (LHC), que contienen clorofilas *a* y *b*, carotenoides y otros pigmentos que absorben luz de múltiples longitudes de onda. La energía es transferida desde las moléculas de clorofila LHC a las clorofilas de los centros de reacción por transferencia de energía de resonancia (véase fig. 8-34).

8.5 Análisis molecular de los fotosistemas

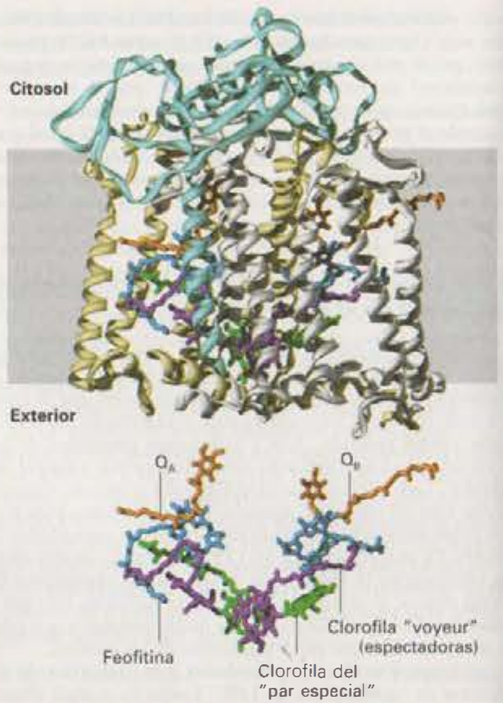


Como se mencionó en las secciones previas, la fotosíntesis en las bacterias verdes y violetas no genera oxígeno, mientras que la fotosíntesis en las cianobacterias, algas y plantas superiores sí lo hace*. Esta diferencia se atribuye a la presencia de dos tipos de fotosistemas (PS) en los últimos organismos: el PSI reduce el $NADP^+$ a NADPH y el PSII forma O_2 a partir del agua. En cambio, las bacterias verdes y violetas tienen sólo un tipo de fotosistema, el cual no puede formar O_2. Veremos primero los fotosistemas más simples de las bacterias violetas y luego la maquinaria fotosintética más complicada de los cloroplastos. ■

El único fotosistema de las bacterias violetas genera una fuerza protón-motriz pero no O_2

Se han determinado las estructuras tridimensionales de los centros de reacción fotosintéticos de dos bacterias violetas, lo que les permite a los científicos trazar los caminos detallados de los electrones durante y después de la absorción de luz. Similares proteínas y pigmentos también componen el fotosistema II de las plantas y las conclusiones extraídas de los estudios sobre este fotosistema simple pueden aplicarse a los sistemas de las plantas.

El centro de reacción de las bacterias violetas contiene tres subunidades proteicas (L, M y H) localizadas en la membrana plasmática (fig. 8-35). Unidos a estas proteínas se encuentran los grupos prostéticos que absorben luz y transportan electrones durante la fotosíntesis. Los grupos prostéticos incluyen un "par especial" de moléculas de bacterioclorofila *a* equivalente a las moléculas de clorofila *a* del centro de reacción de las plantas, al igual que otros diversos pigmentos y dos quinonas, denominadas Q_A y Q_B, similares estructuralmente a la ubiquinona mitocondrial.



▲ **Fig. 8-35. Estructura tridimensional del centro de reacción fotosintético de la bacteria violeta *Rhodobacter spheroides*.** *(Arriba)* La subunidad L (amarillo) y la subunidad M (blanco) forman, cada una, cinco hélices α transmembrana y tienen una estructura general similar; la subunidad H (celeste) está anclada a la membrana por una única hélice α transmembrana. Una cuarta subunidad (no mostrada) es una proteína periférica que se une al segmento exoplasmático de las otras subunidades. *(Abajo)* Dentro de cada centro de reacción se encuentra un par especial de moléculas de bacterioclorofila *a* (verde), capaz de iniciar el transporte fotoelectrónico; dos clorofilas espectadoras (violeta); dos feofitinas (azul oscuro) y dos quinonas, QA y QB (anaranjado). QB es el aceptor primario de electrones durante la fotosíntesis. (Según M. H. Stowell et al., 1997, *Science* 276:812.)

Separación inicial de cargas El mecanismo de separación de carga en el fotosistema de las bacterias violetas es idéntico al de las plantas antes destacado; es decir, la energía de la luz absorbida se utiliza para extraer un electrón de una molécula de bacterioclorofila *a* del centro de reacción y transferirlo, a través de varios pigmentos diferentes, al aceptor de electrones primario Q_B, el cual está adherido débilmente a un sitio sobre la cara citosólica de la membrana. Por ende, la clorofila adquiere una carga positiva y la Q_B una carga negativa. Para determinar la vía recorrida por los electrones a través del centro de reacción bacteriano, los investigadores aprovecharon que cada pigmento absorbe luz de sólo ciertas longitudes de onda y que su espectro de absorción cambia cuando éste posee un electrón extra. Dado que estos movimientos de electrones se completan en menos de 1 milisegundo (ms), se requiere una técnica especial denominada *espectroscopia de absorción en picosegundos* para monitorizar los cambios en el espectro de absorción de los diversos pigmentos como función del tiempo poco después de la absorción de un fotón de luz.

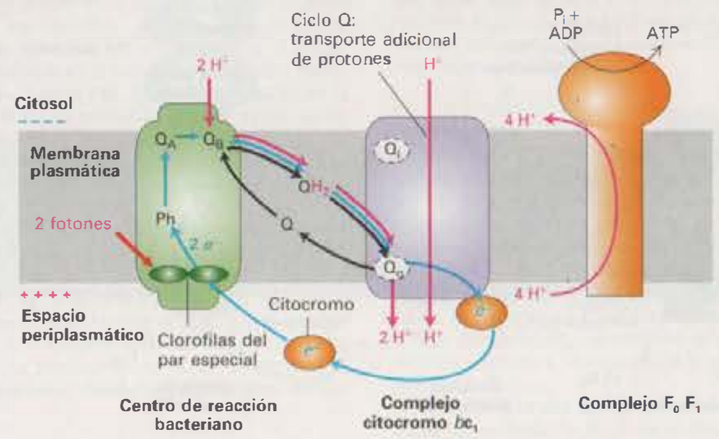
Cuando se expone una preparación de vesículas de membrana bacteriana a un pulso intenso de luz láser que dura menos de 1 ps, cada centro de reacción absorbe un fotón. La luz absorbida por las moléculas de clorofila *a* en cada centro de reacción las convierte al estado excitado y los procesos de transferencia de electrones siguientes están sincronizados en todos los centros de reacción. Dentro de los 4×10^{-12} segundos (4 ps), un electrón se mueve a una de las moléculas de feofitina (Ph) y deja una carga positiva sobre la clorofila *a*. Al electrón le toma 200 ps moverse hasta la Q_A, y luego, en el paso más lento, 200 µs para moverse hasta la Q_B. Este trayecto de flujo de electrones se ilustra en la parte izquierda de la figura 8-36.

El flujo de electrones y el movimiento acoplado de protones subsiguiente. Después que el aceptor primario de electrones, Q_B, en el centro de reacción de la bacteria acepta un electrón y forma Q_B^-, éste acepta un segundo electrón de la misma clorofila del centro de reacción tras la absorción de un segundo fotón. Luego la quinona une dos protones del citosol y forma la quinona reducida (QH_2), que se libera del centro de reacción (véase fig 8-36). La QH_2 se difunde dentro de la membrana bacteriana hasta el sitio Q_o sobre la cara exoplasmática del complejo citocromo bc_1, donde libera sus dos protones al espacio periplasmático (el espacio entre la membrana plasmática y la pared celular bacteriana). Este proceso mueve protones desde el citosol hacia el exterior de la célula y genera una fuerza protón-motriz a través de la membrana plasmática. Al mismo tiempo, la QH_2 libera sus dos electrones, que se mueven a través del complejo citocromo bc_1 exactamente como se representa para el complejo mitocondrial $CoQH_2$-citocromo *c* reductasa en la figura 8-21. El ciclo Q en el centro de reacción bacteriano, al igual que el ciclo Q en la mitocondria, bombea protones adicionales desde el citosol hacia el espacio intermembrana e incrementa así la fuerza protón-motriz.

El aceptor para los electrones transferidos a través del complejo citocromo bc_1 es un citocromo soluble, un transportador de un electrón en el espacio periplasmático, que es reducido desde el estado Fe^{3+} al de Fe^{2+}. El citocromo reducido (análogo al citocromo *c* de las mitocondrias) se difunde entonces a un centro de reacción, donde libera sus electrones a una clorofila a^* cargada positivamente, con lo que la clorofila retorna al estado basal y el citocromo al estado de Fe^{3+}. Este flujo *cíclico* de electrones no genera oxígeno ni coenzimas reducidas.

Los electrones también pueden fluir a través del único fotosistema de las bacterias violetas mediante la vía *lineal* (no cíclica). En este caso, los electrones eliminados de las clorofilas del centro de reacción son transferidos finalmente al NAD^+ (en lugar de $NADP^+$ como en las plantas) y forman NADH. Para reducir la clorofila *a* oxidada del centro de reacción y retornarla a su estado basal, se transfiere un electrón desde el citocromo *c* reducido; el citocromo *c* oxidado que se forma es reducido por los electrones eliminados desde el sulfuro de hidrógeno (H_2S), formando azufre (S) elemental, o del hidrógeno gaseoso (H_2). Puesto que el H_2O no es el dador de electrones, no se forma O_2.

Tanto la vía cíclica como la lineal del flujo de electrones en los fotosistemas bacterianos generan una fuerza protón-mo-



▲ **Fig. 8-36. Flujo cíclico de electrones en el único fotosistema de la bacteria violeta.** Las flechas azules indican el flujo de electrones; las flechas rojas indican el movimiento de protones. *(Izquierda)* La energía concentrada desde un LHC asociado energiza una de las clorofilas del par especial en el centro de reacción. El transporte fotoelectrónico desde la clorofila energizada, a través de la feofitina (Ph) y la quinona A (Q_A), a la quinona B (Q_B) forma la semiquinona Q^- y deja una carga positiva sobre la clorofila. Seguido a la absorción de un segundo fotón y a la transferencia de un segundo electrón a la semiquinona, rápidamente se toman dos protones del citosol para formar QH_2. *(Centro)* Luego de difundirse a través de la membrana y unirse al sitio Q_o sobre la cara exoplasmática del complejo citocromo bc_1, la QH_2 dona dos electrones y simultáneamente entrega dos protones al medio externo, lo que genera una fuerza protón-motriz ($H^+_{exoplasmático} > H^+_{citosólico}$). Los electrones son transportados de vuelta a la clorofila del centro de reacción a través de un citocromo soluble, el cual se difunde en el espacio periplasmático. El funcionamiento de un ciclo Q en el complejo citocromo bc_1 bombea protones adicionales a través de la membrana al medio externo, como en las mitocondrias. La fuerza protón-motriz es utilizada por el complejo F_oF_1 para sintetizar ATP y, al igual que en otras bacterias, para transportar moléculas hacia adentro y hacia afuera de la célula. (Adaptado de J. Deisenhofer y H. Michael, 1991, *Ann. Rev. Cell Biol.* 7:1.)

* Un tipo muy diferente de fotosíntesis bacteriana, que ocurre sólo en ciertas arqueobacterias, no se trata aquí porque es muy distinto de la fotosíntesis de las plantas superiores. En este tipo de fotosistemas, la proteína bacteriorrodopsina de la membrana plasmática bombea un protón desde el citosol al espacio extracelular por cada cuanto de luz absorbido. Esta pequeña proteína tiene siete segmentos que atraviesan la membrana y un pigmento retiniano unido de manera covalente (véase fig. 5-13).

triz. Al igual que en otros sistemas, esta fuerza es utilizada por el complejo F_0F_1 localizado en la membrana plasmática para sintetizar ATP y también para transportar moléculas a través de la membrana en contra de un gradiente de concentración.

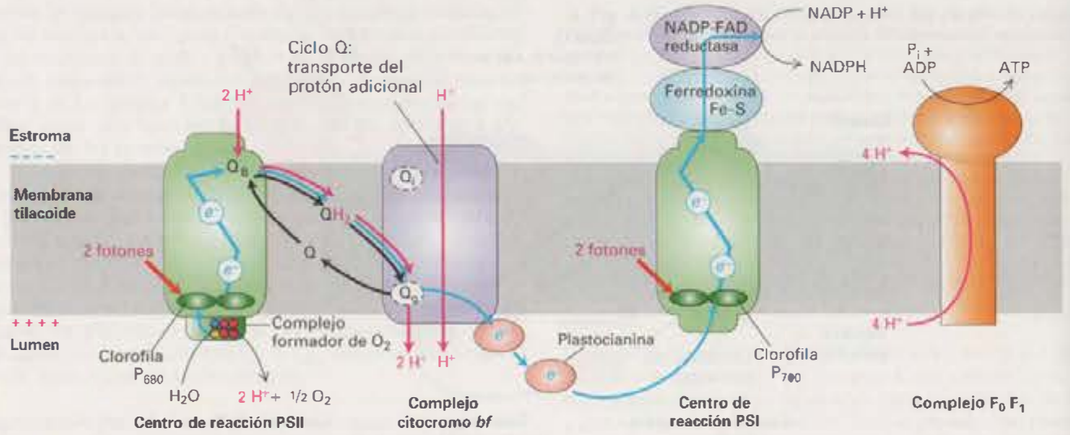
Los cloroplastos contienen dos fotosistemas funcional y espacialmente distintos

En la década de 1940, el biofísico R. Emerson descubrió que la velocidad de la fotosíntesis de las plantas generada por la luz de 700 nm de longitud de onda puede aumentar mucho mediante la adición de luz de una longitud de onda más corta. Descubrió que una combinación de luz; p. ej., a 600 y 700 nm sustenta una mayor velocidad de fotosíntesis que la suma de las velocidades para las dos longitudes de onda separadas. Este *efecto Emerson*, como se denomina, condujo a los investigadores a concluir que la fotosíntesis en las plantas involucra la interacción de dos fotosistemas separados, a los que se denomina *PSI* y *PSII*. El PSI es impulsado por una luz de longitud de onda de 700 nm o menor; el PSII, sólo por una luz de longitud de onda más corta < 680 nm.

Al igual que en los centros de reacción de las bacterias verdes y violetas, cada fotosistema del cloroplasto contiene un par de moléculas especializadas de clorofila *a* del centro de reacción capaces de iniciar el transporte de fotoelectrones. Las clorofilas del centro de reacción en los PSI y PSII difieren en el máximo de su absorción luminosa por las diferencias en sus ambientes proteicos. Por tal motivo, estas clorofilas a menudo son designadas P_{680} (PSII) y P_{700} (PSI). Del mismo modo que un centro de reacción bacteriano, cada centro de reacción de un cloroplasto está asociado con múltiples complejos captadores de luz (LHC); los LHC asociados con el PSII y el PSI contienen proteínas diferentes.

Los dos fotosistemas también están distribuidos de manera diferente en las membranas tilacoides; el PSII principalmente en las regiones apiladas (grana) y el PSI en las regiones no apiladas. El apilamiento de las membranas tilacoides puede deberse a las propiedades de unión de las proteínas del PSII. La evidencia de esta distribución proviene de estudios en los cuales las membranas tilacoides se fragmentaron suavemente en vesículas por ultrasonido. Las vesículas apiladas y no apiladas se fraccionaron luego mediante centrifugación en gradiente de densidad. Las fracciones apiladas contenían principalmente proteína del PSII y la fracción no apilada, del PSI.

Por último, y lo más importante, los dos fotosistemas de los cloroplastos difieren significativamente en sus funciones; sólo el PSII escinde el agua para formar oxígeno, mientras que sólo el PSI transfiere electrones al aceptor final de electrones, el $NADP^+$. La fotosíntesis en los cloroplastos puede seguir una vía lineal o cíclica, al igual que las bacterias verdes y violetas. La vía lineal, que trataremos primero, puede dar lugar a la fijación de carbono y a la síntesis de ATP. Por el contrario, la vía cíclica sólo origina la síntesis de ATP y no genera NADPH reducido para usar en la fijación de carbono. Las algas fotosintéticas y las cianobacterias contienen dos fotosistemas análogos a los de los cloroplastos.



▲ Fig. 8-37. El flujo lineal de electrones en las plantas requiere los dos fotosistemas de los cloroplastos, PSI y PSII. Las flechas azules indican el flujo de electrones; las flechas rojas indican el movimiento de protones. Los LHC no se muestran. *(Izquierda)* En el centro de reacción PSII, dos excitaciones secuenciales de la misma clorofila P_{680} inducidas por luz dan como resultado la reducción del principal aceptor de electrones, Q_B a QH_2. En el lado luminal del PSII, los electrones extraídos del H_2O en el lumen tilacoide son transferidos al P_{680}^+, lo que restablece las clorofilas del centro de reacción al estado fundamental y genera O_2. *(Centro)*. El complejo citocromo *bf* luego acepta electrones del QH_2, acoplado a la liberación de dos protones en el lumen. El funcionamiento de un ciclo Q en el complejo citocromo *bf* transloca protones adicionales a través de la membrana hacia el lumen tilacoide e incrementa la fuerza protón-motriz generada. *(Derecha)* En el centro de reacción PSI, cada electrón liberado de las clorofilas P_{700} excitadas por la luz se mueve a través de una serie de transportadores en el centro de reacción hacia la superficie estromal, donde las ferredoxinas solubles (y una proteína Fe-S) transfiere el electrón al FAD y finalmente al $NADP^+$, para formar NADPH. El P_{700}^+ es devuelto a su estado fundamental por la adición de un electrón transportado desde el PSII por el complejo citocromo *bf* y la plastocianina, un transportador de electrones soluble. La fuerza protón-motriz generada por el flujo lineal de electrones desde el PSII a la NADP-FAD reductasa impulsa la síntesis de ATP por el complejo F_0F_1.

El flujo lineal de electrones a través de ambos fotosistemas de las plantas, PSII y PSI, genera una fuerza protón-motriz, O_2 y NADPH

El flujo lineal de electrones en los cloroplastos involucra el PSII y el PSI en una serie obligatoria en la cual los electrones son transferidos desde el H_2O al $NADP^+$. El proceso comienza con la absorción de un fotón por el PSII, lo que provoca que los electrones se muevan desde una clorofila *a* P_{680} hacia un aceptor plastoquinona (Q_B) sobre la superficie estromal (fig. 8-37). La P_{680}^+ oxidada resultante extrae un electrón del dador renuente H_2O y forma un intermediario en la formación de O_2 y un protón, el cual queda en el lumen del tilacoide y contribuye a la fuerza protón-motriz. Después que la P_{680} absorbe un segundo fotón, la semiquinona Q^- acepta un segundo electrón, toma dos protones del espacio estromal y genera QH_2. Al difundirse en la membrana, el QH_2 se une al sitio Q_o sobre el complejo citocromo *bf*, que es análogo en estructura y función al complejo citocromo bc_1 en las bacterias violetas y al complejo $CoQH_2$–citocromo *c* reductasa en las mitocondrias. Como sucede en estos sistemas, un ciclo Q funciona en el complejo citocromo *bf* en asociación con el centro de reacción PSII, incrementando por lo tanto la fuerza protón-motriz generada por el transporte de electrones.

La absorción de un protón por el PSI conduce a la eliminación de un electrón de la clorofila *a* del centro de reacción, P_{700} (véase fig. 8-37). La clorofila P_{700}^+ oxidada resultante es reducida por un electrón pasado desde el centro de reacción PSII a través del complejo citocromo *bf* y la *plastocianina*, un transportador de electrones soluble que contiene un único átomo de cobre (Cu). Después que el complejo citocromo *bf* acepta electrones del QH_2, los transfiere, uno a la vez, a la forma Cu^{2+} de la plastocianina reduciéndola a la forma Cu^+. La plastocianina reducida se difunde en el lumen del tilacoide y transporta el electrón a la P_{700}^+ en el PSI. El electrón tomado en la superficie luminal por la P_{700} se mueve a través de varios transportadores hasta la superficie estromal de la membrana del tilacoide, donde es aceptado por la ferredoxina, una proteína de hierro azufre (Fe-S). Los electrones excitados en el PSI pueden ser transferidos al $NADP^+$ desde la ferredoxina a través del transportador de electrones FAD, formando, junto con un protón tomado desde la estroma, la molécula reducida de NADPH.

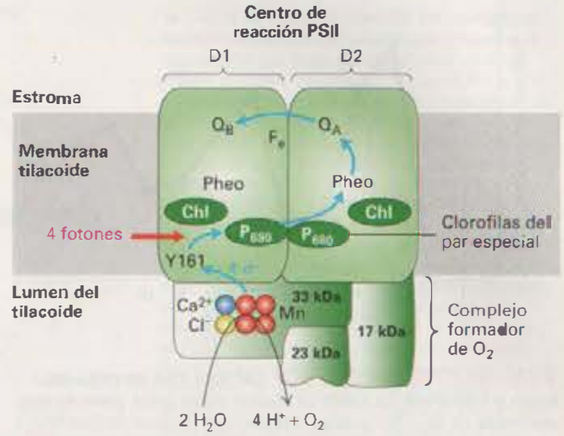
Los complejos F_0F_1 de la membrana tilacoide utilizan la fuerza protón-motriz generada durante el flujo lineal de electrones para sintetizar ATP sobre el lado estromal de la membrana. Por ende esta vía produce tanto NADPH como ATP en la estroma del cloroplasto, donde se utilizan para la fijación de CO_2.

Un complejo productor de oxígeno se localiza sobre la superficie luminal del centro de reacción PSII

De manera sorprendente, la estructura del centro de reacción PSII, que elimina electrones del H_2O para formar O_2, se asemeja a la del centro de reacción de las bacterias fotosintéticas violetas, que no forman O_2. Como sucede en el centro de reacción bacteriano, el centro de reacción PSII contiene dos moléculas de clorofila *a* (P_{680}), al igual que otras dos clorofilas, dos feofitinas, dos quinonas (Q_A y Q_B) y un átomo de hierro no hemo. Estas moléculas pequeñas están unidas a dos proteínas del PSII, llamadas D1 y D2, cuyas secuencias son notablemente similares a las de los péptidos L y M del centro de reacción bacteriano, lo que confirma sus orígenes evolutivos en común (véase fig. 8-35). Cuando el PSII absorbe un fotón con una longitud de onda < 680 nm, desencadena la pérdida de un electrón desde una molécula P_{680} y genera P_{680}^+. Al igual que en las bacterias fotosintéticas violetas, el electrón es transportado a través de una feofitina y una quinona (Q_A) al aceptor de electrones, Q_B, sobre la superficie externa (estromal) de la membrana tilacoide (figs. 8-37 y 8-38).

La clorofila del centro de reacción del PSII, fotoquímicamente oxidada, la P_{680}^+, es el oxidante biológico más potente que se conoce. El potencial de reducción de la P_{680}^+ es más positivo que el del agua y, por ende, puede oxidar el agua para generar O_2 e iones H^+. Las bacterias fotosintéticas no pueden oxidar el agua porque la clorofila a^+ excitada en el centro de reacción bacteriano no es un oxidante lo suficientemente fuerte. (Como ya se dijo, las bacterias violetas utilizan H_2S e H_2 como dadores de electrones para reducir la clorofila a^+ en el flujo lineal de electrones.)

La descomposición del H_2O, que provee los electrones para la reducción de la P_{680}^+ en el PSII, es catalizada por un complejo de tres proteínas, el *complejo productor de oxígeno*, ubicado sobre la superficie luminal de la membrana tilacoide. El complejo productor de oxígeno contiene cuatro iones man-



▲ Fig. 8-38. Flujo de electrones y producción de O_2 en el PSII de los cloroplastos. El centro de reacción PSII, que comprende dos proteínas integrales, D1 y D2, clorofilas del par especial (P_{680}), y otros transportadores de electrones, está asociado con un complejo productor de O_2 sobre la superficie luminal. Cuatro iones manganeso (rojo), un ion Ca^{2+} (azul), y un ion Cl^- (amarillo) están unidos a las tres proteínas extrínsecas (33, 23, y 17 kDa) del complejo productor de oxígeno. Estos iones unidos participan en la escisión del H_2O y mantienen el ambiente esencial para altos índices de producción de O_2. La tirosina-161 (Y161) del polipéptido D1 conduce electrones desde los iones Mn a la clorofila oxidada del centro de reacción (P_{680}^+) y la reduce al estado basal P_{680}. Para más detalles véase el texto. (Adaptado de C. Hoganson y G. Babcock, 1997. *Science* 277:1953.)



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 8-39 Un solo PSII absorbe un fotón y transfiere un electrón cuatro veces para generar una molécula de O_2. Cloroplastos adaptados a la oscuridad fueron expuestos a una serie de pulsos cortos de luz (5-μs) poco espaciados que activaron virtualmente todos los PSII en la preparación. Los picos en la producción del O_2 tuvieron lugar luego de cada cuarto pulso, lo que indica que se requiere la absorción de cuatro fotones por un PSII para generar cada molécula de O_2. Debido a que los cloroplastos adaptados a la oscuridad estaban al principio en un estado parcialmente reducido, los picos en la producción del O_2 tuvieron lugar luego de los destellos 3, 7 y 11. (De J. Berg et al., 2002. *Biochemistry*, 5th ed., W.H. Freeman and Company.)

ganeso (Mn) y iones Cl^- y Ca^{2+} unidos (véase fig. 8-38); éste es uno de los pocos casos en los cuales el Mn desempeña un papel en un sistema biológico. Estos iones de Mn junto con las tres proteínas extrínsecas pueden ser eliminados del centro de reacción mediante tratamiento con soluciones de sales concentradas; esto suprime la formación de O_2, pero no afecta la absorción de luz o las etapas iniciales del transporte de electrones.

La oxidación de dos moléculas de H_2O para formar O_2 requiere la eliminación de cuatro electrones, pero la absorción de cada fotón por el PSII conduce a la transferencia de un solo electrón. Un experimento simple, descrito en la figura 8-39, resolvió el interrogante de si la formación del O_2 depende de un PSII único o de múltiples fotosistemas que actúan juntos. El resultado indicó que un PSII debe perder un electrón y luego oxidar el complejo productor de oxígeno cuatro veces seguidas para que se forme una molécula de O_2.

Se sabe que el manganeso existe en múltiples estados de oxidación que van de dos a cinco cargas positivas. Los estudios espectroscópicos subsiguientes mostraron que los iones Mn unidos en el complejo productor de oxígeno cumplen un ciclo a través de cinco diferentes estados de oxidación, S_0–S_4. En este ciclo S, un total de dos moléculas de H_2O son escindidas en cuatro protones, cuatro electrones y una molécula de O_2. Los electrones liberados del H_2O son transferidos, uno a la vez, a través de los iones Mn y una cadena lateral de tirosina cercana sobre la subunidad D_1, al centro de reacción P_{680}^+, donde regeneran la clorofila reducida, P_{680}. Los protones liberados del H_2O permanecen en el lumen del tilacoide. A pesar de la numerosa experimentación aún no conocemos los detalles de cómo es formado el O_2 por este complejo que contiene Mn. ■

BIOTEC Los herbicidas que inhiben la fotosíntesis no sólo son muy importantes en la agricultura, también son útiles en la elucidación de la vía del transporte fotoelectrónico en las plantas. Una de estas clases de herbicidas, las *s*-triazinas (p. ej., atrazina), se fija específicamente al D1 en el centro de reacción PSII e inhibe así la fijación de la Q_B a este sitio sobre la superficie estromal de la membrana tilacoide. Cuando se añaden a cloroplastos en presencia de luz, las *s*-triazinas provocan la acumulación de todos los transportadores de electrones corriente abajo en la forma oxidada, puesto que ningún electrón puede ser liberado del PSII. En los mutantes resistentes a la atrazina, un único cambio de aminoácidos en el D1 los incapacita para fijar el herbicida, por lo que la fotosíntesis se realiza a velocidades normales. Tales malezas resistentes están muy difundidas y representan un grave problema en la agricultura. ■

El flujo cíclico de electrones a través del PSI genera una fuerza protón-motriz, pero no NADP ni O_2

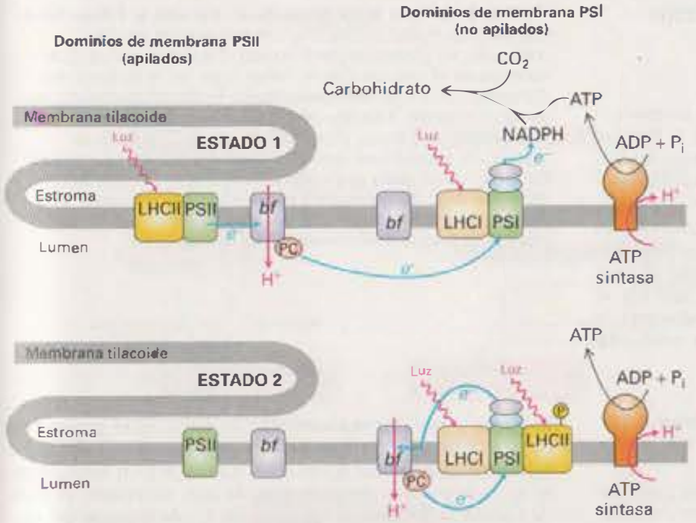
Como hemos visto, los electrones de la ferredoxina reducida en el PSI son transferidos a $NADP^+$ durante el flujo lineal de electrones (véase fig. 8-37). Alternativamente, la ferredoxina reducida puede donar dos electrones a una quinona (Q) unida a un sitio sobre la superficie estromal del PSI; la quinona luego toma dos protones de la estroma y forma QH_2. Esta QH_2 se difunde a través de la membrana tilacoide hasta el sitio de unión de la Q_0 sobre la superficie luminal del complejo citocromo *bf*. Allí libera dos electrones al complejo citocromo *bf* y dos protones al lumen del tilacoide, lo que genera una fuerza protón-motriz. Al igual que en el flujo lineal de protones, esros electrones vuelven al PSI a través de la plastocianina. Este flujo cíclico de electrones, que no involucra el PSII, es similar al proceso cíclico que tiene lugar en el único fotosistema de las bacterias violetas (véase fig. 8-36). Un ciclo Q funciona en el complejo del citocromo *bf* durante el flujo cíclico de electrones, lo que conduce al transporte de dos protones adicionales hacia el lumen por cada par de electrones transportados y a una mayor fuerza protón-motriz.

La fuerza protón-motriz generada durante el flujo cíclico de electrones en los cloroplastos impulsa la síntesis de ATP por los complejos F_0F_1 de la membrana tilacoide. Sin embargo, estos procesos no generan NADPH y no se produce O_2.

La actividad relativa de los fotosistemas I y II está regulada

Para que el PSII y el PSI actúen en secuencia durante el flujo lineal de electrones, la cantidad de energía luminosa entregada a los dos centros de reacción debe estar controlada para que cada centro active el mismo número de electrones. Si los dos fotosistemas no son excitados por igual, el flujo cíclico de electrones tiene lugar en el PSI y el PSII se vuelve menos activo. Un mecanismo para regular la contribución lineal relativa y el flujo cíclico de electrones en los cloroplastos conlleva la fosforilación y desfosforilación reversibles de las proteínas asociadas con el complejo de recolección de luz del PSII (LHCII).

De acuerdo con este mecanismo, una proteincinasa unida a la membrana percibe las actividades relativas de los



◀ Fig. 8-40. Distribución de los complejos multiproteicos en la membrana tilacoide y regulación del flujo de electrones cíclico frente al lineal. *(Arriba)* En la luz, el PSI y PSII están igualmente activados, y los fotosistemas se organizan en el estado I. En esta disposición, el complejo II de captación de luz (LHCII) no está fosforilado y se encuentra fuertemente asociado con el centro de reacción PSII en la grana. Como resultado, el PSII y el PSI pueden funcionar en paralelo en el flujo lineal de electrones. *(Abajo)* Cuando la excitación lumínica de los dos fotosistemas no está balanceada, el LHCII se vuelve fosforilado, se disocia del PSII y se difunde en las membranas no apiladas, donde se asocia con el PSI y su LHCI permanentemente asociado. En esta organización supramolecular alternativa (estado II), la mayor parte de la energía lumínica absorbida es transferida al PSI, lo que favorece el flujo cíclico de electrones y la producción de ATP, pero no la formación de NADPH y, por lo tanto, la no fijación del CO_2. PC: plastocianina. (Adaptado de F. A. Wollman, 2001. *EMBO J.* 20:3623.)

dos fotosistemas. Este control puede involucrar el reconocimiento del estado oxidado-reducido del *pool* de plastoquinonas que transfiere electrones desde el PSII al complejo citocromo *bf* en ruta al PSI. La excitación balanceada de los dos fotosistemas está asociada con el flujo lineal de electrones (fig. 8-40, estado I). Sin embargo, si se reduce demasiada plastoquinona (lo que indica una activación excesiva del PSII con relación al PSI), la cinasa se activa y se fosforilan algunos LHCII. Estos LHCII fosforilados se disocian del PSII, que está preferentemente ubicado en la grana, y se difunden en la membrana hasta las membranas tilacoides no apiladas, donde pueden activar el PSI. Esta redistribución de LHCII, que disminuye el tamaño de las antenas del PSII e incrementa el del PSI y la redistribución concomitante de los complejos citocromo *bf* desde los dominios de la membrana ricos en PSII hacia los dominios ricos en PSI promueven el flujo cíclico de electrones (fig. 8-40 estado II).

Por ende, la organización supramolecular de los fotosistemas en las plantas tiene el efecto de dirigirlos hacia la producción de ATP (estado II) o hacia la generación de equivalentes reductores (NADPH) y ATP (estado I). Tanto el NADPH como el ATP se requieren para convertir el CO_2 a sacarosa o almidón, la cuarta etapa en la fotosíntesis, que veremos en la última sección de este capítulo.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 8.5

Análisis molecular de los fotosistemas

- En el único fotosistema de las bacterias violetas, el flujo cíclico de electrones desde las moléculas de clorofila *a* excitadas por la luz en el centro de reacción genera una fuerza protón-motriz, utilizada principalmente para impulsar la síntesis de ATP por el complejo F_0F_1 en la membrana plasmática (fig. 8-36).
- Las plantas contienen dos fotosistemas, el PSI y el PSII, con diferentes funciones y separados físicamente en la membrana tilacoide. El PSII escinde el H_2O en O_2. El PSI reduce el $NADP^+$ a NADPH. Las cianobacterias tienen dos fotosistemas análogos.
- En los cloroplastos, la energía luminosa absorbida por los complejos de recolección de luz (LHC) es transferida a las moléculas de clorofila *a* en los centros de reacción (P_{680} en el PSII y P_{700} en el PSI).
- Los electrones fluyen a través del PSII mediante los mismos transportadores que están en los fotosistemas bacterianos. A diferencia de los sistemas bacterianos, la P_{680}^+ fotoquímicamente oxidada en el PSII es regenerada a P_{680} por los electrones derivados de la escisión de H_2O con la producción de O_2 (véase fig. 8-37, *izquierda*).
- En el flujo lineal de electrones, la P_{700}^+ fotoquímicamente oxidada en el PSI es reducida, regenerando P_{700}, por los electrones transferidos desde el PSII a través del complejo citocromo *bf* y la plastocianina soluble. Los electrones perdidos del P_{700} que siguen a la excitación del PSI son transportados a través de varios transportadores hasta alcanzar el $NADP^+$, generando NADPH (véase fig. 8-37, *derecha*).
- A diferencia del flujo lineal de electrones, que requiere tanto PSII como PSI, el flujo cíclico de electrones en las plantas involucra sólo el PSI. En esta vía, no se forman NADPH ni O_2, aunque se genera una fuerza protón-motriz.
- La fuerza protón-motriz generada por el transporte fotoelectrónico de los fotosistemas vegetales y bacterianos es aumentada por el funcionamiento del ciclo Q en los complejos citocromo *bf* asociados con cada uno de los fotosistemas.
- La fosforilación y la desfosforilación reversible del complejo recolector de luz del PSII controlan la organización funcional del aparato fotosintético en las membranas tilacoides. El estado I favorece el flujo lineal de electrones, mientras que el estado II favorece el flujo cíclico de electrones (véase fig. 8-40).

8.6 Metabolismo del CO_2 durante la fotosíntesis

PLANTAS

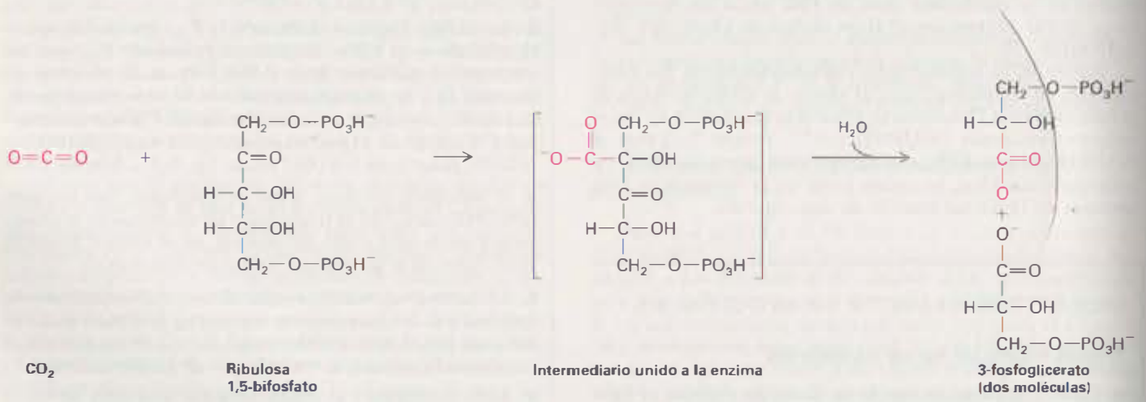
Los cloroplastos realizan numerosas reacciones metabólicas en las hojas verdes. Además de la fijación del CO_2, la síntesis de casi todos los aminoácidos, todos los ácidos grasos y carotenos, todas las pirimidinas y probablemente todas las purinas tiene lugar en los cloroplastos. Sin embargo, la síntesis de azúcares a partir del CO_2 es la vía biosintética más estudiada en las células vegetales. Primero consideramos la vía exclusiva, conocida como el ciclo de Calvin (por su descubridor, Melvin Calvin), que fija el CO_2 en componentes de tres carbonos, impulsados por la energía liberada durante la hidrólisis de ATP y la oxidación de NADP. ∎

La fijación del CO_2 se produce en la estroma de los cloroplastos

La reacción que realmente fija el CO_2 en los carbohidratos es catalizada por la *ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa* (a menudo llamada *rubisco*), localizada en el espacio estromal del cloroplasto. Esta enzima añade CO_2 al azúcar de cinco carbonos ribulosa 1,5 bifosfato para formar dos moléculas de 3-fosfoglicerato (fig. 8-41). La rubisco es una enzima grande (≈500 kDa) compuesta de ocho subunidades grandes idénticas y ocho subunidades pequeñas idénticas. Una subunidad está codificada en el DNA del cloroplasto; las otras, en el DNA nuclear. Dado que la velocidad catalítica de la rubisco es bastante lenta, se necesitan muchas copias de la enzima para fijar suficiente CO_2. En efecto, esta enzima constituye casi el 50% de la proteína del cloroplasto y se cree que es la proteína más abundante de la tierra.

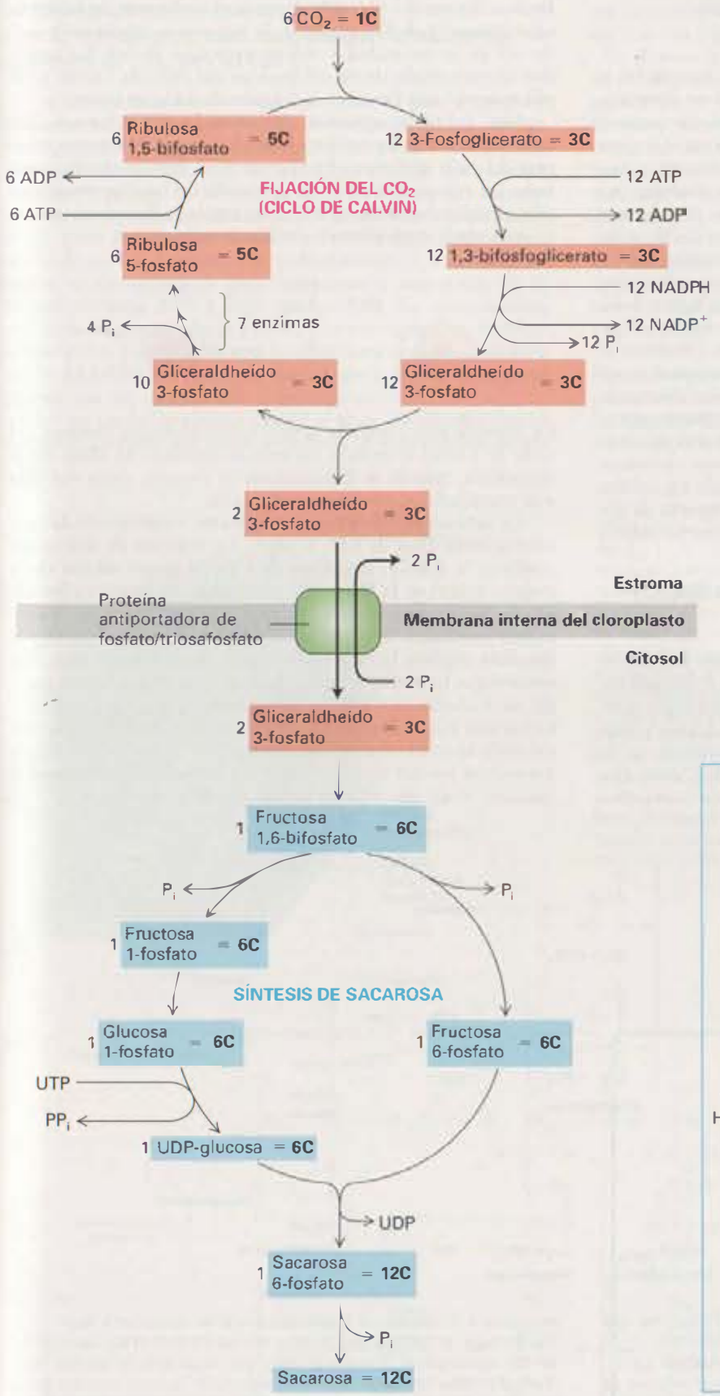
Cuando se exponen algas fotosintéticas a un pulso breve de CO_2 marcado con ^{14}C y las células se rompen luego rápidamente, el fosfoglicerato es radiomarcado más rápidamente y toda la radiactividad se halla en el grupo carboxilo. Este descubrimiento establece que la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa fija el CO_2. Como el CO_2 inicialmente se incorpora a componentes de tres carbonos, el ciclo de Calvin se denomina también *vía* C_3 de fijación del carbono.

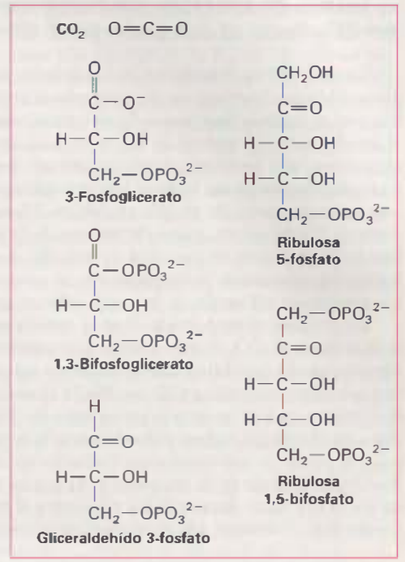
El destino del 3-fosfoglicerato formado por la rubisco es complejo: una parte se convierte en almidón o sacarosa, pero parte se utiliza para regenerar la ribulosa 1,5 bifosfato. Se necesitan al menos nueve enzimas para regenerar la ribulosa 1,5 bifosfato a partir del 3-fosfoglicerato. Cuantitativamente por cada 12 moléculas de 3- fosfoglicerato generado por la rubisco (un total de 36 átomos de C), 2 moléculas (6 átomos de C) son convertidas a 2 moléculas de gliceraldehído 3-fosfato (y luego a 1 hexosa), mientras que 10 moléculas (30 atomos de C) son convertidas en 6 moléculas de ribulosa 1,5 bifosfato (fig. 8-42, *arriba*). La fijación de seis moléculas de CO_2 y la formación neta de dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato requieren el consumo de 18 ATP y 12 NADPH, generados por los procesos de la fotosíntesis que necesitan luz.

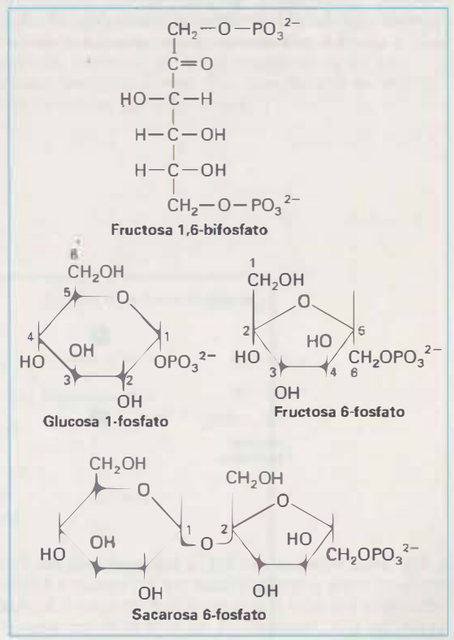


▲ **Fig. 8-41. Reacción inicial que fija el CO_2 en compuestos orgánicos.** En esta reacción, catalizada por la ribulosa 1,5 bifosfato, el CO_2 se condensa con el azúcar de cinco carbonos ribulosa 1,5 bifosfato. Los productos son dos moléculas de 3-fosfoglicerato.

▶ **Fig. 8-42. Ruta o vía del carbono durante la fotosíntesis.** *(Arriba)* Seis moléculas de CO_2 son convertidas en dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato. Estas reacciones, que constituyen el ciclo de Calvin, tienen lugar en la estroma del cloroplasto. A través del transportador fosfato/triosafosfato, algo del gliceraldehído 3-fosfato es transportado al citosol en intercambio de fosfato. *(Abajo)* en el citosol, una serie de reacciones exergónicas convierte el gliceraldehído 3-fosfato en fructosa 1,6 bifosfato y, en última instancia, en el disacárido sacarosa. Algo del gliceraldehído 3-fosfato (no mostrado aquí) también es convertido en aminoácidos y grasas, componentes esenciales para el crecimiento de las plantas.







La síntesis de sacarosa por incorporación del CO_2 fijado se completa en el citosol

Después de su formación en la estroma del cloroplasto, el gliceraldehído 3-fosfato es transportado al citosol en intercambio con el fosfato. Los pasos finales de la síntesis de sacarosa se producen en el citosol de las células de las hojas. En estas reacciones, una molécula de gliceraldehído 3-fosfato se isomeriza a dihidroxiacetona fosfato. Este compuesto se condensa con una segunda molécula de gliceraldehído 3-fosfato para formar fructosa 1,6-bifosfato, que es la inversa de la reacción de aldolasa en la glucólisis (véase fig. 8-4, paso 4). La fructosa 1,6-bifosfato es convertida principalmente en sacarosa por las reacciones que se muestran en la parte inferior de la figura 8-42.

La proteína transportadora en la membrana del cloroplasto que lleva el CO_2 fijado (como gliceraldehído 3-fosfato) al citosol cuando la célula exporta sacarosa vigorosamente, es un antiportador estricto: el CO_2 no fijado abandona el cloroplasto a menos que se le incorpore un fosfato. El fosfato es generado en el citosol, sobre todo durante la formación de sacarosa, a partir de intermediarios fosforilados de tres carbonos. Por ende, la síntesis de sacarosa y su salida desde las células de las hojas hacia otras células fomentan el transporte de gliceraldehído 3-fosfato adicional desde el cloroplasto al citosol.

La luz y la rubisco activasa estimulan la fijación de CO_2

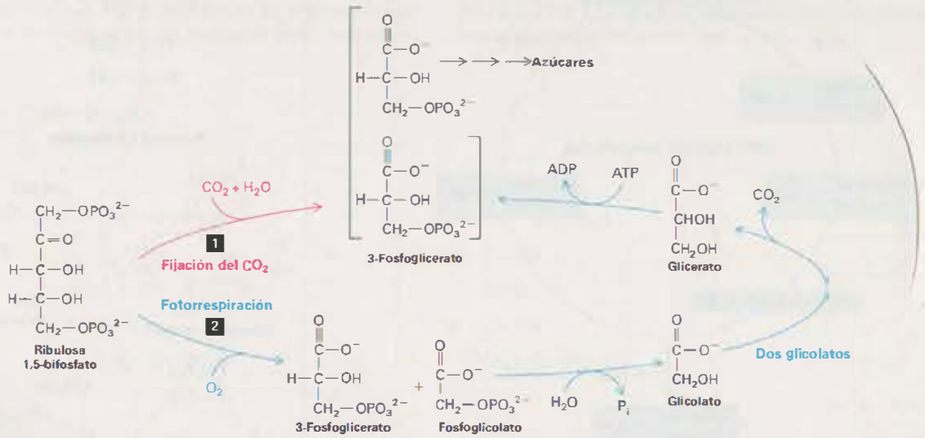
Las enzimas del ciclo de Calvin que catalizan la fijación de CO_2 se inactivan con rapidez en la oscuridad, conservando por ende el ATP generado en la oscuridad para otras reacciones sintéticas, como la biosíntesis de aminoácidos y lípidos. Un mecanismo que contribuye a su control es la dependencia del pH de varias enzimas del ciclo de Calvin. Debido a que los protones son transportados desde la estroma hacia el lumen del tilacoide durante el transporte fotoelectrónico (véase fig. 8-37), el pH de la estroma se incrementa desde ≈7 en la oscuridad a ≈8 en presencia de luz. La actividad incrementada de varias enzimas del ciclo de Calvin en el pH más elevado fomenta la fijación de CO_2 en la luz.

Una proteína estromal denominada *tiorredoxina (Tx)* también desempeña un papel en el control de algunas enzimas del ciclo de Calvin. En la oscuridad, la tiorredoxina contiene un enlace disulfuro; en presencia de luz, los electrones son transferidos desde el PSI, a través de la ferredoxina, a la tiorredoxina, reduciendo su enlace bisulfuro:



La tiorredoxina reducida activa entonces varias enzimas del ciclo de Calvin al reducir los enlaces disulfuro en ellos. En la oscuridad, cuando la tiorredoxina se reoxida, estas enzimas son reoxidadas y, por ende, inactivadas.

La rubisco se activa espontáneamente en presencia de concentraciones altas de CO_2 y Mg^{2+}. La reacción de activación conlleva la adición covalente de CO_2 al grupo amino de la cadena lateral de la lisina-191, formando un grupo carbamato que luego se une a un ion Mg^{2+}. Sin embargo, en condiciones normales, con niveles medioambientales de CO_2, la reacción requiere la catálisis mediante la rubisco activasa, una enzima que hidroliza simultáneamente el ATP y utiliza la energía para añadir un CO_2 a la lisina. Esta enzima fue descubierta durante el estudio de una cepa de *Arabidopsis thaliana* que requería altos niveles de CO_2 para crecer y que no exhibió la activación por luz de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa; el mutante tenía una rubisco activasa defectuosa.



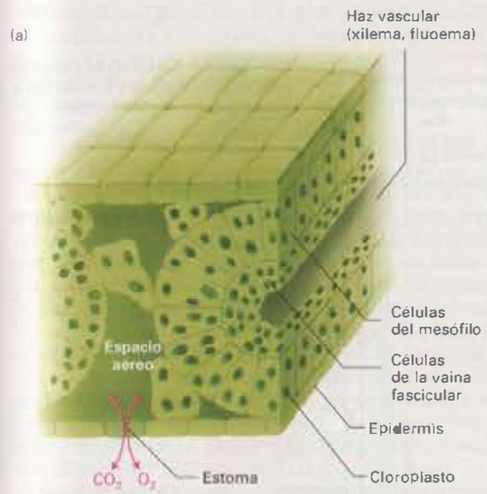
▲ **Fig. 8-43. Fijación del CO_2 y fotorrespiración.** Estas vías que compiten entre sí son iniciadas por la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa (rubisco) y ambas utilizan ribulosa 1,5-bifosfato. La fijación del CO_2, reacción (1), es favorecida por altas presiones de CO_2 y bajas presiones de O_2; la fotorrespiración, la vía (2), tiene lugar a bajas presiones de CO_2 y altas presiones de O_2 (es decir, en condiciones atmosféricas normales). El fosfoglucolato es reciclado a través de un grupo complejo de reacciones que tienen lugar en los peroxisomas y en las mitocondrias, así como en los cloroplastos. Resultado neto: por cada dos moléculas de fosfoglucolato formadas por fotorrespiración (cuatro átomos de C), una molécula de 3-fosfoglicerato es finalmente formada y reciclada, y se pierde una molécula de CO_2.

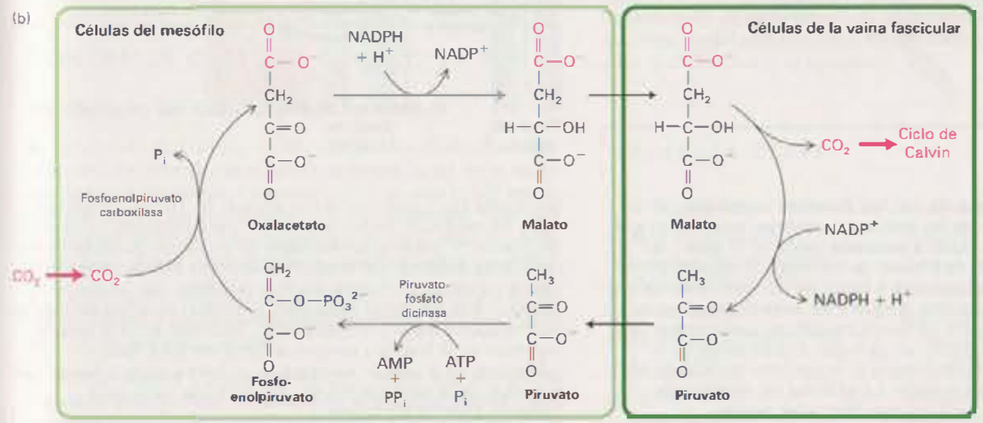
La fotorrespiración, que compite con la fotosíntesis, está reducida en las plantas que fijan el CO_2 por la vía C_4

La fotosíntesis siempre está acompañada por la **fotorrespiración**, un proceso que ocurre en presencia de luz, consume O_2 y convierte la ribulosa 1,5-bifosfato en parte a CO_2. Como muestra la figura 8-34, la rubisco cataliza dos reacciones que compiten: la adición de CO_2 a ribulosa 1,5 bifosfato para formar dos moléculas de 3-fosfoglicerato y la adición de O_2 para formar una molécula de 3-fosfoglicerato y una molécula de dos carbonos, el fosfoglucolato. La fosforrespiración es derrochadora para la economía energética de la planta: consume ATP y O_2, y genera CO_2. Es sorprendente, por lo tanto, que toda la rubisco conocida catalice la fotorrespiración. Es probable que la estructura necesaria del sitio activo de la rubisco haya imposibilitado la evolución de una enzima que no catalizara la fotorrespiración.

En un medio ambiente cálido y seco, las plantas deben mantener cerrados los poros (estomas) de intercambio de gases en sus hojas gran parte del tiempo para evitar la pérdida excesiva de humedad. Esto provoca la caída de los niveles de CO_2 dentro de la hoja por debajo de la K_m de la rubisco para el CO_2. En estas condiciones, la velocidad de la fotosíntesis disminuye y la fotorrespiración se favorece ampliamente. El maíz, la caña de azúcar, la grama y otras plantas que pueden crecer en ambientes cálidos y secos han desarrollado una forma de evitar este problema utilizando una vía de dos pasos para la fijación del CO_2 en la cual un paso de acumulación de CO_2 precede al ciclo de Calvin. Esta vía ha sido denominada la *vía C_4* porque el CO_2 marcado con [^{14}C] mostró que las primeras moléculas radiactivas formadas durante la fotosíntesis en esta vía son componentes de cuatro carbonos, como el oxalacetato y el malato, en lugar de las moléculas de tres carbonos que inician el ciclo de Calvin (vía C_3).

La vía C_4 involucra dos tipos de células: las *células mesófilas*, adyacentes a los espacios aéreos en el interior de la hoja y las *células de la vaina fascicular*, que rodean el tejido vascular (fig. 8-44a). En las células mesófilas de las plantas C_4, el fosfoenolpiruvato, una molécula de tres carbonos derivada del



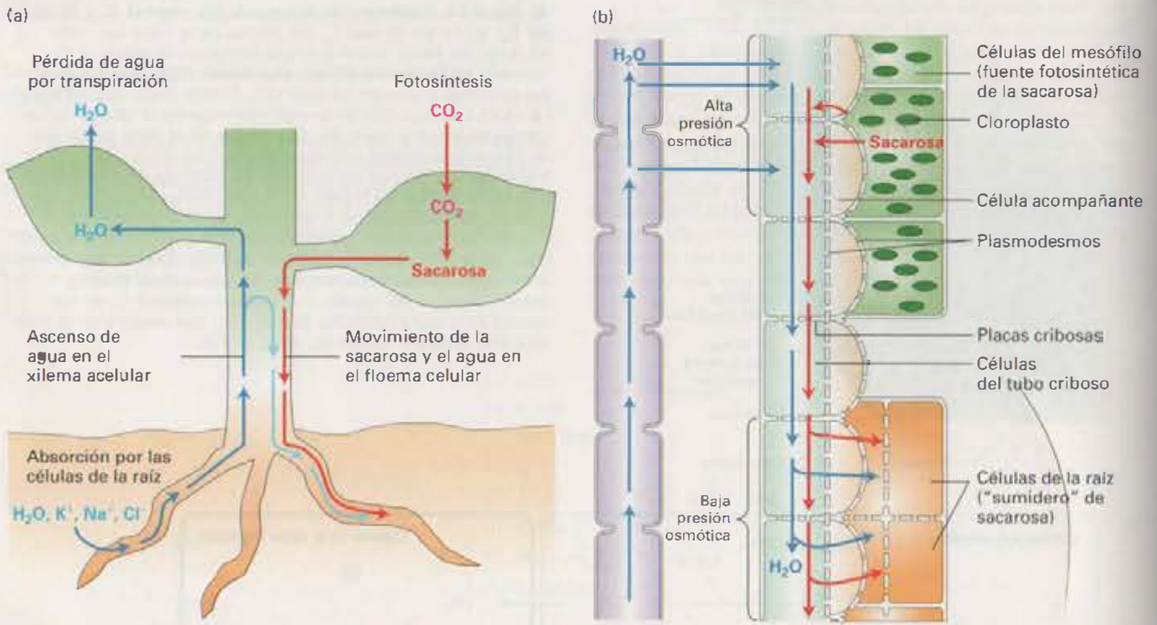


◀ **Fig. 8-44. Anatomía de la hoja de las plantas C_4 y la vía del C_4.** (a) En las plantas C_4, las células de la vaina fascicular recubren los haces vasculares que contienen el xilema y el floema. Las células mesófilas, adyacentes a los espacios aéreos subestromales, pueden asimilar CO_2, formar moléculas de cuatro carbonos con bajo CO_2 ambiental y entregarlas al interior de las células de la vaina fascicular. Las células de la vaina fascicular contienen abundantes cloroplastos y son los sitios de fotosínteisis y síntesis de sacarosa. La sacarosa es transportada al resto de la planta a través del floema. En las plantas C_3, que carecen de las células de la vaina fascicular, el ciclo de Calvin funciona en las células mesófilas para fijar el CO_2. (b) La enzima clave en la vía C_4 es la fosfoenolpiruvato carboxilasa, que asimila el CO_2 para formar oxalacetato en las céluas mesófilas. La descarboxilación del malato u otros intermediarios C_4 en las células de la vaina fascicular liberan CO_2, que penetra en el ciclo de Calvin estándar (véase fig. 8-42, *arriba*).

piruvato, reacciona con el CO_2 para generar oxalacetato, un componente de cuatro carbonos. La enzima que cataliza esta reacción, la *fosfoenolpiruvato carboxilasa*, se encuentra casi exclusivamente en las plantas C_4 y a diferencia de la rubisco es sensible al O_2. La reacción general de piruvato a oxalacetato involucra la hidrólisis de un enlace fosfoanhidrido en el ATP y tiene un ΔG negativo. Por lo tanto, la fijación del CO_2 se producirá aun cuando la concentración de CO_2 sea baja. El oxalacetato formado en las células mesófilas se reduce a malato, el cual es transferido, por medio de un transportador especial, a las células de la vaina fascicular, donde se libera el CO_2 por descarboxilación y entra en el ciclo de Calvin (fig. 8-44b).

Debido al transporte del CO_2 desde las células mesófilas, la concentración de CO_2 en las células de la vaina fascicular de las plantas C_4 es mucho mayor que la existente en la atmósfera normal. Las células de la vaina fascicular también son inusuales en el sentido de que carecen del PSII y llevan a cabo sólo el flujo cíclico de electrones catalizado por el PSI, por lo cual no se produce O_2. Las altas concentraciones de CO_2 y las bajas de O_2 en las células de la vaina fascicular favorecen la fijación de CO_2 por la rubisco para formar 3-fosfoglicerato e inhiben la utilización de la ribulosa 1,5 bifosfato en la fotorrespiración.

En cambio, la alta concentración de O_2 en la atmósfera favorece la fotorrespiración en las células mesófilas de las plantas C_3 (vía 2 en la fig. 8-43); como resultado, hasta el 50% del carbono fijado por la rubisco podría ser reoxidado a CO_2 en las plantas C_3. Las plantas C_4 son superiores a las plantas C_3 al utilizar el CO_2 disponible, puesto que la enzima carboxilasa fosfoenolpiruvato de las C_4 tiene mayor afinidad por el CO_2 que la rubisco en el ciclo de Calvin. Sin embargo, se consume un enlace fosfodiéster del ATP en el proceso cíclico de las C_4 (para generar fosfoenolpiruvato a partir de piruvato); por ende la eficiencia general de la producción fotosintética de azúcares a partir de NADPH y ATP es menor que la existente en las plantas C_3, que utilizan sólo el ciclo de Calvin para la fijación de CO_2. No obstante, debido a la eliminación de pérdidas de la fotorrespiración las velocidades netas de la fotosíntesis para las plantas C_4, como el maíz o la caña de azúcar, pueden ser de dos a tres veces las velocidades de las plantas C_3 que, por otra parte, son similares a éstas, como el trigo, el arroz o la avena.



▲ Fig. 8-45. Diagrama de los dos sistemas vasculares –el xilema y el floema– de las plantas superiores, que muestra el transporte de agua (azul) y sacarosa (rojo). (a) El agua y las sales entran en el xilema a través de las raíces. El agua se pierde por evaporación, principalmente a través de las hojas, creando una presión de succión que lleva el agua y las sales disueltas hacia arriba a través del xilema. El floema es utilizado para conducir la sacarosa disuelta, producida en las hojas, a otras partes de la planta. (b) La vista ampliada ilustra el mecanismo del flujo de la sacarosa en una planta superior. La sacarosa es transportada activamente desde las células mesófilas a las células acompañantes y luego se mueve a través de los plasmodesmos hacia las células de los tubos cribosos que constituyen los vasos del floema. El incremento resultante en la presión osmótica dentro del floema ocasiona que el agua transportada por los vasos del xilema penetre en el floema por flujo osmótico. Las células de las raíces u otras células no fotosintéticas extraen sacarosa del floema por transporte activo y la metabolizan. Esto disminuye la presión osmótica en el floema y provoca la salida del agua. Estas diferencias en la presión osmótica en el floema entre la fuente y el sumidero de la sacarosa proveen la fuerza que conduce la sacarosa a través del floema.

La sacarosa es transportada desde las hojas a través del floema a todos los tejidos vegetales

Uno de los dos carbohidratos producidos por la fotosíntesis, el almidón, permanece en las células mesófilas, de las plantas C_3 y en las células de la vaina fascicular de las plantas C_4. En estas células, el almidón está sujeto a la glucólisis, sobre todo en la oscuridad, formando ATP, NADH y moléculas pequeñas que son utilizadas como unidades químicas para la síntesis de aminoácidos, lípidos y otros constituyentes celulares. La sacarosa, en cambio, se transporta desde las células fotosintéticas hacia toda la planta. Los sistemas vasculares utilizados por las plantas superiores para transportar agua, iones, sacarosa y otras sustancias solubles en agua tienen dos componentes; el *xilema* y el *floema*, generalmente agrupados juntos en el *haz vascular* (véase fig. 8-44).

Como se ilustra en la figura 8-45a, el xilema conduce las sales y el agua desde las raíces a través de los tallos hasta las hojas. El agua transportada hacia arriba a través del xilema se pierde de la planta por evaporación, principalmente desde las hojas. En las plantas jóvenes el xilema está constituido por células interconectadas por plasmodesmos, pero en los tejidos maduros el cuerpo celular se degenera y deja sólo las paredes de la célula. Por el contrario, el floema transporta la sacarosa disuelta y las moléculas orgánicas, como los aminoácidos, desde sus sitios de origen en las hojas a los tejidos a través de la planta; el agua también es transportada hacia abajo en el floema.

Un vaso del floema consiste en largas células delgadas, llamadas *células del tubo criboso*, interconectadas por las *placas cribosas*, un tipo de pared celular que contiene muchos plasmodesmos y que está muy perforada (fig. 8-45b). Numerosos plasmodesmos también conectan las células del tubo criboso con las *células acompañantes*, que revisten los vasos del floema, y las células mesófilas con las células acompañantes. Las células del tubo criboso perdieron su núcleo y la mayoría de los orgánulos, pero retienen una membrana plasmática permeable al agua y el citoplasma, a través del cual se mueven la sacarosa y el agua. En efecto, las células del tubo criboso forman un tubo continuo de citosol que se extiende a través de toda la planta. Las diferencias en la fuerza osmótica provoca el movimiento de la sacarosa desde las células fotosintéticas mesófilas en las hojas, a través del floema, hasta las raíces y otros tejidos no fotosintéticos que catabolizan la sacarosa.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 8.6

Metabolismo del CO_2 durante la fotosíntesis

- En el ciclo de Calvin, el CO_2 se fija a las moléculas orgánicas en una serie de reacciones que tienen lugar en la estroma de los cloroplastos. La reacción inicial, catalizada por la rubisco, forma un intermediario de tres carbonos. Una parte del gliceraldehído 3-fosfato generado en el ciclo es transportado al citosol y convertido en sacarosa (véase fig. 8-42).
- La activación dependiente de luz de varias enzimas del ciclo de Calvin y de otros mecanismos incrementa la fijación de CO_2 en presencia de luz.
- En las plantas C_3, mucho del CO_2 fijado por el ciclo de Calvin se pierde como resultado de la fotorrespiración, una reacción derrochadora catalizada por la rubisco que es favorecida a bajas concentraciones de CO_2 y altas presiones de O_2 (véase fig. 8-43).
- En las plantas C_4, el CO_2 está fijado inicialmente en las células mesófilas externas por reacción con el fosfoenolpiruvato. Las moléculas de cuatro carbonos así generadas son transportadas a las células de la vaina fascicular, donde el CO_2 es liberado y luego utilizado en el ciclo de Calvin. La proporción de fotorrespiración en las plantas C_4 es mucho menor que en las plantas C_3.
- La sacarosa de las células fotosintéticas es transportada a través del floema a las partes no fotosintéticas de la planta. Las diferencias en la presión osmótica proporcionan la fuerza que impulsa el transporte de sacarosa (véase fig. 8-45).

PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO

Aunque los procesos generales de fotosíntesis y oxidación mitocondrial son bien comprendidos, quedan muchos detalles importantes para descubrir por una nueva generación de científicos. Por ejemplo, se conoce poco acerca de cómo los complejos I y IV en la mitocondria acoplan los movimientos de protones y electrones para crear una fuerza protón-motriz. Asimismo, aunque ahora en general se acepta el mecanismo de cambio de afinidad de unión para la síntesis de ATP por el complejo F_0F_1 no entendemos cómo los cambios de conformación en cada subunidad están acoplados a la unión cíclica de ADP y P_i, la formación de ATP y luego la liberación de ATP. También quedan muchas preguntas acerca de la estructura y función de las proteínas de transporte de la membrana mitocondrial interna y de las membranas del cloroplasto que desempeñan un papel clave en la fosforilación oxidativa y la fotosíntesis. El análisis molecular de esas proteínas de membrana es difícil, y serán necesarios nuevos tipos de técnicas para dilucidar los detalles de sus estructuras y funciones.

Ahora sabemos que la liberación del citocromo *c* y otras proteínas del espacio intermembrana de la mitocondria hacia el citosol cumple un papel primordial en el desencadenamiento de la apoptosis (cap. 22). Ciertos miembros de la familia Bcl-2 de las proteínas apoptóticas y de los canales iónicos localizados en parte en la membrana mitocondrial externa participan en este proceso. Aún falta aprender mucho acerca de la estructura de estas proteínas de la membrana mitocondrial, sus funciones normales en el metabolismo celular y la alteración que conduce a la apoptosis.

PALABRAS CLAVE

ATP sintasa *302*
cadena respiratoria (cadena de transporte de electrones) *310*
ciclo de Calvin *342*
ciclo del ácido cítrico *309*
ciclo ● *323*
citocromos *318*
clorofila *331*
cloroplastos *302*
complejo F_0F_1 *302*
control respiratorio *330*
desacopladores *330*
fosforilación a nivel del sustrato *304*
fosforilación oxidativa *316*
fotorrespiración *345*
fotosíntesis *301*

fotosistemas *333*
fuerza protón-motriz *302*
glucólisis *301*
hipótesis endosimbionte *302*
mitocondria *301*
oxidación aeróbica *301*
quimioósmosis *302*
respiración celular *307*
rubisco *342*
tilacoides *331*
transportadores de electrones *302*
transporte fotoelectrónico *334*
vía C4 *345*

REVISIÓN DE CONCEPTOS

1. La fuerza protón-motriz (pmf) es esencial tanto para la función mitocondrial como para la de los cloroplastos. ¿Qué produce la pmf y cuál es su relación con el ATP?

2. La membrana mitocondrial interna exhibe todas las características fundamentales de una membrana celular típica, pero también tiene varias características únicas que están estrechamente asociadas con su papel en la fosforilación oxidativa. ¿Cuáles son estas características únicas? ¿Cómo contribuye cada una a la función de la membrana interna?

3. La producción máxima de ATP a partir de la glucosa involucra las reacciones de la glucólisis, el ciclo del ácido cítrico y la cadena de transporte de electrones. ¿Cuáles de estas reacciones requiere O_2 y por qué?

4. Describa cómo los electrones producidos por la glucólisis son entregados a la cadena de transporte de electrones. ¿Qué papel desempeñan los aminoácidos en este proceso? ¿Cuál sería la consecuencia para la producción general de ATP por molécula de glucosa si una mutación inactivara este sistema de entrega? ¿Cuál sería la consecuencia a largo plazo para la actividad de la vía glucolítica?

5. Cada uno de los citocromos de la mitocondria contiene un grupo prostético. ¿Qué es un grupo prostético? ¿Qué tipo de grupo prostético está asociado con los citocromos? ¿Qué propiedad de los diferentes citocromos asegura la unidireccionalidad del flujo de electrones a lo largo de la cadena transportadora de electrones?

6. Se estima que cada par de electrones donado por el NADH conduce a la síntesis de aproximadamente tres moléculas de ATP, mientras cada par de electrones donado por el $FADH_2$ conduce a la síntesis de aproximadamente dos moléculas de ATP. ¿Cuál es la razón subyacente a esta diferencia en la producción de electrones donados por el $FADH_2$ o por el NADH?

7. Gran parte de nuestra comprensión acerca de la ATP sintasa deriva de la investigación en bacterias acrobias. ¿Qué es lo que hace a estos organismos útiles para la investigación? ¿Dónde tienen lugar las reacciones de glucólisis, el ciclo del ácido cítrico y la cadena de transporte de electrones en estos organismos? ¿Dónde se genera la pmf en las bacterias aerobias? ¿Qué otros procesos celulares dependen de la pmf en estos organismos?

8. Una función importante de la membrana mitocondrial interna es proveer una barrera selectivamente permeable al movimiento de las moléculas solubles en agua y por ende generar diferentes ambientes a cada lado de la membrana. Sin embargo, muchos de los sustratos y productos de la fosforilación oxidativa son solubles en agua y deben cruzar la membrana interna. ¿Cómo tiene lugar este transporte?

9. El ciclo Q desempeña un papel primordial en la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, los cloroplastos y las bacterias. ¿Cuál es la función del ciclo Q y cómo realiza esta función?¿Qué componentes del transporte de electrones participan en el ciclo Q en las mitocondrias, en las bacterias y en los cloroplastos?

10. Escriba la reacción completa de la fotosíntesis generadora de oxígeno. Explique la siguiente afirmación: el O_2 generado por la fotosíntesis es simplemente un subproducto de la reacción de generación de carbohidratos y ATP.

11. La fotosíntesis puede dividirse en múltiples etapas. ¿Cuáles son las etapas de la fotosíntesis y dónde tiene lugar cada una dentro de los cloroplastos?¿Dónde se genera la sacarosa producida por la fotosíntesis?

12. Los fotosistemas responsables de la absorción de energía luminosa están compuestos por dos componentes conectados, el centro de reacción y un complejo antena. ¿Cuál es la composición del pigmento y el papel de cada uno en el proceso de absorción de luz? ¿Qué evidencia existe de que los pigmentos hallados en estos componentes están involucrados en la fotosíntesis?

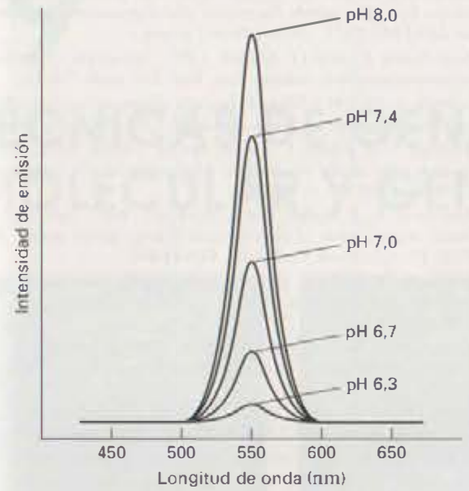
13. La fotosíntesis en las bacterias verdes y violetas no produce O_2 ¿Por qué?¿Cómo pueden estos organismos seguir utilizando la fotosíntesis para producir ATP?

14. Los cloroplastos contienen dos fotosistemas. ¿Cuál es la función de cada uno? Para el flujo lineal de electrones, diagrame el flujo de electrones desde la absorción de protones hasta la formación del NADPH. ¿Qué se sintetiza con la energía almacenada en la forma de NADPH?

15. Las reacciones del ciclo de Calvin que fija CO_2 no funcionan en la oscuridad. ¿Cuáles son las razones probables de esto? ¿Cómo son reguladas por la luz estas reacciones?

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Un gradiente de protones puede ser analizado con colorantes fluorescentes cuyo perfil de intensidad de emisión depende del pH. Uno de los colorantes más útiles para la medición de gradientes de pH a través de las membranas mitocondriales es el fluoroforo 2',7'-bis-(2-carboxietilo)-5(6)-carboxifluoresceína (BCECF) que no es permeable a la membrana y es soluble en agua. El efecto del pH en la intensidad de emisión del BCECF, excitado a 505 nm, se muestra en la figura. En un estudio, las vesículas selladas que contienen este componente fueron preparadas mezclando membranas mitocondriales internas no selladas, aisladas con BCECF; luego del resellado de las membranas, las vesículas fueron recogidas por centrifugación y luego resuspendidas en un medio no fluorescente.



a. Cuando estas vesículas fueron incubadas en un buffer fisiológico que contenía NADH, ADP, P_i, y O_2, la fluorescencia del BCECF atrapado disminuyó gradualmente en intensidad. ¿Qué sugiere esta disminución de la intensidad de la fluorescencia acerca de la preparación vesicular?

b. Cómo esperaría que cambien las concentraciones de ADP, P_i y O_2 durante el curso del experimento descrito en la parte a?¿Por qué?

c. Después de incubar por un tiempo las vesículas en un buffer que contenía ADP, P_i y O_2, la adición de dinitrofenol no provocó un incremento de la fluorescencia de BCECF. En cambio, la adición de valinomicina produjo un leve efecto transitorio. Explique estos hallazgos.

b. Prediga el resultado de un experimento realizado como se describe en la parte a si se utiliza un tejido de grasa parda como fuente de las membranas mitocondriales internas no selladas aisladas. Explique su respuesta.

BIBLIOGRAFIA

Oxidación de la glucosa y de los ácidos grasos a CO_2

Berg, J., J. Tymoczko, and L. Stryer. 2002. Biochemistry, 5th ed. W. H. Freeman and Company, chaps. 16 and 17.

Depre, C., M. Rider, and L. Hue. 1998. Mechanisms of control of heart glycolysis. Eur. J. Biochem. 258:277-290.

Fell, D. 1997. Understanding the Control of Metabolism. Portland Press.

Fersht, A. 1999. Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding. W. H. Freeman and Company. Contains an excellent discussion of the reaction mechanisms of key enzymes.

Fothergill-Gilmore, L. A., and P. A. Michels. 1993. Evolution of glycolysis. Prog. Biophys. Mol. Biol. 59:105-135.

Guest, J. R., and G. C. Russell. 1992. Complexes and complexities of the citric acid cycle in *Escherichia coli*. Curr. Top. Cell Reg. 33:231-247.

Krebs, H. A. 1970. The history of the tricarboxylic acid cycle. Perspect. Biol. Med. 14:154-170.

Mannaerts, G. P., and P. P. Van Veldhoven. 1993. Metabolic pathways in mammalian peroxisomes. Biochimie 75:147-158.

Nelson, D. L., and M. M. Cox. 2000. Lehninger Principles of Biochemistry. Worth, chaps. 14-17, 19.

Pilkis, S. J., T. H. Claus, I. J. Kurland, and A. J. Lange. 1995. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme. Ann. Rev Biochem. 64:799-835.

Rasmussen, B., and R. Wolfe. 1999. Regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle. Ann. Rev. Nutrition 19:463-484.

Velot, C., M. Mixon, M. Teige, and P. Srere. 1997. Model of a quinary structure between Krebs TCA cycle enzymes: a model for the metabolon. Biochemistry 36:14271-14276.

Transporte de electrones y generación de la fuerza protón-motriz

Babcock, G. 1999. How oxygen is acrivated and reduced in respiration. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 96:12971-12973.

Beinert, H., R. Holm, and E. Münck. 1997. Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. Science 277:653-659.

Brandt, U., and B. Trumpower. 1994. The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria. Crit. Rev Biochem. Mol. Biol. 29:165-197.

Darrouzet, E., C. Moser, P. L. Dutton, and F. Daldal. 2001. Large scale domain movement in cytochrome bc1: a new device for electron transfer in proteins. Trends Biochem. Sci. 26:445-451.

Grigorieff, N. 1999. Structure of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). Curr. Opin. Struc. Biol. 9: 476-483.

Michel, H., J. Behr, A. Harrenga, and A. Kannt. 1998. Cyrochrome *c* oxidase. Ann. Rev Biophys. Biomol. Struc. 27:329-356.

Mitchell, P. 1979. Keilin's respirarory chain concept and its chemiosmotic consequences. Science 206:1148-1159. (Nobel Prize Lecture.)

Ramirez, B. E., B. Malmström, J. R. Winkler, and H. B. Gray. 1995. The currents of life: the terminal electron-transfer complex of respiration. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 92:11949-11951.

Ruitenberg, M., et al. 2002. Reduction of cytochrome *c* oxidase by a second electron leads to proton translocation. Nature 417:99-102.

Saraste, M. 1999. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. Science 283:1488-1492.

Scheffler, I. 1999. Mitochondria. Wiley.

Schultz, B., and S. Chan. 2001. Srructures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. Ann. Rev. Biophys. Biomol. Srruc. 30:23-65.

Tsukihara, T., et al. 1996. The whole srructure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å. Science 272:1136-1144.

Walker, J. E. 1995. Determination of the srructures of respiratory enzyme complexes from mammalian mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 1271:221-227.

Xia, D., et al. 1997. Crystal structure of the cytochrome bc_1 complex from bovine heart mitochondria. Science 277:60-66.

Zaslavsky, D., and R. Gennis. 2000. Proton pumping by cytochrome oxidase: progress and postulares. Biochim. Biophys. Acta 1458:164-179.

Zhang, Z., et al. 1998. Electron transfer by domain movement in cytochtome bc_1. Nature 392:677-684.

Generación de la fuerza protón-motriz para procesos que requieren energía

Bianchet, M. A., J. Hullihen, P. Pedersen, and M. Amzel. The 2.8-Å structure of rat liver F1-ATPase: configuration of a critical intermediate in ATP synthesis/hydrolysis. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 95:11065-11070.

Boyer, P. D. 1989. A perspective of the binding change mechanism for ATP synthesis. FASEB J. 3:2164-2178.

Boyer, P. D. 1997. The ATP synthase—a splendid molecular machine. Ann. Rev. Biochem. 66:717-749.

Capaldi, R., and R. Aggeler. 2002. Mechanism of the F_0F_1-type ATP synthase—a biological rotary motor. Trends Biochem. Sci. 27:154-160.

Elston, T., H. Wang, and G. Oster. 1998. Energy transduction in ATP synthasc. Nature 391:510-512.

Kinosita, K., et al. 1998. F_1-ATPase: a rotary motor made of a single molecule. Cell 93:21-24.

Klingenberg, M., and S. Huang. 1999. Structure and function of the uncoupling ptotein from btown adipose tissue. Biochim. Biophys. Acta 1415:271-296.

Tsunoda, S., R. Aggeler, M. Yoshida, and R. Capaldi. 2001. Rotation of the c subunit oligomer in fully functional F_0F_1 ATP synthase. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 98:898-902.

Yasuda, R., et al. 2001. Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F1- ATPase. Nature 410:898-904.

Etapas de la fotosíntesis y pigmentos que absorben luz

Blankenship, R. E. 2002. Molecular Mechanisms of Photosynthesis. Blackwell.

Deisenhofer, J., and J. R. Norris, eds. 1993. The Photosynthetic Reaction Center, vols. 1 and 2. Academic Press.

Govindjee, and W. J. Coleman. 1990. How plants make oxygen. Sci. Am. 262(2):50-58.

Harold, F. M. 1986. The Vital Force: A Study of Bioenergetics. W. H. Freeman and Company, chap. 8.

McDermott, G., et al. 1995. Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria. Nature 364:517.

Prince, R. 1996. Photosynthesis: the Z-scheme revisited. Trends Biochem. Sci. 21:121-122.

Wollman, F. A. 2001. State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. EMBO J. 20:3623-3630.

Análisis molecular de los fotosistemas

Allen, J. F. 2002. Photosynthesis of ATP—electrons, proton pumps, rotors, and poise. Cell 110:273-276.

Aro, E. M., I. Virgin, and B. Andersson. 1993. Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage, and turnover. Biochim. Biophys. Acta 1143:113-134.

Deisenhofer, J., and H. Michel. 1989. The photosyntheticreaction center from the purple bacterium *Rhodopseudomonas viridis*. Science 245:1463-1473. (Nobel Prize Lecture.)

Deisenhofer, J., and H. Michel. 1991. Structures of bacterial photosynthetic reaction centers. Ann. Rev. Cell Biol. 7:1-23.

Golbeck, J. H. 1993. Shared themaric elements in photochemical reaction centers. Proc. Nat'l. Acad Sci. USA 90: 1642-1646.

Haldrup, A., P. Jensen, C. Lunde, and H. Schellet 2001. Balance of power: a view of the mechanism of photosynthetic state transitions. Trends Plant Sci. 6:301-305.

Hankamer, B., J. Barber, and E. Boekema. 1997. Structute and membrane organization of photosystem II from green plants. Ann. Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:641-672.

Heathcote, P., P. Fyfe, and M. Jones. 2002. Reaction centres: the structure and evolution of biological solar power. Trends Biochem. Sci. 27:79-87.

Horton, P., A. Ruban, and R. Walters. 1996. Regulation of light harvesting in green plants. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47:655-684.

Jordan, P., et al. 2001 Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. Nature 411:909-917.

Kühlbrandt, W. 2001. Chlorophylls galore. Nature 411:896-898.

Martin, J. L., and M. H. Vos. 1992. Femtosecond biology. Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struc. 21:199-222.

Penner-Hahn, J. 1998. Structural characterization of the Mn site in the photosynthetic oxygen-evolving complex. Struc. and Bonding 90: 1-36.

Tommos, C., and G. Babcock. 1998. Oxygen production in nature: a light-driven metalloradical enzyme process. Accounts Chem. Res. 31:18-25.

Metabolismo del CO_2 durante la fotosíntesis

Bassham, J. A. 1962. The path of carbon in photosynthesis. Sci. Am. 206(6):88-100.

Buchanan, B. B. 1991. Regulation of CO_2 assimilation in oxygenic photosynthesis: the ferredoxin/thioredoxin system. Perspective on its discovery, present status, and future development. Arch. Biochem. Biophys. 288:1-9.

Portis, A. 1992. Regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity. Ann. Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43:415-437.

Rawsthorne, S. 1992. Towards an undetstanding of C_3-C_4 photosynthesis. Essays Biochem. 27:135-146.

Rokka, A., I. Zhang, and E.-M. Aro. 2001. Rubisco activase: an enzyme with a temperature-dependent dual function? Plant J. 25:463-472.

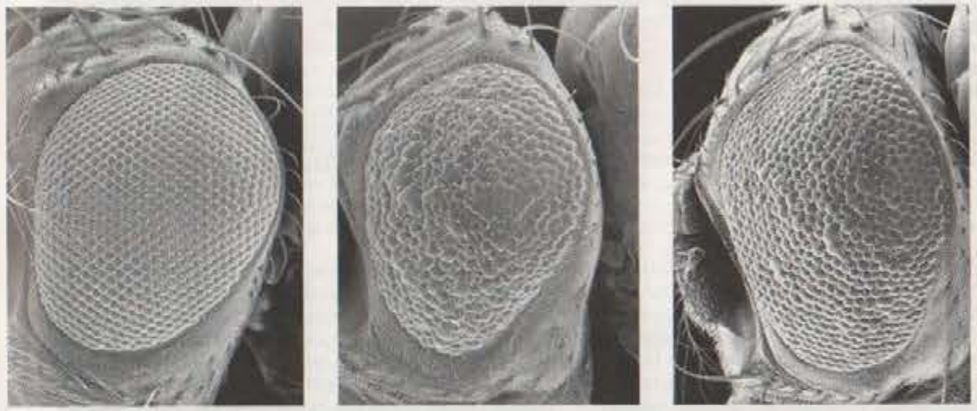
Sage, R., and J. Colemana. 2001. Effects of low atmospheric CO_2 on plants: more than a thing of the past. Trends Plant Sci 6:18-24.

Schneider, G., Y. Lindqvist, and C. I. Branden. 1992. Rubisco: structure and mechanism. Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struc. 21:119-153.

Wolosiuk, R. A., M. A. Ballicora, and K. Hagelin. 1993. The reductive pentose phosphate cycle for photosynthetic CO_2 assimilation: enzyme modulation. FASEB J. 7:622-637.

9

TÉCNICAS DE GENÉTICA MOLECULAR Y GENÓMICA



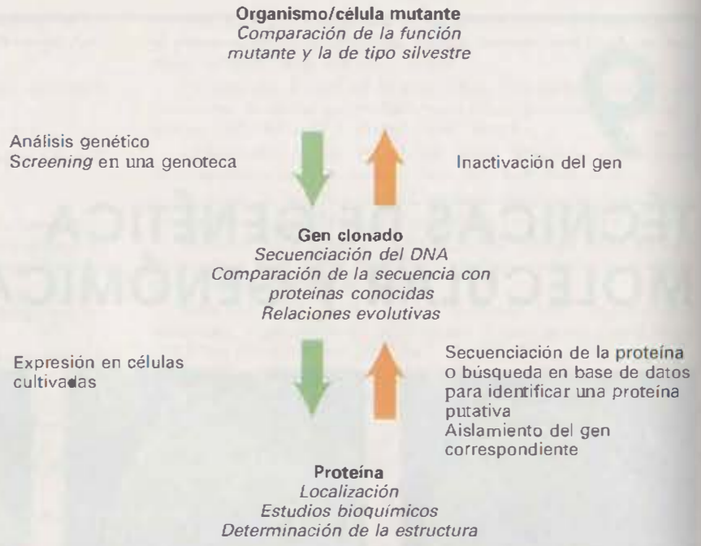
Efecto de las mutaciones en el desarrollo de *Drosophila*. Microfotografías electrónicas de barrido del ojo de (izquierda) una mosca de tipo silvestre, (medio) una mosca que lleva una mutación dominante del desarrollo producida por métodos de DNA recombinante y (derecha) una mosca que lleva una mutación supresora que revierte parcialmente el efecto de la mutación dominante. (Cortesía de Ilaria Rebay, Whitehead Institute, MIT.)

En capítulos anteriores se estudiaron las diversas tareas que ejecutan las proteínas en los sistemas biológicos. En los próximos capítulos se describe cómo algunas proteínas llevan a cabo su tarea específica. En el estudio de una proteína recién descubierta, los biólogos celulares suelen comenzar preguntado: ¿Cuál es su función, dónde está ubicada y cuál es su estructura? Para responder a estas preguntas, los investigadores emplean tres herramientas: el gen que codifica la proteína, una línea celular u organismo mutante que carece de las funciones de la proteína y una fuente de proteína purificada para estudios bioquímicos. En este capítulo consideramos diversos aspectos de dos estrategias experimentales básicas para la obtención de las tres herramientas (fig. 9-1).

La primera estrategia, referida a menudo a la *genética clásica*, comienza con el aislamiento de un mutante que aparenta ser defectuoso en algunos procesos de interés. Luego se uti-

CONTENIDO

9.1 Análisis genético de mutaciones para identificar y estudiar genes
9.2 Clonación del DNA mediante métodos de DNA recombinante
9.3 Caracterización y uso de fragmentos clonados de DNA
9.4 Genómica: análisis amplio del genoma, de la estructura de genes y de la expresión
9.5 Inactivación de la función de genes específicos en los eucariontes
9.6 Identificación y localización de genes de enfermedades humanas



▶ Fig. 9-1. Vista general de dos estrategias para determinar la función, la ubicación y la estructura primaria de las proteínas. Un organismo mutante es el punto de partida para la estrategia de genética clásica (flechas verdes). La estrategia inversa (flechas anaranjadas) comienza con el aislamiento bioquímico de una proteína o con la identificación de una proteína putativa basada en el análisis del gen almacenado y las secuencias de proteínas. En ambas estrategias, el gen se aísla desde una genoteca, una larga colección de secuencias de DNA clonadas que representa el genoma de un organismo. Una vez que un gen clonado es aislado, puede utilizarse para producir la proteína codificada en sistemas de expresión bacterianos o eucariontes. Alternativamente, un gen clonado puede inactivarse mediante una de las diversas técnicas usadas para generar células u organismos mutantes.

lizan métodos genéticos para identificar el gen afectado, que después se aísla a partir de una genoteca apropiada, una gran colección de secuencias de DNA individuales que representan todo o parte del genoma de un organismo. El gen aislado puede manipularse para producir grandes cantidades de la proteína para experimentos bioquímicos y para diseñar sondas para estudios acerca de dónde y cuándo la proteína codificada se expresa en un organismo. La segunda estrategia sigue esencialmente los mismos pasos que el método clásico, pero en orden inverso, comenzando con el aislamiento de una proteína de interés o su identificación basada en el análisis de la secuencia genómica de un organismo. Una vez que el gen correspondiente ha sido aislado de una genoteca, se lo puede alterar y luego reinsertar en un organismo. Observando los efectos del gen alterado, los investigadores pueden inferir la función de la proteína normal.

Un componente importante en ambas estrategias para estudiar una proteína y su función biológica es el aislamiento del gen correspondiente. De esa manera analizaremos diversas técnicas mediante las cuales los investigadores pueden aislar, secuenciar y manipular regiones específicas del DNA de un organismo. Las extensas colecciones de secuencias de DNA acumuladas en los últimos años han dado nacimiento a un nuevo campo de estudio denominado **genómica**, la caracterización molecular de genomas enteros y el total de los patrones de expresión génica. También se presentan numerosos ejemplos del tipo de información disponible a partir de tan vasto análisis de los genomas.

9.1 Análisis genético de mutaciones para identificar y estudiar genes

Como se describe en el capítulo 4, la información codificada en la secuencia de DNA de genes especifica la secuencia y, en consecuencia, la estructura y función de toda molécula proteica en una célula. El poder de la genética como herramienta para el estudio de células y organismos reside en la capacidad de los investigadores para alterar selectivamente cada copia de un solo tipo de proteína en una célula realizando un cambio en el gen para esa proteína. Los análisis genéticos de mutantes defectuosos en un proceso particular pueden revelar a) nuevos genes requeridos para que el proceso ocurra; b) el orden en el cual los productos del gen actúan en el proceso; y c) si las proteínas codificadas por diferentes genes interactúan entre sí. Antes de ver cómo los estudios genéticos de este tipo pueden proporcionar un mayor entendimiento de los complicados mecanismos de los procesos celulares o del desarrollo, explicaremos algunos términos genéticos básicos utilizados en nuestro abordaje.

Las diferentes formas o variantes de un gen se denominan **alelos**. Los genetistas comunmente denominan alelos a las numerosas variantes genéticas que ocurren naturalmente en las poblaciones, sobre todo, las humanas. El término **mutación** se reserva para instancias en las cuales se sabe que se ha formado un alelo recientemente, como sucede después del tratamiento de un organismo experimental con un **mutágeno**, un agente que causa un cambio hereditario en la secuencia del DNA.

En sentido estricto, el **genotipo** es el conjunto particular de alelos para todos los genes portados por un individuo. Sin embargo, este término también se utiliza en un sentido más restrictivo para denotar sólo los alelos del gen particular o de los genes en estudio. Para organismos experimentales, el término tipo **silvestre** suele utilizarse para designar un genotipo estándar para usarlo como referencia en los experimentos de cultivo. Así, el alelo normal no mutante será designado como el *tipo silvestre*. Debido a la enorme variación alélica que existe de manera natural en las poblaciones humanas, ese término generalmente denota un alelo que está presente con una frecuencia mucho más alta que cualquier otra de las alternativas posibles.

Los genetistas trazan una distinción importante entre el *genotipo* y el **fenotipo** de un organismo. El fenotipo se refiere a todos los atributos físicos o rasgos de un individuo que son consecuencia de un genotipo dado. Sin embargo, en la práctica el término *fenotipo* suele denotar las consecuencias físicas que resultan sólo de los alelos que están en estudio experimental. Las características fenotípicas rápidamente observables son críticas en el análisis genético de las mutaciones.

Los alelos mutantes recesivos y dominantes por lo general tienen efectos opuestos en la función del gen

Una diferencia genética fundamental entre organismos experimentales es si sus células llevan un solo juego de cromosomas o dos copias de cada cromosoma. Los primeros se denominan **haploides** y los segundos, **diploides**. Los organismos multicelulares complejos (p. ej.: moscas de la fruta, ratones, seres humanos) son diploides, mientras que muchos organismos unicelulares simples son haploides. Algunos organismos, notablemente la levadura *Saccharomyces*, pueden existir tanto en estado haploide como diploide. Muchas células cancerígenas y las células normales de algunos organismos, tanto de plantas como de animales, llevan más de dos copias de cada cromosoma. Sin embargo, nuestra exposición de técnicas y análisis genéticos se relaciona con organismos diploides, incluidas las levaduras diploides.

Dado que los organismos diploides tienen dos copias de cada gen, pueden disponer de alelos idénticos, es decir, ser **homocigotos** para un gen, o disponer de alelos diferentes, es decir, ser **heterocigotos** para un gen. Un alelo mutante recesivo se define como uno en el cual ambos alelos deben ser mutantes para que se observe el fenotipo mutante; es decir; el individuo debe ser homocigótico para el alelo mutante para que exhiba el fenotipo mutante. En cambio, las consecuencias fenotípicas de un alelo mutante **dominante** se observan en un individuo heterocigótico que contiene un alelo mutante y uno de tipo silvestre (fig. 9-2).

Que un alelo mutante sea recesivo o dominante provee información valiosa acerca de la función del gen afectado y de la naturaleza de la mutación causativa. Los alelos recesivos suelen ser consecuencia de una mutación que inactiva el gen afectado y los lleva a una *pérdida de función* parcial o completa. Tales mutaciones recesivas podrían eliminar la totalidad del gen del cromosoma o sólo una parte, interrumpir la expresión del gen, o alterar la estructura de la proteína codificada y alterar en consecuencia su función. Los alelos dominantes suelen ser consecuencia de una mutación que provoca alguna clase de *ganancia de función*. Estas mutaciones dominantes podrían incrementar la actividad de la proteína codificada, conferirle una nueva actividad o conducir a un patrón de expresión inapropiado en el espacio y en el tiempo.

Sin embargo, las mutaciones dominantes en ciertos genes se asocian con una pérdida de función. Por ejemplo, algunos genes son *haploinsuficientes*, lo que significa que se requiere de ambos alelos para la función normal. La eliminación o inactivación de un alelo simple en tales genes conduce a un fenotipo mutante. En otra instancia excepcional una mutación dominante en un alelo podría conducir a un cambio estructural en la proteína que interfiere en la función de la proteína de tipo silvestre codificada por el otro alelo. Este tipo de mutación, denominada mutación *dominante negativa*, produce un fenotipo similar al que se obtiene de una mutación de pérdida de función.



Algunos alelos pueden exhibir tanto las propiedades recesivas como las dominantes. En éstos, las afirmaciones acerca de si un alelo es dominante o recesivo deben especificar el fenotipo. Por ejemplo, el alelo del gen de la hemoglobina en los seres humanos designado Hb^s tiene más de una consecuencia fenotípica. Los individuos homocigóticos para este alelo (Hb^s/Hb^s) tienen la enfermedad debilitante anemia falciforme, pero los heterocigóticos (Hb^s/Hb^a) no la padecen. Por consiguiente, Hb^s es *recesivo* para el rasgo de la enfermedad de células falciformes. Por otro lado, los individuos heterocigóticos (Hb^s/Hb^a) son más resistentes al paludismo que los homocigóticos (Hb^a/Hb^a), lo que revela que Hb^s es *dominante* para el rasgo de la resistencia al paludismo. ∎

Un agente utilizado a menudo para inducir mutaciones (mutagénesis) en organismos experimentales es el sulfato de etilmetano (EMS). Aunque este mutágeno puede alterar la secuencia de DNA de diversas maneras, uno de los efectos más comunes es modificar químicamente las bases de guanina en el DNA, lo que conduce a la conversión de un par de bases G·C en un par de bases A·T. Esta alteración en la secuencia de un gen, que involucra sólo un par de bases, se conoce como **mutación puntual**. Una mutación puntual *silenciosa* no provoca cambios en la secuencia aminoacídica o en la actividad de la proteína codificada por el gen. Sin embargo, consecuencias fenotípicas observables que se deben a cambios en la actividad de la proteína pueden partir de mutaciones puntuales que conducen a la sustitución de un aminoácido por otro (mutación *con sentido erróneo*), a la introducción de un codón de terminación prematuro (mutación *sin sentido*) o a un cambio en el marco de lectura de un gen (mutación *de co-*

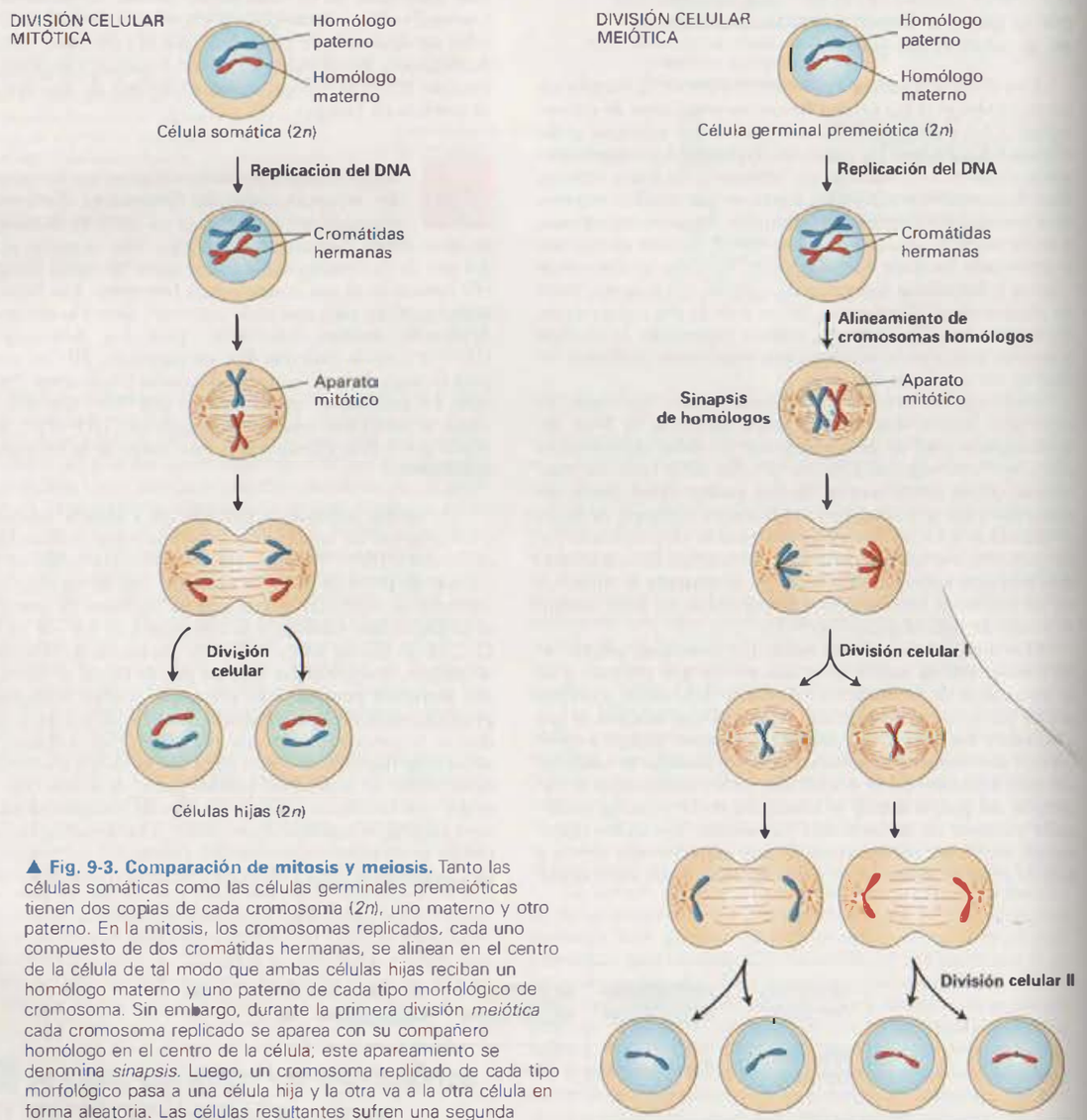


▲ Fig. 9-2. Efectos de alelos mutantes recesivos o dominantes sobre el fenotipo en organismos diploides. Una sola copia de un alelo dominante es suficiente para producir un fenotipo mutante, mientras que debe haber ambas copias de un alelo recesivo para causar un fenotipo mutante. Las mutaciones recesivas suelen causar una pérdida de función, las mutaciones dominantes suelen causar una ganancia de función o una función alterada.

rrimiento del marco). Como las alteraciones en la secuencia de DNA que conducen a una disminución de la actividad de la proteína son mucho más probables que las que llevan a un incremento o a un cambio cualitativo en la actividad de la proteína, la mutagénesis suele producir muchas más mutaciones recesivas que mutaciones dominantes.

La segregación de mutaciones en experimentos de cruzas de cepas revela si son dominantes o recesivas

Los genetistas aprovechan el ciclo normal de vida de un organismo para evaluar la dominancia o la recesividad de



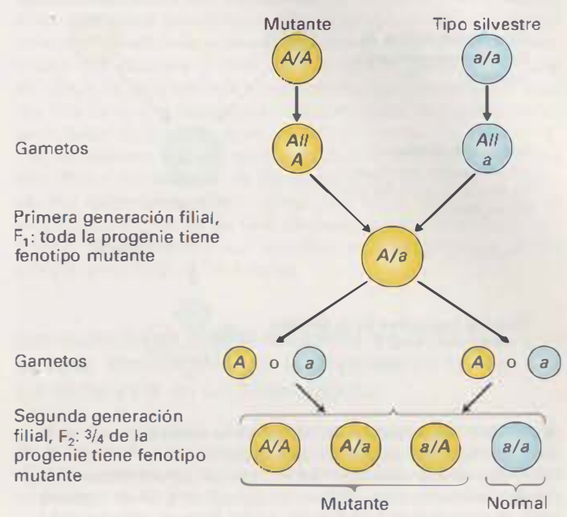
▲ **Fig. 9-3. Comparación de mitosis y meiosis.** Tanto las células somáticas como las células germinales premeióticas tienen dos copias de cada cromosoma (*2n*), uno materno y otro paterno. En la mitosis, los cromosomas replicados, cada uno compuesto de dos cromátidas hermanas, se alinean en el centro de la célula de tal modo que ambas células hijas reciban un homólogo materno y uno paterno de cada tipo morfológico de cromosoma. Sin embargo, durante la primera división *meiótica* cada cromosoma replicado se aparea con su compañero homólogo en el centro de la célula; este apareamiento se denomina *sinapsis*. Luego, un cromosoma replicado de cada tipo morfológico pasa a una célula hija y la otra va a la otra célula en forma aleatoria. Las células resultantes sufren una segunda división sin que intervenga la replicación del DNA, con la distribución de las cromátidas hermanas de cada tipo morfológico entre las células hijas. Cada célula diploide sometida a meiosis produce cuatro células haploides (*1n*).

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación general: Ciclo de vida de una célula

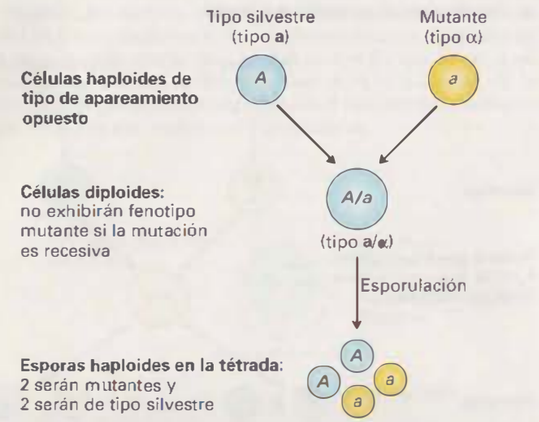
los alelos. Para ver cómo se hace esto, primero necesitamos revisar el tipo de división celular que da origen a los gametos (espermatozoides y óvulos en los animales superiores). Mientras las células (somáticas) del cuerpo de la mayoría de los organismos multicelulares se dividen por mitosis, las células germinales que dan origen a los gametos experimentan meiosis. Al igual que las células somáticas, las células germinales premeióticas son diploides y contienen dos homólogos de cada tipo morfológico de cromosoma. Los dos homólogos que constituyen cada par de cromosomas homólogos descienden de padres diferentes y, por lo tanto, sus genes pueden existir en formas alélicas diferentes. La figura 9-3 representa los principales pasos en la división celular mitótica y en la meiótica. En la mitosis, la replicación del DNA siempre es seguida por la división celular, lo que produce dos células hijas diploides. En la meiosis *un* ciclo de replicación del DNA siempre es seguido de *dos* divisiones celulares separadas, para dar cuatro células haploides (*1n*) que contienen sólo un cromosoma de cada par homólogo. La distribución, o segregación, de los cromosomas homólogos replicados en las células hijas durante la primera división meiótica es aleatoria; es decir que los homólogos derivados de la madre y del padre se segregan de manera independiente y producen células hijas con diferentes mezclas de cromosomas paternos y maternos.

Para evitar una complejidad no deseada, los genetistas intentan empezar los experimentos de cruzas con cepas que son homocigóticas para los genes en examinación. En tales *cepas puras (verdaderas)*, todo individuo recibirá el mismo alelo de cada padre y, por consiguiente, la composición de los alelos no cambiará de una generación a la siguiente. Cuando una cepa mutante verdadera se aparea con una cepa de tipo silvestre verdadera, toda la primera progenie filial (F_1) será heterocigótica (fig. 9-4). Si la progenie F_1 exhibe el rasgo mutante, el alelo mutante es dominante; si la progenie F_1 exhibe el rasgo de tipo silvestre, el mutante es recesivo. Cruzas posteriores entre los individuos F_1 también revelarán patrones diferentes de herencia según la mutación sea dominante o recesiva. Cuando los individuos F_1 que son heterocigóticos para un alelo dominante se cruzan entre sí, las tres cuartas partes de la progenie F_2 resultante exhibirán el rasgo mutante. Por el contrario, cuando los individuos F_1 que son heterocigóticos para un alelo recesivo se cruzan entre sí, sólo una cuarta parte de la progenie F_2 resultante exhibirá el rasgo mutante.

Como ya señalamos, la levadura *Saccharomyces*, un importante microorganismo experimental, puede existir tanto en estado haploide como en estado diploide. En estos eucariontes unicelulares, los cruzamientos entre células haploides pueden determinar si un alelo mutante es dominante o recesivo. Las células haploides de levadura, que llevan una copia de cada cromosoma, pueden ser de dos tipos diferentes de apareamientos conocidos como a y α. Las células haploides de tipo de apareamiento opuesto pueden aparearse para producir diploides a/α, que llevan dos copias de cada cromosoma. Si una mutación nueva con un fenotipo observable se aísla en una cepa haploide, la cepa mutante puede aparearse con una cepa silvestre del tipo de apareamiento opuesto para producir diploides a/α que son heterocigóticos para el alelo mutante. Si estos diploides exhiben el rasgo mutante, el alelo mutante es dominante, pero si los diploides aparecen como de tipo silvestre, el alelo mutante es recesivo. Cuando se colocan diploides a/α en condiciones de inanición, las células entran en meiosis y



▲ **Fig. 9-4. Segregación de patrones de mutaciones dominantes o recesivas en cruzamientos entre cepas verdaderas de organismos diploides.** Toda la descendencia en la primera generación (F_1) es heterocigótica. Si el alelo mutante es dominante, la progenie F_1 exhibirá el fenotipo mutante, como en la parte (a). Si el alelo mutante es recesivo, la progenie F_1 exhibirá el fenotipo de tipo silvestre (normal), como en la parte (b). El cruzamiento de los heterocigóticos F_1 entre sí también produce diferentes índices de segregación para alelos mutantes dominantes y recesivos en la generación F_2.



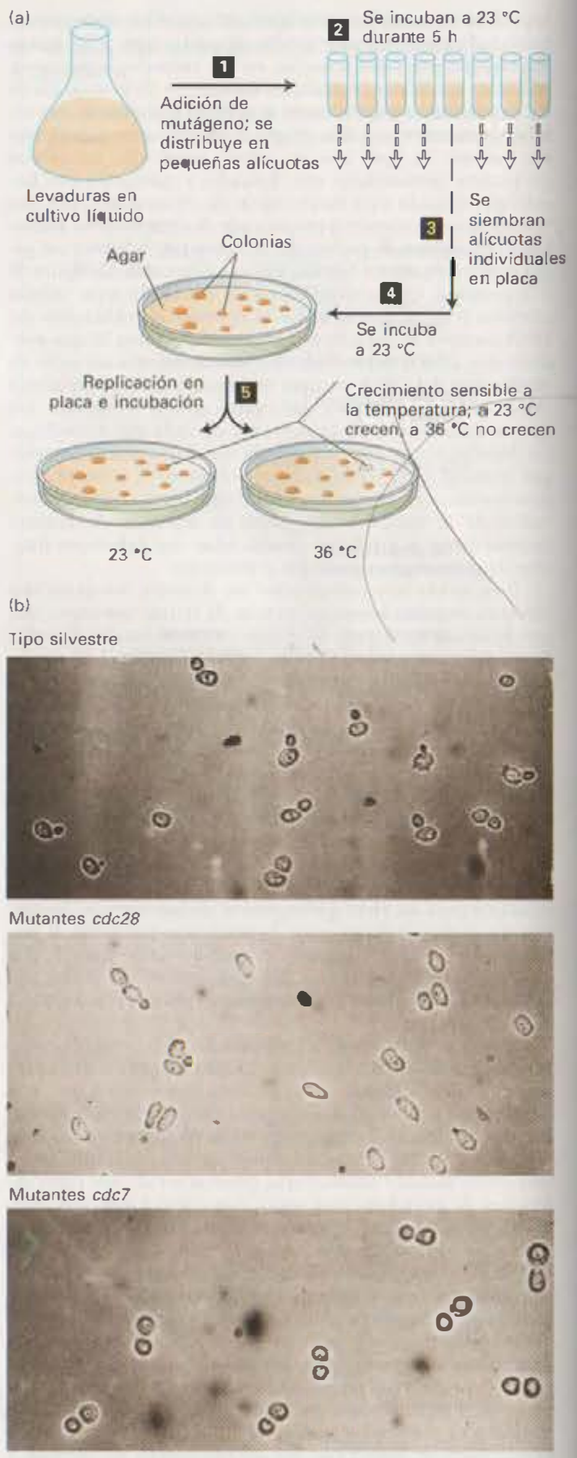
▲ **Fig. 9-5. Segregación de alelos en la levadura.** Las células *Saccharomyces* haploides de tipo de apareamiento opuesto (es decir, uno de apareamiento tipo α y uno de apareamiento tipo **a**) pueden aparearse para producir un diploide **a**/α. Si un haploide lleva un alelo mutante dominante y otro lleva un alelo de tipo silvestre recesivo del mismo gen, el diploide heterocigótico resultante expresará el rasgo dominante. En ciertas condiciones, una célula diploide formará una tétrada de cuatro esporas haploides. Dos de las esporas de la tétrada expresarán el rasgo recesivo y las otras dos expresarán el rasgo dominante.

dan origen a una tétrada de cuatro esporas haploides: dos de tipo a y dos de tipo α. La esporulación de una célula diploide heterocigótica produce dos esporas que llevan el alelo mutante y dos que llevan el alelo de tipo silvestre (fig. 9-5). En condiciones apropiadas, las esporas de levadura germinarán y producen cepas haploides vegetativas de ambos tipos de apareamiento.

Las mutaciones condicionales pueden utilizarse para estudiar genes esenciales en la levadura

Los procedimientos utilizados para identificar y aislar los mutantes, conocidos como *screening genético*, dependen de si el organismo experimental es haploide o diploide y si se trata de este último, de si la mutación es recesiva o dominante. Los genes que codifican las proteínas esenciales para la vida están entre los más interesantes e importantes para estudiar. Dado que la expresión fenotípica de mutaciones en genes esenciales produce la muerte de los individuos, se necesitan ingeniosos screenings genéticos para aislar y mantener los organismos con una mutación letal.

En las células de levadura haploides, los genes esenciales pueden estudiarse mediante las *mutaciones condicionales*. Entre las mutaciones condicionales más comunes se encuentran las mutaciones sensibles a la temperatura, las que pueden ser aisladas en bacterias y eucariontes inferiores, pero no en los eucariontes de sangre caliente. Así, una proteína mutante puede ser completamente funcional a una temperatura (p. ej., 23°C), pero completamente inactiva a otra (p. ej., 36°C), mientras que la proteína normal sería completa-



◀ **FIGURA EXPERIMENTAL 9-6 Las levaduras haploides que llevan mutaciones letales sensibles a la temperatura son mantenidas a temperaturas permisivas y analizadas a temperaturas no permisivas.** (a) Screening genético para mutantes del ciclo de división celular sensible a la temperatura (*cdc*) en las levaduras. Las levaduras que crecen y forman colonias a 23 °C (temperatura permisiva), pero no a 36 °C (temperatura no permisiva) pueden llevar una mutación letal que bloquea la división celular. (b) Ensayo de colonias sensibles a la temperatura para bloqueos en etapas específicas en el ciclo celular. Aquí se muestran las microfotografías de levaduras de tipo silvestre y dos mutantes diferentes sensibles a la temperatura, después de la incubación a la temperatura no permisiva durante 6 horas. Las células de tipo silvestre, que continúan creciendo, pueden verse con brotes de distintos tamaños y reflejan diferentes etapas del ciclo celular. En cambio, las células de las microfotografías inferiores exhiben un bloqueo en una etapa específica del ciclo celular. Los mutantes *cdc28* se detienen en un punto anterior al surgimiento de un nuevo brote, por ende, aparece como una célula no brotada. Los mutantes *cdc7*, que se detienen justo antes de la separación de la célula madre y la brotación (célula hija en surgimiento), aparecen como células con brotes grandes. [Parte (a) véase L. H. Hartwell, 1967, J. Bacteriol. 93:1662; parte (b) de L. M. Hereford y L. H. Hartwell, 1974, J. Mol. Biol. 84:445.]

mente funcional a ambas temperaturas. Una temperatura a la cual se observa el fenotipo mutante se denomina *no permisiva*; una temperatura *permisiva* es aquella a la cual no se observa el fenotipo mutante aun cuando el mutante está presente. De esta forma, las cepas mutantes pueden mantenerse a temperaturas permisivas y luego subcultivarse a una temperatura no permisiva para el análisis del fenotipo mutante.

Un ejemplo de screening muy importante para los mutantes sensibles a la temperatura en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* proviene de los estudios de L. H. Hartwell y col. de finales de la década de 1960 y principios de 1970. Estos investigadores comenzaron a identificar genes importantes en la regulación del **ciclo celular** durante el cual una célula sintetiza proteínas, replica su DNA y luego experimenta la división celular mitótica, en la que cada célula hija recibe una copia de cada cromosoma. El crecimiento exponencial de una única célula de levadura dado por 20-30 divisiones celulares forma una colonia de levaduras visible en un medio de agar sólido. Como los mutantes con un bloqueo celular completo en el ciclo celular no serían capaces de formar una colonia, se requirieron los mutantes condicionales para estudiar las mutaciones que afectan a este proceso celular básico. Para detectar estos mutantes, los investigadores identificaron primero células de levaduras mutagenizadas que podían crecer normalmente a 23 °C pero que no podían formar una colonia cuando eran llevadas a 36 °C (fig. 9-6a).

Una vez aislados los mutantes sensibles a la temperatura, el análisis posterior reveló que efectivamente resultaron defectuosos en la división celular. En *S. cerevisiae* la división celular tiene lugar a través de un proceso de brote y el tamaño del brote, que se visualiza con facilidad con el microscopio óptico, indica una posición en el ciclo celular. Con microscopio se examinó a cada uno de los mutantes que no pudieron crecer a 36 °C luego de varias horas a la temperatura no permisiva. El estudio de muchos mutantes diferentes sensibles a la temperatura reveló que alrededor del 1% exhibió un bloqueo distintivo en el ciclo celular. Estos mutantes fueron designados mutantes *cdc* (ciclo de división celular). Más importante aún, estas levaduras mutantes simplemente no fallaron en crecer, como habría sucedido si hubiesen portado una mutación que afectara el metabolismo celular general. En lugar de ello, a la temperatura no permisiva, los mutantes de interés crecieron con normalidad durante parte del ciclo celular, pero luego se detuvieron en un estadio particular de este ciclo, de manera que se vieron muchas células en esta etapa (fig. 9-6b). La mayoría de las mutaciones *cdc* en las levaduras son recesivas; es decir, cuando las cepas haploides *cdc* se cruzan con haploides de tipo silvestre, los diploides heterocigóticos resultantes no son sensibles a la temperatura ni defectuosos en la división celular.

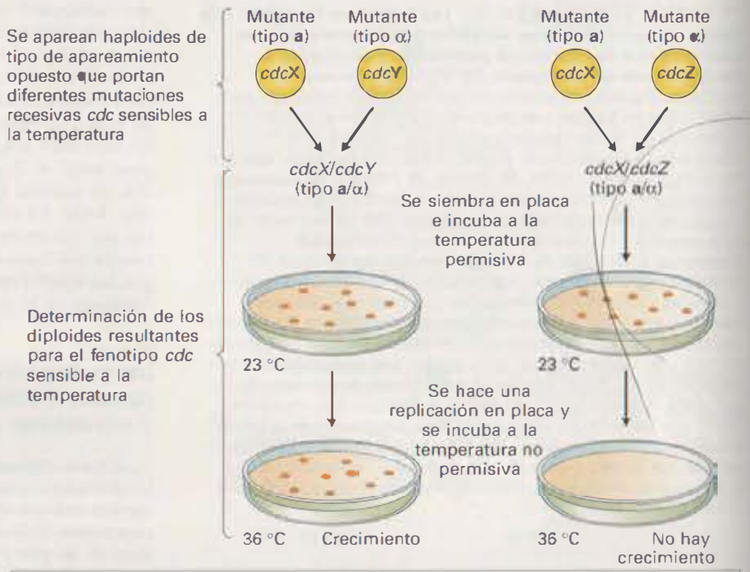
Las mutaciones letales recesivas en diploides pueden identificarse por endogamia y mantenerse en los heterocigotos

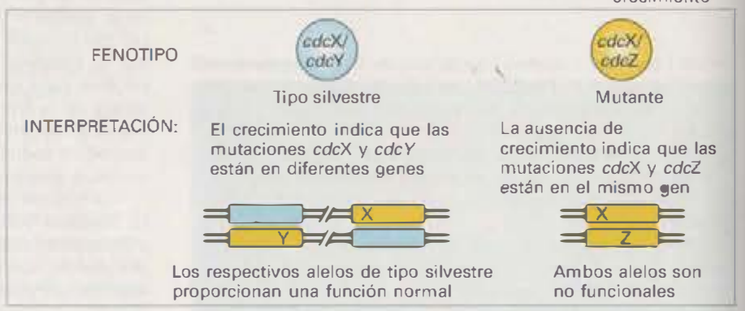
En los organismos diploides, los fenotipos resultantes de las mutaciones recesivas sólo pueden observarse en los homocigotos individuales para los alelos mutantes. Dado que en un organismo diploide la mutagénesis típicamente cambia sólo un alelo de un gen y produce mutantes heterocigóticos, los screenings genéticos deben incluir pasos de endogamia para generar una progenie que sea homocigótica para los alelos mutantes. El genetista H. Muller creó un procedimiento general y eficiente para realizar estos experimentos de endogamia en la mosca de la fruta *Drosophila*. Las mutaciones letales recesivas en *Drosophila* y otros organismos diploides pueden mantenerse en individuos heterocigóticos y sus consecuencias fenotípicas pueden analizarse en los homocigóticos.

La técnica Muller fue utilizada con mayores efectos por C. Nüsslein-Volhard y E. Wieschaus, quienes buscaron sistemáticamente mutaciones letales recesivas que afectaran la embriogénesis en *Drosophila*. Los embriones homocigóticos muertos que portaban las mutaciones letales identificadas mediante este screening se examinaron bajo el microscopio en busca de defectos morfológicos específicos. El entendimiento actual de los mecanismos moleculares subyacentes al desarrollo de organismos multicelulares se basa, en gran parte, en el cuadro detallado del desarrollo embrionario revelado por la caracterización de estos mutantes de *Drosophila*. En el capítulo 15 analizaremos algunos de los descubrimientos fundamentales basados en estos estudios genéticos.

Los análisis de complementación determinan si distintas mutaciones recesivas se encuentran en el mismo gen

En el enfoque genético para estudiar un proceso celular particular, los investigadores a menudo aíslan múltiples mutaciones recesivas que producen el mismo fenotipo. Un análisis común para determinar si estas mutaciones se encuentran en el mismo gen o en genes diferentes aprovecha el fenómeno de la **complementación** genética, es decir, la restauración del fenotipo silvestre mediante el apareamiento de dos mutantes diferentes. Si dos mutaciones recesivas, *a* y *b*, se encuentran en el *mismo* gen, entonces un organismo diploide heterocigótico para ambas mutaciones (es decir, que lleva un alelo *a* y un alelo *b*) exhibirá el fenotipo mutante debido a que ningún alelo provee una copia funcional del gen. Por el contrario, si las mu-





▶ **FIGURA EXPERIMENTAL 9-7 Los análisis de complementación determinan si las mutaciones recesivas se encuentran en el mismo gen o en genes diferentes.** Los experimentos de complementación en levaduras se realizan mediante apareamientos de células haploides a y α que portan diferentes mutaciones recesivas para producir células diploides. En el análisis de las mutaciones *cdc*, pares de distintas cepas *cdc* haploides sensibles a la temperatura fueron apareadas sistemáticamente y los diploides resultantes puestos a prueba para el crecimiento a las temperaturas permisiva y no permisiva. En este ejemplo hipotético, los mutantes *cdcX* y *cdcY* se complementan entre sí y, por lo tanto, tienen mutaciones en genes diferentes, mientras que los mutantes *cdcX* y *cdcZ* tienen mutaciones en el mismo gen.

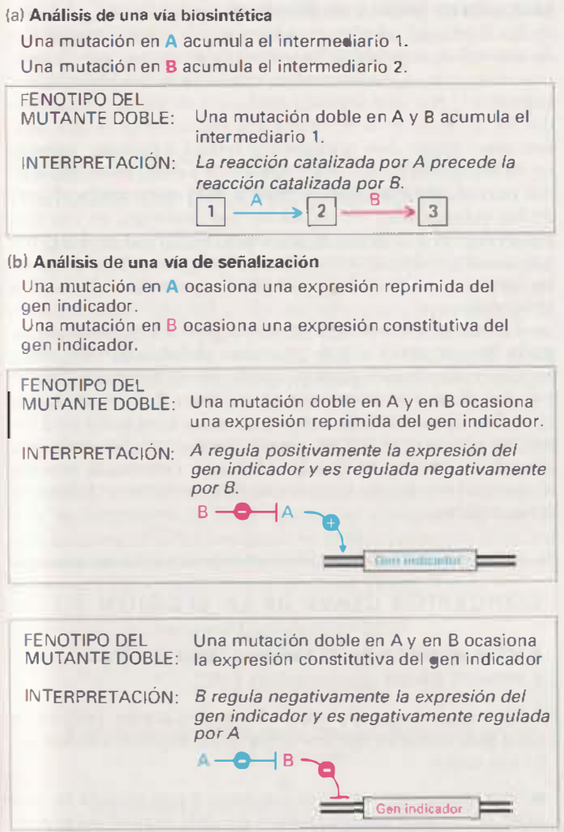
taciones *a* y *b* están en genes *separados*, los heterocigóticos que contienen una única copia de cada alelo mutante no exhibirán el fenotipo mutante porque un alelo de tipo silvestre de cada gen también estará presente. En este caso, se dice que las mutaciones se *complementan* entre sí.

El análisis de complementación de un grupo de mutantes que exhibe el mismo fenotipo puede distinguir los genes individuales en un grupo de genes funcionalmente relacionados, todos los cuales deben funcionar para producir un rasgo fenotípico dado. Por ejemplo, el screening genético para las mutaciones *cdc* en *Saccharomyces* arriba descrita produjo muchos mutantes recesivos sensibles a la temperatura que aparecieron detenidos en la misma fase del ciclo celular. Para determinar cuántos genes fueron afectados por estas mutaciones, Hartwell y col. realizaron experimentos de complementación en todas las combinaciones de a pares de mutantes *cdc* siguiendo el protocolo general esquematizado en la figura 9-7. Estos experimentos identificaron más de 20 genes *CDC* diferentes. La caracterización molecular subsiguiente de los genes *CDC* y sus proteínas codificadas, como se describe en el capítulo 21, proporcionó un esquema de trabajo para entender cómo está regulada la división celular en organismos que van desde las levaduras hasta los seres humanos.

Los mutantes dobles son útiles para la valoración del orden en el cual funcionan las proteínas

Basándose en análisis cuidadosos de los fenotipos mutantes asociados con un proceso celular en particular, los investigadores a menudo pueden deducir el orden en que funcionan un grupo de genes y sus productos proteicos. Dos tipos generales de procesos son sensibles a tal análisis: a) las vías biosintéticas en las cuales un material precursor es convertido a través de uno o más intermediarios en un producto final y b) las vías de señalización que regulan otros procesos y conciernen al flujo de información en lugar de a los intermediarios químicos.

Ordenamiento de las vías biosintéticas. Un ejemplo simple del primer tipo de procesos es la biosíntesis de un metabolito como el aminoácido triptófano en las bacterias. En este caso, cada una de las enzimas requeridas para la síntesis del triptófano cataliza la conversión de uno de los intermediarios en el camino al siguiente. En *E. coli*, los genes que codifican estas enzimas se encuentran adyacentes entre sí en el genoma y constituyen el operón *trp* (véase fig. 4-12a).



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 9-8 El análisis de mutantes dobles a menudo puede ordenar los pasos en las vías biosintéticas o de señalización.** Cuando las mutaciones en dos genes diferentes afectan el mismo proceso celular, pero tienen fenotipos distintivamente diferentes, el fenotipo del doble mutante puede a menudo revelar el orden en el cual deben funcionar los dos genes. (a) En el caso de las mutaciones que afectan la misma vía biosintética, un mutante doble acumulará el intermediario inmediatamente precedente al paso catalizado por la proteína que actúa con anterioridad en el organismo de tipo silvestre. (b) El análisis de doble mutante de una vía de señalización es posible si dos mutaciones tienen efectos opuestos sobre la expresión de un gen informador. En este caso, el fenotipo observado del doble mutante provee información acerca del orden en el cual actúan las proteínas y si son reguladores positivos o negativos.

El orden de acción de los diferentes genes para estas enzimas, por lo tanto el orden de las reacciones bioquímicas en la vía, se dedujo al principio a partir de los tipos de componentes intermedios acumulados en cada mutante. Sin embargo, en el caso de las vías sintéticas complejas, el análisis fenotípico de los mutantes defectuosos en un único paso puede dar resultados ambiguos que no permiten un ordenamiento de los pasos. Los mutantes dobles defectuosos en dos pasos en la vía son muy útiles en el ordenamiento de esas vías (fig. 9-8a).

En el capítulo 17 trataremos el uso clásico de la estrategia del doble mutante para ayudar a dilucidar la vía secretoria. En esta vía, las proteínas por ser secretadas de la célula se mueven desde sus sitios de síntesis sobre el retículo endoplasmático rugoso al complejo de Golgi, luego a las vesículas de secreción y, por último, a la superficie celular.

Ordenamiento de las vías de señalización. Como aprenderemos en los capítulos posteriores, la expresión de muchos genes eucariontes está regulada por vías de señalización iniciadas por hormonas extracelulares, factores de crecimiento u otras señales. Tales vías de señalización pueden incluir numerosos componentes y el análisis de doble mutante puede proporcionar un entendimiento más profundo de las funciones e interacciones de estos componentes. El único prerrequisito para obtener información útil a partir de este tipo de análisis es que las dos mutaciones deben tener efectos opuestos sobre el resultado de la misma vía regulada. Más comúnmente, una mutación reprime la expresión de un gen indicador *(reporter)* en particular aun cuando la señal está presente, mientras que otra mutación da como resultado la expresión del gen indicador aun cuando la señal está ausente (esto es, expresión constitutiva). Como se ilustra en la figura 9-8b, dos mecanismos reguladores simples son compatibles con tales mutantes individuales, pero el fenotipo del doble mutante puede distinguir entre ellos. Esta metodología general permitió a los genetistas delinear muchos de los pasos clave en diversas vías de regulación y establecer la base para ensayos bioquímicos más específicos.

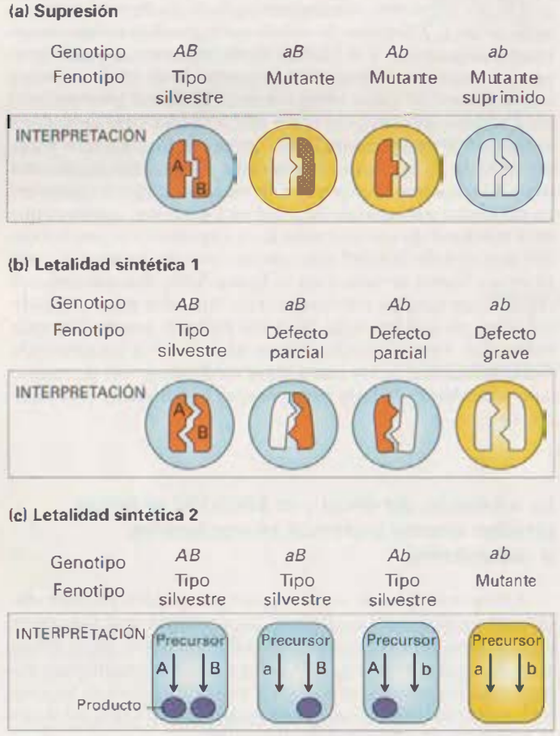
La supresión genética y la letalidad sintética pueden revelar proteínas interactuantes o redundantes

Otros dos tipos de análisis genéticos pueden proveer claves adicionales acerca de cómo las proteínas que funcionan en el mismo proceso celular podrían interactuar en la célula viva. Estos dos métodos, aplicables a muchos organismos experimentales, involucran el uso de mutantes dobles en los cuales los efectos fenotípicos de una mutación son cambiados por la presencia de una segunda mutación.

Mutaciones supresoras. El primer tipo de análisis se basa en la *supresión genética*. Para entender este fenómeno, supongamos que algunas mutaciones puntuales conducen a cambios estructurales en una proteína (A) que afectan su capacidad para asociarse con otra proteína (B) involucrada en el mismo proceso celular. En forma similar, las mutaciones en la proteína B conducen a cambios estructurales pequeños que inhiben su capacidad para interactuar con la proteína A. Más aún, aceptemos que el funcionamiento normal de las proteínas A y B depende de su interacción. En teoría, un cambio estructural específico en la proteína A podría quizá suprimirse por cambios compensatorios en la proteína B y permitir que las proteínas mutantes interactúen. En los casos raros en los cuales estas mutaciones supresoras ocurren, las cepas que contengan ambos alelos mutantes serán normales, mientras que las cepas que con-

tengan sólo uno u otro alelo mutante tendrán un fenotipo mutante (fig. 9-9a).

La observación de la supresión genética en cepas de levadura que contienen un alelo de actina mutante (*act1-1*) y una segunda mutación (*sac6*) en otro gen proporcionó evidencia de una interacción directa in vivo entre las proteínas codificadas por los dos genes. Estudios bioquímicos posteriores mostraron que estas dos proteínas –Act1 y Sac6– interactúan en la construcción de estructuras funcionales de actina dentro de la célula.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 9-9 Las mutaciones que derivan en la supresión genética o la letalidad sintética revelan proteínas redundantes o interactuantes. (a) La observación de que mutantes dobles con dos proteínas defectuosas (A y B) tienen un fenotipo de tipo silvestre pero que los mutantes individuales ocasionan un fenotipo mutante indica que la función de cada proteína depende de la interacción con la otra. (b) La observación de que los mutantes dobles tienen un defecto fenotípico más grave que los mutantes individuales también es evidencia de que dos proteínas (p. ej., las subunidades de un heterodímero) debe interactuar para funcionar normalmente. (c) La observación de que un mutante doble es no viable, pero que los mutantes individuales correspondientes tienen el fenotipo de tipo silvestre, indica que dos proteínas funcionan en vías redundantes para producir un producto esencial.

Mutaciones letales sintéticas. Otro fenómeno, denominado *letalidad sintética*, produce un efecto fenotípico opuesto al de supresión. En este caso, el efecto mortífero de una mutación es enormemente exacerbado (en lugar de ser suprimido) por una segunda mutación en un gen relacionado. En la figura 9-9b se ilustra una situación en la cual pueden tener lugar esas mutaciones letales sintéticas. En este ejemplo, una proteína heterodimérica es inactivada en forma parcial, pero no por completo, por mutaciones en una de las subunidades no idénticas. Sin embargo, en los mutantes dobles que llevan mutaciones específicas en los genes que codifican ambas subunidades, hay poca interacción entre las subunidades, lo que da como resultado efectos fenotípicos severos.

Las mutaciones letales sintéticas también pueden revelar genes no esenciales cuyas proteínas codificadas funcionan en vías redundantes para producir un componente celular esencial. Como se representa en la figura 9-9c, si cualquier vía sola es inactivada por una mutación, la otra vía será capaz de suministrar los productos necesarios. Sin embargo, si ambas vías son inactivadas al mismo tiempo, el producto esencial no puede sintetizarse y los mutantes dobles no serán viables.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 9.1

Análisis genético de mutaciones para identificar y estudiar genes

- Los organismos diploides tienen dos copias (alelos) de cada gen, mientras que los organismos haploides tienen sólo una copia.
- Las mutaciones recesivas conducen a una pérdida de función, la cual está enmascarada si un alelo normal del gen está presente. Para que el fenotipo mutante se presente, ambos alelos deben llevar la mutación.
- Las mutaciones dominantes conducen a un fenotipo mutante en presencia de un alelo normal del gen. Los fenotipos asociados con las mutaciones dominantes a menudo representan una ganancia de funciones, pero en el caso de algunos genes producen una pérdida de funciones.
- En la meiosis, una célula diploide realiza una replicación del DNA y dos divisiones celulares, lo que produce cuatro células haploides en las cuales los alelos maternos y paternos se combinan al azar (véase fig. 9-3).
- Las mutaciones dominantes y las recesivas exhiben patrones de segregación característicos en las cruzas genéticas (véase fig. 9-4).
- En las levaduras haploides, las mutaciones sensibles a la temperatura son muy útiles para identificar y estudiar genes esenciales para la supervivencia.
- El número de genes funcionalmente relacionados involucrados en un proceso puede definirse mediante el análisis de complementación (véase fig. 9-7).
- El orden en el cual los genes funcionan en una vía biosintética o de señalización puede deducirse a partir del fenotipo de los mutantes dobles defectuosos en dos pasos en el proceso afectado.

- Las interacciones funcionalmente significativas entre proteínas pueden deducirse a partir de los efectos fenotípicos de las mutaciones supresoras de alelos específicas o de las mutaciones letales sintéticas.

9.2 Clonación del DNA mediante métodos de DNA recombinante

Los estudios detallados de la estructura y la función de un gen a nivel molecular requieren grandes cantidades del gen individual en forma pura. Diversas técnicas, a menudo denominadas *tecnología del DNA recombinante*, se utilizan en la clonación de DNA, lo que permite que los investigadores preparen gran cantidad de moléculas de DNA idénticas. El DNA recombinante es simplemente cualquier molécula de DNA compuesta de secuencias derivadas de diferentes fuentes.

La clave para clonar un fragmento de DNA de interés es conectarlo a una molécula vector de DNA, la cual puede replicarse dentro de una célula huésped. Después que una única molécula de DNA recombinante, compuesta de un vector más un fragmento de DNA inserto, se introduce en una célula huésped, el DNA insertado se replica junto con el vector y genera un gran número de moléculas de DNA idénticas. El esquema básico puede resumirse como sigue:

Vector + fragmento de DNA
↓
DNA recombinante
↓
Replicación del DNA recombinante dentro de las células huésped
↓
Aislamiento, secuenciación y manipulación del fragmento de DNA purificado

Aunque los investigadores han diseñado numerosas variaciones experimentales, este diagrama de flujo indica los pasos esenciales en la clonación del DNA. En esta sección se verán los pasos en este esquema básico enfocándose en los dos tipos de vectores más utilizados en las células huésped de *E. coli*: el plásmido, el que se replica junto con las células huésped, y el bacteriófago λ, que se replica como los virus lítico, mata la célula huésped y empaqueta su DNA en viriones. En las siguientes secciones describiremos la caracterización y los diferentes usos de los fragmentos de DNA clonados.

Las enzimas de restricción y las DNA ligasas permiten la inserción de los fragmentos de DNA en los vectores de clonación

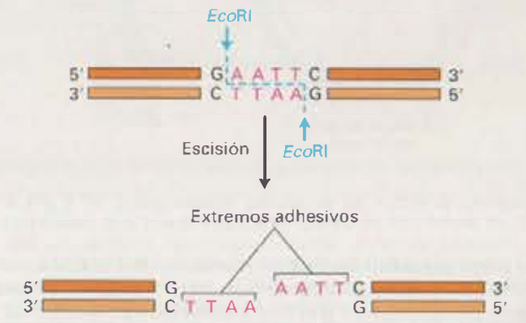
El principal objetivo de la clonación de DNA es obtener regiones separadas y pequeñas del DNA de un organismo que constituyen genes específicos. Además, sólo se pueden clonar moléculas de DNA relativamente pequeñas en cualquiera de los vectores. Por esta razón, las moléculas de DNA muy largas que componen el genoma de un organismo deben cortarse en fragmentos que puedan insertarse en el vector de DNA. Dos tipos de enzimas, las enzimas de restricción y las DNA ligasas, facilitan la producción de moléculas de DNA recombinante.

Corte de moléculas de DNA en fragmentos pequeños. Las enzimas de restricción son endonucleasas producidas por las bacterias que reconocen típicamente secuencias específicas de 4 a 8 pares de bases, denominadas *sitios de restricción* y luego escinden ambas hebras de DNA en este sitio. Los sitios de restricción comúnmente son secuencias *palindrómicas* cortas; es decir, la secuencia sitio de restricción es la misma sobre cada hebra de DNA cuando se la lee en la dirección 5' → 3' (fig. 9-10).

Para cada enzima de restricción, la bacteria produce también una *enzima de modificación*, que protege al propio DNA bacteriano de la escisión mediante su modificación en cada sitio posible de escisión o cerca de él. La enzima de modificación adiciona un grupo metilo a una o dos bases, casi siempre dentro del sitio de restricción. Cuando se encuentra allí un grupo metilo, la endonucleasa de restricción no puede cortar el DNA. Junto con la endonucleasa de restricción, la enzima metilante forma un sistema de modificación y restricción que protege al DNA del huésped mientras destruye al DNA extraño entrante (p. ej., el DNA del bacteriófago o el DNA incorporado durante la transformación) mediante la escisión de todos los sitios de restricción en el DNA.

Muchas enzimas de restricción realizan cortes escalonados en las dos hebras de DNA en sus sitios de restricción y generan fragmentos que tienen una "cola" de hebra simple en ambos extremos (véase fig. 9-10). Las colas sobre los fragmentos generados en un sitio de restricción determinado son complementarias a las de todos los otros fragmentos generados por la misma enzima de restricción. A temperatura ambiente, estas regiones de hebra simple, denominadas a menudo "extremos adhesivos", pueden aparear transitoriamente sus bases con las de otros fragmentos generados con la misma enzima de restricción. Algunas de estas enzimas como *Alu*I y *Sma*I, escinden ambas hebras de DNA en el mismo punto dentro del sitio de restricción y generan fragmentos con extremos "romos" (al ras) en los cuales todos los nucleótidos en los extremos del fragmento están apareados por sus bases a los nucleótidos de la hebra complementaria.

El DNA aislado a partir de organismos individuales tiene una secuencia específica, que por pura casualidad contendrá



▲ Fig. 9-10. Escisión del DNA por la enzima de restricción *Eco*RI. Esta enzima de restricción de *E. coli* efectúa cortes escalonados en la secuencia (palindrómica) repetida invertida específica de seis pares de bases y produce fragmentos con extremos "adhesivos" complementarios, de hebra simple. Muchas otras enzimas de restricción también producen fragmentos con extremos adhesivos.

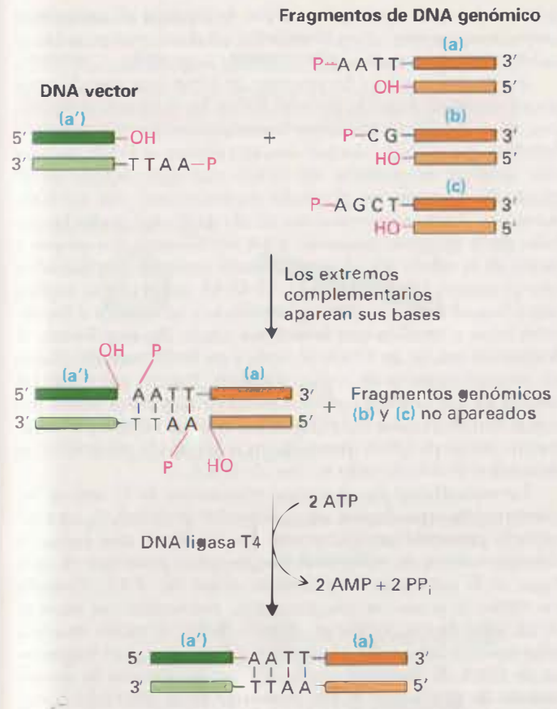
CUADRO 9-1 Enzimas de restricción seleccionadas y sus secuencias de reconocimiento

Enzimas	Microorganismo de origen	Sitio de reconocimiento*	Extremos producidos
BamHI	*Bacillus amyloliquefaciens*	-G-G-A-T-C-C- -C-C-T-A-G-G-	Adhesivos
*Eco*RI	*Escherichia coli*	-G-A-A-T-T-C- -C-T-T-A-A-G-	Adhesivos
*Hind*III	*Haemophilus influenzae*	-A-A-G-C-T-T- -T-T-C-G-A-A-	Adhesivos
*Kpn*I	*Klebsiella pneumonia*	-G-G-T-A-C-C- -C-C-A-T-G-G-	Adhesivos
*Pst*I	*Providencia stuartii*	-C-T-G-C-A-G- -G-A-C-G-T-C-	Adhesivos
*Sac*I	*Streptomyces achromogenes*	-G-A-G-C-T-C- -C-T-C-G-A-G-	Adhesivos
*Sal*I	*Streptomyces albue*	-G-T-C-G-A-C- -C-A-G-C-T-G-	Adhesivos
*Sma*I	*Serratia marcescens*	-C-C-C-G-G-G- -G-G-G-C-C-C-	Romos
*Sph*I	*Streptomyces phaeochromogenes*	-G-C-A-T-G-C- -C-G-T-A-C-G-	Adhesivos
*Xba*I	*Xanthomonas badrii*	-T-C-T-A-G-A- -A-G-A-T-C-T-	Adhesivos

*Estas secuencias de reconocimientos están incluidas en un poliligador común (véase fig. 9-12)

un grupo específico de sitios de restricción. Por lo tanto, una enzima de restricción determinada cortará el DNA de una fuente particular en un grupo de fragmentos reproducibles denominados **fragmentos de restricción**. Se han purificado cientos de enzimas de restricción de diferentes especies de bacterias, lo que permite cortar las moléculas de DNA en numerosas secuencias correspondientes a los sitios de restricción de estas enzimas (cuadro 9-1).

Insertar fragmentos de DNA en vectores. Los fragmentos de DNA tanto con extremos adhesivos como con extremos romos pueden insertarse en vectores de DNA con la ayuda de DNA ligasas. Durante la replicación normal del DNA, la DNA ligasa cataliza la unión (ligación) de extremo con extremo de fragmentos cortos de DNA, denominados *fragmentos de Okazaki*. Para propósitos de clonación del DNA, la DNA ligasa purificada se utiliza para unir covalentemente los extremos de un fragmento de restricción y un vector de DNA que tenga extremos complementarios (fig. 9-11). El vector de DNA y los fragmentos de restricción se ligan covalentemente a través de los enlaces fosfodiéster 3' → 5' estándares del DNA. Además de ligar los extremos adhesivos complementarios, la DNA ligasa del bacteriófago T4 puede ligar dos extremos romos cualesquiera de DNA. Sin embargo, la ligación de extremos romos es intrínsecamente ineficiente y requiere una mayor concentración de DNA y de DNA ligasa que la de extremos adhesivos.



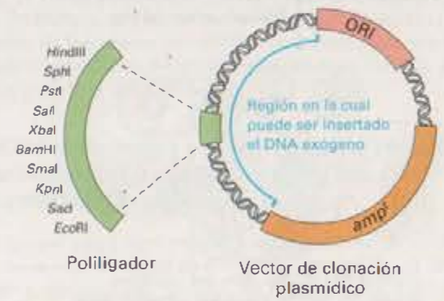
▲ Fig. 9-11. Unión de fragmentos de restricción con extremos adhesivos complementarios. En este ejemplo, el DNA vector cortado con *Eco*RI se mezcló con una muestra que contiene fragmentos de restricción producidos por escisión de DNA genómico con varias enzimas de restricción diferentes. Se muestran las secuencias de base corta que componen los extremos adhesivos de cada tipo de fragmento. El extremo adhesivo en el DNA vector cortado (a') forma pares de bases sólo con los extremos adhesivos complementarios sobre el fragmento *Eco*RI (a) en la muestra genómica. Los grupos adyacentes 3' hidroxilo y 5' fosfato (rojo) en los fragmentos apareados por sus bases son unidos luego de manera covalente (ligados) por la DNA ligasa T4.

Los plásmidos de *E. coli* son vectores apropiados para la clonación de fragmentos aislados de DNA

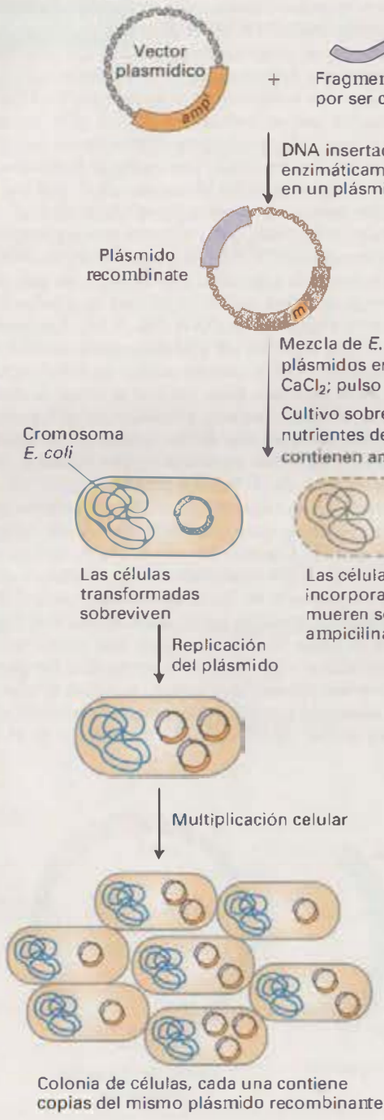
Los **plásmidos** son moléculas circulares de DNA bicatenario (dDNA) que están separados del DNA cromosómico de una célula. Estos DNA extracromosómicos, que se encuentran naturalmente en las bacterias y en las células eucariontes inferiores (p. ej., las levaduras), existen en una relación parasitaria o simbiótica con sus células huésped. Al igual que el DNA cromosómico de la célula huésped, el DNA plasmídico es duplicado antes de cada división celular. Durante la división celular, se segregan copias del DNA plasmídico a cada célula hija, lo cual asegura la propagación continua del plásmido a través de generaciones sucesivas de la célula huésped.

Los plásmidos más utilizados en la tecnología del DNA recombinante son los que se replican en *E. coli*. Los investigadores diseñaron estos plásmidos para optimizar su uso como vectores en la clonación del DNA. Por ejemplo, la eliminación de porciones no necesarias de los plásmidos de *E. coli* que surgen naturalmente producen vectores plasmídicos de ≈1,2–3 kb de longitud de circunferencia, que contienen tres regiones esenciales para la clonación del DNA: un origen de replicación; un marcador que permite la selección, casi siempre un gen de resistencia a fármacos; y una región en la cual se pueden insertar los fragmentos exógenos de DNA (fig. 9-12). Las enzimas de la célula huésped replican un plásmido comenzando en el origen de replicación (ORI), una secuencia de DNA específica de 50-100 pares de bases. Una vez que se inició la replicación del DNA en el ORI, continúa alrededor del plásmido circular sin importar su secuencia de nucleótidos. Por lo tanto, cualquier secuencia de DNA insertada en ese plásmido se replica junto con el resto del DNA del plásmido.

En la figura 9-13 se esquematiza el procedimiento general para clonar un fragmento de DNA empleando vectores plasmídicos de *E. coli*. Cuando las células de *E. coli* se mezclan con el vector de DNA recombinante en ciertas condiciones, una fracción pequeña de las células incorporará el DNA plasmídico, proceso conocido como **transformación**. Típicamente 1 célula de cada 10.000 incorpora una *única* molécula de DNA plasmídico y por ende se transforma. Después de incubar los vectores plasmídicos con *E. coli*, las células que incorporan el plásmido pueden seleccionarse con facilidad del número mucho mayor de células. Por ejemplo, si el plásmi-



▲ Fig. 9-12. Componentes básicos de un vector de clonación plasmídico que puede replicarse dentro de una célula de *E. coli*. Los vectores plasmídicos contienen un gen de selección como el *amp^r*, que codifica la enzima β-lactamasa y confiere resistencia a la ampicilina. El DNA exógeno puede ser insertado en la región entre corchetes sin perturbar la capacidad del plásmido para replicarse o expresar el gen *amp^r*. Los vectores plasmídicos también contienen una secuencia de origen de replicación (ORI) donde la replicación de DNA es iniciada por las enzimas de la célula huésped. La inclusión de un *poliligador* (*polylinker*) sintético que contenga las secuencias de reconocimiento para varias enzimas de restricción diferentes incrementa la versatilidad de un vector plasmídico. El vector es diseñado de tal manera que cada sitio de restricción en el poliligador sea único en el plásmido.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 9-13 La clonación en un vector plasmídico permite la amplificación de un fragmento de DNA. Un fragmento de DNA por ser clonado primero es insertado en un vector plasmídico que contenga un gen de resistencia a la ampicilina (*amp*^{r}), como el que se muestra en la figura 9-12. Sólo las pocas células transformadas por incorporación de una molécula de plásmido sobrevivirán en un medio que contenga ampicilina. En las células transformadas, el DNA plasmídico se replica y se segrega en células hijas, lo que conduce a la formación de una colonia resistente a la ampicilina.

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación técnica: Clonación de plásmidos

do transporta un gen que confiere resistencia al antibiótico ampicilina, pueden seleccionarse las células transformadas al cultivarlas en un medio que contenga ampicilina.

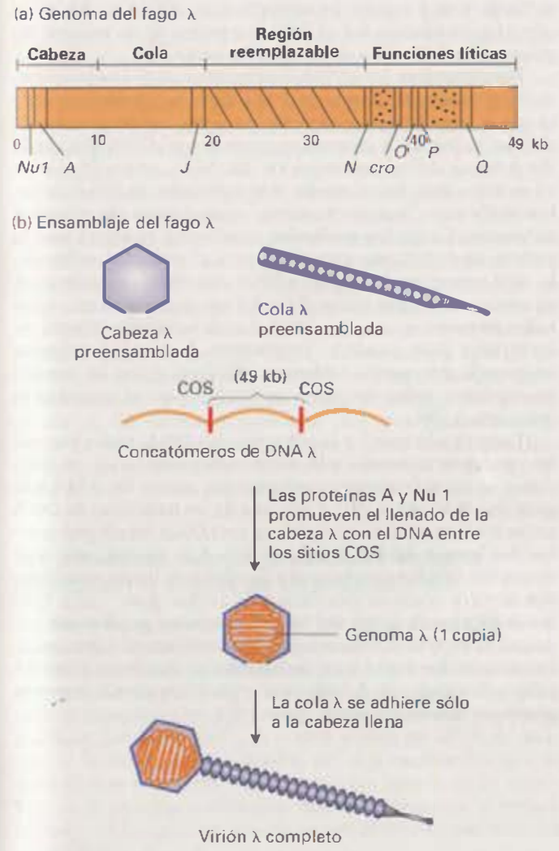
Es posible insertar fragmentos de DNA que van de unos pocos pares de bases hasta ≈20 kb en los vectores plasmídicos. Si se toman precauciones especiales para evitar manipulaciones que podrían romper mecánicamente el DNA, se pueden insertar fragmentos de DNA aún más largos en el plásmido. Cuando un plásmido recombinante con un fragmento de DNA transforma una célula de *E. coli*, todas las células de la progenie resistente a los antibióticos que surgen a partir de la célula inicial transformada contendrán plásmidos con el mismo DNA insertado. El DNA insertado se replica junto con el resto del DNA plasmídico y se segrega a las células hijas a medida que la colonia crece. De esta forma, el fragmento inicial de DNA se replica en la colonia de células en un gran número de copias idénticas. Puesto que todas las células en una colonia surgen a partir de una única célula parental transformada, constituyen un clon de células y el fragmento inicial de DNA insertado en el plásmido progenitor se denomina *DNA clonado* o *clon de DNA*.

La versatilidad de un vector plasmídico de *E. coli* se incrementa incorporándole *un poliligador* (*polylinker*), una secuencia generada sintéticamente que contiene una copia de diferentes sitios de restricción que no están presentes en otro lugar en la secuencia del plásmido (véase fig. 9-12). Cuando ese vector se trata con una enzima de restricción que reconoce un sitio de restricción en el poliligador, el vector se corta sólo una vez dentro del poliligador. Luego cualquier fragmento de DNA de longitud apropiada producido con la misma enzima de restricción puede insertarse en el plásmido cortado con la ligasa de DNA. Los plásmidos que contienen un poliligador le permiten a un investigador clonar fragmentos de DNA generados con diferentes enzimas de restricción empleando el mismo vector plasmídico, lo cual simplifica los procedimientos experimentales.

Los bacteriófagos λ son vectores que permiten la construcción eficiente de grandes genotecas de DNA

Los vectores construidos a partir del bacteriófago λ son alrededor de mil veces más eficientes que los plásmidos para clonar grandes cantidades de fragmentos de DNA. Por esta razón, los vectores de fago λ se utilizaron ampliamente para generar genotecas de DNA, colecciones extensas de fragmentos de DNA que representan el genoma o los mRNA expresados de un organismo. Dos factores dan cuenta de esta mayor eficiencia del fago λ como vector de clonación: la infección de las células huésped de *E. coli* por viriones λ tiene lugar a una frecuencia alrededor de mil veces superior que la transformación por plásmidos, y muchos más clones λ que colonias transformadas pueden crecer y ser detectados en una placa única de cultivo.

Cuando un virión λ infecta una célula de *E. coli*, puede realizar un ciclo de crecimiento lítico durante el cual el DNA del fago se replica y se ensambla formando una progenie de más de 100 fagos completos, que se liberan al lisarse la célula infectada (véase fig. 4-40). Si se coloca una muestra del fago λ sobre una capa de *E. coli* que crece en una placa de Petri, cada virión infectará una única célula. Los consiguientes ciclos de crecimiento del fago darán origen a una región visible y clara, denominada *placa de lisis*, donde las células se han lisado y las partículas del fago se han liberado (véase fig. 4-39).



▲ Fig. 9-14. El genoma del bacteriófago λ y el empaquetamiento del DNA del bacteriófago λ. (a) Mapa simplificado del genoma del fago λ. Existen alrededor de 60 genes en el genoma λ, de los cuales en el diagrama se muestran sólo algunos. Los genes que codifican proteínas requeridas para el ensamblaje de la cabeza y la cola se localizan en el extremo izquierdo; los que codifican proteínas adicionales requeridas para el ciclo lítico, en el extremo derecho. Algunas regiones del genoma pueden ser reemplazadas por DNA exógeno (líneas diagonales) o eliminadas (punteadas) sin afectar la capacidad del fago λ para infectar células huésped y ensamblar nuevos viriones. Más de ≈25 kb de DNA exógeno puede ser insertado en forma estable entre los genes *J* y *N*. (b) Ensamblaje de viriones λ in vivo. Las cabezas y las colas están formadas por múltiples copias de varias proteínas λ diferentes. Durante la última etapa de la infección λ, se forman largas moléculas de DNA llamadas *concatómeros*; estas moléculas multiméricas consisten en múltiples copias del genoma λ de 49 kb de extremo a extremo y separadas por sitios COS (rojos), secuencias nucleotídicas de unión a proteínas que aparecen una vez en cada copia del genoma λ. La unión de las proteínas de la cabeza λ Nu1 y A a los sitios COS promueve la inserción del segmento de DNA entre dos sitios COS adyacentes dentro de una cabeza vacía. Luego de que las cabezas se llenan con DNA, se adhieren las colas λ preensambladas, lo que producen viriones λ completos capaces de infectar células de *E. coli*.

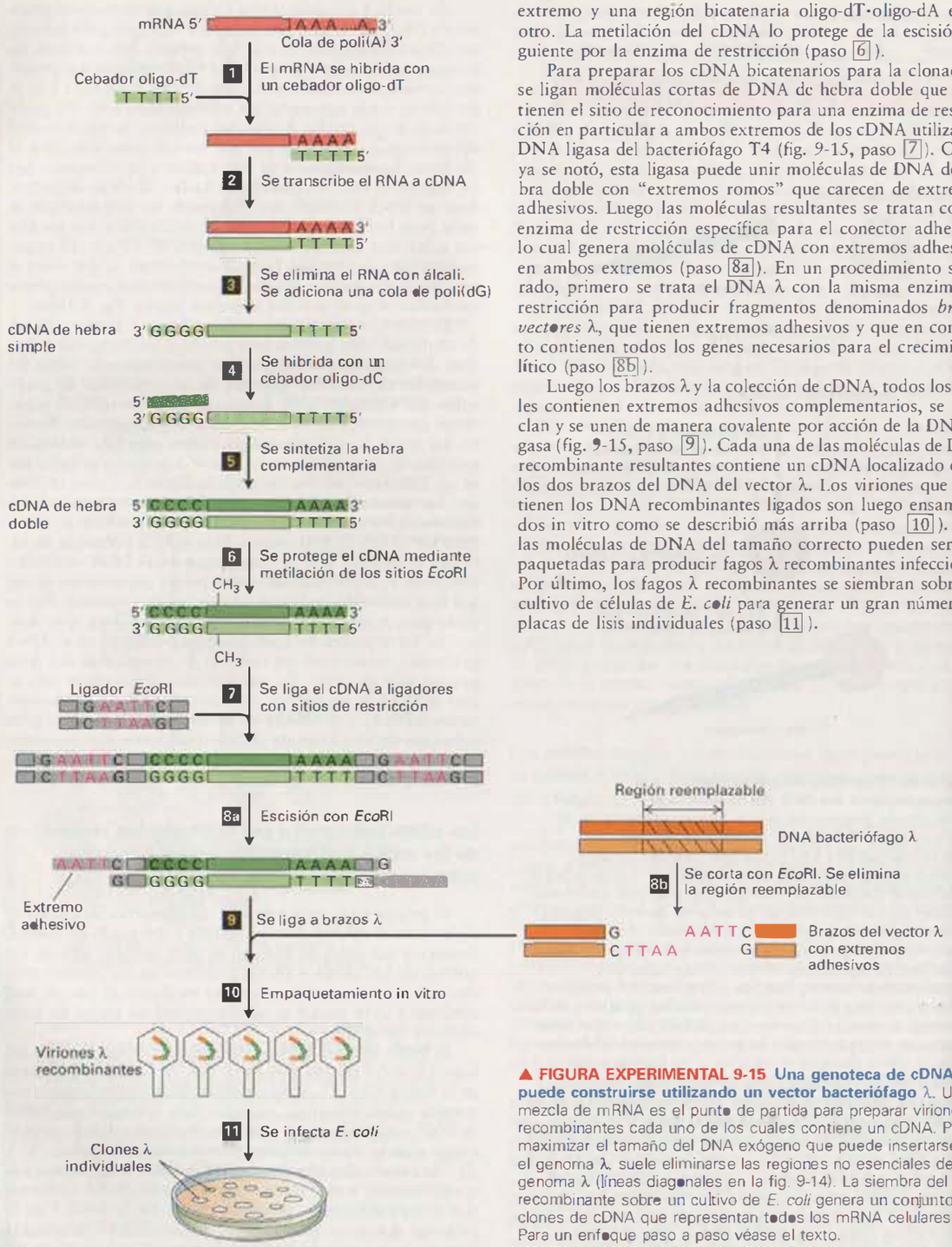
Un virión λ consiste en una cabeza que contiene el genoma de DNA del fago y una cola, que funciona para infectar las células huésped de *E. coli*. Los genes λ que codifican las proteínas de la cabeza y la cola, al igual que diversas proteínas involucradas en la replicación del DNA del fago y la lisis celular, están agrupadas en regiones separadas del genoma viral de ≈50 kb (fig. 9-14a). Sin embargo, la región central del genoma λ contiene genes que no son esenciales para la vía lítica. La eliminación de esta región y su reemplazo por un fragmento de DNA extraño de hasta ≈25 kb de largo produce un DNA recombinante que puede ser empaquetado in vitro para formar un fago capaz de replicarse y formar placas sobre una capa de células huésped de *E. coli*. El empaquetamiento in vitro del DNA recombinante λ, que imita el proceso de ensamblaje in vivo, requiere cabezas y colas preensambladas al igual que dos proteínas virales (fig. 9-14b).

Es técnicamente posible utilizar fagos λ como vectores de clonación para generar una *genoteca*, es decir, una colección de clones λ que representen colectivamente todas las secuencias de DNA del genoma de un organismo en particular. Sin embargo, tales genotecas para eucariontes superiores presentan ciertas dificultades experimentales. Primero, los genes de esos organismos suelen contener secuencias extensas de intrones y por ende son demasiado grandes para ser insertadas en los vectores de fagos λ. Como resultado, las secuencias de genes individuales son separadas y transportadas en más de un clon λ (esto también es cierto para los clones de plásmidos). Más aún, la presencia de intrones y regiones intergénicas largas en el DNA genómico dificultan la identificación de las partes importantes de un gen que realmente codifican secuencias de proteínas. Por lo tanto para muchos estudios, los mRNA celulares, que carecen de las regiones no codificadoras presentes en el DNA genómico, constituyen un material de partida más útil para generar una genoteca. En este método, se sintetizan las copias de DNA de los mRNA, denominadas DNA complementarios (cDNA) y se clonan en vectores de fagos. Una gran colección de los clones de cDNA resultantes, que representan todos los mRNA expresados en un tipo celular, se denomina *genoteca de cDNA*.

Los cDNA preparados por transcripción inversa de los mRNA celulares pueden ser clonados para preparar genotecas de cDNA

El primer paso para preparar una genoteca de cDNA es aislar todo el mRNA del tipo celular o del tejido de interés. Gracias a sus colas de poli(A), es muy sencillo separar los mRNA de los rRNA y tRNA presentes en un número mucho mayor en un extracto celular mediante el uso de una columna a cuya matriz se adhirieron hebras cortas de timidilato (oligo-dT).

El procedimiento general para preparar una genoteca del fago λ a partir de una mezcla de mRNA celular se bosqueja en la figura 9-15. La enzima **transcriptasa inversa**, que se encuentra en los retrovirus, se utiliza para sintetizar una hebra de DNA complementario a cada molécula de mRNA, comenzando a partir de un cebador (*primer*) oligo-dT (pasos 1 y 2). Las moléculas híbridas de cDNA-mRNA resultantes son convertidas en varios pasos a moléculas de cDNA bicatenarios correspondientes a todas las moléculas de mRNA en la preparación original (pasos 3 - 5). Cada cDNA bicatenario contiene una región bicatenaria de oligo-dC·oligo-dG en un



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 9-15 Una genoteca de cDNA puede construirse utilizando un vector bacteriófago λ.** Una mezcla de mRNA es el punto de partida para preparar viriones λ recombinantes cada uno de los cuales contiene un cDNA. Para maximizar el tamaño del DNA exógeno que puede insertarse en el genoma λ, suele eliminarse las regiones no esenciales del genoma λ (líneas diagonales en la fig. 9-14). La siembra del fago recombinante sobre un cultivo de *E. coli* genera un conjunto de clones de cDNA que representan todos los mRNA celulares. Para un enfoque paso a paso véase el texto.

extremo y una región bicatenaria oligo-dT·oligo-dA en el otro. La metilación del cDNA lo protege de la escisión siguiente por la enzima de restricción (paso 6).

Para preparar los cDNA bicatenarios para la clonación, se ligan moléculas cortas de DNA de hebra doble que contienen el sitio de reconocimiento para una enzima de restricción en particular a ambos extremos de los cDNA utilizando DNA ligasa del bacteriófago T4 (fig. 9-15, paso 7). Como ya se notó, esta ligasa puede unir moléculas de DNA de hebra doble con "extremos romos" que carecen de extremos adhesivos. Luego las moléculas resultantes se tratan con la enzima de restricción específica para el conector adherido, lo cual genera moléculas de cDNA con extremos adhesivos en ambos extremos (paso 8a). En un procedimiento separado, primero se trata el DNA λ con la misma enzima de restricción para producir fragmentos denominados *brazos vectores* λ, que tienen extremos adhesivos y que en conjunto contienen todos los genes necesarios para el crecimiento lítico (paso 8b).

Luego los brazos λ y la colección de cDNA, todos los cuales contienen extremos adhesivos complementarios, se mezclan y se unen de manera covalente por acción de la DNA ligasa (fig. 9-15, paso 9). Cada una de las moléculas de DNA recombinante resultantes contiene un cDNA localizado entre los dos brazos del DNA del vector λ. Los viriones que contienen los DNA recombinantes ligados son luego ensamblados in vitro como se describió más arriba (paso 10). Sólo las moléculas de DNA del tamaño correcto pueden ser empaquetadas para producir fagos λ recombinantes infecciosos. Por último, los fagos λ recombinantes se siembran sobre un cultivo de células de *E. coli* para generar un gran número de placas de lisis individuales (paso 11).

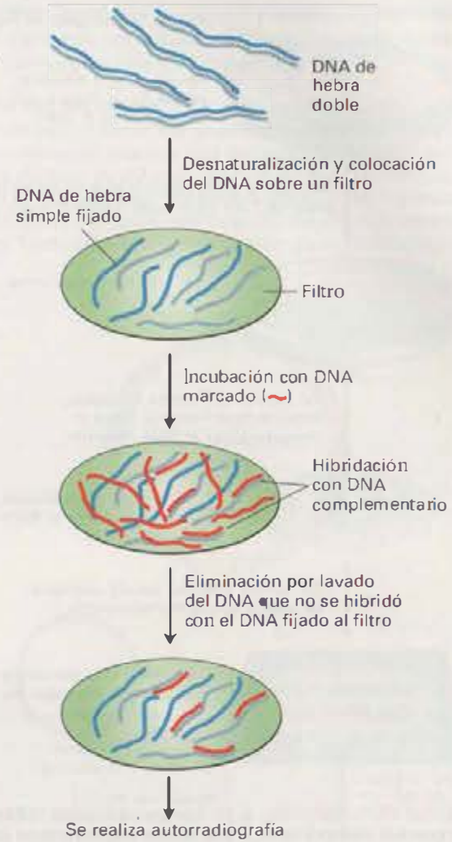
Puesto que cada placa de lisis se origina a partir de un fago recombinante individual, toda la progenie de fagos λ que se desarrollan son genéticamente idénticos y constituyen un clon portador de un cDNA derivado de un único mRNA; colectivamente constituyen una genoteca de cDNA λ. Una característica de las genotecas de cDNA surge debido a que se transcriben diferentes genes a velocidades muy diferentes. Como resultado, los clones de cDNA correspondientes a los genes que se transcriben rápidamente estarán representados muchas veces en una genoteca de cDNA, mientras que los cDNA correspondientes a los genes que se transcriben lentamente serán excepcionales o no estarán presentes en absoluto. Esta propiedad es ventajosa si un investigador está interesado en un gen que es transcripto a una alta velocidad en un tipo de célula en particular. En este caso, una genoteca de cDNA preparada a partir de los mRNA expresados en ese tipo de célula estará enriquecida con el cDNA de interés, lo que facilita la detección de la genoteca para los clones λ que porten ese cDNA. Sin embargo, para tener una oportunidad razonable de incluir clones correspondientes a genes transcriptos lentamente, las genotecas de cDNA de los mamíferos deben contener 10^6–10^7 clones individuales de fago λ recombinante.

Las genotecas pueden analizarse mediante hibridación a sondas de oligonucleótidos

Tanto las genotecas como las genotecas de cDNA de diversos organismos contienen cientos de miles a más de un millón de clones individuales en el caso de los eucariontes superiores. Se dispone de dos metodologías generales para realizar búsquedas en genotecas a fin de identificar clones específicos que porten un gen u otra región de DNA de interés: 1) la detección con sondas de oligonucleótidos que se unen al clon de interés y 2) la detección basada en la expresión de la proteína codificada. Aquí describiremos el primer método; en la siguiente sección se presentará un ejemplo del segundo.

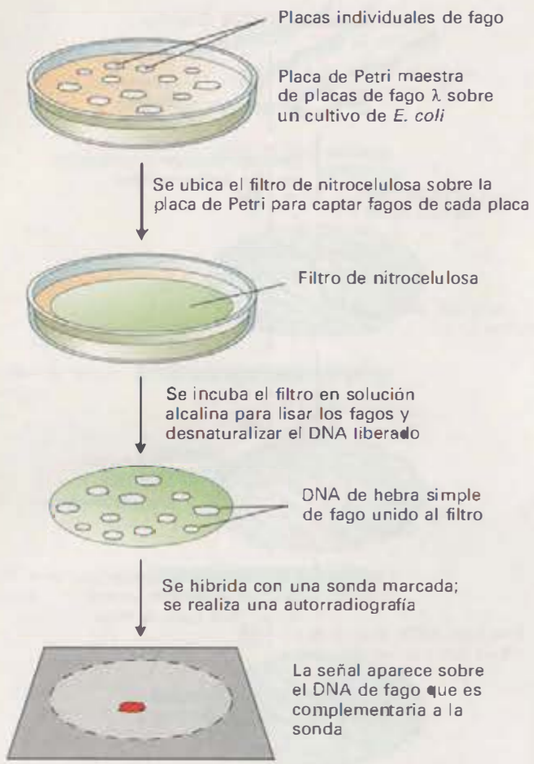
La base para la detección con sondas de oligonucleótidos es la **hibridación**, la capacidad de moléculas de DNA o RNA de hebra simple complementarias de asociarse (hibridar) específicamente entre sí mediante el apareamiento de bases. Como se analizó en el capítulo 4, el DNA de hebra doble (dúplex) puede ser desnaturalizado (fundido) a hebras simples por calentamiento en una solución salina diluida. Si luego la temperatura baja y se eleva la concentración de iones, las hebras simples complementarias se reasociarán (se hibridarán) para formar dúplex. En una mezcla de ácidos nucleicos, sólo las hebras simples complementarias (o las hebras que contengan regiones complementarias) se reasociarán; más aún, la extensión de su reasociación no se ve casi afectada por la presencia de hebras no complementarias.

En la prueba de *hibridación sobre membrana* esquematizada en la figura 9-16, se utiliza una sonda de ácido nucleico monocatenario para detectar los fragmentos de DNA en una mezcla que son complementarios a la sonda. Primero se desnaturaliza la muestra de DNA y se adhieren las hebras simples a un soporte sólido, por lo común un filtro de nitrocelulosa o una membrana de nailon tratada. Luego se incuba la membrana en una solución que contiene una sonda marcada radiactivamente. En condiciones de hibridación (cerca del pH neutro, 40–65°C, 0,3 – 0,6 M NaCl), esta sonda marcada se hibrida a cualquier hebra de ácido nucleico complementaria fijada a la membrana. Cualquier exceso de sonda no hibridada se elimina por lavado y los híbridos marcados se detectan mediante autorradiografía del filtro.



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 9-16 El ensayo de hibridación sobre membrana detecta los ácidos nucleicos complementarios a la sonda de oligonucleótido.** Esta prueba se puede emplear para detectar tanto DNA como RNA y la sonda complementaria radiomarcada puede ser DNA o RNA.

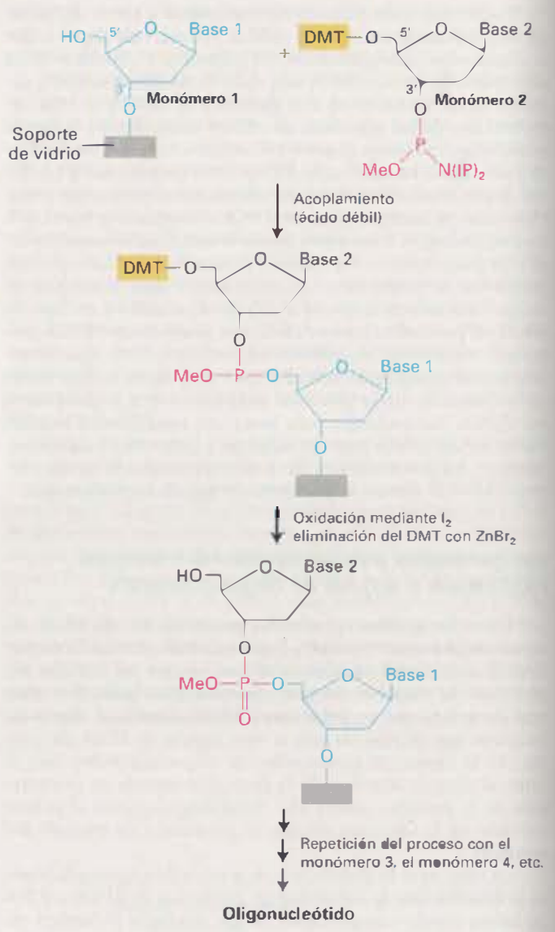
La aplicación de este procedimiento para la búsqueda en una genoteca de cDNA λ se representa en la figura 9-17. En este caso, se reproduce una *réplica* de la placa de Petri que contiene numerosos clones λ individuales sobre la superficie de una membrana de nitrocelulosa. Luego se analiza la membrana usando una sonda marcada radiactivamente específica para el DNA recombinante que contiene el fragmento de interés. La hibridación de la membrana con oligonucleótidos marcados radiactivamente suele utilizarse para realizar búsquedas en genotecas de cDNA λ. Una vez que se obtiene un clon de cDNA que codifique una proteína particular, puede marcarse con radiactividad al cDNA en toda su longitud y usarse como sonda para buscar en una genoteca clones que contengan fragmentos del gen correspondiente.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 9-17 Las genotecas de cDNA de fagos pueden detectarse con una sonda radiomarcada para identificar un clon de interés. En el plaqueado inicial de una genoteca, no se permite que las placas de fago λ se desarrollen hasta un tamaño visible, de manera tal que se pueden analizar hasta 50.000 recombinantes sobre una única placa. La aparición de una mancha en el autorradiograma indica la presencia de un clon λ recombinante que contiene un DNA complementario a la sonda. La posición de la mancha en el autorradiograma es la imagen especular de la posición en la placa de Petri original de ese clon en particular. El alineamiento del autorradiograma con la placa de Petri original localizará el clon correspondiente a partir del cual las partículas del fago infeccioso pueden ser recuperadas y colocadas nuevamente en una placa a baja densidad, lo que da como resultado placas bien separadas. Al repetir el análisis de hibridación se obtienen aislamientos puros.

Las sondas de oligonucleótidos se diseñan tomando como base secuencias proteicas parciales

La identificación de clones específicos mediante la técnica de hibridación de membrana depende de la disponibilidad de sondas complementarias marcadas radiactivamente. Para que un oligonucleótido sea útil como sonda, debe ser lo suficientemente largo para que su secuencia sólo aparezca en el clon de interés y no en cualquier otro clon. En la mayoría de los casos, esta condición es satisfecha por los oligonucleótidos que contienen unos 20 nucleótidos. Esto obedece a que una secuencia específica de 20 nucleótidos aparece una vez cada 4^{20} ($\approx 10^{12}$) nucleótidos. Puesto que todos los genomas son mucho más pequeños ($\approx 3 \times 10^9$ nucleótidos para los seres humanos), una secuencia específica de 20 nucleótidos en un genoma sólo aparece una vez. Los oligonucleótidos de esta longitud con una secuencia específica pueden sintetizarse químicamente y marcarse luego con radiactividad utilizando un polinucleótido cinasa para transferir un grupo fosfato marcado con ^{32}P del ATP al extremo 5′ de cada oligonucleótido.



▲ Fig. 9-18. Síntesis química de oligonucleótidos mediante adición secuencial de derivados de nucleótidos reactivos. El primer nucleótido (3′) en la secuencia (monómero 1) está unido a un soporte de vidrio a través de su hidroxilo 3′; su hidroxilo 5′ está disponible para la adición del segundo nucleótido. El segundo nucleótido en la secuencia (monómero 2) se modifica por la adición de 4′,4′-dimetoxitritilo (DMT) a su hidroxilo 5′, bloqueando así a este hidroxilo para que no reaccione; además, un grupo altamente reactivo (letras rojas) se adhiere al hidroxilo 3′. Cuando los dos monómeros se mezclan en presencia de un ácido débil, forman un enlace fosfodiéster 5′ → 3′ con el fósforo en el estado trivalente. La oxidación de este intermediario incrementa la valencia del fósforo a 5 y la posterior eliminación del grupo DMT con bromuro de cinc ($ZnBr_2$) libera el hidroxilo 5′. Luego se añade el monómero 3 y las reacciones se repiten. La repetición de este proceso produce todo el oligonucleótido. Finalmente, todos los grupos metilo en los fosfatos son eliminados al mismo tiempo a pH alcalino y se escinde el enlace de conexión del monómero 1 al soporte de vidrio. (Véase S. L. Beaucage y M. H. Caruthers, 1981, Tetrahedron Lett. 22:1859.)

¿Cómo puede un investigador diseñar una sonda de oligonucleótido para identificar un clon de cDNA que codifica una proteína en particular? Si se conoce toda o una porción de la secuencia de aminoácidos de la proteína, es posible diseñar una sonda de DNA correspondiente a una pequeña región del gen sobre la base del código genético. Sin embargo, como el código genético es degenerado (es decir, muchos aminoácidos son codificados por más de un codón), una sonda basada en una secuencia de aminoácidos debe incluir *todos* los oligonucleótidos que en teoría pueden codificar la secuencia peptídica. Dentro de esta mezcla de oligonucleótidos habrá uno que hibridará perfectamente al clon de interés.

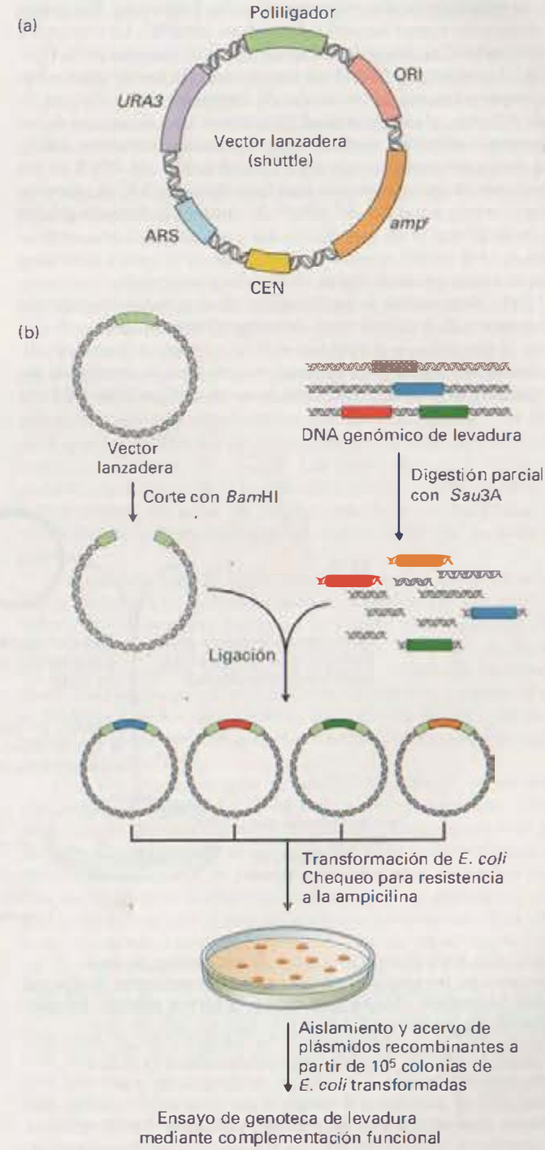
En los últimos años, este método ha sido simplificado por la disponibilidad de las secuencias genómicas completas para los seres humanos y algunos organismos modelo como el ratón, *Drosophila* y el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Mediante un programa de computación apropiado, un investigador puede buscar en la base de datos de la secuencia genómica la secuencia codificadora que corresponde a una porción específica de la secuencia aminoacídica de la proteína en estudio. Si se encuentra una coincidencia, entonces una única sonda individual de DNA basada en esta secuencia genómica conocida se hibridará perfectamente con el clon que codifica la proteína en estudio.

La síntesis química de sondas de DNA monocatenario de secuencia definida puede lograrse mediante la serie de reacciones mostradas en la figura 9-18. Con instrumentos automatizados ahora disponibles, los investigadores pueden programar la síntesis de oligonucleótidos de secuencia específica de hasta alrededor de 100 nucleótidos de largo. En forma alternativa, estas sondas pueden prepararse mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una técnica muy utilizada para amplificar secuencias específicas de DNA que se describirá luego.

▶ FIGURA EXPERIMENTAL 9-19 La genoteca de levadura puede construirse en un vector *shuttle* plasmídico que puede replicarse en levadura y en *E. coli*. (a) Componentes de un típico vector versátil o lanzadera (*shuttle*) plasmídico para clonar los genes de *Saccharomyces*. La presencia de un origen de replicación de DNA de levadura (ARS) y un centrómero de levadura (CEN) permite la replicación estable y la segregación en levadura. También se incluye un marcador de selección de levadura como el *URA3*, el cual permite que un mutante *ura3* crezca en un medio que carece de uracilo. Por último, el vector contiene secuencias para la replicación y la selección en *E. coli* (ORI y *amp*^{r}) y un poliligador para la inserción fácil de fragmentos de DNA de levadura. (b) Protocolo típico para construir una genoteca de levadura. La digestión parcial de todo el DNA genómico de la levadura con *Sau*3A se ajusta para generar fragmentos con un tamaño promedio de alrededor de 10 kb. Se prepara el vector para aceptar los fragmentos genómicos mediante digestión con *Bam*HI, lo que produce los mismos extremos adhesivos que *Sau*3A. Cada clon transformado de *E. coli* que crece luego de la selección para la resistencia a ampicilina contienen un único tipo de fragmento de DNA de levadura.

Las genotecas de levadura pueden construirse con vectores lanzaderas (*shuttle*) y detectarse por complementación funcional

En algunos casos una genoteca puede analizarse por la capacidad para expresar una proteína funcional que complementa una mutación recesiva. Esta estrategia de detección sería una forma eficiente de aislar un gen clonado que corresponda a una mutación recesiva interesante identificada en un organismo experimental. Para ilustrar este método, denominado **complementación funcional**, describiremos cómo genes de levadura clona-



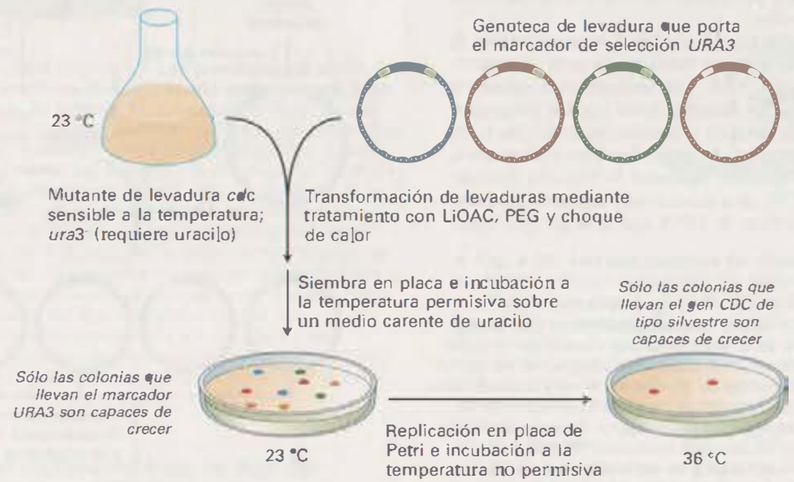
Ensayo de genoteca de levadura mediante complementación funcional

dos en plásmidos especiales de *E. coli* pueden ser introducidos en células de levadura mutantes para identificar el gen de tipo silvestre (normal) que está defectuoso en la cepa mutante.

Las genotecas construidas con el propósito de realizar screenings entre secuencias génicas de levadura suelen construirse a partir de DNA genómico en lugar de cDNA. Debido a que los genes de *Saccharomyces* no contienen múltiples intrones, son lo suficientemente compactos para que puedan incluir toda la secuencia de un gen en un fragmento de DNA genómico inserto en un vector plasmídico. Para construir una genoteca de plásmidos que será rastreada por complementación funcional en células de la levadura, el vector plasmídico debe poder replicarse tanto en las células de *E. coli* como en las de levadura. Este tipo de vector, capaz de propagarse en dos huéspedes diferentes, se denomina vector versátil o lanzadera (shuttle). La estructura de un vector lanzadera de levadura típico se muestra en la figura 9-19a (véase pág 369). Este vector contiene los elementos básicos que permiten la clonación de fragmentos de DNA en *E. coli*. Además, el vector lanzadera contiene una secuencia de replicación autónoma (*autonomous replicating sequence*, ARS), que funciona como origen para la replicación del DNA en las levaduras; un centrómero de levadura (llamado CEN), que permite la segregación fiel del plásmido durante la división celular de la levadura; y un gen de levadura que codifica una enzima para la síntesis del uracilo (*URA3*), que sirve como marcador seleccionable en un mutante de levadura apropiado.

Para incrementar la probabilidad de que todas las regiones del genoma de levadura sean clonadas y representadas con éxito en la genoteca de plásmidos, el DNA genómico suele sólo digerirse parcialmente para producir fragmentos de restricción superpuestos de ≈10 kb. Estos fragmentos se ligan luego dentro del vector lanzadera en el cual el poliligador ha sido escindido con una enzima de restricción que produce extremos adhesivos complementarios a los de los fragmentos de DNA de la levadura (fig. 9-19b). Como los fragmentos de restricción de 10 kb del DNA de la levadura se incorporan al azar en los vectores lanzaderas, se necesitan al menos 10^5 colonias de *E. coli*, cada una con un vector lanzadera recombinante particular para asegurar que cada región del DNA de levaduras tenga alta probabilidad de estar representada en la genoteca al menos una vez.

En la figura 9-20 se representa cómo puede analizarse esa genoteca para aislar el gen de tipo silvestre correspondiente a una de las mutaciones *cdc* sensibles a la temperatura ya mencionada en este capítulo. La cepa de levadura inicial es un mutante doble que requiere uracilo para el crecimiento debido a una mutación de *ura3* y es sensible a la temperatura debido a una mutación *cdc28* identificada por su fenotipo (véase fig. 9-6). Los plásmidos recombinantes aislados de la genoteca de levadura se mezclan con células de levadura en condiciones que promueven la transformación de las células con DNA extraño. Puesto que las células de levadura transformadas llevan una copia del gen de tipo silvestre *URA3*, pueden seleccionarse por su capacidad para crecer en ausencia de uracilo. Típicamente, alrededor de 20 placas de Petri, cada una con alrededor de 500 levaduras transformantes, son suficientes para representar todo el genoma de la levadura. Esta colección de transformantes de levadura puede mantenerse a 23 °C, una temperatura permisiva para el crecimiento del mutante *cdc28*. Toda la colección en 20 placas se transfiere luego a placas réplicas, que se colocan a 36 °C, una temperatura no permisiva para los mutantes *cdc*. Las colonias de levadura que llevan los plásmidos recombinantes que expresan una copia de tipo silvestre del gen *CDC28* serán capaces de crecer a 36 °C. Una vez identificadas las colonias de levadura resistentes a la temperatura, el DNA plasmídico puede extraerse de las células de levadura cultivadas y analizarse por subclonación y secuenciación del DNA, temas que analizaremos en la siguiente sección.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 9-20 El screening de una genoteca de levadura mediante complementación funcional puede identificar clones que llevan la forma normal del gen mutante de levadura. En este ejemplo, un gen de tipo silvestre *CDC* es aislado por complementación de un mutante de levadura *cdc*. La cepa *Saccharomyces* utilizada para el screening de la genoteca de levadura porta *ura3*- y una mutación *cdc* sensible a la temperatura. Esta cepa mutante se cultiva y mantiene a una temperatura permisiva (23 °C). El pool de plásmidos recombinantes preparado como se muestra en la figura 9-19 se incuba con las células mutantes de levadura en condiciones que promueven la transformación. Las relativamente pocas células transformadas, que contienen el DNA plasmídico recombinante, pueden crecer en ausencia de uracilo a 23 °C. Cuando las colonias de levadura transformadas se replican en una placa de Petri y se incuban a 36 °C (una temperatura no permisiva), sólo sobrevivirán los clones que transporten una genoteca de plásmidos que contenga la copia de tipo silvestre del gen *CDC*. LiOAC: acetato de litio; PEG: polietilenglicol.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 9.2

Clonación del DNA mediante métodos de DNA recombinante

- En la clonación de DNA, las moléculas de DNA recombinante se forman in vitro al insertar fragmentos de DNA a moléculas vectores de DNA. Luego se introducirán las moléculas de DNA recombinante en las células huésped, donde se replican y producen grandes cantidades de moléculas de DNA recombinante.
- Las enzimas de restricción (endonucleasas) cortan el DNA en secuencias palindrómicas específicas de 4 a 8 bp y producen fragmentos definidos que a menudo tienen colas de hebra simple autocomplementarias (extremos adhesivos).
- Dos fragmentos de restricción con extremos complementarios pueden unirse mediante la acción de la DNA ligasa para formar un DNA recombinante (véase fig. 9-11).
- Los vectores de clonación de *E. coli* son moléculas pequeñas de DNA circular (plásmidos) que incluyen tres regiones funcionales: un origen de replicación, un gen resistente a fármacos y un sitio donde puede insertarse un fragmento de DNA. Las células transformadas que transportan un vector crecen y forman colonias sobre el medio de selección (véase fig. 9-13).
- Los fagos son vectores de clonación que se forman reemplazando partes no esenciales del genoma λ con fragmentos de DNA superiores a ≈25 kb de longitud y empaquetando los DNA recombinantes resultantes con cabezas preensambladas y colas in vitro.
- En la clonación de cDNA, los mRNA expresados se transcriben inversamente a DNA complementarios o cDNA. Mediante una serie de reacciones, los cDNA monocatenarios se convierten a DNA bicatenarios, que pueden ligarse en un vector fago λ (véase fig. 9-15).
- Una genoteca de cDNA es un conjunto de clones de cDNA preparados a partir de mRNA aislados de un tipo particular de tejido. Una genoteca es un conjunto de clones que transporta fragmentos de restricción producidos por escisión de todo el genoma.
- El número de clones en una genoteca o de cDNA debe ser lo suficientemente grande para que todas o casi todas las secuencias nucleotídicas originales estén presentes en, al menos, un clon.
- Un fragmento de DNA clonado en particular dentro de una genoteca puede detectarse mediante hibridación a un oligonucleótido radiomarcado cuya secuencia es complementaria a una porción del fragmento (véanse figs. 9-16 y 9-17).
- Los vectores lanzadera que se replican tanto en las levaduras como en *E. coli* pueden utilizarse para construir una genoteca de la levadura. Los genes específicos pueden aislarse por su capacidad para complementar los genes mutantes correspondientes en las células de la levadura (véase fig. 9-20).

9.3 Caracterización y uso de fragmentos clonados de DNA

Ahora que hemos descrito las técnicas básicas para utilizar la tecnología del DNA recombinante para aislar clones de DNA, consideraremos cómo los DNA clonados se caracterizan adicionalmente y las diversas formas en que pueden utilizarse. Comenzamos con varias técnicas muy utilizadas y examinaremos algunas aplicaciones más específicas en las secciones siguientes.

La electroforesis en gel permite la separación del DNA del vector de los fragmentos clonados

Para manipular o secuenciar un fragmento de DNA clonado, éste primero debe separarse del DNA del vector. Esto se puede lograr cortando el clon de DNA recombinante con la misma enzima de restricción utilizada para producir originalmente los vectores de recombinación. El DNA clonado y el DNA del vector son sometidos luego a **electroforesis** en gel, un método poderoso para separar moléculas de DNA de diferentes tamaños.

Cerca del pH neutro, las moléculas de DNA tienen una gran carga negativa y por ende se mueven hacia el electrodo positivo durante la electroforesis en gel. Debido a que la matriz del gel restringe la difusión aleatoria de las moléculas, las que tienen la misma longitud migran juntas como una banda cuyo ancho iguala al del carril en el que se colocó la mezcla de DNA original al comienzo de la corrida electroforética. Las moléculas más pequeñas se mueven a través de la matriz del gel más rápidamente que las más grandes, de manera que las moléculas de diferentes longitudes migran como bandas distintivas (fig. 9-21). Las moléculas de DNA compuestas por hasta ≈2000 nucleótidos suelen separarse electroforéticamente en *geles de poliacrilamida* y las moléculas de alrededor de 200 nucleótidos hasta más de 20 kb, en *geles de agarosa*.

Un método común para visualizar bandas de DNA separadas en un gel es incubarlo en una solución que contenga el colorante fluorescente bromuro de etidio. Esta molécula planar se une al DNA intercalándose entre los pares de bases. La unión concentra el etidio en el DNA y también incrementa su fluorescencia intrínseca. Como resultado, cuando el gel se ilumina con luz ultravioleta, las regiones del gel que contienen DNA fluorescen con mucha más fuerza que las regiones del gel sin DNA.

Una vez que un fragmento de DNA clonado, sobre todo uno largo, se separó del DNA del vector, se trata con diversas enzimas de restricción para producir fragmentos más pequeños. Después de la separación mediante electroforesis en gel, todos o algunos de estos fragmentos más pequeños pueden ser ligados individualmente a un vector plasmídico y clonados en *E. coli* por el procedimiento convencional. Este proceso, conocido como *subclonación*, es un paso importante en el reordenamiento de las partes de genes en nuevas configuraciones útiles. Por ejemplo, un investigador que quiera cambiar las condiciones en las cuales se expresa un gen podría usar la subclonación para reemplazar el promotor normal asociado con un gen clonado con un segmento de DNA que contenga un promotor diferente. La subclonación también puede utilizarse para obtener fragmentos de DNA clonados de una longitud apropiada para determinar la secuencia nucleotídica.

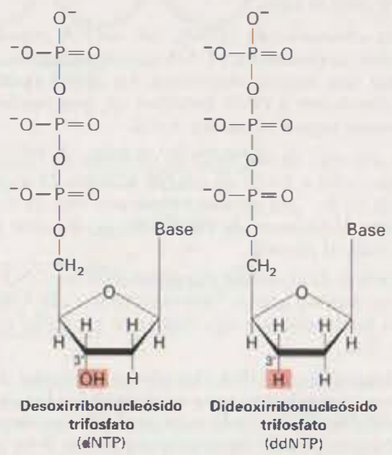


◀ FIGURA EXPERIMENTAL 9-21 La electroforesis en gel separa las moléculas de DNA de diferentes longitudes. Se prepara un gel volcando un líquido que contiene agarosa fundida o acrilamida no polimerizada entre dos placas de vidrio separadas unos pocos milímetros. A medida que la agarosa se solidifica o la acrilamida se polimeriza en poliacrilamida, se forma una matriz de gel (óvalos anaranjados) compuesta de largas cadenas enredadas de polímeros. Las dimensiones de los canales interconectantes, o poros, dependen de la concentración de la agarosa o de la acrilamida utilizada para formar el gel. Las bandas generadas pueden visualizarse por autorradiografía (si los fragmentos están marcados radiactivamente) o por adición de un marcador fluorescente (p. ej., bromuro de etidio) que se une al DNA.

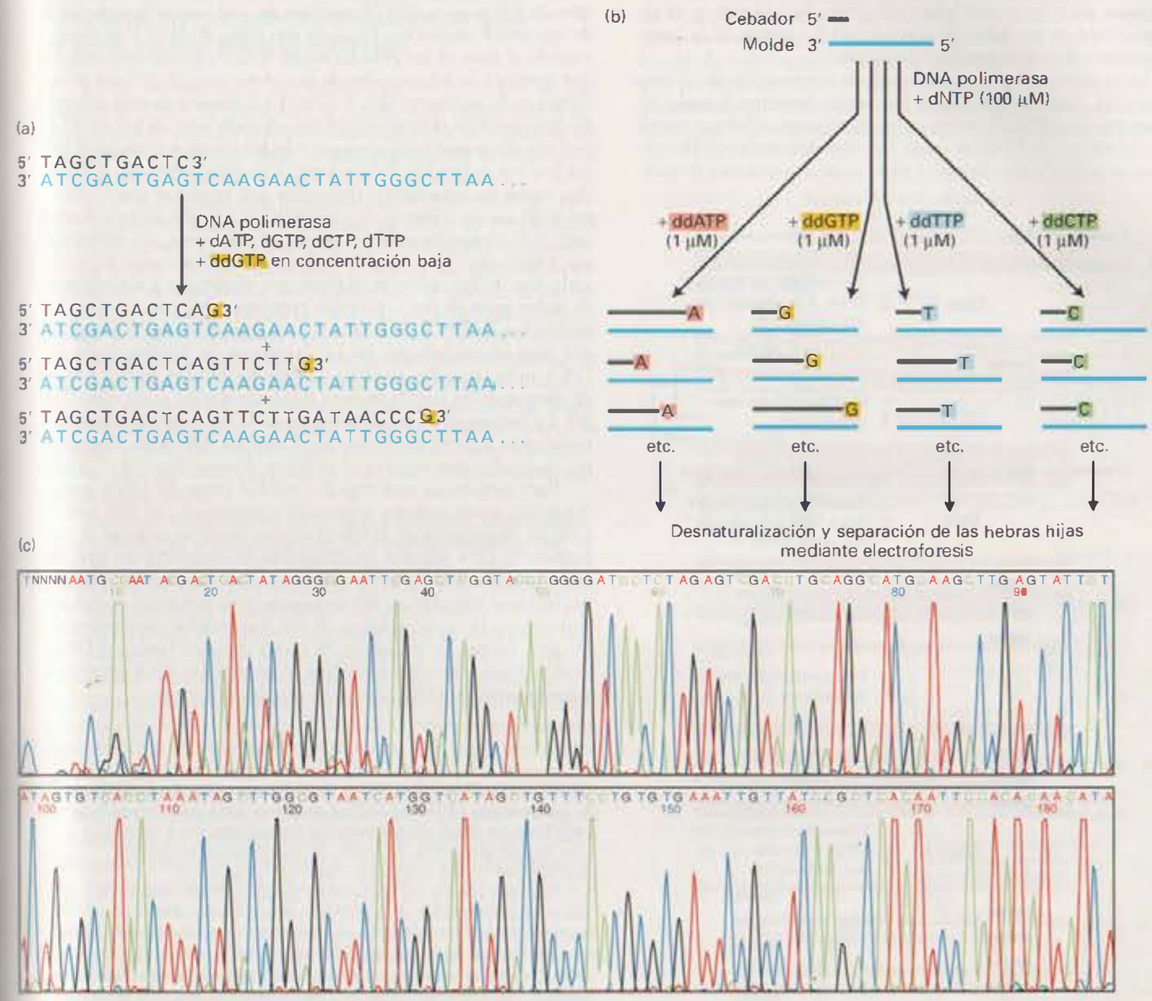
Las moléculas de DNA clonado son secuenciadas con rapidez mediante el método de terminación de cadena o método didesoxi

La caracterización de cualquier fragmento de DNA requiere la determinación de su secuencia de nucleótidos. F. Sanger y col. crearon el método más utilizado ahora para determinar la secuencia exacta de nucleótidos de fragmentos de DNA de hasta ≈500 nucleótidos de longitud. La idea básica de este método es sintetizar, a partir de los fragmentos de DNA por ser secuenciados, un grupo de hebras hijas que son marcadas en un extremo y que difieren en longitud por un nucleótido. La separación de las hebras hijas truncadas mediante electroforesis en gel puede luego establecer la secuencia nucleotídica del fragmento de DNA original.

La síntesis de las hebras hijas truncadas se logra con el uso de 2′, 3′-didesoxirribonuleósido trifosfatos (ddNTP). Estas moléculas, a diferencia de los desoxirribonucleótidos normales (dNTP), carecen de un grupo hidroxilo 3′ (fig. 9-22). Aunque los ddNTP pueden incorporarse a una cadena de DNA en crecimiento mediante la DNA polimerasa, una vez



▲ Fig. 9-22. Estructura del desoxirribonucleósido trifosfato (dNTP) y del didesoxirribonucleósido trifosfato (ddNTP). La incorporación de un residuo de ddNTP a una cadena de DNA en crecimiento termina la elongación en ese punto.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 9-23 Los DNA clonados pueden ser secuenciados por el método de Sanger, utilizando didesoxirribonucleósidos trifosfatos (ddNTP) marcados con fluorescencia. (a) Una hebra (molde) simple de DNA por ser secuenciada (letras azules) se hibrida a un cebador sintético desoxirribonucleótido (letras negras). El cebador es elongado en una mezcla de reacción que contiene los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfatos normales más una cantidad relativamente pequeña de uno de los cuatro didesoxirribonucleósidos trifosfatos. En este ejemplo, está presente el ddGTP (amarillo). Debido a la concentración relativamente baja de ddGTP, la incorporación de un ddGTP, y por lo tanto la terminación de la cadena, tiene lugar en una posición dada en la secuencia sólo alrededor del 1% del tiempo. Por último la mezcla de reacción contendrá una mezcla de fragmentos de cadenas hijas terminadas prematuramente (truncadas) que finalizan en cada posición de ddGTP. (b) Para obtener la secuencia completa de un DNA molde, se llevan a cabo cuatro reacciones separadas, cada una con un didesoxirribonucleósido trifosfato (ddNTP) diferente. El ddNTP que termina cada fragmento truncado puede identificarse mediante el uso de ddNTP marcados con cuatro colorantes fluorescentes distintos (indicados por los colores que se resaltan). (c) En un aparato de secuenciación automática, las cuatro mezclas de reacción se someten a electroforesis en gel y se registra el orden de aparición de cada uno de los cuatro colorantes fluorescentes en el extremo del gel. Aquí se presenta una impresión de muestra de un secuenciador automático a partir del cual se puede leer directamente la secuencia del DNA molde original. N: = nucleótido que no puede ser asignado. [Parte (c) de Griffiths et al., Fig. 14:27.]

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación técnica: Secuenciación didesoxi de DNA

incorporados no pueden formar un enlace fosfodiéster con el siguiente nucleótido trifosfato entrante. Por lo tanto, la incorporación de un ddNTP termina con la síntesis de la cadena y produce una hebra hija truncada.

La secuenciación con el método de *terminación de cadena* o método *didesoxi de Sanger* comienza desnaturalizando un fragmento de DNA de hebra doble para generar hebras molde para la síntesis de DNA in vitro. Un oligodesoxinucleótido sintético se utiliza como cebador para *cuatro* reacciones de polimerización separadas, cada una con una concentración baja de uno de los cuatro ddNTP además de una concentración alta de los dNTP normales. En cada reacción, el ddNTP es incorporado al azar en las posiciones del dNTP correspondiente, lo que provoca la terminación de la polimerización en esas posiciones en la secuencia (fig. 9-23a). La inclusión de marcadores fluorescentes de diferentes colores en cada uno de los ddNTP permite distinguir cada conjunto de fragmentos truncados hijos por sus correspondientes marcas fluorescentes (fig. 9-23b). Así, todos los fragmentos truncados que terminan con G fluorescerán en un color (p. ej., amarillo) y los que terminan con una A fluorescerán con otro color (p. ej., rojo), sin importar sus longitudes. Las mezclas de fragmentos truncados hijos de cada una de las cuatro reacciones son sometidas a electroforesis sobre geles de poliacrilamida especiales que pueden separar moléculas de DNA de hebra simple que difieren en longitud por sólo un nucleótido. En las máquinas de secuenciación de DNA automatizadas, se ubica un detector fluorescente que puede distinguir las cuatro marcas fluorescentes en el extremo del gel. La secuencia de la hebra molde de DNA original puede determinarse a partir del orden en el cual los diferentes fragmentos marcados pasaron por el detector fluorescente (fig. 9-23c).

Para secuenciar una región continua larga del DNA genómico, los investigadores a menudo comienzan con una colección de fragmentos de DNA clonados cuyas secuencias se superponen. Una vez que se determina la secuencia de uno de estos fragmentos, se pueden sintetizar químicamente los oligonucleótidos basados en esa secuencia para utilizarse como cebadores en la secuenciación de los fragmentos superpuestos. De esta forma, la secuencia de una extensión larga de DNA se determina experimentalmente al secuenciar los fragmentos superpuestos de DNA clonados que la componen.



◀ FIGURA EXPERIMENTAL 9-24 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utiliza ampliamente para amplificar regiones de DNA de secuencias conocidas. Para amplificar una región específica de DNA, un investigador sintetizará químicamente dos cebadores de oligonucleótidos complementarios a las secuencias de aproximadamente 18 bases que flanquean la región de interés (designados como barras celestes y azules). La reacción completa está compuesta de una mezcla compleja de DNA de hebra doble (en general DNA genómico que contiene la secuencia diana de interés), un exceso estequiométrico de ambos cebadores, los cuatro desoxinucleósidos trifosfatos, y una DNA polimerasa estable al calor conocida como *Taq polimerasa*. Durante cada ciclo de PCR, se calienta la mezcla de reacción primero para separar las hebras y luego se enfría para permitir que los cebadores se unan a las secuencias complementarias que flanquean la región por amplificar. La *Taq polimerasa* extiende luego cada cebador desde su extremo 3′ y genera hebras recién sintetizadas que se extienden en la dirección 3′ hasta el extremo 5′ de la hebra patrón. Durante el tercer ciclo, se generan dos moléculas de DNA de hebra doble iguales en longitud a la secuencia de la región por amplificar. En cada ciclo sucesivo el segmento diana, que se hibrida a los cebadores, se duplica y excede enormemente en número a todos los otros segmentos de DNA en la mezcla de reacción. Los ciclos sucesivos de PCR pueden automatizarse alternando cada ciclo de reacción por intervalos a alta temperatura para la separación del DNA y a una temperatura menor definida, para la hibridación y la elongación de porciones. Una reacción que realiza el ciclo 20 veces amplifica la secuencia diana específica un millón de veces.

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación técnica: Reacción en cadena de la polimerasa

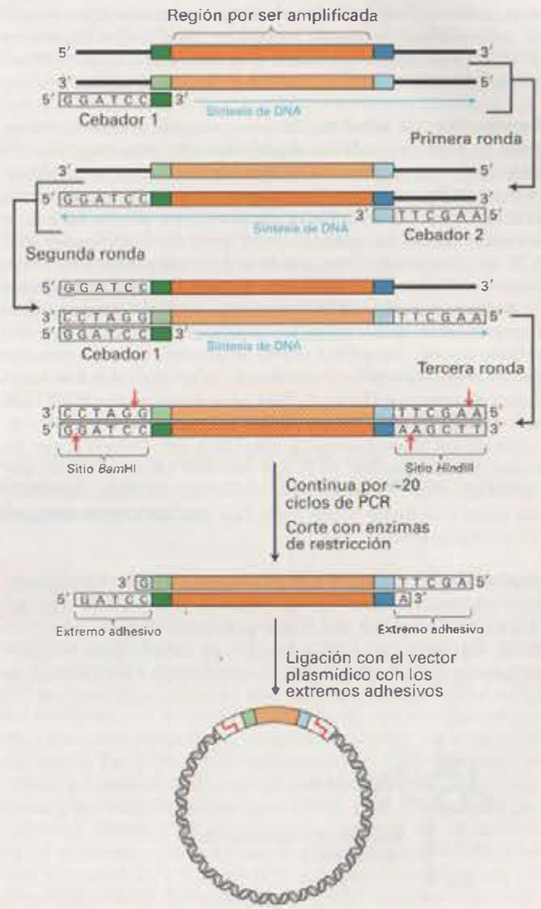
La reacción en cadena de la polimerasa amplifica una secuencia específica de DNA a partir de una mezcla compleja

Si las secuencias de nucleótidos en los extremos de una región de DNA en particular se conocen, el fragmento intermedio puede amplificarse directamente por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Aquí describimos la técnica básica de PCR y tres situaciones en las que se utiliza.

La PCR depende de la capacidad para desnaturalizar (fundir) alternativamente las moléculas de DNA de hebra doble y renaturalizar (hibridar) las hebras individuales complementarias en una forma controlada. Como en los ensayos de hibridación de membrana antes descritos, la presencia de hebras no complementarias en una mezcla tiene poco efecto sobre el apareamiento de bases de hebras de DNA simples complementarias o regiones complementarias de hebras. El segundo requisito para la PCR es la capacidad para sintetizar oligonucleótidos de al menos 18-20 nucleótidos de longitud con una secuencia definida. Tales nucleótidos sintéticos pueden producirse rápidamente con instrumentos automatizados basados en el esquema de reacción estándar mostrado en la figura 9-18.

Como se esquematizó en la figura 9-24, un procedimiento de PCR típico comienza con la desnaturalización por calor de una muestra de DNA de hebras simples. Luego, al DNA desnaturalizado se le añaden, en gran exceso, dos oligonucleótidos sintéticos complementarios a los extremos 3′ del segmento de DNA de interés y la temperatura se disminuye hasta 50-60 °C. Estos oligonucleótidos específicos, que se encuentran en una concentración muy alta, se hibridarán con sus secuencias complementarias en la muestra de DNA, mientras que las hebras largas de DNA de la muestra permanecen aparte debido a su baja concentración. Los oligonucleótidos hibridados sirven luego como cebadores para la síntesis de la cadena de DNA en presencia de desoxinucleótidos (dNTP) y una DNA polimerasa resistente a la temperatura como la proveniente de *Thermus aquaticus* (una bacteria que vive en las aguas termales). Esta enzima, denominada *Taq polimerasa*, puede permanecer activa aun después de ser calentada a 95 °C y puede extender los cebadores a temperaturas de hasta 72 °C. Cuando se completa la síntesis, toda la mezcla se vuelve a calentar a 95 °C para desnaturalizar los dúplex de DNA recién formados. Después que se vuelve a bajar la temperatura, tiene lugar otro ciclo de síntesis porque aún hay exceso de cebador. Ciclos repetidos de desnaturalización (calentamiento) y síntesis (enfriamiento) amplifican rápidamente la secuencia de interés. En cada ciclo, se duplica la cantidad de copias de la secuencia entre los sitios del cebador; por ende, la secuencia deseada se incrementa exponencialmente –alrededor de un millón de veces después de 20 ciclos– mientras que todas las otras secuencias en la muestra de DNA original permanecen sin amplificar.

Aislamiento directo de un segmento específico de DNA genómico. Para los organismos en los cuales se ha secuenciado todo o la mayor parte del genoma, la amplificación por PCR, que comienza con el total del DNA genómico, a menudo es la forma más fácil de obtener una región específica de DNA para clonar. En esta aplicación, los dos cebadores oligonucleótidos son diseñados para hibridar con las secuencias que flanquean la región genómica de interés y para incluir secuencias que sean reconocidas por enzimas de restricción específicas (fig. 9-25). Después de la amplificación de la secuencia diana deseada por alrededor de 20 ciclos de PCR, la escisión con las enzimas de restricción apropiadas produce extremos adhesivos que permiten un ligamiento eficiente de los fragmentos en un vector plasmídico escindido por las mismas enzimas de restricción en el poliligador. Los plásmidos recombinantes resultantes, todos los cuales llevan el mismo segmento de DNA genómico, pueden ser clonados



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 9-25 Una región diana específica en el DNA genómico total puede amplificarse mediante PCR para utilizarse en la clonación. Cada cebador para la PCR es complementario a un extremo de la secuencia diana e incluye la secuencia de reconocimiento para una enzima de restricción que no tiene un sitio dentro de la región diana. En este ejemplo, el cebador 1 contiene una secuencia *Bam*HI, mientras que el cebador 2 contiene una secuencia *Hind*III. (Nótese que para mayor claridad, en cualquier ciclo, se muestra la amplificación de sólo una de las dos hebras, la que está entre corchetes.) Después de la amplificación, los segmentos diana se tratan con las enzimas de restricción apropiadas y generan fragmentos con extremos adhesivos. Éstos pueden ser incorporados a plásmidos complementarios y clonados en *E. coli* por el procedimiento usual (véase fig. 9-13).

en células de *E. coli*. Con ciertos refinamientos de la PCR, los segmentos de DNA >10 kb de longitud pueden amplificarse y clonarse de esta forma.

Nótese que este método no implica la clonación de grandes cantidades de fragmentos de restricción derivados del DNA genómico y su análisis subsiguiente para identificar los fragmentos específicos de interés. De hecho, el método PCR invierte esta metodología tradicional y por ende evita sus aspectos más tediosos; además es útil para aislar secuencias génicas para ser manipuladas en diversas formas útiles descritas más adelante y puede emplearse para aislar secuencias génicas a partir de organismos mutantes a fin de determinar cómo difieren respecto de la forma de tipo silvestre.

Preparación de sondas. Ya vimos cómo se pueden sintetizar químicamente las sondas de oligonucleótidos para los análisis de hibridación. La preparación de esas sondas mediante amplificación por PCR requiere la síntesis química de sólo dos cebadores relativamente cortos correspondientes a los dos extremos de la secuencia diana. La muestra inicial para la amplificación por PCR de la secuencia diana puede ser una preparación de DNA genómico. Como alternativa, si la secuencia diana corresponde a una secuencia de mRNA madura, se puede utilizar como fuente de DNA molde un grupo completo de cDNA celular sintetizado a partir del mRNA celular total empleando la transcriptasa inversa u obtenido al combinar cDNA de todos los clones en una genoteca de cDNA λ. Para generar un producto de PCR radiomarcado, se incluyen dNTP marcados con ^{32}P durante varios de los últimos ciclos de amplificación. Debido a que las sondas preparadas por PCR son bastante largas y tienen muchos átomos de ^{32}P radiactivo incorporados a ellas, suelen dar una señal más fuerte y más específica que las sondas sintetizadas químicamente.

Marcación de genes mediante inserción de mutaciones. Otra aplicación útil de la PCR es amplificar un gen "marcador" a partir del DNA genómico de una cepa mutante. Esta técnica es un método más simple para identificar genes asociados con un fenotipo mutante particular que el screening de una genoteca por complementación funcional (véase fig. 9-20).

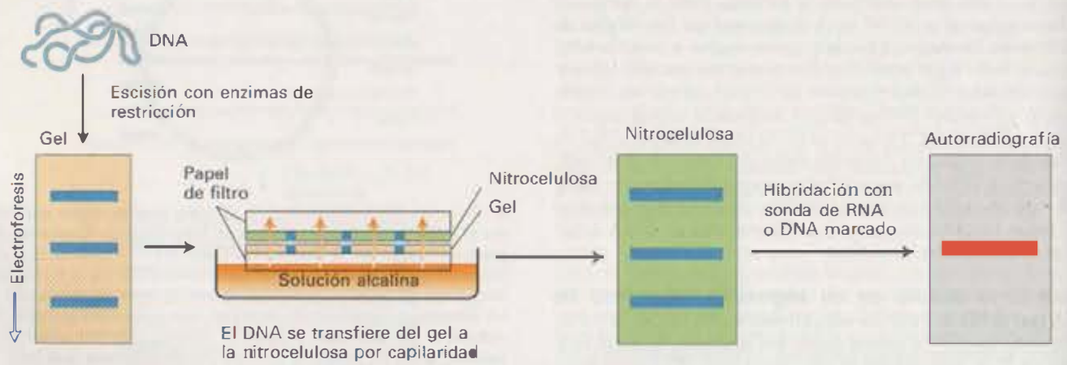
La clave para este uso de la PCR es la capacidad para producir mutaciones por inserción de una secuencia de DNA conocida en el genoma de un organismo experimental. Estas mutaciones por inserción pueden generarse por el uso de elementos de DNA móviles, los cuales pueden moverse (o transponer) de un sitio cromosómico a otro. Como se tratará con mayor detalle en el capítulo 10, estas secuencias de DNA ocurren naturalmente en los genomas de la mayoría de los organismos y pueden dar origen a mutaciones con pérdida de función si se transponen a una región codificadora de proteína.

Por ejemplo, los investigadores han modificado un elemento de DNA móvil de *Drosophila*, conocido como el elemento P, para optimizar su uso en la generación experimental de mutaciones por inserción. Una vez demostrado que la inserción de un elemento P causa una mutación con un fenotipo interesante, las secuencias genómicas adyacentes al sitio de inserción pueden amplificarse por una variación del protocolo de PCR estándar que emplea cebadores sintéticos complementarios a la secuencia conocida del elemento P, pero que permite amplificar las secuencias vecinas desconocidas. De nuevo, este enfoque evita la clonación de grandes cantidades de fragmentos de DNA y su screening para detectar un DNA clonado correspondiente a un gen mutado de interés.

Se aplicaron métodos similares a otros organismos para los cuales las mutaciones por inserción pueden generarse utilizando tanto elementos de DNA móvil como virus con genomas secuenciados que pueden insertarse aleatoriamente en el genoma.

Las técnicas de inmunotransferencia permiten la detección de fragmentos de DNA y mRNA específicos con sondas de DNA

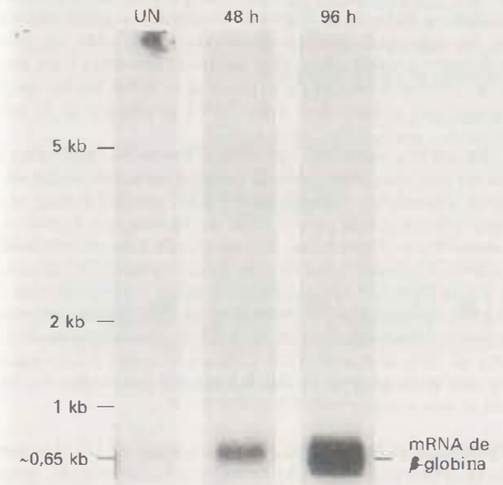
Dos métodos muy sensibles para detectar una secuencia particular de DNA o RNA dentro de una mezcla compleja combinan la separación mediante electroforesis en gel y la hibridación con una sonda de DNA complementaria marcada



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 9-26 La técnica de Southern blot puede detectar un fragmento específico de DNA en una mezcla compleja de fragmentos de restricción. El diagrama muestra tres fragmentos de restricción diferentes en el gel, pero el procedimiento se puede aplicar a una mezcla de millones de fragmentos de DNA. Sólo los fragmentos que hibridan a una sonda marcada darán una señal en un autorradiograma. Una técnica similar denominada *Northern blot* detecta mRNA específicos dentro de una mezcla. (Véase E. M. Southern, 1975, J. Mol. Biol. 98:508.)

radiactivamente. En otros capítulos encontraremos referencias a estas dos técnicas, que tienen numerosas aplicaciones.

***Southern blot* (Inmunotransferencia *Southern*)** La primera técnica de inmunotransferencia que se diseñó se conoce como *Southern blot* en honor a su creador E. M. Southern. Con esta técnica se puede detectar un único fragmento de restricción específico en una mezcla muy compleja de fragmentos producidos por la escisión de todo el genoma humano con una enzima de restricción. En esta mezcla tan compleja, muchos fragmentos tendrán la misma o casi la misma longitud y por lo tanto migrarán juntos durante la electroforesis. Aunque no todos los fragmentos se separan por completo mediante electroforesis en gel, se puede identificar un fragmento individual dentro de una de las bandas mediante hibridación con una sonda de DNA específica. Para lograrlo, los fragmentos de restricción presentes en el gel son desnaturalizados con álcali y transferidos a un filtro de nitrocelulosa o membrana de nailon por inmunotransferencia (fig. 9-26). Este procedimiento preserva la distribución de los fragmentos en el gel y crea una réplica de éste sobre el filtro, muy similar al filtro de la réplica producida a partir de clones en una genoteca λ. (La inmunotransferencia se utiliza porque las sondas no se propagan rápidamente en el gel original.) Luego se incuba el filtro en condiciones de hibridación con una sonda de DNA específica marcada radiactivamente, generada casi siempre a partir de un fragmento de restricción clonado. El fragmento de restricción de DNA que es complementario a la sonda se hibrida y su localización se revela sobre el filtro mediante autorradiografía.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 9-27 El análisis de la Northern blot revela la expresión incrementada del mRNA β-globina en las células diferenciadas de eritroleucemia. El mRNA total en los extractos de células de eritroleucemia que proliferaron, pero no fueron inducidas y de células inducidas para detener la proliferación y a las que se les permitió diferenciarse por 48 o 96 horas, se analizó mediante Northern blot para el mRNA de la β-globina. La densidad de una banda es proporcional a la cantidad de mRNA presente. El mRNA de la β-globina apenas se detecta en las células no inducidas (línea UN) pero se incrementa más de 1000 veces a las 96 horas después de que se indujo la diferenciación. (Cortesía de L. Kole.)

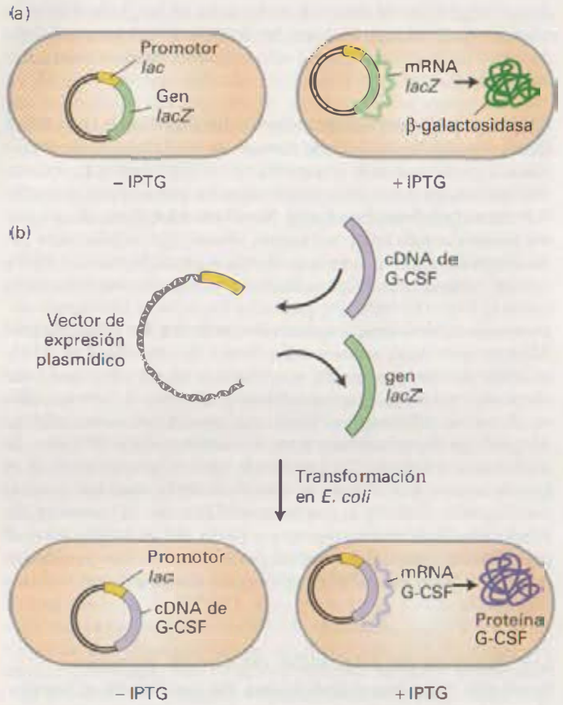
***Northern blot* (Inmunotransferencia *Northern*)** Una de las formas más básicas de caracterizar un gen clonado es determinar cuándo y dónde se expresa en un organismo. La expresión de un gen particular puede seguirse por análisis del mRNA correspondiente mediante *Northern blot*, llamado así, en un juego de palabras, en honor al método relacionado de *Southern blot* una muestra de RNA, a menudo todo el RNA celular, se desnaturaliza mediante tratamiento con un agente como el formaldehído que perturba los enlaces hidrógeno entre los pares de bases, asegurando que todas las moléculas de RNA tengan una conformación lineal desplegada. Los RNA individuales se separan de acuerdo con el tamaño mediante electroforesis en gel y se transfieren a un filtro de nitrocelulosa al cual se adhieren los RNA desnaturalizados extendidos. Al igual que en el Southern blot, a continuación el filtro se expone a una sonda de DNA marcada que es complementaria al gen de interés; por último, se somete el filtro marcado a autorradiografía. Debido a que se puede estimar la cantidad de RNA específico en una muestra a partir del *Northern blot*, el procedimiento se utiliza mucho para comparar las cantidades de un mRNA particular en células en diferentes condiciones (fig. 9-27).

Los sistemas de expresión de *E. coli* pueden producir grandes cantidades de proteínas a partir de genes clonados

MEDICINA

Muchas hormonas proteicas y otras proteínas señalizadoras y reguladoras suelen expresarse a muy bajas concentraciones, lo que imposibilita su aislamiento y purificación en grandes cantidades mediante técnicas bioquímicas estándares. El uso terapéutico generalizado de esas proteínas, al igual que la investigación básica sobre sus estructuras y funciones, depende de los procedimientos eficientes para producirlas en grandes cantidades a un costo razonable. Las técnicas de recombinación de DNA que convierten las células de *E. coli* en fábricas para sintetizar proteínas poco abundantes se usan ahora para producir comercialmente factor VIII (un factor coagulante de la sangre), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), insulina, hormona del crecimiento y otras proteínas humanas con usos terapéuticos. Por ejemplo, la G-CSF estimula la producción de granulocitos, los glóbulos blancos fagocíticos críticos para la defensa contra las infecciones bacterianas. La administración de G-CSF a los pacientes con cáncer ayuda a contrarrestar la reducción en la producción de granulocitos causada por los agentes quimioterapéuticos y protege a los pacientes contra infecciones serias mientras reciben este tratamiento. ▮

El primer paso en la producción de grandes cantidades de una proteína de poca abundancia es obtener un clon de cDNA que codifique la proteína en toda su longitud mediante los métodos tratados anteriormente. El segundo paso es diseñar vectores plasmídicos que expresarán grandes cantidades de la proteína codificada cuando se los inserte en las células de *E. coli*. La clave para designar tales vecto-



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 9-28 Algunas proteínas eucariontes pueden ser producidas en células de *E. coli* a partir de vectores plasmídicos que contienen el promotor *lac*. (a) El vector de expresión plasmídico contiene un fragmento del cromosoma de *E. coli* que contiene el promotor *lac* y el gen *lacZ* contiguo. En presencia del análogo de lactosa IPTG, la RNA polimerasa normalmente transcribe el gen *lacZ* y produce mRNA *lacZ*, el cual se traduce a la proteína codificada, β-galactosidasa. (b) El gen *lacZ* puede ser eliminado del vector de expresión con enzimas de restricción y reemplazado por un cDNA clonado, en este caso uno que codifica el factor de estimulación de colonia de granulocitos (G-CSF). Cuando el plásmido resultante se transforma en las células de *E. coli*, la adición de IPTG y la transcripción subsiguiente del promotor *lac* producen mRNA G-CSF, que es traducido a la proteína G-CSF.

res de expresión es la inclusión de un promotor, una secuencia de DNA a partir de la cual puede comenzar la transcripción del cDNA. Consideremos, por ejemplo, el sistema relativamente simple para expresar el G-CFS mostrado en la figura 9-28. En este caso el G-CSF se expresa en *E. coli* transformada con los plásmidos que contienen el promotor *lac* adyacente al cDNA clonado que codifica al G-CSF. La transcripción a partir del promotor *lac* tiene lugar a altas velocidades sólo cuando se agrega lactosa o un análogo de la lactosa como el isopropiltiogalactósido (IPTG) al medio de cultivo. Se pueden producir cantidades aún mayores de una proteína deseada en sistemas de expresión más complicados que el de *E. coli*.

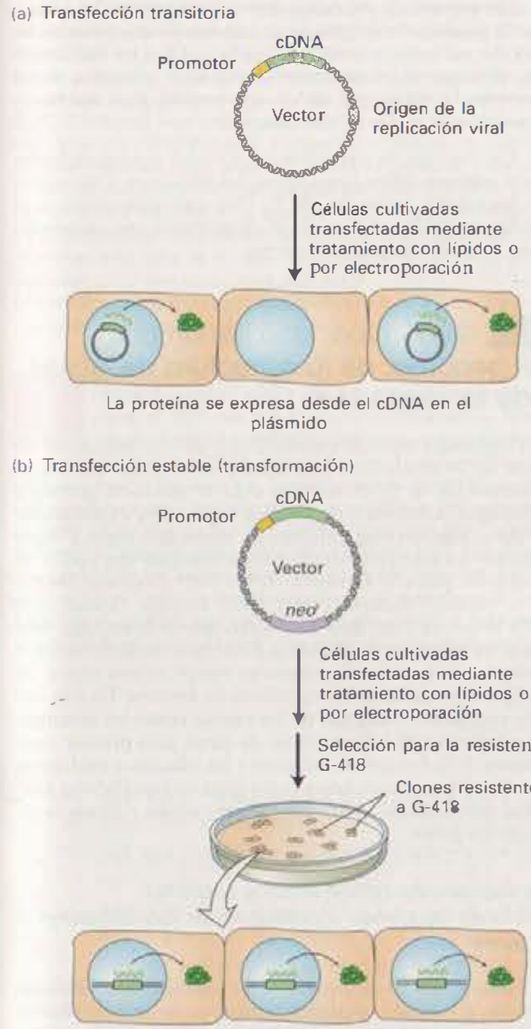
Para ayudar en la purificación de una proteína eucarionte producida en un sistema de expresión de *E. coli*, los investigadores a menudo modifican el cDNA que codifica la proteína recombinante para facilitar su separación de las proteínas endógenas de *E. coli*. Una modificación de este tipo utilizada a menudo es añadir una secuencia corta de nucleótidos al extremo del cDNA, de manera que la proteína expresada tenga seis residuos de histidina en el C-terminal. Las proteínas modificadas de esta forma se unen con fuerza a una matriz de afinidad que contiene átomos de níquel quelados, mientras que la mayoría de las proteínas de *E. coli* no se unirán a esa matriz. Las proteínas unidas pueden liberarse de los átomos de níquel si se disminuye el pH del medio circundante. En la mayoría de los casos, este procedimiento produce una proteína recombinante pura que es funcional, puesto que la adición de secuencias cortas de aminoácidos al extremo C o al N de una proteína no suele interferir en la actividad bioquímica de la proteína.

Los vectores de expresión plasmídicos pueden diseñarse para utilizarlos en células animales

Una desventaja de los sistemas de expresión bacterianos es que muchas proteínas eucariontes sufren diversas modificaciones (p. ej., glucosilación, hidroxilación) después de su síntesis sobre los ribosomas (cap. 3). Estas modificaciones postraduccionales suelen ser necesarias para el funcionamiento celular normal, pero no pueden ser introducidas por las células de *E. coli*, que carecen de las enzimas necesarias. Para superar esta limitación, los genes clonados son introducidos en células animales cultivadas, un proceso llamado transfección. Dos métodos comunes para transfectar células animales difieren en si el DNA vector recombinante está integrado o no al DNA genómico de la célula huésped.

En ambos métodos, las células animales cultivadas deben ser tratadas para facilitar la incorporación inicial de un vector plasmídico recombinante. Esto puede hacerse al exponer células a una preparación de lípidos que penetran en la membrana plasmática, incrementando su permeabilidad al DNA. En forma alternativa, puede aplicarse a las células un pulso eléctrico breve de varios miles de voltios, una técnica conocida como *electroporación*, que las hace transitoriamente permeables al DNA. El DNA plasmídico suele añadirse en una concentración suficiente como para asegurar que una gran proporción de las células cultivadas reciba al menos una copia.

Transfección transitoria. El más simple de los dos métodos de expresión, llamado *transfección transitoria*, emplea un vector similar a los vectores lanzaderas de levadura ya descritos. Para usarlos en las células de los mamíferos, los plásmidos son también diseñados para tener un origen de replicación derivado de un virus que infecta esas células, un promotor fuerte reconocido por la RNA polimerasa de mamíferos y el cDNA clonado, que codifica la proteína por ser expresada, adyacente al promotor (fig. 9-29a). Una vez que ese plásmido penetra en una célula de mamífero, el origen de replicación viral le permite replicarse con eficiencia, lo que genera numerosos plásmidos a partir de los cuales se expresa la proteína. Sin embargo, durante la división celular esos plásmidos no son segregados fielmente en ambas células hijas y con el tiempo, una fracción sustancial de las



◀ FIGURA EXPERIMENTAL 9-29 La transfección estable y transitoria con plásmidos especialmente diseñados permite la expresión de genes clonados en células animales cultivadas. Ambos métodos emplean vectores plasmídicos que contienen los elementos usuales –ORI, marcador de selección (p. ej., *amp^r*), y un poliligador– que permite la propagación en *E. coli* y la inserción de un cDNA clonado con un promotor animal adyacente. Para mayor simplicidad, no se representan estos elementos. (a) En la transfección transitoria, el vector plásmido contiene un origen de replicación para un virus que puede replicar en las células animales cultivadas. Puesto que el vector no está incorporado al genoma de la célula cultivada, la producción de la proteína codificada en el cDNA continúa sólo por un tiempo limitado. (b) En la transfección estable, el vector transporta un marcador de selección como el *neo^r*, el cual confiere resistencia al G-418. Las relativamente pocas células animales transfectadas que integran el DNA exógeno en sus genomas son seleccionadas en un medio que contiene G-418. Estas células establemente transfectadas, o transformadas, continuarán produciendo la proteína codificada en el cDNA mientras se mantenga el cultivo. Para profundizar véase el texto.

células en un cultivo no contendrán el plásmido, de ahí el nombre de *transfección transitoria*.

Transfección estable (transformación). Si un vector introducido se integra en el genoma de la célula huésped, el genoma se altera de manera permanente y se dice que la célula está *transformada*. La integración la logran más probablemente las enzimas de mamíferos que suelen funcionar en la reparación y recombinación del DNA. Debido a que la integración es un suceso raro, los vectores de expresión plasmídicos diseñados para transformar células animales deben tener un marcador de selección para identificar las fracciones pequeñas de células que integran el DNA plasmídico. Un marcador de selección utilizado con frecuencia es el gen de la neomicina fosfotransferasa (designada *neo^r*), que confiere resistencia a un compuesto tóxico químicamente relacionado con la neomicina conocido como G-418. El procedimiento básico para expresar un cDNA clonado mediante *transfección estable* se esquematiza en la figura 9-29b. Sólo las células que han integrado el vector de expresión en el cromosoma huésped sobrevivirán y darán origen a un clon en presencia de una alta concentración de G-418. Como la integración ocurre en sitios aleatorios en el genoma, los clones individuales transformados, resistentes al G-418, diferirán en las velocidades de transcripción del cDNA insertado. Por lo tanto, los transfectantes estables suelen ser rastreados para identificar a los que producen la proteína de interés en los niveles más altos.

Marcación con epítopos. Además de su empleo en la producción de proteínas que son modificadas después de la traducción, los vectores de expresión eucariontes proveen una forma fácil de estudiar la localización intracelular de las proteínas eucariontes. En este método, un cDNA clonado es modificado al fusionarlo a una secuencia corta de DNA que codifica una secuencia de aminoácidos reconocida por un anticuerpo monoclonal conocido. Este péptido corto que es unido por un anticuerpo se denomina epítopo; en consecuencia este método se conoce como *marcación con epítopos*. Después de la transfección con un vector de expresión plasmídico que contiene el cDNA fusionado, la expresión de la forma de la proteína marcada con epítopo puede detectarse por marcación con inmunofluorescencia de las células con el anticuerpo monoclonal específico para el antiepítopo. En la figura 9-30 se ilustra el uso de este método para localizar las proteínas adaptadoras AP1, que participan en la formación de vesículas recubiertas de clatrina involucradas en el tráfico intracelular de proteínas (cap. 17). La marcación con epítopo de una proteína para que sea detectable con un anticuerpo monoclonal disponible evita la lenta tarea de producir un nuevo anticuerpo monoclonal específico para la proteína natural.



AP1 Furina Combinadas

▲ FIGURA EXPERIMENTAL 9-30 La marcación con epítopos facilita la localización celular de proteínas expresadas a partir de genes clonados. En este experimento, el cDNA clonado que codifica una subunidad de la proteína adaptadora AP1 fue modificado mediante la adición de una secuencia que codifica un epítopo para un anticuerpo monoclonal conocido. Los vectores de expresión plasmídico, similares a los que se muestran en la figura 9-29, fueron construidos para contener el cDNA AP1 marcado con el epítopo. Luego de que las células fueran transfectadas y se les permitió expresar la versión de la proteína AP1 marcada con el epítopo, se fijaron y marcaron con anticuerpo monoclonal contra el epítopo y con un anticuerpo contra furina, una proteína marcadora para las membranas endosómica y de Golgi tardío. La adición de un segundo anticuerpo marcado con fluorescencia verde específico contra el anticuerpo antiepítopo visualizó la proteína AP1 (*izquierda*). Otro anticuerpo secundario con una señal fluorescente diferente (rojo) se empleó para visualizar la furina (*centro*). La colocalización de la AP1 marcada con epítopo y la furina en el mismo compartimiento intracelular es evidente cuando las dos señales fluorescentes se combinan (*derecha*) (Cortesía de Ira Mellman, Yale University School of Medicine.)

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 9.3

Caracterización y uso de fragmentos clonados de DNA

- Los fragmentos clonados largos de DNA a menudo son escindidos con enzimas de restricción y producen fragmentos más pequeños que luego son separados por electroforesis en gel y subclonados en plásmidos antes de la secuenciación o la manipulación experimental.
- Los fragmentos de DNA de hasta 500 nucleótidos de largo suelen ser secuenciados en instrumentos automáticos basados en el método didesoxi de Sanger (terminación de cadena) (véase fig. 9-23).
- La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la amplificación exponencial de un segmento específico de DNA a partir de una única molécula de DNA molde inicial si se conoce la secuencia que flanquea la región de DNA por ser amplificada (véase fig. 9-24).
- El *Southern blot* puede detectar un único fragmento de DNA específico dentro de una mezcla compleja al combinar la electroforesis en gel, la transferencia (*blot*) de las bandas separadas a un filtro y la hibridación con una sonda de DNA radiomarcada complementaria (véase fig. 9-26). La técnica similar de *Northern blot* detecta un RNA específico dentro de una mezcla.
- Los vectores de expresión derivados de plásmidos permiten la producción de grandes cantidades de una proteína de interés una vez que un cDNA que la codifica ha sido clonado. El rasgo único de estos vectores es la presencia de un promotor fusionado al cDNA que permite altos niveles de transcripción en las células huésped.
- Los vectores de expresión eucariontes pueden utilizarse para expresar genes clonados en las levaduras o en células de mamíferos (véase fig. 9-29). Una aplicación importante de estos métodos es el marcado de proteínas con un epítopo para la detección por anticuerpos.

9.4 Genómica: análisis amplio del genoma, de la estructura de genes y de la expresión

Empleando técnicas especializadas de recombinación de DNA, los investigadores han determinado vastas cantidades de secuencias de DNA incluida toda la secuencia genómica de los seres humanos y de muchos organismos experimentales clave. Este enorme volumen de datos que crece a ritmo acelerado ha sido almacenado y organizado en dos bancos de datos principales: el GenBank de los NIH (National Institutes of Health), Bethesda, Maryland, Estados Unidos, y el EMBl Sequence Data Base en el Laboratorio de Biología Molecular en Heidelberg, Alemania. Estos bancos de datos intercambian continuamente secuencias recién informadas y las ponen a disposición de los científicos en Internet. En esta sección, examinamos algunas de las formas cómo los investigadores utilizan este valioso tesoro de datos para proveer comprensión de la función de los genes y las relaciones evolutivas, para identificar nuevos genes cuyas proteínas codificadas nunca han sido aisladas y para determinar cuándo y dónde se expresan los genes.

Las secuencias almacenadas sugieren funciones de genes y proteínas de identificación reciente

Como se vio en el capítulo 3, las proteínas con funciones similares a menudo contienen secuencias de aminoácidos similares que corresponden a importantes dominios funcionales en la estructura tridimensional de las proteínas. Mediante la comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por un gen recientemente clonado con la secuencia de proteínas de función conocida, un investigador puede buscar similitudes en las secuencias que proporcionen claves acerca de la función de la proteína codificada. Debido a la degeneración en el código genético, las proteínas relacionadas siempre exhiben mayor similitud en las secuencias que los genes que las codifican. Por esta razón, se comparan las secuencias de proteínas en lugar de las secuencias de DNA correspondientes.

El programa de computación empleado con este propósito es conocido como BLAST (*b*asic *l*ocal *a*lignment *s*earch *t*ool). El algoritmo BLAST divide la secuencia de la nueva proteína (conocida como la *secuencia consultada; "query"*) en segmentos más cortos y luego busca en la base de datos coincidencias significativas con cualquiera de las secuencias almacenadas. El programa de coincidencias asigna un puntaje alto a los aminoácidos que coinciden idénticamente y un puntaje más bajo a coincidencias entre aminoácidos que son relacionados (p. ej., hidrófobos, polares, cargados positivamente, cargados negativamente). Cuando se encuentra una coincidencia significativa para un segmento, el algoritmo BLAST buscará localmente para extender la región de similitud. Una vez completada la búsqueda, el programa clasifica las coincidencias entre la proteína de averiguación y diversas proteínas conocidas de acuerdo con sus *valores p*. Este parámetro es una medida de la probabilidad de hallar ese grado de similitud entre dos secuencias de proteínas por casualidad. Mientras más bajo es el valor *p*, mayor es la similitud de secuencias entre dos secuencias. Un valor *p* menor de 10^{-3} suele considerarse una evidencia significativa de que dos proteínas comparten un ancestro común.

MEDICINA

Para ilustrar el poder de esta técnica, consideraremos el *NF1*, un gen humano identificado y clonado mediante los métodos descritos en este capítulo. Las mutaciones en el *NF1* se asocian con la enfermedad hereditaria neurofibromatosis 1, en la cual se desarrollan múltiples tumores en el sistema nervioso periférico que provocan grandes protuberancias en la piel (el síndrome del "hombre elefante"). Después que el clon de cDNA de *NF1* fue aislado y secuenciado, la secuencia deducida de la proteína *NF1* se comparó con todas las demás secuencias de proteínas del GenBank. Se descubrió que una región de la proteína *NF1* tiene una homología considerable con una porción de la proteína de levadura denominada Ira (fig. 9-31). Estudios previos mostraron que Ira es una proteína aceleradora de la GTPasa (GAP) que modula la actividad GTPasa de la proteína G monomérica llamada Ras (véase fig. 3-E). Como analizaremos en detalle en los capítulos 14 y 15, en condiciones normales las proteínas GAP y Ras tienen la función de controlar la replicación y la diferenciación celular en respuesta a señales de las células vecinas. Los estudios funcionales sobre la proteína normal NF1, obtenida mediante expresión del gen de tipo silvestre clonado, mostraron que efectivamente regulaba la actividad de Ras, como lo sugería su homología con Ira. Estos hallazgos sugieren que los individuos con neurofibromatosis expresan una proteína NF1 mutante en las células del sistema nervioso periférico, lo que conduce a la división celular considerable y a la formación de los tumores característicos de esta enfermedad. ▮

Aun cuando una proteína no muestre una similitud significativa con otras proteínas con el algoritmo BLAST puede, no obstante, compartir una secuencia corta funcionalmente importante con otras proteínas. Estos segmentos cortos recurrentes en muchas proteínas diferentes, denominados motivos, suelen cumplir funciones similares. Varios de tales motivos se describen en el capítulo 3 (véase fig. 3-6). Para buscar éstos y otros motivos en una proteína, los investigadores comparan la secuencia de la proteína consultada con una base de datos de secuencias de motivos conocidas. En el cuadro 9-2 se resumen varios de los motivos más comunes.



▲ Fig. 9-31. Comparación de las regiones de la proteína NF1 humana y la proteína Ira de *S. cerevisiae* que muestra una similitud significativa en la secuencia. Las secuencias de la NF1 y la Ira se muestran en las líneas superiores e inferiores de cada columna, respectivamente, en el código de los aminoácidos de una letra (véase fig. 2-13). Los aminoácidos que son idénticos en las dos proteínas se resaltan en amarillo. Los aminoácidos con cadenas laterales químicamente similares, pero no idénticas están conectados por un punto azul. Los números de los aminoácidos en las secuencias proteicas se muestran en los extremos derecho e izquierdo de cada columna. Los puntos indican "brechas" en la secuencia proteica insertada de manera tal de maximizar el alineamiento de los aminoácidos homólogos. El valor *p* del BLAST para estas dos secuencias es 10^{-28}, lo que indica un alto grado de similitud. (De Xu et al., 1990, Cell 62:599.)

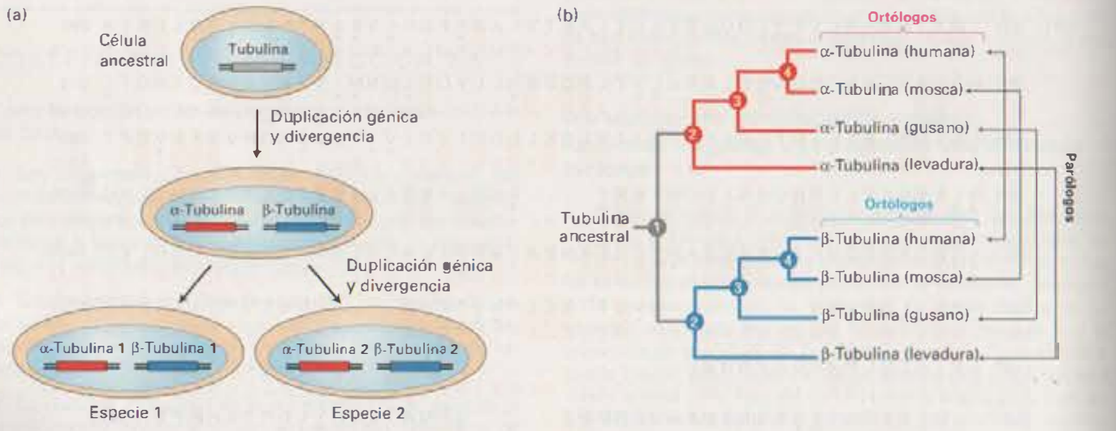
CUADRO 9-2 Motivos de secuencias proteicas

Nombre	Secuencia*	Función
De unión a ATP/GTP	[A,G]-X_4-G-K-[S,T]	Residuos dentro de un dominio de unión a nucleótido que contactan el nucleótido
Sitio de unión a grupo prenilo	C-Ø-Ø-X (C-terminal)	Secuencia C-terminal covalentemente unida a lípidos isoprenoides en algunas proteínas ancladas a lípidos (p. ej., Ras)
Dedo de cinc (tipo C_2H_2)	C- X_{2-4}-C- X_3-Ø-X_8-H-X_{3-5}-H	Secuencia de unión a Zn^{2+} dentro de dominios de unión a DNA o RNA de algunas proteínas
Caja DEAD	$Ø_2$-D-E-A-D-[R,K,E,N]-Ø	Secuencia presente en muchas helicasas de RNA dependientes de ATP
Repetición heptad	$(Ø\text{-}X_2\text{-}Ø\text{-}X_3)_n$	Secuencia repetida en proteínas que forman estructuras de espiral enrollada.

*Abreviaturas de aminoácidos de una sola letra utilizadas para secuencias (véase fig. 2-13). X: cualquier residuo; Ø: residuos hidrófobos. Los corchetes contienen residuos alternativos permisibles.

La comparación de secuencias relacionadas de especies diferentes puede otorgar claves acerca del parentesco evolutivo entre proteínas

La búsqueda con BLAST de secuencias de proteínas emparentadas puede revelar que las proteínas pertenecen a una **familia de proteínas.** (Los genes correspondientes constituyen una familia de genes.) Se piensa que las familias de proteínas surgen por dos tipos de procesos evolutivos diferentes, la *duplicación de genes y la especiación*, tratadas en el capítulo 10. Consideremos, por ejemplo, la familia de proteínas tubulina, que constituye las subunidades básicas de los microtúbulos. De acuerdo con el esquema simplificado en la figura 9.32a, se piensa que las células eucariontes más antiguas contenían un único gen de



▲ Fig. 9-32. Generación de las diversas secuencias de tubulina durante la evolución de los eucariontes. (a) Probables mecanismos que dieron origen a los genes de tubulina hallados en especies existentes. Es posible deducir que un evento de duplicación de genes tuvo lugar antes de la especiación porque las secuencias de α-tubulina de diferentes especies (p. ej., seres humanos y levaduras) son más semejantes que las secuencias de α-tubulina y β-tubulina dentro de una especie. (b) Árbol filogenético que representa las relaciones entre las secuencias de tubulina. Los puntos (nodos), indicados por números pequeños, representan genes comunes ancestrales en el tiempo en que dos secuencias divergieron. Por ejemplo, el nodo 1 representa el evento de duplicación que dio origen a las familias α-tubulina y β-tubulina, y el nodo 2 representa la divergencia de levaduras de especies multicelulares. Las llaves y flechas indican, respectivamente, los genes de tubulina ortólogos, que difieren como resultado de la especiación, y los genes parálogos, que difieren como resultado de la duplicación de genes. Este diagrama está simplificado porque cada una de las especies representadas contiene en realidad múltiples genes de α-tubulina y β-tubulina que surgieron de eventos posteriores de duplicación de genes.

tubulina que fue duplicado tempranamente en la evolución; la divergencia subsiguiente de las distintas copias del gen de tubulina original formó la versión ancestral de los genes de α y β-tubulina. A medida que las distintas especies divergieron a partir de estas antiguas células eucariontes, cada una de estas secuencias de genes divergió más aún y dio origen a las formas algo diferentes de α y β-tubulina halladas ahora en cada especie.

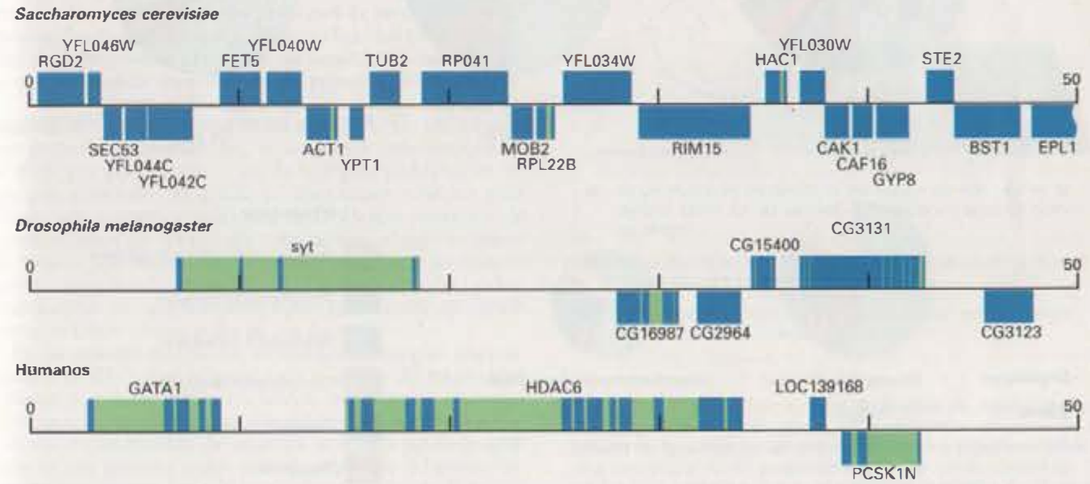
Todos los diferentes miembros de la familia de la tubulina son lo suficientemente similares en la secuencia como para sugerir una secuencia ancestral común. Por ende, todas estas secuencias se consideran *homólogas*. Más específicamente, las secuencias que tal vez divergieron como resultado de la duplicación de genes (p. ej., las secuencias α y β-tubulina) se describen como *parálogas*. Las secuencias que surgieron debido a la especiación (p. ej., los genes de α-tubulina en especies diferentes) se describen como *ortólogas*. A partir del grado de parentesco de las secuencias de las tubulinas presentes en diferentes organismos hoy, es posible deducir las relaciones evolutivas, como se ilustra en la figura 9-32b. De los tres tipos de secuencias relacionadas, las secuencias ortólogas son las que más probablemente comparten la misma función.

Los genes pueden identificarse dentro de secuencias del DNA genómico

La secuencia genómica completa de un organismo contiene la información necesaria para deducir la secuencia de cada proteína hecha por las células de ese organismo. Para organismos como las bacterias y las levaduras, cuyos genomas poseen pocos intrones y regiones intergénicas cortas, la mayoría de las secuencias que codifican proteínas pueden hallarse simplemente rastreando la secuencia genómica en busca de marcos abiertos de lectura (**ORF**) de longitudes significativas. Un ORF suele definirse como un tramo de DNA que contiene al menos 100 codones que comienzan con un codón de inicio y finalizan con un codón de terminación. Como la probabilidad de que una secuencia aleatoria de DNA no contenga ningún codón de terminación por cada 100 codones seguidos es muy pequeña, la mayoría de los ORF codifican una proteína.

Los análisis de los ORF identifican correctamente más del 90% de los genes en la levadura y las bacterias. Algunos de los genes más cortos son salteados por este método, y surgen por casualidad los marcos abiertos de lectura ocasionalmente largos que no son en realidad genes. Ambos tipos de tareas fallidas pueden corregirse mediante análisis más sofisticados de la secuencia y por pruebas genéticas para la función de los genes. De los genes de *Saccharomyces* identificados de esta manera, alrededor de la mitad ya eran conocidos por algunos criterios funcionales como el fenotipo mutante. Las funciones de algunas de las proteínas codificadas por los genes putativos restantes identificados mediante el análisis ORF se asignaron sobre la base de la similitud de su secuencia con la de proteínas conocidas en otros organismos.

La identificación de genes en organismos con una estructura genómica más compleja requiere algoritmos más sofisticados que la búsqueda por marcos de lectura abiertos. En la figura 9-33 se comparan los genes identificados en un segmento representativo de 50 kb de los genomas de levadura, *Drosophila* y humanos. Debido a que la mayoría de los genes en los cucariontes superiores, incluidos los humanos y *Drosophila*, están compuestos de múltiples regiones codificadoras relativamente cortas (exones) separadas por regiones



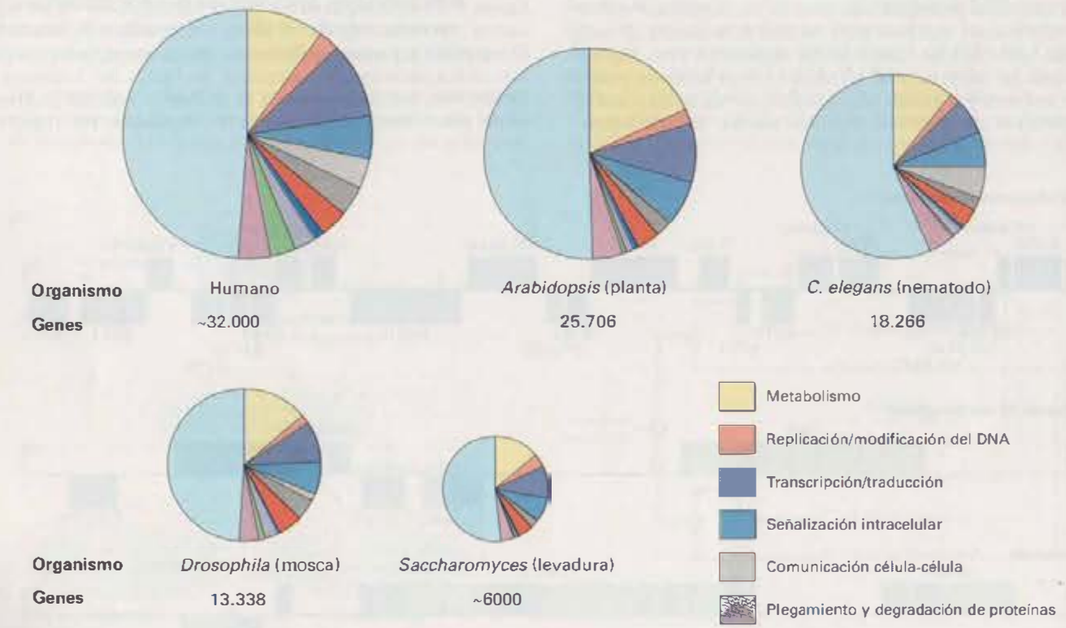
▲ Fig. 9-33. Disposición de secuencias de genes en segmentos de 50 kb de los genomas representativos de la levadura, de la mosca de la fruta y de los seres humanos. Los genes por encima de la línea son transcriptos hacia la derecha; los genes bajo la línea son transcriptos hacia la izquierda. Los bloques azules representan exones (secuencias codificadoras); los bloques verdes representan intrones (secuencias no codificadoras). Como los genes de levadura contienen pocos o ningún intrón, el screening de secuencias genómicas en busca de marcos abiertos de lectura (ORF) identifica correctamente la mayoría de las secuencias génicas. Por el contrario, los genes de los eucariontes de orden superior comprenden múltiples exones separados por intrones. El análisis ORF no es eficaz para identificar genes en estos organismos. Las secuencias génicas probables para las cuales no hay datos funcionales disponibles se designan con nombres numéricos: en la levadura, éstos comienzan con Y; en *Drosophila* con CG; y en los seres humanos, con LOC. Los otros genes aquí mostrados codifican proteínas con funciones conocidas.

no codificadoras (intrones), el rastreo en busca de los ORF es un método malo para hallar genes. Los mejores algoritmos de hallazgo de genes combinan todo los datos disponibles que pueden sugerir la presencia de un gen de un sitio genómico en particular. Los datos relevantes incluyen el alineamiento o la hibridación con un cDNA de longitud completa; el alineamiento con una secuencia de cDNA en particular, casi siempre de 200-400 bp de longitud, conocida como marca de expresión de secuencia *(expressed sequence tag, EST)*; la adaptación a modelos para los exones, los intrones y las secuencias de sitios de corte y empalme; y la similitud de secuencia con otros organismos. Empleando estos métodos, los biólogos computacionales identificaron unos 35.000 genes en el genoma humano, aunque para alrededor de 10.000 de estos genes putativos aún no existe evidencia concluyente de que realmente codifican proteínas o RNA.

Un método muy poderoso para identificar genes humanos es comparar la secuencia genómica humana con la del ratón. Los seres humanos y los ratones están suficientemente emparentados como para tener la mayoría de los genes en común; sin embargo, las secuencias de DNA mayormente no funcionales, como las regiones intergénicas y los intrones, tenderán a ser muy diferentes ya que no se hallan bajo una presión selectiva fuerte. Por esto, es probable que los segmentos correspondientes del genoma humano y del ratón que exhiben alta similitud en la secuencia sean regiones de codificación funcional (es decir, exones).

El tamaño del genoma de un organismo no está directamente relacionado con su complejidad biológica

La combinación del secuenciamiento genómico y los algoritmos computacionales de hallazgo de genes produjeron el inventario completo de genes codificadores de proteínas para diversos organismos. En la figura 9-34 se muestra el número total de genes codificadores de proteínas en varios genomas eucariontes que han sido secuenciados por completo. Las funciones de alrededor de la mitad de las proteínas codificadas en estos genomas son conocidas o se predijeron sobre la base de la comparación de secuencias. Uno de los rasgos sorprendentes de esta comparación es que el número de genes codificadores de proteínas dentro de diferentes organismos no parece proporcional a nuestro sentido intuitivo de su complejidad biológica. Por ejemplo, el nematodo *C. elegans* parece tener más genes que la mosca de la fruta *Drosophila*, cuyo diseño corporal o su comportamiento son mucho más



▲ Fig. 9-34. Comparación del número y los tipos de proteínas codificadas en los genomas de diferentes eucariontes. Para cada organismo, el área del gráfico de torta representa el número total de genes codificadores de proteínas, todos mostrados aproximadamente a la misma escala. En la mayoría de los casos, las funciones de las proteínas codificadas por alrededor de la mitad de los genes todavía se desconocen (celeste). Las funciones del resto son conocidas o se predijeron por similitud de secuencias con genes de función conocida (Adaptado de International Human Genome Sequencing Consortium, 2001, Nature 409:860.)

complejos. Y los seres humanos tienen menos del doble del número de genes de *C. elegans*, lo que es inexplicable dadas las enormes diferencias entre ambos.

Sin duda, las simples diferencias cuantitativas en los genomas de organismos diferentes son inadecuadas para explicar la diversidad de la complejidad biológica. Sin embargo, varios fenómenos pueden generar mayor complejidad en las proteínas expresadas de los eucariontes superiores de las predichas a partir de sus genomas. Primero, el corte y empalme alternativo de un pre-mRNA puede producir múltiples mRNA correspondientes a un gen particular (cap. 12). Segundo, las variaciones en la modificación postraduccional de algunas proteínas pueden producir diferencias funcionales. Por último, las diferencias cualitativas en las interacciones entre proteínas y su integración pueden contribuir significativamente a las diferencias en la complejidad biológica entre los organismos. Las funciones específicas de muchos genes y proteínas identificados mediante el análisis de las secuencias genómicas aún no han sido determinadas. A medida que los investigadores desentrañen las funciones de proteínas individuales en diferentes organismos y detallen más sus interacciones, emergerá una comprensión más sofisticada de las bases genéticas de los sistemas biológicos complejos.

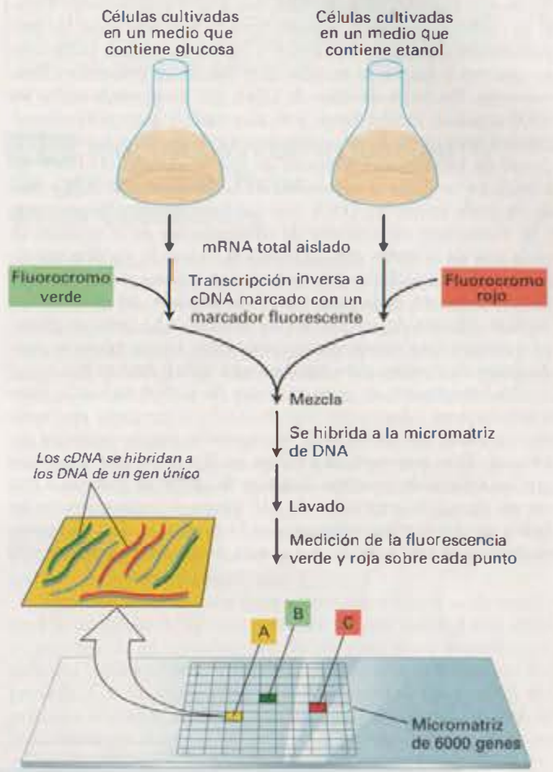
Las micromatrices de DNA pueden utilizarse para evaluar la expresión de muchos genes de una vez

El monitoreo simultáneo de la expresión de miles de genes es posible con el análisis de **micromatrices de DNA** (DNA *microarrays*). Una micromatriz de DNA consiste en miles de secuencias específicas de genes individuales estrechamente comprimidas adheridas a la superficie de un portaobjetos de vidrio para microscopio. Al acoplar los análisis de micromatrices con los resultados de los proyectos de secuenciación de genomas, los investigadores pueden analizar los patrones globales de la expresión génica de un organismo durante respuestas fisiológicas específicas o de procesos del desarrollo.

Preparación de micromatrices de DNA. En un método para preparar micromatrices, se amplifica individualmente por PCR una porción de ≈1 kb de la región codificadora de cada gen analizado. Se utiliza un dispositivo robótico para aplicar cada muestra amplificada de DNA a la superficie de un portaobjetos de vidrio para microscopio, el cual es sometido luego a procesamientos químicos para adherir permanentemente las secuencias de DNA a la superficie de vidrio y desnaturalizarlas. Un ordenamiento típico puede contener ≈6000 puntos de DNA en una grilla de 2 × 2 cm.

En un método alternativo, se sintetizan múltiples oligonucleótidos de DNA, por lo general de al menos 20 nucleótidos de longitud, a partir de un nucleótido inicial unido en forma covalente a la superficie de un portaobjetos de vidrio. La síntesis de un oligonucleótido de secuencia específica puede programarse en una pequeña región sobre la superficie del portaobjetos. De esta manera, en regiones vecinas del portaobjetos se sintetizan varias secuencias de oligonucleótidos de un único gen para analizar la expresión de ese gen. Con este método, los oligonucleótidos que representan miles de genes pueden ser producidos en un único portaobjetos de vidrio. Como los métodos para construir estos ordenamientos o disposiciones de oligonucleótidos sintéticos fueron adaptados a partir de métodos diseñados para la fabricación de circuitos integrados microscópicos utilizados en las computadoras, estos tipos de micromatrices de oligonucleótidos se denominan *chips de DNA*.

Efecto de la fuente de carbono sobre la expresión de genes en la levadura. El paso inicial en un estudio de expresión de micromatriz es preparar cDNA marcados fluorescentemente correspondiente a los mRNA expresados por las células en estudio. Cuando la preparación de cDNA se aplica



A Si un punto es amarillo, la expresión de ese gen es la misma tanto en las células cultivadas en glucosa como en etanol

B Si un punto es verde, la expresión de ese gen es mayor en las células cultivadas en glucosa

C Si un punto es rojo, la expresión de ese gen es mayor en las células cultivadas en etanol

▲ FIGURA EXPERIMENTAL 9-35 El análisis de micromatrices de DNA puede revelar diferencias en la expresión de genes en las células de levadura en distintas condiciones experimentales. En este ejemplo, el cDNA preparado a partir de mRNA aislado de células de *Saccharomyces* de tipo silvestre cultivadas en glucosa o etanol está marcado con diferentes colorantes fluorescentes. Una micromatriz compuesta de puntos de DNA que representan cada gen de levadura se expone a una mezcla igual de las dos preparaciones de cDNA en condiciones de hibridación. La relación de las intensidades en la fluorescencia roja y verde sobre cada punto, detectada con un microscopio láser confocal de barrido, indica la expresión relativa de cada gen en las células cultivadas en cada una de las fuentes de carbono. El análisis de las micromatrices también es útil para detectar diferencias en la expresión de genes entre las cepas mutantes y las de tipo silvestre.

a una micromatriz, los puntos que representan los genes que son expresados se hibridarán en condiciones apropiadas a sus cDNA complementarios y pueden luego detectarse en un microscopio láser de barrido.

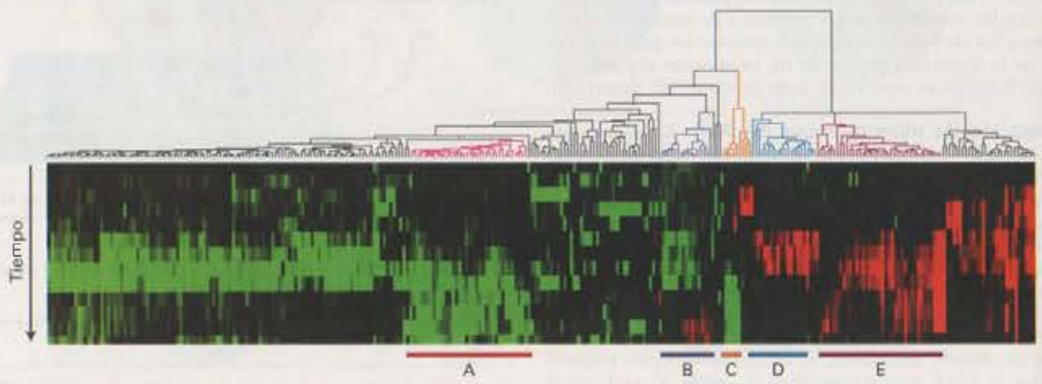
En la figura 9-35 se representa cómo puede aplicarse este método para comparar la expresión de genes en las células de levaduras que crecen sobre glucosa con el etanol como fuente de carbono y energía. En este tipo de experimentos, las preparaciones separadas de cDNA a partir de células cultivadas en glucosa y etanol se marcan con diferentes colorantes fluorescentes. Un ordenamiento de DNA que comprende todos los 6000 genes se incuba luego con una mezcla que contiene cantidades iguales de las dos preparaciones de cDNA en condiciones de hibridación. Después de que se elimina el cDNA no hibridado, se mide la intensidad de la fluorescencia roja y verde en cada punto de DNA con un microscopio fluorescente y se almacenan en archivos de computadora en el nombre de cada gen de acuerdo con su posición conocida en el portaobjetos. Las intensidades relativas de las señales rojas y verdes fluorescentes en cada punto son una medida del nivel de expresión relativo de ese gen en las células cultivadas en glucosa o etanol. Los genes que no son transcriptos en estas condiciones de crecimiento no dan una señal detectable.

La hibridación de preparaciones de cDNA marcado fluorescentemente a micromatrices de DNA proporciona un medio para analizar los patrones de la expresión génica en escala genómica. Con este tipo de análisis se demostró que a medida que las células de levadura cambian de crecer en glucosa a crecer en etanol, la expresión de 710 genes se incrementa en un factor de dos o más, mientras que la expresión de 1030 genes disminuye en un factor de dos o más. Aunque alrededor de 400 de los genes expresados diferencialmente no tienen funciones conocidas, estos resultados proporcionan la primera clave de su posible función en la biología de la levadura.

El análisis de grupos (clusters) de experimentos de expresión múltiple identifica genes corregulados

Rara vez pueden extraerse conclusiones firmes a partir de un único experimento de micromatrices acerca de si los genes que exhiben cambios similares en la expresión están corregulados y en consecuencia pueden estar relacionados funcionalmente. Por ejemplo, muchas de las diferencias observadas en la expresión génica recién descrita en la levadura que crece en glucosa o etanol podrían ser consecuencia indirecta de los numerosos cambios que tienen lugar en la fisiología celular cuando las células son transferidas de un medio a otro. En otras palabras, los genes que parecen estar corregulados en un único experimento de expresión de micromatrices pueden sufrir cambios en la expresión por muy diferentes razones y de hecho pueden tener funciones biológicas muy distintas. Una solución a este problema es combinar la información de un conjunto de experimentos de expresión de micromatrices para encontrar genes que están regulados similarmente en diversas condiciones durante un período determinado.

Este uso más informativo de los experimentos de micromatrices de expresión múltiple se ilustra mediante los cambios observados en la expresión génica después de transferir fibroblastos humanos crecidos en un medio pobre a un medio de cultivo rico que contiene suero. En un estudio, se determinó la expresión relativa de 8600 genes a diferentes tiempos después de la adición de suero, lo que generó más de 10^4 piezas



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 9-36 Los análisis de cluster (grupos) de datos de experimentos de expresión de micromatrices múltiples pueden identificar genes corregulados. En este experimento, se detectó la expresión de 8600 genes de mamíferos mediante análisis de micromatrices que a intervalos durante un período de 24 horas después de proveer suero a fibroblastos crecidos en un medio pobre. El diagrama de *clusters* que se muestra aquí está basado en un algoritmo de computadora que agrupa los genes que muestran cambios similares en la expresión comparada con una muestra control a lo largo del tiempo. Cada columna de cajas coloreadas representa un único gen, y cada fila representa un punto del tiempo. Una caja roja indica un incremento en la expresión en relación con la del control; una caja verde, una disminución en la expresión, y una caja negra, ningún cambio significativo en la expresión. El diagrama de "árbol" en la parte superior muestra cómo pueden organizarse de manera jerárquica los patrones de expresión para genes individuales para agrupar los genes con la mayor similitud en sus patrones de expresión a lo largo del tiempo. Cinco *clusters* de genes regulados coordinadamente fueron identificados en este experimento, como se indica por las barras en la parte inferior. Cada *cluster* contiene múltiples genes cuyas proteínas codificadas funcionan en un proceso celular en particular: biosíntesis del colesterol (A), ciclo celular (B), respuesta temprana inmediata (C), señalización y angiogénesis (D), y cicatrización de heridas y remodelación de tejidos (E). (Cortesía de Michael B. Eisen, Lawrence Berkeley National Laboratory.)

individuales de información. Un programa de computación, vinculado con el empleado para determinar la relación de diferentes secuencias de proteínas, puede organizar estos datos y agrupar genes que muestran una expresión similar a lo largo del tiempo tras la adición del suero. Notablemente, estos *análisis de clusters* agrupan grupos de genes cuyas proteínas codificadas participan en un proceso celular en común, como la biosíntesis del colesterol o el ciclo celular (fig. 9-36).

Puesto que los genes con patrones de regulación idénticos o similares suelen codificar proteínas funcionalmente relacionadas, el análisis de *clusters* de experimentos de expresión de micromatrices múltiples es otra herramienta para deducir las funciones de genes recién identificados. Este enfoque permite la combinación de experimentos diferentes. Cada nuevo experimento refinará el análisis, con las cohortes de genes cada vez más pequeñas se identifican como pertenecientes a *clusters* diferentes.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 9.4

Genómica: análisis amplio del genoma, de la estructura de genes y de la expresión

- La función de una proteína que no ha sido aislada a menudo puede predecirse sobre la base de las similitudes de su secuencia de aminoácidos con proteínas de funciones conocidas.
- Un algoritmo de computación conocido como BLAST busca rápidamente en las bases de datos de secuencias proteicas conocidas para hallar aquellas con una similitud significativa a una nueva proteína (consultada).
- Las proteínas con motivos funcionales en común pueden no ser identificadas en una búsqueda BLAST típica. Estas secuencias cortas pueden localizarse en búsquedas en las bases de datos de motivos.
- Una familia de proteínas comprende múltiples proteínas derivadas de la misma proteína ancestral. Los genes que codifican estas proteínas, que constituyen la correspondiente familia de genes, surgieron por un episodio inicial de duplicación de genes y la divergencia siguiente durante la evolución de las especies (véase fig. 9-32).
- Los genes emparentados y sus proteínas codificadas que derivan de un episodio de duplicación de genes son parálogas; las que derivan de la especiación son ortólogas. Las proteínas que son ortólogas suelen tener una función similar.
- Los marcos abiertos de lectura (ORF) son regiones del DNA genómico que contienen al menos 100 codones localizados entre un codón de inicio y un codón de terminación.
- La búsqueda por computadora de las secuencias genómicas completas bacterianas y de levadura para los marcos abiertos de lectura identifica correctamente la mayoría de los genes codificadores de proteínas. Se deben utilizar varios tipos de datos adicionales para identificar genes probables en las secuencias genómicas de los seres humanos y otros eucariontes superiores debido a la estructura de genes más compleja en estos organismos.
- El análisis de las secuencias genómicas completas de diferentes organismos indica que la complejidad biológica no está directamente relacionada con el número de genes codificadores de proteínas (véase fig. 9-34).
- El análisis de micromatrices de DNA detecta simultáneamente el nivel relativo de expresión de miles de genes en diferentes tipos de células o en las mismas células en diferentes condiciones (véase fig. 9-35).
- El análisis de *clusters* de datos de los experimentos de expresión de micromatrices múltiples puede identificar genes que son regulados similarmente en diversas condiciones. Estos genes corregulados suelen codificar proteínas que tienen funciones biológicas relacionadas.

9.5 Inactivación de la función de genes específicos en los eucariontes

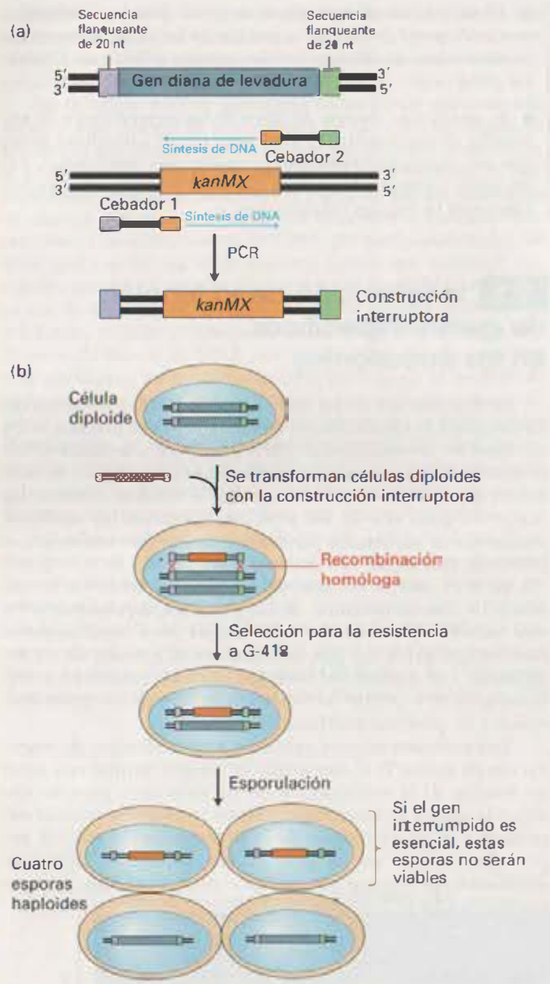
La dilucidación de las secuencias de DNA y de proteínas ha llevado a la identificación de muchos genes, utilizando los patrones de secuencia en el DNA genómico y la similitud de la secuencia de las proteínas codificadas con proteínas de funciones conocidas. Como se trató en la sección anterior, las funciones generales de las proteínas identificadas mediante búsquedas de secuencias pueden predecirse por analogía con proteínas conocidas. Sin embargo, los papeles in vivo precisos de tales proteínas "nuevas" pueden ser inciertos en ausencia de formas mutantes de los genes correspondientes. En esta sección describimos varias formas para interrumpir la función normal de un gen específico en el genoma de un organismo. Los análisis del fenotipo mutante resultante a menudo ayudan a revelar las funciones in vivo de los genes normales y su proteína codificada.

Tres enfoques básicos subyacen a estas técnicas de inactivación de genes: 1) el reemplazo de un gen normal con otras secuencias; 2) la introducción de un alelo cuya proteína codificada inhiba el funcionamiento de la proteína normal expresada y 3) la promoción de la destrucción del mRNA expresado a partir de un gen. El gen endógeno normal es modificado en técnicas basadas en el primer enfoque, pero no es modificado en los otros enfoques.

Los genes de levaduras normales pueden ser reemplazados con alelos mutantes mediante recombinación homóloga

Modificar el genoma de *Saccharomyces* es muy fácil por dos razones: las células de levaduras incorporan con rapidez el DNA exógeno en ciertas condiciones y el DNA introducido es intercambiado eficientemente por el sitio cromosómico homólogo en las células receptoras. Esta recombinación específica y focalizada de tramos de DNA idénticos permite que cualquier gen en los cromosomas de levadura sea remplazado con un alelo mutante. (Como veremos en la sección 9.6, la recombinación entre cromosomas homólogos también ocurre naturalmente durante la meiosis.)

En un conocido método para interrumpir genes de levadura de esta manera, se utiliza PCR para generar una *construcción interruptora* que contiene un marcador de selección que luego es transfectado a células de levadura. Como se muestra en la figura 9-37a, los cebadores para la amplificación por PCR del marcador de selección se designan de manera tal que incluyan alrededor de 20 nucleótidos idénticos a la secuencia que flanquea el gen de levadura a reemplazar. La construcción



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 9-37 La recombinación homóloga con construcciones interruptoras transfectadas puede inactivar genes diana específicos en la levadura. (a) Se puede preparar una construcción adecuada para interrumpir un gen diana mediante PCR. Los dos cebadores diseñados para este propósito contienen cada uno una secuencia de alrededor de 20 nucleótidos (nt) que es homóloga a un extremo del gen diana de levadura al igual que las secuencias necesarias para amplificar un segmento de DNA que lleva un gen marcador de selección como *kanMX*, el cual confiere resistencia al G-418. (b) Cuando las células diploides receptoras de *Saccharomyces* son transformadas con la construcción interruptora de genes, la recombinación homóloga entre los extremos de la construcción y las secuencias cromosómicas correspondientes integrarán el gen *kanMX* al cromosoma, reemplazando la secuencia del gen diana. Las células diploides recombinantes crecerán en un medio que contenga G-418, mientras que las células no transformadas no lo harán. Si el gen diana es esencial para la viabilidad, la mitad de las esporas haploides que se formen luego de la esporulación de células diploides recombinantes serán no viables.

amplificada resultante comprende el marcador de selección (p. ej., el gen *kanMX*, que al igual que el *neo*^{r} confiere resistencia a G-418) flanqueado por alrededor de 20 pares de bases que se aparean con los extremos del gen diana de levadura. Las células diploides transformadas de levadura en las cuales una de las dos copias del gen endógeno diana ha sido reemplazada por la construcción interruptora se identifican por su resistencia a G-418 u otro fenotipo elegible. Estas células diploides heterocigóticas de levaduras suelen crecer normalmente a pesar de la función del gen diana, pero la mitad de las esporas haploides derivadas de estas células transportarán sólo el alelo interrumpido (fig. 9-37b). Si el gen es esencial para la viabilidad, entonces las esporas que transportan el alelo interrumpido no sobrevivirán.

La interrupción de los genes de la levadura mediante este método es muy útil para la asignación del papel de las proteínas identificadas por los análisis de ORF de toda la secuencia entera del DNA genómico. Un gran grupo de investigación científica reemplazó cada uno de los cerca de 6000 genes identificados por los análisis de ORF con la construcción interruptora *kanMX* y determinó cuál interrupción de genes conduce a esporas haploides no viables. Estos análisis mostraron que alrededor de 4500 de los 6000 genes de la levadura no son necesarios para la viabilidad, un número inesperadamente grande de genes en apariencia no esenciales. En algunos casos, la interrupción de un gen en particular puede dar origen a defectos sutiles que no comprometen la viabilidad de las células de levaduras que crecen en condiciones de laboratorio. Alternativamente, las células que llevan un gen alterado pueden ser viables debido al funcionamiento de vías de soporte o compensadoras. Para investigar esta posibilidad, los genetistas están buscando mutaciones letales sintéticas que puedan revelar genes no esenciales con funciones redundantes (véase fig. 9-9c).

La transcripción de genes ligados a un promotor regulable puede controlarse experimentalmente

Aunque la interrupción de un gen esencial necesario para el crecimiento celular producirá esporas no viables, este método proporciona poca información acerca de lo que realmente hace la proteína codificada en las células. Para aprender más acerca de cómo un gen específico contribuye al crecimiento celular y a la viabilidad, los investigadores deben inactivar selectivamente el gen en una población de células en crecimiento. Un método para hacerlo emplea un promotor regulable para impedir o interrumpir selectivamente la transcripción de un gen esencial.

Un promotor útil para este propósito es el promotor *GAL1* de levadura, que está activo en las células cultivadas en presencia de galactosa, pero completamente inactivo en las células cultivadas en presencia de glucosa. En este enfoque, la secuencia codificante de un gen esencial (*X*) ligado al promotor *GAL1* se inserta en un vector lanzadera de levadura (véase fig. 9.19a). Se introduce luego el vector recombinante en las células haploides de levadura en las cuales se interrumpió el gen *X*. Las células haploides que son transformadas crecerán sobre un medio que contiene galactosa, puesto que la copia normal del gen *X* en el vector se expresa en presencia de galactosa. Cuando las células son transferidas a un medio con glucosa, el gen *X* no se transcribe más; a medida que la célula se divide, la cantidad de la proteína X codificada disminuye hasta alcanzar un estado de depleción que imita una mutación de pérdida completa de función. Los cambios

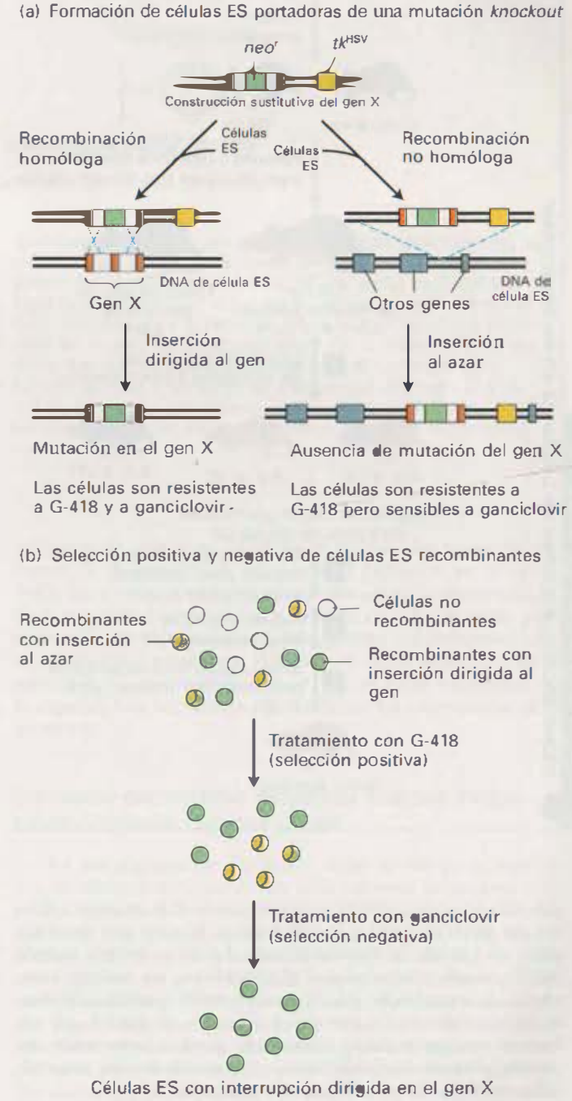
observados en el fenotipo de estas células después del cambio a un medio de glucosa pueden sugerir qué proceso celular depende de la proteína codificada por el gen esencial X.

En una aplicación inicial de este método, los investigadores exploraron la función de los genes citosólicos *Hsc70* en las levaduras. Las células haploides con una interrupción en los cuatro genes redundantes *Hsc70* fueron no viables, a menos que las células transportaran un vector que contenía una copia del gen *Hsc70* que pudiera expresarse a partir del promotor *GAL1* en un medio con galactosa. En la transferencia a un medio con glucosa, las células que llevaban vectores dejaron de crecer debido a una actividad insuficiente de Hsc70. El examen cuidadoso de estas células moribundas reveló que sus proteínas secretorias no pudieron entrar más en el retículo endoplasmático (RE). Este estudio proporcionó la primera evidencia del papel inesperado de la proteína Hsc70 en la translocación de proteínas secretorias hacia el RE, proceso que se verá en detalle en el capítulo 16.

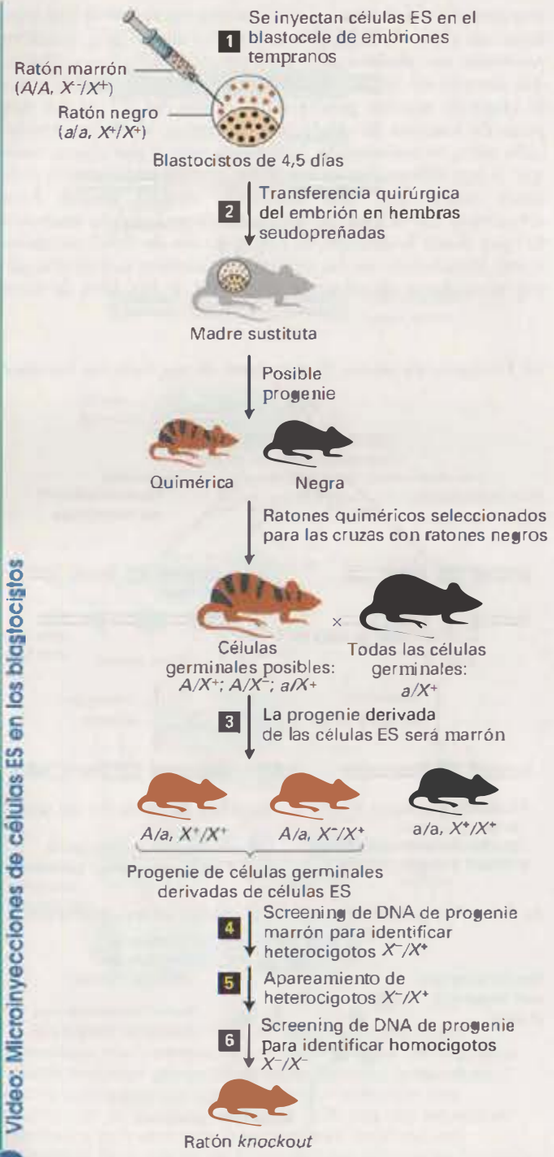
Se pueden inactivar permanentemente genes específicos en la línea germinal de ratones

Muchos de los métodos para inactivar genes de levadura pueden aplicarse a genes de eucariontes superiores. Estos genes pueden ser introducidos en la línea germinal a través de la recombinación homóloga para producir animales con un gen *knockout* o simplemente "*knockout*". Los ratones *knockout*, en los cuales se inactiva un gen específico, constituyen un poderoso sistema experimental para estudiar el desarrollo, el comportamiento y la fisiología de los mamíferos. También son útiles para estudiar las bases moleculares de ciertas enfermedades genéticas.

Los ratones *knockout* dirigidos a un gen diana son generados mediante un procedimiento de dos etapas. En la primera etapa, se introduce una construcción de DNA que contiene un alelo alterado (interrumpido) de un gen diana en particular en *células madre embrionarias* (*ES*). Estas células, que derivan de los blastocistos, pueden crecer en cultivos a lo largo de muchas generaciones (véase fig. 22-3). En una pequeña fracción de células transfectadas, el DNA introducido sufre recombinación homóloga con el gen diana, aunque la recombinación en los sitios cromosómicos no homólogos ocurre con una frecuencia mucho mayor. Para seleccionar las células en las cuales tiene lugar la inserción del gen diana homólogo, la construcción de DNA recombinante introducida en las células ES necesita incluir dos genes marcadores de selección (véase fig. 9-38). Uno de estos



▶ FIGURA EXPERIMENTAL 9-38 El aislamiento de células ES murinas con una interrupción dirigida a un gen es el primer paso en la producción de ratones knockout. (a) Cuando se introduce el DNA exógeno en células madre embrionarias (ES), la inserción aleatoria a través de la recombinación no homóloga sucede mucho más frecuentemente que la inserción dirigida a genes a través de una recombinación homóloga. Las células recombinantes en las cuales un alelo del gen *X* (naranja y blanco) está interrumpido pueden obtenerse mediante el uso de un vector recombinante que lleva el gen *X* interrumpido con *neo*^{r} (verde), el cual confiere resistencia al G-418, y, fuera de la región de homología, el tk^{HSV} (amarillo), el gen de la timidincinasa del virus del herpes simple. La timidincinasa viral, a diferencia de la enzima endógena del ratón, puede convertir el análogo de nucleótido ganciclovir a la forma monofosfato; ésta es luego modificada a la forma trifosfato, la cual inhibe la replicación del DNA celular en las células ES. De este modo, el ganciclovir es citotóxico para las células recombinantes ES que llevan el gen tk^{HSV}. La inserción no homóloga incluye el gen tk^{HSV}, mientras que la inserción homóloga no lo incluye; por ende, sólo las células con inserción no homóloga son sensibles al ganciclovir. (b) Las células recombinantes son seleccionadas por tratamiento con G-418, puesto que las células que fallan en tomar el DNA o integrarlo en su genoma son sensibles a este compuesto citotóxico. Las células recombinantes sobrevivientes se tratan con ganciclovir. Sólo las células con una interrupción dirigida en el gen *X*, y que por lo tanto carecen del gen tk^{HSV}, sobrevivirán. (Véase S. L. Mansour et. al., 1988. *Nature* 336:348.)



◀ FIGURA EXPERIMENTAL 9-39 Células ES heterocigóticas para un gen interrumpido son usadas para producir ratones *knockout* con respecto a un gen. Paso 1: Las células madre embrionarias (ES) heterocigóticas para una mutación *knockout* en un gen de interés (*X*) y homocigótica para un alelo dominante de un gen marcador (aquí, pelaje de color pardo, *A*) se trasplantan a la cavidad del blastocele de embriones de 4-5 días que son homocigóticos para un alelo recesivo del marcador (aquí pelaje de color negro, a). Paso 2: Los embriones tempranos se implantan luego en una hembra seudopreñada. La progenie que contiene células derivadas de las ES son quimeras, lo que se evidencia por su pelaje mezclado negro y pardo. Paso 3: Luego se hacen cruzamientos retrógrados de los ratones quiméricos con ratones negros; la progenie parda de esta cruza tiene células derivadas de ES en su línea germinal. Pasos 4 – 6: Los análisis de DNA aislado de una pequeña cantidad de tejido de la cola pueden identificar a los ratones pardos heterocigóticos para el alelo *knockout*. El entrecruzamiento de estos ratones produce algunos individuos homocigóticos para el alelo alterado es decir, ratones *knockout*. (Adaptado de M. R. Capecchi, 1989, Trends Genet. 5:70.)

En la segunda etapa en la producción de ratones *knockout*, las células ES heterocigóticas para una mutación *knockout* en el gen *X* se inyectan en un blastocisto murino de tipo silvestre receptor, el cual posteriormente se transfiere a un ratón seudopreñado sustituto (fig. 9-39). La progenie resultante serán quimeras, que contienen tejidos derivados tanto de las células ES trasplantadas como de las células huésped. Si las células ES también son homocigóticas para un rasgo marcador visible (p. ej. color del pelaje), entonces la progenie quimérica en la cual las células ES sobrevivieron y proliferaron pueden identificarse con facilidad. Luego los ratones quiméricos son apareados con ratones homocigóticos para otro alelo del rasgo marcador, para determinar si la mutación *knockout* se incorpora a la línea germinal. Por último, el apareamiento de ratones, cada uno heterocigótico para el alelo *knockout*, producirá una progenie homocigótica para la mutación *knockout*.

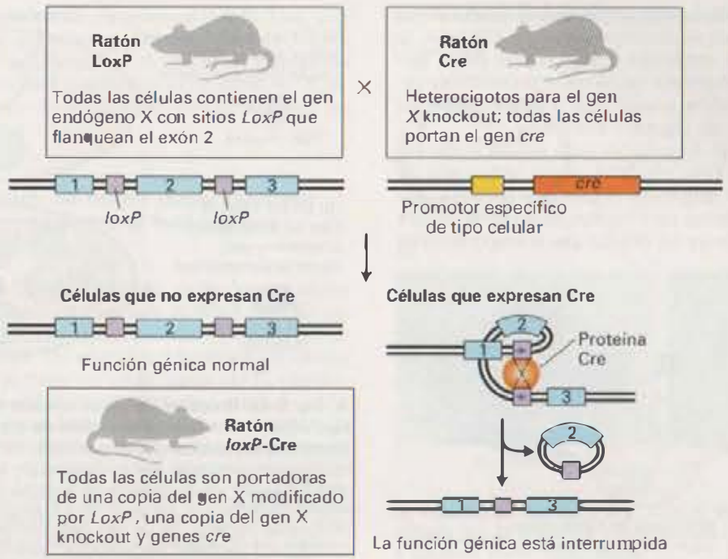


El desarrollo de ratones *knockout* que imitan ciertas enfermedades humanas puede ser ilustrado por la fibrosis quística. Mediante los métodos tratados en la sección 9.6, se demostró que la mutación recesiva que causa esta enfermedad está localizada en un gen conocido como *CFTR*, el cual codifica un canal de cloruro. Utilizando el gen *CTFR* humano de tipo silvestre clonado, los investigadores aislaron el gen murino homólogo e introdujeron en él mutaciones. Luego se utilizó la técnica de genes *knockout* para producir ratones mutantes homocigóticos, que mostraron los síntomas (es decir, un fenotipo), incluidos los trastornos del funcionamiento de las células epiteliales, similares a los de los seres humanos con fibrosis quística. Estos ratones *knockout* se utilizan en la actualidad como sistema modelo para estudiar esta enfermedad genética y desarrollar terapias eficaces. ▮

La recombinación de células somáticas puede inactivar genes en tejidos específicos

Los investigadores están interesados en examinar los efectos de las mutaciones *knockout* en un tejido en particular del ratón, en un estadio específico del desarrollo o en ambos. Sin embargo, los ratones que llevan una línea germinal *knockout* genes (neo^r), que confiere resistencia al G-418, se inserta dentro del gen diana (*X*) y lo interrumpe. El otro gen de selección, el gen de la timidinacinasa del virus herpes simple (tk^{HSV}), confiere sensibilidad al ganciclovir, un análogo citotóxico de nucleótido; éste se inserta en la construcción fuera de la secuencia del gen diana. Sólo las células ES que sufrieron recombinación homóloga pueden sobrevivir en presencia tanto de G-418 como de ganciclovir. En estas células un alelo del gen *X* estará interrumpido.

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Microinyecciones de células ES en los blastocistos



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 9-40 El sistema de recombinación *loxP-Cre* puede inactivar genes en tipos celulares específicos. Se insertan dos sitios *loxP* a cada lado de un exón esencial (2) del gen de interés *X* (azul) mediante recombinación homóloga, produciendo un ratón *loxP*. Puesto que los sitios *loxP* se encuentran en los intrones, no alteran la función de *X*. El ratón Cre transporta un alelo *knockout* del gen *X* y un gen *cre* (naranja) introducido del bacteriófago P1 unido a un promotor específico del tipo celular (amarillo). El gen *cre* es incorporado al genoma del ratón por recombinación no homóloga y no afecta la función de otros genes. En los ratones *loxP*-Cre que resultan del cruzamiento, la proteína Cre sólo es producida en aquellas células en las cuales el promotor está activo. Así, éstas son las únicas células en las cuales tiene lugar la recombinación entre los sitios *loxP* catalizados por el Cre, conduciendo a la deleción del exón 2. Puesto que el otro alelo es un gen *X* constitutivo *knockout*, la deleción entre los sitios *loxP* da como resultado una pérdida completa de la función del gen *X* en todas las células que expresan Cre. Al utilizar diferentes promotores, los investigadores pueden estudiar los efectos de la inactivación del gen *X* en diversos tipos de células.

pueden tener defectos en numerosos tejidos o morir antes del estadio de desarrollo de interés. Para enfrentar este problema, los genetistas de ratones diseñaron una astuta técnica para inactivar genes diana en tipos específicos de células somáticas o en momentos particulares del desarrollo.

Esta técnica emplea sitios específicos de recombinación del DNA (llamados sitios *loxP*) y la enzima Cre que cataliza la recombinación entre ellos. El *sistema de recombinación loxP-Cre* deriva del bacteriófago P1, pero este sistema de recombinación de sitios específicos también funciona cuando se lo ubica en células murinas. Una característica esencial de esta técnica es que la expresión de Cre está controlada por un promotor específico del tipo de célula. En los ratones *loxP*-Cre generados mediante el procedimiento descrito en la figura 9-40, la inactivación del gen de interés (*X*) tiene lugar sólo en las células en las cuales el promotor que controla el gen *cre* está activo.

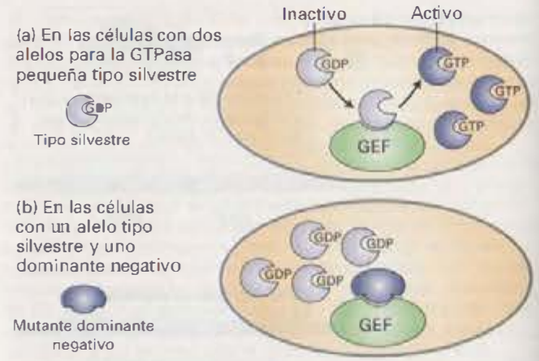
La aplicación inicial de esta técnica proporcionó una evidencia fuerte de que un receptor neurotransmisor particular es importante para el aprendizaje y la memoria. Estudios farmacológicos y fisiológicos previos indicaron que el aprendizaje normal requiere la clase NMDA de receptores de glutamato en el hipocampo, una región del cerebro. Pero los ratones en los cuales se eliminaba por *knockout* el gen que codifica una subunidad del receptor NMDA morían siendo neonatos, lo que imposibilitaba el análisis del papel del receptor en el aprendizaje. Siguiendo el protocolo en la figura 9-40, los investigadores generaron ratones en los cuales el gen de la subunidad receptor fue inactivado en el hipocampo, pero expresado en otros tejidos. Estos ratones sobrevivieron hasta la adultez y mostraron defectos en el aprendizaje y en la memoria, lo que confirmó un papel de estos receptores en la capacidad de los ratones para codificar sus experiencias en la memoria.

Los alelos dominantes negativos pueden inhibir funcionalmente algunos genes

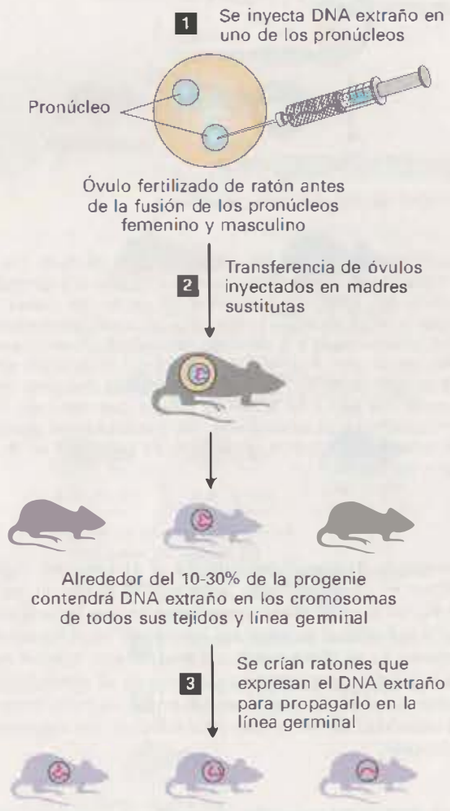
En los organismos diploides, como se vio en la sección 9.1, el efecto fenotípico de un alelo recesivo se expresa sólo en los individuos homocigóticos, mientras que los alelos dominantes se expresan en los heterocigóticos. Es decir, un individuo debe llevar dos copias de un alelo recesivo, pero sólo una copia de un alelo dominante para exhibir los fenotipos correspondientes. Hemos visto cómo se pueden producir cepas de ratones que son homocigóticos para una mutación *knockout* recesiva dada, al cruzar individuos que son heterocigóticos para la misma mutación *knockout* (véase fig. 9-39). Sin embargo, para los experimentos con células animales

cultivadas, suelen ser difícil interrumpir ambas copias de un gen con el fin de producir un fenotipo mutante. Más aún, la dificultad para producir cepas con ambas copias de un gen mutado a menudo es compuesta mediante la presencia de genes relacionados de función similar que también deben ser inactivadas para revelar un fenotipo observable.

Para ciertos genes, las dificultades para producir mutantes homocigóticos *knockout* pueden evitarse utilizando un alelo que contenga una **mutación dominante negativa.** Estos alelos son genéticamente dominantes; es decir, producen un fenotipo mutante aun en las células que transportan una



▲ Fig. 9-42. Inactivación de la función de una GTPasa de tipo silvestre mediante la acción de un alelo mutante dominante negativo. (a) Pequeñas GTPasas (monoméricas) (violeta) son activadas por su interacción con un factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF), el cual cataliza el intercambio de GDP por GTP. (b) La introducción de un alelo dominante negativo de un gen pequeño de GTPasa en células cultivadas o animales transgénicos conduce a la expresión de una GTPasa mutante que se une a la GEF y la inactiva. Como resultado, las copias de tipo silvestre endógenas de la misma GTPasa pequeña son atrapadas en el estado inactivo unido al GDP. Por ende, un único alelo dominante negativo, provoca un fenotipo de pérdida de función en los heterocigóticos similar a los vistos en los homocigotos que transportan dos alelos recesivos de pérdida de función.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 9-41 Los ratones transgénicos son producidos por integración aleatoria de un gen extraño en la línea germinal del ratón. El DNA extraño inyectado en uno de los dos pronúcleos (los núcleos haploides masculino y femenino aportados por los progenitores) tiene una buena probabilidad de ser integrado al azar en los cromosomas del cigoto diploide. Debido a que un transgén se integra al genoma receptor por recombinación no homóloga, no se alteran los genes endógenos. (Véase R. L. Brinster et. al., 1981, Cell 27:223.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación técnica: Creación de un ratón transgénico
Video: DNA inyectado en un pronúcleo de un cigoto murino

copia de tipo silvestre del gen. Pero a diferencia de otros tipos de alelos dominantes, los alelos dominantes negativos producen un fenotipo equivalente al de una mutación de pérdida de función.

Se han identificado alelos dominantes negativos útiles para diversos genes, que pueden ser introducidos en células cultivadas mediante transfección o en la línea germinal de ratones u otros organismos. En ambos casos, el gen introducido se integra en el genoma mediante recombinaciones no homólogas. Estos genes insertados aleatoriamente se llaman transgenes; las células u organismos que los llevan se denominan **transgénicos.** Los transgenes que portan un alelo negativo dominante suelen diseñarse de manera que el alelo esté controlado por un promotor regulable, lo que permite la expresión de la proteína mutante en diferentes tejidos en momentos distintos. Como ya se vio, la integración aleatoria de DNA exógeno por medio de recombinación no homóloga tiene lugar a una frecuencia mucho mayor que la inserción por medio de recombinación homóloga. Debido a este fenómeno, la producción de ratones transgénicos es un proceso eficiente y directo (fig. 9-41).

Entre los genes que pueden inactivarse funcionalmente mediante la introducción de un alelo dominante negativo se encuentran los que codifican proteínas pequeñas de unión a GTP (monoméricas) pertenecientes a la superfamilia de la GTPasa. Como analizaremos en otros capítulos, estas proteínas (p. ej., Ras, Rac y Rab) actúan como interruptores intracelulares. La conversión de las GTPasas pequeñas de un estado inactivo unido al GDP a un estado activo unido al GTP depende de su interacción con un factor correspondiente de intercambio de nucleótido de guanina (GEF). Una GTPasa mutante pequeña que se une permanentemente a la proteína GEF bloqueará la conversión de GTPasas endógenas pequeñas de tipo silvestre al estado activo unido al GTP, inhibiéndolas por lo tanto de realizar sus funciones como interruptores (fig. 9-42).

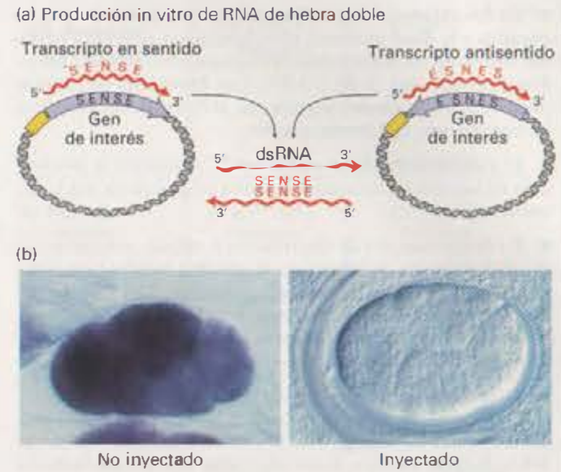
Las moléculas de RNA de hebra doble pueden interferir en la función génica al seleccionar el mRNA para su destrucción

Los investigadores están explotando un fenómeno recién descubierto conocido como **interferencia de RNA** (RNAi) para inhibir la función de genes específicos. Este método es técnicamente más simple que los métodos descritos para alterar genes. Observada por primera vez en el nematodo *C. elegans*, la RNAi alude a la capacidad de un RNA de doble hebra (ds) para bloquear la expresión de su correspondiente mRNA de hebra simple, pero no el mRNA con una secuencia diferente.

Para utilizar RNAi para el silenciamiento intencional de un gen de interés, los investigadores primero producen dsRNA basado en la secuencia del gen que se va a inactivar (fig. 9-43a). Este dsRNA se inyecta en la gónada de un gusano adulto, donde tiene acceso a los embriones en desarrollo. A medida que los embriones crecen, las moléculas de mRNA correspondientes al dsRNA inyectado se destruyen con rapidez. Los gusanos resultantes exhiben un fenotipo similar al que resultaría de la interrupción del correspondiente gen en sí mismo. En algunos casos, la entrada de sólo algunas moléculas de un dsRNA en una célula es suficiente para inactivar muchas copias del mRNA correspondiente. En la figura 9-43b se ilustra la capacidad de un dsRNA inyectado para interferir en la producción del mRNA endógeno correspondiente en los embriones de *C. elegans*. En este experimento, los niveles de mRNA en los embriones se determinaron por incubación de los embriones con una sonda marcada fluorescentemente específica para el mRNA de interés. Esta técnica, **hibridación in situ**, es útil para analizar la expresión de un mRNA en particular en secciones celulares y tisulares.

En principio, el fenómeno de la RNAi fue bastante misterioso para los genetistas. En estudios recientes se mostró que las enzimas especializadas en procesar RNA escinden el dsRNA en segmentos más cortos, que se aparean con mRNA endógenos. Las moléculas híbridas resultantes son reconocidas y escindidas por nucleasas específicas en estos sitios de hibridación. Este modelo da cuenta de la especificidad de la RNAi, dado que depende del apareamiento de bases y de su potencia para silenciar la función génica, puesto que el mRNA complementario es destruido permanentemente por degradación nucleolítica. Aunque no se comprende el funcionamiento celular normal de la RNAi, puede proporcionar una defensa contra los virus con los genomas dsRNA o ayudar a regular ciertos genes endógenos. (Para un análisis más detallado de los mecanismos de interferencia de RNA, véase la sección 12.4.)

Otros organismos en los cuales la inactivación génica mediada por RNAi ha sido exitosa incluyen *Drosophila*, muchos tipos de plantas, el pez cebra, las arañas, la rana *Xenopus* y los ratones. Aunque la mayoría de otros organismos no parecen tan sensibles a los efectos de la RNAi como *C. elegans*, el método tiene aplicación general cuando el dsRNA se inyecta en tejidos embrionarios.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 9-43. El RNA de interferencia (RNAi) puede inactivar funcionalmente genes en *C. elegans* y algunos otros organismos. (a) Producción de RNA de hebra doble (dsRNA) para la RNAi de un gen de interés específico. La secuencia codificadora del gen, derivada ya sea de un clon de cDNA o de un segmento de DNA genómico, se ubica en dos orientaciones en un vector plasmídico adyacente a un promotor fuerte. La transcripción de ambas construcciones in vitro mediante RNA polimerasa y ribonucleótidos trifosfatos produce muchas copias de RNA en la orientacion del sentido "sense" (idéntica a la secuencia de mRNA) o en la orientación antisentido complementaria "esnes". En condiciones apropiadas, estas moléculas de RNA complementarios se hibridarán para formar dsRNA. (b) Inhibición de la expresión de RNA *mex3* en los embriones de gusano por el RNAi (véase el mecanismo en el texto). (*Izquierda*) La expresión de *mex3* RNA en los embriones derivados de un gusano inyectado con mRNA de hebra doble produce poco o nada de mRNA *mex3* endógeno, como se indica por la ausencia de color. Cada embrión de la etapa de cuatro células tiene ≈50 μm de longitud. [Parte (b) de A. Fire et. al., 1998, Nature 391:806.]

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 9.5

Inactivación de la función de genes específicos en los eucariontes

- Una vez que un gen ha sido clonado, pueden deducirse importantes claves acerca de su función normal in vivo a partir de los efectos fenotípicos de la mutación del gen.
- Los genes pueden ser interrumpidos en las levaduras insertando un gen marcador de selección en un alelo de un gen de tipo silvestre a través de recombinación homóloga, produciendo un mutante heterocigótico. Cuando ese heterocigoto esporula, la interrupción de un gen esencial producirá dos esporas haploides no viables (fig. 9-37).
- Un gen de levadura puede inactivarse de manera controlada utilizando el promotor *GAL1* para interrumpir la transcripción de un gen cuando las células son transferidas a un medio que contiene glucosa.

- En los ratones, los genes modificados pueden ser incorporados a la línea germinal en su ubicación genómica original mediante recombinación homóloga, produciendo *knockouts* (véanse figs. 9-38 y 9-39). Los *knockouts* en ratones pueden proveer modelos para las enfermedades genéticas humanas como la fibrosis quística.
- El sistema de recombinación *loxP*-Cre permite la producción de ratones en los cuales se altera un gen en un tejido específico.
- En la producción de organismos o células transgénicas, el DNA exógeno es integrado al genoma huésped mediante recombinación no homóloga (véase fig. 9-41). La introducción de un alelo dominante negativo de esta manera puede inactivar funcionalmente un gen sin alterar su secuencia.
- En algunos organismos, incluido el nematodo *C. elegans*, el RNA de hebra doble desencadena la destrucción de todas las moléculas de mRNA con la misma secuencia (véase fig. 9-43). Este fenómeno, conocido como *RNAi* (interferencia de RNA), provee un medio específico y potente para inactivar funcionalmente genes sin alterar su estructura.

9.6 Identificación y localización de genes de enfermedades humanas

MEDICINA

Las enfermedades humanas hereditarias son la consecuencia fenotípica de genes defectuosos. En el cuadro 9-3 se listan varias de las enfermedades hereditarias más comunes. Aunque el gen de una "enfermedad" puede ser el resultado de una nueva mutación surgida en la generación precedente, la mayoría de los casos de enfermedades hereditarias son causados por alelos mutantes preexistentes pasados de una generación a la siguiente durante muchas generaciones.

Hoy en día, el primer paso típico para descifrar la causa subyacente de cualquier enfermedad humana hereditaria es identificar el gen afectado y su proteína codificada. La comparación de secuencias del gen de una enfermedad y su producto con la de los genes y proteínas cuyas secuencias y funciones son conocidas puede proporcionar claves de las causas celulares y moleculares de la enfermedad. Históricamente, los investigadores usaron cualquier clave fenotípica que fuera relevante para hacer conjeturas acerca de las bases moleculares

CUADRO 9-3 Enfermedades humanas hereditarias comunes

Enfermedad	Defecto celular y molecular	Incidencia
AUTOSÓMICA RECESIVA		
Anemia falciforme	La hemoglobina anormal causa deformación de los glóbulos rojos, los cuales comienzan a alojarse en los capilares; también confiere resistencia al paludismo.	1/625 en oriundos del África subsahariana
Fibrosis quística	El canal de cloruro defectuoso (CFTR) en las células epiteliales conduce a un exceso de moco en los pulmones	1/2500 de origen europeo
Fenilcetonuria	La enzima defectuosa en el metabolismo de la fenilalanina (tirosinhidroxilasa) da como resultado un exceso de fenilalanina, lo que conduce a retraso mental, a menos que se ingiera una dieta restrictiva	1/10.000 de origen europeo
Enfermedad de Tay-Sachs	La enzima hexosaminidasa defectuosa conduce a la acumulación de un exceso de esfingolípidos en los lisosomas de las neuronas y perjudica el desarrollo neural.	1/10.000 judíos del este de Europa
AUTOSÓMICA DOMINANTE		
Enfermedad de Huntington	La proteína neural defectuosa (huntingtina) puede ensamblarse en agregados y causar daño en el tejido neural.	1/10.000 de origen europeo
Hipercolesterolemia	El receptor LDL defectuoso conduce a un exceso de colesterol en la sangre y a infartos cardíacos tempranos.	1/122 francocanadienses
RECESIVA LIGADA AL CROMOSOMA X		
Distrofia muscular de Duchenne (DMD)	La proteína del citoesqueleto distrofina defectuosa conduce a una función muscular alterada.	1/3500 varones
Hemofilia A	El factor de coagulación VIII defectuoso conduce a hemorragias descontroladas	1-2/10.000 varones

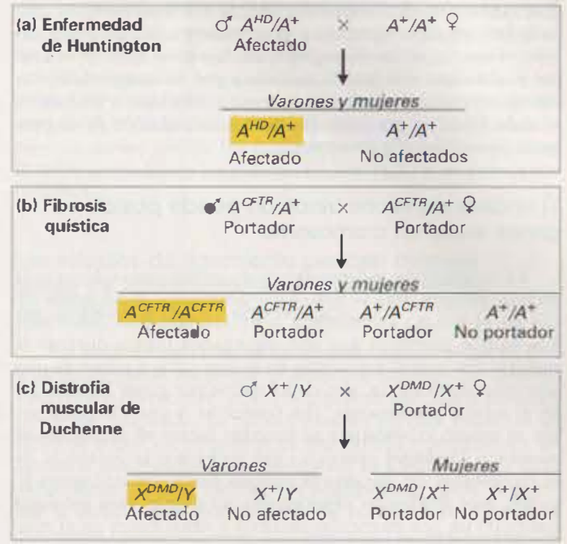
de las enfermedades hereditarias. Un antiguo ejemplo de una conjetura exitosa fue la hipótesis de que la anemia de células falciformes, conocida por ser una enfermedad de las células sanguíneas, podría ser causada por una hemoglobina defectuosa. Esta idea condujo a la identificación de la sustitución de un aminoácido específico en la hemoglobina que provoca la polimerización de las moléculas defectuosas y causa una deformación en forma de hoz de los glóbulos rojos en los individuos que han heredado dos copias del alelo Hb^s para la hemoglobina de células falciformes.

Sin embargo, más a menudo, los genes responsables de enfermedades hereditarias deben hallarse sin ningún conocimiento previo o hipótesis razonable acerca de la naturaleza del gen afectado o de su proteína codificada. En esta sección vemos cómo los genetistas pueden hallar el gen responsable de una enfermedad hereditaria siguiendo la segregación de la enfermedad en las familias. Esta segregación puede correlacionarse con la segregación de otros muchos marcadores genéticos y conducir a la identificación de la posición cromosómica del gen afectado. Esta información, junto con el conocimiento de la secuencia del genoma humano, puede permitir la localización del gen afectado y de las mutaciones que provocan la enfermedad.

Muchas enfermedades hereditarias muestran uno de los tres patrones principales de herencia

Las enfermedades genéticas humanas que resultan de la mutación en un gen específico exhiben varios patrones de herencia según la naturaleza y la localización cromosómica de los alelos que las provocan. Un patrón característico es el exhibido por un alelo dominante en un autosoma (es decir, uno de los 22 cromosomas humanos que no es un cromosoma sexual). Debido a que un alelo *autosómico dominante* se expresa en el heterocigoto casi siempre al menos uno de los padres de un individuo afectado también tendrá la enfermedad. A menudo se da el caso de que las enfermedades causadas por alelos dominantes aparecen tarde en la vida, después de la edad reproductiva. Si éste no fuera el caso, la selección natural podría haber eliminado el alelo durante la evolución humana. Un ejemplo de una enfermedad autosómica dominante es la enfermedad de Huntington, un trastorno neurológico degenerativo que suele aparecer a partir de la mitad de la vida. Si sólo uno de los padres porta un alelo *HD* mutante, cada uno de sus hijos (sin importar el sexo) tiene un 50% de posibilidad de heredar el alelo mutante y estar afectado (fig. 9-44a).

Un alelo recesivo en un autosoma exhibe un patrón de segregación bastante diferente. Para un alelo *autosómico recesivo*, ambos padres deben ser portadores heterocigóticos del alelo para que sus hijos estén en riesgo de ser afectados por la enfermedad. Cada chico de padres heterocigóticos tiene un 25% de posibilidad de recibir ambos alelos recesivos y por lo tanto, de ser afectado por la enfermedad, un 50% de posibilidad de recibir un alelo normal y uno mutante y por lo tanto, de ser un portador y un 25% de recibir ambos alelos normales. Un claro ejemplo de una enfermedad autosómica recesiva es la fibrosis quística, que resulta de un gen defectuoso que codifica un canal de cloruro conocido como *CFTR* (fig. 9-44b). Los individuos emparentados (p. ej. los primos primeros o segundos) tienen una probabilidad relativamente alta de ser portadores de los mismos alelos recesivos. Por ende, los niños nacidos de padres emparentados son mucho más propensos que los nacidos de padres no emparentados a ser homocigóticos para un trastorno autonómico recesivo y por ende a ser afectados por él.



▲ Fig. 9-44. Tres patrones de herencia comunes de enfermedades genéticas. Los cromosomas autonómicos (A) de tipo silvestre y los cromosomas sexuales (X e Y) se indican por superíndices más signos. (a) En un trastorno autosómico dominante como la enfermedad de Huntington, sólo un alelo mutante es necesario para manifestar la enfermedad. Si ambos padres son heterocigóticos para el alelo mutante *HD*, sus hijos o hijas tendrán 50% de posibilidades de heredar el alelo mutante y evidenciar la enfermedad. (b) En un trastorno autosómico recesivo como la fibrosis quística, deben estar presentes dos alelos mutantes para conferir la enfermedad. Ambos padres deben ser portadores heterocigóticos del gen *CFTR* mutante para que sus hijos estén en riesgo de ser afectados o ser portadores. (c) Una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X, como la distrofia muscular de Duchenne, es causada por una mutación recesiva en el cromosoma X y exhibe el típico patrón de segregación ligado al sexo. Los varones nacidos de madres heterocigóticas para un alelo *DMD* mutante tienen un 50% de posibilidades de heredar el alelo mutante y ser afectados. Las mujeres nacidas de madres heterocigóticas tienen un 50% de posibilidades de ser portadoras.

El tercer patrón de herencia común es el de un alelo *recesivo ligado al cromosoma X*. Un alelo recesivo en el cromosoma X se expresará más a menudo en los varones, que reciben sólo un cromosoma X de su madre, pero no en las mujeres que reciben un cromosoma X tanto de su madre como de su padre. Esto conduce a un patrón de segregación ligado al sexo en el que la enfermedad se exhibe con mucho mayor frecuencia en los varones. Por ejemplo, la distrofia muscular de Duchenne (DMD), una enfermedad muscular de-

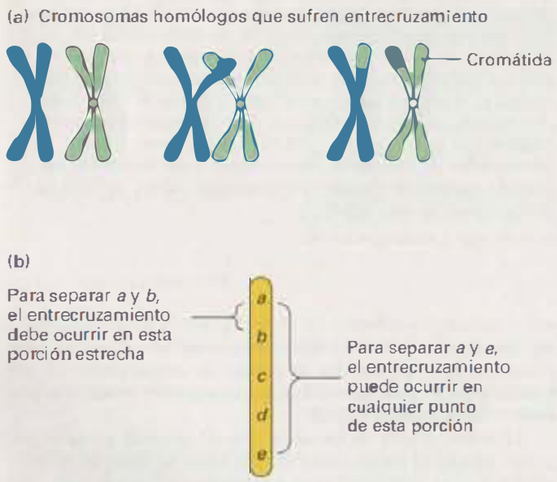
generativa que afecta específicamente a los varones, es causada por un alelo recesivo en el cromosoma X. La DMD exhibe el típico patrón de segregación ligado al sexo en el cual las madres que son heterocigóticas y por lo tanto fenotípicamente normales pueden actuar como portadoras y transmitir el alelo DMD, y por ende la enfermedad, al 50% de su progenie masculina (fig. 9-44c).

El análisis de recombinación puede posicionar genes sobre un cromosoma

La segregación independiente de cromosomas durante la meiosis proporciona la base para determinar si los genes están en el mismo cromosoma o en cromosomas diferentes. Los rasgos genéticos que son segregados juntos durante la meiosis con mayor frecuencia de lo esperado a partir de una segregación aleatoria, son controlados por genes localizados en el mismo cromosoma. (La tendencia a que los genes sobre el mismo cromosoma se hereden juntos se denomina **ligamiento [*linkage*]** genético.) Sin embargo, la presencia de la recombinación durante la meiosis puede separar genes ligados; este fenómeno proporciona un medio para localizar (mapear) un gen particular relativo a otros genes en el *mismo* cromosoma.

La recombinación tiene lugar antes de la primera división celular meiótica en las células germinales cuando los cromosomas replicados de cada par homólogo se alinean el uno con el otro, en una acción denominada *sinapsis* (véase fig. 9-3). En este momento, las secuencias de DNA homólogas sobre las cromátidas maternas y paternas pueden intercambiarse entre sí, en un proceso conocido como **entrecruzamiento** (*crossing over*). Los sitios de recombinación tienen lugar más o menos al azar a lo largo de los cromosomas; por ende mientras más cerca estén dos genes entre sí, es menos probable que esa recombinación tenga lugar entre ellos durante la meiosis (fig. 9-45). En otras palabras, *mientras menos frecuente es la recombinación entre dos genes sobre el mismo cromosoma, más fuertemente están ligados y más cerca se encuentran entre sí.* La frecuencia de la recombinación entre dos genes puede determinarse a partir de la proporción de progenie recombinante, cuyos fenotipos difieren de los fenotipos parentales producidos en las cruzas de padres que portan diferentes alelos de los genes.

La presencia de muchos rasgos genéticos diferentes (o marcadores) ya mapeados distribuidos a lo largo de un cromosoma facilita el mapeo de una nueva mutación al asignar su posible ligamiento con los genes marcadores en cruzas apropiadas. Mientras más marcadores estén disponibles, más precisamente se podrá mapear una mutación. A medida que más y más mutaciones sean mapeadas, se puede construir el orden lineal de los genes a lo largo de un cromosoma. Este ordenamiento de genes a lo largo de un cromosoma se denomina *mapa genético* o *mapa de ligamiento*. Por convención, una unidad de un mapa genético se define como la distancia entre dos posiciones a lo largo de un cromosoma que produce un individuo recombinante en una progenie de 100. La distancia correspondiente a esta frecuencia de recombinación del 1% se denomina *centimorgan* (*cM*). La comparación de las distancias físicas reales entre los genes conocidos, determinada por el análisis molecular, con sus frecuencias de recombinación indica que en los seres humanos 1 centimorgan representa en promedio una distancia de alrededor de $7{,}5 \times 10^5$ pares de bases.



▲ **Fig. 9-45. Recombinación durante la meiosis.** (a) El entrecruzamiento puede tener lugar entre cromátidas de cromosomas homólogos antes de la primera división meiótica (véase fig. 9-3). (b) Mientras más larga es la distancia entre dos genes en una cromátida, es más probable que sean separados por recombinación.

Los polimorfismos del DNA se utilizan en el mapeo de ligamiento de mutaciones humanas

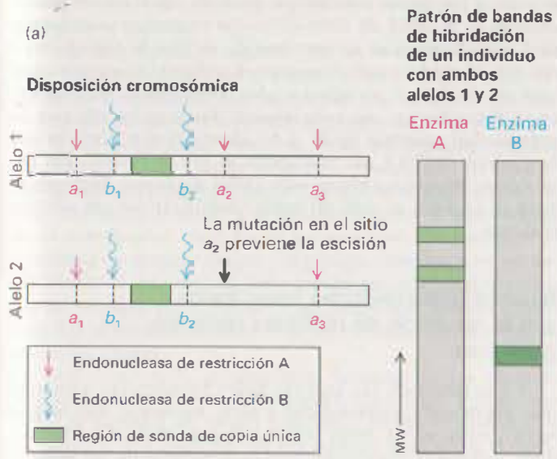
Para construir un mapa genético de alta resolución se necesitan muchos marcadores genéticos diferentes. En los organismos experimentales utilizados en los estudios genéticos, se dispone de numerosos marcadores con fenotipos fácilmente detectables para el mapeo genético de mutaciones. Éste no es el caso para el mapeo de genes cuyos alelos mutantes se asocian con enfermedades hereditarias humanas. Sin embargo, la tecnología del DNA recombinante ha hecho accesible un caudal de *marcadores moleculares* de DNA útiles. Debido a que la mayor parte del genoma humano no codifica para proteínas, existe gran cantidad de variaciones de secuencias entre los individuos. Se estimó que es posible detectar diferencias de nucleótidos entre individuos no emparentados en promedio cada 10^3 nucleótidos. Si estas variaciones en la secuencia de DNA, denominadas *polimorfismos de DNA*, pueden seguirse de una generación a la siguiente, pueden servir como marcadores genéticos para estudios de ligamiento. Actualmente, se utiliza un panel de 10^4 polimorfismos diferentes conocidos, cuyas localizaciones han sido mapeadas en el genoma humano, para los estudios de ligamiento genético.

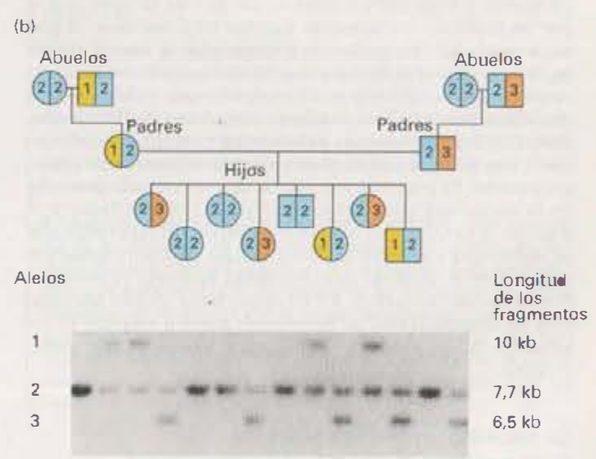
Los *polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción* (*RFLP*) fueron los primeros tipos de marcadores moleculares utilizados en los estudios de ligamiento. Los RFLP surgen porque las mutaciones pueden crear o destruir los sitios reconocidos por enzimas de restricción específicas y conducir a variaciones entre individuos en la longitud de los fragmentos de restricción producidos de regiones idénticas del genoma. Las diferencias en los tamaños de los fragmentos de restricción entre individuos pueden detectarse mediante estudios de *Southern blot* con una sonda específica para una región de DNA que se sabe que contiene un RFLP (fig. 9-46a). La segregación y la recombinación meiótica de tales polimorfismos de DNA pueden seguirse como los marcadores genéticos típicos. En la figura 9-46b se ilustra cómo el análisis de RFLP de una familia permite detectar la segregación de un RFLP que puede utilizarse para probar un ligamiento estadísticamente significativo con el alelo para una enfermedad hereditaria u otro rasgo humano de interés.

La acumulación reciente de gran cantidad de información de secuencias genómicas de diferentes seres humanos condujo a la identificación de otros polimorfismos de DNA útiles. Los *polimorfismos de un nucleótido simple* (*SNP*) constituyen el tipo más abundante y útil para la construcción de mapas genéticos de alta resolución. Otro tipo de polimorfismo de DNA útil consta de un número variable de repeticiones de una secuencia de una, dos o tres bases. Estos polimorfismos, conocidos como repeticiones de secuencia simple (SSR), o *microsatélites*, presumiblemente se forman por recombinación o por un mecanismo de deslizamiento tanto de hebras molde como de hebras recién sintetizadas durante la replicación del DNA. Una propiedad útil de las SSR es que los distintos individuos a menudo tendrán un número diferente de repeticiones. La existencia de múltiples versiones de una SSR hace más probable que ésta produzca un patrón de segregación informativo en una estirpe dada y por ende sea de uso más general en el mapeo de las posiciones de genes de enfermedades. Si un SNP o una SSR altera un sitio de restricción, puede detectarse por análisis de RFLP. Sin embargo, estos polimorfismos no suelen alterar los fragmentos de restricción y deben detectarse mediante amplificación por PCR y secuenciación de DNA.

Los estudios de ligamiento pueden mapear genes de enfermedades con una resolución de alrededor de 1 centimorgan

Sin profundizar en todas las consideraciones técnicas, veamos cómo puede mapearse el alelo que confiere un determinado rasgo dominante (p. ej., la hipercolesterolemia familiar) puede ser mapeada. El primer paso es obtener muestras de DNA de todos los miembros de una familia que contenga individuos que exhiban la enfermedad. El DNA de cada individuo afectado y no afectado se analiza luego para determinar la identidad de gran número de polimorfismos de DNA conocidos (puede utilizarse cualquiera de los marcadores SSR o SNP). El patrón de segregación de cada polimorfismo de DNA dentro de la familia se compara entonces con la segregación de la enfermedad en estudio para hallar los polimor-





▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 9-46 Los polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) pueden seguirse como marcadores genéticos.** (a) En el ejemplo mostrado, el DNA de un individuo es tratado con dos enzimas de restricción distintas (A y B), las cuales cortan el DNA en diferentes secuencias (*a* y *b*). Los fragmentos resultantes son sometidos a análisis de Southern *blot* (véase fig. 9-26) con una sonda radiactiva que se une a la región de DNA indicada (verde) para detectar los fragmentos. Puesto que no aparecen diferencias entre los dos cromosomas homólogos en las secuencias reconocidas por la enzima B, sólo un fragmento es reconocido por la sonda, como se indica por una única banda de hibridación. Sin embargo, el tratamiento con la enzima A produce fragmentos de dos longitudes diferentes (se visualizan dos bandas) lo que indica que una mutación ha provocado la pérdida de uno de los sitios *a* en uno de los dos cromosomas. (b) Pedigrí basado en los análisis de RFLP del DNA de una región que se sabe está presente en el cromosoma 5. Las muestras de DNA fueron cortadas con la enzima de restricción *Taq*1 y analizadas por Southern blot. En esta familia esta región del genoma existe en tres formas alélicas caracterizadas por los sitios *Taq*I espaciados 10, 7,7, 6,5 kb de distancia. Cada individuo tiene dos alelos; algunos contienen el alelo 2 (7,7 kb) en ambos cromosomas y otros son heterocigóticos en este sitio. Los círculos indican mujeres; los cuadrados indican varones. Las áreas del gel están alineadas debajo del sujeto correspondiente. (Según H. Donis-Keller et al., 1987, Cell 51:319.)

fismos que tienden a segregarse junto con la enfermedad. Por último, el análisis computarizado de la información de la segregación se utiliza para calcular la probabilidad del ligamiento entre cada polimorfismo de DNA y el alelo causante de la enfermedad.

En la práctica, se recogen y se agrupan los datos de la segregación de diferentes familias que exhiben la misma enfermedad. Mientras más familias exhiban una enfermedad en particular que pueda ser examinada, mayor será la significación estadística de la evidencia de ligamiento que puede obtenerse y mayor la precisión con la cual pueda medirse la distancia entre un polimorfismo de DNA ligado y el alelo de una enfermedad. La mayoría de los estudios familiares tienen un máximo de alrededor de 100 individuos en los cuales se puede probar el ligamiento entre el gen de una enfermedad y un panel de polimorfismos de DNA. Este número de individuos marca el límite superior práctico en la resolución de ese estudio de mapeo en alrededor de 1 centimorgan, o una distancia física de alrededor de $7{,}5 \times 10^5$ pares de bases.

Un fenómeno denominado *desequilibrio de ligamiento* es la base de una estrategia alternativa, que en algunos casos puede permitir un mayor grado de resolución en los estudios de mapeo. Este enfoque depende de la circunstancia en la cual una enfermedad genética hallada comúnmente en una población resulta como consecuencia de una única mutación producida muchas generaciones antes. Este cromosoma ancestral portará polimorfismos de DNA estrechamente ligados que serán conservados durante muchas generaciones. Los polimorfismos que se encuentran más alejados en el cromosoma tenderán a separarse del gen de la enfermedad por recombinación, mientras que los más cercanos al gen de la enfermedad permanecerán asociados a éste. A través de la evaluación de la distribución de marcadores específicos en todos los individuos afectados en una población, los genetistas pueden identificar los marcadores de DNA estrechamente asociados con la enfermedad y localizar así el asociado con la enfermedad dentro de una región relativamente pequeña. El poder de resolución de este método proviene de la capacidad para determinar si un polimorfismo y el alelo de la enfermedad alguna vez estuvieron separados por un episodio de recombinación meiótica en algún momento puesto que el alelo de la enfermedad apareció primero en el cromosoma ancestral. En circunstancias ideales los estudios de desequilibrios de ligamiento pueden mejorar la resolución de los estudios de mapeo a menos de 0,1 centimorgan.

Se necesita un análisis posterior para localizar el gen de una enfermedad en el DNA clonado

Aunque el mapeo de ligamiento casi siempre puede localizar el gen de una enfermedad humana en una región que contiene alrededor de 7.5×10^5 pares de bases, pueden localizarse hasta 50 genes distintos en una región de este tamaño. El objetivo final de un estudio de mapeo es localizar el gen dentro de un segmento clonado de DNA y luego determinar la secuencia de nucleótidos de este fragmento.

Una estrategia para localizar aún más el gen de una enfermedad dentro del genoma es identificar el mRNA codificado por el DNA en la región del gen en estudio. La comparación de la expresión génica en los tejidos de individuos normales y afectados puede sugerir tejidos en los cuales normalmente se expresa el gen de una enfermedad en particular. Por ejemplo, una mutación que afecta fenotípicamente el músculo, pero no otro tejido, puede estar en un gen que se expresa sólo en el tejido muscular. La expresión de mRNA tanto en los individuos normales como en los afectados se determina mediante transferencia *Northern* o por hibridación in situ de DNA o RNA marcado en secciones de tejidos. Los *Northern blots* permiten la comparación del nivel de expresión y del tamaño de los mRNA en tejidos mutantes y de tipo silvestre (véase fig. 9-27). Aunque la sensibilidad de la hibridación in situ es menor que la del análisis del *Northern blot*, puede ser muy útil para identificar un mRNA que se exprese en bajos niveles en un tejido dado, pero en altos niveles en una subclase de células dentro de ese tejido. Un mRNA que está alterado o falta en diversos individuos afectados con una enfermedad, comparada con individuos de tipo silvestre sería un candidato excelente para codificar la proteína cuya función alterada causa esa enfermedad.

En muchos casos, las mutaciones puntuales que dieron origen a alelos causantes de enfermedades pueden producir un cambio no detectable en el nivel de expresión o en la movilidad electroforética de los mRNA. Por ende, si las comparaciones del mRNA expresado en los individuos normales y afectados no revelan diferencias detectables en el mRNA candidato, se emprende una búsqueda de mutaciones puntuales en las regiones de DNA que codifican el mRNA. La estrategia general es buscar secuencias codificadoras que muestren en forma consistente posibles alteraciones perjudiciales en el DNA de individuos que presentan la enfermedad. Una limitación de este método es que la región cerca del gen afectado puede transportar polimorfismos que ocurren naturalmente, no relacionados con el gen de interés. Estos polimorfismos, no relacionados funcionalmente con la enfermedad, pueden llevar a la identificación errónea del fragmento de DNA que transporta el gen de interés. Por esta razón, mientras existan más alelos mutantes disponibles para el análisis, es más probable identificar un gen correctamente.

Muchas enfermedades hereditarias son el resultado de múltiples defectos genéticos

La mayoría de las enfermedades hereditarias humanas que ahora son comprendidas a nivel molecular son *rasgos monogenéticos*. Es decir, se produce un estado de enfermedad claramente discernible por la presencia de un defecto en un único gen. Las enfermedades monogenéticas provocadas por mutación en un gen específico exhiben uno de los patrones hereditarios característicos mostrados en la figura 9-44. Los genes asociados con la mayoría de las enfermedades monogenéticas ya han sido mapeados utilizando marcadores basados en DNA, como describimos anteriormente.

Sin embargo, muchas otras enfermedades hereditarias muestran patrones de herencia más complicados, lo que hace mucho más difícil la identificación de la causa genética subyacente. Un tipo de complejidad añadida encontrada con frecuencia es la *heterogeneidad genética*. En tales casos, las mutaciones en cualquiera de los múltiples genes diferentes pueden causar la misma enfermedad. Por ejemplo, la retinitis pigmentaria, caracterizada por la degeneración de la retina y que suele conducir a la ceguera, puede ser causada por mutaciones en cualquiera de más de 60 genes diferentes. En los estudios de ligamiento en seres humanos, debe confirmarse la información de múltiples familias para determinar si existe un ligamiento estadísticamente significativo entre el gen de una enfermedad y los marcadores moleculares conocidos. La heterogeneidad genética como la exhibida por la retinitis pigmentaria puede desconcertar tal metodología debido a que cualquier tendencia estadística en la información del mapeo de una familia tiende a ser anulada por la información obtenida a partir de otra familia con un gen causante no relacionado.

Los especialistas en genética humana emplearon dos enfoques diferentes para identificar los numerosos genes asociados con la retinitis pigmentaria. El primero confía en los estudios de mapeo en familias excepcionalmente grandes que contienen suficiente número de individuos afectados como para proveer evidencia estadísticamente significativa el ligamiento entre los polimorfismos de DNA conocidos y un único gen causal. Mediante los genes identificados en esos estudios se mostró que muchas de las mutaciones que causan la retinitis pigmentaria yacen dentro de genes que codifican abundantes proteínas de la retina. Siguiendo esta pista, los genetistas concentraron su atención en los genes muy expresados en la retina de otros individuos con retinitis pigmentaria examinados. Este enfoque de emplear información adicional para dirigir los esfuerzos de screening a un subgrupo de genes potenciales condujo a la identificación de raras mutaciones causativas en muchos genes diferentes que codifican proteínas retinianas.

Una complicación adicional en la disección genética de enfermedades humanas es presentada por la diabetes, la cardiopatía, la obesidad, la predisposición al cáncer y diversos trastornos mentales que tienen al menos algunas propiedades hereditarias. Éstas y muchas otras enfermedades pueden considerarse *rasgos poligénicos* en el sentido de que los alelos de múltiples genes, actuando juntos dentro de un individuo, contribuyen tanto a la aparición como a la severidad de la enfermedad. Aún no existe una solución sistémica al problema de mapear rasgos poligénicos complejos en los seres humanos. El progreso futuro quizá provenga del desarrollo de métodos refinados de diagnóstico que puedan distinguir las diferentes formas de enfermedades resultantes de múltiples causas.

Los modelos de enfermedades humanas en los organismos experimentales también pueden contribuir a desenmarañar la genética de rasgos complejos, como la obesidad o la diabetes. Por ejemplo, los experimentos de cruza controlados en gran escala en los ratones pueden identificar los genes murinos asociados con enfermedades análogas a las de los seres humanos. Los ortólogos humanos de los genes de ratón identificados en tales estudios serían probables candidatos por la participación en la enfermedad humana correspondiente. El DNA de las poblaciones humanas podría luego ser examinado para determinar si los alelos particulares de los genes candidatos muestran una tendencia a estar presentes en los individuos afectados con la enfermedad, pero ausentes en los individuos no afectados. Este enfoque del "gen candidato" se utiliza intensamente para buscar genes que pueden contribuir a las principales enfermedades poligénicas en los seres humanos.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 9.6

Identificación y localización de genes de enfermedades humanas

- Las enfermedades hereditarias y otros rasgos en los seres humanos muestran tres patrones principales de herencia: autosómico dominante, autosómico recesivo y recesivo ligado al cromosoma X (véase fig. 9-44).
- Los genes localizados en el mismo cromosoma pueden separarse mediante entrecruzamiento durante la meiosis y producir así nuevos genotipos recombinantes en la siguiente generación. (véase fig. 9-45).
- Los genes para las enfermedades humanas y otros rasgos pueden ser mapeados determinando su cosegregación con marcadores cuyas localizaciones en el genoma son conocidas. Mientras más cercano está un gen a un marcador en particular es más probable que cosegregen.
- El mapeo de los genes humanos con gran precisión requiere miles de marcadores moleculares distribuidos a lo largo de los cromosomas. Los marcadores más útiles son diferencias en la secuencia de DNA (polimorfismos) entre los individuos en las regiones no codificadoras del genoma.
- Los polimorfismos del DNA útiles en el mapeo de genes humanos incluyen los polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), los polimorfismos de un nucleótido simple (SNP) y las repeticiones de secuencias simples (SSR).
- El mapeo de ligamiento a menudo puede localizar el gen de una enfermedad humana en una región cromosómica que incluye tanto como 50 genes. Para identificar el gen de interés dentro de esta región candidata se requiere el análisis de la expresión y la comparación de secuencias de DNA entre individuos de tipo silvestre e individuos afectados por la enfermedad.
- Algunas enfermedades hereditarias pueden ser el resultado de mutaciones en diferentes genes en diferentes individuos (heterogeneidad genética). La aparición y la severidad de otras enfermedades dependen de la presencia de alelos mutantes de múltiples genes en los mismos individuos (rasgos poligénicos). El mapeo de los genes asociados con esas enfermedades es muy difícil porque la aparición de la enfermedad no puede ser rápidamente correlacionada con un único locus cromosómico.

PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO

Como ilustran los ejemplos en este capítulo y a lo largo del libro, el análisis genético es el fundamento de nuestra comprensión de muchos procesos fundamentales de la biología celular. Al examinar las consecuencias fenotípicas de las mutaciones que inactivan un gen en particular, los genetistas pueden conectar el conocimiento acerca de la secuencia, la estructura y la actividad bioquímica de la proteína codificada con su función en el contexto de una célula viviente o un organismo multicelular. El enfoque clásico para hacer estas conexiones tanto

en los seres humanos como en los organismos más simples y experimentalmente accesibles, ha sido identificar nuevas mutaciones de interés basadas en sus fenotipos y luego aislar el gen afectado y su producto proteico. Aunque los científicos continúan utilizando este enfoque para analizar procesos y vías bioquímicas celulares fundamentales, la disponibilidad de información de la secuencia genómica completa para la mayoría de los organismos experimentales comunes ha cambiado fundamentalmente el modo de conducir los experimentos genéticos. Empleando diversos métodos computacionales, los científicos han identificado la mayoría de las secuencias de genes codificadoras de proteínas de *E. coli*, levadura, *Drosophila*, *Arabidopsis*, el ratón y los seres humanos. Las secuencias génicas, a su vez, revelan la principal secuencia aminoacídica de los productos proteicos codificados, proveyéndonos una lista casi completa de las proteínas halladas en cada uno de los principales organismos experimentales. De esta manera, el enfoque empleado por la mayoría de los investigadores ha virado del descubrimiento de nuevos genes y proteínas al descubrimiento de las funciones de genes y proteínas cuyas secuencias ya son conocidas. Una vez identificado un gen de interés, la información de la secuencia genómica acelera enormemente las manipulaciones siguientes del gen incluida su inactivación planeada, para aprender más acerca de su función. Ya se han producido todos los ≈6000 posibles genes *knockouts* en las levaduras; esta relativamente pequeña pero completa colección de mutantes se ha vuelto el punto de inicio preferido para muchos análisis genéticos en levaduras. Similarmente, grupos de vectores para la inactivación RNAi de un gran número de genes definidos en el nematodo *C. elegans* permiten llevar a cabo análisis genéticos eficientes en este organismo multicelular. Siguiendo la trayectoria de avances recientes, parece bastante probable que en un futuro previsible el método de RNAi o el *knockout* se usen para inactivar cada gen en los principales organismos modelo, incluido el ratón.

En el pasado, un científico podía perder muchos años estudiando sólo un gen, hoy en día se estudian conjuntos completos de genes de una sola vez. Por ejemplo, con las micromatrices de DNA se puede medir el nivel de expresión de todos los genes en un organismo casi tan fácilmente como la expresión de un único gen. Uno de los grandes desafíos para los genetistas en el siglo XXI será explotar la enorme cantidad de información disponible acerca de la función y regulación de los genes para adquirir una comprensión fundamental de la organización de las complejas vías bioquímicas y redes reguladoras.

PALABRAS CLAVE

alelos *352*
clon *364*
clonación de DNA *361*
complementación *357*
DNA complementario (cDNA) *365*
DNA recombinante *361*
dominante *353*
enzimas de restricción *361*
fenotipo *352*
genes *knockout* *389*
genómica *352*
genoteca *352*
genotipo *352*
heterocigoto *353*
hibridación *367*
homocigoto *353*
interferencia de RNA (RNAi) *393*
ligamiento (linkage)*396*
micromatriz de DNA *385*
mutación *352*
mutaciones sensibles a la temperatura *356*
plásmido *363*
reacción en cadena de la polimerasa (PCR) *375*
recesivo *353*
recombinación *387*
segregación *355*
sondas *367*
transfección *378*
Northern blot *377*
Southern blot *377*
transformación *363*
transgenes *392*
vectores *361*

REVISIÓN DE CONCEPTOS

1. Las mutaciones genéticas pueden proporcionar una comprensión más profunda acerca de los mecanismos de procesos celulares complejos o evolutivos. ¿Cuál es la diferencia entre las mutaciones dominantes y recesivas? ¿Qué es una mutación sensible a la temperatura y de qué manera es útil este tipo de mutación?

2. Se pueden utilizar numerosos enfoques experimentales para analizar las mutaciones. Describa cómo pueden utilizarse los análisis de complementación para revelar si dos mutaciones están en el mismo o en genes distintos. ¿Qué son las mutaciones supresoras y las mutaciones letales sintéticas?

3. Las enzimas de restricción y la DNA ligasa cumplen papeles esenciales en la clonación de DNA. ¿Cómo es que una bacteria que produce una enzima de restricción no corta su propio DNA? Describa algunas características generales de los sitios de restricción de la enzima. ¿Cuáles son los tres tipos de extremos de DNA que pueden generarse después de cortar el DNA con enzimas de restricción? ¿Qué reacción cataliza la DNA ligasa?

4. Los plásmidos bacterianos y el fago λ sirven como vectores de clonación. Describa las características esenciales de un vector plasmídico y de un fago λ. ¿Cuáles son las ventajas y las aplicaciones de los plásmidos y de los fagos λ como vectores de clonación?

5. Una genoteca es una colección de clones, cada uno con un fragmento diferente de DNA inserto en un vector de clonación. ¿Cuál es la diferencia entre una genoteca y una de DNA genómico? ¿Cómo puede usted utilizar la hibridación o la expresión para examinar una genoteca en busca de un gen específico? ¿Qué cebadores de oligonucleótidos podrían sintetizarse como sondas para examinar una genoteca en busca del gen que codifica el péptido Met-Pro-Glu-Phe-Tyr?

6. En 1993, Kerry Mullis ganó el premio Nobel de Química por su invención del proceso PCR. Describa los tres pasos de cada ciclo de una reacción PCR. ¿Por qué el descubrimiento de una DNA polimerasa termoestable (p. ej., la Taq polimerasa) fue tan importante para el desarrollo de la PCR?

7. El Southern y el Northern *blot* son herramientas poderosas en la biología molecular; describa las técnicas para cada una. ¿Cuáles son las aplicaciones de estas dos técnicas de transferencia?

8. Numerosas proteínas extrañas han sido expresadas en células bacterianas y de mamíferos. Describa las características esenciales de un plásmido recombinante requeridas para expresar un gen extraño. ¿Cómo puede usted modificar la proteína extraña para facilitar su purificación? ¿Cuál es la ventaja de expresar una proteína en las células de mamíferos o en las bacterianas?

9. ¿Por qué la búsqueda de genes basada en la presencia de ORF (marcos abiertos de lectura) es más útil para los genomas bacterianos que para los genomas eucariontes?¿Qué son los genes parálogos y ortólogos?¿Cuáles son algunas de las explicaciones para el descubrimiento de que los seres humanos son organismos mucho más complejos que el nematodo *C. elegans*, conteniendo a pesar de esto menos del doble del número de genes (35.000 frente a 19.000)?

10. Un análisis global de la expresión génica puede lograrse utilizando una micromatriz de DNA. ¿Qué es una micromatriz? ¿Cómo se utilizan esos micromatrices para estudiar la expresión génica? ¿En qué difieren los experimentos con micromatrices de los Northern *blot* descritos en la pregunta 7?

11. La capacidad para modificar selectivamente el genoma en el ratón ha revolucionado la genética de los ratones. Describa el procedimiento para generar un ratón *knockout* en un locus genético específico. ¿Cómo puede utilizarse el sistema *loxP*-Cre para inactivar condicionalmente a un gen?¿ Cuál es una aplicación médica importante de los ratones *knockout*?

12. Dos métodos para inactivar funcionalmente un gen sin alterar la secuencia génica son las mutaciones dominantes negativas y la interferencia de RNA (RNAi). Describa cómo cada método puede inhibir la expresión de un gen.

13. Los polimorfismos de DNA pueden emplearse como marcadores de DNA. Describa las diferencias entre los polimorfismos RFLP, SNP y SSR. ¿Cómo pueden utilizarse estos marcadores para los estudios de mapeo de DNA?

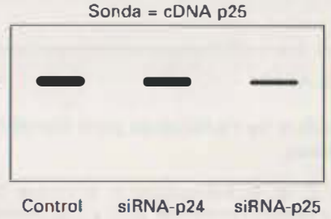
14. Los estudios de ligamiento genético pueden localizar aproximadamente la posición cromosómica del gen de una "enfermedad". Describa cómo los análisis de la expresión y la secuencia de DNA pueden utilizarse para identificar el gen de una "enfermedad".

ANÁLISIS DE LOS DATOS

La interferencia de RNA (RNAi) es un proceso de silenciamiento de genes postranscripcional mediado por moléculas cortas de RNA de hebra doble llamadas siRNA (RNA interferentes pequeños, *small interfering, RNAs*). En las células de los mamíferos, la transfección de 21-22 nucleótidos siRNA conduce a la degradación de moléculas de mRNA que contienen la misma secuencia que el siRNA. En el siguiente experimento, se utilizan siRNA y ratones *knockout* para investigar dos proteínas de superficie emparentadas designadas como p24 y p25 que se sospecha son receptores celulares para la incorporación de un nuevo virus aislado.

a. Para probar la eficacia de la RNAi en las células, los siRNA específicos de la proteína de superficie p24 (siRNA–p24) y p25 (siRNA–p25) son transfectados individualmente a células de ratón cultivadas. Se extrae el RNA de estas células transfectadas y el mRNA para las proteínas p24 y p25 se detecta mediante inmunotransferencia *Northern blot* empleando cDNA p24 marcado o cDNA p25 como sondas. El control para este experimento es una transfección fingida sin siRNA. ¿Qué concluye a partir de este *Northern blot* acerca de la especificidad de los siRNA por sus mRNA diana?





b. A continuación, se investiga la capacidad de los siRNA para inhibir la replicación viral. Las células son transfectadas con siRNA–p24 o siRNA–p25 o con siRNA para una proteína viral esencial. Veinticuatro horas después, las células transfectadas están infectadas con el virus. Tras un período de incubación adicional, las células se recogen y se lisan. El número de virus producidos por cada cultivo se muestra abajo. El control es una transfección fingida sin ningún siRNA. ¿Qué concluye acerca del papel de las p24 y p25 en la incorporación del virus?¿Por qué el siRNA de la proteína viral podría ser más eficaz que el siRNA para los receptores en reducir el número de virus?

Tratamiento celular	Número de virus/mL
Control	1×10^7
siRNA–p24	3×10^6
siRNA–p25	2×10^6
siRNA–p24 y siRNA–p25	1×10^4
siRNA para proteína viral	1×10^2

c. Para investigar el papel de las proteínas p24 y p25 en la replicación viral en los ratones vivos, se generan ratones transgénicos que carecen de genes para p24 y p25. El sistema de *knockout* condicional *loxP*-Cre se utiliza para eliminar selectivamente los genes en las células del hígado o del pulmón. Los ratones de tipo silvestre y los *knockout* son infectados con virus. Luego de un período de incubación de 24 horas, se mata a los ratones y se examinan los tejidos del pulmón y del hígado para determinar la presencia (infectado) o ausencia (normal) del virus mediante inmunohistoquímica. ¿Qué indica esta información acerca de los requerimientos celulares para la infección viral en diferentes tejidos?

	Tejido examinado	
Ratón	Hígado	Pulmón
Tipo silvestre	infectado	infectado
Knockout de p24 en el hígado	normal	infectado
Knockout de p24 en el pulmón	infectado	infectado
Knockout de p25 en el hígado	infectado	infectado
Knockout de p25 en el pulmón	infectado	normal

d. Al realizar *Northern blot* en diferentes tejidos de ratones de tipo silvestre, usted encuentra que el p24 se expresa en el hígado, pero no en los pulmones, mientras que el p25 se expresa en los pulmones, pero no en el hígado. Basado en toda esta información que recogió, proponga un modelo para explicar cuál(es) proteína(s) está(n) involucrada(s) en el ingreso del virus en el hígado y las células de los pulmones. ¿Predecía que las células de ratón cultivadas utilizadas en las partes (a) y (b) expresarán p24, p25 o ambas proteínas?

BIBLIOGRAFÍA

Análisis genético de mutaciones para identificar y estudiar genes

Adams, A. E. M., D. Botstein, and D. B. Drubin. 1989. A yeast actin-binding protein is encoded by *sac6*, a gene found by suppression of an actin mutation. Science 243:231.

Griffiths, A. G. F., et al. 2000. An Introduction to Genetic Analysis, 7th ed. W. H. Freeman and Company.

Guarente, L. 1993. Synthetic enhancement in gene interaction. a genetic tool comes of age. Trends Genet. 9:362-366.

Hartwell, L. H. 1967. Macromolecular synthesis of temperature-sensitive mutants of yeast. J. Bacteriol. 93:1662.

Hartwell, L. H. 1974. Genetic control of the cell division cycle in yeast. Science 183:46.

Nüsslein-Volhard, C., and E. Wieschaus. 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. Nature 287:795-801.

Simon, M. A., et al. 1991. Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the seven-less protein tyrosine kinase. Cell 67:701-716.

Tong, A. H., et al. 2001. Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. Science 294:2364-2368.

Clonación del DNA mediante métodos de DNA recombinante

Ausubel, F. M., et al. 2002. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley.

Gubler, U., and B. J. Hoffman. 1983. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. Gene 25:263-289.

Han, J. H., C. Stratowa, and W. J. Rutter. 1987. Isolation of full-length putative rat lysophospholipase cDNA using improved methods for mRNA isolation and cDNA cloning. Biochem. 26:1617-1632.

Itakura, K., J. J. Rossi, and R. B. Wallace, 1984. Synthesis and use of synthetic oligonucleotides. Ann. Rev. Biochem. 53:323-356.

Maniatis, T., et al. 1978. The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA. Cell 15:687-701.

Nasmyth, K. A., and S. I. Reed. 1980. Isolation of genes by complementation in yeast: molecular cloning of a cell-cycle gene. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 77:2119-2123.

Nathans, D., and H. O. Smith. 1975. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. Ann. Rev. Biochem. 44:273-293.

Roberts, R. J., and D. Macelis. 1997. REBASE—restriction enzymes and methylases. Nucl. Acids Res. 25:248-262. Information on accessing a continuously updated database on restriction and modification enzymes at http://www.neb.com/rebase.

Thomas, M., J. R. Cameron, and R. W. Davis. 1974. Viable molecular hybrids of bacteriophage lambda and eukaryotic DNA. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 71:4579-4583.

Sambrook, J., and D. Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory.

Caracterización y uso de fragmentos clonados de DNA

Andrews, A. T. 1986. Electrophoresis, 2d ed. Oxford University Press.

Erlich, H., ed. 1992. PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification. W. H. Freeman and Company.

Pellicer, A., M. Wigler, R. Axel, and S. Silverstein. 1978. The transfer and stable integration of the HSV thymidine kinase gene into mouse cells. Cell 41:133-141.

Saiki, R. K., et al. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-491.

Sanger, F. 1981. Determination of nucleotide sequences in DNA. Science 214:1205-1210.

Souza, L. M., et al. 1986. Recombinant human granulocyte-colony stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. Science 232:61-65.

Wahl, G. M., J. L. Meinkoth, and A. R. Kimmel. 1987. Northern and Southern blots. Meth. Enzymol. 152:572-581.

Wallace, R. B., et al. 1981. The use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes. II: Hybridization of oligonucleotides of mixed sequence to rabbit β-globin DNA. Nucl. Acids Res. 9:879-887.

Genómica: análisis amplio del genoma, de la estructura de genes y de la expresión

BLAST Information can be found at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Eucation/BLASTinfo/information3.htm

Ballester, R., et al. 1990. The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. Cell 63:851-859.

Chervitz, S. A., et al. 1998. Comparison of the complete protein sets of worm and yeast: orthology and divergence. Science 282:2022-2028.

Gene Ontology Consortium. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. Nature Gen. 25:25-29.

Lander, E. S., et al. 2001 Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409:860-921.

Rubin, G. M., et al. 2000. Comparative genomics of the eukaryotes. Science 287:2204-2215.

Waterston, R. H., et al. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. Nature 420:520-562.

Inactivación de la función de genes específicos en los eucariontes

Capecchi, M. R. 1989. Altering the genome by homologous recombination. Science 244:1288-1292.

Deshaies, R. J., et al. 1988. A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeprides. Nature 332:800-805.

Fire, A., et al. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorabditis elegans*. Nature 391:806-811.

Gu, H., et al. 1994. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. Science 265:103-106.

Zamore, P. D., T. Tuschl, P. A. Sharp, and D. P. Bartel. 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell 101:25-33.

Zimmer, A. 1992. Manipulating the genome by homologous recombination in embryonic stem cells. Ann. Rev. Neurosci. 15:115.

Identificación y localización de genes de enfermedades humanas

Botstein, D., et al. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Genet. 32:314-331.

Donis-Keller, H., et al. 1987. A genetic linkage map of the human genome. Cell 51:319-337.

Hartwell, et al. 2000. Genetics: From Genes to Genomes McGraw-Hill.

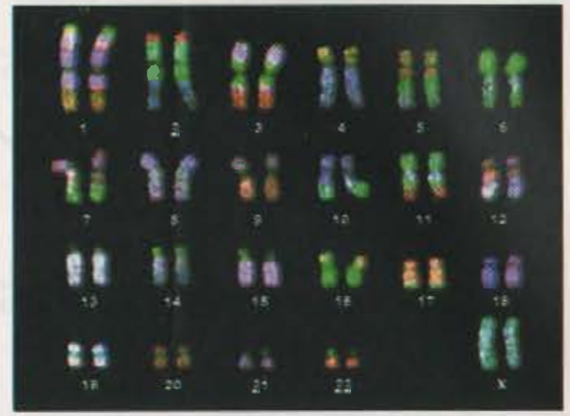
Hastbacka, T., et al. 1994. The diastrophic dysplasia gene encodes a novel sulfate transportet: positional cloning by fine-structure linkage disequilibrium mapping. Cell 78:1073.

Orita, M., et al. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerasc chain reaction. Genomics 5:874.

Tabor, H. K., N. J. Risch, and R. M. Myers. 2002. Opinion: candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. Nat. Rev. Genet. 3:391-397.

10

ESTRUCTURA MOLECULAR DE GENES Y CROMOSOMAS



Estos cromosomas pintados por RxFISH con colores brillantes son tan hermosos como útiles para revelar las anomalías cromosómicas y para comparar cariotipos de diferentes especies. (● Department of Clinical Cytogenetics, Addenbrookes Hospital/Photo Researchers, Inc.)

Para el comienzo del siglo XXI, los biólogos moleculares completaron la secuenciación de los genomas de cientos de virus, numerosas bacterias y de la levadura *S. cerevisiae*, un eucarionte unicelular. Además, hoy se conoce la gran mayoría de las secuencias de los genomas de muchos eucariontes multicelulares que incluyen el nematodo *C. elegans*, la mosca de la fruta *D. melanogaster* y los humanos (véase fig. 9-34). Los análisis detallados de esta información de secuenciación revelaron que una gran porción de los genomas de los eucariontes superiores no codifican mRNA ni ningún otro RNA requerido por el organismo. Notablemente, ese DNA no codificador constituye más del 95% del DNA cromosómico.

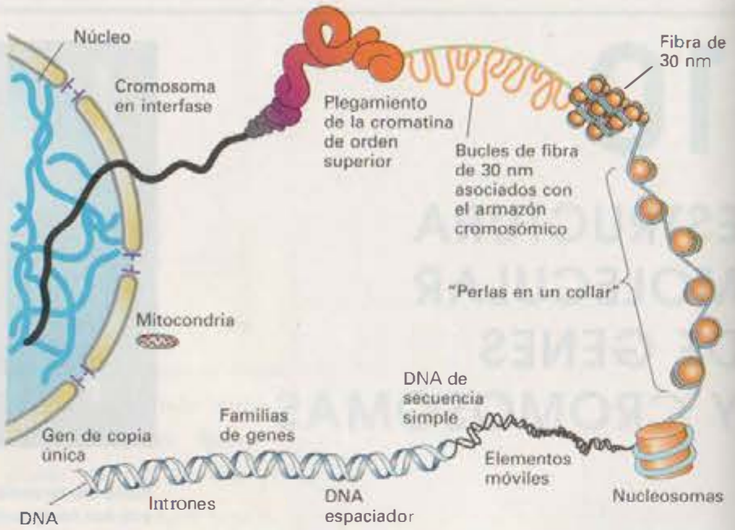
El DNA no codificador en los organismos multicelulares contiene muchas regiones que son similares, pero no idénticas. Las variaciones dentro de algunos tramos de este *DNA repetitivo* son tan grandes que cada persona puede ser distinguida por una "huella digital" *(fingerprint)* de DNA basada en estas variaciones de secuencia. Más aún, algunas secuencias de DNA repetitivo no se hallan en posiciones constantes en el DNA de individuos de las mismas especies. Estos elementos "móviles" de DNA, presentes tanto en los organismos eucariontes como en los procariontes, pueden causar mutaciones cuando se mueven a nuevos sitios en el genoma. Aunque no suelen tener funciones en el ciclo vital de un organismo individual, los elementos móviles probablemente desempeñaron un papel importante en la evolución.

En los eucariontes superiores, las regiones de DNA que codifican proteínas –es decir, los genes– se sitúan en medio de esa extensión de DNA aparentemente no funcional. Además del DNA no funcional *entre* genes, los intrones no codificadores suelen encontrarse *dentro* de genes de plantas y animales multicelulares. Los intrones son poco frecuentes en los eucariontes unicelulares y muy raros en las bacterias. La secuenciación de los genes codificadores de las mismas proteínas en diversas especies mostró que la presión evolutiva selecciona el mantenimiento de secuencias relativamente similares en las regiones codificadoras, o exones. En cambio, entre los intrones existe una amplia variación de secuencia, incluida la pérdida total, lo que sugiere que la mayoría de las secuencias de intrones tienen poca significación funcional.

La longitud del DNA celular es un problema sustancial con el que deben lidiar las células. El DNA de una única célula humana, que mide alrededor de 2 metros de longitud total, debe ser contenido dentro de células con diámetros de menos de 10 μm, una razón de compactación mayor de 10^5. Las proteínas eucariontes especializadas que están asociadas con el DNA nuclear lo pliegan y organizan para formar las estructuras de DNA y proteínas visualizadas como cromosomas individuales durante la mitosis. Las mitocondrias y los cloroplastos también contienen DNA, probablemente rema-

CONTENIDO

10.1 Definición molecular de gen
10.2 Organización cromosómica de los genes y del DNA no codificador
10.3 DNA móvil
10.4 Organización estructural de los cromosomas eucariontes
10.5 Morfología y elementos funcionales de los cromosomas eucariontes
10.6 DNA de los orgánulos



▶ Fig. 10-1. Vista general de la estructura de genes y cromosomas. El DNA de los eucariontes superiores consiste en secuencias únicas y repetidas. Sólo un 5% del DNA humano codifica proteínas y RNA funcionales y secuencias reguladoras que controlan su expresión; el resto es meramente DNA espaciador entre genes e intrones dentro de los genes. La mayoría de este DNA, ~50% en los seres humanos, deriva de elementos móviles de DNA, simbiontes genéticos que contribuyeron a la evolución de los genomas contemporáneos. Cada cromosoma consiste en una única molécula larga de DNA de más de ~280 Mb en los seres humanos, organizada en niveles crecientes de condensación por las proteínas histonas y no histonas con las cuales forma complejos intrincados. En la mitocondria y los cloroplastos se localizan moléculas de DNA mucho más pequeñas.

nentes evolutivos de sus orígenes, que codifica componentes esenciales de estos orgánulos vitales.

Comenzamos este capítulo con una definición molecular de los genes y de las complejidades que surgen en los organismos superiores a partir del procesamiento de precursores de mRNA en mRNA con cortes y empalmes alternativos. Luego abordaremos las principales clases de DNA eucarionte y las propiedades especiales del DNA móvil. También consideraremos el empaquetamiento de DNA y proteínas en complejos compactos, la estructura en gran escala de los cromosomas, y los elementos funcionales requeridos para la duplicación y segregación cromosómica. En la sección final, consideraremos el DNA de los orgánulos y cómo difiere del DNA nuclear. En la figura 10-1 se reseñan cómo se interrelacionan estos temas.

10.1 Definición molecular de gen

En términos moleculares, un gen se define como *la secuencia completa de ácidos nucleicos necesaria para la síntesis de un producto génico funcional (polipéptido o RNA)*. De acuerdo con esta definición, un gen incluye más que los nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos de una proteína, denominada *región codificadora;* incluye también todas las secuencias de DNA requeridas para la síntesis de una transcripto particular de RNA. En los genes eucariontes las regiones de control de la transcripción conocidas como **secuencias amplificadoras,** o simplemente **amplificadores** (***enhancers***) pueden estar a 50 kb o más de distancia de la región codificadora. Otras regiones no codificadoras críticas en los genes eucariontes son las secuencias que especifican la escisión 3′ y la poliadenilación, conocidas como *sitios poli(A)*, y las de eliminación de intrones de RNA de los transcriptos primarios de RNA, conocidas como *sitios de corte y empalme* (*splicing*) (véase fig. 4-14). Las mutaciones en estas señales de procesamiento del RNA evitan la expresión de un mRNA funcional y por lo tanto del polipéptido codificado.

Aunque la mayoría de los genes se transcriben a mRNA, que codifican proteínas, claramente algunas secuencias de DNA se transcriben a RNA que no codifican proteínas (p. ej., tRNA y rRNA). Sin embargo, debido a que el DNA que codifica los tRNA y rRNA puede causar fenotipos específicos cuando está mutado, estas regiones de DNA suelen denominarse *genes* de tRNA y rRNA, aunque los productos finales de estos genes son moléculas de RNA y no proteínas. Muchas otras moléculas de RNA descritas en los capítulos posteriores también se transcriben a partir de genes no codificadores de proteínas.

La mayoría de los genes eucariontes producen mRNA monocistrónicos y contienen intrones largos

Como tratamos en el capítulo 4, muchos mRNA bacterianos son *policistrónicos;* es decir, una única molécula de mRNA (p. ej., el mRNA codificado por el operón *trp*) incluye la región codificadora de varias proteínas que funcionan juntas en un proceso biológico. Por el contrario, la mayoría de los mRNA eucariontes son *monocistrónicos*; es decir, cada molécula de mRNA codifica una única proteína. Esta diferencia entre los mRNA monocistrónicos y policistrónicos se correlaciona con una diferencia fundamental en su traducción.

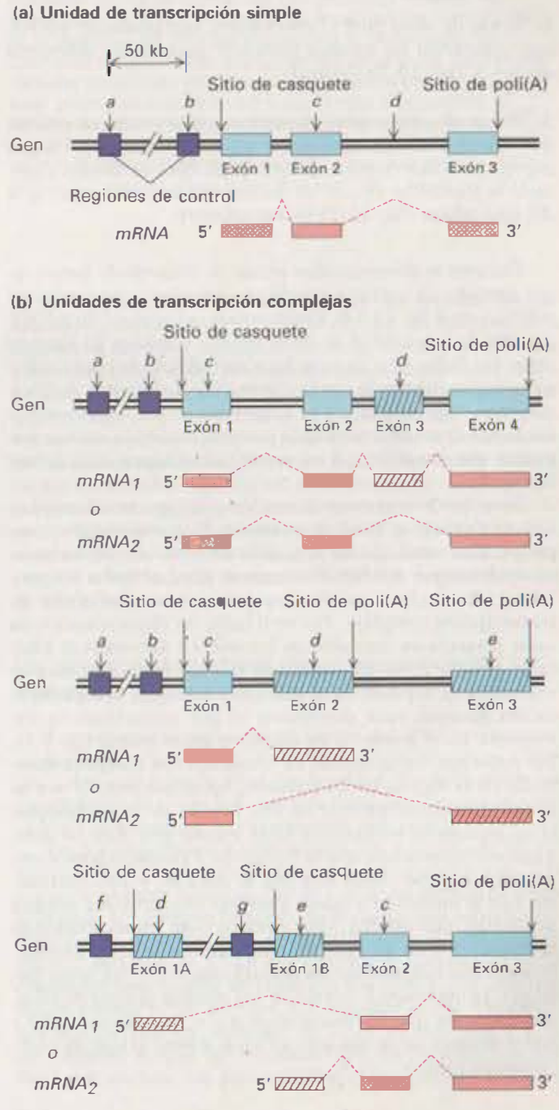
Dentro de un mRNA policistrónico bacteriano se localiza un sitio de unión ribosómico cerca del sitio de inicio para cada una de las regiones codificadoras de proteínas, o cistrones, en el mRNA. La iniciación de la traducción puede comenzar en cualquiera de estos múltiples sitios internos, que producen múltiples proteínas (véase fig. 4-12a). Sin embargo, en la mayoría de los mRNA eucariontes, la estructura casquete 5′ dirige la unión de los ribosomas y la traducción comienza en el codón de inicio AUG más cercano (véase fig. 4-12b). Como resultado, la traducción sólo comienza en este sitio. En muchos casos, los transcriptos primarios de los genes eucariontes codificadores de proteínas se procesan a un único tipo de mRNA, que es traducido para dar un único tipo de polipéptido (véase fig. 4-14).

A diferencia de los genes bacterianos y de levaduras, que suelen carecer de intrones, la mayoría de los genes de las plantas y de los animales multicelulares contienen intrones, que se eliminan durante el procesamiento del RNA. En muchos casos, los intrones en un gen son considerablemente más largos que los exones. Por ejemplo, de los ≈50.000 pares de bases que componen muchos genes humanos que codifican proteínas de tamaño promedio, más del 95% están presentes en los intrones y en las regiones no codificadoras 5′ y 3′. Muchas proteínas grandes en los organismos superiores tienen dominios repetidos y son codificadas por genes que consisten en repeticiones de exones similares separados por intrones de longitud variable. Un ejemplo es la fibronectina, un componente de la matriz extracelular codificado por un gen que contiene múltiples copias de tres tipos de exones (véase fig. 4-15).

En los genomas eucariontes se encuentran unidades de transcripción simples y complejas

El grupo de genes que forma un operón bacteriano comprende una única **unidad de transcripción,** que se transcribe a partir de un promotor particular a un único transcripto primario. En otras palabras, los genes y las unidades de transcripción a menudo son distinguibles en los procariontes. Por el contrario, la mayoría de los genes eucariontes y las unidades de transcripción suelen ser idénticas y los dos términos se emplean en forma intercambiable. Sin embargo, las unidades de transcripción eucariontes se clasifican en dos tipos, según el destino del transcripto primario.

El transcripto primario producido a partir de una *única* unidad de transcripción se procesa para producir un único tipo de mRNA y codifica una única proteína. Las mutaciones en los exones, intrones y regiones de control de la transcripción pueden influir en la expresión de la proteína codificada por una unidad de transcripción simple (fig. 10-2a).



▶ Fig. 10-2. Comparación de las unidades de transcripción eucariontes simples y complejas. (a) Una unidad de transcripción simple incluye una región que codifica una proteína y se extiende desde el sitio del casquete 5′ hasta el sitio poli(A) 3′, y las regiones de control asociadas. Los intrones se sitúan entre los exones (rectángulos azules) y son eliminados durante el procesamiento del transcripto primario (líneas rojas discontinuas); por lo tanto no aparecen en el mRNA monocistrónico funcional. Las mutaciones en una región de control de la transcripción (*a, b*) pueden reducir o evitar la transcripción, disminuyendo o impidiendo la síntesis de la proteína codificada. Una mutación dentro de un exón (*c*) puede producir en una proteína anormal con actividad disminuida. Una mutación dentro de un intrón (*d*) que introduce un nuevo sitio de corte y empalme produce un mRNA con proceso de corte y empalme anormal, que codifica una proteína no funcional. (b) Las unidades de transcripción complejas producen transcriptos primarios que pueden procesarse de maneras alternativas. (*Arriba*) Si un transcripto primario contiene sitios de corte y empalme alternativos, puede ser procesado en mRNA con los mismos exones 5′ y 3′, pero con distintos exones internos. (*Medio*) Si un transcripto primario tiene dos sitios poli(A), puede ser procesado en mRNA con exones 3′ alternativos. (*Abajo*) Si los promotores alternativos (*f* o *g*) están activos en diferentes tipos de células, el $mRNA_1$, producido en un tipo de células en la cual *f* está activado, tiene un exón diferente (1A) del que tiene el $mRNA_2$, el cual es producido en un tipo de célula en el cual *g* está activado (y donde se usa el exón 1B). Las mutaciones en las regiones de control (*a* y *b*) y las designadas *c* dentro de los exones compartidos por los mRNA alternativos afectan las proteínas codificadas por ambos mRNA procesados alternativamente. En cambio, las mutaciones (designadas *d* y *e*) dentro de los exones únicos de uno de los mRNA alternativamente procesado sólo afectan la proteína traducida a partir de ese mRNA. Para genes que se transcriben de diferentes promotores en diferentes tipos de células *(abajo)*, las mutaciones en diferentes regiones de control (*f* y *g*) afectan la expresión sólo en el tipo de célula en la cual la región de control es activa.

En el caso de las unidades de transcripción *complejas*, bastante comunes en los organismos multicelulares, el transcripto primario de RNA puede procesarse en más de una forma y llevar a la formación de mRNA que contiene diferentes exones. Sin embargo, cada mRNA es monocistrónico y es traducido a un único polipéptido, traducción que se inicia casi siempre en el primer AUG en el mRNA. Múltiples mRNA pueden surgir a partir de un transcripto primario mediante tres formas (fig. 10-2b):

1. El uso de diferentes sitios de corte y empalme produce mRNA con los mismos exones 5′ y 3′, pero con diferentes exones internos. En la figura 10-2b (*arriba*) se muestra un ejemplo de este tipo de procesamiento alternativo de RNA, el *salteo de exones*.

2. El uso de sitios poli(A) alternativos, que producen mRNA que comparten los mismos exones 5′ pero tienen diferentes exones 3′ (fig. 10-2b [*centro*]).

3. El uso de promotores alternativos, que producen mRNA que tienen diferentes exones 5′ y exones 3′ comunes. Un gen expresado selectivamente en dos o más tipos de células a menudo se transcribe a partir de distintos promotores específicos del tipo celular (fig. 10-2b [*parte inferior*]).

Durante la diferenciación sexual de *Drosophila* tienen lugar ejemplos de los tres tipos de procesamiento alternativo de mRNA (véase fig. 12-14). Comúnmente, se produce un mRNA a partir de una unidad de transcripción compleja en algunos tipos de células y en otras se hace un mRNA alternativo. Por ejemplo, las diferencias en la eliminación de intrones de RNA del transcripto primario de fibronectina en los fibroblastos y los hepatocitos determina si la proteína secretada incluye dominios que se adhieren a las superficies celulares o no (véase fig. 4-15).

La relación entre una mutación y un gen no siempre es directa cuando se trata de unidades de transcripción complejas. Una mutación en la región de control o en un exón compartido por mRNA alternativos afectará todas las proteínas alternativas codificadas por una unidad dada de transcripción compleja. Por otro lado, las mutaciones en un exón presente en uno sólo de los mRNA alternativos afectarán sólo la proteína codificada por ese mRNA. Como se explicó en el capítulo 9, se utilizan pruebas de **complementación genética** para determinar si dos mutaciones se encuentran en el mismo o en distintos genes (véase fig. 9-7). Sin embargo, en la unidad de transcripción compleja mostrada en la figura 10-2b (*centro*), las mutaciones *d* y *e* se complementarían entre sí en una prueba de complementación, aunque se encuentren en el mismo gen. Esto se debe a que un cromosoma con la mutación *d* puede expresar una proteína normal codificada por el $mRNA_2$ y un cromosoma con la mutación *e* puede expresar una proteína normal codificada por $mRNA_1$. Sin embargo, un cromosoma con la mutación *c* en un exón común a ambos mRNA no complementaría ninguna de las mutaciones *d* o *e*. En otras palabras, la mutación *c* estaría en los mismos grupos de complementación que las mutaciones *d* y *e*, ¡aun cuando *d* y *e* por sí mismas no se encuentren en el mismo grupo de complementación!

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 10.1

Definición molecular de gen

- En términos moleculares, un gen es toda la secuencia de DNA requerida para la síntesis de una proteína funcional o molécula de RNA. Además de las regiones codificadoras (exones), un gen incluye las regiones de control y a veces intrones.
- La mayoría de los genes bacterianos y de levaduras carecen de intrones, mientras que la mayoría de los genes en los organismos multicelulares contienen intrones. La longitud total de las secuencias de intrones a menudo es mucho más larga que la de las secuencias de exones.
- Una unidad de transcripción eucarionte simple produce un único mRNA monocistrónico, que es traducido a una única proteína.
- Una unidad de transcripción eucarionte compleja se transcribe a un transcripto primario que puede ser procesado a dos o más mRNA monocistrónicos diferentes según las elecciones de los sitios de corte y empalme o sitios de poliadenilación (véase fig. 10-2b).
- Muchas unidades de transcripción complejas (p. ej., el gen de la fibronectina) expresan un mRNA en un tipo celular y un mRNA alternativo en un tipo celular diferente.

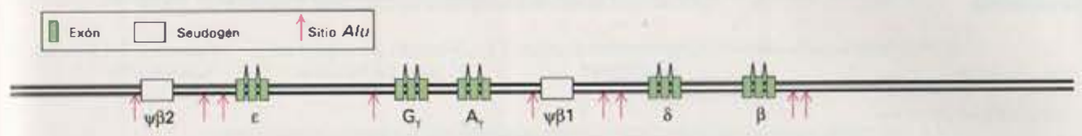
10.2 Organización cromosómica de los genes y del DNA no codificador

Habiendo revisado la relación entre las unidades de transcripción y los genes, consideraremos ahora la organización de los genes en los cromosomas y la relación entre las secuencias de DNA no codificadoras y codificadoras.

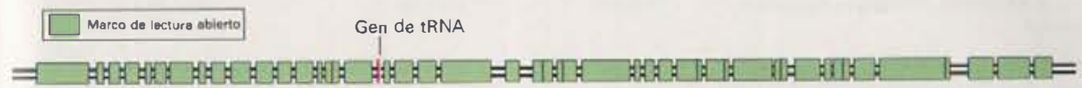
Los genomas de numerosos organismos contienen mucho DNA no funcional

Las comparaciones del total de DNA cromosómico por células de diversas especies sugirieron en un principio que mucho del DNA en ciertos organismos no codifica RNA o no tiene ninguna función reguladora o estructural. Por ejemplo, las levaduras, las moscas de la fruta, las gallinas y los seres humanos tienen cantidades cada vez mayores de DNA en sus conjuntos de cromosomas haploides (12; 180; 1300 y 3300 Mb, respectivamente), de acuerdo con lo que percibimos es la complejidad creciente de estos organismos. Aún así, los vertebrados con la mayor cantidad de DNA por célula son anfibios, que sin duda son menos complejos que los seres humanos en estructura y comportamiento. Aún más sorprendente, la especie protozoaria unicelular *Amoeba dubia* tiene 200 veces más DNA por célula que los seres humanos. Por ejemplo, los tulipanes tienen 10 veces más DNA por célula que las personas. El contenido de DNA por célula también varía en forma considerable entre especies estrechamente relacionadas. Todos los insectos o todos los anfibios parecerían ser similarmente complejos, pero la cantidad de DNA haploide en las

(a) Grupo de genes de la β-globina humana (cromosoma 11)



(b) *S. cerevisiae* (cromosoma III)



▲ Fig. 10-3. Densidad comparada de genes en regiones de ≈80 kb del DNA genómico humano y de la levadura *S. cerevisiae*. (a) En el diagrama del grupo de genes de la β-globina en el cromosoma 11 humano, los cuadrados verdes representan los exones de los genes relacionados con la β-globina. Los exones cortados y empalmados juntos para formar un mRNA están conectados por púas similares a signos de intercalación. El grupo de genes de β-globina humana contiene dos seudogenes (blanco); estas regiones están relacionadas con genes símil-globina funcionales, pero que no se transcriben. Cada flecha roja indica la ubicación de una secuencia *Alu*, una secuencia repetida no codificadora de ≈300 bp que abunda en el genoma humano. (b) En el diagrama del DNA del cromosoma III de levadura, los cuadrados verdes indican marcos de lectura abiertos. La mayoría de estas secuencias codificadoras de proteínas probablemente sean genes funcionales sin intrones. Nótese la proporción de secuencias no codificadoras respecto de las codificadoras, mucho mayor en el DNA humano que en el DNA de la levadura. [Parte (a), véase F. S. Collins y S. M. Weissman, 1984, *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 31:315; parte (b), véase S. G. Oliver et al., 1992, *Nature* 357:28.]

especies de cada una de estas clases filogenéticas varía en un factor de 100.

El secuenciamiento detallado y la identificación de los exones en el DNA cromosómico proporcionaron evidencia directa de que los genomas de los eucariontes superiores contienen grandes cantidades de DNA no codificador. Por ejemplo, sólo una pequeña porción del grupo de genes β-globina de los seres humanos, de alrededor de 80 kb de largo, codifica proteínas (fig. 10-3a). Más aún, en comparación con otras regiones del DNA de los vertebrados, el grupo de genes β-globina es inusualmente rico en secuencias codificadoras de proteínas y los intrones en los genes globina son muchísimo más cortos que los de numerosos genes humanos. Por el contrario, una extensión típica de 80 kb de DNA de la levadura *S. cerevisiae*, un eucarionte unicelular (fig. 10-3b) contiene muchas secuencias codificadoras de proteínas estrechamente espaciadas sin intrones y bastante menos DNA no codificador.

La densidad de genes varía en gran medida en diferentes regiones del DNA cromosómico humano, desde regiones "ricas en genes", como el grupo β-globina, hasta grandes "desiertos" pobres en genes. Del 94% del DNA genómico humano que ha sido secuenciado, sólo un ≈1,5% corresponde a secuencias codificadoras de proteínas (exones). La mayoría de los exones humanos contiene 50-200 pares de bases, aunque el exón 3′ en muchas unidades de transcripción es mucho más grande. Los intrones humanos varían considerablemente en longitud. Aunque muchos tienen alrededor de ≈90 bp de largo, algunos son mucho más largos; su longitud media es de 3,3 kb. Se piensa que cerca de un tercio del DNA genómico humano se transcribe a precursores pre-mRNA, pero algo así como el 95% de estas secuencias se encuentran en los intrones, los cuales son eliminados mediante corte y empalme del RNA.

Diferentes presiones selectivas durante la evolución pueden dar cuenta, al menos en parte, de las notables diferencias en la cantidad de DNA no funcional en los organismos unicelulares y multicelulares. Por ejemplo, los microorganismos deben competir por cantidades limitadas de nutrientes en sus ambientes y, por ende, la economía metabólica es una característica crítica. Puesto que la síntesis de DNA no funcional requiere tiempo y energía, debe de haber existido presión selectiva para perder DNA no funcional durante la evolución de los microorganismos. Por otro lado, la selección natural en los vertebrados depende en gran medida de su comportamiento. La energía invertida en la síntesis de DNA es trivial en comparación con la energía metabólica requerida para el movimiento de los músculos; por consiguiente existió poca presión selectiva para eliminar el DNA no funcional en los vertebrados.

Los genes codificadores de proteínas pueden ser solitarios o pertenecer a una familia de genes

Las secuencias nucleotídicas dentro del DNA cromosómico pueden ser clasificadas sobre la base de la estructura y función, como se muestra en el cuadro 10-1. Examinaremos las propiedades de cada clase, comenzando con los genes codificadores de proteínas, que comprende dos grupos.

En los organismos multicelulares, un 25-50% de los genes codificadores de proteínas están representados sólo una vez en el genoma haploide, por lo que se los denomina genes *solitarios*. Un ejemplo bien estudiado de un gen solitario codificador de proteínas es el gen de la lisozima de pollo. La secuencia de DNA de 15-kb que codifica la lisozima de pollo constituye una unidad de transcripción simple que contiene cuatro exones y tres intrones. Las regiones que la flanquean, que se extienden por alrededor de 20 kb en dirección 5′ y 3′, no codifican ningún mRNA detectable. La lisozima, una enzima que escinde los polisacáridos de las paredes celulares

CUADRO 10-1 Principales clases de DNA eucarionte y su representación en el genoma humano

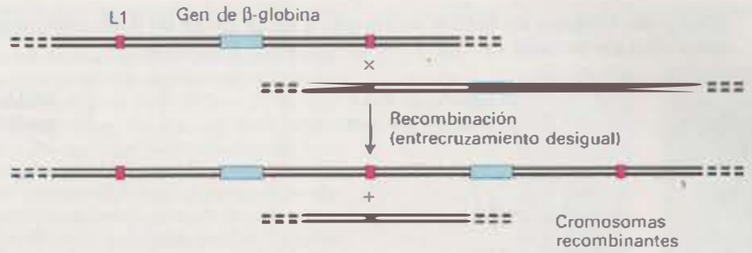
Clase	Longitud	Número de copias en el genoma humano	Fracción del genoma humano, %
Genes que codifican proteínas			
Genes solitarios	Variable	1	≈15* (0,8)†
Genes duplicados o divergentes en familias génicas	Variable	2-≈1000	≈15* (0,8)†
Genes que codifican rRNA, tRNA, snRNA e histona repetidos en tándem	Variable	20-300	0,3
DNA repetitivo			
DNA de secuencia simple	1-500 pb	Variable	3
Repeticiones intercaladas			
Transposones de DNA	2-3 kb	300.000	3
Retrotransposones con LTR	6-11 kb	440.000	8
Retrotransposones sin LTR			
LINE	6-8 kb	860.000	21
SINE	100-300 pb	1.600.000	13
Seudogenes procesados	Variable	1-≈100	≈0,4
DNA espaciador no clasificado	Variable	n.a.	≈25

*Unidades de transcripción completas, incluidos los intrones.
†Exones que codifican proteínas. El número total de genes codificadores de proteína humana se estima que es 30.000-35.000, pero este número está basado en métodos actuales para la identificación de genes en la secuencia del genoma humano y puede ser una subestimación.
n.a: no aplicable
FUENTE: E. S. Lander et al., 2001, *Nature* 409:860

bacterianas, es un componente abundante de la proteína de la clara de huevo de gallina y también se encuentra en las lágrimas humanas. Su actividad ayuda a mantener estéril la superficie del ojo y el huevo de gallina.

Los genes *duplicados* constituyen el segundo grupo de genes codificadores de proteínas. Éstas son regiones con secuencias cercanas, pero no idénticas, que suelen localizarse a 5-50 kb la una de la otra. En los genomas de los vertebrados, los genes duplicados probablemente constituyen la mitad de las secuencias de DNA codificadoras de proteínas. Un conjunto de genes duplicados que codifican proteínas con secuencias de aminoácidos similares, pero no idénticas se llama familia de genes; las proteínas homólogas codificadas, entrechamente relacionadas, constituyen una familia de proteínas. Unas pocas familias de proteínas, como las proteincinasas, los factores de transcripción y las inmunoglobulinas incluyen cientos de miembros. Sin embargo, la mayoría de las familias de proteínas abarcan desde apenas unos pocos miembros hasta 30 o más; son ejemplos comunes las proteínas del citoesqueleto, las proteínas de shock térmico de 70 kDa, la cadena pesada de miosina, la ovalbúmina de pollo y las α- y β-globinas de los vertebrados.

Los genes que codifican las β-globinas son un buen ejemplo de una familia de genes. Como se muestra en la figura 10-3a, la familia de genes de las β-globinas contiene cinco genes funcionales designados β, δ, A_γ, G_γ y ε; los polipéptidos codificados se designan de manera similar. Dos polipéptidos idénticos de globinas símil-β se combinan con dos polipéptidos idénticos de α-globina (codificados por otra familia de genes) y con cuatro grupos hemos pequeños para formar una molécula de hemoglobina (véase fig. 3-10). Todas las hemoglobinas formadas a partir de las diversas β-globinas transportan oxígeno en la sangre, pero exhiben propiedades algo diferentes adaptadas a funciones específicas de la fisiología humana. Por ejemplo, las hemoglobinas que contienen cualquiera de los polipéptidos A_γ o G_γ sólo se expresan durante la vida fetal. Como estas hemoglobinas fetales tienen mayor afinidad por el oxígeno que las hemoglobinas adultas, pueden extraer con eficacia el oxígeno de la circulación materna en la placenta. La menor afinidad por el oxígeno de las hemoglobinas adultas, que se expresan después del nacimiento, permite una mejor liberación del oxígeno a los tejidos, sobre todo los músculos, que tienen alta demanda de oxígeno durante el ejercicio.



▲ Fig. 10-4. Duplicación de genes producida por entrecruzamientos desiguales. Cada cromosoma parental (*arriba*) contiene un gen ancestral de β-globina que contiene tres exones y dos intrones. Diversas secuencias repetidas L1 no codificadoras homólogas se sitúan a 5′ y 3′ del gen de β-globina. Los cromosomas parentales se muestran desplazados entre sí, de manera que las secuencias L1 estén alineadas. La recombinación homóloga entre las secuencias L1 como se muestra generaría un cromosoma recombinante con dos copias del gen de β-globina y un cromosoma con una deleción del gen de β-globina. Mutaciones independientes posteriores en los genes duplicados podrían conducir a cambios leves en la secuencia que podrían dar como resultado propiedades funcionales levemente diferentes de las proteínas codificadas. El entrecruzamiento desigual también puede producir combinaciones raras entre secuencias no relacionadas. (Véase D. H. A. Fitch et al., 1991, *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* USA 88:7396.)

Es posible que distintos genes β-globina surgieran por duplicación de un gen ancestral, muy probablemente como resultado de un "entrecruzamiento desigual" durante la recombinación meiótica en una célula germinal en desarrollo (óvulo o espermatozoide) (fig. 10-4). Durante la evolución, las dos copias del gen resultante acumularon mutaciones aleatorias; las mutaciones beneficiosas que confirieron cierto refinamiento a las funciones básicas de transporte de oxígeno de la hemoglobina se retuvieron por selección natural y provocaron *desviación de la secuencia*. Se piensa que las duplicaciones de genes repetidos y la posterior desviación de la secuencia generaron los genes similares a la globina que se observan hoy en los seres humanos y en otras especies complejas.

Dos regiones del grupo de genes de β-globinas contienen secuencias no funcionales denominadas seudogenes, similares a aquellas funcionales de los genes de β-globinas (véase fig. 10-3a). El análisis de la secuencia muestra que estos seudogenes tienen la misma estructura aparente de exones e intrones que los genes funcionales de β-globinas, lo que indica que ellas también surgieron por duplicación del mismo gen ancestral. Sin embargo, las desviaciones de secuencias durante la evolución generaron secuencias que terminan la traducción o bloquean el procesamiento del mRNA, haciendo que esas regiones sean no funcionales aun cuando se transcriban a RNA. Dado que esos seudogenes no son dañinos, permanecen en el genoma y marcan la ubicación de una duplicación de genes que tuvo lugar en uno de nuestros ancestros. Como veremos en una sección posterior, otras copias no funcionales de genes pueden surgir por transcripción inversa de mRNA a cDNA e integración de este DNA sin intrones en un cromosoma.

Varias familias de genes diferentes codifican las diversas proteínas que constituyen el citoesqueleto. Estas proteínas están presentes en cantidades variables en casi todas las células. En los vertebrados, las principales proteínas del citoesqueleto son las actinas, las tubulinas y las proteínas de los filamentos intermedios, como las queratinas. Ya analizamos el origen de una de esas familias, la familia de la tubulina, en el capítulo anterior (véase fig. 9-32). Aunque las causas fisiológicas de las familias de proteínas citoesqueléticas no son tan obvias como lo son para las globinas, los distintos miembros de una familia probablemente tienen funciones similares, pero algo diferentes adecuadas al tipo particular de célula en la cual se expresan.

Los genes repetidos en tándem codifican rRNA, tRNA e histonas

En los vertebrados e invertebrados, los genes que codifican los rRNA y algunos otros RNA no codificadores como algunos de los snRNA involucrados en el corte y empalme de RNA aparecen como *repeticiones en tándem*. Éstas se distinguen de los genes duplicados de las familias de genes en que los múltiples genes repetidos en tándem codifican proteínas idénticas o casi idénticas o RNA funcionales. Muy a menudo las copias de una secuencia aparecen una después de la otra, en disposición cabeza con cola, a lo largo de una larga extensión de DNA. Dentro de una disposición en tándem de genes de rRNA, cada copia es exactamente, o casi exactamente, similar a las otras. Aunque las porciones transcriptas de genes de rRNA son las mismas en un individuo dado, las regiones espaciadoras no transcriptas entre las regiones transcriptas pueden variar.

Los genes de rRNA, tRNA e histona repetidos en tándem son necesarios para satisfacer la enorme demanda celular de sus transcripciones. Para entender por qué, consideremos que un número máximo fijo de copias de RNA puede producirse a partir de un único gen durante una generación celular cuando el gen está cargado completamente con moléculas de RNA polimerasa. Si se requiere más RNA del que puede transcribirse a partir de un gen, se necesitan múltiples copias del gen. Por ejemplo, durante el desarrollo embrionario temprano en los seres humanos, muchas células embrionarias tienen un tiempo de duplicación de alrededor de 24 horas y contienen de 5-10 millones de ribosomas. Para producir suficiente rRNA para formar tantos ribosomas, una célula embrionaria humana necesita al menos 100 copias de genes de rRNA de

CUADRO 10-2 Efecto del número de copias de un gen y de la carga de RNA polimerasa sobre la velocidad de síntesis de Pre-rRNA en los seres humanos

Copias del gen Pre-rRNA	Moléculas de RNA polimerasa por gen	Moléculas de Pre-rRNA producidas en 24 horas
1	1	288
1	≈250	≈70.000
100	≈250	≈7.000.000

las subunidades mayor y menor, y la mayoría de éstos deben tener actividad cercana al máximo para que la célula se divida cada 24 horas (cuadro 10-2). Es decir que múltiples RNA polimerasas deben cargarse sobre cada gen de rRNA y transcribirlo al mismo tiempo (véase fig. 12-32).

Todos los eucariontes, incluidas las levaduras, contienen 100 o más copias de genes que codifican rRNA 5S y rRNA de las subunidades mayor y menor. La importancia de los genes repetidos de rRNA se ilustra con los mutantes de *Drosophila* denominados *bobbed* (porque tienen alas cortas y gruesas), que carecen de un complemento completo de los genes pre-rRNA repetidos en tándem. Una mutación *bobbed* que reduce el número de genes pre-rRNA a menos de ≈50 es una mutación recesiva letal.

También aparecen múltiples copias de tRNA y genes de histona, a menudo en grupos, pero generalmente no ordenados en tándem.

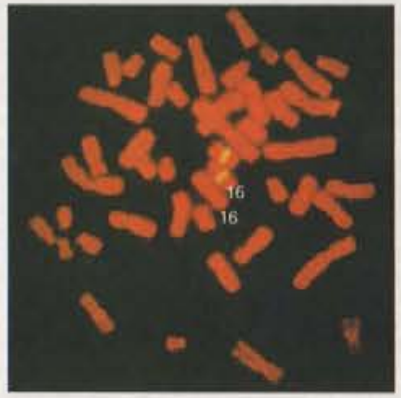
La mayoría de los DNA de secuencia simple se concentra en localizaciones cromosómicas específicas

Aparte de los genes duplicados codificadores de proteínas y de los genes repetidos en tándem, las células eucariontes contienen múltiples copias de otras secuencias de DNA en el genoma, denominado *DNA repetitivo* (véase cuadro 10-1). De los dos tipos principales de DNA repetitivos, el menos predominante es el **DNA de secuencia simple,** que constituye alrededor del 3% del genoma humano y está compuesto de repeticiones perfectas o casi perfectas de secuencias relativamente cortas. El tipo más común de DNA repetitivo, compuesto de secuencias mucho más largas, se trata en la sección 10.3.

El DNA de secuencia simple suele denominarse DNA *satélite* porque en los estudios iniciales de los DNA de organismos superiores que utilizaban ultracentrifugación en equilibrio de densidad, algunos DNA de secuencia simple formaban bandas en una posición diferente de la de la mayoría del DNA celular. Éstas fueron denominadas *bandas satélite* para distinguirlas de la banda principal de DNA en el gradiente de equilibrio de densidad. Los DNA de secuencia simple en los cuales las repeticiones contienen 1-13 pares de bases se denominan *microsatélites*. La mayoría tiene longitudes repetidas de 150 pares de bases o menos. Se piensa que los microsatélites se originaron por "deslizamiento hacia atrás" de una hebra hija sobre su hebra molde durante la replicación de DNA de manera que la misma secuencia corta se copia dos veces.

MEDICINA

Los microsatélites tienen lugar en ocasiones dentro de las unidades de transcripción. Algunos individuos nacen con un número mayor de repeticiones en genes específicos que los observados en la población general, debido quizás al deslizamiento de las hebras hijas durante la replicación del DNA en una célula germinal de la cual se desarrollaron. Se descubrió que esos microsatélites expandidos provocan al menos 14 tipos diferentes de enfermedades neuromusculares, según el gen en el cual ocurran. En algunos casos los microsatélites expandidos se comportan como mutaciones recesivas porque interfieren en la función o la expresión del gen codificado. Pero en los tipos más comunes de enfermedades asociadas con las repeticiones expandidas de microsatélites, la *distrofia miotónica* y la *ataxia espinocerebelosa*, las repeticiones expandidas se comportan como mutaciones dominantes porque interfieren en el procesamiento del RNA en general en las neuronas donde se expresan los genes afectados. ▮

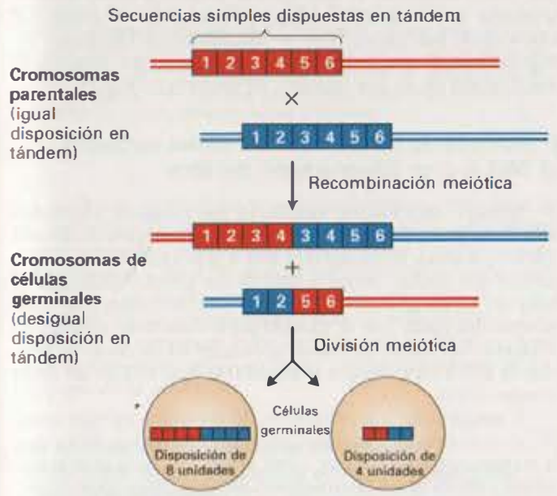


▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 10-5 Los DNA de secuencia simple son marcadores cromosómicos útiles.** Los cromosomas metafásicos humanos teñidos con un colorante fluorescente se hibridaron in situ con un DNA de secuencia simple particular marcado con un derivado fluorescente de la biotina. Cuando se visualizan bajo la luz de longitud de onda apropiada, el DNA aparece rojo y el DNA de secuencia simple hibridado aparece como una banda amarilla sobre el cromosoma 16, localizando por tanto esta particular secuencia simple en un sitio del genoma. (Véase R. K. Moyzis et al., 1987, *Chromosoma* 95:378; cortesía de R. K. Moyzis.)

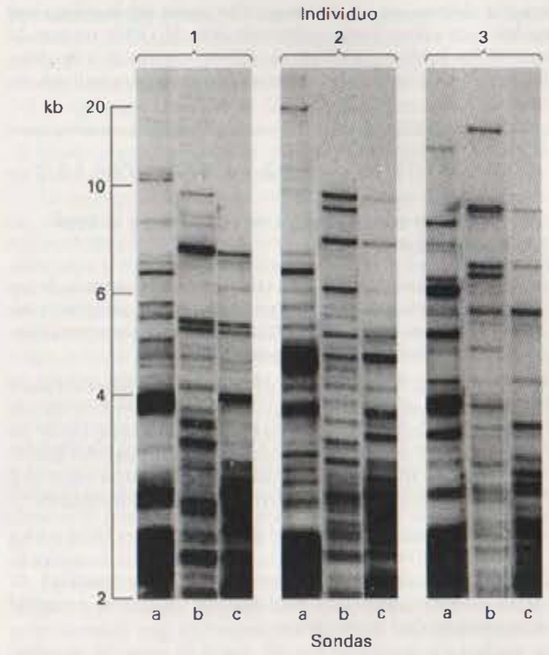
La mayoría del DNA satélite está compuesto de 14-500 pares de bases repetidas en tándem de 20-100 kb. En los estudios de hibridación in situ con cromosomas en metafase se han localizado estos DNA satélite en regiones cromosómicas específicas. En la mayoría de los mamíferos, gran parte de este DNA satélite se sitúa cerca de los centrómeros, las regiones cromosómicas diferenciadas que se adhieren a los microtúbulos del huso durante la mitosis y la meiosis. El DNA satélite también se sitúa en los telómeros, los extremos de los cromosomas y en ubicaciones específicas dentro de los brazos de los cromosomas en algunos organismos. Estas últimas secuencias pueden ser útiles para identificar cromosomas particulares mediante hibridación in situ con fluorescencia (FISH), como se ilustró en la figura 10-5. El DNA de secuencia simple situado en los centrómeros puede asistir en la adhesión de cromosomas a los microtúbulos del huso durante la mitosis. Sin embargo, hay todavía poca evidencia experimental concluyente que demuestre cualquier función para la mayor parte del DNA de secuencia simple, a excepción de las repeticiones cortas en los extremos de los cromosomas tratadas en una sección posterior.

El *fingerprinting* del DNA depende de las diferencias en la longitud de los DNA de secuencia simple

Dentro de una especie, las secuencias de nucleótidos de las unidades repetidas que componen las disposiciones en tándem de las secuencias simples de DNA están altamente conservadas entre los individuos. En cambio, son bastante comunes las diferencias en el *número* de repeticiones y, por ende, en la longitud de las disposiciones en tándem de secuencias simples que contienen la misma unidad repetida. Se piensa



▲ **Fig. 10-6. Generación de diferencias en las longitudes de un DNA de secuencia simple por entrecruzamiento desigual durante la meiosis.** En este ejemplo, el entrecruzamiento desigual dentro de un tramo de DNA que contiene seis copias (1-6) de una unidad de secuencia simple particular repetida produce células germinales que contienen una disposición en tándem de ocho unidades o de cuatro unidades.



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 10-7 Las sondas para el DNA minisatélite pueden revelar fragmentos de restricción únicos (fingerprinting o huellas dactilares de DNA) que permiten distinguir individuos.** Las muestras de DNA de tres individuos (1, 2 y 3) se sometieron a análisis de *Southern blot* utilizando la enzima de restricción *Hinf*1 y tres diferentes minisatélites marcados como sondas (líneas a, b, y c). El DNA de cada individuo produjo un patrón de bandas único con cada sonda. Las condiciones de electroforesis pueden ajustarse para poder resolver para cada persona al menos 50 bandas con esta enzima de restricción. Se distingue con facilidad que las tres muestras no son idénticas. (De A. J. Jeffreys et al., 1985, Nature 316:76; cortesía de A. J. Jeffreys.)

que estas diferencias en la longitud resultan del entrecruzamiento desigual entre regiones dentro del DNA de secuencia simple durante la meiosis (fig. 10-6). Como consecuencia de este entrecruzamiento desigual, las longitudes de algunas disposiciones en tándem son únicas para cada individuo.

En los seres humanos y en otros mamíferos, existe algo del DNA satélite en regiones relativamente cortas de 1 a 5 kb formadas de 20 a 50 unidades repetidas, cada una compuesta de 15-100 pares de bases. Estas regiones se denominan *minisatélites* para distinguirlas de las regiones más comunes de DNA satélite repetidas en tándem, que son de alrededor de 20-100 kb de longitud. Difieren de los microsatélites antes mencionados en que aquellos tienen unidades repetidas muy cortas. Incluso se pueden detectar leves diferencias en las longitudes totales de diversos minisatélites de diferentes individuos mediante Southern *blot* del DNA celular tratado con una enzima de restricción que corta por fuera de la secuencia repetida (fig. 10-7). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que utiliza cebadores que hibridan las únicas secuencias que flanquean cada minisatélite, también puede

detectar diferencias en las longitudes de los minisatélites entre los individuos. Estos polimorfismos de DNA forman la base de las *huellas dactilares de DNA,* superiores a las huellas dactilares convencionales para identificar a los individuos.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 10.2

Organización cromosómica de los genes y el DNA no codificador

- En los genomas de los procariontes y de la mayoría de los eucariontes inferiores, que contienen menos secuencias no funcionales, las regiones codificadoras están densamente ordenadas a lo largo del DNA genómico.
- En cambio, los genomas de los vertebrados contienen muchas secuencias que no codifican para RNA ni tienen función estructural o regulatoria. Mucho de este DNA no funcional está compuesto de secuencias repetidas. En los seres humanos sólo alrededor del 1,5% del DNA total (los exones) codifica realmente proteínas o RNA funcionales.
- La variación en la cantidad de DNA no funcional en los genomas de diversas especies es, en gran medida, la razón de que no haya una relación uniforme entre la cantidad de DNA en los cromosomas haploides de un animal o vegetal y su complejidad filogenética.
- El DNA genómico eucarionte consiste en tres clases principales de secuencias: los genes que codifican proteínas y RNA funcionales, incluidas las familias de genes y los genes repetidos en tándem; el DNA repetitivo; y el DNA espaciador (véase cuadro 10-1).
- Alrededor de la mitad de los genes codificadores de proteínas en el DNA genómico de los vertebrados son genes solitarios y cada uno aparece sólo una vez en el genoma haploide. El resto son genes duplicados, que surgieron por duplicación de un gen ancestral y de las mutaciones independientes posteriores (véase fig. 10-4).
- Los genes duplicados codifican proteínas estrechamente relacionadas y suelen aparecer agrupados en una región particular del DNA. Las proteínas codificadas por una familia de genes tienen secuencias de aminoácidos homólogas, pero no idénticas y exhiben propiedades similares si bien algo diferentes.
- En los invertebrados y en los vertebrados, los rRNA son codificados por múltiples copias de genes situadas en disposiciones en tándem en el DNA genómico. También aparecen copias múltiples de genes de tRNA e histonas, a menudo en grupos, pero casi nunca en disposiciones en tándem.
- El DNA de secuencia simple, que consiste mayoritariamente en secuencias bastante cortas repetidas en largas disposiciones en tándem, se localiza de preferencia en los centrómeros, telómeros y otras regiones específicas dentro de los brazos de cromosomas particulares.
- La longitud de una disposición en tándem de secuencia simple específica varía bastante entre individuos de una especie, debido quizás al entrecruzamiento desigual durante la meiosis (véase fig. 10-6). Las diferencias en las longitudes de algunas disposiciones en tándem forman la base de las huellas dactilares de DNA.

10.3 DNA móvil

El segundo tipo de repeticiones de DNA de los genomas eucariontes denominadas *repeticiones dispersas* (también conocidas como *DNA moderadamente repetido o de repetición intermedia*) está compuesto de un número muy grande de copias de relativamente pocas familias de secuencias (véase cuadro 10-1). Estas secuencias, diseminadas en todos los genomas de los mamíferos, constituyen ≈25–50% del DNA de los mamíferos (≈45% del DNA humano).

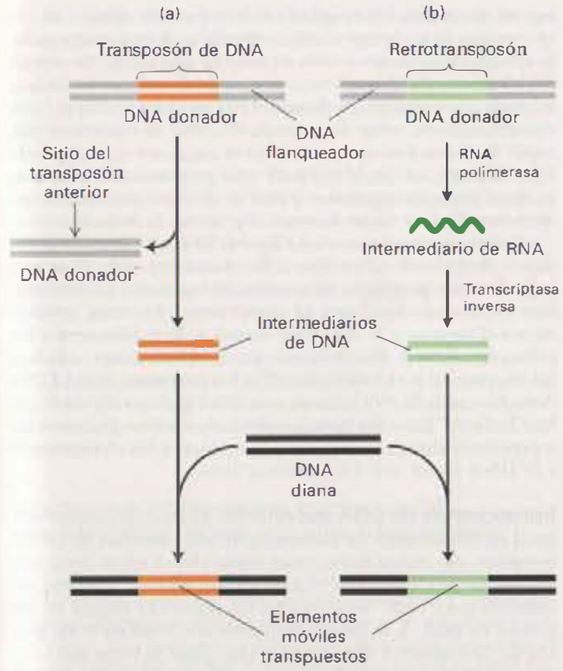
Debido a que las secuencias de DNA moderadamente repetidas tienen la capacidad poco común de "moverse" en el genoma, se denominan elementos **móviles** de DNA (o *elementos transponibles*). Aunque los elementos móviles de DNA, que van desde cientos a unos miles de pares de bases de longitud, fueron descubiertos en los eucariontes, también se encuentran en los procariontes. El proceso por el cual estas secuencias se copian y se insertan en un nuevo sitio en el genoma se denomina **transposición**. Los elementos móviles de DNA (o simplemente *elementos móviles*) son esencialmente simbiontes moleculares que, en la mayoría de los casos, parecen no tener función específica en la biología de sus organismos huésped, excepto existir sólo para mantenerse a sí mismos. Por esta razón, Francis Crick se refirió a estas secuencias como "DNA egoístas".

Cuando la transposición de elementos móviles ocurre en las células germinales, las secuencias transpuestas a sus nuevos sitios pueden pasarse a generaciones sucesivas. De esta manera, los elementos móviles se han multiplicado y acumulado lentamente en los genomas eucariontes a lo largo del tiempo evolutivo. Puesto que los elementos móviles se eliminan muy lentamente de los genomas eucariontes, constituyen una porción significativa de los genomas de muchos eucariontes actuales. La transposición también puede tener lugar dentro de una célula somática; en este caso la secuencia transpuesta se transmite sólo a las células hijas derivadas de esa célula. En casos raros, esto puede llevar a mutaciones de las células somáticas con efectos fenotípicos perjudiciales; por ejemplo, la inactivación de un gen supresor de tumores (cap. 23).

El movimiento de elementos móviles involucra al DNA o a un intermediario del RNA

Barbara McClintock descubrió los primeros elementos móviles realizando experimentos genéticos clásicos en el maíz (choclo) durante la década de 1940. Caracterizó entidades genéticas que podían entrar o salir de los genes, cambiando el fenotipo de los granos de maíz. Sus teorías fueron muy controversiales hasta que se descubrieron elementos móviles similares en las bacterias, donde se caracterizaron como secuencias de DNA específicas y se descifró la base molecular de su transposición.

A medida que la investigación de elementos móviles avanzó, se descubrió que pertenecían a dos categorías: 1) los que se transponen directamente como DNA y 2) los que se transponen a través de un intermediario de RNA, transcripto a partir de los elementos móviles por acción de una RNA polimerasa y que luego se vuelve a convertir en DNA de doble hebra por acción de una **transcriptasa inversa** (fig. 10-8). Los elementos móviles que se transponen a través de un intermediario de DNA se denominan **transposones de DNA**. Los elementos móviles que se transponen a nuevos sitios en el genoma a través de un intermediario de RNA se llaman **retrotransposones** porque su movimiento es análogo al proceso infeccioso de los retrovirus. De hecho, los retrovirus pueden considerarse retrotransposones cuyos genes evolucionaron y lograron codificar cubiertas virales, lo que les permitió transponerse entre las células. Los retrotransposones pueden subclasificarse sobre la base de sus mecanismos específicos de transposición. Describiremos la estructura y los movimientos de los principales tipos de elementos móviles y luego consideraremos su probable papel en la evolución.



▲ Fig. 10-8. Clasificación de elementos móviles en dos clases principales. (a) Los transposones de DNA eucarionte (naranja) se mueven a través de un intermediario de DNA, el cual es escindido del sitio donante. (b) Los retrotransposones (verde) se transcriben primero a una molécula de RNA, que luego es transcripta de manera inversa a DNA de hebra doble. En ambos casos, el intermediario del DNA bicatenario es integrado al DNA del sitio diana para completar el desplazamiento. Por lo tanto los transposones de DNA se desplazan mediante un mecanismo de corte y pegado, mientras que los retrotransposones se mueven mediante un mecanismo de copia y pegado.

Los elementos móviles que se mueven como DNA están presentes en los procariontes y en los eucariontes

La mayoría de los elementos móviles en las bacterias se transponen directamente como DNA. En cambio, la mayoría de los elementos móviles en los eucariontes son retrotransposones, pero también existen transposones de DNA eucarionte. De hecho, los elementos móviles originales descubiertos por Barbara McClintock son transposones de DNA.

Secuencias de inserción bacteriana. Los primeros conocimientos moleculares de los elementos móviles provinieron del estudio de ciertas mutaciones de *E. coli* causadas por la inserción espontánea de una secuencia de DNA, de alrededor de 1-2 kb de largo, en el medio del gen. Estas porciones de DNA insertadas se denominan *secuencias de inserción*, o *elementos IS*. Hasta ahora, se hallaron más de 20 elementos IS diferentes en *E. coli* y en otras bacterias.

La transposición de un elemento IS es un hecho muy raro, sólo tiene lugar en una de 10^5–10^7 células por generación, según el elemento IS. Muchas transposiciones inactivan genes esenciales y matan a la célula huésped y a los elementos IS que transporta. Por lo tanto, índices más altos de transposición probablemente conduzcan a un índice de mutación demasiado grande para que la célula huésped sobreviva. Sin embargo, puesto que los elementos IS se transponen más o menos de manera aleatoria, algunas secuencias transpuestas entran en regiones no esenciales del genoma (p. ej., regiones entre genes), lo que permite que la célula sobreviva. A una tasa muy pequeña de transposición, la mayoría de las células huésped sobreviven y por ende propagan los elementos simbióticos IS. Éstos IS también pueden insertarse en plásmidos o virus lisogénicos y, por lo tanto, transferirse a otras células. Cuando esto sucede, los elementos IS se pueden transponer a los cromosomas de células vírgenes.

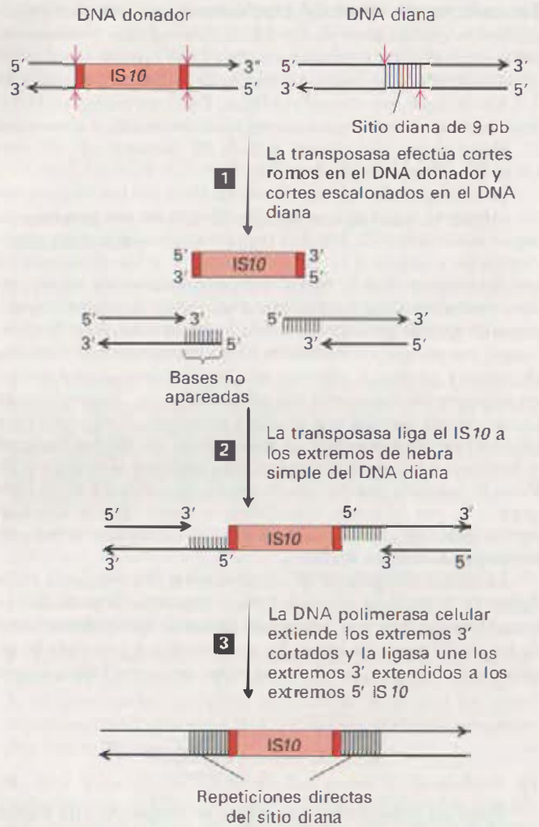
La estructura general de los elementos IS se muestra en la figura 10-9. En cada extremo de una secuencia de inserción invariablemente hay una *repetición invertida* que contiene alrededor de 50 pares de bases. En una repetición invertida la secuencia 5′→3′ sobre una hebra se repite en la otra hebra, como:

$$\begin{array}{l} \xrightarrow{\qquad} \\ 5'\text{GAGC} \text{---} \text{GCTC}\ 3' \\ 3'\text{CTCG} \text{---} \text{CGAG}\ 5' \\ \xleftarrow{\qquad} \end{array}$$

Entre las repeticiones invertidas se encuentra una región que codifica la *transposasa*, una enzima requerida para la transposición del elemento IS a un nuevo sitio. La transposa-



▲ Fig. 10-9. Estructura general de los elementos bacterianos IS. La región central larga de un elemento IS, que codifica una o dos enzimas requeridas para la transposición, está flanqueada por una repetición invertida en cada extremo. Las secuencias de las repeticiones invertidas son casi idénticas, pero están orientadas en direcciones opuestas. La secuencia es característica de un elemento IS en particular. Las repeticiones *directas* (como opuestas a las *inversas*) cortas 5′ y 3′ no se transponen con el elemento de inserción; en cambio, son secuencias de sitios de inserción que se vuelven duplicados, con una copia en cada extremo, durante la inserción de un elemento móvil. La longitud de las repeticiones directas es constante para un elemento IS dado, pero su secuencia depende del sitio de inserción y por lo tanto varía con cada transposición del elemento IS. Las flechas indican la orientación de la secuencia. Las regiones en este diagrama no están en escala; las regiones codificadoras constituyen la mayor parte de la longitud de un elemento IS.



▲ Fig. 10-10. Modelo para la transposición de secuencias de inserción bacterianas. Paso 1: La transposasa, codificada por el elemento IS (IS*10* en este ejemplo), escinde ambas hebras del DNA donador próximas a las repeticiones invertidas (rojo oscuro), extrayendo el elemento IS*10*. En un sitio elegido (diana) que suele ser aleatorio, la transposasa efectúa cortes escalonados en el DNA diana. En el caso del IS*10*, los dos cortes se encuentran separados por 9 bp. Paso 2: La transposasa también cataliza la unión de los extremos 3′ del elemento IS extraído con los sitios escalonados en el DNA diana. Paso 3: Las brechas de 9 bp del DNA monocatenario que quedan en el intermedio resultante se llenan por acción de una DNA polimerasa celular; finalmente la DNA ligasa celular forma los enlaces fosfodiéster 3′→5′ entre los extremos 3′ de las hebras de DNA diana extendidas y los extremos 5′ de las hebras IS*10*. Este proceso genera la duplicación de la secuencia del sitio diana a cada lado del elemento IS insertado. Nótese que la longitud del sitio diana e IS*10* no están en escala. (Véase H. W. Benjamin y N. Kleckner, 1989, Cell 59:373, y 1992, *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* USA 89:4648.)

sa se expresa a una velocidad muy lenta, lo que explica la frecuencia muy baja de transposición. Una marca distintiva importante de los elementos IS es la presencia de una *secuencia de repetición directa* corta, que contiene de 5 a 11 pares de bases, inmediatamente adyacente a ambos extremos del elemento insertado. La *longitud* de la repetición directa es característica de cada tipo de elemento IS, pero su *secuencia* depende del sitio diana donde se inserta una copia particular del elemento IS. Cuando se compara la secuencia de un gen mutado que contiene un elemento IS con la secuencia del gen de tipo silvestre antes de la inserción, sólo se encuentra una copia de la secuencia corta de repetición directa en el gen de tipo silvestre. La duplicación de esta secuencia del sitio diana para crear la segunda repetición directa adyacente a un elemento IS tiene lugar durante el proceso de inserción.

Como se representa en la figura 10-10, la transposición de un elemento IS es similar al funcionamiento de "cortar y pegar" en un programa de procesador de texto. La transposasa ejecuta tres funciones en este proceso: 1) extrae precisamente el elemento IS del DNA donador, 2) realiza cortes escalonados en una secuencia corta en el DNA diana y 3) liga las terminales 3′ del elemento IS a los extremos 5′ del DNA donador cortado. Por último, una DNA polimerasa de la célula huésped llena los espacios de cada cadena y genera las repeticiones directas cortas que flanquean a los elementos IS y la DNA ligasa une los extremos libres.

Transposones de DNA eucarionte. El descubrimiento original de McClintock de elementos móviles provino de la observación de ciertas mutaciones espontáneas en el maíz que afectan la producción de alguna de las diversas enzimas requeridas para hacer antocianina, un pigmento violeta de los granos de maíz. Los granos mutantes son blancos y los granos de tipo silvestre son violetas. Una clase de estas mutaciones se revierte con alta frecuencia, mientras que la segunda clase de mutaciones no se revierte a menos que se encuentre en presencia de la primera clase de mutaciones. McClintock denominó *elemento activador (Ac)* al agente responsable de la primera clase de mutaciones y *elementos de disociación (Ds)* a los responsables de la segunda clase debido a que también tendían a estar asociados con la ruptura de cromosomas.

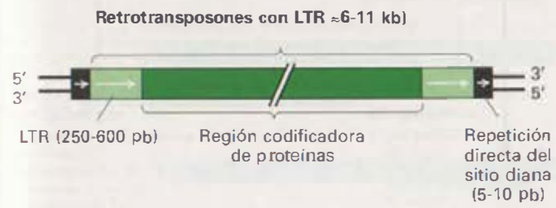
Muchos años después de los descubrimientos pioneros de McClintock, la clonación y la secuenciación revelaron que los elementos Ac son equivalentes a los elementos IS bacterianos. Al igual que los elementos IS, contienen secuencias repetitivas terminales invertidas que flanquean la región codificadora para una transposasa, la cual reconoce las repeticiones terminales y cataliza la transposición a un nuevo sitio en el DNA. Los elementos Ds son formas eliminadas del elemento Ac en el cual falta una porción de la secuencia que codifica la transposasa. Debido a que no codifica una transposasa funcional, un elemento Ds no puede moverse por sí mismo. Sin embargo, en las plantas que contienen el elemento Ac, y que por lo tanto expresan una transposasa funcional, los elementos Ds pueden moverse.

Desde el trabajo inicial de McClintock acerca de los elementos móviles en el maíz, se identificaron transposones en otros eucariontes. Por ejemplo, cerca de la mitad de las mutaciones espontáneas observadas en *Drosophila* se deben a la inserción de elementos móviles. Aunque la mayoría de los elementos móviles en *Drosophila* funcionan como retrotransposones, al menos uno –el elemento P– funciona como un transposón de DNA y se mueve mediante un mecanismo de corte y pegado similar al utilizado por las secuencias de inserción bacterianas. Los métodos actuales para construir *Drosophilas* transgénicas dependen del diseño de una transposasa del elemento P con alto nivel de expresión y el uso de las repeticiones terminales invertidas del elemento P como diana de la transposición.

La transposición de DNA mediante el mecanismo de corte y pegado puede producir un incremento en el número de copias de un transposón cuando ocurre durante la fase S, el período del ciclo celular en que tiene lugar la síntesis de DNA. Esto sucede cuando el DNA donador proviene de una de las dos moléculas de DNA hijas en una región de un cromosoma que ya se replicó y el DNA diana se encuentra en la región que aún no se replicó. Cuando la replicación del DNA se completa al final de la fase S, también se ha replicado el DNA diana en su nueva ubicación. Esto se traduce en un incremento neto en uno del número total de estos transposones en la célula. Cuando esto ocurre durante la fase S que precede a la meiosis, dos de las cuatro células germinales producidas poseen la copia extra. La repetición de este proceso a lo largo del tiempo evolutivo produjo la acumulación de grandes cantidades de transposones de DNA en los genomas de algunos organismos. El DNA humano contiene alrededor de 300.000 copias de transposones de DNA de longitud completa y eliminados, que totalizan alrededor del 3% del DNA humano.

Algunos retrotransposones contienen LTR y se comportan como retrovirus intracelulares

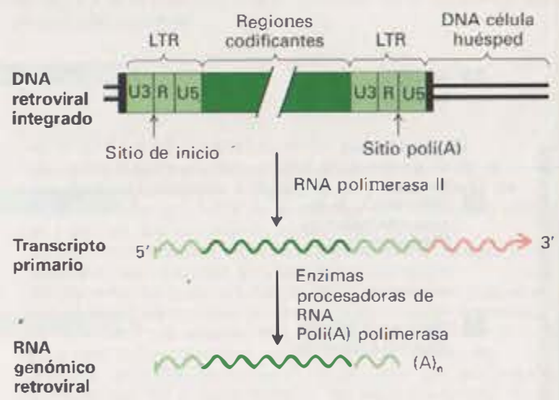
Los genomas de todos los eucariontes estudiados, desde las levaduras hasta los seres humanos, contienen retrotransposones, elementos móviles de DNA que se transponen a través de un intermediario de RNA utilizando una transcriptasa inversa (véase fig. 10-8b). Estos elementos móviles están divididos en dos categorías principales: los que contienen repeticiones terminales largas (LTR) y los que carecen de ellas. Los retrotransposones con LTR, que trataremos en esta sección, son comunes en las levaduras (p. ej., los elementos Ty) y en *Drosophila* (p. ej., los elementos *copia*). Aunque menos abundantes en los mamíferos que los retrotransposones sin LTR, los retrotransposones con LTR constituyen un 8% del DNA genómico humano. Debido a que exhiben algunas similitudes con los retrovirus, estos elementos móviles a menudo se denominan *retrotransposones virales*. En los mamíferos, los retrotransposones que carecen de LTR son el tipo más común de elementos móviles y se describen en la siguiente sección.



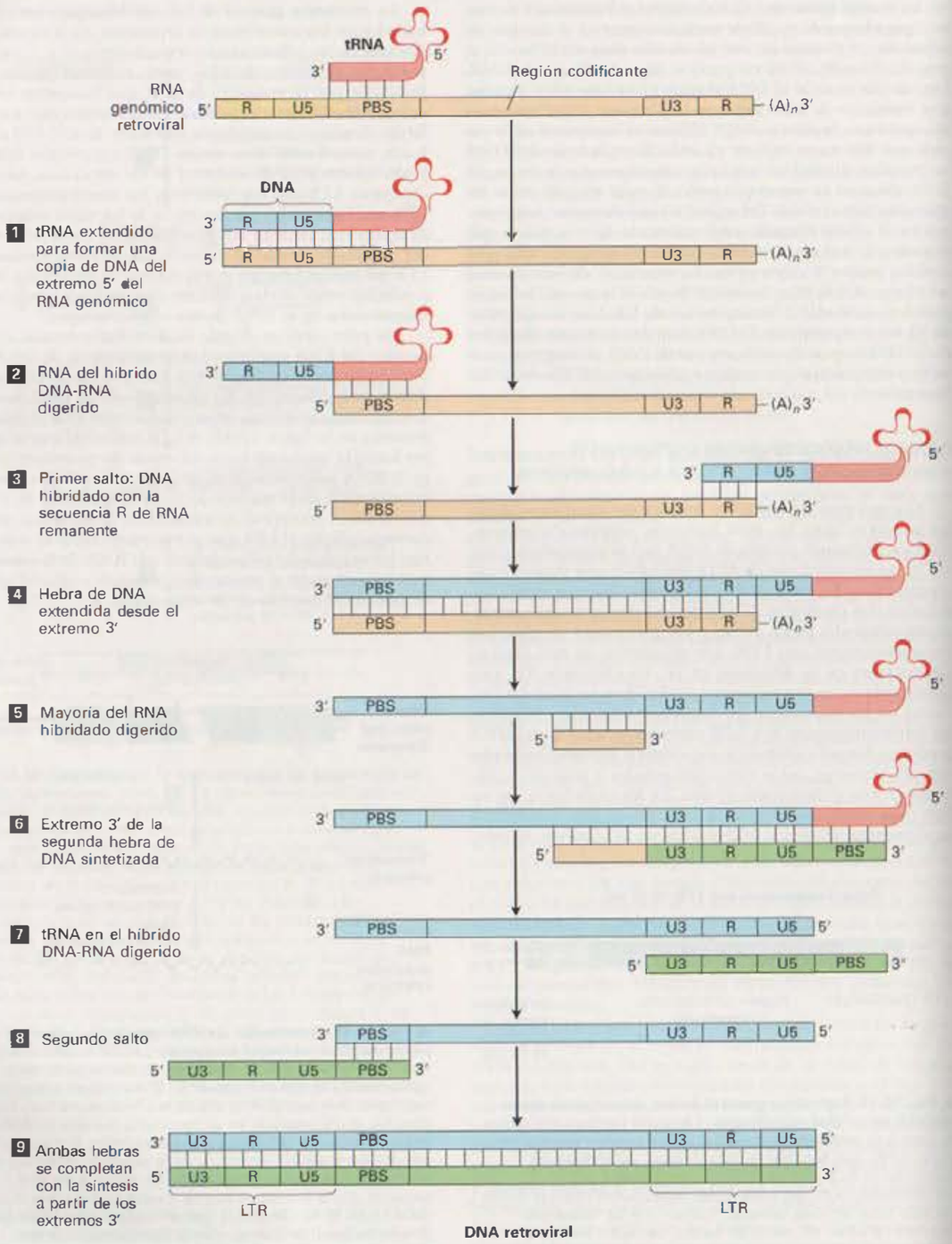
▲ Fig. 10-11. Estructura general de los retrotransposones con LTR en células eucariontes. La región central codificadora de proteínas está flanqueada por dos repeticiones terminales largas (LTR), que son repeticiones directas específicas del elemento. Al igual que otros elementos móviles, los retrotransposones integrados tienen repeticiones directas cortas del sitio diana en cada extremo. Nótese que las diferentes regiones no están dibujadas en escala. La región codificadora de proteínas constituye el 80% o más de un retrotransposón y codifica la transcriptasa inversa, la integrasa y otras proteínas retrovirales.

La estructura general de los retrotransposones con LTR hallados en los eucariontes se representa en la figura 10-11. Además de las repeticiones cortas directas 5′ y 3′ típicas de todos los elementos móviles, estos retrotransposones están marcados por la presencia de LTR que flanquean las regiones codificadoras de proteínas. Estas repeticiones terminales largas directas, que contienen alrededor de 250-600 pares de bases, son características de los DNA retrovirales integrados y son críticas para el ciclo vital de los retrovirus. Además de compartir LTR con los retrovirus, los retrotransposones con LTR codifican todas las proteínas de los tipos más comunes de retrovirus, excepto las proteínas de la envoltura. Al carecer de esas proteínas de cubierta, los retrotransposones con LTR no pueden emerger por gemación de sus células huésped e infectar otras células; sin embargo, pueden transponerse a nuevos sitios en el DNA de sus células huésped.

Un paso clave en el ciclo vital de los retrovirus es la formación del RNA genómico retroviral a partir de DNA retroviral integrado (véase fig. 4-43). Este proceso sirve como modelo para la generación del intermediario de RNA durante la transposición de los retrotransposones con LTR. Como se representa en la figura 10-12, el LTR retroviral que se encuentra hacia la izquierda funciona como un promotor que dirige la RNA polimerasa II de la célula huésped para iniciar la transcripción en el nucleótido 5′ de la secuencia R. Después que el DNA retroviral se transcribió, la secuencia de RNA correspondiente al LTR que se encuentra hacia la derecha dirige las enzimas del procesamiento de RNA de la célula huésped para escindir el transcripto primario y añadir una cola de poli(A) al extremo 3′ de la secuencia R.

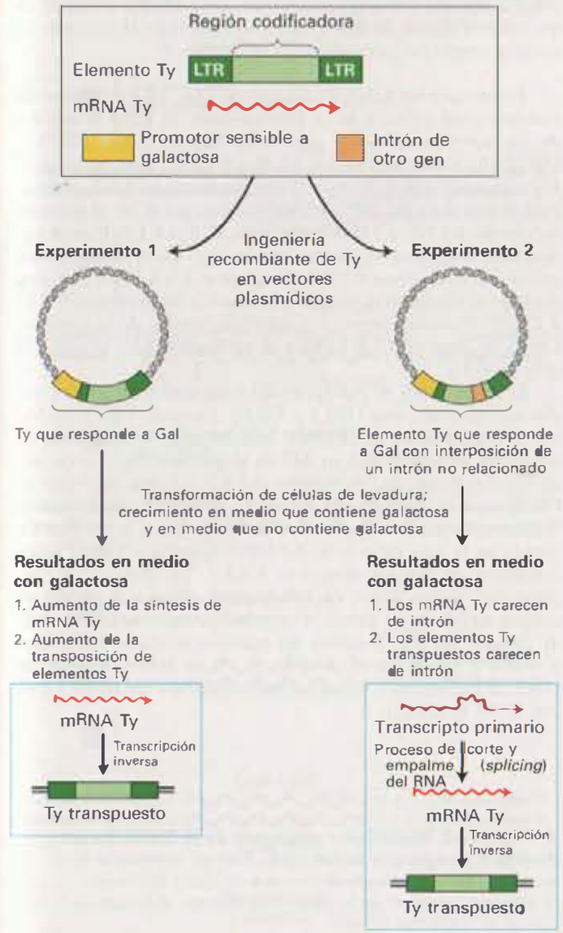


▲ Fig. 10-12. Generación de RNA genómico retroviral a partir de DNA retroviral integrado. La LTR izquierda dirige la RNA polimerasa II celular para iniciar la transcripción en el primer nucleótido de la región R izquierda. El transcripto primario resultante se extiende más allá de la LTR derecha. La LTR derecha, ahora presente en el transcripto primario de RNA, dirige las enzimas celulares para que escindan el transcripto primario en el último nucleótido de la región R derecha y para añadir una cola poli(A), produciendo un genoma de RNA retroviral con la estructura que se muestra en la parte superior de la figura 10-13. Se piensa que un mecanismo similar genera el intermediario de RNA durante la transposición de los retrotransposones. Las secuencias cortas de repetición directa (negro) del sitio diana de DNA se generan durante la integración del DNA retroviral en el genoma de la célula huésped.



TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación focalizada: Transcripción inversa retroviral

◀ Fig. 10-13. Modelo de la transcripción inversa del RNA genómico retroviral a DNA. En este modelo, una serie complicada de nueve eventos generan una copia de DNA bicatenario del genoma de RNA monocatenario de un retrovirus (parte superior). El RNA genómico se empaqueta en el virión con un tRNA celular específico del retrovirus hibridado con una secuencia complementaria cerca de su extremo 5′ denominado sitio de unión del cebador (PBS: *primer-binding site*). El RNA retroviral tiene una secuencia terminal corta (R) de repetición directa en cada extremo. La reacción global es llevada a cabo por la transcriptasa inversa, la cual cataliza la polimerización de los desoxirribonucleótidos. La RNasaH digiere la hebra de RNA de un híbrido DNA-RNA. El proceso completo produce una molécula de DNA de doble hebra que es más larga que el RNA molde y tiene una repetición terminal larga (LTR) en cada extremo. Las diferentes regiones no se muestran en escala. Las regiones PBS y R son, en realidad, mucho más cortas que las regiones U5 y U3, y la región central codificadora es mucho más larga que las otras regiones. (Véase E. Gilboa et al., 1979, *Cell* 18:93.)



El genoma retroviral RNA resultante, que carece de una LTR completa, se empaqueta en un virión por gemación de la célula huésped.

Una vez que un retrovirus infecta una célula, la transcripción inversa de su genoma de RNA mediante la transcriptasa inversa codificada por el retrovirus produce un DNA de doble hebra que contiene LTR completas (fig. 10-13). La integrasa, otra enzima codificada por los retrovirus que está estrechamente relacionada con la transposasa de algunos transposones de DNA, emplea un mecanismo similar para insertar el DNA retroviral de doble hebra en el genoma de la célula huésped. En este proceso, se generan repeticiones cortas directas de la secuencia del sitio diana en cada extremo de la secuencia de DNA viral insertada.

Como ya se dijo, los retrotransposones con LTR codifican la transcriptasa inversa y la integrasa. Por analogía con los retrovirus, se piensa que estos elementos se mueven mediante un mecanismo de "copiado y pegado" por el cual la transcriptasa inversa convierte una copia de RNA de un elemento del sitio donador en DNA, el cual se inserta en un sitio diana mediante la integrasa. Los experimentos representados en la figura 10-14 proporcionaron fuerte evidencia del papel de un intermediario de RNA en la transposición de los elementos Ty.

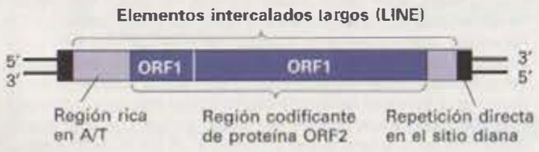
La secuenciación del genoma humano reveló que las secuencias más comunes relacionadas con los retrotransposones con LTR en los seres humanos derivan de retrovirus endógenos (ERV). La mayoría de las 443.000 secuencias de DNA relacionadas con los ERV en el genoma humano consisten sólo en LTR aisladas. Éstas derivan de DNA proviral de longitud completa mediante recombinación homóloga entre dos LTR, lo que provoca la eliminación de las secuencias retrovirales internas.

◀ FIGURA EXPERIMENTAL 10-14 Los plásmidos recombinantes demuestran que el elemento Ty de la levadura se transpone a través de un intermediario de RNA. Cuando las células de la levadura se transforman con un plásmido que contiene Ty, el elemento Ty puede transponerse a nuevos sitios, aunque normalmente esto sucede a baja velocidad. Empleando los elementos diagramados en la parte superior, los investigadores diseñaron dos vectores plasmídicos diferentes que contienen elementos Ty recombinantes adyacentes a un promotor sensible a la galactosa. Estos plásmidos transformaron en células de levadura, las cuales se cultivaron en un medio con galactosa y sin galactosa. En el experimento 1, las células cultivadas en el medio que contenía galactosa dieron como resultado muchas más transposiciones que las del medio sin galactosa, lo que indica que se requiere la transcripción a un intermediario de mRNA para la transposición de Ty. En el experimento 2, se insertó un intrón de un gen de una levadura no relacionado en la región que se presume como codificadora de la proteína del elemento Ty sensible a la galactosa. La ausencia del intrón, observada en los elementos Ty transpuestos, es una fuerte evidencia de que la transposición involucra un intermediario de mRNA a partir del cual se eliminó el intrón mediante el proceso de corte y empalme de RNA, como se representa en el recuadro de la derecha. En cambio, los transposones de DNA eucarionte, como el elemento Ac del maíz, contienen intrones dentro del gen de la transposasa, lo que indica que no se transponen a través de un intermediario de RNA. (Véase J. Boeke et al., 1985, *Cell* 40:491.)

Los retrotransposones que carecen de LTR se mueven por un mecanismo distinto

Los elementos móviles más abundantes en los mamíferos son los retrotransposones que carecen de LTR, llamados a veces *retrotransposones no virales*. Estas secuencias de DNA moderadamente repetitivas forman dos clases en los genomas de los mamíferos: *elementos dispersos largos* (*long interspersed elements, LINE*) y *elementos dispersos cortos* (*short interspersed elements, SINE*). En los seres humanos, los LINE de longitud completa tienen ≈6 kb de largo y los SINE tienen ≈300 bp de largo. En protozoos, insectos y plantas, se observaron secuencias repetidas con las características de los LINE, pero por razones desconocidas estas secuencias son muy abundantes en los genomas de los mamíferos. Los SINE también se hallan principalmente en el DNA de los mamíferos. A lo largo del tiempo evolutivo se acumularon grandes cantidades de LINE y SINE en los eucariontes superiores mediante la copia repetida de secuencias de unas pocas posiciones del genoma y su inserción en nuevas posiciones. Aunque estos elementos móviles no contienen LTR, la evidencia disponible indica que se transponen a través de un RNA intermediario.

Elementos LINE. El DNA humano contiene tres familias principales de secuencias LINE que son similares en sus mecanismos de transposición, pero que difieren en sus secuencias: L1, L2 y L3. Sólo los miembros de la familia L1 se transponen en el genoma humano contemporáneo. Las secuencias LINE están presentes en alrededor de 900.000 sitios en el genoma humano, lo que da cuenta del asombroso 21% del total del DNA humano. La estructura general de una secuencia LINE completa se diagrama en la figura 10-15. Los LINE están flanqueados por repeticiones cortas directas, la marca distintiva de los elementos móviles y contienen dos marcos de lectura abiertos (ORF) largos. El ORF1, de ≈1 kb de largo, codifica una proteína de unión a RNA. El ORF2, de ≈4 kb de largo, codifica una proteína que tiene una larga región de homología con la transcriptasa inversa de los retrovirus y de los retrotransposones virales, pero también exhibe actividad endonucleasa de DNA.

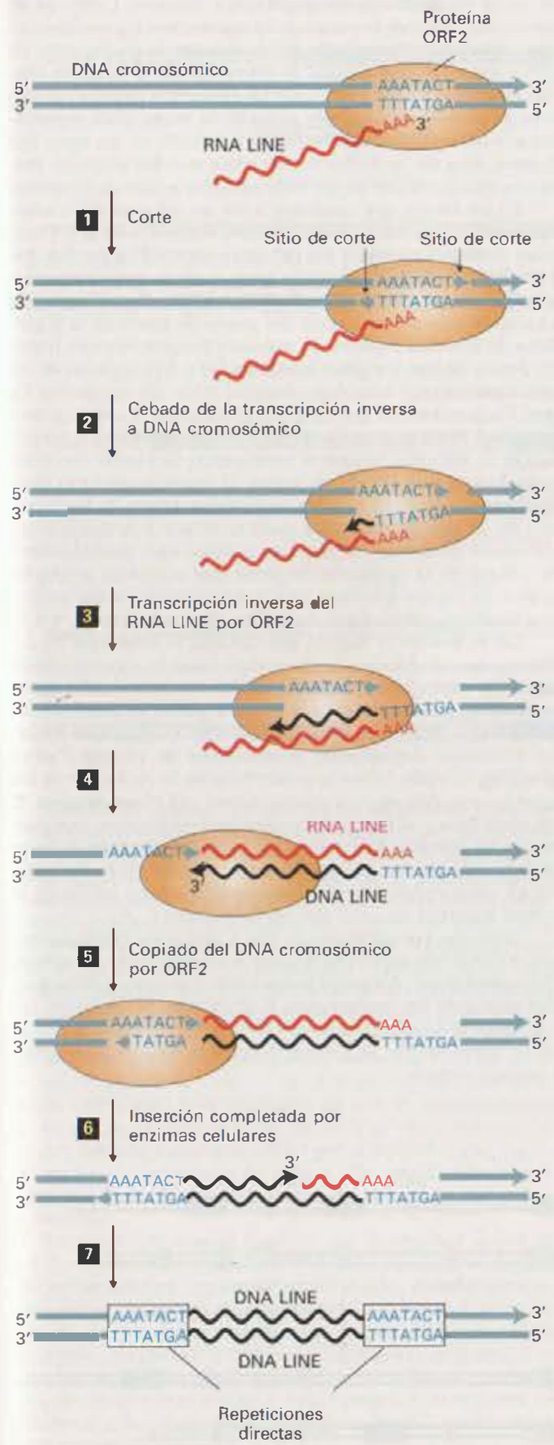


▲ Fig. 10-15. Estructura general de un LINE, una de las dos clases de retrotransposones sin LTR en el DNA de mamíferos. La longitud de las repeticiones directas del sitio diana varía entre las copias del elemento en sitios diferentes del genoma. Aunque la secuencia L1 de longitud completa es de ≈6 kb de largo, en más del 90% de los sitios donde se halla este elemento móvil están ausentes cantidades variables del extremo izquierdo. El marco abierto de lectura más corto (ORF1), de ≈1 kb de largo, codifica una proteína de unión a RNA. El ORF2, de ≈4 kb de largo, codifica una proteína bifuncional con actividad de transcriptasa inversa y de endonucleasa de DNA.

MEDICINA La evidencia de la movilidad de los elementos L1 provino primero del análisis de DNA clonado a partir de seres humanos con ciertas enfermedades genéticas. Se descubrió que el DNA de estos pacientes transportaba mutaciones resultantes de la inserción de un elemento L1 en un gen, mientras que ese elemento no aparecía dentro de este gen en ninguno de los padres. Alrededor de 1 en 600 mutaciones que causan enfermedades significativas en los seres humanos se debe a las transposiciones de L1 o transposiciones SINE que son catalizadas por proteínas codificas por L1. Experimentos posteriores similares a los recién descritos con los elementos Ty de las levaduras (véase fig. 10-14) confirmaron que los elementos L1 se transponen a través de un intermediario de RNA. En estos experimentos, se introdujo un intrón en un elemento L1 de ratón clonado y el elemento L1 recombinante fue transformado establemente en células de hámster cultivadas. Después de varias duplicaciones celulares, se detectó en las células un fragmento amplificado por PCR correspondiente al elemento L1, pero carente del intrón insertado. Este hallazgo sugiere con firmeza que a lo largo del tiempo el elemento L1 recombinate que contenía el intrón insertado se transpuso a nuevos sitios en el genoma del hámster a través de un intermediario de RNA que fue sometido al proceso de corte y emplame para eliminar el intrón. ▮

Puesto que los LINE no contienen LTR, su mecanismo de transposición a través de un intermediario de RNA difiere del de los retrotransposones con LTR. Las proteínas ORF1 y ORF2 son traducidas desde un RNA LINE. Los estudios in vitro indican que la transcripción mediante la RNA polimerasa II está dirigida por secuencias promotoras en el extremo izquierdo del DNA LINE integrado. El RNA LINE es poliadenilado mediante el mismo mecanismo postranscripcional que poliadenila otros mRNA. Después el RNA LINE es transportado al citoplasma, donde se traduce a las proteínas ORF1 y ORF2. Posteriormente, las múltiples copias de la proteína ORF1 se unen al RNA LINE y la proteína ORF2 se une a la cola poli(A).

El RNA LINE es transportado nuevamente al núcleo como un complejo con ORF1 y ORF2. Después ORF2 realiza cortes escalonados en el DNA cromosómico a cada lado de cualquier secuencia rica en A/T en el genoma (fig. 10-16, paso 1). La transcripción inversa del RNA LINE mediante el ORF2 se ceba mediante la secuencia de hebra simple rica en T generada por la muesca en la hebra inferior, la cual se hibrida con la cola de poli(A) del LINE (paso 2). ORF2 luego transcribe de manera inversa el RNA LINE (paso 3) y continúa esta nueva hebra de DNA, cambiando a la región de cadena simple de la hebra cromosómica superior como molde (pasos 4 y 5). Después las enzimas celulares hidrolizan el RNA y extienden el extremo 3′ de la hebra superior de DNA cromosómico, reemplazando la hebra de RNA LINE con DNA (paso 6).



▶ Fig. 10-16. Mecanismo propuesto de la transcripción inversa e integración de los LINE. Sólo se representó la proteína ORF2. En negro se muestra el DNA LINE recién sintetizado. Véase el texto para la explicación. (Adaptado de D. D. Luan et al., 1993, *Cell* 72:595.)

Por último, los extremos 5′ y 3′ de las hebras de DNA se ligan y se completa la inserción (paso 7). Estos últimos pasos (6 y 7) probablemente son catalizados por las mismas enzimas celulares que eliminan los cebadores de RNA y ligan los fragmentos de Okazaki durante la replicación del DNA (véase fig. 4-33). El proceso completo conduce a la inserción de una copia del retrotransposón LINE original en un nuevo sitio en el DNA cromosómico. Se genera una repetición directa corta en el sitio de inserción debido a la escisión escalonada inicial de las dos hebras de DNA cromosómico (paso 1).

La gran mayoría de los LINE en el genoma humano están truncados en su extremo 5′, lo que sugiere que la transcripción inversa termina antes de completarse y que los fragmentos resultantes se extienden a distancias variables desde la cola poli(A) donde fueron insertados. Debido a este acortamiento, el tamaño promedio de los elementos LINE es de sólo alrededor de 900 pares de bases, mientras que la secuencia de longitud completa es de ≈6 kb de largo. Además, casi todos los elementos de longitud completa contienen codones de terminación y mutaciones de corrimiento del marco de lectura en ORF1 y ORF2; estas mutaciones probablemente se acumularon en la mayoría de las secuencias LINE durante el transcurso del tiempo evolutivo. Como resultado del truncamiento y la mutación, sólo el 0,01% de las secuencias LINE del genoma humano son de longitud completa con marcos abiertos de lectura intactos para ORF1 y ORF2, ≈60–100 en total.

SINE. La segunda clase más abundante de elementos móviles en el genoma humano, los SINE, constituyen ≈13% del total del DNA. Con una longitud que varía aproximadamente de 100 a 400 pares de bases, estos retrotransposones no codifican proteínas, pero la mayoría contiene una secuencia 3′ rica en A/T similar a la de los LINE. Los SINE son transcriptos por la RNA polimerasa III, la misma RNA polimerasa nuclear que transcribe los genes que codifican los tRNA, rRNA 5S y otros RNA estables pequeños (cap. 11). Muy probablemente, las proteínas ORF1 y ORF2 expresadas a partir de LINE de longitud completa median la transposición de los SINE a través del mecanismo de retrotransposición representado en la figura 10-16.

Los SINE aparecen en alrededor de 1,6 millones de sitios en el genoma humano. De ellos, ≈1,1 millones son *elementos Alu*, denominados así porque la mayoría de ellos contienen un único sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Alu*1. Los elementos *Alu* exhiben considerable homología de secuencias con el RNA 7SL, un componente de la partícula de reconocimiento de señal, y probablemente hayan evolucionado de él. Esta abundante partícula ribonucleoproteica citosólica ayuda a dirigir ciertos polipéptidos, a medida que son sintetizados, hacia las membranas del retículo endoplasmático (cap. 16). Los elementos *Alu* están diseminados en todo el genoma humano en sitios donde su inserción no altera la expresión génica: entre genes, dentro de los intrones y en las regiones 3′ no traducidas de algunos mRNA. Por ejemplo, nueve elementos *Alu* se localizan dentro del grupo de genes de la β-globina humana (véase fig. 10-3b). Se estima que la frecuencia general de las retrotransposiciones L1 y SINE en los seres humanos es de alrededor de una retrotransposición nueva cada ocho individuos, siendo un ≈40% L1 y, un 60%, SINE de los cuales ≈90% son elementos *Alu*.

Similares a otros elementos móviles, la mayoría de los SINE han acumulado mutaciones desde el momento de su inserción en la línea germinal de un antiguo ancestro de los seres humanos modernos. Al igual que los LINE, muchos SINE también están truncados en sus extremos 5′. En el cuadro 10-1 se resumen los tipos principales de repeticiones dispersas derivadas de los elementos móviles en el genoma humano.

Además de los elementos móviles listados en el cuadro 10-1, parecen haberse integrado en el DNA cromosómico copias de DNA de una amplia variedad de mRNA. Puesto que estas secuencias carecen de intrones y no están flanqueadas por secuencias similares a las de las copias funcionales de genes; las mismas claramente no son genes duplicados que devinieron en no funcionales y se volvieron seudogenes, como se trató con anterioridad (fig. 10-3a). Por el contrario, estos segmentos de DNA parecen ser copias retrotranspuestas de mRNA poliadenilado y con sus intrones ya eliminados (procesado). Comparados con genes normales que codifican mRNA, estos segmentos insertados suelen contener múltiples mutaciones, las cuales se piensa que se acumularon desde que sus mRNA fueron transcriptos inversamente por primera vez y se integraron al azar en el genoma de una célula germinal en un antiguo ancestro. Estas copias genómicas no funcionales de mRNA se denominan *seudogenes procesados*. La mayoría de estos seudogenes están flanqueados por repeticiones directas cortas, lo que apoya la hipótesis de que fueron generados por episodios raros de retrotransposición que involucraron los mRNA celulares.

En los genomas de los mamíferos se hallan otras secuencias moderadamente repetitivas que representan copias parciales o mutantes de genes que codifican RNA nucleares pequeños (snRNA) y tRNA. Al igual que los seudogenes procesados derivados de mRNA, estas copias no funcionales de genes pequeños de RNA están flanqueadas por repeticiones directas cortas y muy probablemente son el resultado de episodios raros de retrotransposición que se acumularon durante del curso de la evolución. Se piensa que las enzimas expresadas desde un LINE llevaron a cabo todos estos eventos de retrotransposición que involucran mRNA, snRNA y tRNA.

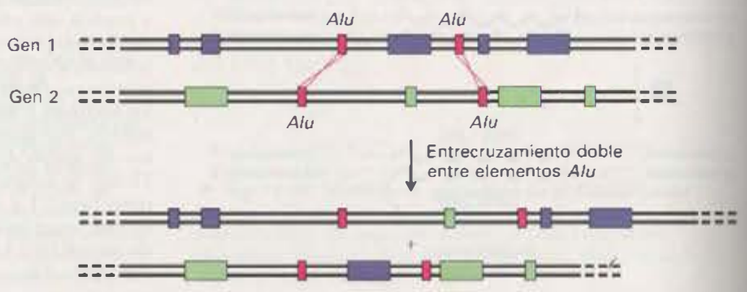
Es probable que los elementos de DNA móviles hayan tenido una influencia significativa sobre la evolución

Aunque los elementos de DNA móviles no parecen tener ninguna función directa además de mantener su propia existencia, su presencia debe de haber tenido un profundo impacto en la evolución de los organismos actuales. Como ya se mencionó, cerca de la mitad de las mutaciones espontáneas en *Drosophila* son el resultado de la inserción de un elemento de DNA móvil en una unidad de transcripción o cerca de ella. Sin embargo, en los mamíferos los elementos móviles causan una proporción mucho más pequeña de mutaciones espontáneas: ≈10% en los ratones y sólo 0,1-0,2% en los seres humanos. Aún así, se hallaron elementos móviles en alelos mutantes asociados con varias enfermedades genéticas humanas.

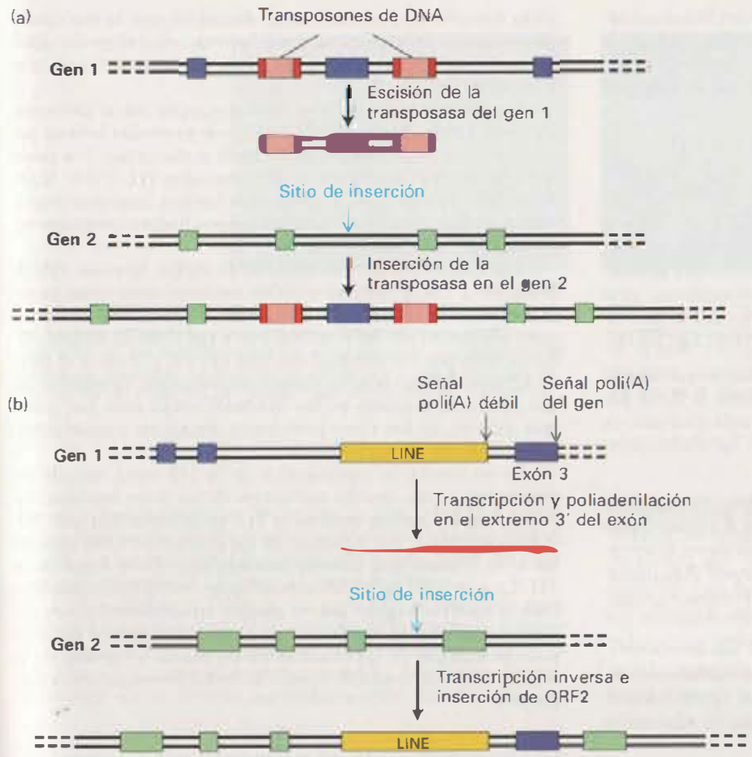
En los linajes que conducen a los eucariontes superiores, las recombinaciones homólogas entre elementos de DNA móviles dispersos en todos los genomas ancestrales pueden haber generado duplicaciones de genes y otras reestructuraciones durante la evolución (véase fig. 10-4). Por ejemplo, la clonación y la secuenciación del grupo de genes de la β-globina de diversas especies de primates proporcionaron fuerte evidencia de que los genes humanos Gγ y Aγ surgieron de un entrecruzamiento homólogo desigual entre dos secuencias L1 que flanqueaban un gen de globina ancestral. La divergencia posterior de esos genes duplicados pudo conducir a la adquisición de distintas funciones beneficiosas asociadas con cada miembro de una familia de genes. El entrecruzamiento desigual entre elementos móviles localizados dentro de los intrones de un gen en particular pudo conducir a la duplicación de exones dentro de ese gen. Este proceso muy probablemente influyó en la evolución de genes que contenían múltiples copias de exones similares que codificaban dominios proteicos similares, como el gen de la fibronectina (véase fig. 4-15).

Cierta evidencia sugiere que durante la evolución de los eucariontes superiores, también tuvo lugar la recombinación entre las repeticiones dispersas en los intrones de *dos* genes *separados*, generando nuevos genes a partir de combinaciones nóveles de exones preexistentes (fig. 10-17). Este proceso evolutivo, denominado **combinación de exones** (*"exon shuffling"*), pudo haber ocurrido durante la evolución de los genes que codifican el activador tisular del plasminógeno, el receptor Neu y el factor de crecimiento epidérmico, que contienen un dominio EGF (véase fig. 3-8). En este caso, la combinación de exones presumiblemente resultó en la inserción de un exón codificador de dominio EGF en un intrón de la forma ancestral de cada uno de estos genes.

Tanto los transposones de DNA como los retrotransposones LINE han mostrado llevarse ocasionalmente secuencias flanqueantes no relacionadas cuando se insertan en sitios nuevos mediante los mecanismos diagramados en la figura 10-18. Estos mecanismos también debieron contribuir al proceso de combinación de exones durante la evolución de genes contemporáneos.



▶ **Fig. 10-17. Proceso de mezcla de exones (*exon shuffling*) a través de recombinación entre repeticiones dispersas homólogas.** La recombinación entre repeticiones dispersas de DNA en los intrones de genes separados produce unidades de transcripción con una nueva combinación de exones. En el ejemplo aquí mostrado, un entrecruzamiento doble entre dos conjuntos de repeticiones *Alu* produce un intercambio de exones entre los dos genes.



◀ **Fig. 10-18. Proceso de mezcla de exones (*exon shuffling*) mediante transposición.** (a) Transposición de un exón flanqueado por transposones de DNA homólogos a un intrón de un segundo gen. Como vimos en la figura 10-10, paso 1, la transposasa puede reconocer y escindir el DNA en los extremos de las repeticiones invertidas de los transposones. En el gen 1, si la transposasa escinde el extremo izquierdo del transposón de la izquierda y el extremo derecho del transposón de la derecha, puede transponer todo el DNA interviniente, incluido el exón del gen 1, a un nuevo sitio en un intrón del gen 2. El resultado neto es una inserción de un exón del gen 1 en el gen 2. (b) Integración de un exón con otro gen a través de la transposición de LINE. Algunos LINE tienen señales poli(A) débiles. Si ese LINE se encuentra en el intrón más cercano al extremo 3′ del gen 1, durante la transposición su transcripción puede continuar más allá de sus propias señales poli(A) y extenderse al exón 3′, transcribiendo las señales de escisión y de poliadenilación del gen 1 en sí mismo. Luego, este RNA puede transcribirse en forma inversa e integrarse a un intrón en el gen 2 mediante la proteína ORF2 LINE (fig. 10-16), introduciendo un nuevo exón 3′ (del gen 1) en el gen 2.

Además de causar cambios en las secuencias codificadoras en el genoma, la recombinación entre elementos móviles y la transposición del DNA adyacente a los transposones de DNA y a los retrotransposones probablemente desempeñaron un papel significativo en la evolución de secuencias reguladoras que controlan la expresión génica. Como ya se dijo, los genes eucariontes tienen regiones de control de transcripción, denominadas amplificadores, que pueden funcionar a largas distancias de decenas de cientos de pares de bases. La transcripción de muchos genes se controla a través de los efectos combinados de varios elementos amplificadores. La inserción de elementos móviles cerca de esas regiones de control de la transcripción probablemente contribuyó a la evolución de nuevas combinaciones de secuencias amplificadoras. Éstas a su vez controlan en los organismos modernos cuáles genes específicos se expresan en tipos particulares de células y la cantidad de la proteína codificada producida, como trataremos en el siguiente capítulo.

Estas consideraciones sugieren que la creencia inicial de que los elementos móviles de DNA eran parásitos moleculares completamente "egoístas" estaba errada. Por el contrario, éstos deben de haber contribuido profundamente a la evolución de organismos superiores al promover 1) la generación de familias de genes a través de la duplicación de genes, 2) la creación de nuevos genes a través del proceso de combinación de exones preexistentes y 3) la formación de regiones reguladoras más complejas que proveen control multifacético de la expresión génica.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 10.3

DNA móvil

- Los elementos de DNA móvil son secuencias de DNA moderadamente repetidas intercaladas en múltiples sitios en todo el genoma de los eucariontes superiores. Están presentes con menor frecuencia en los genomas procariontes.
- Los elementos de DNA móvil que se transponen a nuevos sitios directamente como DNA se llaman *transposones de DNA*; los que primero se transcriben a una copia de RNA del elemento, el cual luego se transcribe inversamente a DNA, se llaman *retrotransposones* (véase fig. 10-8).
- Un rasgo común de todos los elementos móviles es la presencia de repeticiones directas cortas que flanquean la secuencia.
- Las enzimas codificadas por los elementos móviles por sí mismos catalizan la inserción de estas secuencias en nuevos sitios en el DNA genómico.
- Aunque los transposones de DNA, similares en estructura a los elementos bacterianos IS, se encuentran en los eucariontes (p. ej., el elemento P de *Drosophila*), los retrotransposones suelen ser mucho más abundantes, sobre todo en los vertebrados.
- Los retrotransposones LTR están flanqueados por repeticiones terminales largas (LTR), similares a las del DNA re-

troviral; al igual que los retrovirus, codifican la transcriptasa inversa y la integrasa. Se mueven en el genoma por transcripción a RNA, el cual luego se somete a transcripción inversa e integración al cromosoma de la célula huésped (véase fig. 10-13).

- Los elementos dispersos largos (LINE) y los elementos dispersos cortos (SINE) son los elementos móviles más abundantes en el genoma humano. Los LINE dan cuenta del ≈21% del DNA humano, los SINE, del ≈13%.
- Tanto los LINE como los SINE carecen de LTR y tienen un tramo rico en A/T en un extremo. Se piensa que se mueven mediante un mecanismo de retrotransposición no viral mediado por las proteínas codificadas por los LINE que involucra el cebado del DNA cromosómico (véase fig. 10-16).
- Las secuencias SINE exhiben una homología extensa con pequeños RNA celulares transcriptos mediante la RNA polimerasa III. Los elementos *Alu*, los SINE más comunes en los seres humanos, son secuencias de ≈300 bp diseminadas en todo el genoma.
- Algunas secuencias de DNA moderadamente repetidas son derivadas de RNA celulares sometidos a transcripción inversa e insertados en el DNA genómico en algún momento de la historia evolutiva. Los derivados de mRNA, llamados *seudogenes procesados*, carecen de intrones, un rasgo que los distingue de los seudogenes, los cuales surgieron por desviación de la secuencia de genes duplicados.
- Los elementos de DNA móviles muy probablemente influyeron significativamente en la evolución al servir como sitios de recombinación y al movilizar secuencias adyacentes de DNA.

10.4 Organización estructural de los cromosomas eucariontes

Ahora cambiamos de dirección y abordamos la pregunta de cómo se organizan las moléculas de DNA dentro de las células eucariontes. Debido a que la longitud total del DNA celular es superior a cientos de miles de veces la longitud de una célula, el empaquetamiento del DNA es crucial para la arquitectura de la célula. Durante la interfase, cuando las células no se están dividiendo, el material genético existe como un complejo de nucleoproteínas llamado **cromatina**, disperso en la mayor parte del núcleo. El posterior plegamiento y compactación de la cromatina durante la mitosis produce los visibles **cromosomas metafásicos**, cuyas características morfológicas y de tinción fueron detalladas por los primeros citogenetistas. En esta sección consideramos las propiedades de la cromatina y su organización en cromosomas. En la siguiente sección se analizan los rasgos importantes de los cromosomas en su totalidad.

El DNA nuclear de los eucariontes se asocia con proteínas histonas para formar cromatina

Cuando el DNA del núcleo eucarionte se aísla en medios *buffer* isotónicos (p. ej., medios *buffer* con la misma concentración salina hallada en las células, ≈0,15 M KCL), se asocia con una masa equivalente de proteínas y forma un complejo denominado cromatina. Se descubrió que la estructura general de la cromatina es notablemente similar en las células de todos los eucariontes, incluidos los hongos, las plantas y los animales.

Las proteínas más abundantes asociadas con el DNA eucarionte son las histonas, una familia de proteínas básicas pequeñas presentes en todos los núcleos eucariontes. Los cinco tipos principales de histonas –denominadas *H1, H2A, H2B, H3* y *H4*– son ricos en aminoácidos básicos cargados positivamente, que interactúan con los grupos fosfato cargados negativamente del DNA.

Las secuencias de aminoácidos de cuatro histonas (H2A, H2B, H3 y H4) presentan notable similitud entre especies remotamente relacionadas. Por ejemplo, las secuencias de la histona H3 del tejido del erizo de mar y del timo de ternero difieren sólo por un aminoácido, y la H3 del poroto y el timo de ternero difieren sólo en cuatro aminoácidos. También existen variantes mínimas en las histonas codificadas por genes que difieren de los tipos principales altamente conservados, sobre todo en los vertebrados.

La secuencia de aminoácidos de la H1 varía más de un organismo a otro que las secuencias de las otras histonas importantes. En ciertos tejidos, la H1 es reemplazada por bistonas especiales. Por ejemplo, en los eritrocitos nucleados de las aves aparece una histona denominada *H5* en lugar de la H1. La similitud en las secuencias entre las histonas de todos los eucariontes sugiere que se pliegan en conformaciones tridimensionales muy similares que alcanzaron niveles óptimos para la función de las histonas en un punto temprano de la evolución en un ancestro común de todos los eucariontes modernos.

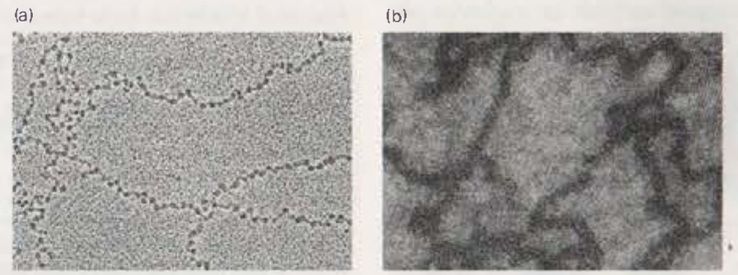
La cromatina existe en las formas condensada y extendida

Cuando la cromatina se extrae del núcleo y se examina con el microscopio electrónico, su aspecto depende de la concentración salina a la cual se expone. Con baja concentración salina, en ausencia de cationes divalentes como el Mg^{+2}, la cromatina aislada se asemeja a las "perlas de un collar" (fig. 10-19a). En esta forma extendida, el cordón está compuesto de DNA libre llamado DNA "conector", que liga estructuras semejantes a las perlas denominadas nucleosomas. Compuestos por DNA e histonas, los nucleosomas tienen alrededor de 10 nm de diámetro y son las principales unidades estructurales de la cromatina. Si se aísla la cromatina a concentraciones salinas fisiológicas (≈0,15 M KCl, 0,004 M de Mg^{+2}), adopta una forma tipo fibra más condensada que tiene un diámetro de 30 nm (fig. 10-19b).

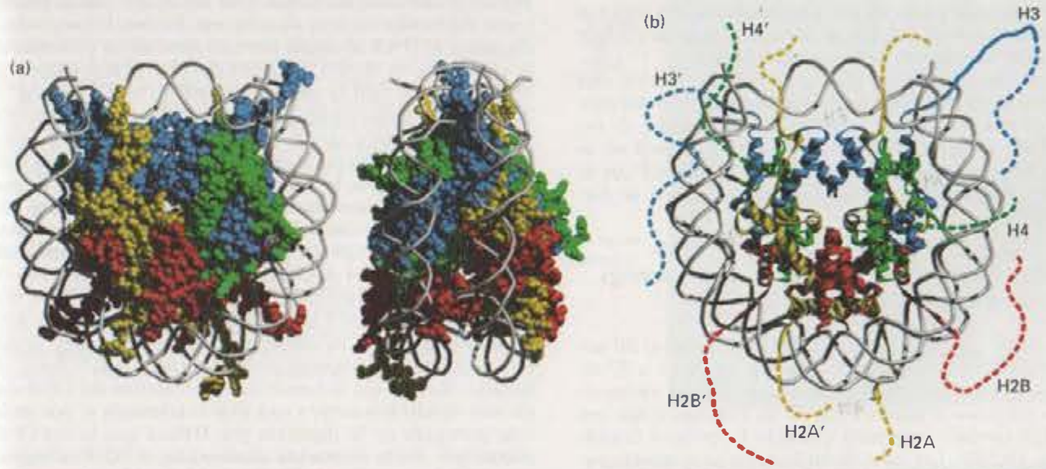
Estructura de los nucleosomas. El componente de DNA de los nucleosomas es mucho menos susceptible a la digestión por nucleasa que el DNA espaciador entre ellos. Si el tratamiento con nucleasa se controla con cuidado, se puede digerir todo el DNA espaciador, liberando los nucleosomas individuales con su componente de DNA. Un nucleosoma está formado por un núcleo de proteínas con DNA enrollado alrededor de su superficie como el hilo alrededor de un carretel. El núcleo es un octámero que contiene dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. La cristalografía porrayos X mostró que el núcleo octamérico de histonas es una molécula con forma de disco compuesta de subunidades de histona entrelazadas (fig. 10-20). Los nucleosomas de todos los eucariontes contienen 147 pares de bases de DNA enroscados algo menos de dos vueltas alrededor del núcleo de proteínas. La longitud del DNA espaciador varía entre las especies y alcanza desde 15 hasta 55 pares de bases.

En las células, el DNA recién replicado se ensambla para formar los nucleosomas poco después de que pasa la horquilla de replicación, pero cuando se añaden histonas aisladas al DNA in vitro a una concentración salina fisiológica, los nucleosomas no se forman espontáneamente. Sin embargo, se caracterizaron las proteínas nucleares que se unen a las histonas y las ensamblan con el DNA en nucleosomas in vitro. Se piensa que las proteínas de este tipo también ensamblan histonas y el DNA recién replicados para formar nucleosomas in vivo.

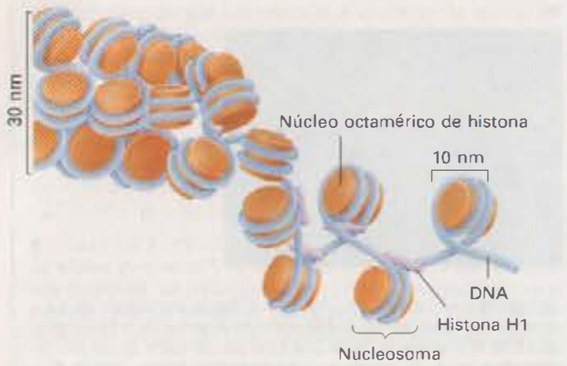
Estructura de la cromatina condensada. Cuando se extrae la cromatina de las células en un *buffer* isotónico, la mayoría aparece como fibras de ≈30 nm de diámetro (véase fig.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 10-19 La cromatina extraída en las formas extendida y condensada tiene aspecto muy diferente en las microfotografías electrónicas. (a) La cromatina aislada en un buffer de baja fuerza iónica tiene una apariencia de "perlas de un collar". Las "perlas" son nucleosomas (10 nm de diámetro) y el "collar" es DNA que conecta (conector). (b) La cromatina aislada en un buffer con una fuerza iónica fisiológica (0,15 M KCl) aparece como una fibra condensada de 30 nm de diámetro. [Parte (a) cortesía de S. McKnight y O. Miller, Jr.; parte (b) cortesía de B. Hamkalo y J. B. Rattner.]



▲ Fig. 10-20. Estructura del nucleosoma sobre la base de cristalografía de rayos X. (a) Modelo espacial mostrado de frente (*izquierda*) y de costado (*derecha*, rotado 90° en sentido de las agujas del reloj). La H2A es amarilla; la H2B es roja; la H3 es azul; la H4 es verde. La columna vertebral de azúcar-fosfato de las hebras de DNA se muestra como tubos blancos. Las colas N-terminales de las ocho histonas y las dos colas C-terminales de la H2A involucradas en la condensación de la cromatina, no son visibles porque están desordenadas en el cristal. (b) Diagrama de cintas de las histonas que muestra las longitudes de las colas de histona (líneas punteadas) no visibles en la estructura de cristal. Colas N-terminal de H2A en la parte inferior, colas C-terminales en la parte superior. [Parte (a) según K. Luger et al., 1997, *Nature* 389:251; parte (b) K. Luger y T. J. Richmond, 1998, *Curr. Opin. Gen. Dev.* 8:140.]



▲ **Fig. 10-21. Modelo solenoide de la fibra de cromatina condensada de 30 nm, en una vista lateral.** El núcleo octamérico de histonas (véase fig. 10-20) se muestra como un disco anaranjado. Cada nucleosoma se asocia con una molécula de H1, y la fibra se enrolla en una estructura solenoide con un diámetro de 30 nm. (Adaptado de M. Grunstein, 1992, *Sci. Am.* 267:68.)

10-19b). Se cree que en estas fibras condensadas los nucleosomas están empaquetados en una espiral irregular o formando un solenoide, con aproximadamente seis nucleosomas por vuelta (fig. 10-21). H1, la quinta histona principal, se une al DNA en el interior del solenoide, con una molécula H1 asociada con cada nucleosoma. Estudios recientes con microscopio electrónico sugieren que la fibra de 30 nm es menos uniforme que un solenoide perfecto. De hecho, la cromatina condensada puede ser bastante dinámica, con regiones que ocasionalmente se despliegan en parte y luego se vuelven a plegar para formar una estructura solenoide.

La cromatina en las regiones cromosómicas que no está siendo transcripta existe predominantemente en la forma condensada de fibra de 30 nm y en estructuras plegadas de orden superior cuyas conformaciones detalladas todavía no se conocen. Se piensa que las regiones de la cromatina que se transcriben activamente adoptan la forma extendida de perlas de collar.

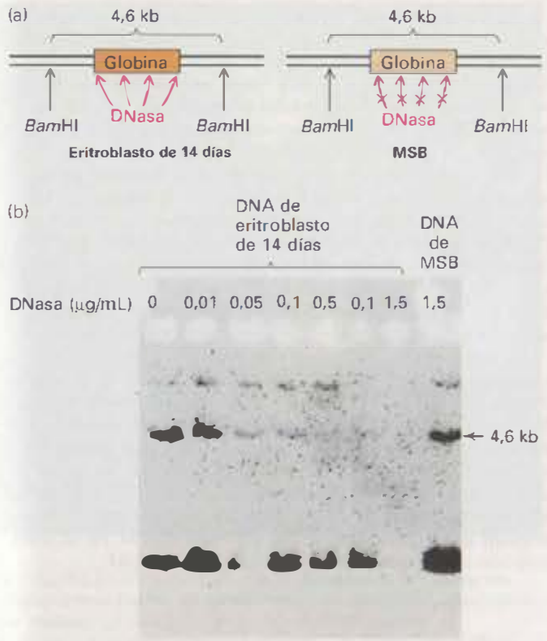
La modificación de las colas de histona controla la condensación de la cromatina

Cada una de las histonas que conforman el núcleo del nucleosoma contiene un extremo amino flexible de 11 a 37 residuos que se extienden desde la estructura fija del nucleosoma; estos extremos se llaman *colas de las histonas*. Cada una de las H2A también contienen una cola C-terminal flexible (véase fig. 10-20b). Las colas de las histonas se requieren para que la cromatina se condense desde la conformación de perlas de un collar a la fibra de 30 nm. Varias cadenas laterales de lisina cargadas positivamente en las colas de las histonas pueden interactuar con el DNA espaciador y las colas de un nucleosoma probablemente interactúen con los nucleosomas circundantes. Las lisinas de la cola de histona, sobre todo aquellas en H3 y H4, sufren acetilación y desacetilación reversibles mediante enzimas que actúan sobre lisinas específicas en el N-terminal. En la forma acetilada, la carga positiva del grupo ε-amino de la lisina se neutraliza y elimina su interacción con un grupo fosfato del DNA. Por ende, mientras más grande es la acetilación del N-terminal de la histona, menor será la probabilidad de que la cromatina forme fibras condensadas de 30 nm y posiblemente estructuras plegadas de orden superior.

Las colas de las histonas también pueden unirse a otras proteínas asociadas con la cromatina que influyen en la estructura de la cromatina y en procesos como la transcripción y la replicación del DNA. La interacción de las colas de las histonas con estas proteínas puede regularse mediante diversas modificaciones covalentes de cadenas laterales de aminoácidos de la cola de histona. Éstas incluyen la acetilación de los grupos ε-amino de la lisina, como ya se mencionó, al igual que la metilación de estos grupos, un proceso que evita la acetilación, manteniendo así su carga positiva. Las cadenas laterales de arginina también pueden ser metiladas. Las cadenas laterales de serina y treonina pueden ser fosforiladas introduciendo una carga negativa. Por último, una única molécula de ubicuitina de 76 aminoácidos puede añadirse a algunas lisinas. Hay que recordar que la adición de múltiples moléculas de ubicuitina conectadas a una proteína puede marcarla para ser degradada por el proteasoma (cap. 3). En este caso, la adición de una única ubicuitina no afecta la estabilidad de una histona, pero influye en la estructura de la cromatina. En resumen, los múltiples tipos de modificaciones covalentes de las colas de histona pueden influir en la estructura de la cromatina al alternar las interacciones del DNA de la histona y las interacciones entre los nucleosomas y al controlar las interacciones con proteínas adicionales que participan en la regulación de la transcripción, como se trata en el siguiente capítulo.

La magnitud de la acetilación de la histona se correlaciona con la resistencia relativa del DNA de la cromatina a la digestión mediante nucleasas. Este fenómeno puede demostrarse digiriendo núcleos aislados con DNasa I. Luego de la digestión, el DNA se separa por completo de las proteínas de la cromatina, se digiere en su totalidad con una enzima de restricción y se analiza mediante *Southern blot* (véase fig. 9-26). Un gen intacto tratado con una enzima de restricción produce fragmentos característicos. Cuando un gen se expone primero a la DNasa, es escindido en sitios aleatorios dentro de los límites de los sitios de corte de la enzima de restricción. En consecuencia, cualquier banda de *Southern blot* vista normalmente con ese gen se perderá. Este método se empleó para mostrar que el gen de β-globina transcripcionalmente inactivo en las células no eritroides, donde está asociado con histonas relativamente no acetiladas, es mucho más resistente a la DNasa I que el gen transcripcionalmente activo de β-globina en las células precursoras eritroides, donde está asociado con histonas acetiladas (fig. 10-22). Estos resultados indican que la estructura de cromatina del DNA que no está siendo transcripto está más condensada y, por ende, más protegida de la digestión por DNasa que la del DNA transcripto. En la cromatina condensada, el DNA es mayormente inaccesible para la DNasa I debido a su cercana asociación con histonas y otras proteínas de la cromatina menos abundantes. Por el contrario, el DNA transcripcionalmente activo es mucho más accesible a la digestión con DNasa I porque está presente en la forma extendida de la cromatina, como perlas de un collar.

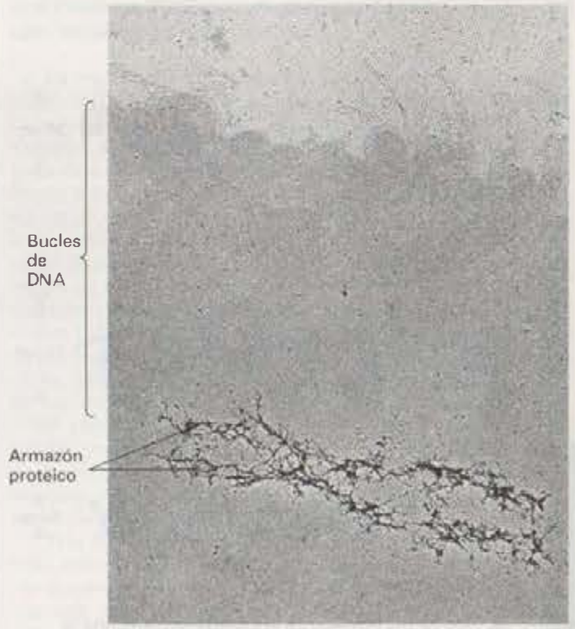
Los estudios genéticos en las levaduras indican que se requieren acetilasas específicas de histona para la activación completa de la transcripción de numerosos genes. Por lo tanto, como se verá en el capítulo 11, se piensa que el control de la acetilación del N-terminal de la histona en regiones cromosómicas específicas contribuye al control génico mediante la regulación de la fuerza de la interacción de las histonas con el DNA y del plegamiento de la cromatina en estructuras condensadas. Los genes de las regiones plegadas condensadas de la cromatina son inaccesibles a la RNA polimerasa y otras proteínas requeridas para la transcripción.



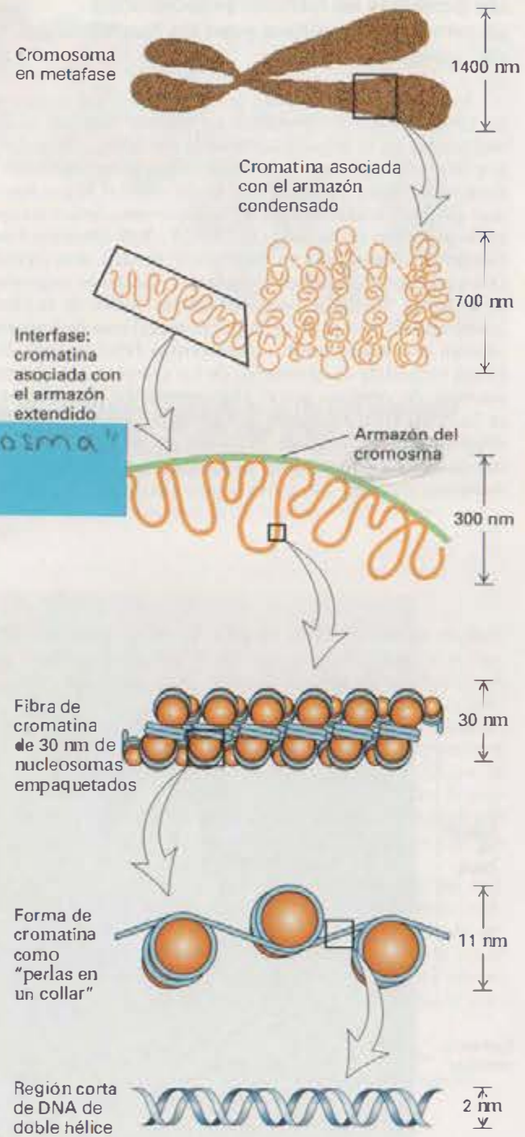
▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 10-22 Los genes que no se transcriben son menos susceptibles a la digestión con DNasa I que los genes activos.** Los eritroblastos de embrión de pollo de 14 días sintetizan activamente globina, mientras que las células MSB no diferenciadas en cultivo no lo hacen. (a) Los núcleos de cada tipo de célula se aislaron y expusieron a concentraciones crecientes de DNasa I. Luego se extrajo el DNA nuclear y se lo trató con la enzima de restricción *Bam*HI, la cual escinde el DNA alrededor de la secuencia de globina y normalmente libera un fragmento de globina de 4,6 kb. (b) El DNA digerido por la DNasa I y la *Bam*HI se sometió a análisis de Southern blot con una sonda de DNA de globina adulta clonada marcada, la cual se hibrida con el fragmento *Bam*HI de 4,6 kb. Si el gen de globina es susceptible a la digestión inicial por DNasa, debería escindirse repetidamente y no se esperaría que se mostrase en este fragmento. Como se ve en el Southern blot, el DNA transcripcionalmente activo de las células sintetizadoras de globina de 14 días fue sensible a la digestión con DNasa I, indicado por la ausencia de la banda de 4,6 kb a las mayores concentraciones de nucleasa. En cambio, el DNA inactivo de las células de MSB fue resistente a la digestión. Estos resultados sugieren que el DNA inactivo se encuentra en una forma más condensada de cromatina en la cual el gen de globina está protegido de la digestión con DNasa. (Véase J. Stalder et al., 1980, *Cell* 19:973; fotografía cortesía de H. Weintraub.)

Las proteínas no histonas proporcionan un armazón estructural para los bucles largos de cromatina

Aunque las histonas son las proteínas predominantes en los cromosomas, las proteínas no histona también están involucradas en la organización de la estructura del cromosoma. Microfotografías electrónicas de los cromosomas sin histona en metafase de las células HeLa revelan largos bucles o asas de DNA anclados a un *armazón cromosómico* compuesto de proteínas no histona (fig. 10-23). Este armazón tiene la forma del cromosoma en metafase y persiste aun cuando el DNA es digerido mediante nucleasas. Como se esquematiza en la figura 10-24, se propuso que los bucles de la fibra de cromatina de 30 nm de unas pocas megabases de longitud se asocian con un armazón cromosómico flexible, para dar la forma extendida característica de los cromosomas durante la interfase. Se propuso que el plegamiento del armazón produce la estructura altamente condensada característica de los cromosomas en metafase. Pero aún no se determinó la geometría del plegamiento del armazón de los cromosomas en metafase.



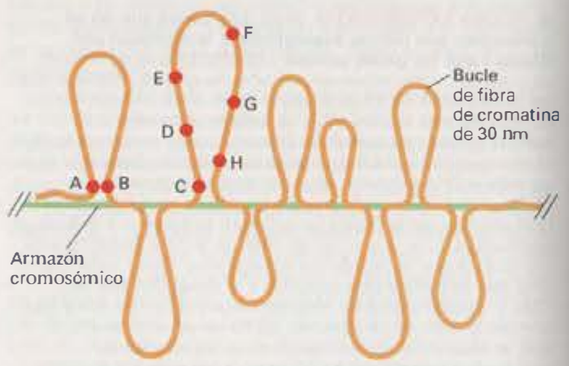
▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 10-23 Una microfotografía electrónica de un cromosoma en metafase sin histonas revela el armazón alrededor del cual se organiza el DNA.** Los bucles largos de DNA son visibles extendiéndose del armazón de proteína no histona (la estructura oscura). La forma del armazón refleja la del mismo cromosoma metafásico. El cromosoma fue preparado a partir de células HeLa mediante tratamiento con un detergente suave. (De J. R. Paulson y U. K. Laemmli, 1977, *Cell* 12:817. Copyright 1977 MIT.)



▲ **Fig. 10-24. Modelo de empaquetamiento de la cromatina y del armazón cromosómico en los cromosomas en metafase.** En los cromosomas en interfase, largas extensiones de cromatina de 30 nm forman bucles hacia afuera de los armazones extendidos. En los cromosomas metafásicos, el armazón se pliega adicionalmente para formar una estructura muy compacta cuya geometría precisa aún no se ha determinado.

Los experimentos de hibridación in situ con varias sondas diferentes de DNA marcadas con fluorescencia en células humanas en interfase avalan el modelo de bucles mostrado en la figura 10-24. En estos experimentos, algunas secuencias de la sonda separadas por millones de pares de bases en el DNA lineal aparecieron en forma reproducible muy cercanas entre sí en el núcleo en interfase de diferentes células (fig. 10-25). Se postuló que estos sitios de sonda estrechamente espaciados se encuentran cerca de secuencias específicas del DNA, llamadas *regiones asociadas con el armazón (SAR)* o *regiones de adhesión a la matriz (MAR)*, que están conectadas al armazón del cromosoma. Las SAR han sido ubicadas mediante la digestión de cromosomas libres de histona con enzimas de restricción y la posterior recuperación de los fragmentos unidos a las proteínas del armazón.

En general, las SAR se encuentran entre unidades de transcripción. En otras palabras, los genes se localizan principalmente dentro de los bucles de cromatina, los cuales están adheridos en sus bases a un armazón cromosómico. Los experimentos con ratones transgénicos indican que en algunos casos se necesitan SAR para la transcripción de genes vecinos. En *Drosophila*, algunas SAR pueden aislar unidades de transcripción entre sí, de manera tal que las proteínas que regulan la transcripción de un gen no influyan en la transcripción de un gen vecino separado por una SAR.



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 10-25 Sondas marcadas con fluorescencia, hibridadas con cromosomas en interfase, demuestran los bucles de cromatina y permiten su medición.** Se llevó a cabo la hibridación in situ de células en interfase con varias sondas diferentes específicas para secuencias separadas por distancias conocidas en el DNA clonado lineal. Los círculos con letras representan sondas. Las mediciones de las distancias entre diferentes sondas hibridadas, que pueden distinguirse por su color, mostraron que algunas secuencias (p. ej., A, B y C), separadas entre sí por millones de pares de bases, aparecen localizadas una cerca de la otra dentro del núcleo. Para algunos conjuntos de secuencias, las distancias medidas en el núcleo entre una sonda (p. ej., C) y las secuencias ubicadas a distancias sucesivamente mayores, parecen aumentarse al principio (p. ej., D, E y F) y luego parecen disminuir (p. ej., G y H). Las distancias medidas entre sondas se corresponden con los bucles que van desde 1 millón a 4 millones de pares de bases de tamaño. (Adaptada de H. Yokota et al., 1995, *J. Cell Biol.* 130:1239.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación focalizada: Empaquetamiento tridimensional de los cromosomas nucleares



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 10-26 Durante la interfase los cromosomas humanos permanecen en dominios específicos del núcleo.** Linfocitos humanos en interfase fijados, se hibridaron in situ con sondas marcadas con biotina específicas para secuencias a lo largo de la longitud total del cromosoma 7 humano y se visualizaron con avidina marcada fluorescentemente. En la célula diploide aquí mostrada, cada uno de los dos cromosomas 7 está restringido a un territorio o dominio dentro del núcleo, en lugar de extenderse por todo el núcleo. (De P. Lichter et al., 1988, *Hum. Genet.* 80:224.)

Los cromosomas individuales en interfase, que están menos condensados que los cromosomas en metafase, no pueden resolverse mediante microscopia estándar o microscopia electrónica. Sin embargo, la cromatina de las células en interfase se asocia con armazones extendidos y luego se organiza en dominios específicos. Esto se demuestra mediante la hibridación in situ del núcleo en interfase con una gran mezcla de sondas marcadas con fluorescencia específicas para las secuencias a lo largo de la longitud de un cromosoma en particular. Como se ilustra en la figura 10-26, las sondas unidas se visualizan dentro de regiones restringidas o dominios del núcleo en lugar de aparecer en todo el núcleo. El uso de sondas específicas para diferentes cromosomas demuestra que existe poca superposición entre cromosomas en el núcleo en interfase. Sin embargo, las posiciones precisas de los cromosomas en distintas células no son reproducibles.

La cromatina contiene pequeñas cantidades de otras proteínas además de las histonas y de las proteínas del armazón

La masa total de las histonas asociadas con el DNA en la cromatina es aproximadamente igual a la del DNA. La cromatina de la interfase y los cromosomas en metafase también contienen pequeñas cantidades de un complejo grupo de otras proteínas. Por ejemplo, se identificó una lista creciente de **factores de transcripción** de unión al DNA asociados con la cromatina en interfase. La estructura y la función de estas proteínas no histonas críticas, que ayudan a regular la transcripción, se analizan en el capítulo 11. Otras proteínas no histonas menos abundantes asociadas con la cromatina regulan la replicación del DNA durante el ciclo celular eucarionte (cap. 21).

Otras pocas proteínas no histonas de unión al DNA están presentes en cantidades mucho mayores que los factores de transcripción o replicación. Algunas de éstas exhiben alta movilidad durante la separación electroforética y por ello se las designó *proteínas HMG (high mobility group)*. Cuando se eliminan de las células de levadura los genes que codifican las proteínas HMG más abundantes, se altera la transcripción normal en la mayoría de los otros genes analizados. Se descubrió que algunas proteínas HMG se unen al DNA cooperativamente con los factores de transcripción que se unen a secuencias de DNA específicas y estabilizan los complejos multiproteína que regulan la transcripción de un gen vecino.

Los cromosomas eucariontes contienen una molécula lineal de DNA

En los eucariontes inferiores, los tamaños de las moléculas de DNA más largas que se pueden extraer indican que cada cromosoma contiene una única molécula de DNA. Por ejemplo, el DNA de cada uno de los cromosomas bastante pequeños de *S. cerevisiae* ($2{,}3 \times 10^5$ a $1{,}5 \times 10^6$ pares de bases) puede separarse e identificarse mediante electroforesis en gel con campo pulsado. El análisis físico de las moléculas más grandes de DNA extraídas de varias especies y cepas genéticamente diferentes de *Drosophila* muestra que miden de 6×10^7 a 1×10^8 pares de bases de largo. Estos tamaños concuerdan con el contenido de DNA de cromosomas individuales en metafase teñidos de esas especies de *Drosophila*, medidos por la cantidad de colorante específico de DNA absorbido. Las moléculas de DNA más largas de los cromosomas humanos son demasiado grandes ($2{,}8 \times 10^8$ pares de bases, o casi 10 cm de largo) para ser extraídas sin romperlas. Sin embargo, las observaciones con eucariontes inferiores avalan la conclusión de que cada cromosoma visualizado durante la mitosis contiene una única molécula de DNA.

Para resumir nuestro abordaje hasta el momento, hemos visto que el cromosoma eucarionte es una estructura lineal compuesta de una molécula de DNA inmensamente larga que está enrollada alrededor de los octámeros de histona aproximadamente cada 200 bp, formando cordones de nucleosomas estrechamente empaquetados. Los nucleosomas se pliegan para formar una fibra de cromatina de 30 nm, la cual está adherida a un armazón de proteína flexible a intervalos de millones de pares de bases, lo que produce largos bucles de cromatina que se extienden desde el armazón (véase fig. 10-24). Además de esta estructura general, un conjunto complejo de miles de proteínas reguladoras poco abundantes se asocian con secuencias específicas en el DNA cromosómico.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 10.4

Organización estructural de los cromosomas eucariontes

- En las células eucariontes, el DNA se asocia con una masa aproximadamente igual de proteínas histona en un complejo nucleoproteico altamente condensado llamado *cromatina*. El bloque constitutivo de la cromatina es el nucleosoma, que consiste en un octámero de histonas alrededor del cual se enrollan 147 bp de DNA (véase fig. 10-21).
- Se piensa que la cromatina en las regiones transcripcionalmente inactivas del DNA dentro de las células existe en la forma condensada de una fibra de 30 nm y en estructuras de orden superior construidas a partir de ésta (véase fig. 10-19).
- Se cree que la cromatina en las regiones transcripcionalmente activas del DNA dentro de las células existe en una forma abierta extendida.
- La acetilación y la desacetilación reversibles de residuos de lisina en el N-terminal de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 controlan cuán fuertemente está unido el DNA por el octámero de histonas y afecta el ensamblaje de los nucleosomas para establecer la forma condensada de la cromatina (véase fig. 10-20b).
- Las colas de histona también pueden modificarse mediante metilación, fosforilación y monoubicuitinación. Estas modificaciones influyen en la estructura de la cromatina al regular la unión de las colas de histona a otras proteínas menos abundantes asociadas con la cromatina.
- La cromatina hipoacetilada, inactiva en el aspecto transcripcional, adquiere una estructura más condensada y es más resistente a la DNasa I que la cromatina hiperacetilada y transcripcionalmente activa.
- Cada cromosoma eucarionte contiene una única molécula de DNA empaquetada en nucleosomas y plegada en una fibra de cromatina de 30 nm, la cual está unida a un armazón de proteínas en sitios específicos (véase fig. 10-24). Plegamientos adicionales del armazón compactan aún más la estructura en la forma altamente condensada de los cromosomas en metafase.

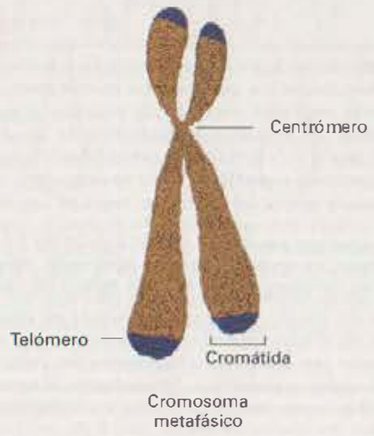
10.5 Morfología y elementos funcionales de los cromosomas eucariontes

Habiendo examinado la organización estructural detallada de los cromosomas en la sección anterior, la veremos ahora desde una perspectiva más global. Las primeras observaciones acerca del número y el tamaño de los cromosomas y sus patrones de tinción condujeron al descubrimiento de muchas características generales importantes de la estructura de los cromosomas. Los investigadores identificaron luego regiones cromosómicas críticas para su replicación y segregación a células hijas durante la división celular.

El número, el tamaño y la forma de los cromosomas en metafase son específicos de especie

Como ya se vio, en las células que no están en proceso de división, los cromosomas individuales no son visibles, aun con la ayuda de colorantes histológicos para el DNA (p. ej., colorantes de Feulgen o Giemsa) o microscopia electrónica. Sin embargo, durante la mitosis y la meiosis los cromosomas se condensan y se vuelven visibles con el microscopio óptico. Por ende, casi todo el trabajo citogenético (es decir, estudios de la morfología de los cromosomas) se realizó con cromosomas condensados en metafase obtenidos de células en división, ya sean células somáticas en mitosis o gametos en división durante la meiosis.

La condensación de cromosomas en metafase probablemente es el resultado de varios órdenes de plegamiento y enrollamiento de las fibras de cromatina de 30 nm (véase fig. 10-24). En el momento de la mitosis, las células ya han progresado a través de la fase S del ciclo celular y han replicado su DNA. En consecuencia, los cromosomas que se vuelven visibles durante la metafase son estructuras duplicadas. Cada cromosoma en metafase consiste en dos cromátidas hermanas, que están adheridas al centrómero (fig. 10-27). El número, los tamaños y las formas de los cromosomas metafásicos constituyen el cariotipo, que es distintivo para cada especie. En la mayoría de los organismos, todas las células tienen el mismo cariotipo. Sin embargo, las especies que parecen bastante similares pueden tener cariotipos muy diferentes, lo que indica que el potencial genético similar puede estar organizado en formas muy diferentes en los cromosomas. Por ejemplo, dos especies de ciervos pequeños –el mutiaco (muntjac) indio y el mutiaco de Reeves– contienen alrededor de la misma cantidad total de DNA genómico. En una especie, este



▲ Fig. 10-27. Aspecto microscópico de un cromosoma metafásico típico. Cada cromosoma se ha replicado y comprende dos cromátidas, cada una de las cuales contiene una de dos moléculas de DNA idénticas. El centrómero, donde las cromátidas están adheridas, es requerido para su separación al final de la mitosis. Las secuencias teloméricas especiales de los extremos tienen la función de evitar el acortamiento de los cromosomas.

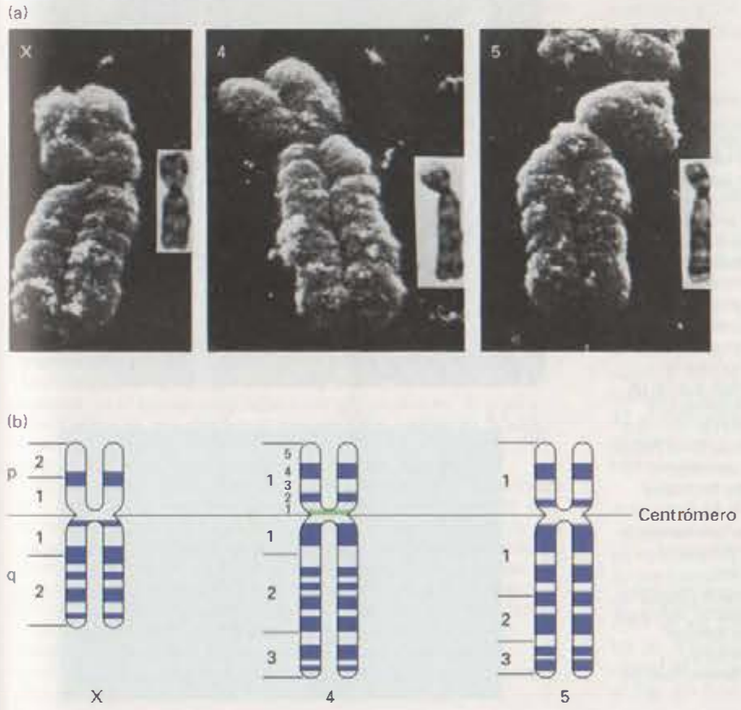
DNA está organizado en 22 pares de autosomas homólogos y dos cromosomas sexuales físicamente separados. En cambio, la otra especie contiene sólo tres pares de autosomas; un cromosoma sexual está físicamente separado, pero el otro está unido al extremo de un autosoma.

Durante la metafase, los cromosomas pueden distinguirse por los patrones de bandas y la coloración

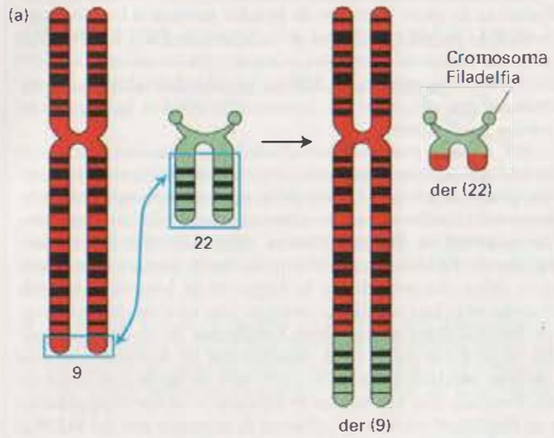
Ciertos colorantes tiñen selectivamente algunas regiones de los cromosomas en metafase más intensamente que otras y producen patrones característicos específicos de cromosomas individuales. Aunque el fundamento molecular para la regularidad de las bandas cromosómicas sigue siendo desconocido, sirven como puntos de referencias visibles y útiles a lo largo de la longitud de cada cromosoma y pueden ayudar a distinguir cromosomas de tamaño y forma similares.

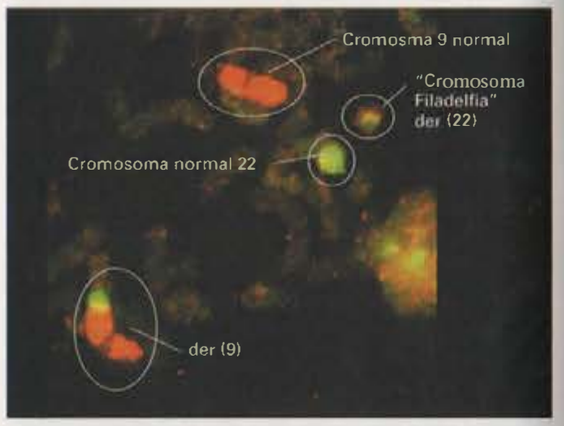
Las *bandas G* se producen cuando se somete brevemente a los cromosomas metafásicos a calor suave o a proteólisis y luego se los tiñe con el reactivo de Giemsa, un colorante permanente del DNA (fig. 10-28). Las bandas G corresponden a grandes regiones del genoma humano que tienen un contenido bajísimo de G+C. El tratamiento de los cromosomas con una solución alcalina caliente antes de la tinción con el reactivo de Giemsa produce *bandas R* en un patrón que es aproximadamente el inverso del patrón de bandas G. La cualidad distintiva de estos patrones de bandas permite a los citólogos identificar partes específicas de un cromosoma y localizar los sitios de rupturas y translocaciones cromosómicas (fig. 10-29a). Además, sondas de DNA clonadas hibridadas con secuencias específicas en los cromosomas pueden localizarse en bandas particulares.

Un método recién desarrollado para visualizar cada uno de los cromosomas humanos en colores brillantes distintivos, denominado *coloración de cromosomas*, simplifica enormemente la diferenciación entre cromosomas de tamaño y forma similares. En esta técnica, una variación de la hibridación de fluorescencia in situ, se usan sondas específicas para sitios diseminados a lo largo de la longitud de cada cromosoma. Las sondas se marcan con uno de dos colorantes fluorescentes a diferentes longitudes de onda. Las sondas específicas para cada cromosoma se marcan con una fracción predeterminada de cada uno de estos dos colorantes. Después que las sondas se hibridan con los cromosomas y se elimina el exceso, se observa la muestra con un microscopio de fluorescencia en el cual un detector determina la fracción de cada colorante presente en cada posición fluorescente del campo microscópico. Esta información se transmite a una computadora y un programa especial asigna una imagen falsa en color a cada tipo de cromosoma. Una técnica relacionada llamada *FISH multicolor* puede detectar las translocaciones cromosómicas (fig. 10-29b). Con esta técnica es posible un análisis mucho más detallado que permite detectar translocaciones cromosómicas que el análisis de bandas no revela.

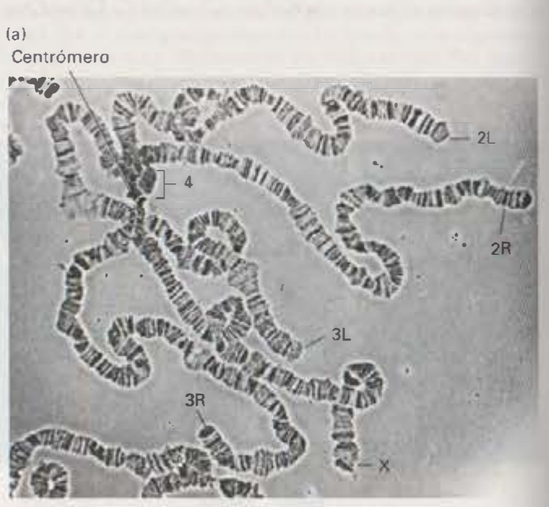


◀ FIGURA EXPERIMENTAL 10-28 Las bandas G producidas con el colorante Giemsa son marcadores útiles para identificar cromosomas específicos. Los cromosomas se someten a un breve tratamiento proteolítico y luego se tiñen con el reactivo Giemsa, con el que se forman bandas distintivas en lugares característicos. (a) Las microfotografías electrónicas de barrido de los cromosomas X, 4, y 5 muestran constricciones en los sitios donde las bandas aparecen en las microfotografías ópticas (recuadros). (b) Diagramas estándares de las bandas G (violeta). Las regiones de longitud variable (verde) son más comunes en la región del centrómero (p. ej., en el cromosoma 4). Por convención, p denota el brazo corto; q el brazo largo. Cada brazo está dividido en secciones principales (1, 2, etc.) y subsecciones. El brazo corto del cromosoma 4, por ejemplo, tiene cinco subsecciones. Para referirse al DNA localizado en la cuarta subsección está en p14. [Parte (a) de C. J. Harrison et al., 1981, *Exp. Cell Res.* 134:141; cortesía de C. J. Harrison.]





▲ FIGURA EXPERIMENTAL 10-29 Las translocaciones cromosómicas pueden analizarse utilizando patrones de banda y FISH multicolor. Algunas translocaciones cromosómicas características están asociadas con ciertos trastornos genéticos y tipos específicos de cáncer. Por ejemplo, en casi todos los pacientes con leucemia mieloide crónica, las células leucémicas contienen el cromosma Filadelfia, un cromosoma 22 acortado [der (22)], y un cromosoma 9 anormalmente largo [der (9)]. Esto es el resultado de una translocación entre los cromosomas normales 9 y 22. Esta translocación puede detectarse mediante análisis de banda clásicos (a) y por FISH multicolor (b). [Parte (a) de J. Kuby, 1997, Immunology, 3ra ed., W.H. Freeman and Company p. 578; parte (b) cortesía de J. Rowley y R. Espinosa.]

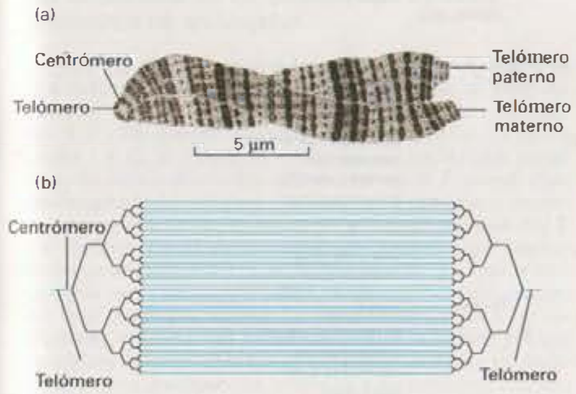


▶ FIGURA EXPERIMENTAL 10-30 El método de bandeado en los cromosomas politénicos de la glándula salival de *Drosophila* y la hibridación in situ se emplean juntos para localizar las secuencias de genes. (a) En esta microfotografía óptica de los cromosomas de glándula salival de larva de *Drosophila melanogaster*, pueden observarse cuatro cromosomas (X, 2, 3 y 4), con un total de aproximadamente 5000 bandas distinguibles. Los centrómeros de los cuatro cromosomas a menudo aparecen fusionados en el cromocentro. Las puntas de los cromosomas 2 y 3 están marcadas (L = brazo izquierdo; R = brazo derecho), al igual que la punta del cromosoma X. (b) Una secuencia de DNA particular puede ubicarse en el mapa de los cromosomas de glándula salival de *Drosophila* mediante hibridación in situ. Esta microfotografía muestra una porción de un cromosoma que se hibridó con una secuencia de DNA clonada marcada con nucleótidos biotinilados. La hibridación se detecta con avidina, la proteína de unión a biotina que está unida covalentemente a la enzima fosfatasa alcalina. Cuando se adiciona un sustrato soluble, la enzima cataliza una reacción que tiene como resultado la formación de un precipitado coloreado insoluble en el sitio de hibridación (asterisco). Puesto que los patrones de bandas muy reproducibles son característicos de cada cromosoma politénico de *Drosophila*, la secuencia hibridada puede localizarse sobre un cromosoma en particular. Los números indican las bandas principales. Las bandas que están entre las indicadas se designan con números y letras (no mostradas). [Parte (a) cortesía de J. Gall; parte (b) cortesía de F. Pignoni.]

Los cromosomas politénicos en interfase surgen por amplificación del DNA

Las glándulas salivales de especies de *Drosophila* y otros insectos dípteros contienen cromosomas en interfase agrandados que son visibles con el microscopio óptico. Cuando se fijan y se tiñen, estos cromosomas politénicos se caracterizan por un gran número de bandas reproducibles bien demarcadas a las que se les asignan números estandarizados (fig. 10-30a). Los patrones de bandas altamente reproducibles que se ven en los cromosomas de las glándulas salivales proporcionan un método muy poderoso para localizar secuencias de DNA específicas a lo largo de la longitud de los cromosomas en esta especie. Por ejemplo, la ubicación cromosómica de una secuencia de DNA clonada puede determinarse con precisión al hibridar una muestra marcada de DNA clonado con cromosomas politénicos preparados a partir de glándula salival de larvas (fig. 10-30b).

Una amplificación generalizada del DNA da origen a los cromosomas politénicos hallados en las glándulas salivales de *Drosophila*. Este proceso, denominado *politenización*, tiene lugar cuando el DNA se replica repetidamente, pero los cromosomas hijos no se separan. El resultado es un cromosoma agrandado compuesto de muchas copias paralelas de sí mismo (fig. 10-31). La amplificación de DNA cromosómico incrementa muchísimo el número de copias de genes, tal vez para abastecer de suficiente mRNA para la síntesis de proteínas en las células de las glándulas salivales. Aunque las bandas que se ven en los cromosomas humanos en metafase probablemente representen extensiones muy largas de DNA plegado o compactado que contienen alrededor de 10^7 pares de bases, las bandas en los cromosomas politénicos representan extensiones mucho más cortas de sólo 50.000–100.000 pares de bases.



▲ Fig. 10-31. Amplificación del DNA a lo largo del cuarto cromosoma politénico de *Drosophila melanogaster*. (a) Morfología del cuarto cromosoma politénico teñido como aparece en el microscopio óptico con gran aumento. El cuarto cromosoma es, por mucho, el más pequeño (véase fig. 10-30). Las cromátidas homólogas (paterna y materna) se aparean. El patrón de bandas es el resultado del empaquetamiento reproducible de DNA y proteínas dentro de cada sitio amplificado a lo largo del cromosoma. Las bandas oscuras son regiones de la cromatina más compactada. (b) Patrón de amplificación de una de las dos cromátidas homólogas durante cinco replicaciones. El DNA de hebra doble se representa mediante una única línea. Los DNA del telómero y del centrómero no están amplificados. En los cromosomas politénicos de las glándulas salivales, cada cromosoma parental atraviesa ≈10 replicaciones (2^{10} = 1024 hebras). [Parte (a) de C. Bridges, 1935, J. Hered. 26:60; parte (b) adaptada de C. D. Laird et al., 1973, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 38:311.]

La heterocromatina consiste en regiones cromosómicas que no se desenrollan

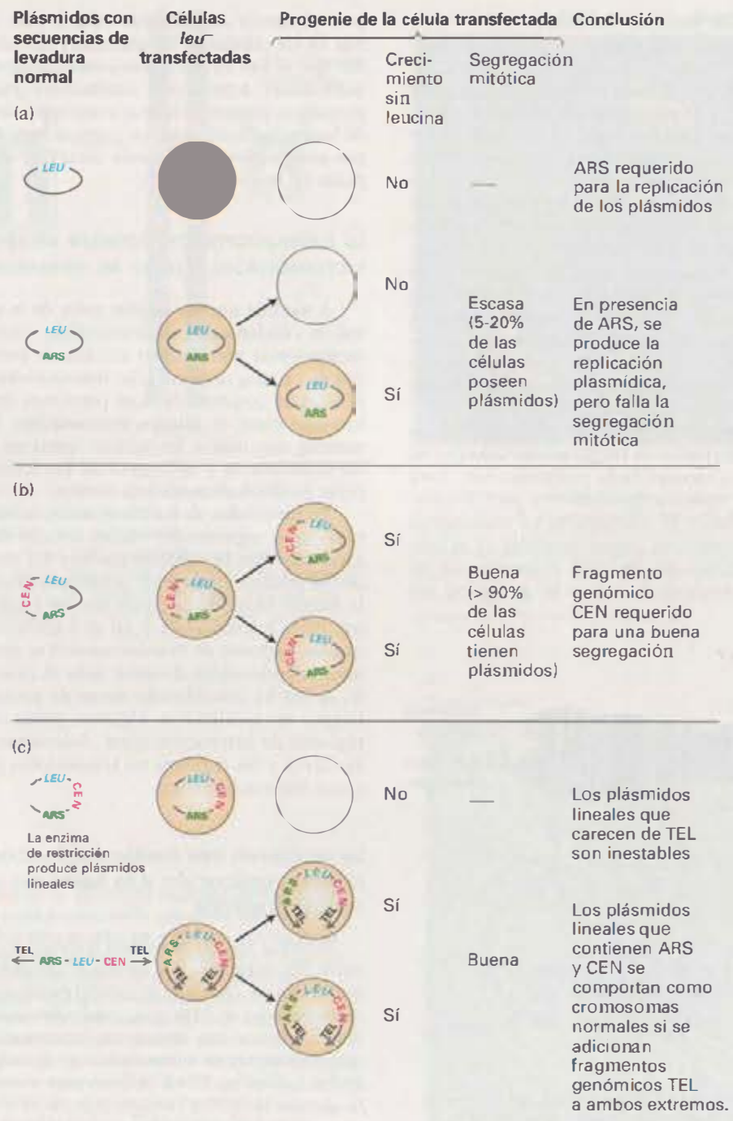
A medida que las células salen de la mitosis y los cromosomas condensados se desenrollan, ciertas secciones de los cromosomas permanecen teñidas de oscuro. Las áreas teñidas de oscuro, denominadas heterocromatina son regiones de cromatina condensada. Las porciones de cromatina con coloración clara se llaman eucromatina. La heterocromatina aparece con mayor frecuencia –pero no exclusivamente– en los centrómeros y telómeros de los cromosomas y la mayor parte es DNA de secuencia simple.

En las células de los mamíferos, la heterocromatina aparece como regiones del núcleo teñidas de oscuro, a menudo asociadas con la cubierta nuclear. La marcación con pulsos de ^{3}H-uridina y posterior autorradiografía demostraron que la mayor parte de la transcripción tiene lugar en las regiones de la eucromatina y en el nucléolo. Debido a esto y a que las regiones de heterocromatinas aparentemente permanecen condensadas durante todo el ciclo de vida de la célula, se las ha considerado sitios de genes inactivos. Sin embargo, se localizaron algunos genes transcriptos en las regiones de heterocromatina. Asimismo, no todos los genes inactivos y las regiones no transcriptas de DNA son visibles como heterocromatina.

Se requieren tres elementos funcionales para la replicación y la herencia estable de cromosomas

Aunque los cromosomas difieren en longitud y número entre las especies, los estudios citogenéticos demostraron que todos se comportan similarmente en el momento de la división celular. Más aún, cualquier cromosoma eucarionte debe contener tres elementos funcionales para que se replique y se segregue correctamente: 1) orígenes de replicación en los cuales las DNA polimerasas y otras proteínas inicien la síntesis de DNA (véanse figs. 4-34 y 4-36), 2) el centrómero y 3) los dos extremos o telómeros. Los estudios de transformación de levadura representados en la figura 10-32 demostraron las funciones de estos tres elementos cromosómicos y establecieron su importancia para la función cromosómica.

Como se abordó en el capítulo 4, la replicación del DNA comienza en los sitios que están diseminados en todos los cromosomas eucariontes. El genoma de la levadura contiene muchas secuencias de ≈100 bp, denominadas *secuencias de replicación autónomas (ARS)*, que actúan como orígenes de replicación. La observación de que la inserción de un ARS en un plásmido circular le permite replicarse en células de levadura proporcionó la primera identificación funcional de las secuencias de origen en el DNA eucarionte (véase fig. 10-32a).



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 10-32 Los experimentos de transfección de levadura identifican los elementos cromosómicos funcionales necesarios para la replicación y la segregación cromosómicas normales. En estos experimentos, se construyen plásmidos que contienen el gen *LEU* de células normales de levadura y se introducen en células *leu⁻* por transfección. Si el plásmido se mantiene en las células *leu⁻*, son transformadas a *LEU⁺* por el gen *LEU* del plásmido y pueden formar colonias en un medio carente de leucina. (a) Se identificaron las secuencias que permiten la replicación autónoma (ARS) de un plásmido debido a que su inserción en un vector plasmídico que contenía un gen *LEU* clonado dio como resultado una alta frecuencia de transformación a *LEU⁺*. Sin embargo, incluso los plásmidos con ARS exhiben una segregación escasa durante la mitosis, y por ende no aparecen en cada una de las células hijas. (b) Cuando piezas de DNA genómico de levadura rotas al azar se insertan en plásmidos que contienen ARS y *LEU*, algunas de las células transfectadas a continuación producen grandes colonias, lo que indica un alto índice de segregación mitótica de sus plásmidos que facilita la proliferación continua de las células hijas. El DNA recuperado de los plásmidos en estas grandes colonias contiene secuencias de centrómeros de levadura (CEN). (c) Cuando las células de levadura *leu⁻* se transfectan con plásmidos lineales que contienen *LEU*, ARS y CEN, no crecen colonias. La adición de secuencias de telómero (TEL) a los extremos del DNA lineal confiere a los plásmidos lineales la capacidad de replicarse como cromosomas nuevos que se comportan de manera muy similar a un cromosoma normal tanto en la mitosis como en la meiosis. (Véase A. W. Murray y J. W. Szostak, 1983, *Nature* 305:89, y L. Clarke y J. Carbon, 1985, *Ann. Rev. Genet.* 19:29.)

A pesar de que los plásmidos circulares que contienen ARS pueden replicarse en las células de levadura, sólo alrededor del 5-20% de la progenie de células contiene al plásmido debido a que la segregación mitótica de los plásmidos es defectuosa. Sin embargo, los plásmidos que también transportan una secuencia CEN proveniente del centrómero de cromosomas de levadura, se segregan de manera igual o casi igual en las células madre e hija durante la mitosis (véase fig. 10-32b).

Si los plásmidos circulares que contienen una secuencia ARS y CEN se cortan una vez con una enzima de restricción, el plásmido lineal resultante no produce colonias *LEU⁺* a menos que contengan secuencias teloméricas (TEL) ligadas a sus extremos (véase fig. 10-32c). Los primeros experimentos exitosos que involucran la transfección de células de levadura con plásmidos lineales se logró con el empleo de los extremos de una molécula de DNA que se sabía que se replicaba como una molécula lineal en el protozoo ciliado *Tetrahymena*. Durante parte del ciclo de vida de *Tetrahymena*, gran parte del DNA nuclear se copia repetidamente en partes pequeñas para formar un *macronúcleo*. Uno de estos fragmentos repetidos se identificó como un dímero de DNA ribosómico, cuyos extremos contienen una secuencia repetida $(G_4T_2)_n$. La replicación y la buena segregación de los plásmidos lineales tuvieron lugar cuando una sección de esta secuencia TEL repetida se ligó a los extremos de los plásmidos lineales que contenían ARS y CEN.

Las secuencias de los centrómeros varían enormemente en longitud

Una vez que se clonaron las regiones del centrómero de la levadura que confieren segregación mitótica, se pudo determinar y comparar sus secuencias, lo que reveló tres regiones (I, II y III) conservadas entre ellas (fig. 10-33a). En las regiones I y III se presentan secuencias de nucleótidos cortas bastante bien conservadas. Aunque la región II parece tener una longitud relativamente constante, no contiene una secuencia consenso definida; sin embargo, es rica en residuos A y T. Las regiones I y III están unidas por proteínas que interactúan con un conjunto de más de 30 proteínas que fijan el cromosoma corto de *S. cerevisiae* a un microtúbulo del aparato del huso durante la mitosis. La región II está unida a un nucleosoma que tiene una forma variante de la histona H3 que reemplaza la usual H3. Los centrómeros de todos los eucariontes están similarmente unidos por nucleosomas con una forma especializada de histona H3 específica del centrómero llamada *CENP-A* en los seres humanos. *S. cerevisiae* tiene por mucho la secuencia de centrómeros más simple conocida en la naturaleza.

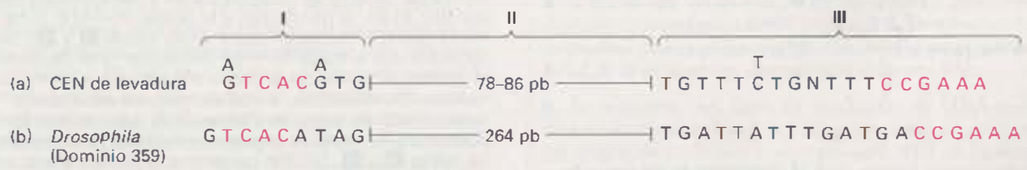
En la levadura de fisión *S. pombe*, los centrómeros tienen ≈40 kb de largo y están compuestos de copias repetidas de secuencias similares a las de los centrómeros de *S. cerevisiae*. Múltiples copias de proteínas homólogas a las que interactúan con los centrómeros de *S. cerevisiae* se unen a estos complejos centrómeros de *S. pombe* y a su vez unen los cromosomas mucho más largos de *S. pombe* a varios microtúbulos del aparato del huso mitótico. En animales y vegetales, los centrómeros tienen megabases de longitud y están compuestos de múltiples repeticiones de DNA de secuencia simple. Un DNA de secuencia simple de *Drosophila*, que proviene de una región centromérica, tiene una unidad de repetición que tiene cierta similitud con las regiones CEN I y III de levadura (véase fig. 10-33b). En los seres humanos, los centrómeros contienen matrices de 2 a 4 megabases de DNA de secuencia simple de 171 bp que se denominan DNA *alfoide* que están unidos a los nucleosomas con la variante H3 de histona CENP-A, al igual que a otras repeticiones de DNA de secuencia simple.

En los eucariontes superiores, una estructura proteica compleja denominada cinetocoro se ensambla en los centrómeros y se asocia con múltiples fibras del huso mitótico durante la mitosis. Los homólogos de la mayoría de las proteínas centroméricas encontradas en las levaduras tienen lugar en los seres humanos y otros eucariontes superiores y se piensa que son componentes de los cinetocoros. En los capítulos 20 y 21 se describe la función del centrómero y de las proteínas que se fijan a éste en la segregación de las cromátidas hermanas durante la mitosis.

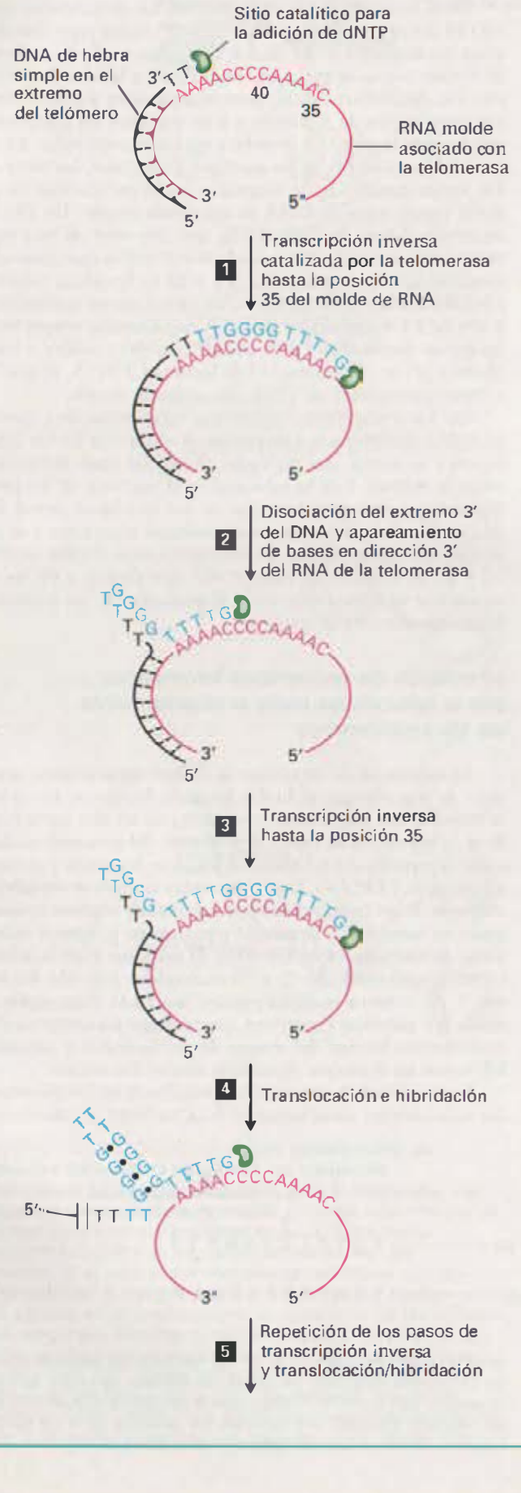
La adición de secuencias teloméricas por la telomerasa evita el acortamiento de los cromosomas

La secuenciación de telómeros de aproximadamente una docena de organismos, incluidos los seres humanos, mostró que la mayoría son oligómeros repetitivos con un alto contenido de G en la hebra con su extremo 3′ al final del cromosoma. La secuencia repetida del telómero en los seres humanos y otros vertebrados es TTAGGG. Estas secuencias simples se repiten en el extremo de los cromosomas por un total de algunos cientos de pares de bases en las levaduras y protozoos y algunos miles de pares de bases en los vertebrados. El extremo 3′ de la hebra rica en G se extiende de 12 a 16 nucleótidos más allá del extremo 5′ de la hebra complementaria rica en C. Esta región está unida por proteínas específicas que protegen los extremos de los cromosomas lineales del ataque de exonucleasas y asocian los telómeros en dominios específicos dentro del núcleo.

La necesidad de una región especializada en los extremos de los cromosomas eucariontes se hace evidente si consideramos



▲ Fig. 10-33. Comparación de la secuencia CEN de levadura y el DNA de secuencia simple de *Drosophila*. (a) La secuencia consenso CEN de levadura, basada en el análisis de 10 centrómeros de levadura, incluye tres regiones conservadas. La región II, aunque variable en secuencia, es bastante constante en longitud y rica en residuos A y T. (b) Un DNA de secuencia simple de *Drosophila* localizado cerca del centrómero tiene una unidad de repetición con cierta homología con la secuencia consenso CEN de levadura, incluidas dos extensiones idénticas de 4 y 6 bp (rojo). (Véase L. Clarke y J. Carbon, 1985, *Ann. Rev. Genet.* 19:29.)



◀ Fig. 10-34. Mecanismo de acción de la telomerasa. El extremo 3′ de hebra simple de un telómero es extendido por la telomerasa, contrarrestando la incapacidad del mecanismo de replicación de DNA para sintetizar el extremo terminal del DNA lineal. La telomerasa elonga este extremo de hebra simple mediante un mecanismo reiterativo de transcripción inversa. Se representa la acción de la telomerasa del protozoo *Oxytricha*, el cual añade una unidad de repetición T_4G_4; otras telomerasas añaden secuencias levemente diferentes. La telomerasa contiene un molde de RNA (rojo) que forma un par de bases con el extremo 3′ del molde de la hebra rezagada. El sitio catalítico de la telomerasa (verde) luego añade desoxirribonucleótidos (azul) usando la molécula de RNA como molde; esta transcripción inversa procede hasta la posición 35 del molde de RNA (paso 1). Se piensa que las hebras del dúplex de DNA-RNA resultante luego se deslizan una respecto de la otra, lo que conduce al desplazamiento de una región de hebra simple de la hebra de DNA telomérica y a la puesta al descubierto de parte de la secuencia molde de RNA (paso 2). La secuencia telomérica de la hebra rezagada vuelve a ser extendida hasta la posición 35 por la telomerasa, y el dúplex DNA-RNA sufre translocación e hibridación como antes (pasos 3 y 4). Se considera que el mecanismo de deslizamiento es facilitado por el apareamiento inusual de bases (puntos negros) entre los residuos G desplazados, el cual es menos estable que el apareamiento de bases de Watson-Crick. Las telomerasas pueden añadir múltiples segmentos mediante la repetición de los pasos 3 y 4. La DNA polimerasa α-primasa puede cebar la síntesis de nuevos fragmentos de Okazaki en esta hebra molde extendida. El resultado neto evita el acortamiento de la hebra rezagada en cada ciclo de replicación de DNA. (Adaptado de D. Shippen-Lentz y E. H. Blackburn, 1990, *Nature* 247:550.)

que todas las DNA polimerasas conocidas alargan cadenas de DNA en el extremo 3′ y que todas requieren un cebador de RNA o DNA. A medida que la horquilla en crecimiento se acerca al extremo de un cromosoma lineal, la síntesis de la hebra conductora continúa hasta el final de la hebra molde de DNA, completando una doble hélice de DNA hija. Sin embargo, como el molde de la hebra seguidora se copia de modo discontinuo, no puede replicarse en su totalidad (véase fig. 4-33). Cuando se elimina el último cebador de RNA, no hay una hebra en la dirección 5′ sobre la cual la DNA polimerasa pueda constituirse para llenar la hebra faltante. Sin algún mecanismo especial, la hebra de DNA hija resultante de la síntesis de la hebra conductora se acortaría en cada división celular.

El problema del acortamiento del telómero se soluciona mediante una enzima que añade secuencias teloméricas a los extremos de cada cromosoma. La enzima es un complejo de proteínas y RNA llamado *transferasa terminal telomérica*, o *telomerasa*. Debido a que la secuencia del RNA asociado con la telomerasa, como veremos, sirve como molde para la adición de desoxirribonucleótidos a los extremos de los telómeros, el RNA de la enzima y no el del cebador de DNA telomérico determina la secuencia añadida. Esto fue probado al transformar *Tetrahymena* con una forma mutada del gen que codifica el RNA asociado con la telomerasa. La telomerasa resultante añadió una secuencia de DNA complementaria a la secuencia mutada de RNA a los extremos de cebadores teloméricos. Por esto la telomerasa es una forma especializada de una transcriptasa inversa que transporta su propio molde de RNA interno para dirigir la síntesis de DNA.

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación focalizada: Replicación de los telómeros

La figura 10-34 representa cómo la telomerasa, mediante transcripción inversa de su RNA asociado, elonga el extremo 3′ del DNA de hebra simple en el extremo de la hebra rica en G arriba mencionada. Las células de ratones *knockout* que no pueden producir el RNA asociado con la telomerasa no exhiben ninguna actividad de telomerasa y sus telómeros se acortan sucesivamente con cada generación. Estos ratones pueden criarse y reproducirse normalmente durante tres generaciones antes de que las repeticiones teloméricas largas se erosionen en forma sustancial. Por lo tanto, la ausencia de DNA telomérico trae como resultado efectos adversos, incluidas la fusión del terminal cromosómico y la pérdida cromosómica. Para la cuarta generación, el potencial reproductivo de estos ratones *knockout* declina y no pueden producir descendientes después de la sexta generación.

MEDICINA

Los genes humanos que expresan la proteína telomerasa y el RNA asociado con la telomerasa son activos en las células germinales, pero se encuentran inactivos en la mayor parte de los tejidos adultos, en los cuales las células se replican sólo rara vez. Sin embargo, estos genes se reactivan en la mayoría de las células humanas cancerígenas, donde se requiera la telomerasa para las múltiples divisiones celulares necesarias para formar un tumor. Este fenómeno estimuló la búsqueda de inhibidores de la telomerasa humana como posibles agentes terapéuticos para tratar el cáncer. ■

Mientras la telomerasa evita el acortamiento del telómero en la mayoría de los eucariontes, algunos organismos emplean estrategias alternativas. Las especies de *Drosophila* mantienen la longitud del telómero mediante la inserción regulada de retrotransposones sin LTR en los telómeros. Este es uno de los pocos ejemplos en los cuales un elemento móvil tiene una función específica en su organismo huésped.

Los cromosomas artificiales de levadura se pueden utilizar para clonar fragmentos de DNA de megabases de longitud

Las investigaciones efectuadas con plásmidos circulares y lineales en levaduras identificaron todos los componentes básicos de un *cromosoma artificial de levadura* (*YAC*). Para construir un YAC, se combinan las secuencias TEL de las células de levadura o de los prorozoos *Tetrahymena* con secuencias ARS y CEN de levadura; a éstas se les añade DNA con genes de levadura seleccionados y suficiente DNA de cualquier fuente para constituir un total de más de 50 kb. (Los segmentos de DNA más pequeños no son tan eficaces.) Estos cromosomas artificiales se replican en las células de levadura y se segregan de manera casi perfecta; sólo una célula hija en 1000 o 10.000 no recibe un cromosoma artificial. Durante la meiosis, las dos cromátidas hermanas del cromosoma artificial se separan correctamente para producir esporas haploides. La propagación exitosa de los YAC y estudios como los representados en la figura 10-32 avalan con firmeza la conclusión de que los cromosomas de las levaduras, y probablemente todos los cromosomas eucariontes, son moléculas lineales de DNA de doble hebra que contienen regiones especiales que aseguran la replicación y la segregación apropiadas.

MEDICINA

Los YAC son herramientas experimentales valiosas que pueden utilizarse para clonar pedazos cromosómicos muy largos de otras especies. Por ejemplo, los YAC se utilizaron ampliamente para clonar fragmentos de DNA humano superiores a los 1000 kb de longitud (1 megabase), lo que permite el aislamiento de los clones YAC solapantes que comprenden colectivamente casi toda la longitud de los cromosomas humanos individuales. La investigación se encuentra en curso de construir cromosomas humanos artificiales utilizando el DNA centromérico mucho más largo de los cromosomas humanos y los más largos telómeros humanos. Tales cromosomas humanos artificiales podrían ser útiles para tratar enfermedades genéticas, como la anemia falciforme, la fibrosis quística y los errores congénitos del metabolismo. ■

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 10.5

Morfología y elementos funcionales de los cromosomas eucariontes

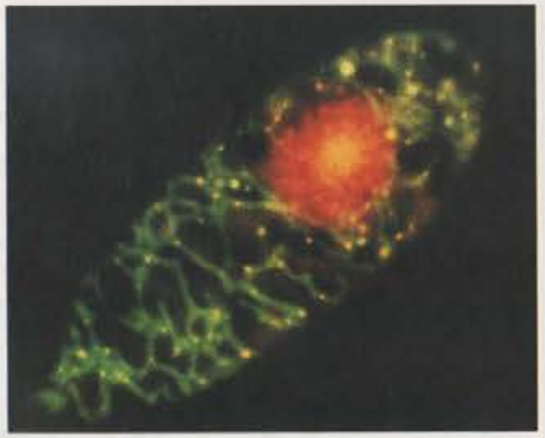
- Durante la metafase, los cromosomas eucariontes se condensan lo suficiente como para poder visualizarlos individualmente con el microscopio óptico.
- El cariotipo, el conjunto de cromosomas en metafase, es característico de cada especie. Las especies estrechamente relacionadas pueden tener cariotipos notablemente diferentes, lo cual indica que información genética similar puede estar organizada en los cromosomas de maneras muy distintas.
- Los análisis de bandas y el coloreado de los cromosomas, un método más preciso, se utilizan para identificar los diferentes cromosomas humanos en metafase y detectar las translocaciones y las deleciones (véase fig. 10-29).
- En ciertas células de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y en insectos relacionados, los cromosomas en interfase son reduplicados 10 veces, lo que genera cromosomas politénicos visibles con el microscopio óptico (véase fig. 10-31).
- Los patrones de bandas altamente reproducibles de los cromosomas politénicos posibilitan localizar el DNA de *Drosophila* clonado sobre un cromosoma de *Drosophila* mediante hibridación in situ (fig. 10-30) y para visualizar las deleciones y los reordenamientos cromosómicos como cambios en el patrón normal de bandas.
- Cuando los cromosomas en metafase se descondensan durante la interfase, ciertas regiones denominadas *heterocromatina* permanecen mucho más condensadas que la totalidad de la cromatina, denominada *eucromatina*.
- Se requieren tres tipos de secuencias de DNA para que una molécula lineal de DNA funcione como un cromosoma: un origen de replicación, denominado *ARS* en la levadura; una secuencia centromérica (CEN) y dos secuencias teloméricas (TEL) en los extremos del DNA (véase fig. 10-32).
- Los fragmentos de DNA superiores a 10^6 pares de bases de largo pueden clonarse en vectores YAC (cromosomas artificiales de la levadura).

10.6 DNA de los orgánulos

Aunque la gran mayoría del DNA en casi todos los eucariontes se encuentra en el núcleo, algo del DNA está presente dentro de la mitocondria de los animales, plantas y hongos y dentro de los cloroplastos de las plantas. Estos orgánulos son los principales sitios celulares de formación de ATP durante la fosforilación oxidativa en la mitocondria y la fotosíntesis en los cloroplastos (cap. 8). Numerosas líneas de evidencia indican que la mitocondria y los cloroplastos evolucionaron de bacterias que fueron endocitadas en células ancestrales que contenían un núcleo eucarionte, formando *endosimbiontes*. A lo largo del tiempo evolutivo, la mayoría de los genes bacterianos que codifican componentes de los orgánulos actuales fueron transferidos al núcleo. Sin embargo, la mitocondria y los cloroplastos en los eucariontes actuales retienen DNA que codifican proteínas esenciales para el funcionamiento del orgánulo, al igual que los RNA ribosómicos y de transferencia requeridos para su traducción. Por lo tanto, las células eucariontes tienen múltiples sistemas genéticos: un sistema nuclear predominante y sistemas secundarios con su propio DNA en la mitocondria y los cloroplastos.

La mitocondria contiene múltiples moléculas de mtDNA

Las mitocondrias individuales son lo suficientemente grandes para verse con el microscopio óptico y aun el DNA mitocondrial (mtDNA) puede detectarse mediante microscopia de fluorescencia. El mtDNA se ubica en el interior de la mitocondria, en una región conocida como la matriz (véase fig. 5-26). A juzgar por el número de "puntos" fluorescentes de mtDNA, una célula de *Euglena gracilis* contiene al menos 30 moléculas de mtDNA (fig. 10-35).



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL. 10-35 La doble tinción revela las múltiples moléculas de DNA mitocondrial en una célula de *Euglena gracilis* en crecimiento.** Las células fueron tratadas con una mezcla de dos colorantes: bromuro de etidio, que se fija al DNA y emite una fluorescencia roja, y DiOC6, que se incorpora específicamente dentro de las mitocondrias y emite una fluorescencia verde. Por ende, el núcleo emite una fluorescencia roja y las áreas ricas en DNA mitocondrial fluorescen de color amarillo –una combinación de fluorescencia roja de DNA y verde mitocondriales. (De Y. Hayasahi y K. Ueda, 1989, *J. Cell. Sci.* 93:565.)

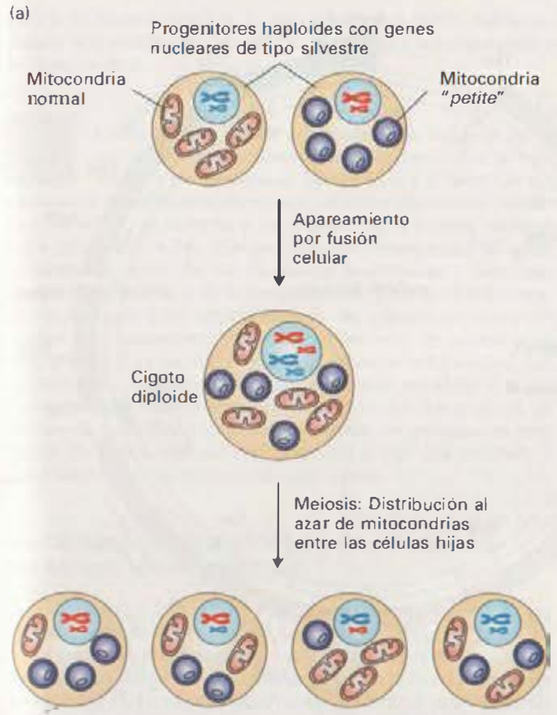
Puesto que los colorantes utilizados para visualizar el DNA nuclear y mitocondrial no afectan el crecimiento ni la división celular, es posible seguir la replicación del mtDNA y la división de las mitocondrias en células vivas utilizando microscopia de secuencia temporal *(time–lapse microscopy)*. Estos estudios muestran que en la mayoría de los organismos el mtDNA se replica durante la interfase. En la mitosis, cada célula hija recibe aproximadamente el mismo número de mitocondrias, pero puesto que no existe un mecanismo para distribuir un número exactamente igual de mitocondrias a las células hijas, algunas células contienen más mtDNA que otras. Al aislar las mitocondrias de las células y analizar el DNA extraído de ellas, puede verse que cada mitocondria contiene múltiples moléculas de mtDNA. Por lo tanto, la cantidad total de mtDNA en una célula depende del número de mitocondrias, el tamaño del mtDNA y el número de moléculas de mtDNA por mitocondria. Cada uno de estos parámetros varía enormemente entre diferentes tipos de células.

El mtDNA es heredado en forma citoplasmática y codifica rRNA, tRNA y algunas proteínas mitocondriales

Los estudios de mutantes de levaduras y otros organismos unicelulares indicaron primero que las mitocondrias exhiben *herencia citoplasmática* y que, por ende, deben contener su propio sistema genético (fig. 10-36). Por ejemplo, los mutantes de levadura *petite* exhiben mitocondrias estructuralmente anormales y son incapaces de realizar la fosforilación oxidativa. Como resultado, las células *petite* crecen más lentamente que las levaduras de tipo silvestre y forman colonias pequeñas (de ahí el nombre *petite*). Las cruzas genéticas entre diferentes cepas de levadura (haploides) mostraron que la mutación *petite* no se segrega con ningún gen nuclear o cromosoma. En estudios posteriores se descubrió que la mayoría de los mutantes petite contenían deleciones de mtDNA.

En el cruzamiento por fusión de células de levadura haploides, ambos padres contribuyeron equitativamente con el citoplasma del diploide resultante; por lo tanto la herencia de mitocondrias es biparental (véase fig. 10-36a). Sin embargo, en los mamíferos y en la mayoría de los otros organismos multicelulares, el espermatozoide contribuye con poco (si es que lo hace) citoplasma al cigoto y casi todas las mitocondrias del embrión derivan de las del óvulo, no del espermatozoide. Los estudios en ratones mostraron que el 99,99% del mtDNA se hereda de la madre, pero una pequeña parte (0,01%) se hereda del progenitor masculino. En las plantas superiores, el mtDNA se hereda exclusivamente de manera uniparental a través del progenitor femenino (huevo), no del masculino (polen).

Ya se ha clonado y secuenciado el genoma mitocondrial completo de numerosos organismos diferentes y se descubrió que los mtDNA de todas estas fuentes codifican rRNA, tRNA y proteínas mitocondriales esenciales. Todas las proteínas codificadas por el mtDNA son sintetizadas sobre los ribosomas mitocondriales. Todos los polipéptidos sintetizados en las mitocondrias que se identificaron hasta ahora (con una posible excepción) no son enzimas completas sino subunidades de complejos multiméricos utilizados en el transporte de electrones o en la síntesis de ATP. La mayoría de las proteínas localizadas en las mitocondrias, como las RNA y DNA polimerasas, son sintetizadas sobre los ribosomas citosólicos y transportadas al interior del orgánulo mediante procesos que se estudian en el capítulo 16.

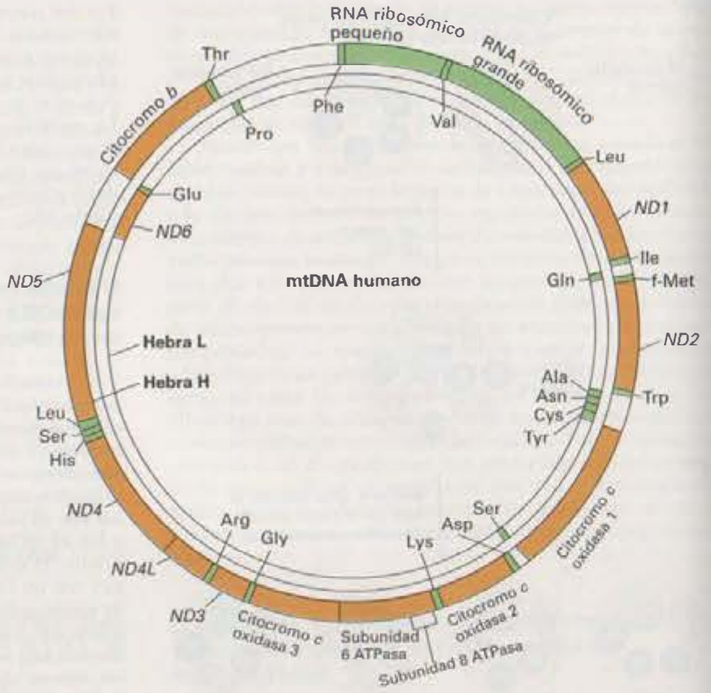


◀ **Fig. 10-36. Herencia citoplasmática de la mutación *petite* en la levadura.** Las mitocondrias de cepas *petite* son defectuosas en la fosforilación oxidativa debido a una deleción en el mtDNA. (a) Las células haploides se fusionan para producir una célula diploide que experimenta meiosis, durante la cual tiene lugar la segregación aleatoria de los cromosomas y las mitocondrias que contiene el mtDNA de los progenitores. Puesto que la levadura contiene normalmente ≈50 moléculas de mtDNA por célula, todos los productos de la meiosis suelen contener tanto el mtDNA *petite* como el normal y son capaces de respirar. (b) A medida que estas células haploides crecen y se dividen por medio de la mitosis, el citoplasma (incluidas las mitocondrias) se distribuye aleatoriamente en las células hijas. A veces, se genera una célula que contiene sólo mtDNA *petite* defectuoso y origina una colonia *petite*. Por ende, la formación de estas células *petite* es independiente de cualquier marcador genético nuclear.

El tamaño y la capacidad de codificación del mtDNA varían considerablemente en los diferentes organismos

El tamaño del mtDNA, el número y la naturaleza de las proteínas que codifica y aun el mismo código genético mitocondrial presentan notables variaciones en los distintos organismos. El mtDNA humano, una molécula circular ya completamente secuenciada, está entre los mtDNA conocidos más pequeños, con 16.569 pares de bases (fig. 10-37). Codifica los dos rRNA encontrados en los ribosomas mitocondriales y los 22 tRNA utilizados para traducir los mRNA mitocondriales. El mtDNA humano tiene 13 secuencias que comienzan con un codón ATG (metionina) y finaliza con un codón de terminación, y son lo suficientemente largos como para codificar un polipéptido de más de 50 aminoácidos; ya se han identificado todas las posibles proteínas codificadas por estos marcos abiertos de lectura. El mtDNA de los mamíferos, a diferencia del DNA nuclear, carece de intrones y contiene secuencias cortas no codificantes.

El mtDNA de la mayoría de los animales multicelulares (metazoos) es aproximadamente del mismo tamaño que el mtDNA humano y codifica productos genéticos similares. En cambio, el mtDNA de la levadura es aproximadamente cinco veces más largo (≈78.000 bp). Los mtDNA de la levadura y otros hongos codifican muchos de los mismos productos genéticos que los mtDNA de los mamíferos, así como otros cuyos genes se encuentran en el núcleo de las células de los metazoos.



▶ Fig. 10-37. Capacidad de codificación del DNA (mtDNA) mitocondrial humano. Las proteínas y los RNA codificados por cada una de las dos "hebras" se muestran por separado. La transcripción de la hebra exterior (H) ocurre en el sentido de las agujas del reloj, y la de la hebra (L) en dirección contraria a las agujas del reloj. Las abreviaturas para los aminoácidos denotan los genes tRNA correspondientes. *ND1, ND2,* etc., denotan genes que codifican subunidades del complejo de la NADH-CoQ reductasa. El gen de 207 bp que codifica la subunidad 8 de la ATPasa se superpone, fuera del marco, con la porción N-terminal del segmento que codifica la subunidad 6 de la ATPasa. Los genes mtDNA de los mamíferos no contienen intrones, aunque entre algunos genes se ubica DNA interviniente. (Véase D. A. Clayton, 1991, *Ann. Rev. Cell Biol.* 7:453)

PLANTAS

En contraste con los otros eucariontes, que contienen un tipo simple de mtDNA, las plantas contienen varios tipos de mtDNA que parecen recombinarse unos con otros. Los mtDNA de las plantas son mucho más largos y variables en tamaño que los mtDNA de otros organismos. Aun en una misma familia de plantas, los mtDNA pueden variar hasta ocho veces en tamaño (sandía = 330 kb; melón 2500 kb). A diferencia del mtDNA de los animales, las levaduras y los hongos, los mtDNA de las plantas contienen genes que codifican un rRNA mitocondrial 5S, el cual sólo se presenta en los ribosomas mitocondriales de las plantas y en la subunidad α de las ATPasa F_1. Los rRNA mitocondriales de las plantas también son considerablemente más largos que los de otros eucariontes. Las largas regiones no codificadoras y las secuencias duplicadas son, en gran medida, responsables de la mayor longitud de los mtDNA de las plantas. ▮

Las diferencias de tamaño y de capacidad de codificación del mtDNA de diversos organismos muy probablemente reflejan el desplazamiento de DNA entre las mitocondrias y el núcleo durante la evolución. La evidencia directa de este movimiento proviene de la observación de que varias proteínas codificadas por mtDNA en algunas especies son codificadas por DNA nuclear en otras. Por lo tanto, parece que genes completos se desplazaron desde la mitocondria al núcleo, o viceversa, durante la evolución.

El ejemplo más notable de este fenómeno está relacionado con el gen *cox II*, el cual codifica la subunidad 2 de la citocromo *c* oxidasa. Este gen se encuentra en el mtDNA de todos los organismos estudiados excepto en una especie de legumbre, el frijol *mung*: únicamente en este organismo el gen *cox II* es nuclear. Muchos transcriptos de RNA de genes mitocondriales vegetales son editados principalmente por la conversión catalizada por enzimas de residuos C seleccionados a U, y en ocasiones de U a C (la edición de RNA se aborda en el cap. 12.) El gen nuclear *cox II* del frijol *mung* se corresponde más cercanamente al transcripto de RNA *cox II* editado que con los genes *cox II* mitocondriales hallados en otras legumbres. Estas observaciones constituyen una fuerte evidencia de que el gen *cox II* se desplazó desde la mitocondria al núcleo durante la evolución de frijol *mung* a través de un proceso que involucró un intermediario de RNA. Este movimiento pudo haber tenido lugar mediante un mecanismo de transcripción inversa similar al que genera seudogenes procesados en el genoma nuclear a partir de los mRNA codificados en el núcleo.

Los productos de los genes mitocondriales no son exportados

Hasta donde se conoce, todos los transcriptos de RNA del mtDNA y sus productos de traducción permanecen en la mitocondria, y todas las proteínas codificadas por el mtDNA se sintetizan sobre ribosomas mitocondriales. Las mitocondrias codifican los rRNA que forman los ribosomas mitocondriales, si bien todas las proteínas ribosómicas excepto una o dos (según la especie) provienen del citosol. En la mayoría de los eucarionres, todos los tRNA utilizados para la síntesis de proteínas en la mitocondria son codificados por mtDNA. Sin embargo, en el trigo, en el parásito protozoario *Trypanosoma brucei* (causante de la enfermedad del sueño africana), y

en los protozoos ciliados, la mayoría de los tRNA mitocondriales son codificados por el DNA nuclear e incorporados a la mitocondria.

MEDICINA

Como reflejo de los antecesores bacterianos de la mitocondria, los ribosomas mitocondriales se asemejan a los ribosomas bacterianos y difieren de los ribosomas citosólicos eucariontes, en su composición proteica y de RNA, su tamaño y su sensibilidad a ciertos antibióticos (véase fig. 4-24). Por ejemplo, el cloranfenicol bloquea la síntesis proteica de los ribosomas bacterianos y mitocondriales de la mayoría de los organismos, pero la cicloheximida no lo hace. Esta sensibilidad de los ribosomas mitocondriales a la importante clase aminoglucósida de antibióticos es la principal causa de la toxicidad de estos antibióticos. Por el contrario, los ribosomas citosólicos son sensibles a la cicloheximida y resistentes al cloranfenicol. En los cultivos de células de mamíferos las únicas proteínas sintetizadas en presencia de cicloheximida son codificadas por los mtDNA y producidas por ribosomas mitocondriales. ▮

Los códigos genéticos mitocondriales difieren del código nuclear estándar

El código genético de las mitocondrias de los animales y los hongos es diferente del código estándar utilizado en todos los genes nucleares procariontes y eucariontes; notablemente, el código incluso difiere en las mitocondrias de diferentes especies (cuadro 10-3). Es un misterio por qué y cómo se originaron estas diferencias durante la evolución. Por ejemplo el UGA es normalmente un codón de terminación, pero es leído como triptófano por los sistemas de traducción mitocondrial humano y fúngico; sin embargo, en las mitocondrias vegetales, el UGA aún se reconoce como un codón de terminación. El AGA y el AGG, los codones nucleares estándares para la arginina, también codifican para la arginina en el mtDNA fúngico y vegetal, pero son codones de terminación en el mtDNA de los mamíferos y codones de serina en el mtDNA de *Drosophila*.

PLANTAS

Como se muestra en el cuadro 10-3, las mitocondrias de las plantas parecen utilizar el código genético estándar. Sin embargo, las comparaciones de las secuencias de aminoácidos de las proteínas mitocondriales vegetales con las secuencias de nucleótidos de los mtDNA vegetales sugirieron que el CGG puede codificar *tanto* para la arginina (el aminoácido "estándar") como para el triptófano. Esta aparente ausencia de especificidad del código mitocondrial de plantas se explica por la edición de los transcriptos de RNA mitocondriales, los cuales pueden convertir residuos de citosina a residuos de uracilo. Si una secuencia CGG se edita a UGG, el codón especifica triptófano, el aminoácido estándar para el UGG, mientras que los codones CGG sin editar codifican la arginina estándar. Por lo tanto, el sistema de traducción de las mitocondrias vegetales utiliza el código genético estándar. ▮

Las mutaciones en el DNA mitocondrial causan varias enfermedades genéticas en los seres humanos

La severidad de la enfermedad causada por una mutación en el mtDNA depende de la naturaleza de la mutación y de la proporción de mtDNA mutante y de tipo silvestre presente en un tipo de célula en particular. Cuando se encuentran mutaciones en el mtDNA, las células suelen contener mezclas de mtDNA de tipo silvestre y de tipo mutante –una condición conocida como *heteroplasmia*. Cada vez que se divide una célula somática o de la línea germinal de un mamífero, los mtDNA de tipo mutante y de tipo silvestre se segregarán al azar en las células hijas, como ocurre en las células de la levadura (véase fig. 10-36). Por lo tanto, el genotipo del mtDNA, el cual fluctúa de una generación a otra y de una división celular a la siguiente, puede derivar hacia un mtDNA predominantemente de tipo silvestre o un mtDNA predominantemente mutante. Puesto que todas las enzimas para la replicación y el crecimiento de las mitocondrias, como las DNA y RNA polimerasas, provienen del citosol, un mtDNA mutante

CUADRO 10-3 Alteraciones en el código genético estándar en las mitocondrias

Codón	Código estándar: proteínas codificadas en el núcleo	Mitocondrias				
		Mamíferos	*Drosophila*	*Neurospora*	Levaduras	Plantas
UGA	Terminación	Trp	Trp	Trp	Trp	Terminación
AGA, AGG	Arg	Terminación	Ser	Arg	Arg	Arg
AUA	Ile	Met	Met	Ile	Met	Ile
AUU	Ile	Met	Met	Met	Met	Ile
CUU, CUC, CUA, CUG	Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu

FUENTES: S. Andeson et al., 1981, *Nature* 290:457; P. Borst, en *International Cell Biology* 1980-1981, H. G. Schwiegen, ed., Springer-Verlag, p. 239; C. Breitenberger and U. L. Raj Bhandary, 1985, *Trends Biochem. Sci.* 10:478-483; V. K. Eckenrode and C. S. Levings, 1986, *In vitro Cell Dev. Biol.* 22:169-176; J. M. Gualber et al., 1989, Nature 341:660-662; and P. S. Covello and M. W. Gray, 1989, *Nature* 341:662-666.

no debe ser una "desventaja replicativa"; los mutantes que impliquen grandes deleciones de mtDNA podrían incluso tener una ventaja selectiva en la replicación porque pueden replicarse más rápidamente.



Todas las células tienen mitocondrias, aunque las mutaciones del mtDNA sólo afectan algunos tejidos. Los tejidos más afectados son los que tienen altos requerimientos del ATP producido por fosforilación oxidativa y los tejidos que requieren la mayoría o todo el mtDNA de la célula para sintetizar cantidades suficientes de proteínas mitocondriales funcionales. Por ejemplo, la *neuropatía óptica hereditaria de Leber* (degeneración del nervio óptico, acompañada por ceguera progresiva), es causada por una mutación sin sentido del mtDNA que codifica la subunidad 4 de la NADH-CoQ reductasa. Cualquiera de varias deleciones grandes en el mtDNA produce otros grupos de enfermedades, incluidos la *oftalmoplejía externa progresiva crónica* y el *síndrome de Kearns-Sayre*, caracterizadas por defectos oculares y, en el síndrome de Kearns-Sayre, también por arritmias cardíacas y degeneración del sistema nervioso central. Una tercera condición, que causa fibras musculares "desgarradas" (con mitocondrias ensambladas inapropiadamente) y movimientos espasmódicos descontrolados asociados, se debe a una sola mutación en el asa TψCG del tRNA de lisina mitocondrial. Como resultado de esta mutación, aparentemente se inhibe la traducción de varias proteínas mitocondriales. ▮

Los cloroplastos contienen DNA circulares grandes que codifican más de cien proteínas



Como se vio en el capítulo 8, la estructura de los cloroplastos es, en muchos aspectos, similar a la de las mitocondrias. Como la mitocondria, los cloroplastos contienen múltiples copias del DNA del orgánulo y ribosomas, que sintetizan algunas proteínas codificadas por los cloroplastos utilizando el código genético "estándar". Otras proteínas de los cloroplastos se fabrican sobre los ribosomas citosólicos y se incorporan al orgánulo después de la traducción (cap. 16).

Los DNA de los cloroplastos son moléculas circulares de 120.000-160.000 bp, según las especies. Se ha determinado la secuencia completa de varios DNA de cloroplastos. De los aproximadamente 120 genes del DNA de los cloroplastos, cerca de 60 participan en la transcripción y la traducción del RNA, incluidos genes para rRNA, tRNA, subunidades de RNA polimerasa y proteínas ribosómicas. Alrededor de 20 genes codifican subunidades del complejo de transporte de electrones para la fotosíntesis en los cloroplastos y del complejo ATPasa F_0F_1. El genoma de los cloroplastos también codifica la más grande de las dos subunidades de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa, involucrada en la fijación de dióxido de carbono durante la fotosíntesis.

Reflejando el origen endosimbiótico de los cloroplastos, algunas regiones del DNA de los cloroplastos son sorprendentemente similares al DNA de las bacterias de nuestros días. Por ejemplo, los cloroplastos codifican cuatro subunidades de RNA polimerasa que son altamente homólogas a las de las subunidades de la RNA polimerasa de *E. coli*. Un segmento del DNA de los cloroplastos codifica ocho proteínas que son homólogas a ocho proteínas ribosómicas de *E. coli*; más aún; el orden de estos genes es el mismo en los dos DNA.

A pesar de que la organización completa de los DNA de los cloroplastos de diferentes especies es similar, se suscitan algunas diferencias en la composición génica. Por ejemplo, el DNA de los cloroplastos de las plantas hepáticas tiene algunos genes que no se detectan en el DNA de los cloroplastos más grandes del tabaco y viceversa. Puesto que los cloroplastos en ambas especies contienen casi el mismo conjunto de proteínas, esta información sugiere que algunos genes están presentes en el DNA de los cloroplastos de una especie y en el DNA del núcleo de otras, lo que indica que durante la evolución tuvieron lugar algunos intercambios de genes entre el cloroplasto y el núcleo. ▮



Con el fin de introducir establemente DNA foráneo dentro de los cloroplastos de plantas superiores, se desarrollaron métodos similares a los utilizados para la transformación de células de levadura (cap. 9). El gran número de moléculas de DNA de cloroplastos por célula permite la introducción de miles de copias de un gen diseñado dentro de cada célula, lo que da como resultado la producción de niveles extraordinariamente altos de proteínas foráneas. La transformación de cloroplastos condujo recientemente al diseño de plantas genéticamente resistentes a las bacterias y hongos infecciosos, a las sequías y a los herbicidas. El nivel de producción de proteínas foráneas es comparable con el logrado con las bacterias diseñadas genéticamente, lo que hace posible utilizar la transformación de cloroplastos para el desarrollo de productos farmacéuticos humanos y de cultivos alimenticios que contengan altos niveles de todos los aminoácidos esenciales para el hombre. ▮

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 10.6

DNA de los orgánulos

- Las mitocondrias y los cloroplastos muy probablemente evolucionaron de bacterias que formaron una relación simbiótica con células ancestrales que contenían núcleos eucariontes. La mayoría de los genes que originalmente estaban dentro de estos orgánulos se desplazaron hasta el genoma nuclear durante la evolución, dejando diferentes conjuntos de genes en los mtDNA de distintos organismos.
- La mayoría de los DNA mitocondriales y de los cloroplastos son moléculas circulares que reflejan su probable origen bacteriano. Los mtDNA de las plantas y los DNA de los cloroplastos suelen ser más largos que los mtDNA de otros eucariontes, debido en gran parte a que contienen más regiones no codificadas y secuencias repetitivas.
- Todos los mtDNA y los DNA de los cloroplastos parecen codificar rRNA, tRNA y algunas de las proteínas involucradas en el transporte de electrones mitocondrial o fotosintético y en la síntesis de ATP.
- Debido a que la mayoría del mtDNA se hereda de los óvulos más que del espermatozoide, las mutaciones en el mtDNA exhiben un patrón de herencia citoplasmático materno.
- Los ribosomas mitocondriales se asemejan a los ribosomas bacterianos en su estructura, su sensibilidad al cloranfenicol y su resistencia a la cicloheximida.
- El código genético de los mtDNA de las plantas y de los hongos difiere levemente del bacteriano y del genoma nuclear, y varía entre los diferentes animales y plantas (véase cuadro 10-3). En cambio, los mtDNA vegetales y los DNA de los cloroplastos parecen conformar el código genético estándar.
- Varios trastornos neuromusculares en los seres humanos son el resultado de mutaciones en los mtDNA. Los pacientes tienen una mezcla de mtDNA de tipo silvestre y de tipo mutante en sus células (heteroplasmia): cuanto más alta sea la fracción del mtDNA mutante, más severo será el fenotipo mutante.

PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO

La secuencia del genoma humano es una mina de oro para nuevos descubrimientos acerca de la biología molecular y celular, nuevas proteínas que pueden ser la base de terapias eficaces de enfermedades humanas, y aun para descubrimientos concernientes a la historia y la evolución humana inicial. Sin embargo, ya que sólo cerca del 1,5% de la secuencia codifica proteínas, encontrar un gen nuevo es como hallar una aguja en un pajar. La identificación de genes en secuencias genómicas bacterianas es relativamente simple debido a la escasez de intrones. La simple búsqueda de grandes marcos de lectura abiertos libres de codones de terminación permite identificar la mayoría de los genes. En cambio, la búsqueda de genes humanos es inmensamente complicada a causa de la estructura de estos genes, la mayoría de los cuales están compuestos de múltiples exones, relativamente cortos separados por intrones no codificantes mucho más largos. Se estima que sólo se han identificado alrededor de la mitad de todos los genes humanos. Y la identificación de unidades de transcripción complejas a través del examen de secuencias de DNA solamente es aún más desafiante. Futuros avances en métodos bioinformáticos para la identificación de genes y la caracterización posterior de copias de cDNA de los mRNA aislados de cientos de tipos de células humanas conducirán tal vez al descubrimiento de nuevas proteínas y, a través de su estudio, a un nuevo entendimiento de los procesos biológicos y a conseguir aplicaciones en la medicina y la agricultura.

Hemos visto que a pesar de que la mayoría de los transposones no participan directamente en procesos celulares, han ayudado a dar forma a los genomas modernos al promover la duplicación de genes, la combinación de exones, la generación de nuevas combinaciones de secuencias de control de la transcripción y otros aspectos de los genomas contemporáneos. Ellos también tienen hoy la posibilidad de enseñarnos acerca de nuestra historia y nuestros orígenes. Esto se debe a que a lo largo de la historia los retrotransposones L1 y *Alu* se han insertado en nuevos sitios en los individuos. Gran cantidad de estas repeticiones dispersas son polimórficas en la población; tienen lugar en un sitio particular en algunos individuos y no en otros. Los individuos que comparten una inserción en un sitio determinado descendieron del mismo antecesor común que se desarrolló de un óvulo o espermatozoide en el cual ocurrió la inserción. El tiempo transcurrido desde la inserción inicial puede estimarse por las diferencias en las secuencias de los elementos entre los individuos que los poseen dado que esas diferencias se originaron a partir de la acumulación de mutaciones aleatorias. Sin duda, estudios posteriores de estos polimorfismos de los retrotransposones contribuirán muchísimo a nuestra comprensión, tanto de las migraciones humanas desde que el *Homo sapiens* evolucionó por primera vez, como de la historia de las poblaciones contemporáneas.

PALABRAS CLAVE

armazón cromosómico *427*
bandas G *431*
cariotipo *430*
centrómero *413*
combinación de exones (*exon shuffling*) *422*
cromátida *430*
cromatina *424*
cromosomas politénicos *433*
DNA de secuencia simple *412*
elemento P *416*
elementos móviles de DNA *414*
eucromatina *433*
familia de genes *410*
herencia citoplasmática *438*
heterocromatina *433*
hibridación in situ fluorescente (FISH) *413*
histonas *424*
LINE *420*
nucleosoma *424*
regiones asociadas con el armazón (SAR) *428*
repeticiones terminales largas (LTR) *417*
retrotransposones *415*
seudogén *411*
SINE *420*
telómero *413*
transposición *414*
transposones *414*
unidad de transcripción *407*

REVISIÓN DE CONCEPTOS

1. Los genes pueden ser transcriptos en mRNA si codifican proteínas, o en RNA si son genes del RNA ribosómico o de transferencia. Defina gen. Describa cómo una unidad de transcripción compleja puede procesarse alternativamente para generar una variedad de mRNA y finalmente proteínas.

2. La secuenciación del genoma humano reveló mucho acerca de la organización de los genes. Describa las diferencias entre genes individuales, familias de genes, seudogenes y genes repetidos en tándem.

3. Gran parte del genoma humano consiste en DNA repetitivo. Describa la diferencia entre el DNA microsatélite y minisatélite. ¿Cuán útil es este DNA repetitivo para identificar individuos a través de la técnica de huellas dactilares de DNA?

4. Los elementos móviles de DNA que pueden moverse o transponerse a un nuevo sitio directamente como DNA se denominan transposones de DNA. Describa el mecanismo por el cual se puede transponer una secuencia de inserción bacteriana.

5. Los retrotransposones son una clase de elementos móviles que usan un intermediario de RNA. Compare el mecanismo de transposición entre los retrotransposones que contienen repeticiones terminales largas (LTR) y los que carecen de ellas.

6. Describa el papel que los elementos móviles de DNA pueden haber desempeñado en la evolución de los organismos modernos. ¿Cuál es el proceso conocido como combinación de exones (*exon shuffling*) y qué función cumplen los elementos móviles de DNA en este proceso?

7. El DNA en una célula se asocia con proteínas para formar cromatina. ¿Qué son los nucleosomas? ¿Qué función cumplen las histonas en los nucleosomas? ¿Cómo se disponen los nucleosomas en fibras condensadas de 30-nm?

8. Describa la organización general de un cromosoma eucarionte. ¿Qué papel estructural cumplen las regiones asociadas con el armazón (SAR) o las regiones adheridas a la matriz? ¿Dónde se ubican los genes principalmente en relación con la estructura de los cromosomas?

9. Los cromosomas en metafase pueden identificarse mediante patrones de bandas característicos. ¿Qué son las bandas G y las bandas R? ¿Qué es el coloreado de cromosomas y cómo se usa esta técnica?

10. La replicación y la segregación de cromosomas eucariontes requiere tres elementos funcionales: orígenes de replicación, un centrómero y telómeros. Describa cómo funcionan estos tres elementos. ¿Cuál es el papel de la telomerasa en el mantenimiento de la estructura del cromosoma? ¿Qué es un cromosoma artificial de levadura (YAC)?

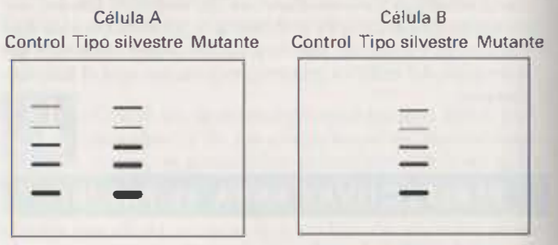
11. La mitocondria contiene sus propias moléculas de DNA. Describa el tipo de genes codificados en el genoma mitocondrial. ¿En qué difieren los genomas mitocondriales de las plantas, los hongos y los animales?

12. Se piensa que la mitocondria y los cloroplastos evolucionaron a partir de una bacteria simbiótica presente en las células nucleadas. Revise la evidencia experimental que apoya esta hipótesis.

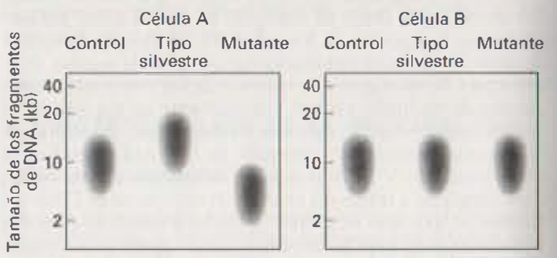
ANÁLISIS DE LOS DATOS

En un cultivo, las células humanas normales experimentan un número finito de divisiones celulares hasta que dejan de proliferar y entran en un estado conocido como senectud replicativa. Se piensa que la incapacidad para mantener la longitud normal de los telómeros desempeña un papel importante en este proceso. La telomerasa es un complejo ribonucleoproteico que regenera los extremos de los telómeros perdidos durante cada ciclo de replicación de DNA. La telomerasa humana consiste en un molde que contiene una subunidad de RNA y una subunidad proteica catalítica conocida como transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT). La mayoría de las células normales no expresan la telomerasa; la mayoría de las células cancerígenas sí la expresan. Por lo tanto, se propone que la telomerasa tiene un papel clave en la transformación de las células desde un estado normal a un estado maligno.

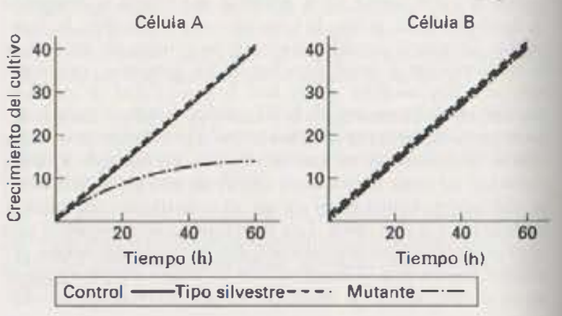
a. En los siguientes experimentos, se investigó el papel de la telomerasa en el crecimiento de células cancerígenas humanas. (Véase W. C. Hahn et al., 1999, Nature Medicine 5:1164-1170.) Células inmortales positivas en telomerasa (célula A) y células inmortales negativas en telomerasa (célula B) se transfectaron con un plásmido expresando un tipo de hTERT silvestre o mutante. La actividad de la telomerasa en los extractos celulares se midió usando el protocolo de amplificación de repeticiones teloméricas (TRAP), un ensayo basado en PCR que mide la adición de unidades teloméricas repetidas a un fragmento de DNA. Se observa un patrón escalonado típico de seis pares de bases. El control indica la transfección de células sólo con el plásmido. Los de tipo silvestre y mutante indican transfección con un plásmido que expresa una hTERT de tipo silvestre o la hTERT mutada, respectivamente. ¿Qué concluye acerca de los efectos de los hTERT mutantes sobre la actividad de la telomerasa en las células transfectadas? ¿Qué tipo de mutación representaría ésta?



b. Se examinó la longitud del telómero en estas células transfectadas mediante un análisis de *Southern blot* del total de DNA genómico digerido con una enzima de restricción y sondeado con una secuencia de DNA específica del telómero. ¿Qué concluye acerca de la longitud de los telómeros en las células A y en las células B después de la transfección con un hTERT de tipo silvestre o de tipo mutante? ¿A través de qué mecanismo las células A y B mantienen la longitud de sus telómeros?



c. Se analizó la proliferación de las células A y B transfectadas a través de la medición del número de células frente al tiempo en el cultivo. ¿Qué concluye acerca de los efectos de la hTRET mutante en la proliferación celular en las células A y B transfectadas?



d. Los resultados de estos tres ensayos, ¿apoyan o refutan el papel propuesto de la telomerasa en la supervivencia a largo plazo de las células en cultivo? ¿Cuál es el valor de comparar la transfección de las células A con las células B?

e. Las células tumorales, que pueden replicarse continuamente en cultivo, pueden causar tumores cuando se las inyecta en ratones que carecen de un sistema inmunitario funcional (ratones atímicos). A partir de los ensayos de arriba, ¿qué podría predecir que pasaría si las células A transfectadas con hTERT de tipo silvestre o mutante se inyectaran en los ratones atímicos?

BIBLIOGRAFÍA

Definición molecular de gen

Ayoubi, T. A., and W. J. Van De Ven. 1996. Regulation of gene expression by alternative promoters. FASEB J. 10:453-460.

Maniatis, T., and B. Tasic. 2002. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. Nature 418:236-243.

Mathe, C., et al. 2002. Current methods of gene prediction, their strengths and weaknesses. Nucl. Acids Res. 30:4103-4117.

Organización cromosómica de los genes y del DNA no codificador

Cummings, C. J., and H. Y. Zoghbi, 2000. Trinucleotide repeats: mechanisms and pathophysiology. Ann. Rev. Genomics Hum. Genet. 1:281-328.

Goff, S. A., et al. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). Science 296:92-100.

Lander, E. S., et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409:860-921.

Ranum, L. P., and J. W. Day. 2002. Dominantly inherited, noncoding microsatellite expansion disorders. Curr. Opin. Genet. Dev. 12:266-271.

DNA móvil

Feschotte, C., N. Jiang, and S. R. Wessler. 2002. Plant transposable elements: where genetics meets genomics. Nat. Rev. Genet. 3:329-341.

Gray, Y. H. 2000. It takes two transposons to tango: transposable-element-mediated chromosomal rearrangements. Trends Genet. 16:461-468.

Kazazian, H. H., Jr. 1999. An estimated frecuency of endogenous insertional mutations in humans. Nature Genet. 22:130.

Ostertag, E. M., and H. H. Kazazian, Jr. 2001. Biology of mammalian L1 retrotransposons. Ann. Rev. Genet. 35:501-538.

Organización estructural de los cromosomas eucariontes

Horn, P. J., and C. L. Peterson. 2002. Molecular biology. Chromatin higher order folding—wrapping up transcription. Science 297:1824-1827.

Luger, K., and T. J. Richmond. 1998. The histone tails of the nucleosome. Curr. Opin. Genet. Dev. 8:140-146.

Morfología y elementos funcionales de los cromosomas eucariontes

Cheeseman, I. M., D. G. Drubin, and G. Barnes, 2002. Simple centromere, complex kinetochore: linking spindle microtubules and centromeric DNA in budding yeast. J. Cell Biol. 157:199-203.

Kelleher, C., et al. 2002. Telomerase: biochemical considerations for enzyme and substrate. Trends Biochem. Sci. 27:572-579.

Kitagawa, K., and P. Hieter. 2001. Evolutionary conservation between budding yeast and human kinetochores. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2:678-687.

Larin, Z., and J. E. Mejia. 2002. Advances in human artificial chromosome technology. Trends Genet. 18:313-319.

McEachern, M. J., A. Krauskopf, and E. H. Blackburn. 2000. Telomeres and their control. Ann. Rev. Genet. 34:331-358.

DNA de los orgánulos

Clayron, D. A. 2000. Transcription and replication of mitochondrial DNA. Hum. Reprod. 2(Suppl.):11-17.

Dahl, H.-H. M., and D. R. Thorburn. 2001. Mitochondrial diseases: beyond the magic circle. Am. J. Med. Genet. 106:1-3.

Daniell, H., M. S. Khan, and L. Allison. 2002. Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. Trends Plant Sci. 7:84-91.

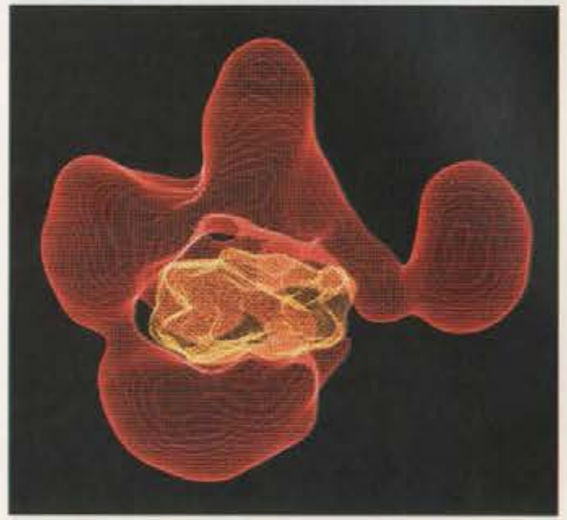
Gray, M. W. 1999. Evolution of organellar genomes. Curr. Opin. Genet. Dev. 9:678-687.

Palmer, J. D., et al. 2000. Dynamic evolution of plant mitochondrial genomes: mobile genes and introns and highly variable mutation rates. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 97:6960-6966.

Sugiura, M., T. Hirose, and M. Sugita. 1998. Evolution and mechanism of translation in chloroplasts. Ann. Rev. Genet. 32:437-459.

11

CONTROL TRANSCRIPCIONAL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA



Estructura del complejo remodelador de la cromatina de levadura RSC determinada mediante microscopia electrónica. El complejo (rojo) se muestra unido a un nucleosoma (amarillo). (Cortesía de Fransicsco J. Asturias, 2002, *PNAS* 99:13477.)

En capítulos previos vimos que las acciones y propiedades de cada tipo de célula están determinadas por las proteínas que contiene. En este y en el próximo capítulo consideraremos cómo se regulan los tipos y cantidades de diversas proteínas producidas por un tipo celular particular en un organismo multicelular. En el capítulo 4 se estudiaron las etapas básicas en la **expresión génica**, el proceso completo por el cual se decodifica la información codificada en un gen para formar una proteína. La síntesis de mRNA requiere que una **RNA polimerasa** inicie la transcripción, polimerice ribonucleótidos trifosfatos complementarios a la hebra codificante de DNA, y luego finalice la transcripción (véase fig. 4-10). En los procariontes, los ribosomas y los factores de iniciación de la traducción tienen acceso inmediato a los transcriptos de RNA recién formados, que actúan como mRNA sin modificación adicional. En los eucariontes, sin embargo, el transcripto de RNA inicial es sometido a un procesamiento que produce un mRNA funcional (véase fig. 4-14). Luego el mRNA es transportado desde su lugar de síntesis en el núcleo, hasta el citoplasma, donde se traduce a proteína con la ayuda de ribosomas, tRNA y factores de traducción (véase fig. 4-26).

En teoría, la regulación de cualquiera de los diversos pasos de la expresión génica podría conducir a la producción *diferencial* de proteínas en diferentes tipos de células o estadio de desarrollo o en respuesta a condiciones externas. Aunque se han encontrado ejemplos de regulación en cada paso de la expresión génica, el control de la iniciación de la transcripción -el primer paso- es el mecanismo más importante para determinar si la mayoría de los genes se expresan y qué cantidad de los mRNA codificados, y en consecuencia de proteínas, se produce. Los mecanismos moleculares que regulan la iniciación de la transcripción son críticos para numerosos fenómenos biológicos, incluidos el desarrollo de un organismo multicelular a partir de una única célula huevo fecundada, las respuestas inmunes que nos protegen de microorganismos patógenos, y los procesos neurológicos, como la memoria y el aprendizaje. Cuando estos mecanismos regulatorios funcionan inadecuadamente, pueden suscitarse procesos patológicos como el cáncer y el envejecimiento.

En este capítulo, nos centramos en los eventos moleculares que determinan cuándo se inicia la transcripción de genes eu-

CONTENIDO

11.1 Panorama general del control génico en los eucariontes y las RNA polimerasas
11.2 Secuencias reguladoras en los genes codificantes de proteínas
11.3 Activadores y represores de la transcripción
11.4 Iniciación de la transcripción por la RNA polimerasa II
11.5 Mecanismos moleculares de la activación y represión de la transcripción
11.6 Regulación de la actividad de los factores de transcripción
11.7 Elongación regulada y terminación de la transcripción
11.8 Otros sistemas de transcripción en los eucariontes

cariontes y también consideramos brevemente el control de la terminación prematura de la transcripción. En el siguiente capítulo se describirá el procesamiento del RNA y diversos mecanismos postranscripcionales para controlar la expresión génica eucarionte. En los capítulos posteriores, sobre todo los capítulos 13, 14 y 15, se proporcionan ejemplos de cómo se regula la transcripción mediante interacciones intercelulares y cómo el control génico resultante contribuye al desarrollo y a la función de los tipos específicos de células en los organismos multicelulares.

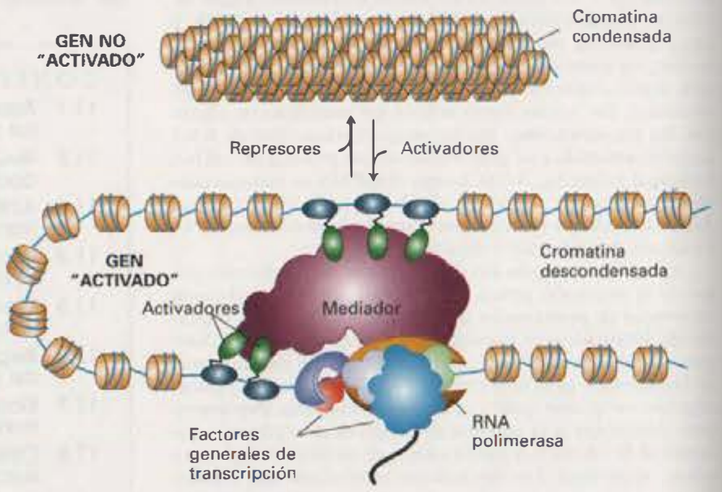
11.1 Panorama general del control génico en los eucariontes y las RNA polimerasas

En las bacterias, el control génico sirve principalmente para permitir que una única célula se ajuste a los cambios en su ambiente de manera que se optimice su crecimiento y división. En los organismos multicelulares, los cambios medioambientales también inducen cambios en la expresión génica. Un ejemplo es la respuesta al bajo oxígeno (hipoxia) que se describe en el capítulo 15. Sin embargo, el propósito más característico y de mayor alcance biológico del control génico en los organismos multicelulares es la ejecución del programa genético que subyace al desarrollo embriológico. La generación de los numerosos tipos celulares diferentes que forman en conjunto un organismo multicelular depende de que los genes adecuados se activen en las células adecuadas en el tiempo adecuado durante el período de desarrollo.

En la mayoría de los casos, una vez que una célula ha dado un paso en el desarrollo, no retrocede. Por lo tanto, estas decisiones son fundamentalmente diferentes de la activación y represión reversible de los genes bacterianos en respuesta a las condiciones del medio. Al ejecutar sus programas genéticos, muchas células diferenciadas (p. ej., células de la piel, eritrocitos de la sangre y células productoras de anticuerpos) siguen un destino que las lleva hacia la muerte celular, sin dejar atrás una progenie. Los patrones fijos del control génico que conducen a la diferenciación sirven a las necesidades de todo el organismo y no a la supervivencia de una célula individual. A pesar de las diferencias en los propósitos del control génico en las bacterias y en los eucariontes, hay dos características clave del control de la transcripción, descubiertas por primera vez en las bacterias y descritas en el capítulo 4, que también se aplican a las células eucariontes. Primero, las secuencias de DNA reguladoras de unión a proteínas, o elementos de control, están asociadas con genes. Segundo, algunas proteínas específicas que se unen a las secuencias reguladoras de un gen determinan dónde comienza la transcripción y activan o reprimen su transcripción. Como se representa en la figura 11-1, en los eucariontes multicelulares, los genes inactivos se ensamblan para formar cromatina condensada, la cual inhibe la unión de las RNA polimerasas y los factores generales de transcripción requeridos para la iniciación de la transcripción. Las proteínas activadoras se unen a los elementos de control cerca del sitio de inicio de la transcripción de un gen, como también a kilobases de distancia y promueven la descondensación de la cromatina y la unión de la RNA polimerasa al promotor. Las proteínas represoras se unen a elementos alternativos de control y causan la condensación de la cromatina y la inhibición de la unión de la polimerasa. En este capítulo consideramos cómo los activadores y represores controlan la estructura de la cromatina y estimulan o inhiben la iniciación de la transcripción mediante la RNA polimerasa.

La mayoría de los genes de los eucariontes superiores se regulan mediante el control de su transcripción

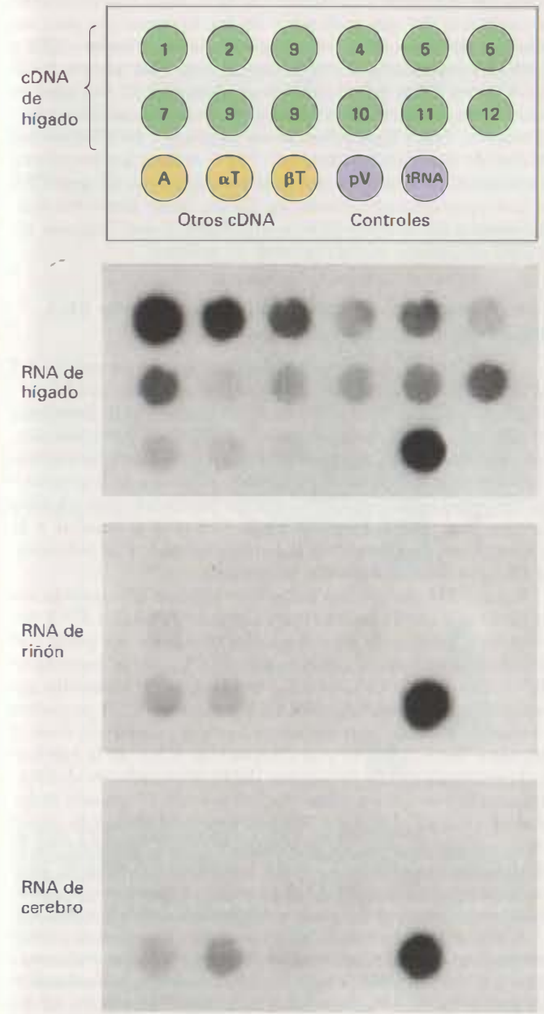
Las mediciones directas de las velocidades de transcripción de múltiples genes en diferentes tipos de células mostraron que la regulación de la iniciación de la transcripción es la forma de control génico más difundida en los eucariontes, al igual que lo es en las bacterias. El *análisis de las cadenas nacientes* es un método común para determinar las velocidades de transcripción relativas de distintos genes en células cultivadas. En este método, también denominado *análisis de iniciación de la transcripción* (*run-on transcription analysis*), se incuban



▶ Fig. 11-1. Panorama general del control de la transcripción en los eucariontes multicelulares. Las proteínas activadoras se unen a elementos específicos de control del DNA en la cromatina e interactúan con estructuras coactivadoras multiproteicas, como el mediador, para descondensar la cromatina y ensamblar la RNA polimerasa y los factores generales de transcripción sobre los promotores. Los genes inactivos están ensamblados en regiones de cromatina condensada que inhiben a las RNA polimerasas y sus factores generales de transcripción asociados (GTF) de interactuar con los promotores. Alternativamente, las proteínas represoras se unen a otros elementos de control para inhibir la iniciación por la RNA polimerasa e interactúan con complejos correpresores multiproteicos para condensar la cromatina.

núcleos aislados con ribonucleótidos trifosfatos marcados con ^{32}P durante un breve período (p. ej., 5 minutos o menos). Durante este período de incubación, las moléculas de RNA polimerasa que estuvieron transcribiendo genes activamente cuando los núcleos fueron aislados, incorporaron varios cientos de nucleótidos marcados en cada cadena de RNA naciente (en crecimiento), pero hubo poca iniciación de nuevas cadenas. El total de la marca radiactiva incorporada al RNA es una medida de la velocidad general de transcripción. La fracción del total de RNA marcado producido mediante transcripción de un gen en particular –es decir, su velocidad relativa de transcripción– se determina hibridando el RNA marcado al DNA clonado de ese gen adherido a una membrana.

Los resultados del análisis de iniciación de la transcripción ilustrados en la figura 11-2 muestran que la transcripción de genes que codifican proteínas expresadas específicamente en los hepatocitos (el principal tipo de célula en el hígado de los mamíferos) se detecta rápidamente en los núcleos obtenidos de hígado, pero no en los núcleos de cerebro o del riñón. Puesto que el ensayo de iniciación de la transcripción mide la síntesis de RNA, estos resultados indican que la síntesis diferencial de las proteínas específicas del hígado se regula mediante el control de la transcripción de los genes correspondientes en tejidos diferentes. Se han obtenido resultados similares en los experimentos de iniciación de la transcripción con otros tipos celulares y una gran variedad de proteínas específicas de los tejidos, lo que indica que el control transcripcional es el principal mecanismo de control génico en los organismos complejos.



◀ FIGURA EXPERIMENTAL 11-2 Las mediciones de la producción de RNA en diversos tejidos demuestran que la transcripción de un gen dado suele ocurrir sólo en los tipos de células en las cuales se expresa. Se expusieron núcleos de hígado, riñón y cerebro de ratón a ^{32}P-UTP. Las tres muestras de RNA marcadas resultantes se hibridaron en membranas de nitrocelulosa separadas; sobre cada membrana se fijó un patrón idéntico de varios cDNA (*arriba*). Los cDNA marcados 1-12 (*verde*) codifican proteínas sintetizadas activamente en el hígado (p. ej., albúmina, transferrina), pero no en la mayoría de los otros tejidos. Los otros cDNA examinados fueron actina (A) y α y β tubulina (αT, βT) (*amarillo*), que son proteínas que se encuentran en casi todos los tipos celulares. Un gen que codifica tRNA de metionina y el DNA del plásmido (pV) en el cual fueron clonados los cDNA se incluyeron como control (*violeta*). Luego de la eliminación de los RNA no hibridados, los RNA marcados complementarios a los cDNA se revelaron mediante autorradiografía. El RNA de la muestra de hígado se hibridó extensamente con los cDNA. Se aprecia poca hibridación en las muestras de cerebro y de riñón, lo que indica que los genes que codifican las proteínas halladas en los hepatocitos se transcriben en las células del hígado, pero no en las células de los otros tejidos. (Véase E. Derman et al., 1981, Cell 23:731 y D. J. Powell et al., 1984, J. Mol. Biol. 197:21.)

Los elementos reguladores del DNA en los eucariontes a menudo se encuentran a kilobases de los sitios de inicio

En los eucariontes, al igual que en las bacterias, se denomina **promotor** a una secuencia de DNA que especifica dónde la RNA polimerasa se une e inicia la transcripción de un gen. La transcripción desde un promotor particular está controlada por las proteínas de unión al DNA, denominadas **factores de transcripción**, que son equivalentes a los *represores* y *activadores* bacterianos. Sin embargo, los elementos de control del DNA en los genomas eucariontes que unen los factores de transcripción suelen ubicarse mucho más lejos del promotor que regulan, de como sucede en los genomas procariontes. En algunos casos, los factores de transcripción que regulan la expresión de genes codificantes de proteínas en los eucariontes superiores se unen en sitios reguladores a decenas de miles de pares de bases, ya sea en dirección 5' ("corriente arriba" u opuesta al sentido de la transcripción) o en dirección 3' (" corriente abajo" o en el mismo sentido que la transcripción) desde el promotor. Como resultado de este arreglo, la transcripción de un único promotor puede estar regulada por la fijación de múltiples factores de transcripción a elementos de control alternativos, lo que permite un control complejo de la expresión génica.

Por ejemplo, la expresión del gen de mamíferos que codifica la transtirretina (*TTR*), la cual transporta la hormona tiroidea en la sangre y en el líquido cefalorraquídeo que rodea el cerebro y la médula espinal dorsal, está regulada por elementos de control de la transcripción alternativos. La trans-



Plásmido N°	Expresión del gen indicador
1	+++
2	+++
3	+
4	+
5	–

▲ FIGURA EXPERIMENTAL 11-3 Los análisis de deleción (eliminación) 5' pueden identificar secuencias de control de la transcripción en el DNA de un gen eucarionte, localizadas en dirección 5'. Paso 1: Las técnicas de DNA recombinantes se utilizan para preparar una serie de fragmentos de DNA que se extienden desde la región 5' no traducida de un gen a diversas distancias secuencia arriba. Paso 2: Los fragmentos de DNA se ligan a un plásmido informador en dirección 5' de un gen indicador de fácil análisis. Paso 3: El DNA se transforma en *E. coli* para aislar plásmidos con deleciones de diversas longitudes hacia el 5' respecto del sitio de inicio de la transcripción. Paso 4: Luego se transfecta cada plásmido a células cultivadas (o utilizadas para preparar organismos transgénicos) y se analiza la expresión del gen indicador (paso 5). Los resultados de este ejemplo hipotético (*abajo*) señalan que los fragmentos investigados contienen dos elementos de control. El extremo 5' de uno se localiza entre las deleciones 2 y 3; el extremo 5' del otro se ubica entre las deleciones 4 y 5.

tirretina se expresa en los hepatocitos, que sintetizan y secretan la mayor parte de las proteínas del suero de la sangre, y en las células de los plexos coroideos del cerebro, que secreta líquido cefalorraquídeo y sus proteínas constitutivas. Los elementos de control requeridos para la transcripción del gen *TTR* se identificaron mediante el procedimiento reseñado en la figura 11-3. En este método experimental, fragmentos de DNA con extensiones variables de secuencia en dirección 5' de un sitio de inicio, se clonan frente a un gen indicador en un plásmido bacteriano empleando técnicas de DNA recombinante. Los genes indicadores expresan enzimas que pueden ser determinadas con facilidad en los extractos celulares; los genes utilizados con mayor frecuencia incluyen el gen *lacZ* de *E. coli* que codifica la β-galactosidasa; el gen de la luciérnaga que codifica la luciferasa, que convierte la energía de la hidrólisis del ATP en luz; y el gen de la medusa que codifica la proteína verde fluorescente (GFP).

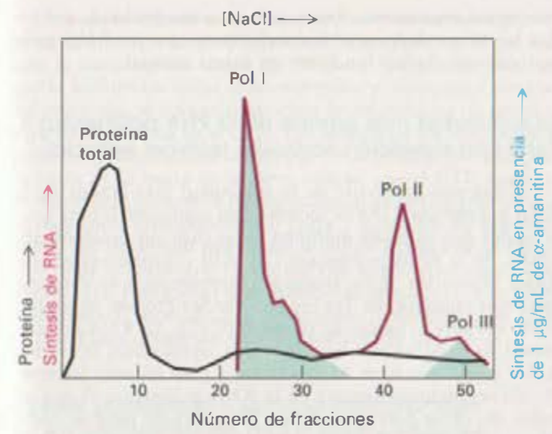
Mediante la construcción y el análisis de una *serie de deleciones 5'* corriente arriba del gen *TTR*, los investigadores identificaron dos elementos de control que estimulan la expresión del gen indicador en los hepatocitos, pero no en otros tipos celulares. Una región localizada entre ≈2,01 y 1,85 kb en dirección 5' del inicio del gen *TTR*; el otro localizado entre ≈200 pares de bases en dirección 5' y el sitio de inicio. Estudios posteriores demostraron que secuencias alternativas de DNA controlan la transcripción de *TTR* en las células de los plexos coroideos. Por lo tanto, los elementos alternativos de control regulan la transcripción del gen *TTR* en dos tipos celulares diferentes. En secciones ulteriores examinaremos los eventos moleculares básicos que originan este tipo de control transcripcional eucarionte.

Tres polimerasas catalizan la formación de RNA diferentes en los eucariontes

El núcleo de todas las células eucariontes examinadas hasta ahora (p. ej., de vertebrados, *Drosophila*, levaduras y células vegetales) contiene tres RNA polimerasas diferentes designadas I, II y III. Estas enzimas son eluidas a diferentes concentraciones salinas durante la cromatografía de intercambio iónico y también difieren en su sensibilidad a la α-amanitina, un octapéptido cíclico venenoso producido por algunos hongos (fig. 11-4). La polimerasa I es muy insensible a la α-amanitina; la polimerasa II es muy sensible y la polimerasa III tiene una sensibilidad intermedia.

Cada RNA polimerasa eucarionte cataliza la transcripción de genes que codifican diferentes clases de RNA. La *RNA polimerasa I*, localizada en el nucléolo, transcribe los genes que codifica el precursor de rRNA (pre-rRNA), que se procesa en rRNA 28S, 5,8S y 18S. La *RNA polimerasa III* transcribe genes que codifican tRNA, rRNA 5S y diversos RNA pequeños y estables, incluido uno involucrado en el proceso de corte y emplame del RNA (U6) y el componente RNA de la partícula de reconocimiento de señales (SRP) implicada en el direccionamiento de las proteínas nacientes hacia el retículo endoplasmático (cap. 16). La *RNA polimerasa II* transcribe todos los genes codificantes de proteínas; es decir, funciona en la producción de mRNA. La RNA polimerasa II también produce cuatro de los cinco RNA nucleares pequeños que participan en el proceso de corte y emplame del RNA (*splicing*).

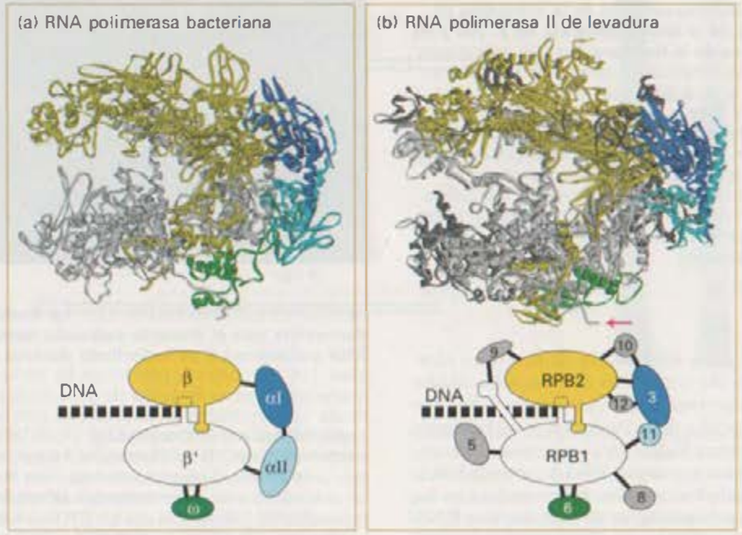
Cada una de las tres RNA polimerasas eucariontes es más compleja que la RNA polimerasa de *E. coli*, aunque sus estructuras son similares (fig. 11-5). Las tres contienen dos subunidades grandes y 10-14 subunidades más pequeñas, algunas de las



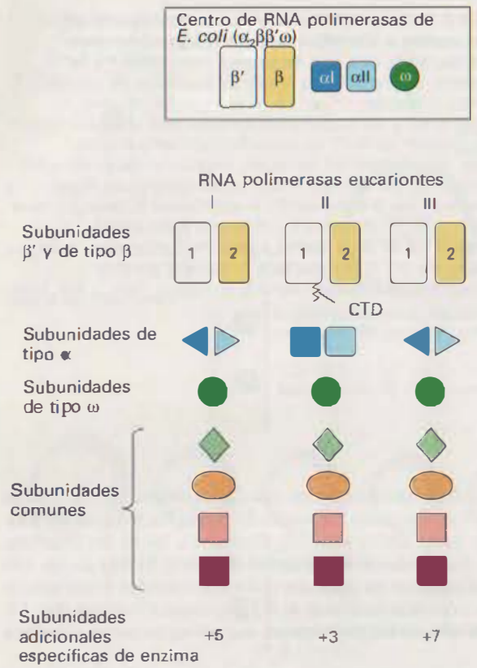
◀ FIGURA EXPERIMENTAL 11-4 La cromatografía en columna separa e identifica las tres RNA polimerasas eucariontes, cada una con su propia sensibilidad a la α-amanitina. Un extracto de proteínas nucleares de células eucariontes cultivadas se pasa a través de una columna de DEAE Sephadex y las proteínas adsorbidas eluidas (curva negra) con una solución de NaCl de concentración en aumento constante. Tres fracciones del eluato mostraron luego actividad RNA polimerasa (curva roja). A una concentración de 1 μg/mL, la α-amanitina inhibe la actividad de la polimerasa II, pero no tiene efecto sobre las polimerasas I y III (sombreado verde). La polimerasa III es inhibida por 10 μg/mL de α-amanitina, mientras que la polimerasa I no es afectada ni siquiera en esta concentración más elevada. (Véase R. G. Roeder, 1974, J. Biol. Chem. 249:241.)

cuales están presentes en dos o en las tres polimerasas. Las RNA polimerasas eucariontes mejor caracterizadas son las de la levadura *S. cerevisiae*. Cada uno de los genes de levadura que codifican las subunidades de las polimerasas fue clonado y secuenciado, y se caracterizaron los efectos de las mutaciones de genes *knockout*. Además, se determinó la estructura tridimensional de la RNA polimerasa II de la levadura a la que le faltan dos subunidades no esenciales (véase fig. 11-5). Las tres RNA polimerasas nucleares de todos los eucariontes examinados hasta ahora son muy similares a las de las levadura.

Las dos subunidades grandes (RPB1 y RPB2) de las tres RNA polimerasas eucariontes están relacionadas y son similares a las subunidades β' y β de *E. coli*, respectivamente (fig. 11-6). Cada una de las polimerasas eucariontes contiene también



▲ Fig. 11-5. Comparación de las estructuras tridimensionales de las RNA polimerasas eucariontes y bacterianas. Estos modelos del rastro de C_α se basan en los análisis cristalográficos de la RNA polimerasa de la bacteria *T. aquaticus* y de la RNA polimerasa II de *S. cerevisiae*. (a) Las cinco subunidades de la enzima bacteriana se distinguen por color. Sólo los dominios N-terminal de las subunidades α están incluidos en este modelo. (b) En este modelo se muestran diez de las doce subunidades que constituyen la RNA polimerasa II de la levadura. Las subunidades que son similares en conformación a las de la enzima bacteriana se muestran en los mismos colores. El dominio C-terminal de la subunidad mayor RPB1 no se observó en la estructura del cristal, pero se sabe que se extiende desde la posición marcada con una flecha roja. (RPB es la abreviatura de "RNA polimerasa B", la cual es una forma alternativa de referirse a la polimerasa II. [Parte (a) basada en estructuras cristalinas de G. Zhang et al., 1999, Cell 98:811. Parte (b) de P. Cramer et al., 2001, Science 292:1863.]



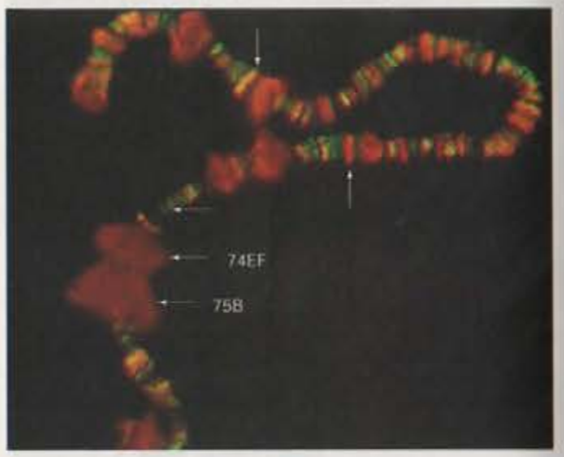
▲ Fig. 11-6. Representación esquemática de la estructura de las subunidades centrales de la RNA polimerasa de *E. coli* y las RNA polimerasas nucleares de la levadura. Las tres polimerasas de la levadura tienen cinco subunidades centrales homólogas a las subunidades β, β', dos α y ω de la RNA polimerasa de *E. coli*. La subunidad más grande (RPB1) de la RNA polimerasa II además contiene un dominio C-terminal esencial (CTD). Las RNA polimerasas I y III contienen las mismas dos subunidades de tipo α no idénticas, mientras que la RNA polimerasa II contiene dos subunidades de tipo α diferentes. Las tres polimerasas comparten la misma subunidad de tipo ω y otras cuatro subunidades comunes. Además, cada polimerasa de la levadura contiene de tres a siete subunidades únicas más pequeñas.

una subunidad de tipo ϖ y dos subunidades de tipo α no idénticas. La gran similitud en las estructuras de estas subunidades centrales de las RNA polimerasas de diversas fuentes indica que esta enzima surgió al principio de la evolución y mayormente se ha conservado. Esto parece lógico para una enzima que cataliza un proceso tan básico como copiar RNA a partir de DNA.

Además de sus subunidades centrales relacionadas con las subunidades de la RNA polimerasa de *E. coli*, las tres RNA polimerasas contienen cuatro subunidades pequeñas adicionales comunes a ella, pero no a la RNA polimerasa bacteriana. Por último, cada polimerasa eucarionte tiene varias subunidades específicas de enzima que no están presentes en las otras dos polimerasas. Los experimentos de inactivación génica (*knockout* de genes) en las levaduras indican que la mayoría de estas subunidades son esenciales para la viabilidad celular. No obstante, la supresión de los pocos genes de las subunidades de las polimerasas que no son absolutamente esenciales para la viabilidad trae como consecuencia células con escaso crecimiento. Por lo tanto, parece probable que todas las subunidades son necesarias para que las RNA polimerasas eucariontes funcionen en forma normal.

La subunidad más grande de la RNA polimerasa II tiene una repetición carboxilo terminal esencial

El extremo carboxilo de la subunidad más grande de la RNA polimerasa II (RPB1) contiene un segmento de siete aminoácidos que se repite múltiples veces casi con precisión absoluta. Ni la RNA polimerasa I ni la III contienen estas unidades repetitivas. Esta repetición heptapeptídica, con una secuencia consenso de Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser, se conoce como el *dominio carboxilo terminal (CTD)*. La RNA polimerasa II de levadura contiene 26 o más repeticiones, la enzima de los mamíferos tiene 52 repeticiones y un número intermedio de repeticiones aparece en la RNA polimerasa II de casi todos los otros eucariontes. El CTD es crítico para la viabilidad y al menos 10 copias de la repetición deben estar presentes para que la levadura sobreviva.



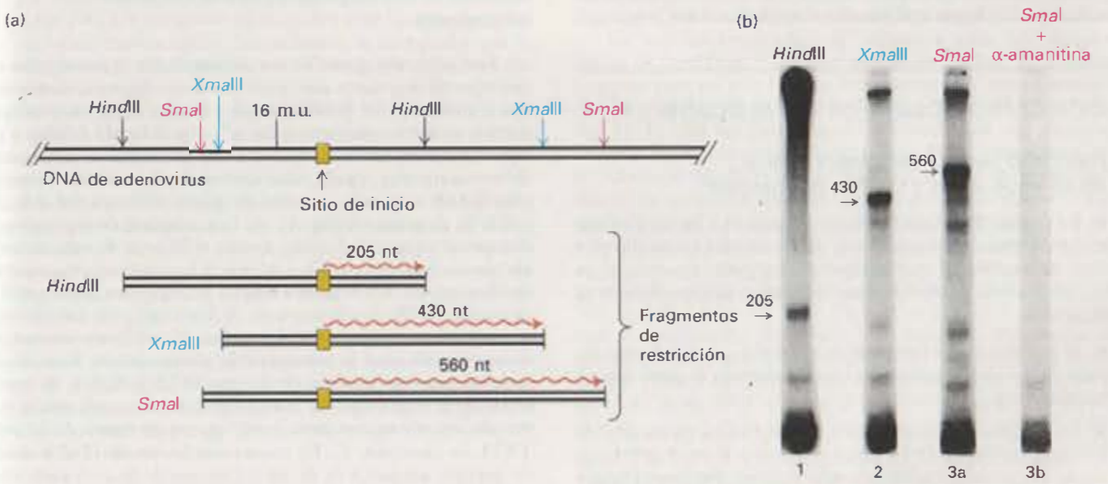
▲ FIGURA EXPERIMENTAL 11-7 La tinción con anticuerpos demuestra que el dominio carboxilo terminal (CTD) de la RNA polimerasa II es fosforilado durante la transcripción in vivo. Los cromosomas politénicos de glándula salival fueron preparados a partir de larvas de *Drosophila* justo antes de la muda. La preparación se trató con un anticuerpo de conejo específico para el CTD fosforilado y con un anticuerpo de cabra específico para CTD no fosforilado. Luego, la preparación se tiñó con un anticuerpo anticabra marcado con fluoresceína (verde) y un anticuerpo anticonejo marcado con rodamina (rojo). Así, las moléculas de polimerasa con un CTD no fosforilado se tiñen de verde y las que tienen un CTD fosforilado se tiñen de rojo. La hormona de muda ecdisona induce valores de transcripción muy altos en las regiones engrosadas o abultadas ("*puffs*") marcadas como 74EF y 75B; nótese que sólo el CTD fosforilado está presente en estas regiones. También se visualizan las regiones menos engrosadas transcriptas a altas velocidades. Los sitios no engrosados que se tiñen de rojo (flecha que apunta hacia arriba) o de verde (flecha horizontal) también se indican, al igual que un sitio teñido tanto de rojo como de verde, que produce un color amarillo (flecha que apunta hacia abajo). (De J. R. Weeks et al., 1993. Genes & Dev. 7:2329; cortesía de J. R. Weeks y A. L. Greenleaf.)

Los experimentos in vitro con promotores modelos primero mostraron que las moléculas de RNA polimerasa II que inician la transcripción tienen un CTD no fosforilado. Una vez que la polimerasa inicia la transcripción y comienza a alejarse del promotor, se fosforilan muchos de los residuos de serina y algunos de tirosina en el CTD. Los análisis de los cromosomas politénicos de glándulas salivales de *Drosophila* preparadas justo antes de la muda de la larva indican que el CTD también es fosforilado durante la transcripción in vivo. Los grandes engrosamientos cromosómicos ("*puffs*") inducidos en este momento del desarrollo son regiones donde el genoma se transcribe muy activamente. La tinción con anticuerpos específicos para el CTD fosforilado o no fosforilado demostró que la RNA polimerasa II asociada con las regiones engrosadas, de gran transcripción, contienen un CTD fosforilado (fig. 11-7).

La RNA polimerasa II inicia la transcripción en las secuencias de DNA correspondientes al casquete 5' de los mRNA

Se emplearon varios métodos experimentales para identificar secuencias de DNA en las cuales la RNA polimerasa II inicia la transcripción. Es posible localizar aproximadamente el sitio de inicio de la transcripción mediante la exposición de células cultivadas o núcleos aislados a ribonucleótidos marcados con ^{32}P durante lapsos muy breves, como ya se describió. Después que los transcriptos nacientes marcados resultantes son separados sobre la base de la longitud de la cadena, cada fracción de tamaño se incuba en condiciones de hibridación con fragmentos de restricción solapados que abarcan la región de DNA de interés. Los fragmentos de restricción que se hibridan con la cadena naciente marcada más corta, al igual que todas las largas, contienen el sitio de inicio de la transcripción. Una de las primeras unidades de transcripción analizadas de esta forma fue la unidad de transcripción tardía principal del adenovirus. Este análisis indicó que la transcripción se inició en una región ≈6 kb del extremo izquierdo del genoma viral.

El par de bases exacto donde la RNA polimerasa II inicia la transcripción en la unidad de transcripción tardía del adenovirus se determinó al analizar el RNA sintetizado durante la transcripción in vitro de los fragmentos de restricción del DNA del adenovirus, que se extendieron un poco en dirección 5' y 3' con respecto a la región de iniciación aproximada, según se determinó por el análisis de la transcripción naciente. El fundamento de este experimento y los resultados típicos se ilustran en la figura 11-8. Los transcriptos de RNA



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 11-8 La transcripción in vitro de los fragmentos de restricción y la medición de las longitudes de los RNA localizan el sitio de iniciación de la principal unidad transcripcional tardía del adenovirus. (a) La línea superior muestra los sitios de restricción para *Hin*dIII (negro), *Xma*III (azul) y *Sma*I (rojo) en la región del genoma del adenovirus donde se localizó el sitio de iniciación de la transcripción mediante análisis de transcripción naciente (cerca de las 16 unidades de mapeo). Los fragmentos de restricción *Hin*dIII, *Xma*III y *Sma*I que abarcan el sitio de iniciación fueron incubados individualmente con un extracto nuclear preparado a partir de células cultivadas y ribonucleósidos trifosfatos marcados con ^{32}P. La transcripción de cada fragmento comienza en el sitio de inicio y finaliza cuando una molécula de RNA polimerasa II llega a un extremo cortado del fragmento y se separa o "descarrila" ("run off") del fragmento molde, produciendo un transcripto incompleto (líneas onduladas rojas). (b) Los transcriptos incompletos sintetizados a partir de cada fragmento luego fueron sometidos a electroforesis en gel y autorradiografía para determinar sus longitudes exactas. Puesto que se conocían las posiciones de los sitios de restricción en el DNA del adenovirus, las longitudes en nucleótidos (nt) de los transcriptos incompletos producidos a partir de los fragmentos de restricción ubican con precisión el sitio de iniciación en el genoma del adenovirus, como se diagrama en la parte (a). En los geles aquí mostrados, las bandas en la parte superior e inferior representan transcriptos de RNA de altos y bajos pesos moleculares que se forman bajo las condiciones del experimento. La muestra en el carril 3b es la misma que en el carril 3a, excepto que la α-amanitina, un inhibidor de la RNA polimerasa II, estaba incluida en la mezcla de transcripción. Para mayor explicación véase el texto. (Véase R. M. Evans y E. Ziff, 1978, Cell 15:1463 y P. A. Weil et al., 1979, Cell 18:469. Autorradiograma cortesía de R. G. Roeder.)

sintetizados in vitro mediante la RNA polimerasa II desde el sitio de inicio determinado en este experimento contenían una estructura casquete o capuchón de RNA idéntica a la que está presente en el extremo 5' de casi todos los mRNA de eucariontes (véase fig. 4-13). Este casquete 5' fue añadido por enzimas del extracto nuclear, que pueden añadir un casquete sólo a un RNA que tenga un trifosfato o un difosfato 5'. Debido a que un extremo 5' generado mediante escisión de un RNA más largo tendría un monofosfato 5', a éste no se le podría añadir un casquete. En consecuencia, los investigadores concluyeron que el nucleótido con casquete generado en la reacción de transcripción in vitro debe haber sido el nucleótido con el cual se inició la transcripción. El hallazgo de que la secuencia en el extremo 5' de los transcriptos de RNA producidos in vitro es la misma que la del extremo 5' de los mRNA del adenovirus tardío aislados de las células confirmó que el nucleótido con casquete de los mRNA tardíos del adenovirus coincide con el sitio de iniciación de la transcripción.

Ensayos de transcripción in vitro similares con otros genes eucariontes clonados produjeron resultados similares. En cada caso, se halló que el sitio de inicio era equivalente a la secuencia 5' del casquete del mRNA correspondiente. Por ende, la síntesis de los precursores eucariontes de mRNA por la RNA polimerasa II comienza en la secuencia de DNA que codifica el extremo 5' con casquete del mRNA. En la actualidad, el sitio de inicio de la transcripción de un mRNA recién caracterizado en general se determina simplemente identificando la secuencia de DNA que codifica el extremo 5' del mRNA.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 11.1

Panorama general del control génico en los eucariontes y las RNA polimerasas

- La finalidad principal del control génico en los organismos multicelulares es la ejecución de decisiones del desarrollo precisas de manera tal que se expresen los genes apropiados en las células apropiadas durante la diferenciación celular y el desarrollo.
- El control transcripcional es el medio principal para regular la expresión génica en los eucariontes, al igual que en las bacterias.
- En los genomas eucariontes, los elementos de control de la transcripción de DNA pueden ubicarse a muchas kilobases de distancia del promotor que regulan. Diferentes regiones de control pueden controlar la transcripción del mismo gen en diferentes tipos celulares.
- Los eucariontes contienen tres tipos de RNA polimerasa nucleares. Las tres contienen dos subunidades centrales grandes y tres más pequeñas con homología con las subunidades β', β, α y ω de la RNA polimerasa de *E. coli*, al igual que varias subunidades pequeñas adicionales (véase fig. 11-6).
- La RNA polimerasa I sintetiza sólo pre-rRNA. La RNA polimerasa II sintetiza mRNA y algo de los RNA nucleares pequeños que participan en el corte y empalme del mRNA. La RNA polimerasa III sintetiza tRNA, rRNA 5S y otros varios RNA estables relativamente cortos.
- El dominio carboxilo terminal (CTD) en la subunidad más grande de la RNA polimerasa II se fosforila durante la iniciación de la transcripción y permanece fosforilado mientras la enzima transcribe el molde.
- La RNA polimerasa II inicia la transcripción de genes en el nucleótido en el DNA molde, que corresponde al nucleótido 5' que tiene casquete en el mRNA codificado.

11.2 Secuencias reguladoras en los genes codificantes de proteínas

Como se vio en la sección anterior, la expresión de los genes eucariontes codificantes de proteínas está regulada por múltiples secuencias de DNA de unión a las proteínas, denominadas genéricamente regiones de **control transcripcional.** Éstas incluyen promotores y otros tipos de elementos control localizados cerca de los sitios de inicio de la transcripción, al igual que las secuencias ubicadas lejos de los genes que regulan. En esta sección examinamos más minuciosamente las propiedades de diversos elementos de control que se hallan en los genes codificantes de proteínas y algunas técnicas empleadas para identificarlos.

La caja TATA, los iniciadores y las islas CpG funcionan como promotores en el DNA eucarionte

Los primeros genes en ser secuenciados y estudiados en sistemas de transcripción in vitro fueron genes virales y genes codificantes de proteínas que se transcriben muy activamente, ya sea en momentos particulares del ciclo celular o en tipos celulares diferenciados específicos. En todos estos genes de transcripción rápida, una secuencia conservada llamada **caja TATA** se encontró a ≈25-35 pares de bases del sitio de inicio en dirección 5'(fig. 11-9). Los estudios de mutagénesis demostraron que el cambio de una sola base en esta secuencia de nucleótidos disminuye drásticamente la transcripción in vitro por la RNA polimerasa II de los genes adyacentes a una caja TATA. En la mayoría de los casos, los cambios de secuencia entre la caja TATA y el sitio de inicio no afectan en forma significativa la velocidad de transcripción. Si se eliminan los pares de bases entre la caja TATA y el sitio de inicio normal, la transcripción del molde alterado y acortado comienza en un nuevo sitio a ≈25 pares de bases de la caja TATA en dirección 3'. En consecuencia, la caja TATA actúa de manera similar a la de un promotor de *E. coli* para ubicar la RNA polimerasa II con el fin de iniciar la transcripción (véase fig. 4-11).

En lugar de una caja TATA, algunos genes eucariontes contienen un elemento promotor alternativo denominado *iniciador*. Los elementos iniciadores que tienen lugar más naturalmente tienen una citosina (C) en la posición –1 y un residuo de adenina (A) en el sitio de inicio de la transcripción (+1). La mutagénesis dirigida de los genes de mamíferos con un promotor provisto de iniciador ha revelado que la secuencia de nucleótidos inmediatamente alrededor del sitio de inicio determina la fuerza de esos promotores. Sin embargo, a diferencia de la secuencia conservada de la caja TATA, sólo se definió una secuencia consenso iniciadora extremadamente degenerada:

(5') Y-Y-A^{+1}-N-T/A-Y-Y-Y (3')



▲ Fig. 11-9. Determinación de la secuencia consenso de la caja TATA. Las secuencias de nucleótidos que se ubican en dirección 5' con respecto al sitio de inicio en 900 diferentes genes codificantes de proteínas de eucariontes se alinearon para maximizar la homología en la región desde –35 a –26. Los números tabulados son la frecuencia porcentual de cada base en cada posición. La homología máxima se presenta en una región de ocho bases, conocida como la *caja TATA*, cuya secuencia consenso se muestra en la parte inferior. La base inicial en los mRNA codificados por genes que contienen una caja TATA es con mucha frecuencia una A. (Véase P. Bucher, 1990, *J Mol Biol* 212:563 y http://www.epd.isb-sib.ch/promoter_elements.)

donde A^{+1} es la base en la cual comienza la transcripción, Y es una pirimidina (C o T), N es cualquiera de las cuatro bases y T/A es T o A en la posición +3.

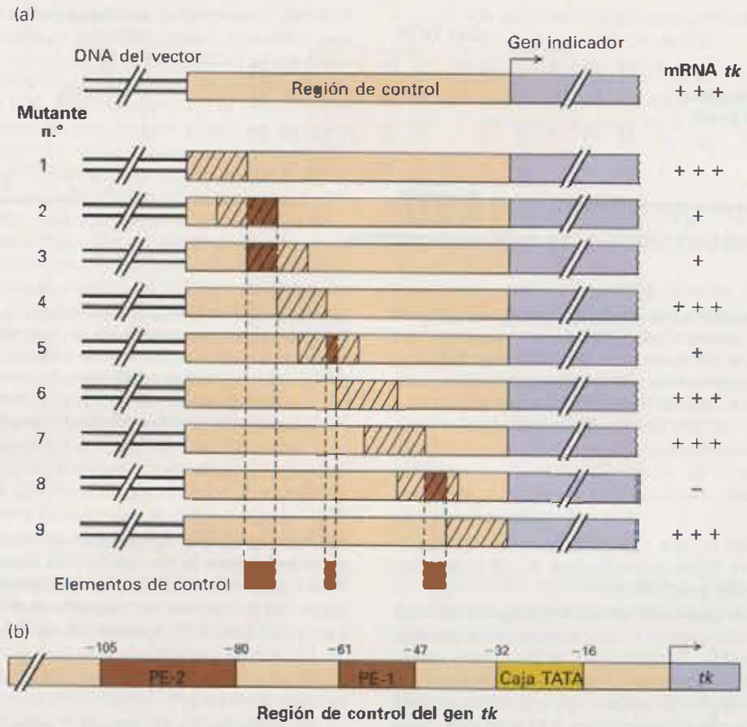
La transcripción de genes con promotores que contienen una caja TATA o un elemento iniciador comienza en un sitio de iniciación bien definido. Sin embargo, se comprobó que la transcripción de muchos genes codificantes de proteínas comienza en cualquiera de los múltiples sitios posibles de una región extensa, a menudo de entre 20 y 200 pares de bases de longitud. Como resultado, estos genes dan origen a mRNA con múltiples extremos 5' alternativos. Estos genes, que suelen transcribirse a bajas velocidades (p. ej., genes que codifican las enzimas del metabolismo intermediario, a menudo llamados "genes domésticos") no contienen una caja TATA o un iniciador. La mayoría de los genes de este tipo contienen una extensión rica en CG de 20 a 50 nucleótidos dentro de ≈100 pares de bases con respecto al sitio de inicio en dirección 5'. El dinucleótido CG está estadísticamente subrepresentado en los DNA de los vertebrados y la presencia de una región rica en CG, ● *isla CpG*, apenas al lado de un sitio de inicio en dirección 5' es una distribución claramente no aleatoria. Por este motivo, la presencia de una isla de CpG en el DNA genómico sugiere que puede contener una región de iniciación de la transcripción.

Los elementos proximales del promotor ayudan a regular los genes eucariontes

Con el fin de identificar las regiones de control de la transcripción se emplearon técnicas de DNA recombinante para mutar en forma sistemática las secuencias de nucleótidos que se encuentran en dirección 5' con respecto a los sitios de inicio de diversos genes eucariontes. Hasta el momento se analizaron centenares de genes eucariontes y se identificaron decenas de regiones de control de la transcripción. Estos elementos de control, junto con la caja TATA o el iniciador, suelen denominarse *promotor* del gen que regulan. Sin embargo, nosotros preferimos reservar el término *promotor* para las secuencias iniciadoras ● la caja TATA que determinan el sitio de iniciación en el molde. Empleamos el término elementos proximales del promotor para las regiones de control ubicadas dentro de los 100 o 200 pares de base en dirección 5' del sitio de inicio. En algunos casos, los elementos proximales del promotor son específicos del tipo celular; es decir, funcionan sólo con tipos celulares diferenciados específicos.

Un método empleado con frecuencia para determinar el límite en dirección 5' de una región de control de la transcripción para un gen de mamífero comprende la construcción de un conjunto de deleciones 5' como se trató antes (véase fig. 11-3). Una vez determinado el límite 5' de una región de control de la transcripción, el análisis de las mutaciones rastreadoras de ligadores (*linker scanning mutations)* puede identificar las secuencias con funciones reguladoras que se ubican entre el límite y el sitio de inicio de la transcripción. En este método se estudia el efecto que tiene un conjunto de construcciones con mutaciones contiguas solapadas sobre la expresión de un gen indicador o sobre la producción de un mRNA específico (fig. 11-10a). Uno de los primeros usos de este tipo de análisis fue identificar los elementos proximales del promotor en el gen timidina cinasa (*tk*) del virus del herpes simple (HSV). Los resultados demostraron que la región de DNA en dirección 5' del gen *tk* del HSV contiene tres secuencias de control de la transcripción separadas: una caja TATA en el intervalo de –32 a –16 y otros dos elementos de control más lejos, en dirección 5' (fig. 11-10b).

Para probar las restricciones del espaciamiento en los elementos de control en la región del promotor *tk* del HSV identificada mediante el análisis de mutaciones rastreadoras de ligadores, los investigadores prepararon y analizaron las construcciones que contenían pequeñas deleciones e inserciones entre los elementos. Los cambios en el espaciamiento entre el promotor y los elementos de control proximal del promotor de 20 nucleótidos o menos tuvieron poco efecto. Sin embargo, las inserciones de 30 a 50 pares de bases entre un elemento proximal del promotor y la caja TATA fueron equivalentes a eliminar el elemento. Los análisis similares de otros promotores eucariontes también indicaron que, en general, se tolera una considerable flexibilidad en el espaciamiento entre los elementos proximales del promotor, pero las separaciones de varias decenas de pares de bases pueden disminuir la transcripción.

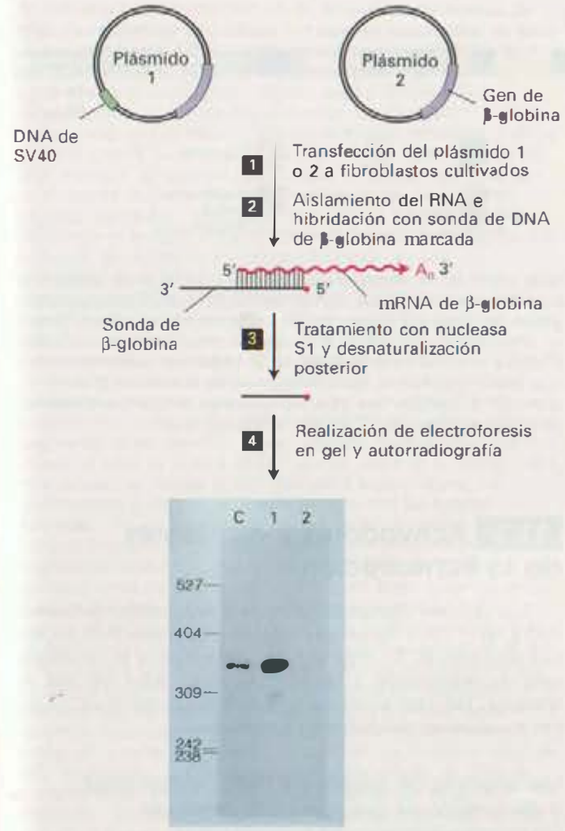


▲ FIGURA EXPERIMENTAL 11-10 Las mutaciones rastreadoras de ligadores *(linker scanning mutations)* identifican los elementos de control transcripcional. (a) Una región de DNA eucarionte (anaranjado) que sustenta un alto nivel de expresión de un gen indicador (violeta) se clona en un vector plasmídico como se diagrama en la parte superior. Desde un extremo de la región bajo análisis al otro se introducen mutaciones rastreadoras de ligadores (LS) (*linker scanning mutations*) que se superponen (sombreadas con rayas). Estas mutaciones son el resultado de la mezcla irregular de la secuencia nucleotídica en un segmento corto de DNA. Después que los plásmidos mutantes se transfectaron por separado a células cultivadas, se analiza la actividad del producto del gen indicador. En el ejemplo hipotético aquí mostrado, las mutaciones LS 1, 4, 6, 7 y 9 tienen poco o ningún efecto en la expresión del gen indicador, lo que señala que las regiones alteradas en estos mutantes no contienen elementos de control. La expresión del gen indicador se reduce de manera significativa en los mutantes 2, 3, 5 y 8 y señala que los elementos de control (en marrón) se ubican en los intervalos que se muestran en la parte inferior. (b) Los análisis de las mutaciones LS en la región de control de la transcripción del gen de la timidincinasa (*tk*) del virus del herpes simple (HSV) identificaron una caja TATA y dos elementos proximales del promotor (PE-1 y PE2). [Parte (b) véase S. L. McKnight y R. Kingsbury, 1982, Science 217:316.]

Los amplificadores distantes a menudo estimulan la transcripción por RNA polimerasa II

Como ya se vio, la transcripción de muchos promotores eucariontes puede estar estimulada por elementos de control ubicados a miles de pares de bases de distancia del sitio de inicio. Tales elementos de control de la transcripción a larga distancia, denominados **amplificadores**, son comunes en los genomas eucariontes, pero bastante raros en los bacterianos. El primer amplificador descubierto que estimula la transcripción de genes eucariontes estaba en un fragmento de 366 pb del virus de los simios 40 (SV40) (fig. 11-11). Análisis posteriores de esta región del DNA del SV40 revelaron que una secuencia de ≈100 pb ubicada ≈100 pares de bases en dirección 5' del sitio de inicio de la transcripción temprana del SV40 era responsable de su capacidad para amplificar la transcripción. En el SV40 esta secuencia amplificadora funciona estimulando la transcripción a partir de promotores virales. Sin embargo, el amplificador SV40 estimula la transcripción a partir de todos los promotores de mamíferos investigados cuando se lo inserta en cualquier orientación y sitio de un plásmido portador del promotor en estudio, aun cuando se encuentre a miles de pares de bases del sitio de inicio. Un análisis extenso de mutaciones rastreadoras de ligadores del amplificador SV40 indicó que está compuesto de múltiples elementos individuales, cada uno de los cuales contribuye a la actividad total del amplificador. Como se tratará más adelante, cada uno de estos elementos reguladores es un sitio de unión a las proteínas.

Poco después del descubrimiento del amplificador SV40, se identificaron amplificadores en otros genomas virales y en el DNA celular eucarionte. Algunos de estos elementos de control están ubicados a 50 o más kilobases del promotor que controlan. Los análisis de muchos amplificadores celulares eucariontes mostraron que se presentan en dirección 5' con respecto a un promotor, en dirección 3' con respecto a un intrón o incluso en dirección 3' del exón final de un gen. Al igual que los elementos proximales del promotor, muchos amplificadores son específicos del tipo celular. Por ejemplo, los genes que codifican anticuerpos (inmunoglobulinas) contienen un amplificador dentro del segundo intrón que puede estimular la transcripción a partir de todos los promotores examinados, pero sólo en los linfocitos B, el tipo de células que normalmente expresa anticuerpos. Los análisis de los efectos de las deleciones y de las mutaciones rastreadoras de ligadores en los amplificadores celulares mostraron que, al igual que el amplificador del SV40, están compuestos de múltiples elementos que contribuyen a la actividad general del amplificador.



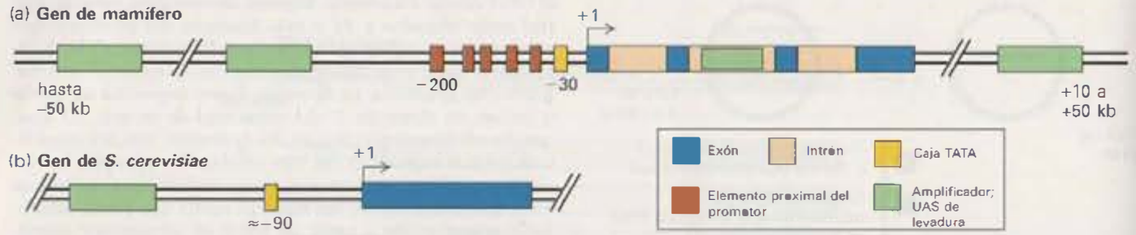
▲ FIGURA EXPERIMENTAL 11-11 Los plásmidos que contienen un fragmento particular de DNA SV40 mostraron un incremento importante de la producción de mRNA en comparación con los plásmidos que carecen de este amplificador. Se construyeron plásmidos con el gen β-globina con un fragmento de 366 pb de DNA SV40 o sin él. Estos plásmidos fueron transfectados a células cultivadas y cualquier RNA resultante se hibridó a una sonda de DNA de β-globina (pasos 1 y 2). La cantidad de mRNA de β-globina sintetizado por las células transfectadas con uno u otro plásmido se analizó mediante el método de protección de la nucleasa S1 (paso 3). La sonda de fragmento de restricción, generada a partir de un clon de cDNA de β-globina, era complementaria al extremo 5' del mRNA de la β-globina. El extremo 5' de la sonda fue marcado con ^{32}P (punto rojo). La hibridación del mRNA de la β-globina a la sonda protegió un fragmento de ≈340 nucleótidos de la sonda de la digestión por la nucleasa S1, la cual digiere DNA monocatenario, pero no DNA en un híbrido de DNA-RNA. La autorradiografía de los fragmentos protegidos por S1 sometidos a electroforesis (paso 4) reveló que las células transfectadas con el plásmido 1 (carril 1) producían muchos más RNA de β-globina que las transfectadas con el plásmido 2 (carril 2). La línea C es un análisis de control del mRNA de la β-globina aislado de los reticulocitos, los cuales sintetizan activamente β-globina. Estos resultados muestran que el fragmento de DNA de SV40 en el plásmido 1 contiene un elemento, el amplificador, que estimula enormemente la síntesis del mRNA de la β-globina. (Adaptado de J. Banerji et al., 1981, Cell 27:299.)

La mayoría de los genes eucariontes están regulados por múltiples elementos de control transcripcional

En un principio se pensaba que los amplificadores y los elementos proximales del promotor eran tipos distintos de elementos de control de la transcripción. Sin embargo, a medida que se analizaron más amplificadores y elementos proximales del promotor, las distinciones entre ellos se volvieron menos claras. Por ejemplo, ambos tipos de elementos generalmente pueden estimular la transcripción aun cuando se los invierta y a menudo son específicos del tipo celular. El consenso general actual es que un espectro de elementos de control regula la transcripción por la RNA polimerasa II. En un extremo están los amplificadores, que pueden estimular la transcripción a partir de un promotor a decenas de miles de pares de bases de distancia (p. ej., el amplificador SV40). En el otro extremo se encuentran los elementos proximales del promotor en dirección 5' que controlan el gen *tk* de HSV, el cual pierde su influencia cuando se lo aleja del promotor unos 30 o 50 pares de bases adicionales. Los investigadores identificaron numerosos elementos de control de la transcripción que pueden estimular la transcripción desde distancias comprendidas entre estos dos extremos.

En la figura 11-12a se resumen las localizaciones de las secuencias de control de la transcripción para un hipotético gen de mamífero. El sitio de inicio en el cual comienza la transcripción codifica el primer nucleótido (5') del primer exón de un mRNA, el nucleótido que forma parte del casquete. Para muchos genes, sobre todo para los que codifican proteínas expresadas con abundancia una caja TATA localizada cerca de 25 a 35 pares de bases en dirección 5' del sitio de inicio dirige la RNA polimerasa II para comenzar la transcripción del nucleótido apropiado. Los elementos proximales del promotor, que son relativamente cortos (≈10-20 pares de bases), se localizan dentro de los primeros ≈200 pares de bases en dirección 5' del sitio de inicio. Por el contrario, los amplificadores suelen tener ≈100 pares de bases de largo y están compuestos de múltiples elementos de ≈10-20 pares de bases. Los amplificadores pueden estar ubicados a más de 50 kilobases en dirección 5' o 3' del sitio de inicio o dentro de un intrón. Muchos genes de los mamíferos están controlados por más de una región amplificadora.

El genoma de *S. cerevisiae* contiene elementos reguladores llamados secuencias **activadoras en dirección 5'** (*upstream*



▲ Fig. 11-12 Modelo general de los elementos de control que regulan la expresión génica en los eucariontes multicelulares y en las levaduras. (a) Los genes de organismos multicelulares contienen tanto amplificadores como elementos proximales del promotor, así como una caja TATA u otros elementos promotores. Los elementos promotores posicionan la RNA polimerasa II para iniciar la transcripción en el sitio de inicio e influyen en la velocidad de transcripción. Los amplificadores pueden estar tanto en dirección 5′ como 3′ y tan lejos como 50 kb desde el sitio de inicio. En algunos casos, los amplificadores se ubican dentro de los intrones. Para algunos genes, los elementos proximales del promotor se ubican tanto en dirección 3′ con respecto al sitio de inicio como en dirección 5′ (b) La mayoría de los genes de *S. cerevisiae* contienen sólo una región reguladora, denominada *secuencia activadora en dirección 5′ (UAS)* y una caja TATA, que se encuentra 90 pares de bases en dirección 5′ desde el sitio de inicio.

activating sequences, UAS), que funcionan de manera similar a los amplificadores y a los elementos proximales del promotor en los eucariontes superiores. La mayoría de los genes de las levaduras contienen sólo una UAS, que se localiza dentro de unos pocos cientos de pares de bases del sitio de inicio. Además, los genes de *S. cerevisiae* contienen una caja TATA de ≈90 pares de bases en dirección 5′ del sitio de inicio de la transcripción (fig. 11-12b).

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCION 11.2

Secuencias reguladoras en los genes codificantes de proteínas

- La expresión de los genes eucariontes codificantes de proteínas suele estar regulada mediante múltiples regiones de control de unión de proteínas ubicadas cerca o distantes del sitio de inicio (fig. 11-12).
- Los promotores dirigen la unión de la RNA polimerasa II al DNA, determinan el sitio de iniciación de la transcripción e influyen en la velocidad de éste.
- Se identificaron tres tipos principales de secuencias promotoras en el DNA eucarionte. La caja TATA, la más común, predomina en los genes de transcripción rápida. Los promotores iniciadores se hallan en algunos genes y las islas CpG son características de los genes transcriptos a baja velocidad.
- Los elementos proximales del promotor aparecen dentro de los 200 pares de bases en dirección 5′ de un sitio de inicio. Varios de tales elementos, que contienen ≈10 a 20 pares de bases, pueden ayudar a regular un gen en particular.
- Los amplificadores, que contienen múltiples elementos de control cortos, pueden estar ubicados de 200 pares de bases a decenas de kilobases de un promotor en dirección 5′ o 3′; dentro de un intrón o en dirección 3′ del último exón de un gen.
- Los elementos proximales del promotor y los amplificadores a menudo son específicos del tipo celular y funcionan sólo en tipos celulares diferenciados específicos.

11.3 Activadores y represores de la transcripción

Los diversos elementos de control de la transcripción hallados en el DNA eucarionte son sitios de unión para proteínas reguladoras. En esta sección, comentamos la identificación, la purificación y las estructuras de estos factores de transcripción, que activan o reprimen la expresión de los genes eucariontes codificantes de proteínas.

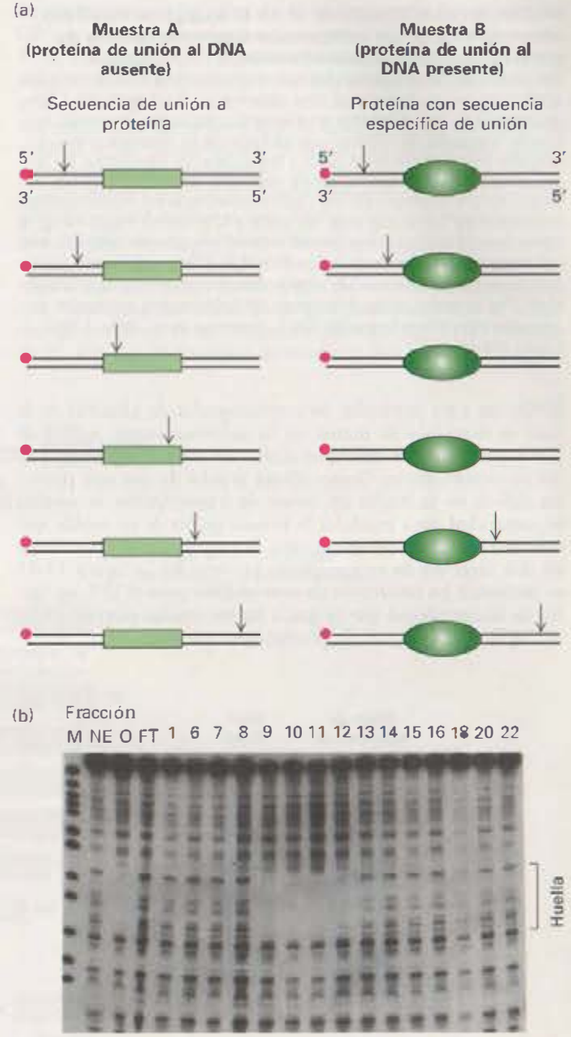
Los ensayos de huellas de DNA (*footprinting*) y de retardo en gel (*gel shift*) detectan las interacciones entre las proteínas y el DNA

En levaduras, *Drosophila* y otros eucariontes genéticamente manipulables, se han identificado numerosos genes que codifican activadores y represores transcripcionales mediante análisis genéticos clásicos como los que se describen en el capítulo 9. Sin embargo, en los mamíferos y otros vertebrados, que son menos dúctiles frente a esos análisis genéticos, la mayoría de los factores de transcripción han sido identificados en un principio y luego se purificaron mediante técnicas bioquímicas. En este enfoque, se utiliza un elemento regulador de DNA identificado mediante la clase de análisis mutacionales descritos en la sección anterior para identificar proteínas *afines ("cognadas")* que se unen a él de manera específica. Dos técnicas comunes para detectar estas proteínas afines son el **footprinting con DNasa I** y el **ensayo de retardo de la movilidad electroforética**.

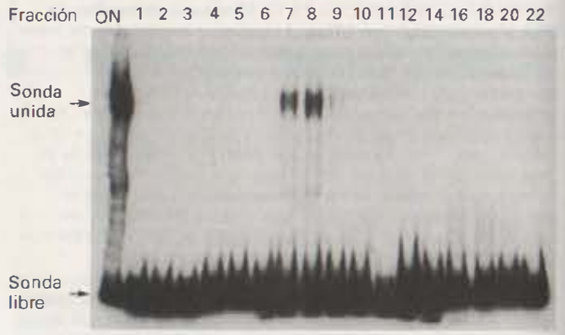
El footprinting con DNasa I toma ventaja del hecho de que cuando una proteína está unida a una región de DNA, protege esta secuencia de DNA de la digestión mediante nucleasas. Como se ilustra en la figura 11-13, cuando las muestras de un fragmento de DNA que está marcado en un extremo se digieren en presencia y ausencia de una proteína de unión al DNA y luego se desnaturalizan, se realiza una electroforesis y al gel resultante se lo somete a autorradiografía, la región protegida por la proteína unida aparece como una brecha o una "huella" en el patrón de bandas resultante respecto de la digestión en ausencia de la proteína. Cuando se realiza el footprinting con un fragmento de DNA que contiene un elemento de control de DNA conocido, la aparición de una huella indica la presencia de un factor de transcripción que se une a ese elemento de control en la muestra proteica bajo análisis. El footprinting también identifica la secuencia de DNA específica a la cual se une el factor de transcripción.

El ensayo de retardo de la movilidad electroforética, también denominado ensayo de cambio de banda (*band-shift assay*), es más útil que el footprinting para el análisis cuantitativo de las proteínas de unión al DNA. En general, la movilidad electroforética de un fragmento de DNA se reduce cuando forma un complejo con una proteína, lo que provoca un cambio en la localización de la banda del fragmento. Este análisis puede utilizarse para detectar un factor de transcripción en fracciones proteicas incubadas con un fragmento de DNA radiomarcado que contiene un elemento de control conocido (fig. 11-14).

En el aislamiento bioquímico de un factor de transcripción, un extracto de núcleos celulares es sometido de manera secuencial a varios tipos de cromatografía en columna (cap. 3). Las fracciones eluidas de las columnas se analizan mediante el footprinting con DNasa I o con ensayos de retardo en gel utilizando fragmentos de DNA que contienen un elemento regulador identificado (véanse figs. 11-13 y 11-14). Las fracciones que contienen proteínas que se unen al elemento regulador en estos ensayos probablemente contengan un factor de transcripción putativo. Una técnica poderosa empleada para el paso final en la purificación de los factores de transcripción es la *cromatografía de afinidad con secuencia específica de*



▶ FIGURA EXPERIMENTAL 11-13 El ensayo de huellas de DNA (*footprinting*) con DNasa I revela las secuencias de los elementos de control y puede usarse como análisis en la purificación de los factores de transcripción. (a) El experimento de huellas con DNasa I puede identificar las secuencias de los elementos de control. Un fragmento de DNA que se sabe que contiene el elemento de control se marca en un extremo con ^{32}P (punto rojo). Luego porciones de la muestra de DNA marcado se digieren con DNasa I en presencia y ausencia de muestras proteicas que se piensa contienen una proteína cognada. La DNasa I hidroliza al azar enlaces fosfodiéster del DNA entre el oxígeno 3′ de la desoxirribosa de un nucleótido y el fosfato 5′ del siguiente nucleótido. Se utiliza una baja concentración de DNasa I de manera tal que en promedio escinda cada molécula de DNA sólo una vez (flechas verticales). Si la muestra proteica no contiene una proteína cognada de unión al DNA, el fragmento de DNA se corta en múltiples posiciones entre el extremo marcado y el no marcado del fragmento original, como en la muestra A de la izquierda. Si la muestra proteica contiene una proteína cognada, como en la muestra B de la derecha, la proteína se fija al DNA, protegiendo a una porción del fragmento de ser digerida. Posteriormente al tratamiento con DNasa, el DNA se separa de la proteína, luego se lo desnaturaliza para separar las hebras y se lo somete a electroforesis. La autorradiografía del gel resultante detecta sólo las hebras marcadas y revela fragmentos que se extienden desde el extremo marcado hasta el sitio de escisión de la DNasa I. Los fragmentos escindidos que contienen la secuencia control aparecen en el gel para la muestra A, pero están ausentes en la muestra B debido a que la proteína cognada bloqueó las escisiones dentro de esa secuencia y por ende la producción de los fragmentos correspondientes. Las bandas ausentes en el gel constituyen la huella. (b) Una fracción proteica que contiene una secuencia específica de unión al DNA puede ser purificada por cromatografía en columna. El footprinting con DNasa I puede identificar posteriormente cuál de las fracciones extraídas contienen la proteína cognada. En ausencia de proteínas añadidas (NE, *no* extracto), la DNasa I escinde el fragmento de DNA en múltiples sitios, produciendo múltiples bandas en el gel aquí mostrado. Una proteína cognada presente en el extracto nuclear aplicado a la columna (O, onput) generó una huella. Esta proteína fue unida a la columna, puesto que la actividad de huella no se detectó en la fracción proteica que no fue retenida (FT). Luego de aplicar un gradiente salino a la columna, la mayoría de la proteína cognada eluyó en las fracciones 9-12, como se evidencia por las bandas faltantes (huellas). La secuencia de la región de unión a proteínas puede determinarse por comparación con los marcadores de fragmentos de DNA de longitud conocida analizados en el mismo gel (M). [Parte (b) de S. Yoshinaga et al., 1989, J. Biol. Chem. 264:10529.]



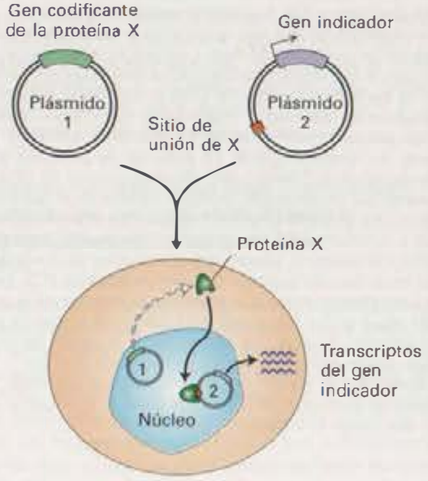
▶ **FIGURA EXPERIMENTAL 11-14 El ensayo de movilidad electroforética puede utilizarse para detectar factores de transcripción durante la purificación.** En este ejemplo, fracciones proteicas separadas por cromatografía en columna se analizaron por su capacidad para unirse a un fragmento de DNA radiomarcado que contenía un elemento regulador conocido, la sonda. Después de incubar una alícuota de la muestra proteica cargada sobre la columna (ON) y las sucesivas fracciones de la columna (números) con la sonda marcada, se sometieron las muestras a electroforesis bajo condiciones que no desnaturalizan las proteínas. La sonda libre no unida a la proteína migró hasta la parte inferior del gel. Una proteína en la preparación aplicada a la columna y en las fracciones 7 y 8 unidas a la sonda forma un complejo DNA-proteína que migró más lentamente que la sonda libre. Por lo tanto, estas fracciones probablemente contenían la proteína reguladora buscada. (De S. Yoshinaga et al., 1989, J. Biol. Chem. 264:10529.)

DNA, un tipo particular de cromatografía de afinidad en la cual se asocian a la matriz de la columna largas hebras de DNA que contienen múltiples copias del sitio de unión del factor de transcripción. Como última prueba de que una proteína aislada es de hecho un factor de transcripción, se analiza su capacidad para modular la transcripción de un molde que contiene los sitios de unión para la proteína correspondiente en una reacción de transcripción in vitro. En la figura 11-15 se muestran los resultados de esos análisis para el SP1, un factor de transcripción que se une a las secuencias ricas en GC y activa la transcripción de promotores cercanos.



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 11-15 Los factores de transcripción pueden identificarse mediante ensayos in vitro para la actividad de transcripción.** La SP1 fue identificada sobre la base de su capacidad para unirse a una región del genoma del SV40 que contiene seis copias de un elemento proximal del promotor rico en GC y se purificó mediante cromatografía en columna. Para analizar la capacidad activadora de la transcripción de la SP1 purificada, se la incubó in vitro con un molde de DNA, una fracción proteica que contenía RNA polimerasa II y factores generales de transcripción, y ribonucleósidos trifosfatos marcados. Los productos de RNA marcados se sometieron a electroforesis y a autorradiografía. Aquí se muestran los autorradiogramas de los análisis con DNA de adenovirus y SV40 en ausencia (–) y presencia (+) de SP1. La SP1 no tuvo efecto significativo sobre la transcripción a partir del promotor del adenovirus, que no contiene sitios de unión para SP1. En cambio, la SP1 incrementó la transcripción a partir del promotor SV40 alrededor de diez veces. (Adaptado de M. R. Briggs et al., 1986, Science 234:47.)

Una vez que se ha aislado y purificado un factor de transcripción, su secuencia parcial de aminoácidos puede determinarse y utilizarse para clonar el gen o el cDNA que lo codifica, como se explicó en el capítulo 9. El gen aislado puede usarse luego para probar la capacidad de la proteína codificada para activar o reprimir la transcripción en un ensayo de transfección in vivo (fig. 11-16).

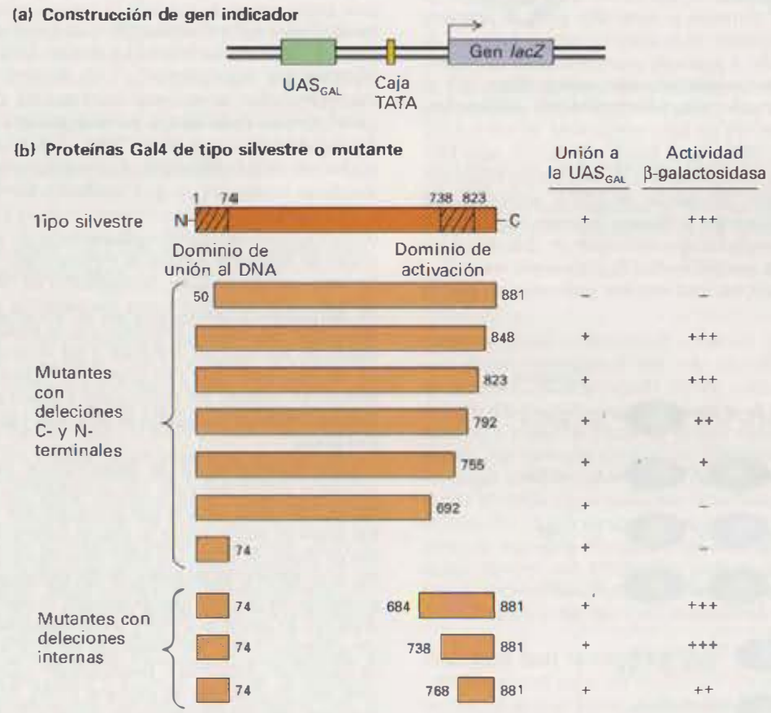


▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 11-16 El ensayo de transfección in vivo mide la actividad transcripcional para evaluar proteínas que se creen que son factores de transcripción.** El sistema de ensayo requiere dos plásmidos. Un plásmido contiene el gen codificante del supuesto factor de transcripción (proteína X). El segundo plásmido contiene un gen indicador (p. ej., *lacZ*) y uno o más sitios de unión para la proteína X. Ambos plásmidos se introducen simultáneamente en las células que carecen del gen codificante de la proteína X. Se mide la producción de transcriptos de RNA del gen indicador; alternativamente se puede analizar la actividad de la proteína codificada. Si la transcripción del gen indicador es mayor en presencia del plásmido codificante de X, entonces la proteína es un activador; si la transcripción es menor, entonces es un represor. Mediante el uso de plásmidos que codifican un factor de transcripción mutado o reordenado, es posible identificar dominios importantes de la proteína.

Los activadores son proteínas modulares compuestas de dominios funcionales diferentes

Los estudios con un activador transcripcional de levadura denominado GAL4 proporcionaron un primer entendimiento acerca de la estructura del dominio de los factores de transcripción. El gen que codifica la proteína GAL4, la cual promueve la expresión de enzimas necesarias para el metabolismo de la galactosa, se identificó por análisis de complementación de los mutantes *gal4* (cap. 9). Estudios de mutagénesis dirigida como los que ya se describieron, identificaron UAS para los genes activados por GAL4. Se descubrió que cada una de estas UAS contiene una o más copias de una secuencia de 17 pb denominada UAS_{GAL}. El footprinting con DNasa I de la proteína recombinante GAL4 producida por *E. coli* a partir del gen GAL4 de levadura mostró que la proteína GAL4 se une a las secuencias UAS_{GAL}. Cuando se clonó una copia de UAS_{GAL} en dirección 5' de una caja TATA seguida por un gen indicador *lacZ*, la expresión de *lacZ* se activó en un medio con galactosa en células de tipo silvestre, pero no en los mutantes *gal4*. Estos resultados mostraron que la UAS_{GAL} es un elemento de control de la transcripción activado por la proteína GAL4 en un medio con galactosa.

Un notable conjunto de experimentos con mutantes con deleciones *gal4* demostró que el factor de transcripción GAL4 está compuesto de dominios funcionales separables: un dominio de unión al DNA N-terminal, que se une a secuencias específicas de DNA y un dominio de activación C-terminal, que interactúa con otras proteínas para estimular la transcripción a partir de un promotor cercano (fig. 11-17). Cuando el dominio N-terminal de unión al DNA de GAL4 se fu-

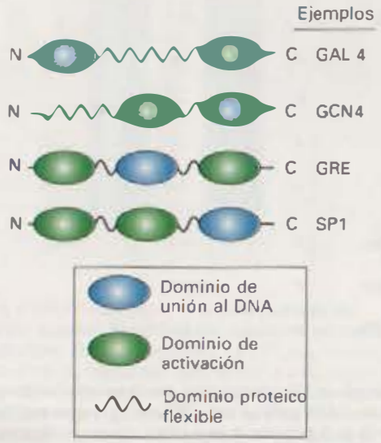


▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 11-17 Los mutantes con deleciones del gen GAL4 en la levadura con una construcción UAS_{GAL} del gen indicador demuestran los dominios funcionales separados en un activador.** (a) Diagrama de una construcción de DNA que contiene un gen indicador *lacZ* y una caja TATA ligada al UAS_{GAL}, un elemento regulador que contiene varios sitios de unión para GAL4. Las construcciones del gen indicador y el DNA que codifica GAL4 de tipo silvestre o mutante (eliminado) fueron introducidas simultáneamente en células de levadura mutantes (*gal4*) y se analizó la actividad de la β-galactosidasa expresada a partir de *lacZ*. La actividad será más alta si el DNA *GAL4* introducido codifica una proteína funcional. (b) Diagramas esquemáticos de GAL4 de tipo silvestre y diversas formas mutantes. Los números pequeños se refieren a las posiciones en la secuencia de tipo silvestre. Las deleciones (eliminaciones) de 50 aminoácidos del N-terminal anularon la capacidad de GAL4 para unirse a la UAS_{GAL} y para estimular la expresión de la β-galactosidasa a partir del gen indicador. Las proteínas con deleciones extensas en el C-terminal aún se unen a la UAS_{GAL}. Estos resultados localizan el dominio de unión al DNA en el N-terminal de la GAL4. La capacidad para activar la expresión de la β-galactosidasa no se elimina totalmente a menos que se suprima alguna región comprendida entre los aminoácidos 126-189 o más a partir del C-terminal. Por lo tanto, el dominio de activación se ubica en la región C-terminal de la GAL4. Las proteínas con deleciones internas (*abajo*) también estimularon la expresión de β-galactosidasa, lo que indica que la región central de la GAL4 no es crucial para su función en este ensayo. (Véase J. Ma y M Ptashne, 1987, Cell 48:847; I. A. Hope y K. Struhl, 1986, Cell 46:885; y R. Brent y M. Ptashne, 1985, Cell 43:729.)

sionaba directamente a varios de sus fragmentos C-terminales, las proteínas truncadas resultantes retuvieron la capacidad para estimular la expresión de un gen indicador en un ensayo in vivo como el que se representa en la figura 11-16. Por lo tanto, la porción interna de la proteína no es necesaria para que GAL4 funcione como factor de transcripción. Experimentos similares con otro factor de transcripción de levadura, el GCN4, que regula los genes necesarios para la síntesis de muchos aminoácidos, indicaron que contiene un dominio de unión al DNA de ≈60-aa en su extremo C-terminal y un dominio de activación de ≈20-aa cerca de la mitad de su secuencia.

Evidencias adicionales de la existencia de distintos dominios de activación en GAL4 y GCN4 provinieron de experimentos en los cuales sus dominios de activación se fusionaron a un dominio de unión al DNA de una proteína de unión al DNA de *E. coli* no relacionada. Cuando se analizaron in vivo estas proteínas fusionadas, activaron la transcripción de un gen indicador que contenía el sitio afín para la proteína de *E. coli*. Por consiguiente, se pueden construir factores de transcripción funcionales a partir de combinaciones totalmente novedosas de elementos procariontes y eucariontes.

Se están llevando a cabo estudios como éstos con muchos activadores eucariontes. El modelo estructural de los activadores eucariontes que emergió de estos estudios es uno modular en el cual uno o más dominios de activación están conectados a un dominio de unión al DNA específico de secuencia a través de dominios proteicos flexibles (fig. 11-18). En algunos casos, los aminoácidos incluidos en el dominio de unión al DNA también contribuyen a la activación transcripcional. Como se tratará en una sección posterior, se piensa



▲ Fig. 11-18. Esquemas que ilustran la estructura modular de los activadores de la transcripción en los eucariontes. Estos factores de transcripción pueden contener más de un dominio de activación, pero rara vez contienen más de un dominio de unión al DNA. GAL4 y GCN4 son activadores de la transcripción de levadura. El receptor glucocorticoide (GRE) promueve la transcripción de genes diana cuando ciertas hormonas están unidas al dominio de activación del C-terminal. SP1 se une a los elementos promotores ricos en GC en gran número de genes de mamífero.

que los dominios de activación funcionan uniendo otras proteínas partícipes de la transcripción. La presencia de dominios flexibles que conectan los dominios de unión al DNA puede explicar por qué las alteraciones del espaciamiento entre los elementos de control son tan bien toleradas en las regiones de control en los eucariontes. Por lo tanto, aun cuando se cambien las posiciones de los factores de transcripción unidos al DNA en relación con los otros, sus dominios de activación pueden interactuar porque están unidos a sus dominios de unión al DNA mediante regiones proteicas flexibles.

Los represores son la inversa funcional de los activadores

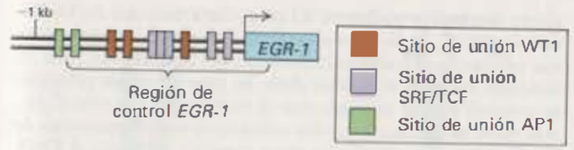
La transcripción eucarionte está regulada por represores al igual que por activadores. Por ejemplo, los genetistas han identificado mutaciones en levadura que producen una expresión continuamente elevada de ciertos genes. Este tipo de expresión anormalmente elevada y desregulada se denomina expresión constitutiva y es el resultado de la inactivación de un represor que suele inhibir la transcripción de estos genes. De manera similar, se aislaron mutantes de *Drosphila* y *C. elegans* que son defectuosos en el desarrollo embrionario debido a que expresan genes en células embrionarias donde normalmente están reprimidos. Las mutaciones en estos mutantes inactivan represores, lo que conduce a un desarrollo anormal.

Los sitios de unión a represores en el DNA han sido identificados mediante análisis sistemático de mutaciones rastreadoras de ligadores similar al representado en la figura 11-10. En este tipo de análisis, la mutación de un sitio de unión de un activador conduce a una disminución de la expresión del gen indicador ligado, mientras que la mutación de un sitio de unión de un represor conduce a un aumento de la expresión de un gen indicador. Las proteínas represoras que se unen a esos sitios pueden ser purificadas y analizadas empleando las mismas técnicas bioquímicas descritas para las proteínas activadoras.

Los represores de la transcripción eucariontes son los opuestos funcionales de los activadores. Pueden inhibir la transcripción de un gen que normalmente no regulan cuando sus sitios de unión afines se ubican dentro de unos pocos cientos de pares de bases del sitio de inicio del gen. Al igual que los activadores, la mayoría de los represores eucariontes son proteínas modulares que tienen dos dominios funcionales: un dominio de unión al DNA y un dominio de represión. De manera similar al de los dominios de activación, los dominios de represión continúan funcionando cuando se fusionan a otro tipo de dominio de unión al DNA. Si los sitios de unión para este segundo dominio de unión al DNA se insertan dentro de unos pocos cientos de pares de bases de un promotor, la expresión de la proteína fusionada inhibe la transcripción a partir del promotor. También al igual que los dominios de activación, los dominios de represión funcionan en interacción con otras proteínas, como se verá más adelante.

MEDICINA

La ausencia de una actividad represora apropiada puede tener consecuencias devastadoras. Por ejemplo, la proteína codificada por el gen del *tumor de Wilms' (WT1)* es un represor que se expresa principalmente en el riñón en desarrollo. Los niños que heredaron las mutaciones tanto en el gen *WT1* materno como en el paterno, de manera tal que no producen proteínas WT1 funcionales, in-



▲ Fig. 11-19. Diagrama de la región de control del gen que codifica EGR-1, un activador transcripcional. Los sitios de unión para el WT1, una proteína represora eucarionte, no se solapan con los sitios de unión para el activador AP1 o el sitio de unión compuesto para los activadores SRF y TCF. Por ende, la represión por WT1 no implica interferencia directa con la unión de otras proteínas como en el caso de los represores bacterianos.

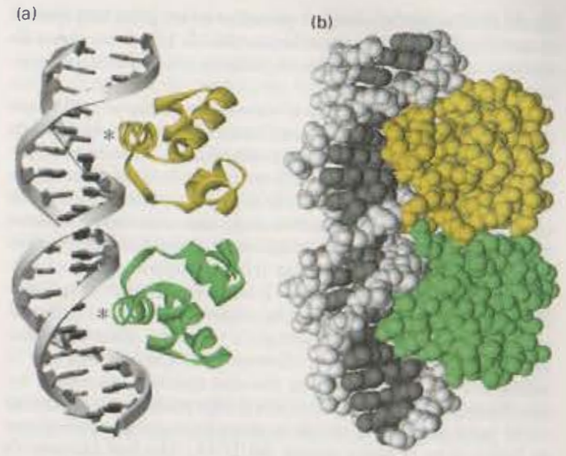
variablemente desarrollan tumores renales en los inicios de su vida. La proteína WT1 se une a la región de control del gen que codifica un activador de la transcripción denominado EGR-1 (fig. 11-19). Este gen, al igual que muchos otros genes eucariontes, está sujeto tanto a la represión como a la activación. La unión de WT1 reprime la transcripción del gen *EGR-1* sin inhibir la unión de los activadores que suelen estimular la expresión de este gen. ∎

Los dominios de unión al DNA pueden clasificarse en varios tipos estructurales

Los dominios de unión de los activadores y represores eucariontes contienen diversos motivos estructurales que unen secuencias de DNA específicas. Por lo general, la capacidad de las proteínas de unión al DNA para unirse a secuencias específicas de DNA es resultado de las interacciones no covalentes entre átomos en una hélice α en el dominio de unión al DNA y átomos en los bordes de las bases dentro de un surco mayor del DNA. También contribuyen a la unión las interacciones con los átomos de la columna de azúcares fosfatos y, en algunos casos, con átomos de un surco menor del DNA.

Los principios de las interacciones específicas entre el DNA y la proteína se descubrieron durante el estudio de los represores bacterianos. Muchos de estos represores son proteínas diméricas en las cuales una hélice α de cada monómero se inserta en un surco mayor en la hélice de DNA (fig. 11-20). Esta hélice α se denomina *hélice de reconocimiento* o *hélice de lectura de secuencia* porque la mayoría de las cadenas laterales de aminoácidos que están en contacto con el DNA se extienden desde esta hélice. La hélice de reconocimiento que se proyecta desde la superficie de los represores bacterianos para penetrar en un surco mayor del DNA y realizar múltiples interacciones específicas con átomos en el DNA suele sustentarse en la estructura proteica debido en parte a las interacciones hidrófobas con una segunda hélice α hacia el N-terminal de ella. Este elemento estructural, presente en muchos represores bacterianos, se denomina motivo *hélice-giro-hélice* (*helix-turn-helix*).

Muchos motivos adicionales que pueden presentar una hélice α al surco mayor de DNA se encuentran en factores de transcripción eucariontes, los cuales suelen clasificarse de acuerdo con el tipo de dominio de unión al DNA que contienen. Como la mayoría de estos motivos tienen secuencias aminoacídicas consenso características, los factores de trans-



▲ Fig. 11-20. Interacción del represor 434 del bacteriófago con el DNA. (a) Diagrama de cintas del represor 434 unido a su DNA operador específico. Los monómeros represores están en amarillo y verde. Las hélices de reconocimiento se indican con asteriscos. Un modelo tridimensional del complejo operador-represor (b) muestra cómo la proteína interactúa íntimamente con un lado de la molécula de DNA en una longitud de 1,5 giros. (Adaptado de A. K. Aggarwal et al., 1988, Science 242:889.)

cripción recién caracterizados pueden ser clasificados una vez que el gen correspondiente o el cDNA haya sido clonado y secuenciado. Los genomas de los eucariontes superiores codifican docenas de clases de dominios de unión al DNA y de cientos a miles de factores de transcripción. El genoma humano, por ejemplo, codifica ≈2000 factores de transcripción.

Aquí introducimos varias clases comunes de proteínas de unión al DNA cuyas estructuras tridimensionales han sido determinadas. En todos estos ejemplos y en muchos otros factores de transcripción, al menos una hélice α se inserta en un surco mayor del DNA. Sin embargo, algunos factores de transcripción contienen motivos estructurales alternativos (p. ej., hebras β y bucles) que interactúan con el DNA.

Proteínas con homeodominio. Muchos factores de transcripción eucariontes que funcionan durante el desarrollo contienen un motivo de unión al DNA de 60 residuos conservados que es similar al motivo hélice-giro-hélice de los represores bacterianos. Denominadas proteínas con homeodominio, estos factores de transcripción se identificaron por primera vez en los mutantes de *Drosophila* en los cuales una parte del cuerpo se transformó en otra durante el desarrollo (cap. 15). La secuencia homeodominio conservada también se encontró en los factores de transcripción de vertebrados, incluidos los que tienen funciones de control importantes similares en el desarrollo humano.

Proteínas con dedos de cinc. Diversas proteínas eucariontes tienen regiones que se pliegan alrededor de un ion de Zn^{2+} central, lo que produce un dominio compacto a partir de un segmento relativamente corto de la cadena polipeptídica. Denominado dedo de cinc, este motivo estructural fue reconocido por primera vez en los dominios de unión al DNA, pero

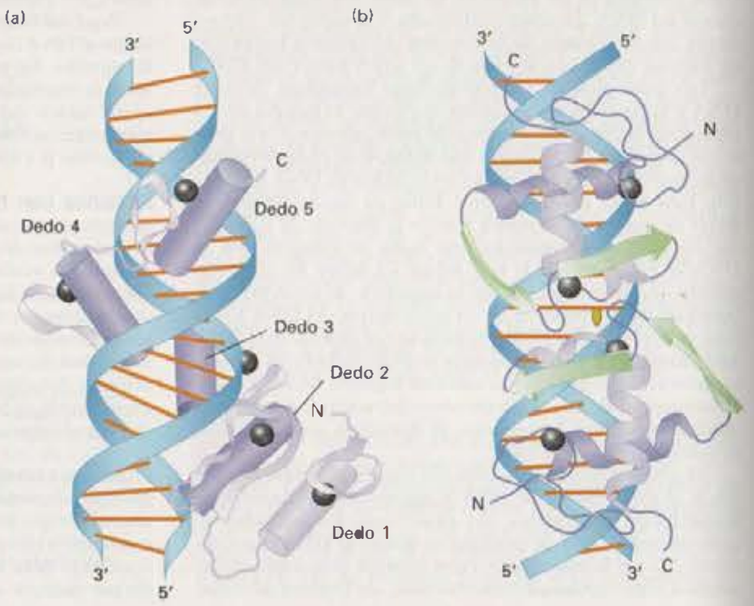
ahora se sabe que también se presenta en las proteínas que no se unen al DNA. Aquí describimos dos de las varias clases de motivos de dedo de cinc identificadas en los factores de transcripción eucariontes.

El *dedo de cinc* C_2H_2 es el motivo de unión al DNA más común codificado en el genoma humano y en los genomas de la mayoría de otros animales multicelulares. También es común en las plantas multicelulares, pero no es el tipo dominante de dominio de unión al DNA en las plantas como sí lo es en los animales. Este motivo tiene una secuencia consenso de 23 a 26 residuos que contienen dos residuos de cisteína (C) y dos residuos de histidina (H) conservados, cuyas cadenas laterales unen un ion Zn^{2+} (véase fig. 3-6b). El nombre "dedo de cinc" se acuñó debido a que un diagrama bidimensional de la estructura se asemeja a un dedo. Cuando se pudo resolver la estructura tridimensional, quedó claro que la unión del ion Zn^{2+} mediante los dos residuos cisteína y los dos histidina pliega la secuencia polipeptídica relativamente corta para formar un dominio compacto que puede insertar su hélice α en el surco mayor del DNA. Muchos factores de transcripción contienen múltiples dedos de cinc C_2H_2, que interactúan con grupos sucesivos de pares de bases, dentro del surco mayor, a medida que la proteína se enrosca alrededor de la doble hélice de DNA (fig. 11-21a).

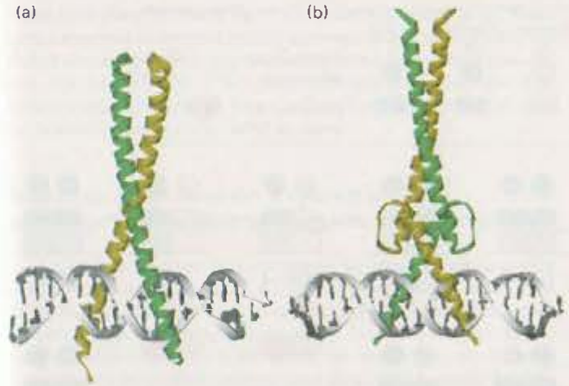
Un segundo tipo de estructura dedo de cinc, designada *dedo de cinc de* C_4 (porque tiene cuatro cisteínas conservadas en contacto con el Zn^{2+}), se encuentra en ≈50 factores de transcripción humanos. Los primeros miembros de esta clase se identificaron como proteínas de unión de alta afinidad intracelulares específicas, o "receptores", para las hormonas esteroides, lo que condujo a que recibieran el nombre de *superfamilia de receptores esteroides*. Como luego se hallaron receptores intracelulares similares para las hormonas no esteroides, estos factores de transcripción suelen denominarse ahora **receptores nucleares**. El rasgo característico de los dedos de cinc C_4 es la presencia de dos grupos de cuatro cisteínas críticas, una hacia cada extremo del dominio de 55 o 56 residuos. Aunque el motivo dedo de cinc C_4 en un principio se nombró así por analogía con el motivo dedo de cinc C_2H_2, más tarde se encontró que las estructuras tridimensionales de las proteínas que contenían estos motivos de unión al DNA eran bastante diferentes. Una diferencia particularmente importante entre ambos es que las proteínas con dedo de cinc C_2H_2 suelen contener tres o más unidades repetitivas de dedos y se fijan como monómeros, mientras que las C_4 generalmente contienen casi siempre sólo dos unidades de dedos y se unen al DNA como homodímeros o heterodímeros. Los homodímeros de dominios de unión al DNA dedo de cinc C_4 poseen simetría rotacional doble (fig. 11-21b). En consecuencia, los receptores nucleares homodiméricos se unen a secuencias de DNA consenso que son repeticiones invertidas.

Proteínas con cremallera de leucina. Otro motivo estructural presente en los dominios de unión al DNA de una gran clase de factores de transcripción contiene el aminoácido hidrófobo leucina en cada séptima posición en la secuencia. Estas proteínas se unen al DNA como dímeros y la mutagénesis de las leucinas mostró que eran necesarias para la dimerización. Por lo tanto, se acuñó el nombre cremallera de leucina para denotar este motivo estructural.

El dominio de unión al DNA del factor de transcripción GCN4 de levadura antes mencionado es un dominio de cremallera de leucina. El análisis cristalográfico de rayos X de complejos entre el DNA y el dominio de unión al DNA de GCN4 permitió comprobar que la proteína dimérica contiene dos hélices α extendidas que "agarran" la molécula de DNA, de manera muy similar a la de una tijera, en dos surcos mayores adyacentes separados por alrededor de medio giro de la doble hélice (fig 11-22a). Las porciones de las hélices α que toman contacto con el DNA incluyen los residuos cargados positivamente (básicos) que interactúan con los fosfatos de la estructura del DNA y residuos adicionales que interactúan con bases específicas en el surco mayor.



▶ **Fig. 11-21. Interacción entre el DNA y las proteínas que contienen dedos de cinc.** (a) La GL1 es una proteína monomérica que contiene cinco dedos de cinc C_2H_2. Las hélices α se muestran como cilindros, los iones Zn^{2+} como esferas. El dedo 1 no interactúa con el DNA, mientras que los otros cuatro dedos sí lo hacen. (b) El receptor glucocorticoide es una proteína homodimérica con dedos de cinc C_4. Las hélices α se muestran como cintas violetas, las hebras β como flechas verdes, los iones de Zn^{2+} como esferas. Dos hélices α (cintas violetas oscuras), una en cada monómero, interactúan con el DNA. Al igual que todos los homodímeros con dedos de cinc C_4, este factor de transcripción tiene una simetría rotacional doble; el centro de simetría está señalado por la elipse amarilla. En cambio, los receptores nucleares heterodiméricos no presentan simetría rotacional. (Véase N. P. Pavletich y C. O. Pabo, 1993, Science 261:1701, y B. F. Luisi et al., 1991, Nature 352:497.)



▲ **Fig. 11-22. Interacción de la proteína con cremallera de leucina homodimérica y la proteína con hélice-bucle-hélice básica (bHLH), con DNA.** (a) En las proteínas con cremallera de leucina, los residuos básicos en las regiones α-helicoidales extendidas de los monómeros interactúan con el esqueleto de DNA en dos surcos mayores adyacentes. El dominio de dimerización de la espiral enrollada se estabiliza mediante interacciones hidrófobas entre los monómeros. (b) En las proteínas bHLH, las hélices de unión al DNA en la parte inferior (N-terminal de los monómeros) están separadas por bucles no helicoidales de una región de tipo cremallera de leucina que contiene un dominio de dimerización de espiral enrollada. [Parte (a) véase T. E. Ellenberger et al., 1992, Cell 71:1223; parte (b) véase A. R. Ferre-D'Amare et al., 1993, Nature 363:38.]

El GCN4 forma dímeros a través de interacciones hidrófobas entre las regiones C-terminales de las hélices α y forman una estructura de espiral enrollada. Esta estructura es común en las proteínas que contienen hélices α anfipáticas en las cuales los residuos de aminoácidos hidrófobos están regularmente espaciados, se encuentran separados de manera alternativa por tres o cuatro posiciones de distancia en la secuencia y forman una franja hacia abajo y a un lado de la hélice α. Estas franjas hidrófobas constituyen las superficies de interacción entre los monómeros α-helicoidales en el dímero de espiral enrollada (véase fig. 3-6c).

Aunque los primeros factores de transcripción con cremallera de leucina en ser analizados contenían residuos de leucina en cada séptima posición en la región de dimerización, luego se identificaron proteínas de fijación al DNA adicionales que contenían otros aminoácidos hidrófobos en estas posiciones. Al igual que las proteínas con cremallera de leucina, éstas forman dímeros que contienen una región de dimerización C-terminal de espiral enrollada y un dominio de unión al DNA N-terminal. El término *cremallera básica (bZip)* se utiliza ahora para referirse a todas las proteínas con estas características estructurales en común. Muchos factores de transcripción con cremallera básica son heterodímeros de dos cadenas polipeptídicas diferentes, cada una con un dominio de cremallera básico.

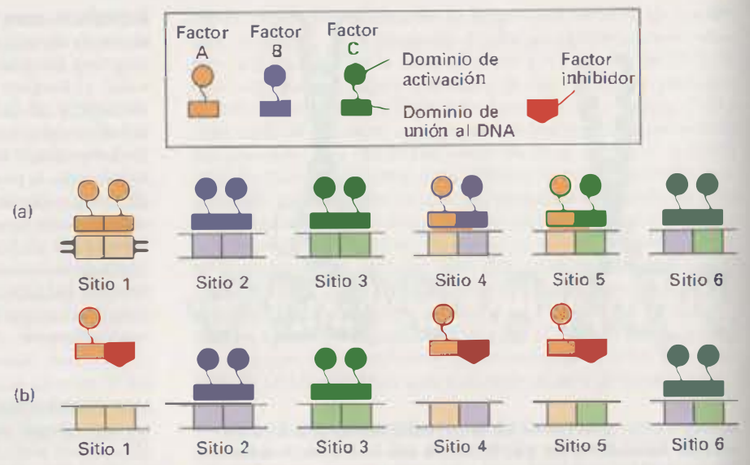
Proteínas con hélice-bucle-hélice básico (bHLH). El dominio de unión al DNA de otra clase de factores de transcripción diméricos contiene un motivo estructural muy similar al motivo de cremallera básica excepto que un bucle no helicoidal de la cadena polipeptídica separa dos regiones α-helicoidales en cada monómero (fig. 11-22b). Denominado **hélice-bucle-hélice básico** (*basic helix-loop-helix*, **bHLH**), este motivo se predijo a partir de las secuencias de aminoácidos de estas proteínas, que contienen una hélice α N-terminal con residuos básicos que interactúan con el DNA, una región intermedia de bucle y una región C-terminal con aminoácidos hidrófobos espaciados a intervalos característicos de una hélice α anfipática. Al igual que con las proteínas con cremallera básica, las diferentes proteínas bHLH pueden formar heterodímeros.

Las interacciones del factor de transcripción incrementan las opciones del control génico

Dos tipos de proteínas de unión al DNA comentadas en la sección anterior –las proteínas con cremallera básica y las proteínas con bHLH– a menudo existen en combinaciones heterodiméricas de monómeros. Otras clases de factores de transcripción no considerados aquí también forman proteínas heterodiméricas. En algunos factores de transcripción heterodiméricos, cada monómero tiene un dominio de unión al DNA con especificidad de secuencia equivalente. En estas proteínas, la formación de heterodímeros alternativos no influye en la especificidad de unión al DNA, sino que, por el contrario, permite que los dominios de activación asociados con cada monómero se junten en combinaciones alternativas en un único factor de transcripción. Como veremos luego y en capítulos posteriores, las actividades de los factores de transcripción individuales pueden estar reguladas por múltiples mecanismos. En consecuencia, un único elemento regulador de DNA bZIP o bHLH en la región de control de un gen puede suscitar diferentes respuestas transcripcionales según cuáles monómeros bZIP o bHLH que se unan a ese sitio se expresen en una célula en un momento determinado y cómo están reguladas sus actividades.

Sin embargo, en algunos factores de transcripción heterodiméricos cada monómero tiene una especificidad de unión al DNA diferente. Las posibilidades combinatorias resultantes incrementan el número de posibles secuencias de DNA que una familia de factores transcripcionales puede unir. En teoría, tres diferentes factores monoméricos podrían combinarse para formar seis factores homo y heterodiméricos, como se ilustra en la figura 12-23a. Cuatro factores monoméricos diferentes podrían formar un total de 10 factores diméricos; 5 monómeros, 16 factores diméricos y así sucesivamente. Además, se sabe que los factores inhibidores que se unen a algunos monómeros con bHLH y con cremallera básica bloquean por lo tanto su unión al DNA. Cuando estos factores inhibidores se expresan, reprimen la activación transcripcional mediante los factores con los cuales interactúan (fig. 11-23b). Las reglas que gobiernan las interacciones de los miembros de una clase de factores de transcripción heterodiméricos son complejas. Esta complejidad combinatoria expande tanto el número de sitios de DNA a partir de los cuales estos factores pueden activar la transcripción como las formas en las cuales pueden regularse.

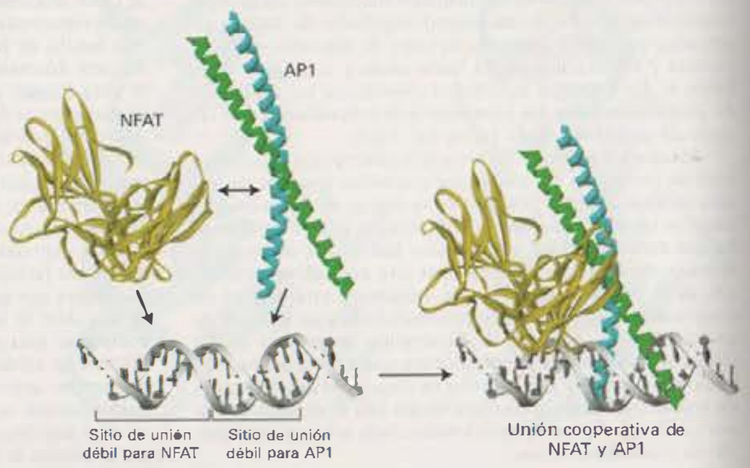
Una regulación transcripcional combinatoria similar se logra mediante la interacción de factores de transcripción es-



▲ Fig. 11-23. Combinaciones posibles por la formación de factores de transcripción heterodiméricos. (a) En el ejemplo hipotético que se muestra, todos los factores de transcripción A, B y C pueden interactuar entre sí, lo que permite que los tres factores se unan a seis secuencias de DNA diferentes (sitios 1–6) y creen seis combinaciones de dominios de activación. Cada sitio de unión compuesto se divide en dos hemisitios y cada factor heterodimérico contiene los dominios de activación de sus dos monómeros constituyentes. (b) La expresión de un factor inhibidor (rojo) que interactúa sólo con el factor A inhibe su unión; por lo tanto la activación transcripcional en los sitios 1, 4 y 5 está inhibida, pero la activación en los sitios 2, 3 y 6 no se ve afectada.

tructuralmente no relacionados unidos a sitios de unión estrechamente espaciados en el DNA. Un ejemplo es la interacción de dos factores de transcripción, el NFAT y el AP1, que se unen a sitios circundantes en un elemento proximal al promotor que regulan el gen que codifica la interleucina-2 (IL-2). La expresión del gen *IL2* es crítica para la respuesta inmune, pero la expresión anormal de la IL-2 puede derivar en enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoidea. Ni el NFAT ni el AP1 se unen a su sitio en la región de control de la *IL-2* en la ausencia del otro. Las afinidades de los factores para estas secuencias de DNA particulares son demasiado bajas para que los factores individuales formen un complejo estable con el DNA. Sin embargo, cuando tanto el NFAT como el AP1 están presentes, las interacciones proteína-proteína entre ellos estabilizan el complejo ternario de DNA compuesto por NFAT, AP1 y DNA (fig. 11-24). Esta unión *cooperativa al DNA* de diversos factores de transcripción dio como resultado una considerable complejidad combinatoria del control de la transcripción. Como resultado, los aproximadamente 2000 factores de transcripción codificados en el genoma humano pueden unirse al DNA a través de un número mayor de interacciones cooperativas, lo que da como resultado un control transcripcional único para cada una de las diversas decenas de miles de genes humanos. En el caso de la *IL-2*, la transcripción tiene lugar sólo cuando se activan ambos NFAT, dando como resultado su transporte desde el citoplasma al núcleo y se sintetizan las dos subunidades de AP1. Estos eventos son controlados por diferentes vías de transducción (caps. 13 y 14) y permiten un control estricto de la expresión del IL-2.

La unión cooperativa de NFAT y AP1 ocurre sólo cuando sus débiles sitios de unión se localizan a una distancia precisa, bastante cerca entre sí en el DNA. Estudios recientes han mostrado que los requerimientos para la unión cooperativa no son demasiado estrictos en el caso de algunos otros factores de transcripción y regiones de control. Por ejemplo, la región de control *EGR-1* contiene un sitio de unión compuesto al cual los factores de transcripción SRF y TCF se unen



▶ Fig. 11-24. Unión cooperativa de dos factores de transcripción no relacionados a sitios vecinos en un elemento de control compuesto. Por sí mismos, tanto el factor de transcripción NFAT monomérico como el AP1 heterodimérico tienen baja afinidad por sus respectivos sitios de unión en la región proximal del promotor *IL-2*. Las interacciones proteína–proteína entre el NFAT y el AP1 contribuyen a la estabilidad general del complejo NFAT-AP1-DNA, de manera tal que las dos proteínas se unen cooperativamente al sitio compuesto. (Véase L. Chen et al., 1998, Nature 392:42.)

cooperativamente (véase fig. 11-19). Debido a que el TCF tiene un extenso dominio flexible que interactúa con el SRF, las dos proteínas pueden unirse cooperativamente cuando sus sitios individuales en el DNA están separados por cualquier distancia hasta 10 pares de bases o cuando están invertidas una en relación con la otra.

Dominios de activación y represión estructuralmente diversos regulan la transcripción

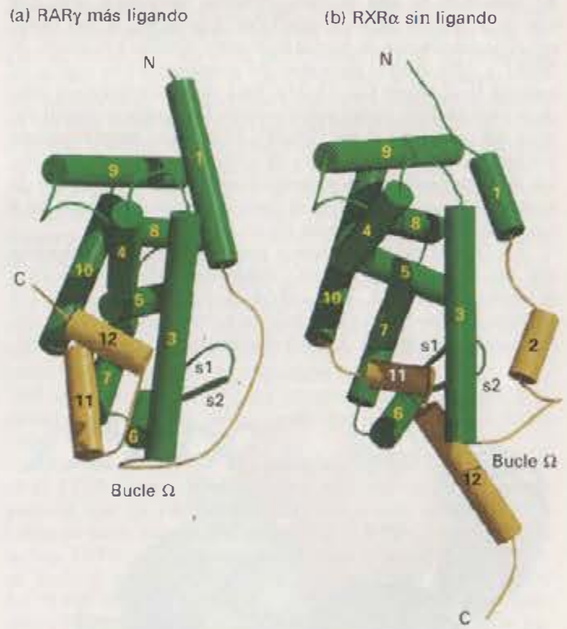
Los experimentos con proteínas fusionadas compuestas del dominio de unión al DNA GAL4 y segmentos aleatorios de proteínas de *E. coli* demostraron que un grupo diverso de secuencias de aminoácidos puede funcionar como dominios de activación, ~1% de todas las secuencias de *E. coli*, a pesar de que evolucionaron para desarrollar otras funciones. Muchos factores de transcripción contienen dominios de activación marcados por un porcentaje inusualmente alto de aminoácidos en particular. GAL4, GCN4 y la mayoría de los otros factores de transcripción, por ejemplo, tienen dominios de activación ricos en aminoácidos acídicos (ácidos aspártico y glutámico). Estos *dominios de activación acídicos* pueden estimular la transcripción en casi todos los tipos de células eucariontes: fúngicas, animales y vegetales. Los dominios de activación de algunos factores de transcripción de *Drosophila* y de mamíferos son ricos en glutamina; algunos son ricos en prolina; incluso otros son ricos en los aminoácidos estrechamente relacionados serina y treonina, los cuales tienen grupos hidroxilo. Sin embargo, algunos dominios de activación no son ricos en algún aminoácido específico.

Los estudios biofísicos indican que los dominios de activación acídicos tienen una conformación desestructurada de enrollamiento al azar. Estos dominios estimulan la transcripción cuando están unidos a una proteína *coactivadora*. La interacción con un coactivador hace que el dominio de activación asuma una conformación α-helicoidal más estructurada en el complejo coactivador-dominio de activación. Un ejemplo bien estudiado de un factor de transcripción con un dominio de activación acídico es la proteína CREB de mamífero, la cual es fosforilada en respuesta a niveles aumentados de cAMP. Se requiere esta fosforilación regulada para que CREB se una a su coactivador CBP (CREB *b*inding *p*rotein), lo que da como resultado la transcripción de genes cuyas regiones de control contienen un sitio de unión a CREB (véase fig 13-32). Cuando el dominio de activación, enrollado al azar, fosforilado de CREB interactúa con CBP, sufre un cambio de conformación para formar dos hélices α que se enroscan alrededor del dominio de interacción de la CBP.

Algunos dominios de activación son más grandes y están más estructurados que los dominios de activación acídicos. Por ejemplo, los dominios de unión al ligando de los receptores nucleares funcionan como dominios de activación cuando fijan su ligando específico (fig. 11-25). La fijación de ligandos induce un gran cambio de conformación que permite que el dominio de unión al ligando con la hormona unida interactúe con una hélice α corta en los coactivadores del receptor nuclear; el complejo resultante puede luego activar la transcripción de genes cuyas regiones de control unen el receptor nuclear.

Por lo tanto, el dominio de activación acídico en CREB y los dominios de activación de unión al ligando en los receptores nucleares representan dos extremos estructurales. El dominio de activación acídico CREB es un enrollamiento al azar que se pliega en dos hélices α cuando se une a la superficie de un dominio globular en un coactivador. Por el contrario, el dominio de activación de unión al ligando del receptor nuclear es un dominio globular estructurado que interactúa con una hélice α corta en un coactivador, que probablemente es un enrollamiento al azar antes de que esté unido. Sin embargo, en ambos casos las interacciones específicas entre proteína y proteína entre los coactivadores y los dominios de activación permiten que los factores de transcripción estimulen la expresión génica.

Actualmente se sabe menos acerca de la estructura de los dominios de represión. Los dominios globulares de unión al ligando de algunos receptores nucleares funcionan como dominios de represión en ausencia de su ligando hormona específico (véase fig. 11-25b). Al igual que los dominios de activación, los de represión pueden ser relativamente cortos y comprenden 15 aminoácidos o menos. Los estudios bioquí-



▲ Fig. 11-25. Efecto de la unión del ligando sobre la conformación de los dominios de activación de unión al ligando en dos receptores nucleares humanos relacionados. Los cilindros representan hélices α. Las regiones que no sufren un cambio significativo en la conformación luego de la unión del ligando se muestran en verde; las regiones que sí lo hacen, en amarillo. (a) Dominio de unión al ligando del monómero RARγ humano cuando se une a su ligando, ácido todo-*trans* retinoico. En esta conformación bastante compacta, el RARγ puede estimular la transcripción. (b) Dominio de unión al ligando del monómero RXRα en ausencia de su ligando, el ácido retinoico 9-*cis*. Como se tratará luego, RXR se asocia con varios monómeros de receptor nuclear diferentes (p. ej., RAR) y forma factores de transcripción heterodiméricos. (De J. M. Wurtz et al., 1996, Nature Struc. 3:87; cortesía de Hinrich Gronemeyer.)

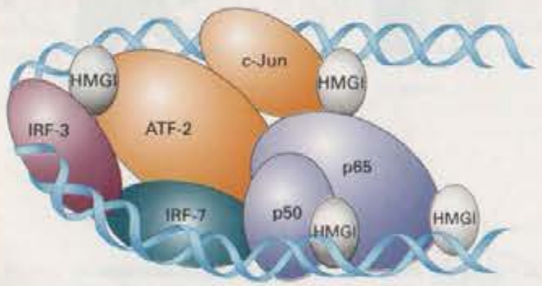
micos y genéticos indican que los dominios de represión también median las interacciones proteína-proteína y se unen a proteínas *correpresoras*, formando un complejo que inhibe la iniciación de la transcripción mediante mecanismos que se verán más adelante en este capítulo.

Los complejos multiproteicos se forman sobre los amplificadores

Como ya se notó, los amplificadores suelen tener una longitud que oscila entre 50 y 200 pares de bases e incluye sitios de unión para varios factores de transcripción. Se piensa que los múltiples factores de transcripción que se unen a un único amplificador interactúan. Los análisis del amplificador de ≈70 bp que regula la expresión del interferón β, una proteína importante en la defensa contra las infecciones virales en los seres humanos, proporcionan un buen ejemplo de esas interacciones de los factores de transcripción. El amplificador del interferón β contiene cuatro elementos de control que unen cuatro factores de transcripción simultáneamente. En presencia de una pequeña proteína abundante asociada con la cromatina denominada *HMGI*, la unión de los factores de transcripción es muy cooperativa, similar a la unión de NFAT y AP1 al sitio proximal del promotor en la región de control *IL-2* (véase fig. 11-24). Esta unión cooperativa produce un complejo multiproteico sobre la secuencia amplificadora del interferón β (fig. 11-26). El término amplificosoma (*enhancesome*) se acuñó para describir esos grandes complejos nucleoproteicos que se ensamblan a partir de factores de transcripción a medida que se unen de manera cooperativa a sus múltiples sitios de unión en un amplificador.

La HMGI se une al surco menor del DNA cualquiera que sea la secuencia y, como resultado, curva agudamente la molécula de DNA. Esta curvatura del DNA amplificador permite que los factores de transcripción unidos interactúen de manera apropiada. Las interacciones no covalentes proteína-proteína, intrínsecamente débiles, entre los factores de transcripción se fortalecen mediante su unión a sitios de DNA vecinos, lo que mantiene a las proteínas en concentraciones relativamente muy altas.

Debido a la presencia de regiones flexibles que conectan los dominios de unión al DNA y los dominios de activación o represión en los factores de transcripción (véase fig. 11-18) y la capacidad de unir proteínas para curvar el DNA, se permite un margen considerable de separación entre los elementos reguladores en las regiones de control de la transcripción. Esta propiedad probablemente contribuyó a la rápida evolución del control génico en los eucariontes. La transposición de las secuencias de DNA y la recombinación entre secuencias repetidas a lo largo del tiempo evolutivo probablemente crearon nuevas combinaciones de elementos de control que fueron sometidas a selección natural y retenidas si probaban que eran beneficiosas. La amplitud de separación entre los elementos reguladores habría permitido que se sometieran a esta experimentación evolutiva muchas más combinaciones funcionales que las que serían sometidas si la restricción en el espaciamiento entre los elementos reguladores fuese estricta.



▲ **Fig. 11-26. Modelo del amplificosoma que se forma sobre el amplificador del interferón β.** Dos factores de transcripción monoméricos, IRF-3 e IRF-7, y dos factores heterodiméricos, Jun/ATF-2 y p50/p65 (NF-κB) se unen a los cuatro elementos de control en este amplificador. La unión cooperativa de estos factores de transcripción es facilitada por el HMGI, que se une al surco menor del DNA y también interactúa directamente con los factores diméricos. La curvatura de la secuencia amplificadora debida a la unión de HMGI es decisiva para la formación de un amplificosoma. Diferentes proteínas de unión al DNA actúan de manera similar a otros amplificadores. (Adaptado de D. Thanos y T. Maniatis, 1995, Cell 83:1091 y M. A. Wathel et al., 1998, Mol. Cell. 1:507.)

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 11.3

Activadores y represores de la transcripción

- En el DNA eucarionte, los factores de transcripción, que estimulan o reprimen la transcripción, se unen a elementos reguladores proximales del promotor y a amplificadores.
- Los represores y activadores transcripcionales son casi siempre proteínas modulares que contienen un único dominio de unión al DNA y uno o unos pocos dominios de activación (para los activadores) o dominios de represión (para los represores). Los diferentes dominios suelen conectarse a través de regiones polipeptídicas flexibles (véase fig. 11.18).
- Entre los motivos estructurales hallados con mayor frecuencia en los dominios de unión al DNA de los factores de transcripción eucariontes, se encuentran el dedo de cinc C_2H_2, el homeodominio, hélice-bucle-hélice básico (bHLH) y la cremallera básica (cremallera de leucina). Todos estos motivos de unión al DNA y muchos otros contienen una o más hélices α que interactúan con los surcos mayores en su sitio afín en el DNA.
- Las regiones de control transcripcional de la mayoría de los genes contienen sitios de unión para múltiples factores de transcripción. La transcripción de estos genes varía de acuerdo con el repertorio particular de factores de transcripción que se expresan y se activan en una célula dada en un momento particular.
- La complejidad combinatoria en el control de la transcripción es el resultado de las combinaciones alternativas de monómeros que forman factores de transcripción heterodiméricos (véase fig. 11-23) y a partir de la unión cooperativa de los factores de transcripción para componer sitios de control (véase fig. 11-24).
- Los dominios de activación y represión en los factores de transcripción presentan una variedad de secuencias aminoacídicas y estructuras tridimensionales. En general, estos dominios funcionales interactúan con coactivadores o correpresores, que son críticos para la capacidad de los factores de transcripción para modular la expresión génica.
- La unión cooperativa de múltiples activadores a sitios cercanos a un amplificador forma un complejo multiproteico denominado *amplificosoma* (véase fig. 11-26). El ensamblaje de los amplificosomas a menudo requiere pequeñas proteínas que se unen al surco menor del DNA y curvan agudamente el DNA, lo que permite que las proteínas unidas a cada lado del arco interactúen con mayor facilidad.

11.4 Iniciación de la transcripción por la RNA polimerasa II

En secciones anteriores se han presentado muchas de las proteínas eucariontes y secuencias de DNA que participan en la transcripción y en su control. En esta sección, nos centramos en el ensamblaje de los *complejos de preiniciación de la transcripción* que involucran la RNA polimerasa II (Pol II). Cabe recordar que esta RNA polimerasa eucarionte cataliza la síntesis de mRNA y algunos pocos RNA nucleares pequeños (snRNA). Los mecanismos que controlan el ensamblaje de los complejos de preiniciación de la transcripción de la Pol II y, por lo tanto, la velocidad de la transcripción de los genes codificantes de proteínas, se tratan en la siguiente sección.

Los factores generales de transcripción ubican las RNA polimerasas II en los sitios de inicio y asisten en la iniciación

La transcripción in vitro por la RNA polimerasa II purificada requiere la adición de varios factores de iniciación que están separados de la polimerasa durante la purificación. Estos factores de iniciación, que ubican las moléculas de polimerasa en los sitios de inicio de la transcripción y ayudan a separar las hebras de DNA de manera tal que la hebra molde pueda entrar en el sitio activo de la enzima, se llaman *factores generales de transcripción*. A diferencia de los factores de transcripción tratados en la sección previa, que se unen a sitios específicos en un número limitado de genes, los factores generales de transcripción son necesarios para la síntesis de RNA a partir de la mayoría de los genes.

Se han aislado y caracterizado los factores generales de transcripción que asisten a la Pol II en la iniciación de la transcripción in vitro a partir de la mayoría de los promotores con cajas TATA. La mayoría de estas proteínas son multiméricas y se designan como factor de transcripción IIA (TFIIA), factor de transcripción IIB (TFIIB), etc. El más grande es TFIID, que consiste en una única *proteína de unión a la caja TATA* de 38 kDa (TBP) y trece factores asociados con la TBP (TAF). Se aislaron factores generales de transcripción con actividades similares a partir de células humanas cultivadas, de hígado de rata, de embriones de *Drosophila* y de levaduras. Los genes que codifican estas proteínas en la levadura fueron secuenciados como parte de la secuencia genómica completa de la levadura, muchos de los cDNA que codifican factores generales de transcripción de la Pol II humanos y de *Drosophila* ya han sido clonados y secuenciados. En todos los casos, los factores generales de transcripción equivalentes de diferentes eucariontes están altamente conservados.

El ensamblaje secuencial de proteínas forma el complejo de preiniciación de la transcripción de la Pol II in vitro

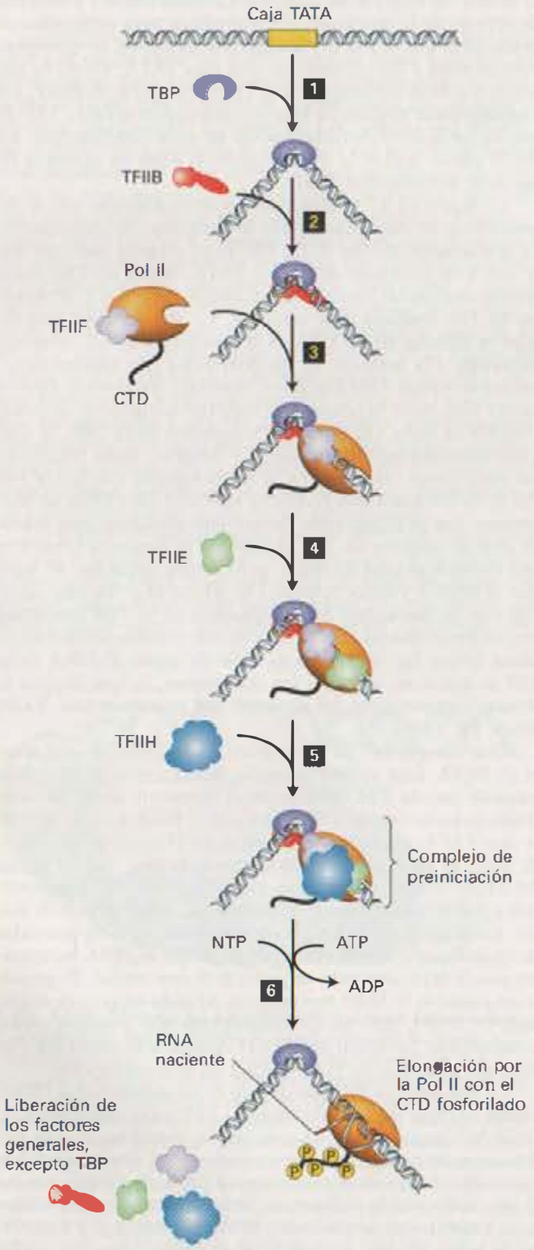
Estudios bioquímicos detallados revelaron cómo se ensambla el complejo de preiniciación Pol II, que comprende una molécula de Pol II y factores generales de transcripción unidos a una región promotora de DNA. En estos estudios se utilizaron ensayos de footprinting con DNasa I y ensayos de retraso de la movilidad electroforética para determinar el orden en el que la Pol II y los factores generales de transcripción se unen a los promotores con caja TATA. Como la purificación de la multisubunidad TFIID completa es difícil, los investigadores emplearon sólo el componente aislado TBP de este factor general de transcripción en estos experimentos. La Pol II puede iniciar la transcripción in vitro en ausencia de las otras subunidades TFIID.

La figura 11-27 resume nuestro entendimiento actual del ensamblaje in vitro paso a paso del complejo de preiniciación de la transcripción Pol II. La TBP es la primera proteína que se une a un promotor de la caja TATA. Todas las TBP eucariontes analizadas hasta la fecha tienen dominios C-terminales de 180 residuos muy similares. La secuencia de esta región es idéntica en un 80% en la levadura y en las proteínas humanas, y la mayoría de las diferencias son subsustituciones conservadas. Este dominio C-terminal conservado funciona tan bien como la proteína de longitud completa en la transcripción in vitro. (El dominio N-terminal de la TBP, la cual varía enormemente en secuencia y longitud entre los distintos eucariontes, funciona en la transcripción, catalizada por Pol II, de los genes que codifican snRNA.) La TBP es un monómero que se pliega para formar una estructura con forma de silla de montar; las dos mitades de la molécula presentan una simetría general de díada, pero no son idénticas. Al igual que la HMGI y otras proteínas de unión al DNA que participan en la formación de amplificosomas, la TBP interactúa con el surco menor del DNA y curva considerablemente la hélice (véase fig. 4-5). La superficie de unión al DNA de la TBP se conserva en todos los eucariontes, lo que explica la elevada conservación del elemento del promotor caja TATA (véase fig. 11-9).

Una vez que la TBP se unió a la caja TATA, puede unirse al TFIIB. Ésta es una proteína monomérica, apenas más pequeña que la TBP. El dominio C-terminal de TFIIB hace contacto tanto con la TBP como con el DNA a cada lado de la caja TATA, mientras que su dominio N-terminal se extiende hacia el sitio de inicio de la transcripción. Tras la unión del TFIIB, se une un complejo preformado de TFIIF tetramérico y Pol II, posicionando la polimerasa sobre el sitio de inicio. En la mayoría de los promotores, dos factores generales de transcripción deben unirse antes de que el DNA bicatenario pueda separarse para exponer la hebra molde. El primero en unirse es el TFIIE tetramérico, creando un sitio de unión para el TFIIH, otro factor multimérico que contiene nueve subunidades. La unión del TFIIH completa el ensamblaje in vitro del complejo de preiniciación de la transcripción.

La actividad de helicasa de una de las subunidades TFIIH utiliza energía de la hidrólisis de ATP para desenrollar el DNA bicatenario en el sitio de inicio, permitiendo a la Pol II formar un complejo *abierto* en el cual el dúplex de DNA que rodea el sitio de inicio se separa y la hebra molde se une al sitio activo de la polimerasa. Si los ribonucleótidos trifosfatos restantes están presentes, la Pol II comienza a transcribir la hebra molde. A medida que la polimerasa transcribe

alejándose de la región promotora, otra subunidad del TFIIH fosforila el CTD de la Pol II en múltiples sitios (véase fig. 11-27). En el análisis de transcripción in vitro mínimo, que contiene sólo estos factores generales de transcripción y RNA polimerasa II purificada, la TBP permanece unida a la caja TATA a medida que la polimerasa transcribe alejándose de la región del promotor, pero el otro factor general de transcripción se disocia.



◀ Fig. 11-27. Ensamblaje in vitro del complejo de preiniciación de la RNA polimerasa II. Los factores de transcripción generales indicados y la RNA polimerasa II (Pol II) purificada se unen secuencialmente al DNA de la caja TATA para formar un complejo de preiniciación. Luego la hidrólisis de ATP provee la energía para desenrollar el DNA en el sitio de inicio mediante una subunidad TFIIH. A medida que la Pol II inicia la transcripción en el complejo abierto resultante, la polimerasa se mueve alejándose del promotor y su CTD se fosforila. In vitro, los factores de transcripción generales (excepto el TBP) se disocian del complejo TBP-promotor, pero aún no se sabe qué factores permanecen asociados con regiones del promotor que siguen cada ronda de iniciación de la transcripción in vivo.

MEDICINA

Las primeras subunidades del TFIIH clonadas a partir de seres humanos se identificaron porque las mutaciones en los genes que la codifican causan defectos en la reparación del DNA dañado. En los individuos normales, cuando una RNA polimerasa que está transcribiendo se queda estancada en una región del DNA molde dañado, se cree que un subcomplejo de TFIIH reconoce la polimerasa estancada y luego recluta otras proteínas que actúan con TFIIH reparando la región de DNA dañada. En ausencia de TFIIH funcional, esta reparación de DNA dañado en los genes transcripcionalmente activos es despareja. Como resultado, los individuos afectados tienen una sensibilidad cutánea extrema a la luz solar (una causa común de lesión del DNA) y exhiben una alta incidencia de cáncer. Según la severidad del defecto en el funcionamiento del TFIIH, estos individuos pueden sufrir enfermedades como la *xerodermia pigmentosa* y el síndrome de Cockayne. ■

La iniciación de la transcripción in vivo mediante la polimerasa II requiere proteínas adicionales

Aunque los factores generales de transcripción tratados arriba permiten que la Pol II inicie la transcripción in vitro, otro factor general de transcripción, el TFIIA, es necesario para la iniciación in vivo por Pol II. El TFIIA purificado forma un complejo con la TBP y el DNA de la caja TATA. La cristalografía de rayos X de este complejo muestra que el TFIIA interactúa con el lado de la TBP que se encuentra hacia 5' desde la dirección de transcripción. Los experimentos bioquímicos sugieren que en las células de los eucariontes superiores el TFIIA y el TFIID, con sus múltiples subunidades TAF, se unen primero al DNA de la caja TATA y luego los otros factores generales de transcripción se unen subsecuentemente como se indica en la figura 11-27.

Las subunidades TAF del TFIID parecen desempeñar un papel en la iniciación de la transcripción a partir de promotores que carecen de una caja TATA. Por ejemplo, algunas subunidades TAF contactan el elemento iniciador en los promotores donde aparece, lo que explica cómo tales secuencias pueden reemplazar una caja TATA. Las subunidades TAF adicionales del TFIID pueden unirse a una secuencia consenso A/G-G-A/T-C-G-T-G centrada ≈30 pares de bases en dirección 3' del sitio de inicio de la transcripción en muchos genes que carecen de un promotor con caja TATA. Debido a su posición, esta secuencia reguladora se denomina *elemento promotor en dirección 3' (DPE)*. El DPE facilita la transcripción de los genes carentes de TATA que lo contienen al incrementar la unión con el TFIID.

Además de los factores generales de transcripción, los activadores y represores específicos regulan la transcripción de genes mediante la Pol II. En la próxima sección examinaremos cómo estas proteínas reguladoras influyen en la iniciación de la transcripción por Pol II.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 11.4

Iniciación de la transcripción por la RNA polimerasa II

- La transcripción de los genes codificantes de proteínas por la Pol II puede iniciarse in vitro mediante la unión secuencial de las siguientes en el orden indicado: TBP, la cual se une al DNA de la caja TATA; TFIIB; un complejo de Pol II y TFIIF; TFIIE y finalmente TFIIH (véase fig. 11-27).
- La actividad de helicasa de una subunidad TFIIH separa las hebras molde en el sitio de inicio en la mayoría de los promotores, un proceso que requiere hidrólisis de ATP. A medida que la Pol II comienza a transcribir alejándose del sitio de inicio, su CTD es fosforilado por otra subunidad TFIIH.
- La iniciación de la transcripción in vivo por la Pol II también requiere TFIIA y, en los metazoos, una proteína TFIID completa, incluidas sus múltiples subunidades TAF al igual que la subunidad TBP.

11.5 Mecanismos moleculares de la activación y represión de la transcripción

Los activadores y los represores que se unen a sitios específicos en el DNA y regulan la expresión de los genes asociados codificantes de proteínas lo hacen por dos mecanismos generales. Primero, estas proteínas reguladoras actúan en coordinación con otras proteínas para modular la estructura de la cromatina, influyendo de esta forma en la capacidad de los factores generales de transcripción para unirse a los promotores. Cabe recordar del capítulo 10 que el DNA en las células eucariontes no está libre, sino que está asociado con aproximadamente una masa igual de proteínas formando la **cromatina**. La unidad estructural básica de la cromatina es el **nucleosoma**, que está compuesto de ≈147 pares de bases de DNA envueltas fuertemente alrededor de un núcleo "discoide" de proteínas **histonas**. Los residuos dentro de la región N-terminal de cada histona y la región C-terminal de la histona H2A, llamadas *colas de histona*, se extienden desde la superficie del nucleosoma, y pueden ser modificadas de manera reversible (véase fig. 10-20). Tales modificaciones, sobre todo la acetilación de las colas de las histona H3 y H4, influyen en la condensación relativa de la cromatina y así su accesibilidad a las proteínas requeridas para la iniciación de la transcripción. Además de su papel en ese control transcripcional mediado por cromatina, los activadores y los represores interactúan con un complejo multiproteico grande llamado *mediador del complejo de transcripción*, o simplemente **mediador**. Este complejo, a su vez, se une a la Pol II y directamente regula el ensamble de los complejos de preiniciación de la transcripción.

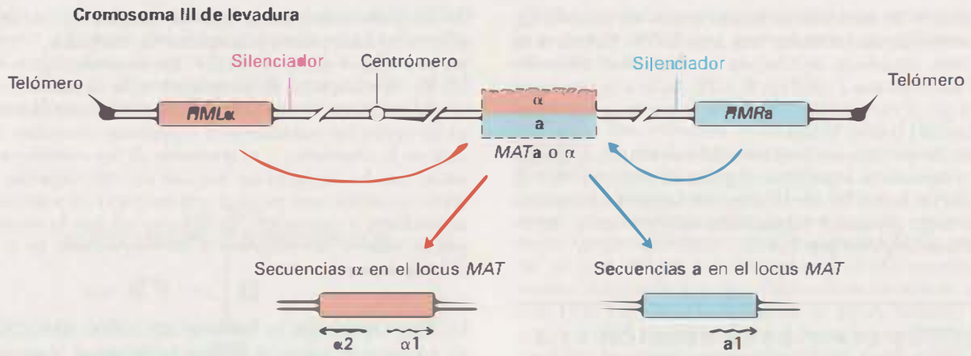
En esta sección revisamos los conocimientos actuales acerca de cómo los activadores y represores controlan la estructura de la cromatina y el ensamble de los complejos de preiniciación. En la siguiente sección de este capítulo, veremos cómo controlan sus propias concentraciones y actividades de activadores y represores, de manera tal que la expresión del gen se adapte precisamente a las necesidades de la célula y del organismo.

La formación de la heterocromatina silencia la expresión génica en los telómeros, cerca de los centrómeros y en otras regiones

Desde hace muchos años se sabe que los genes inactivos en las células eucariontes suelen estar asociados con la **heterocromatina**, regiones de la cromatina muy condensadas y que, con colorantes de DNA, se tiñen de un color más oscuro que la **eucromatina**, donde se localizan la mayoría de los genes transcriptos (véase fig. 5-25). Las regiones de los cromosomas cerca de los centrómeros y los telómeros y las regiones específicas adicionales que varían en diferentes tipos de células están organizadas en forma de heterocromatina. El DNA en la heterocromatina es menos accesible a las proteínas externas añadidas que el DNA en la eucromatina y, en consecuencia, a menudo se la llama cromatina "cerrada". Por ejemplo, en un experimento descrito en el capítulo anterior, se descubrió que el DNA de los genes inactivos es más resistente a la digestión por DNasa I que el DNA de los genes transcriptos (véase fig. 10-22).

El estudio de las regiones de DNA en *S. cervisiae* que se comportan como la heterocromatina de los eucariontes superiores proporcionó una comprensión inicial acerca de la *represión de la transcripción mediada por cromatina*. Esta levadura puede crecer tanto como células haploides o diploides. Las células haploides exhiben uno de dos posibles tipos de apareamientos, llamados a y α. Las células de distintos tipos de apareamiento pueden "aparearse" o fusionarse para generar una célula diploide (véase fig. 1-5). Cuando una célula haploide se divide por gemación, la célula "madre" más grande intercambia su tipo de apareamiento (véase fig. 22-21). Los análisis moleculares y genéticos revelaron que tres locus genéticos en el cromosoma III de la levadura controlan el tipo de apareamiento de las células de la levadura (véase fig. 11-28). Sólo el locus central de tipo de apareamiento, llamado *MAT*, se transcribe activamente. En el capítulo 22 se explica cómo las proteínas codificadas en el locus *MAT* determinan si una célula tiene el fenotipo a o α. Los dos locus adicionales, denominados *HML* y *HMR*, cerca del telómero izquierdo y derecho, respectivamente, contienen copias "silenciosas" (no transcriptas) de genes a o α. Estas secuencias se transfieren alternativamente desde el *HMLα* o el *HMRa* al locus *MAT* mediante un tipo de recombinación no recíproca entre cromátidas hermanas durante la división celular. Cuando el locus *MAT* contiene la secuencia de DNA de *HMLα*, las células se comportan como células α. Cuando contiene la secuencia de DNA de *HMRa*, las células se comportan como células a.

Nuestro interés aquí se centra en cómo se reprime la transcripción de los locus del tipo de apareamiento silencioso en los HML y HMR. Si los genes en estos locus se expresan, como

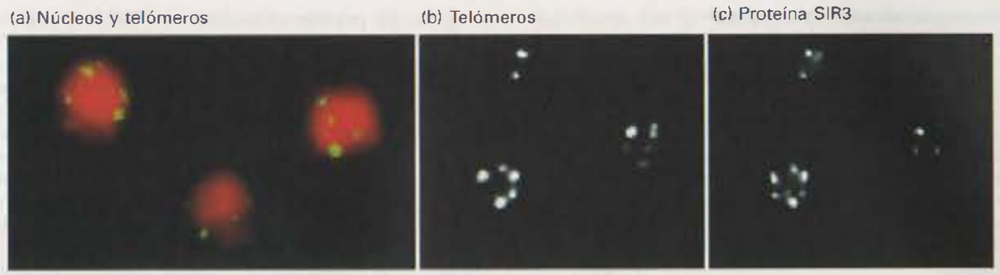


▲ **Fig. 11-28. Arreglo del locus de tipo de apareamiento en el cromosoma III de la levadura *S. cerevisiae*.** Los genes del tipo de apareamiento (ya sea **a** o **α**, según la cepa) silenciosos (no expresados) se localizan en el locus *HML*. Los genes del tipo de apareamiento opuesto están presentes en el locus *HMR* silencioso. Cuando las secuencias **α** o **a** están presentes en el locus *MAT*, pueden transcribirse a mRNA cuyas proteínas codificadas especifican el fenotipo del tipo de apareamiento de la célula. Las secuencias silenciadoras cerca del *HML* o del *HMR* unen proteínas que son críticas para la represión de estos locus silenciosos. Las células haploides pueden cambiar los tipos de apareamiento en un proceso que transfiere la secuencia de DNA del *HML* o *HMR* al locus *MAT* transcripcionalmente activo.

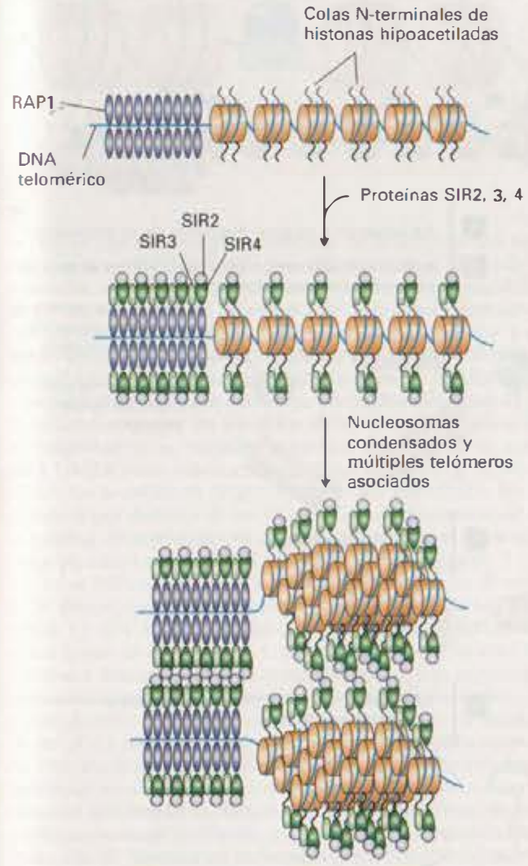
están en los mutantes de levadura con defectos en el mecanismo de represión, se expresan ambas proteínas **a** y **α** provocando que las células se comporten como células diploides, que no pueden aparearse. Los promotores y las UAS que controlan la transcripción de los genes **a** y **α** se ubican cerca del centro de la secuencia de DNA que se transfiere y son idénticas, ya sea que las secuencias estén en el locus *MAT* o en uno de los locus silenciosos. En consecuencia, la función de los factores de transcripción que interactúan con esas secuencias de alguna manera se bloquea en los *HML* y *HMR*. Esta represión del locus silencioso depende de secuencias silenciadoras ubicadas junto a la región de DNA transferido en *HML* y al *HMR* (véase fig. 11-28). Si se elimina el silenciador, el locus silencioso adyacente se transcribe. Notablemente, cualquier gen situado cerca de la secuencia silenciadora de tipo de apareamiento de la levadura por técnicas de recombinación de DNA es reprimido, o "silenciado", incluso un gen de tRNA transcripto por la RNA polimerasa III, que usa un grupo diferente de factores generales de transcripción, que el que usa la RNA polimerasa II.

Varias líneas de evidencia indican que la represión de los locus HML y HMR es el resultado de una estructura de cromatina condensada que bloquea estéricamente la interacción de los factores de transcripción con el DNA. En un experimento revelador, el gen que codifica una enzima de *E. coli* que metila los residuos de adenina en la secuencias GATC fue introducido en células de levadura bajo el control de un promotor de levadura de manera que se expresara la enzima. Los investigadores encontraron que las secuencias de GATC dentro del locus MAT y muchas otras regiones del genoma en estas células se metilaron, pero no aquellas dentro de los locus HML y HMR. Estos resultados indican que el DNA del locus silencioso es inaccesible para la metilasa de *E. coli* y presumiblemente para las proteínas en general, incluidos los factores de transcripción y la RNA polimerasa. Experimentos similares conducidos con diversas histonas mutantes de levaduras indican que se requieren las interacciones específicas que involucran las colas de histona de H3 y H4 para la formación de una estructura de cromatina totalmente represiva. Otros estudios mostraron que los telómeros de cada cromosoma de la levadura también se comportan como secuencias silenciadoras. Por ejemplo, cuando un gen está situado dentro de unas pocas kilobases de cualquier telómero de levadura, su expresión se reprime. Además, esta represión se alivia por las mismas mutaciones H3 y H4 en las colas de histona que interfieren en la represión en el locus del tipo de apareamiento silencioso.

Los estudios genéticos condujeron a la identificación de diversas proteínas, RAP1 y tres proteínas SIR, que se necesitan para la represión del locus del tipo de apareamiento silencioso y los telómeros en la levadura. Se descubrió que el RAP1 se une dentro de las secuencias silenciadoras de DNA asociadas con *HML* y *HMR*, y a una secuencia que se repite múltiples veces en cada telómero cromosómico de las levaduras. Estudios bioquímicos posteriores mostraron que las proteínas SIR se unen unas a otras y que esas dos se unen a las colas N-terminales de histonas H3 y H4 que se mantienen en un estado mayormente no acetilado mediante la actividad de desacetilasa de SIR2. Varios experimentos que utilizan microscopia confocal fluorescente de células de levaduras, ya sea teñidas con anticuerpos marcados con fluorescencia contra cualquiera de las proteínas SIR o RAP1, o hibridadas a una sonda de DNA marcada específica del telómero revelaron que estas proteínas forman grandes estructuras de nucleoproteínas teloméricas condensadas que se parecen a la heterocromatina hallada en los eucariontes superiores (fig. 11-29). La figura 11-30 ilustra un modelo para el silenciamiento mediado por cromatina en los telómeros de levaduras, sobre la base de éstos y de otros estudios. La formación de la heterocromatina en los telómeros está nucleada por múltiples proteínas de RAP1 unidas a secuencias repetidas en una región libre de nucleosomas al final del extremo de un telómero. Una red de interacciones proteína-proteína que involucra al RAP1 unido al telómero, tres proteínas SIR (2, 3 y 4), e histonas H3 y H4 hipoacetiladas crea un complejo de nucleoproteínas estable y de orden superior que incluye varios telómeros y en el cual el DNA es mayormente inaccesible a las proteínas externas. Una proteína adicional, la SIR1, también es necesaria para silenciar el locus de tipo de apareamiento silencioso. Aun-



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 11-29 Las sondas de anticuerpo y de DNA colocalizan la proteína SIR3 con la heterocromatina telomérica en núcleos de levadura.** (a) Microfotografía confocal de 0,3 μm de espesor a través de tres células diploides de la levadura, cada una con 68 telómeros. Los telómeros se marcaron por medio de hibridación a una sonda telómero-específica fluorescente (en amarillo). El DNA se tiñó de rojo para revelar el núcleo. Los 68 telómeros se reúnen en un número de regiones mucho menor cerca de la periferia nuclear. (b, c) Microfotografías confocales de las células de levadura marcadas con una sonda de hibridación telómero-específica (b) y un anticuerpo marcado con fluorescencia específico para SIR3 (c). Nótese que la SIR3 está ubicada en la heterocromatina telomérica reprimida. Experimentos similares con RAP1, SIR2 y SIR4 mostraron que estas proteínas también se colocalizan con la heterocromatina telomérica reprimida. (De M. Gotta et al., 1996, J. Cell Biol. 134:1349, cortesía de M. Gotta, T. Laroche y S. M. Gasser.)



◀ **Fig. 11-30. Esquema del mecanismo de silenciamiento en los telómeros de levadura.** Múltiples copias de RAP1 se unen a una secuencia repetida simple en cada región telomérica, que carece de nucleosomas (*arriba*). Estos nuclean el ensamblaje de un complejo multiproteico (*abajo*) a través de interacciones proteína-proteína entre RAP1, SIR2, SIR3, SIR4 y las colas N-terminales hipoacetiladas de las histonas H3 y H4 de los nucleosomas cercanos. La SIR2 desacetila las colas de histona. La estructura heterocromatínica en cada telómero abarca ≈4 kb del DNA en la vecindad de los sitios de unión para RAP1, independientemente de su secuencia. La asociación de varios telómeros condensados forma complejos de heterocromatina de orden superior, como los que se muestran en la figura 11-29, que bloquean estéricamente la interacción de otras proteínas con el DNA. Para más detalles véase el texto. (Adaptado de M. Grunstein, 1997, Curr. Opin. Cell Biol. 9:383.)

que todavía no se comprende bien la función de SIR1, se sabe que se asocia con la región silenciadora, donde se piensa que permite un mayor ensamblaje del complejo telomérico multiproteico de silenciamiento de manera tal que se esparce más lejos del extremo del cromosoma y abarca *HML* y *HMR*.

Una característica importante de este modelo es la dependencia del silenciamiento en la hipoacetilación de las colas de histonas. Esto se demostró en los experimentos con mutantes de levaduras que expresaban histonas en las cuales las lisinas en los N-terminales de las histonas eran sustituidas por argininas o glutaminas. La arginina está cargada positivamente como la lisina, pero no puede ser acetilada. Se cree que funciona en las colas N-terminales de histonas como una lisina no acetilada. La glutamina por el otro lado estimula una lisina acetilada. La represión en los telómeros y en el locus de apareamiento de tipo silencioso fue defectuosa en los mutantes con sustituciones de glutamina, pero no en los mutantes con sustituciones de arginina. Posteriormente se descubrió que la hiperacetilación de las colas de H3 y H4 interfería en la unión mediante la SIR3 y la SIR4.

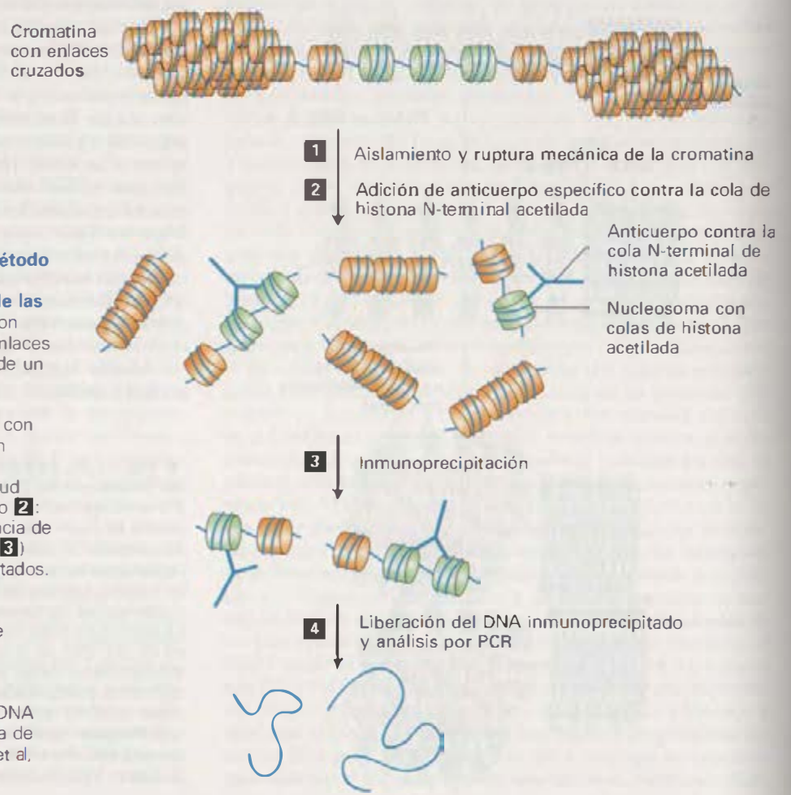
Aunque la represión de la transcripción mediada por cromatina también es importante en los eucariontes multicelula-

res, el mecanismo de esta represión aún se está descifrando. Los análisis genéticos y bioquímicos en *Drosophila* revelaron que múltiples proteínas asociadas en grandes complejos multiproteicos participan en el proceso. Estos *complejos Polycomb* se estudian en el capítulo 15. Al igual que en el caso de las proteínas SIR que se unen a los telómeros de las levaduras (véase fig. 11-29), estas proteínas *Polycomb* de *Drosophila* pueden visualizarse uniéndose a los genes que reprimen en múltiples localizaciones específicas en el genoma por medio de la unión in situ de anticuerpos específicamente marcados contra los cromosomas politénicos de las glándulas salivales.

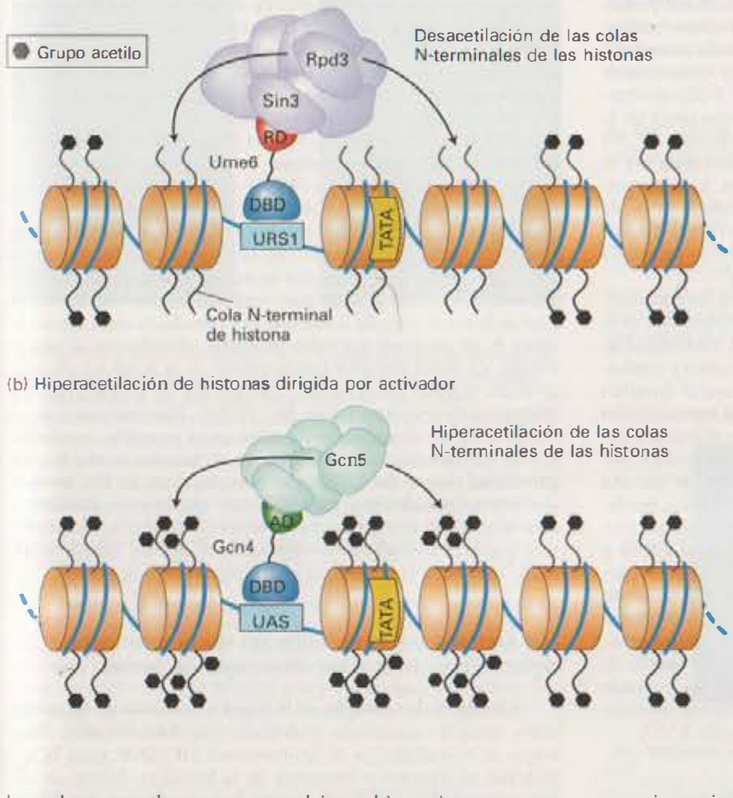
Los represores pueden dirigir la desacetilación de las histonas en genes específicos

La importancia de la *desacetilación de las histonas* en la represión génica mediada por cromatina ha sido sustentada adicionalmente por estudios de represores eucariontes que regulan los genes en posiciones cromosómicas internas. Ahora se sabe que estas proteínas actúan en parte causando la desacetilación de las colas de histona en los nucleosomas que se unen a la caja TATA y a la región proximal al promotor de los genes que reprimen. Los estudios in vitro demostraron que cuando el DNA promotor se ensambla en un nucleosoma con histonas no acetiladas, los factores generales de transcripción no pueden unirse a la caja TATA ni a la región de iniciación. En las histonas desacetiladas, las lisinas N-terminales están cargadas positivamente e interactúan fuertemente con los fosfatos del DNA. Las colas de histonas desacetiladas también interactúan con octámeros de histona de los alrededores, favoreciendo el plegado de la cromatina en estructuras condensadas de orden superior cuyas conformaciones precisas no se comprenden bien. El efecto neto es que los factores generales de transcripción no pueden ensamblarse en un complejo de preiniciación sobre un promotor asociado con histonas hipoacetiladas. En cambio, la unión de los factores generales de transcripción es mucho menos reprimida por las histonas con colas hiperacetiladas en las cuales las lisinas cargadas se neutralizan positivamente y se eliminan las interacciones electrostáticas con los fosfatos del DNA.

La conexión entre la desacetilación de las histonas y la represión de la transcripción en los promotores de levadura cercanos quedó más clara cuando se descubrió que el cDNA que codifica una *histona desacetilasa* tiene alta homología con el gen *RPD3* de levadura, del que se sabe que es necesario para la represión normal de numerosos genes de levadura. Trabajos adicionales mostraron que la proteína RPD3 tiene una actividad histona desacetilasa. La capacidad de la RPD3 para desacetilar histonas en numerosos promotores depende de otras dos proteínas: UME6, un represor que se une a una secuencia reguladora específica en dirección 5′ (URS1) y el SIN3,



▶ FIGURA EXPERIMENTAL 11-31 El método de inmunoprecipitación de la cromatina puede revelar el estado de acetilación de las histonas en la cromatina. Las histonas son levemente entrecruzadas (se establecen enlaces cruzados) al DNA in vivo mediante el uso de un agente químico que realiza estas uniones cruzadas de manera reversible y que es permeable a las células. Los nucleosomas con colas de histona acetiladas se muestran en verde. Paso 1: La cromatina con enlaces cruzados se aísla y se la corta a una longitud promedio de dos a tres nucleosomas. Paso 2: Se añade un anticuerpo contra una secuencia de cola de histona acetilada particular y (paso 3) los nucleosomas unidos son inmunoprecipitados. Paso 4: El DNA en los fragmentos de cromatina inmunoprecipitados se libera revirtiendo los enlaces cruzados y luego se cuantifica empleando un método de PCR sensible. El método puede utilizarse para analizar la asociación in vivo de cualquier proteína con una secuencia específica de DNA empleando un anticuerpo contra la proteína de interés en el paso 2. (Véase S. E. Rundlett et al, 1998, *Nature* 392:831.)



◀ Fig. 11-32. Mecanismo propuesto de desacetilación e hiperacetilación de las histonas en el control de la transcripción de la levadura. (a) Desacetilación de las colas N-terminales de histonas dirigida por represor. El dominio de unión al DNA (DBD) del represor UME6 interactúa con un elemento de control específico en dirección 5′ (URS1) del gen que regula. El dominio de represión UME6 (RD) une SIN3, una subunidad de un complejo multiproteína que incluye RPD3, una histona desacetilasa. La desacetilación de las colas N-terminales de histona sobre los nucleosomas en la región del sitio de unión del UME6 inhibe la fijación de factores de transcripción generales a la caja TATA y reprime, por lo tanto, la expresión génica. (b) Hiperacetilación de colas N-terminales de histona dirigida por activador. El dominio de unión al DNA del activador GCN4 interactúa con secuencias activadoras específicas en dirección 5′ (UAS) de los genes que regula. El dominio de activación del GCN4 (AD) interactúa luego con un complejo multiproteico histona acetilasa que incluye la subunidad catalítica GCN5. La posterior hiperacetilación de las colas N-terminales de histona sobre los nucleosomas en la vecindad del sitio de unión para el GCN4 facilita el acceso de los factores de transcripción generales requeridos para la iniciación. La represión y la activación de muchos genes en los eucariontes superiores se produce mediante mecanismos similares.

la cual es parte de un gran complejo multiproteico que también contiene RPD3. El SIN3 también se une al dominio de represión de UME6, posicionando la histona desacetilasa RPD3 en el complejo, de manera tal que pueda interactuar con los nucleosomas vecinos asociados con el promotor y eliminar los grupos acetilo de las lisinas N-terminales de la histona. Experimentos adicionales que usaron la técnica de *inmunoprecipitación de la cromatina* reseñada en la figura 11-31 demostraron que en las levaduras de tipo silvestre, uno o dos nucleosomas en la vecindad inmediata a los sitios de unión para UME6 están hipoacetilados. Estas regiones de DNA incluyen los promotores de genes reprimidos por UME6. En los mutantes por deleción de *sin3* y *rpd3*, estos promotores no sólo estaban desreprimidos sino que los nucleosomas cerca a los sitios de unión para la UME6 estaban hiperacetilados.

Estos hallazgos proveen considerable apoyo para el modelo de desacetilación dirigida por represor que se muestra en la figura 11-32a. En este modelo, el complejo SIN3-RPD3 funciona como un correpresor. Los complejos correpresores que contienen desacetilasas de histona también se han encontrado asociados con muchos represores de células de mamífero. Algunos de estos complejos contienen el homólogo de mamífero del SIN3 (mSin3), que interactúa con la proteína represora. Otros complejos de desacetilasa de histona identificados en células de mamífero parecen contener proteínas de unión a represores adicionales o diferentes. Se cree que estas diversas combinaciones de represores y correpresores median la desacetilación de histonas en promotores específicos mediante un mecanismo similar al de la levadura (véase fig. 11-32a). Sin embargo, la observación de que diversas proteínas represoras eucariontes inhiben la transcripción in vitro en ausencia de histonas indica que también operan mecanismos de represión más directos que no implican la desacetilación de histonas.

El descubrimiento de complejos de histonas desacetilasas que contienen mSin3 proporciona una explicación para las observaciones anteriores de que las regiones de DNA transcripcionalmente inactivas de los vertebrados a menudo contienen el residuo de citidina modificado *5 metilcitidina* (mC) inmediatamente seguido por una G, mientras que las regiones de DNA transcripcionalmente activas carecen de residuos mC. Se descubrió que el DNA que contiene 5 metilcitidina une una proteína específica que a su vez interactúa específicamente con la mSin3. Este hallazgo sugiere que la asociación de correpresores que contienen mSin3 con sitios metilados en el DNA conduce a la desacetilación de las histonas en nucleosomas vecinos, tornando estas regiones inaccesibles para los factores generales de transcripción y para la Pol II y, por consiguiente, transcripcionalmente inactivas.

Los activadores pueden dirigir la acetilación de las histonas en genes específicos

Los estudios genéticos y bioquímicos en levaduras condujeron al descubrimiento de un gran complejo multiproteico que contiene la proteína GCN5, la cual tiene actividad de histona

acetilasa. Otra subunidad de este complejo de histona acetilasa se une a los dominios de activación ácidicos en las proteínas activadoras de levadura, como GCN4. La máxima activación de la transcripción por GCN4 depende de estos complejos de histona acetilasa, que por lo tanto funcionan como coactivadores. El modelo que se muestra en la figura 11-32b es compatible con la observación de que los nucleosomas cerca de la región promotora de un gen regulado por el activador GCN4 son específicamente hiperacetilados, como se determina por el método de inmunoprecipitación de la cromatina. La hiperacetilación dirigida por activador de los nucleosomas, cerca de una región promotora cambia ("abre") la estructura de la cromatina de manera tal de facilitar la unión de otras proteínas necesarias para la iniciación de la transcripción.

Un mecanismo de activación similar opera en los eucariontes superiores. Por ejemplo, los mamíferos expresan dos proteínas multidominio relacionadas, de ≈400 kD, denominadas *CBP* y *P300*, que se piensa que funcionan de manera similar. Como ya se mencionó, un dominio de la CBP une el dominio de activación acídico fosforilado en el factor de transcripción CREB. Otro dominio de la CBP interactúa con diferentes dominios de activación en otros factores de transcripción. No obstante, otro dominio de la CBP tiene actividad de histona acetilasa, y otro dominio de la CBP se asocia con un complejo multiproteico de histona acetilasa que es homólogo al complejo que contiene GCN5 de levadura. Se cree que el CREB y muchos otros activadores de los mamíferos funcionan en parte dirigiendo la CBP y el complejo histona acetilasa asociado hacia nucleosomas específicos, donde acetilan colas de histona, facilitando la interacción de factores de transcripción generales con el DNA promotor. Además, la subunidad mayor de TFIID también tiene actividad de histona acetilasa y puede funcionar como un coactivador mediante acetilación de colas N-terminales de histonas en la vecindad de la caja TATA.

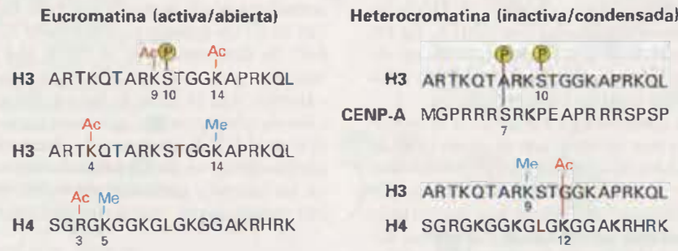
Las modificaciones de residuos específicos en las colas de histonas controlan la condensación de la cromatina

Además de la acetilación reversible, las colas de histonas en la cromatina pueden sufrir fosforilación reversible de los residuos de serina y treonina, la monoubicuitinación de un residuo de lisina en la cola C-terminal H2A, y la metilación irreversible de residuos de lisina. Se está recabando evidencia de que no sólo el nivel general de acetilación de las histonas controla la condensación de cromatina y por ende la accesibilidad del DNA. En cambio, los aminoácidos precisos en las colas que son acetiladas o modificadas de alguna otra forma pueden constituir un "*código de histonas*" que ayude a controlar la condensación de cromatina (fig. 11-33). Por ejemplo, la lisina en la posición 9 en la histona H3 a menudo está metilada en heterocromatina.

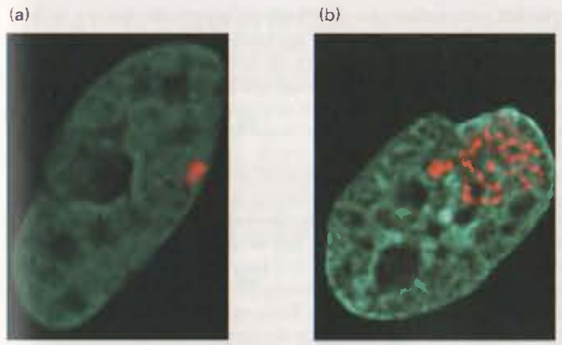
El código de histonas es "leído" por proteínas que se unen a estas modificaciones específicas y a su vez promueven la condensación o descondensación de la cromatina, formando estructuras "cerradas" o "abiertas" de cromatina. Por ejemplo, los eucariontes superiores expresan un número de proteínas asociadas con la heterocromatina que contienen un *cromodominio*, el cual se une a la cola de la histona H3 cuando es metilada en la lisina 9. Se propone que estas proteínas contribuyen al plegamiento de orden superior característico de la heterocromatina, de cierta manera similar a las proteínas SIR en relación con los telómeros de levadura (véase fig. 11-30). Alternativamente, el *bromodominio* descubierto en numerosas proteínas asociadas con la eucromatina se une a las colas de histona acetiladas. La subunidad mayor del TFIID, por ejemplo, contiene dos bromodominios separados por poca distancia que pueden ayudarle a asociarse con la cromatina que contiene un código activo, mientras que la actividad de histona acetilasa de esta misma subunidad mantiene la cromatina en un estado hiperacetilado.

Los factores de remodelación de la cromatina ayudan a activar o reprimir algunos genes

Además de los complejos de histona acetilasa, se necesitan otros tipos de complejos multiproteicos, denominados *complejos de remodelación de la cromatina SWI/SNF*, para la activación en algunos promotores de la levadura. Varias de estas subunidades SWI/SNF tienen homología con las DNA helicasas, enzimas que utilizan la energía proveniente de la hidrólisis del ATP para interrumpir las interacciones entre los ácidos nucleicos apareados o entre ácidos nucleicos y proteínas. Se piensa que el complejo SWI/SNF disocia transitoriamente el DNA de la superficie de los nucleosomas, permite que los nucleosomas se "deslicen" a lo largo del DNA y promueve el desplegamiento de estructuras de orden superior de



▲ **Fig. 11-33. Ejemplos del código de histonas.** Las modificaciones postraduccionales específicas de las colas N-terminales en las histonas H3 y H4 se encuentran en la eucromatina, que es accesible para las proteínas y es transcripcionalmente activa. Existen diferentes modificaciones en la heterocromatina, la cual está condensada y, por ende, es en gran parte inaccesible para las proteínas y es transcripcionalmente inactiva. Las secuencias de las colas de histonas se muestran en el código de los aminoácidos de una letra. CENP-A es una forma variante de la H3 hallada en los nucleosomas asociados con los centrómeros de los cromosomas de los mamíferos (Adaptado de T. Jenuwein y C. D. Allis, 2001, Science 293:1074.)



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 11-34 La expresión de proteínas fusionadas demuestra la descondensación de la cromatina en respuesta a un dominio de activación.** Se diseñó genéticamente una línea celular de hámster cultivada para que contenga múltiples copias de un arreglo en tándem de secuencias *operadoras de lac* de *E. coli* integradas a un cromosoma en una región de la heterocromatina. (a) Cuando se transfectó un vector de expresión para el represor *lac* a estas células, los represores *lac* unidos a los sitios operadores *lac* pudieron visualizarse en una región de la cromatina condensada utilizando un anticuerpo contra el represor *lac* (rojo). El DNA se visualizó mediante tinción con DAPI (azul), que revela el núcleo. (b) Cuando un vector de expresión para el represor *lac* fusionado a un dominio de activación fue transfectado en estas células, la tinción como en (a) reveló que el dominio de activación provocó que esta región de la cromatina se descondense y forme una fibra de cromatina más delgada que llena un volumen mucho mayor del núcleo. Bar = 1 μm. (Cortesía de Andrew S. Belmont, 1999, J Cell Biol 145:1341.)

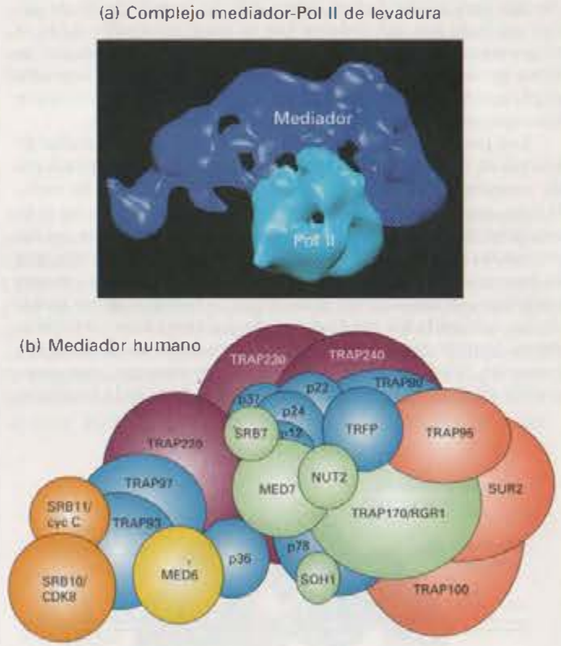
cromatina condensada. El resultado neto de esta remodelación de cromatina es facilitar la unión de factores de transcripción al DNA en la cromatina. Algunos dominios de activación mostraron unirse al complejo SWI/SNF y esta unión estimula la transcripción in vitro a partir de los moldes de cromatina (DNA unido a nucleosomas). Por ende, el complejo SWI/SNF representa otro tipo de complejo coactivador. Se han identificado en levadura otros complejos multiproteicos con actividades de remodelación de la cromatina similares, lo que incrementa la posibilidad de que distintas familias de activadores puedan requerir diferentes complejos de remodelación de la cromatina (véase la figura de apertura del capítulo).

Los eucariontes superiores también contienen complejos multiproteicos homólogos al complejo SWI/SNF de la levadura. Se descubrió que estos complejos aislados a partir de extractos nucleares de células de mamíferos y de *Drosophila* asisten en la unión de los factores de transcripción a sus sitios afines en el DNA nucleosómico en un proceso que requiere ATP. El experimento mostrado en la figura 11-34 demuestra espectacularmente cómo un dominio de activación puede provocar la descondensación de una región de cromatina. Se cree que éste es el resultado de la interacción del dominio de activación con complejos de remodelación de la cromatina y complejos de histona acetilasa.

Sorprendentemente, los complejos SWI/SNF también son necesarios para la represión de algunos genes, debido quizás a que ayudan a exponer las colas de histonas a las desacetilasas o a que asisten en el plegamiento de cromatina para formar estructuras condensadas de orden superior. Aún queda mucho para aprender acerca de cómo esta clase importante de coactivadores y correpresores altera la estructura de la cromatina para influir en la expresión génica.

El complejo mediador forma un puente molecular entre los dominios de activación y la Pol II

Aun otro tipo de coactivador, el complejo mediador multiproteico, asiste más directamente en el ensamblaje de los complejos de preiniciación de la Pol II (fig. 11-35). Algunas de las ≈20 subunidades mediadoras se unen a la RNA polimerasa II, y otras subunidades mediadoras se unen a los dominios de activación en diversas proteínas activadoras. De esta manera el mediador puede formar un puente molecular entre



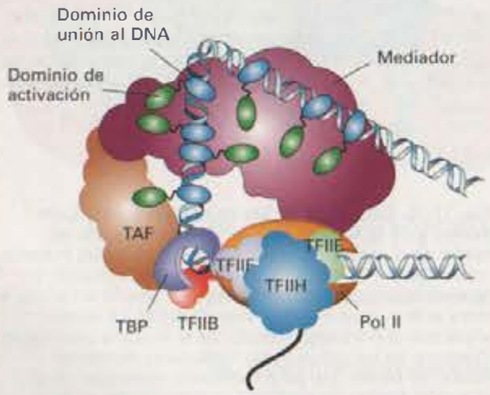
▲ **Fig. 11-35. Estructura de los complejos mediadores humanos y de la levadura.** (a) Imagen reconstruida del mediador de *S. cerevisiae* unida a la Pol II. Múltiples imágenes de microscopia electrónica se alinearon y se procesaron por computadora para producir esta imagen promedio en la cual se muestra la estructura tridimensional de la Pol II (celeste) asociada con el complejo mediador de la levadura (azul oscuro). (b) Diagrama de las subunidades mediadoras de células humanas. Se piensa que las subunidades mostradas en el mismo color forman un módulo. Las subunidades en anaranjado, amarillo y verde son homólogas a las subunidades del complejo mediador de la levadura. Los estudios genéticos en levadura muestran que las mutaciones en una de las subunidades en un módulo inhiben la asociación de otras subunidades en el mismo módulo con el resto del complejo. (Parte (a) cortesía de Francisco J. Asturias, 2002. Mol Cell 10:409. Parte (b) adaptada de S. Malik y R. G. Roeder, 2000, Trends Biochem. Sci. 25:277.)

un activador unido a su sitio afín en el DNA y la Pol II en un promotor. Además, una de las subunidades mediadoras tiene una actividad histona acetilasa y puede funcionar para mantener una región promotora en un estado hiperacetilado.

Los experimentos con mutantes de levadura sensibles a la temperatura indican que se requieren algunas subunidades mediadoras para la transcripción de casi todos los genes de levadura. Muy probablemente estas subunidades ayudan a mantener la estructura general del complejo mediador o se unen a la Pol II y por ende todos los activadores la requieren para la activación. En cambio, para la activación de subgrupos específicos de genes se requieren otras subunidades mediadoras. Los análisis de micromatrices de DNA de la expresión génica en mutantes con defectos en estas subunidades mediadoras indican que cada una de estas subunidades influye en la transcripción del ≈3–10% de todos los genes (véase fig. 9-35 para la técnica de micromatrices –*microarrays*– de DNA). Se piensa que estas subunidades mediadoras interactúan con dominios de activación específicos; de esta manera cuando una subunidad es defectuosa, la transcripción de genes regulada por activadores que se unen a esa subunidad se ve severamente deprimida, pero no afecta la transcripción de otros genes. Los estudios de unión son coincidentes con esta explicación al demostrar que algunos dominios de activación interactúan con subunidades mediadoras específicas.

Los grandes complejos mediadores, aislados de células de mamífero cultivadas, son necesarios para que los activadores de mamíferos estimulen la transcripción por Pol II in vitro. Puesto que los genes que codifican los homólogos de las subunidades mediadoras de los mamíferos se identificaron en las secuencias genómicas de *C. elegans* y *Drosophila*, parece que la mayoría de los animales multicelulares (metazoos) tienen complejos de mediadores homólogos. Alrededor de un tercio de las subunidades mediadoras de los metazoos son claramente homólogas a las subunidades mediadoras de levadura (véase fig. 11-35b). Pero las subunidades restantes, que parecen ser distintas de cualquiera de las proteínas de la levadura, pueden interactuar con dominios de activación que no se hallan en la levadura. Al igual que con el mediador, algunas de las subunidades mediadoras de mamíferos han mostrado interactuar con dominios de activación específicos. Por ejemplo, la subunidad Sur2 del mediador de mamífero se une al dominio de activación de un factor de transcripción TCF que controla la expresión del gen *EGR-1* (véase fig. 11-19). La función de este activador TCF in vivo normalmente está regulada en respuesta a hormonas proteicas específicas presentes en el suero. Las células madre (*stem cells*) embrionarias murinas con una inactivación (*knockout*) del gen *sur2* no pudieron inducir la expresión de la proteína EGR-1 en respuesta al suero, mientras que otros múltiples activadores funcionan normalmente en las células mutantes. Este hallazgo implica a la subunidad mediadora Sur2 en la función de activación del TCF.

Los diversos resultados experimentales que indican que las subunidades mediadoras individuales se unen a dominios de activación específicos influyen en la transcripción a partir de un único promotor al interactuar con un complejo mediador simultáneamente (fig. 11-36). Los activadores unidos a amplificadores o elementos proximales al promotor pueden interactuar con un mediador asociado a un promotor debido a que el DNA es flexible y puede formar un bucle acercando las regiones reguladoras y el promotor. Se observaron esos bucles en los experimentos con el activador NtrC de *E. coli* y la σ^{54}-RNA polimerasa (véase fig. 4-17). Los complejos nucleoproteína multiproteína que se forman sobre los promotores eucariontes pueden comprender tanto como 100 polipéptidos con una masa total de ≈3 megadaltons (MDa), tan grande como un ribosoma.

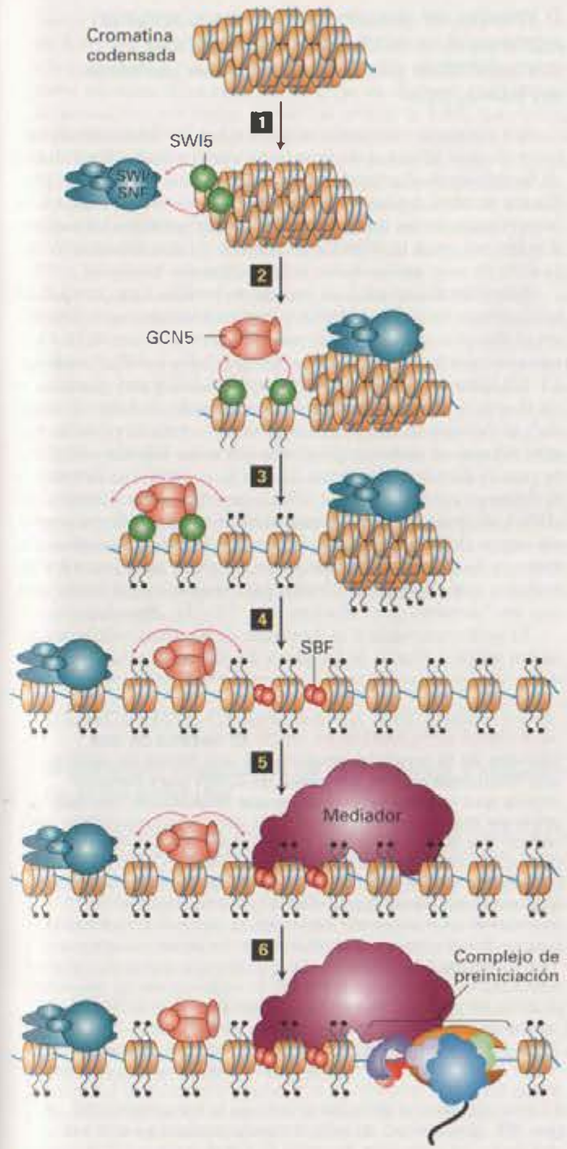


▲ Fig. 11-36. Modelo de varios activadores unidos al DNA que interactúan con un único complejo mediador. La capacidad de diferentes subunidades mediadoras para interactuar con dominios de activación específicos puede contribuir a la integración de señales de varios activadores en un único promotor. Para más detalles véase el texto.

La transcripción de muchos genes requiere la unión ordenada de activadores y la acción de coactivadores

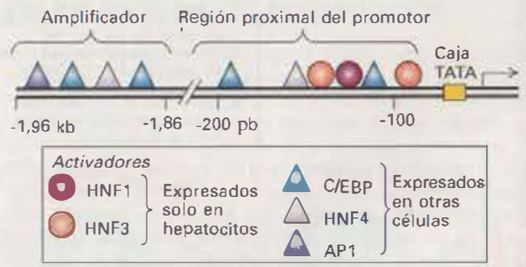
Ahora podemos extender el modelo de la iniciación de la transcripción por Pol II en la figura 11-27 para tener en cuenta el papel de los activadores y los coactivadores. Estas proteínas accesorias funcionan no sólo para hacer que los genes dentro del DNA nucleosómico sean accesibles a los factores de transcripción generales y a la Pol II sino también para atraer la Pol II a las regiones promotoras.

Estudios recientes analizaron el orden en el cual se unen los activadores a una región de control de la transcripción e interactúan con los coactivadores a medida que un gen es inducido. Estos estudios muestran que el ensamblaje de los complejos de preiniciación depende de múltiples interacciones proteína-DNA y proteína-proteína, como se ilustra en la figura 11-37 que representa la activación del gen *HO* de levadura. Este gen codifica una nucleasa específica de secuencia que inicia el cambio del tipo de apareamiento en las células haploides de la levadura (véase fig. 11-28). La activación del gen *HO* comienza con la unión del activador SWI5 a un amplificador en dirección 5'. El SWI5 unido luego interactúa con el complejo de remodelación de la cromatina SWI/SNF y con el complejo histona acetilasa que contiene GCN5. Una vez que la cromatina en la región de control *HO* se descondensa y se hiperacetila, un segundo activador, el SBF, puede unirse a varios sitios en la región proximal al promotor. La posterior unión del complejo mediador mediante SBF conduce al ensamblaje del complejo de preiniciación de la transcripción que contiene Pol II y los factores generales de transcripción mostrados en la figura 11-36.



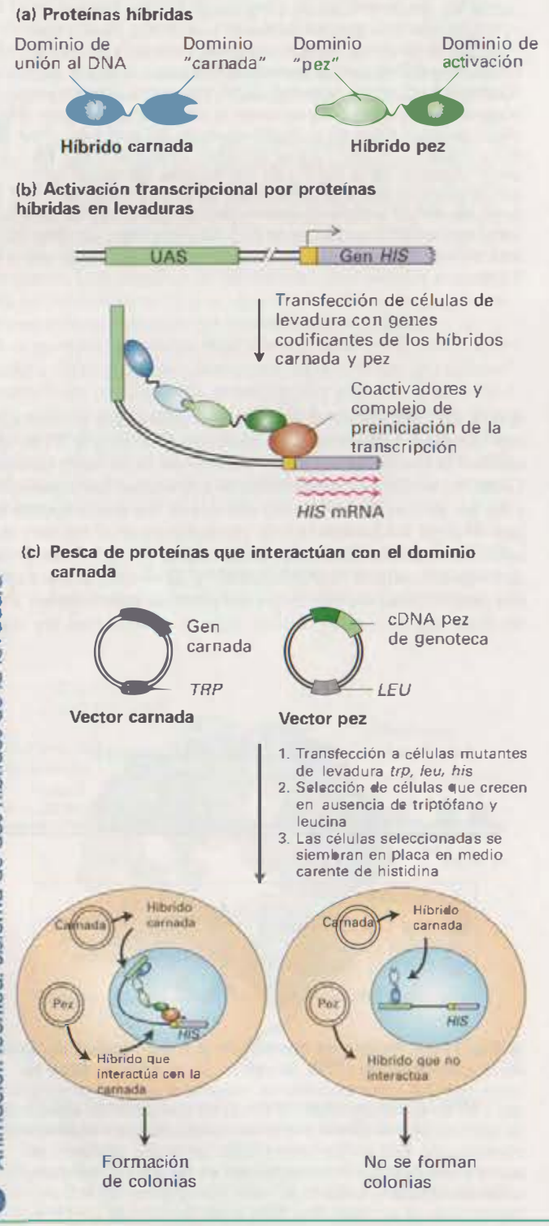
◀ Fig. 11-37. La unión ordenada y la interacción de activadores y coactivadores conducen a la transcripción del gen *HO* de la levadura. Paso 1: Inicialmente, el gen HO está empaquetado dentro de la cromatina condensada. La activación comienza cuando el activador SWI5 se une a sitios amplificadores ubicados a 1.200-1.400 pares de bases del sitio de inicio en dirección 5' e interactúa con el complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF. Paso 2: El complejo SWI/SNF actúa para descondensar la cromatina, exponiendo de esta forma las colas de histonas. Paso 3: Un complejo histona acetilasa que contiene GCN5 se asocia con el SWI5 unido y acetila las colas de histonas en el locus *HO* a medida que el SWI/SNF continúa descondensando cromatinas adyacentes. Paso 4: El SWI5 es liberado del DNA, pero los complejos SWI/SNF y GCN5 permanecen asociados con la región de control del *HO* (en el caso del GCN5, mediante interacciones poco comprendidas). Sus acciones le permiten al activador SBF unirse a varios sitios en la región proximal del promotor. Paso 5: A continuación, el SBF une el complejo mediador. Paso 6: La unión posterior de la Pol II y de los factores generales de transcripción produce el ensamblaje de un complejo de preiniciación de la transcripción cuyos componentes se detallan en la figura 11-37. (Adaptado de C. J. Fry y C. L. Peterson, 2001, Curr. Biol. 11:R185. Véase también M. P. Cosma et al., 1999, Cell 97:299, y M. P. Cosma et al., 2001, Mol. Cell 7:1213.)

Ahora podemos ver que el ensamblaje de un complejo de preiniciación y la estimulación de la transcripción en un promotor son el resultado de la interacción de varios activadores con diversos complejos multiproteicos coactivadores. Estos incluyen los complejos remodeladores de la cromatina, los complejos de histona acetilasa y un complejo mediador. A pesar de que aún queda mucho por aprender acerca de estos procesos, es claro que el resultado neto de estos eventos moleculares múltiples es que la activación de la transcripción en un promotor depende de interacciones altamente cooperativas iniciadas por diversos activadores. Esto permite que los genes sean regulados de una manera específica del tipo celular por combinaciones específicas de factores de transcripción. El gen *TTR*, que codifica la transtirretina en los mamíferos, es un buen ejemplo. Como ya se vio, la transtirretina se expresa en los hepatocitos y en las células de los plexos coroideos. La transcripción del gen *TTR* en los hepatocitos es controlada por al menos cinco activadores transcripcionales distintos (fig. 11-38). Aunque tres de estos activadores –HNF4, C/EBP y AP1– también se expresan en las células del intestino y del riñón, la transcripción *TTR* no tiene lugar en estas células, porque se necesitan los cinco



▲ Fig. 11-38. Región de control de la transcripción del gen de la transtirretina (*TTR*) de ratón. Se indican los sitios de unión para los cinco activadores requeridos para la transcripción del *TTR* en los hepatocitos. El conjunto completo de activadores se expresa en las concentraciones necesarias para estimular la transcripción sólo en los hepatocitos. Un grupo diferente de activadores estimula la transcripción en las células del plexo coroideo. (Véase R. Costa et al., 1989, Mol. Cell Biol. 9:1415, y K. Xanthopoulus et al., 1989, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86:4117.)

activadores y faltan HNF1 y HNF3. Otros amplificadores específicos de los hepatocitos y regiones proximales al promotor que regulan genes adicionales expresados sólo en los hepatocitos contienen sitios de unión para otras combinaciones de factores de transcripción hallados sólo en estas células, junto con los que se expresan en todas partes.



TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación técnica: Sistema de dos híbridos de la levadura

El sistema de dos híbridos de las levaduras aprovecha la flexibilidad del activador para detectar cDNA que codifican proteínas en interacción

Un poderoso método genético molecular denominado sistema de dos híbridos de levaduras aprovecha la flexibilidad de las estructuras activadoras para identificar genes cuyos productos se unen a proteínas específicas de interés. Debido a la importancia de las interacciones proteína-proteína en casi todos los procesos biológicos, el sistema de dos híbridos de levadura es muy utilizado en la investigación biológica.

Este método emplea un vector de levadura para expresar un dominio de unión al DNA y una región conectora flexible sin el dominio de activación asociado, como el gen GAL4 eliminado (*deleted*) que contiene aminoácidos 1–692 (véase fig. 11-17). Una secuencia de cDNA que codifica una proteína o un dominio proteico de interés denominado *dominio "carnada"*, se fusiona en marco a la región conectora flexible de manera tal que el vector exprese una proteína híbrida compuesta por el dominio de unión al DNA, la región conectora y el dominio carnada (fig. 11-39a, *izquierda*). Una genoteca de cDNA es clonada para formar múltiples copias de un segundo vector de levadura que codifica un dominio de activación fuerte y un conector flexible, para producir una genoteca de vectores que expresen múltiples proteínas híbridas, cada uno con un *"dominio pez"* distinto (fig. 11-39a, *derecha*).

El vector carnada y la genoteca de vectores pez se transfectan luego a células de levadura diseñadas genéticamente en

◀ FIGURA EXPERIMENTAL 11-39 El sistema de dos híbridos de la levadura proporciona una forma de realizar una búsqueda en una genoteca de cDNA para detectar clones que codifiquen proteínas que interactúan con una proteína específica de interés. Ésta es una técnica común para realizar una búsqueda en una genoteca de cDNA para detectar clones que codifiquen proteínas que interactúan con una proteína de interés específica. (a) Se construyen dos vectores que contienen genes que codifican proteínas híbridas (quiméricas). En un vector (*izquierda*), la secuencia codificante para el dominio de unión al DNA de un factor de transcripción está fusionada a la secuencia de una proteína conocida, referida como dominio "carnada" (celeste). El segundo vector (*derecha*) expresa un dominio de activación fusionado a un dominio "pez" (verde) que interactúa con el dominio carnada. (b) Si las células de la levadura se transforman con vectores que expresan ambos híbridos, las porciones carnada y pez de las proteínas quiméricas interactúan para producir un activador transcripcional funcional. En este ejemplo, el activador promueve la transcripción de un gen *HIS*. Un extremo de este complejo proteico se une a la secuencia activadora en dirección 5′ (UAS) del gen *HIS3*; el otro extremo, compuesto por el dominio de activación, estimula el ensamblaje del complejo de preiniciación de la transcripción (anaranjado) en el promotor (amarillo). (c) Para analizar una genoteca de cDNA para detectar los clones que codifican proteínas que interactúan con una proteína carnada particular de interés, la genoteca es clonada en el vector que codifica el dominio de activación de manera tal que se expresen las proteínas híbridas. El vector carnada y los vectores pez contienen genes de selección de tipo silvestre (p. ej., un gen *TRP* o *LEU*). Las únicas células transformadas que sobreviven el esquema de selección indicado son las que expresan el híbrido carnada y el híbrido pez que interactúa con él. Para más detalles véase el texto. (Véase S. Fields y O. Song, 1989, Nature 340:245.)

las cuales la única copia de un gen necesario para la síntesis de histidina (*HIS*) se encuentra bajo control de un UAS con sitios de unión para el dominio de unión al DNA de la proteína carnada híbrida. La transcripción del gen *HIS* requiere la activación mediante proteínas unidas a UAS. Las células transformadas que expresan el híbrido carnada y el híbrido pez *interactuante* activan la transcripción del gen *HIS* (fig. 11-39b). Este sistema funciona debido a la flexibilidad en el espaciamiento entre los dominios de unión al DNA y los dominios de activación de los activadores eucariontes.

Se emplea un proceso de selección de dos pasos (fig. 11-39c). El vector carnada también expresa un gen *TRP* de tipo silvestre, y el vector híbrido expresa un gen *LEU* de tipo silvestre. Las células transfectadas primero se cultivan en un medio que carece de triptófano y leucina, pero que contiene histidina. Sólo las células que han incorporado el vector carnada y uno de los plásmidos pez sobrevivirán en este medio. Luego, las células que sobreviven son cultivadas en placas con un medio que carece de histidina. Las células que expresan un híbrido pez que no se une al híbrido carnada no pueden transcribir el gen HIS y, en consecuencia, no formarán una colonia sobre un medio que carece de histidina. Las pocas células que expresan un híbrido pez de unión a carnada crecerán y formarán colonias en ausencia de histidina. La recuperación de los vectores pez a partir de estas colonias produce cDNA que codifican dominios proteicos que interactúan con el dominio carnada.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 11.5

Mecanismos moleculares de la activación y represión de la transcripción

- Los activadores y los represores de la transcripción eucariontes ejercen sus efectos uniéndose principalmente a multisubunidades coactivadoras y correpresoras que influyen en el ensamblaje de los complejos de preiniciación de la transcripción Pol II, ya sea modulando la estructura de la cromatina (efecto indirecto) o interactuando con la Pol II y con los factores de transcripción generales (efecto directo).

- El DNA en las regiones condensadas de la cromatina (heterocromatina) es relativamente inaccesible a los factores de transcripción y otras proteínas, de manera tal que la expresión génica se encuentra reprimida.

- Las interacciones mutuas entre varias proteínas y con las colas N-terminales hipoacetiladas de las histonas H3 y H4 son responsables de la represión de la transcripción mediada por cromatina, que ocurre en los telómeros y el locus de tipo de apareamiento silencioso en *S. cerevisiae* (véase fig. 11-30).

- Algunos dominios de represión funcionan interactuando con correpresores que son complejos de histona desacetilasa. La desacetilación posterior de colas N-terminales de histonas en los nucleosomas cercanos al sitio de unión del represor inhibe la interacción entre el DNA promotor y los factores generales de transcripción y reprime en consecuencia la iniciación de la transcripción (véase fig 11-32a).

- Algunos dominios de activación funcionan uniendo complejos coactivadores multiproteínas como los complejos de histona acetilasa. La hiperacetilación posterior de las colas N-terminales de histona en los nucleosomas cerca del sitio de unión al activador facilita las interacciones entre el DNA promotor y los factores de transcripción generales, estimulando de esta manera la iniciación de la transcripción (véase fig. 11-32b).

- Los factores de remodelación de la cromatina SWI/SNF constituyen otro tipo de coactivadores. Estos complejos multisubunidad pueden disociar transitoriamente el DNA de los núcleos de histona en una reacción dependiente de ATP y pueden asimismo descondensar regiones de cromatina, promoviendo de este modo la unión de las proteínas de unión al DNA necesarias para que ocurra la iniciación en algunos promotores.

- El mediador, otro tipo de coactivador, es un complejo de ≈20 subunidades que forma un puente molecular entre los dominios de activación y la RNA polimerasa II uniéndose directamente a la polimerasa y a los dominios de activación. Mediante la unión simultánea a varios activadores diferentes, el mediador probablemente ayude a integrar los efectos de múltiples activadores a un único promotor (véase fig. 11-36).

- Los activadores unidos a un amplificador distante pueden interactuar con los factores de transcripción unidos a un promotor debido a que el DNA es flexible y puede formar un gran bucle durante el proceso.

- El ensamblaje altamente cooperativo de los complejos de preiniciación in vivo suele requerir varios activadores. Una célula debe producir el grupo específico de activadores necesario para la transcripción de un gen particular de manera tal de expresar ese gen.

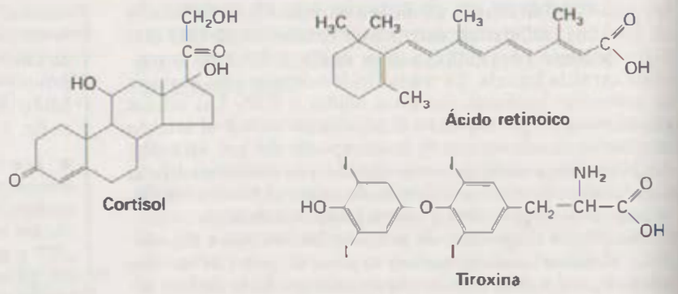
- El sistema de dos híbridos de la levadura se utiliza ampliamente para detectar cDNA que codifican dominios proteicos que se unen a una proteína específica de interés (véase fig. 11-39).

11.6 Regulación de la actividad de los factores de transcripción

En las discusiones precedentes vimos cómo las combinaciones de activadores y represores que se unen a secuencias reguladoras de DNA específicas controlan la transcripción de genes eucariontes. Que un gen específico se exprese o no en un organismo multicelular en una célula dada en un momento en particular es, en gran medida, consecuencia de las concentraciones y actividades de los factores de transcripción que interactúan con las secuencias reguladoras de ese gen. Qué factores de transcripción se expresan en un tipo celular en particular y las cantidades producidas está determinado por múltiples interacciones reguladoras entre los genes de los factores de transcripción que tienen lugar durante el desarrollo y la diferenciación de un tipo celular en particular. En los capítulos 15 y 22 presentamos ejemplos de esas interacciones reguladoras durante el desarrollo y discutimos los principios del desarrollo y la diferenciación que emergieron de esos ejemplos.

No sólo se regula la expresión de los factores de transcripción celulares, sino que, por lo general, también se controlan adicionalmente las actividades de esos factores expre-

▶ Fig. 11-40. Ejemplos de hormonas que se unen a receptores nucleares. Estas y otras hormonas solubles en lípidos se unen a receptores localizados en el citosol o en el núcleo. El complejo receptor-ligando funciona como un activador de la transcripción.

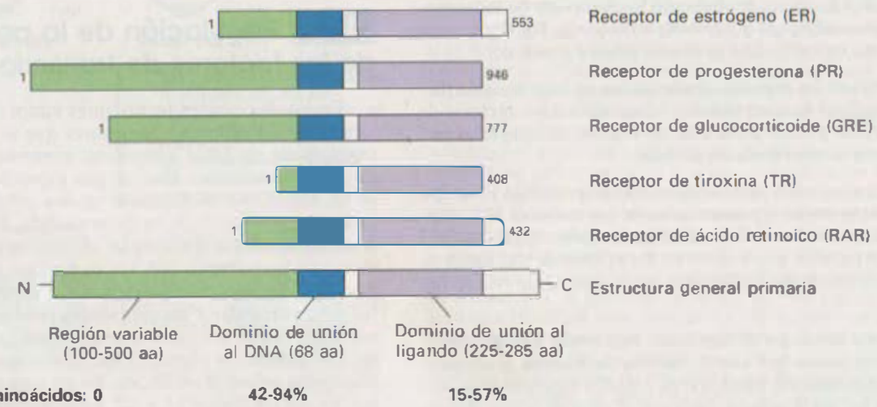


sados en un tipo celular en particular, de manera indirecta, como resultado de las interacciones entre las proteínas de las superficies de células vecinas y por hormonas extracelulares y factores de crecimiento. En los organismos multicelulares, estas últimas moléculas señalizadoras se secretan desde un tipo celular y afectan la función de células que pueden estar cerca o en una ubicación diferente en el organismo. Un grupo importante de señales extracelulares comprende los péptidos y las proteínas, las cuales se unen a receptores en la membrana plasmática. La unión de ligandos a estos receptores dispara vías de transducción de señales. En los capítulos 14 y 15 describimos los tipos principales de receptores de la superficie celular y las vías de señalización intracelular que regulan la actividad de los factores de transcripción.

En esta sección se trata el segundo grupo más importante de señales extracelulares, las pequeñas hormonas solubles en lípidos –incluidas muchas hormonas esteroides diferentes, retinoides y hormonas tiroideas– que pueden difundirse a través de las membranas nucleares y plasmáticas e interactuar directamente con los factores de transcripción que ellas controlan (fig. 11-40). Como ya se mencionó, los receptores intracelulares para la mayoría de estas hormonas solubles en lípidos, que constituyen la *superfamilia de receptores nucleares*, funcionan como activadores de la transcripción cuando están unidos a sus ligandos.

Todos los receptores nucleares comparten una estructura dominio en común

La clonación y la secuenciación de los genes que codifican varios receptores nucleares revelaron una conservación notable en sus secuencias de aminoácidos y en tres regiones funcionales (fig. 11-41). Todos los receptores nucleares tienen una región N-terminal única de longitud variable (100–500 aminoácidos). Algunas porciones de esta región variable funcionan como dominios de activación en algunos receptores nucleares. El dommio de unión al DNA se localiza cerca del centro de la secuencia primaria y presenta una repetición del motivo dedo de cinc C_4. El dominio de unión a hormona, localizado cerca del extremo del C-terminal, contiene un dominio de activación dependiente de la hormona. En algunos receptores nucleares, el dominio de unión a la hormona funciona como un dominio de represión en ausencia del ligando.

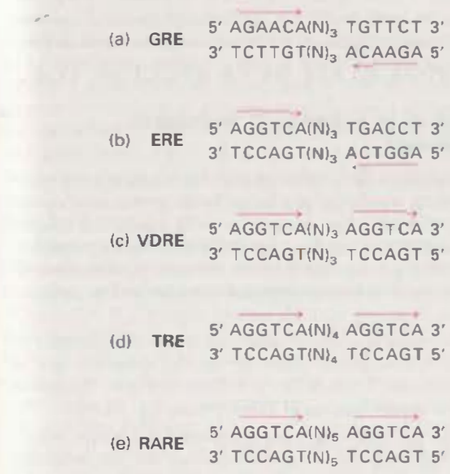


▲ Fig. 11-41. Diseño general de los factores de transcripción en la superfamilia de los receptores nucleares. El dominio de unión al DNA de ubicación central presenta una considerable homología de secuencia entre los diferentes receptores y contiene dos copias del motivo del dedo de cinc de C4. El dominio de unión a hormona C-terminal presenta menos homología. Las regiones N-terminales en diversos receptores varían en longitud, tienen secuencias únicas y pueden contener uno o más dominios de activación. (Véase R. M. Evans, 1988, Science 240:889.)

Los elementos de respuesta de los receptores nucleares contienen repeticiones invertidas o directas

Ya se han determinado las secuencias de nucleótidos características de los sitios del DNA, denominados *elementos de respuesta*, que unen varios receptores nucleares. Las secuencias de los elementos de respuesta consenso para los receptores glucocorticoides y estrógenos son repeticiones invertidas de 6 pb separadas por tres pares de bases cualesquiera (fig. 11-42a, b). Este hallazgo sugiere que los receptores de hormonas esteroides afines se unen al DNA como dímeros simétricos, como se demostró después a partir del análisis cristalográfico de rayos X del dominio de unión al DNA dedos de cinc C_4 del receptor de glucocorticoides homodimérico (véase fig. 11-21b).

Algunos elementos de respuesta de receptores nucleares, como los receptores que unen la vitamina D_3, la hormona tiroidea y el ácido retinoico, son repeticiones directas de la misma secuencia reconocida por los receptores de estrógenos, separados por tres a cinco pares de bases (fig. 11-42c-e). La especificidad para responder a estas diferentes hormonas uniendo distintos receptores está determinada por el espaciamiento entre las repeticiones. Los receptores que se unen a estos elementos de respuesta de repetición directa lo hacen en la forma de heterodímeros con un monómero de receptor nuclear denominado RXR. El elemento de respuesta de la vitamina D_3, por ejemplo, es unido por el heterodímero RXR-VDR y el elemento de respuesta del ácido retinoico es unido mediante RXR-RAR. Los monómeros que componen estos heterodímeros interactúan entre sí, de modo tal que los dos dominios de unión al DNA se ubican en la misma orientación y no en orientación invertida, lo que permite que los heterodímeros RXR se unan a las repeticiones directas del sitio de unión para cada monómero. Por el contrario, los monómeros en los receptores nucleares homodiméricos (p. ej., GRE y ERE) tienen una orientación invertida.



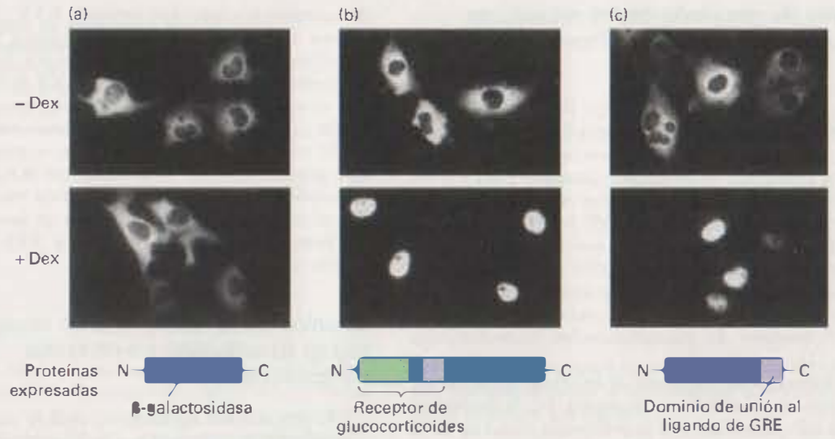
▲ Fig. 11-42 Secuencias consenso de elementos de respuesta del DNA que unen tres receptores nucleares. Los elementos de respuesta para el receptor de glucocorticoide (GRE) y el receptor de estrógeno (ERE) contienen repeticiones invertidas que unen estas proteínas homodiméricas. Los elementos de respuesta para los receptores heterodiméricos contienen una repetición directa en común separada por tres a cinco pares de bases, para el receptor de la vitamina D_3 (VDRE), el receptor de la hormona tiroidea (TRE) y los receptores del ácido retinoico (RARE). Las secuencias repetidas se indican mediante flechas rojas (Véase K. Umesono et. al., 1991, Cell 65:1255, y A. M. Naar et al., 1991, Cell 65:1267.)

La unión de la hormona a un receptor nuclear regula su actividad como factor de transcripción

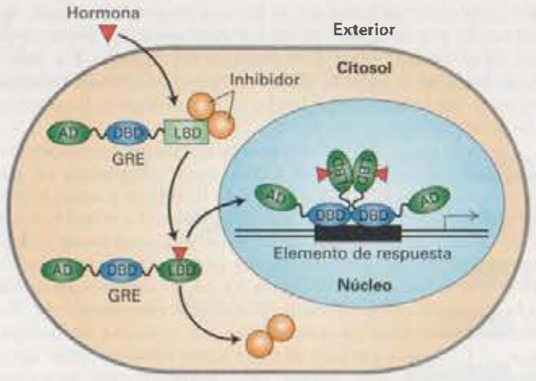
El mecanismo mediante el cual la unión de la hormona controla la actividad de los receptores nucleares difiere para los receptores homodiméricos y los heterodiméricos. Los receptores nucleares heterodiméricos (p. ej., RXR-VDR, RXR-TR y RXR-RAR) se localizan exclusivamente en el núcleo. En ausencia de su ligando hormonal, reprimen la transcripción cuando se encuentran unidos a sus sitios afines en el DNA. Esto lo hacen dirigiendo la desacetilación de las histonas en los nucleosomas cercanos mediante el mecanismo descrito (véase fig. 11-32a). Como ya vimos, en presencia de la hormona, el dominio de unión al ligando del monómero RAR sufre un cambio conformacional espectacular en comparación con el dominio de unión al ligando de un receptor nuclear en ausencia de hormona (véase fig. 11-25). En la conformación de ligando unido, los receptores nucleares heterodiméricos que contienen RXR pueden dirigir la hiperacetilación de histonas en los nucleosomas cercanos, revirtiendo por lo tanto los efectos represivos del dominio de unión al ligando libre. En presencia del ligando, los dominios de unión al ligando de los receptores nucleares también fijan al mediador estimulando el ensamblaje del complejo de preiniciación.

A diferencia de los receptores nucleares heterodiméricos, los homodiméricos se hallan en el citoplasma en ausencia de sus ligandos. La unión de hormona a estos receptores conduce a su translocación al núcleo. La translocación dependiente de hormonas del receptor glucocorticoide (GRE) homodimérico se demostró en los experimentos de transfección que se ilustran en la figura 11-43. El dominio de unión a la hormona del GRE media por sí solo este transporte. Estudios posteriores mostraron que, en ausencia de hormonas, el GRE está anclado al citoplasma como un gran agregado proteico que forma un complejo con proteínas inhibidoras, incluida la Hsp90, una proteína relacionada con la Hsp70, la principal chaperona de choque térmico de las células eucariontes. Mientras el receptor está confinado en el citoplasma no puede interactuar con los genes diana y por lo tanto no puede activar la transcripción. La unión de hormonas a un receptor nuclear homodimérico libera las proteínas inhibidoras y permite que el receptor entre en el núcleo, donde puede unirse a elementos de respuesta asociados con genes diana (fig. 11-44). Una vez que el receptor con la hormona unida se fija a un elemento de respuesta, activa la transcripción al interactuar con los complejos de remodelación de la cromatina y de histona acetilasa y con el mediador.

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Translocación nuclear regulada por la hormona del receptor de glucocorticoides



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 11-43 Proteínas de fusión de vectores de expresión demuestran que el dominio de unión a la hormona del receptor glucocorticoide (GRE) media la translocación hacia el núcleo en presencia de hormona. Las células animales cultivadas fueron transfectadas con vectores de expresión que codifican las proteínas diagramadas en la parte inferior. Se utilizó inmunofluorescencia con un anticuerpo marcado específco para la β-galactosidasa con el fin de detectar las proteínas expresadas en las células transfectadas. (a) En las células que expresaron sólo β-galactosidasa, la enzima se localizó en el citoplasma en presencia y ausencia de la hormona glucocorticoide dexametasona (Dex). (b) En las células que expresaban una proteína de fusión compuesta de β-galactosidasa y del receptor glucocorticoide completo (GRE), la proteína de fusión estaba presente en el citoplasma en ausencia de una hormona pero fue transportada al núcleo en presencia de hormonas. (c) Las células que expresaron una proteína de fusión compuesta de β-galactosidasa y sólo el dominio unión al ligando de GRE (violeta suave) también presentó transporte hormona-dependiente de la proteína de fusión hacia el núcleo. (De D. Picard y K. R. Yamamoto, 1987. EMBO J. 6:3333; cortesía de los autores.)



▲ Fig. 11-44. Modelo de activación génica hormona-dependiente mediante un receptor nuclear homodimérico. En ausencia de hormonas, el receptor es mantenido en el citoplasma mediante interacciones entre su dominio de unión al ligando (LBD) y las proteínas inhibidoras. Cuando una hormona está presente, ésta se difunde a través de la membrana plasmática y se une al dominio de unión al ligando, lo que provoca un cambio conformacional que libera al receptor de las proteínas inhibidoras. Luego, el receptor con el ligando unido es translocado hacia el núcleo, donde su dominio de unión al DNA (DBD) se une a elementos de respuesta y permite que el dominio de unión al ligando y un dominio de activación adicional (AD) en el N-terminal estimulen la transcripción de los genes diana.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 11.6

Regulación de la actividad de los factores de transcripción

- Las actividades de muchos factores de transcripción están indirectamente reguladas por la unión de proteínas extracelulares y péptidos a los receptores de la superficie celular. Estos receptores activan las vías intracelulares de transducción de señales que regulan factores de transcripción específicos a través de diversos mecanismos tratados en los capítulos 13 y 14.
- Los receptores nucleares constituyen una superfamilia de factores de transcripción dedo de cinc C_4 dimérico que se unen a hormonas liposolubles e interactúan con elementos de respuesta específicos en el DNA (véase fig. 11-41).
- La unión de hormona a los receptores nucleares induce cambios conformacionales que modifican sus interacciones con otras proteínas.
- Los receptores nucleares heterodiméricos (p. ej., aquellos para los retinoides, la vitamina D y la hormona tiroidea) se encuentran sólo en el núcleo. En ausencia de hormona, reprimen la transcripción de genes diana con el elemento de respuesta correspondiente. Cuando se hallan unidos a sus ligandos, activan la transcripción.
- Los receptores de hormona esteroide son receptores nucleares homodiméricos. En ausencia de hormona, se encuentran atrapados en el citoplasma mediante proteínas inhibidoras. Cuando se hallan unidos a sus ligandos pueden translocarse al núcleo y activar la transcripción de genes diana (véase fig. 11-44).

11.7 Elongación regulada y terminación de la transcripción

En los eucariontes, los mecanismos para terminar la transcripción difieren para cada una de las tres RNA polimerasas. La transcripción de los genes de pre-rRNA mediante la RNA polimerasa I es terminada por un mecanismo que requiere un factor de terminación específico de la polimerasa. Esta proteína de unión al DNA se une a una secuencia de DNA específica ubicada en dirección 3' con respecto a la unidad transcripcional. La terminación eficiente requiere que el factor de terminación se una al DNA molde en la orientación adecuada. La RNA polimerasa III purificada termina luego de polimerizar una serie de residuos U. El híbrido de DNA-RNA desoxi $(A)_n$–ribo$(U)_n$, que resulta cuando se sintetiza una extensión de U's, es particularmente inestable en comparación con todas las otras secuencias apareadas. La facilidad con que estos híbridos pueden separarse probablemente contribuya al mecanismo de terminación por la RNA polimerasa III.

En la mayoría de los genes codificantes de proteínas transcriptos por la RNA polimerasa II, una vez que la polimerasa transcribió más allá de las aproximadamente 50 bases, la elongación posterior es altamente procesiva y no termina hasta después que se transcriba una secuencia que dirija la escisión y poliadenilación del RNA en la secuencia que forma el extremo 3' del mRNA codificado. Luego la RNA polimerasa II puede terminar en múltiples sitios ubicados a lo largo de una distancia de 0,5-2 kb más allá de este sitio de adición poli(A). Experimentos con genes mutantes mostraron que la terminación está asociada con el proceso que escinde y poliadenila el extremo 3' de un transcripto, el cual se trata en el siguiente capítulo. Experimentos bioquímicos y de inmunoprecipitación de la cromatina sugieren que el complejo de proteínas que escinde y poliadenila el transcripto de mRNA naciente en secuencias específicas se asocia con el dominio carboxilo terminal fosforilado (CTD) de la RNA polimerasa II que sigue a la iniciación (véase fig. 11-27). Este complejo de escisión/poliadenilación puede suprimir la terminación por la RNA polimerasa II hasta que la secuencia de señalización de la escisión y poliadenilación sea transcripta por la polimerasa.

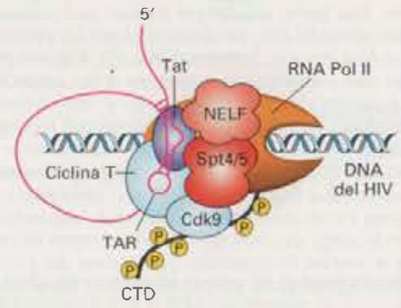
Mientras que la terminación de la transcripción no está regulada para la mayoría de los genes, para algunos genes específicos, se realiza una elección entre la elongación y la terminación o el pausado dentro de unas pocas decenas de bases a partir del sitio de inicio de la transcripción. Esta elección entre la elongación y la terminación o el pausado puede regularse; por ende la expresión de la proteína codificada está controlada no sólo mediante la iniciación de la transcripción, sino también mediante el control de la elongación de la transcripción al inicio de la unidad de transcripción. A continuación comentamos dos ejemplos de este tipo de regulación.

La transcripción del genoma del HIV está regulada por un mecanismo de antiterminación

Actualmente, la transcripción del genoma del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) por la RNA polimerasa II proporciona el ejemplo mejor comprendido de la terminación de la transcripción regulada en los eucariontes. La expresión eficaz de los genes del HIV requiere una pequeña proteína viral codificada en el locus *tat*. La células infectadas con mutantes *tat*⁻ producen transcriptos virales cortos que se hibridan a fragmentos de restricción que contienen regiones proximales del promotor de DNA del HIV, pero no con fragmentos de restricción más lejos en dirección 3' con respecto al promotor. Por el contrario, las células infectadas por HIV de tipo silvestre sintetizan transcriptos virales extensos que se hibridan a fragmentos de restricción de toda la unidad de transcripción única del HIV. Por lo tanto la proteína Tat actúa como un *factor antiterminación*, y permite que la RNA polimerasa II lea a través de un bloque transcripcional. Puesto que la antiterminación mediante la proteína Tat es necesaria para la replicación del HIV, una mejor comprensión de este mecanismo de control génico puede ofrecer posibilidades para el diseño de terapias eficaces para el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

La Tat es una proteína de unión al RNA específica de secuencia. Se une a la copia de RNA de una secuencia denominada TAR, ubicada cerca del extremo 5' del transcripto de HIV. La secuencia TAR se pliega para formar una horquilla de RNA con una protuberancia en el medio del tallo (fig. 11-45). La TAR contiene dos sitios de unión: uno que interactúa con Tat y uno que interactúa con una proteína celular llamada *ciclina T*. Como se representa en la figura 11-45, la proteína Tat del HIV y la ciclina T celular se unen cada una al RNA TAR y también interactúan directamente entre sí de manera tal que se unan cooperativamente, en gran parte de manera similar a la unión cooperativa de los factores de transcripción de unión al DNA (véase fig 11-24). La interacción de la ciclina T con una proteincinasa denominada CDK9 activa la cinasa, cuyo sustrato es el CTD de la RNA polimerasa II. Los estudios de transcripción in vitro que utilizan un inhibidor específico de la CDK9 sugieren que las moléculas de RNA polimerasa II que inician la transcripción del promotor HIV terminan luego de transcribir ≈50 bases a menos que el CTD sea hiperfosforilado por la CDK9. La unión cooperativa de la ciclina T y la Tat a la secuencia TAR en el extremo 5' del transcripto de HIV posiciona la CDK9 de manera tal que pueda fosforilar el CTD, lo que evita la terminación y permite que la polimerasa continúe la elongación de la cadena.

Varias proteínas celulares adicionales, incluidas las Spt4 y Spt5 y el complejo NELF, participan en el proceso median-



▲ Fig. 11-45. Modelo del complejo de antiterminación compuesto de la proteína Tat del HIV y varias proteínas celulares. El elemento *TAR* en el transcripto del HIV contiene secuencias reconocidas por Tat y la proteína celular ciclina T. La ciclina T activa y ayuda a posicionar la proteincinasa CDK9 cerca de su sustrato, el CTD de la RNA polimerasa II. Para más detalles véase el texto. (Véase P. Wei et al., 1998. Cell 92:451; T. Wada et al., 1998, Genes & Devel. 12:357; y Y. Yamaguchi et al., 1999, Cell 97:41.)

te el cual la Tat del HIV controla la elongación versus la terminación (véase fig. 11-45). Los experimentos con el inhibidor específico de la CDK9 arriba mencionado y con los mutantes de levadura *spt4* y *spt5* indican que estas proteínas celulares son necesarias para la elongación de la transcripción más allá de las ≈50 bases para la mayoría de los genes celulares. Pero para la mayoría de los genes, estas proteínas parecen funcionar constitutivamente, es decir, sin ser reguladas. Como se tratará en el capítulo 12, se cree que las pausas en la RNA polimerasa II, favorecidas por las Spt4/5 y el NELF retrasa la elongación hasta que los factores de procesamiento del mRNA se asocian con el CTD fosforilado. La posterior fosforilación del CTD por la ciclina T-CDK9 (también conocida como pTEFb) parece revertir esta pausa y permitir que la elongación continúe. No está claro por qué este proceso no es constitutivo para el promotor HIV, donde la unión cooperativa de la Tat del HIV y la ciclina T a la secuencia de RNA TAR es necesaria para una elongación eficiente.

En algunos genes de inducción rápida se produce una pausa proximal al promotor de la RNA polimerasa II

Los genes del *choque térmico* (p. ej., *hsp70*) ilustran otro mecanismo para regular la elongación de la cadena de RNA en los eucariontes. Durante la transcripción de estos genes, la RNA polimerasa II hace una pausa luego de transcribir ≈25 nucleótidos, pero no termina la transcripción (como sí lo hace cuando transcribe el genoma del HIV en ausencia de la proteína Tat). La polimerasa detenida permanece asociada con el RNA naciente y el DNA molde, hasta que las condiciones conduzcan a la activación del HSTF (factor de transcripción del choque térmico). La posterior unión del HSTF activado a sitios específicos en la región proximal del promotor de los genes del choque térmico estimula la polimerasa detenida a continuar la elongación de la cadena y promueve la rápida reiniciación mediante moléculas adicionales de RNA polimerasa II.

Las pausas durante la transcripción de los genes del choque térmico fueron descubiertas inicialmente en *Drosophila*, pero un mecanismo similar muy probablemente tiene lugar en otros eucariontes. Los genes del choque térmico son inducidos por condiciones intracelulares que desnaturalizan las proteínas (como temperatura elevada, "choque térmico"). Algunas proteínas codificadas son relativamente resistentes a las condiciones de desnaturalización y actúan protegiendo a otras proteínas de la desnaturalización; otras son chaperoninas que repliegan proteínas desnaturalizadas (véase cap. 3). El mecanismo de control transcripcional que evolucionó para regular la expresión de estos genes permite una rápida respuesta: estos genes ya contienen pausas en un estado de transcripción suspendida y por ende, cuando surge una emergencia no necesitan tiempo para remodelar y acetilar la cromatina por encima del promotor y ensamblar un complejo de preiniciación de la transcripción.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 11.7

Elongación regulada y terminación de la transcripción

- Diferentes mecanismos de terminación de la transcripción se emplean para cada una de las RNA polimerasas. La transcripción de la mayoría de los genes codificantes de proteínas no termina hasta que se sintetiza una secuencia de RNA que especifica un sitio de corte y poliadenilación.
- La transcripción del genoma del HIV por la RNA polimerasa II está regulada por un mecanismo de antiterminación que requiere la unión cooperativa mediante la proteína Tat codificada por el virus y la ciclina T a la secuencia *TAR* cerca del extremo 5' del RNA del HIV.
- Durante la transcripción de los genes del choque térmico de *Drosophila*, la RNA polimerasa II hace una pausa dentro de la región proximal del promotor en dirección 3'; esta interrupción en la transcripción se anula cuando el factor de transcripción HSTF se activa, lo que conduce a una transcripción muy veloz de los genes de choque térmico en respuesta a la acumulación de proteínas desnaturalizadas.

11.8 Otros sistemas de transcripción en los eucariontes

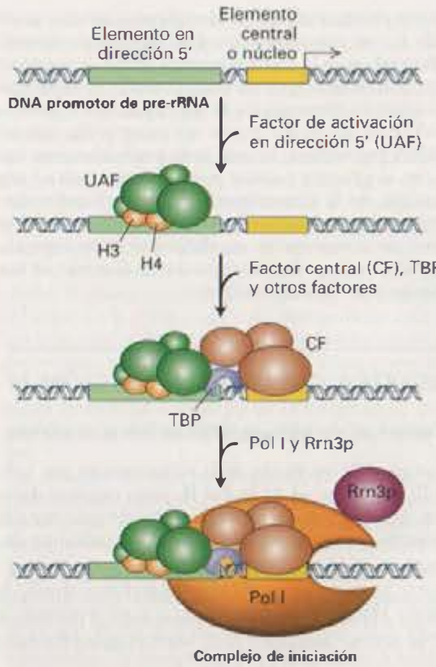
Concluimos este capítulo con una breve descripción de la iniciación de la transcripción por las otras dos RNA polimerasas nucleares de eucariontes, Pol I y Pol III, y por las diferentes polimerasas que transcriben el DNA mitocondrial y cloroplástico. Aunque estos sistemas, sobre todo su regulación, son menos comprendidos que la transcripción por la RNA polimerasa II, también son fundamentales para la vida de las células eucariontes.

La iniciación de la transcripción por Pol I y Pol III es análoga a la de la Pol II

La formación de los complejos de iniciación de la transcripción que involucran a Pol I y Pol III es similar en algunos aspectos al ensamblaje de los complejos de iniciación para la Pol II (véase la fig. 11-27). Sin embargo, cada una de las tres RNA polimerasas requiere sus propios factores generales de transcripción específicos de la polimerasa y reconocen diferentes elementos de control del DNA. Es más, ni la Pol I ni la Pol III necesitan la hidrólisis de ATP para iniciar la transcripción, mientras que la Pol II sí.

La iniciación de la transcripción por la Pol I, que sintetiza pre-rRNA, y por la Pol III, que sintetiza tRNA, 5S-rRNA, y otros RNA cortos y estables, fueron caracterizados más profundamente en *S. cerevisiae* empleando técnicas tanto bioquímicas como genéticas. Es claro que la síntesis de los tRNA y de los rRNA, que son incorporados a los ribosomas, está fuertemente asociada con la velocidad del crecimiento y la proliferación celular. Sin embargo, aún resta aprender mucho acerca de cómo se regula la iniciación de la transcripción por la Pol I y la Pol III de manera tal que la síntesis de pre-rRNA, 5S-rRNA y tRNA esté coordinada con el crecimiento y la replicación de las células.

Iniciación por la Pol I. Los elementos reguladores que dirigen la iniciación por la Pol I están localizados similarmente con relación al sitio de inicio de la transcripción tanto en las levaduras como en los mamíferos. Un *elemento central* que abarca el sitio de inicio de la transcripción desde la posición –40 a +5 es esencial para la transcripción por la Pol I. Un elemento *adicional en dirección 5'*, que se extiende desde alrededor de –155 a –60, estimula diez veces la transcripción in vitro por la Pol I.



▲ **Fig. 11-46. Ensamblaje in vitro del complejo de iniciación de la transcripción Pol I de la levadura.** Los factores generales de transcripción UAF y el CF, ambos multiméricos, se unen al elemento en dirección 5' (UE) y al elemento central o núcleo, respectivamente, en el DNA promotor. La TBP y un factor monomérico (Rm3p) asociado con la RNA polimerasa I (pol I) también participan en la formación del complejo de iniciación. (Adaptado de N. Nomura, 1998, en R. M. Paule, Transcription of Ribosomal RNA Genes by Eukaryotic RNA Polymerase I, Landes Bioscience, pp. 157-172.)

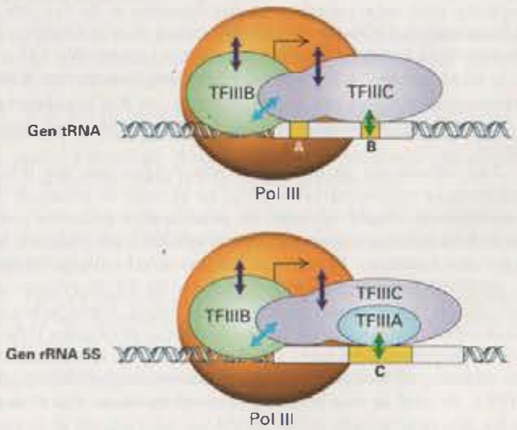
El ensamblaje de un complejo de iniciación de la Pol I completamente activo comienza con la unión de un factor de activación multimérico en dirección 5' (*upstream activating factor*, UAF) al elemento ubicado en dirección 5' (fig. 11-46). Dos de las seis subunidades que componen el UAF son histonas, que probablemente participan en la unión al DNA. A continuación un factor central trimérico se une al elemento central junto con la TBP, que hace contacto tanto con el UAF unido como con el factor central. Por último, un complejo preformado de Pol I y Rrn3p se asocia con las proteínas unidas, posicionando la Pol I cerca del sitio de inicio. En las células humanas, la TBP se une de manera estable a otros tres polipéptidos, formando un factor de iniciación denominado *SL1* que se une al elemento promotor central y es funcionalmente equivalente al factor central de la levadura más la TBP.

Iniciación por Pol II. A diferencia de los genes codificantes de proteínas y los genes de pre-rRNA, las regiones promotoras de los genes tRNA y 5S-rRNA están ubicadas en su totalidad dentro de la secuencia que se transcribe (fig 11-47.) Dos de tales elementos promotores *internos*, denominados *caja A* y *caja B*, están presentes en todos los genes de tRNA. Estas secuencias altamente conservadas no sólo funcionan como promotores sino que también codifican dos porciones invariantes de tRNA eucariontes necesarios para la síntesis de proteínas. En los genes de 5S-rRNA, una única región de control interna, la *caja C*, actúa como un promotor.

Se necesitan tres factores de transcripción generales para que la Pol III inicie la transcripción de los genes tRNA y 5S-rRNA in vitro. Dos factores multiméricos, el TFIIIC y el TFIIIB, participan en la iniciación tanto en promotores de tRNA como de 5S-rRNA; un tercer factor, el TFIIIA, es necesario para la iniciación en los promotores 5S-rRNA. Al igual que con el ensamblaje de los complejos de iniciación de la Pol I y la Pol II, los factores generales de transcripción de la Pol III se unen al DNA promotor en una secuencia definida.

La mitad N-terminal de una subunidad TFIIIB, denominada *BRF* (TFIIB-*r*elated *f*actor = *f*actor *r*elacionado con el TFIIB), es de secuencia similar al TFIIB (un factor de la Pol II). Esta similitud sugiere que el BRF y el TFIIB desempeñan una función similar en la iniciación, a saber, dirigir la polimerasa al sitio de inicio correcto. Una vez que el TFIIIB se ha unido a un gen de tRNA o a uno de 5S-rRNA, la Pol III puede unirse e iniciar la transcripción en presencia de ribonucleósidos trifosfatos. La subunidad BRF del TFIIIB interactúa específicamente con una de las subunidades de la polimerasa exclusivas de la Pol III, dando cuenta de la iniciación por esta RNA polimerasa específica.

Otra de las tres subunidades que componen la TFIIIB es la TBP, la cual podemos ver ahora como un componente de un factor general de transcripción para las tres RNA polimerasas nucleares eucariontes. El hallazgo de que la TBP participa en la iniciación de la transcripción por la Pol I y la Pol III fue sorprendente, puesto que los promotores reconocidos por estas enzimas a menudo no contienen cajas TATA. Sin embargo, estudios recientes indican que la subunidad TBP de la TFIIIB interactúa con el DNA de manera similar a la forma en que interactúa con las cajas TATA.



▲ **Fig. 11-47. Elementos de control de la transcripción en genes transcriptos por la RNA polimerasa III.** Tanto los genes de tRNA como de 5S-rRNA contienen elementos promotores internos (amarillo) ubicados en dirección 3' del sitio de inicio y denominados cajas A, B y C, como se indica. El ensamblaje de los complejos de iniciación de la transcripción sobre estos genes comienza con la unión de los factores generales de transcripción específicos de la Pol III TFIIIA, TFIIIB y TFIIIC a estos elementos de control. Las flechas verdes indican fuertes interacciones DNA-proteína específica de secuencia. Las flechas azules indican interacciones entre los factores generales de transcripción. Las flechas violetas indican interacciones entre los factores generales de transcripción y la Pol III (De L. Schramm y N. Hernandez, 2002, Genes Dev. 16:2593.)

El DNA mitocondrial y el de los cloroplastos son transcriptos por RNA polimerasas específicas de los orgánulos

Como se trató en el capítulo 10, las mitocondrias y los cloroplastos probablemente evolucionaron a partir de bacterias que fueron endocitadas en células ancestrales que contenían un núcleo eucarionte. En los eucariontes contemporáneos, ambos orgánulos contienen DNA circulares diferentes que codifican algunas de las proteínas esenciales para sus funciones específicas. Las RNA polimerasas que transcriben el DNA mitocondrial (mt) y el DNA de los cloroplastos son similares a las polimerasas de bacterias y bacteriófagos.

RNA polimerasa mitocondrial. La RNA polimerasa que transcribe el mtDNA está codificada en el DNA nuclear. Luego de la síntesis de la enzima en el citosol, ésta es incorporada a la matriz mitocondrial mediante mecanismos descritos en el capítulo 16. Las RNA polimerasas mitocondriales de *S. cerevisiae* y de la rana *Xenopus laevis* están constituidas por una subunidad grande con actividad polimerizadora de ribonucleótidos y una subunidad pequeña, o factor de especificidad, esencial para la iniciación de la transcripción en los sitios de inicio del mtDNA utilizados por la célula. La subunidad grande de la RNA polimerasa mitocondrial de levadura está relacionada claramente con las RNA polimerasas monoméricas del bacteriófago T7 y de bacteriófagos similares. Sin embargo, la enzima mitocondrial es funcionalmente distinta de la enzima bacteriófaga en cuanto a su dependencia de la subunidad pequeña para la transcripción a partir de los sitios de inicio apropiados. Esta subunidad pequeña está relacionada con los factores σ de las RNA polimerasas bacterianas, que interactúan con el DNA promotor y funcionan como factores de iniciación. Por lo tanto la RNA polimerasa parece ser un híbrido entre las RNA polimerasas simples del bacteriófago y las RNA polimerasas bacterianas de multisubunidades de complejidad intermedia.

Las secuencias promotoras reconocidas por las RNA polimerasas mitocondriales incluyen el sitio de inicio de la transcripción. Estas secuencias promotoras ricas en residuos A fueron caracterizadas en el mtDNA de plantas, levaduras y animales. El genoma mitocondrial circular humano contiene dos secuencias promotoras de 15 pb relacionadas, una para la transcripción de cada hebra. Cada hebra se transcribe en su totalidad; los transcriptos primarios largos son luego procesados para generar los mRNA mitocondriales, rRNA y tRNA. Una proteína básica pequeña llamada *mtTF1*, la cual se une inmediatamente en dirección 5' desde los dos promotores mitocondriales, estimula en gran medida la transcripción. Una proteína homóloga hallada en las mitocondrias de la levadura es necesaria para el mantenimiento del mtDNA y probablemente desempeñe una función similar.

RNA polimerasa de los cloroplastos. A diferencia de la RNA polimerasa mitocondrial, la enzima que transcribe el DNA del cloroplasto es codificada por el genoma del propio cloroplasto. Esta RNA polimerasa tiene subunidades de considerable homología con las subunidades α, β y β′ de la RNA polimerasa de *E. coli*, pero aparentemente carece de una subunidad equivalente al factor σ de *E. coli*.

Algunos promotores de los cloroplastos evocan al promotor σ^{70} de *E. coli* con secuencias similares en las regiones –10 y –35. Sin embargo, la transcripción a partir de un promotor del cloroplasto depende de secuencias desde alrededor de –20 a +60, bastante diferentes de la mayoría de los promotores de *E. coli*. Este promotor puede ser reconocido por una segunda RNA polimerasa, la cual muy probablemente está codificada en el genoma nuclear y sea incorporada al orgánulo. El análisis de la transcripción del cloroplasto todavía se encuentra en sus comienzos, pero ya es obvio que al menos un sistema de transcripción es altamente homólogo al de la transcripción de *E. coli* y otras bacterias a partir de las cuales evolucionaron los cloroplastos.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 11.8

Otros sistemas de transcripción en los eucariontes

- El proceso de iniciación de la transcripción por la Pol I y la Pol III es similar al de la Pol II, pero requiere diferentes factores de transcripción generales, está dirigida por diferentes elementos promotores y no necesita la hidrólisis de ATP.
- El DNA mitocondrial es transcripto por una RNA polimerasa compuesta de dos subunidades. Una subunidad es homóloga a la RNA polimerasa monomérica del bacteriófago T7; la otra se asemeja a la de los factores σ bacterianos.
- El DNA del cloroplasto se transcribe mediante una RNA polimerasa codificada por el cloroplasto homóloga a las RNA polimerasas bacterianas, excepto que carecen de un factor σ.

PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO

En los últimos años se ha aprendido mucho acerca del control de la transcripción en los eucariontes. En el genoma humano se pueden reconocer los genes que codifican alrededor de 2.000 activadores y represores. Ahora tenemos un atisbo de cómo la cantidad astronómica de combinaciones posibles de estos factores de transcripción puede generar la complejidad del control génico necesario para producir organismos tan notables como los que vemos a nuestro alrededor. Pero aún falta mucho por entender. Si bien comprendemos un poco los procesos que encienden y apagan un gen, ignoramos cómo está controlada la frecuencia de transcripción de manera tal de proveer a una célula con las cantidades apropiadas de sus diversas proteínas. En un precursor del glóbulo rojo, por ejemplo, los genes de las globinas son transcriptos a una velocidad mucho mayor que la de los genes que codifican las enzimas de metabolismo intermediario. ¿Cómo se consiguen las vastas diferencias de frecuencia de iniciación de la transcripción? ¿Qué ocurre con las múltiples interacciones entre dominios de activación, complejos coactivadores, factores generales de transcripción y con la RNA polimerasa II cuando la polimerasa inicia la transcripción y transcribe alejándose de la región promotora? ¿Se disocian completamente de los promotores que se transcriben con poca frecuencia, de manera tal que las combinaciones de múltiples factores necesarias para la transcripción deben reensamblarse nuevamente para cada ciclo de transcripción? ¿Permanecen los complejos de los activadores con sus múltiples coactivadores ensamblados en los promotores desde los cuales tiene lugar la reiniciación a una alta velocidad, para que el ensamblaje no tenga que ser reconstruido cada vez que una polimerasa la inicia?

Aún resta mucho por aprender acerca de la estructura de la cromatina y de cómo esta estructura influye en la transcripción. ¿Qué dirige ciertas regiones de la cromatina a formar heterocromatina donde la transcripción está reprimida? Precisamente, ¿cómo es alterada la estructura de la cromatina por los activadores y represores, y cómo esto promueve o inhibe la transcripción? Una vez que los complejos de remodelación de la cromatina y de histona acetilasa se asocian con una región promotora, ¿cómo permanecen asociados? ¿Se asocian ciertas subunidades de estos complejos con colas de histona modificadas de modo que los complejos adicionales se asocian a lo largo de la longitud de una fibra de cromatina a medida que se modifican las histonas adicionales?

Se ha descubierto que los dominios de activación individuales interactúan con varios complejos coactivadores. ¿Son transitorias estas interacciones, de manera tal que el mismo dominio de activación pueda interactuar con varios coactivadores secuencialmente? ¿Se necesita una orden específica de interacción de coactivadores? ¿De qué manera la interacción de los dominios de activación con el mediador estimula la transcripción? ¿Estimulan de manera simple estas interacciones el ensamblaje de complejos de preiniciación o también influyen en la velocidad a la cual la RNA polimerasa II inicia la transcripción a partir de un complejo de preiniciación ensamblado?

La activación transcripcional es un proceso altamente cooperativo de manera tal que los genes expresados en un tipo de célula específica son expresados sólo cuando se expresa y activa el conjunto completo de activadores que controlan a ese gen. Como ya se mencionó, algunos de los factores de transcripción que controlan la expresión del gen *TTR* en el hígado también se expresan en las células del intestino y del riñón. Sin embargo, el gen *TTR* no se expresa en estos otros tejidos ya que su transcripción requiere dos factores de transcripción que sólo se expresan en el hígado. ¿Qué mecanismos dan cuenta de esta acción altamente cooperativa de los factores de transcripción que es crítica para la expresión génica específica del tipo de célula?

Una comprensión exhaustiva del desarrollo normal y de los procesos anormales asociados con enfermedad requerirá respuestas a estas y a muchas otras preguntas. A medida que se vaya logrando una mayor comprensión de los principios del control de la transcripción, probablemente se realicen aplicaciones del conocimiento. Este entendimiento puede permitir un control fino de la expresión de genes terapéuticos introducidos mediante vectores de terapia génica a medida que sean desarrollados. La comprensión detallada de las interacciones moleculares que regulan la transcripción puede proveer nuevos objetivos para el desarrollo de fármacos que inhiban o estimulen la expresión de genes específicos. Una comprensión más completa de los mecanismos de control de la transcripción puede permitir un diseño mejorado de cultivos con características deseables. Sin duda, los avances futuros en el área del control transcripcinal ayudarán a satisfacer nuestro deseo de comprender cómo los organismos complejos, como nosotros mismos, se desarrollan y funcionan.

PALABRAS CLAVE

activadores *449*
amplificadores *456*
amplificosoma *468*
caja TATA *454*
coactivador *467*
código de histonas *476*
cremallera de leucina *464*
dedo de cinc *463*
desacetilación de histonas *474*
dominio carboxiterminal (CTD) *452*
dominio de activación *461*
dominio de represión *462*
elementos proximales del promotor *455*
factores de antiterminación *485*
factores generales de transcripción *469*
footprinting con DNasa I *458*
genes de choque térmico *486*
locus *MAT* (en levaduras) *471*
mediador *471*
promotor *449*
receptores nucleares *464*
represión mediada por cromatina *471*
represores *449*
RNA polimerasa II *450*
secuencias activadoras en dirección 5' (UAS) *457*
secuencias silenciadoras *472*
sistema de dos híbridos de levadura *480*

REVISIÓN DE CONCEPTOS

1. ¿Cuál es la evidencia de que la iniciación transcripcional es el principal mecanismo del control génico en los organismos complejos?

2. ¿Qué tipos de genes transcriben las RNA polimerasas I, II y III? Diseñe un experimento para determinar si un gen específico es transcripto por la RNA polimerasa II.

3. El CTD de la subunidad mayor de la RNA polimerasa II puede ser fosforilado e hiperfosforilado en diversos residuos de serina y tirosina. ¿Cuáles son las condiciones que conducen a la fosforilación o a la hiperfosforilación?

4. ¿Qué tienen en común las cajas TATA, los iniciadores y las islas CpG? ¿Cuál de éstas fue la primera en ser identificada?¿Por qué?

5. Describa el método empleado para identificar la localización de los elementos de control del DNA en las regiones reguladoras de los genes.

6. ¿Cuál es la diferencia entre los elementos proximales del promotor y un amplificador distal?

7. Describa los métodos empleados para identificar la localización de las proteínas de unión al DNA en las regiones reguladoras de los genes.

8. Describa las características estructurales del activador transcripcional y de las proteínas represoras.

9. ¿Qué sucede con la transcripción del gen *EGR-1* en los pacientes con tumor de Wilm? ¿Por qué?

10. Empleando el CREB y los receptores nucleares como ejemplos, compare y contraste los cambios estructurales que tienen lugar cuando estos factores de transcripción se unen a sus coactivadores.

11. ¿Qué cambios estructurales tienen lugar en los promotores de la polimerasa II durante la formación del complejo de preiniciación?

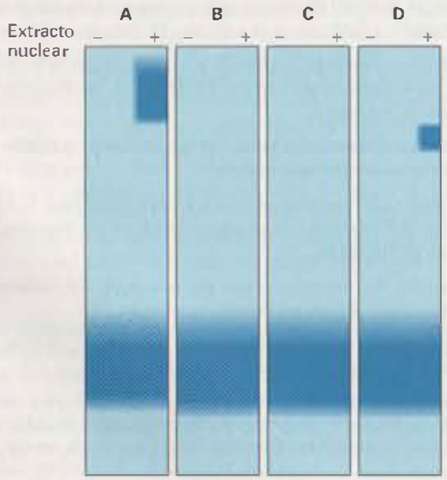
12. La expresión de proteínas recombinantes en las levaduras constituye una herramienta importante de las compañías de biotecnología que producen nuevos fármacos para uso humano. En un intento de obtener un nuevo gen *X* expresado en la levadura, un investigador integró un gen *X* al genoma de la levadura cerca de un telómero. ¿Dará resultado esta estrategia en la expresión adecuada del gen X?¿Por qué sí o por qué no?¿ Diferirá el resultado si el experimento hubiera sido realizado en una línea de levaduras que contuviera mutaciones en las colas de histonas H3 y H4?

13. Usted aisló una nueva proteína denominada STICKY. Puede predecir, a partir de comparaciones con otras proteínas conocidas que la STICKY contiene un dominio bHLH y un dominio de interacción con Sin3. Prediga la función de STICKY y el fundamento de la importancia de estos dominios en la función de STICKY.

14. Describa al menos un gen que usted esperaría ser capaz de clonar empleando los siguientes genes como carnada en un experimento de dos híbridos de levadura: alfa-globina; la subunidad catalítica de la proteincinasa A y la subunidad catalítica de la aspartato transcarbamilasa.

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Se realizó un ensayo de retraso de la movilidad electroforética (EMSA) empleando un fragmento de DNA radiomarcado de la secuencia del gen *X en dirección 5'*. Esta sonda de DNA se incubó con (+) un extracto nuclear aislado o sin (–) él, de los tejidos A (hueso); B (pulmón); C (cerebro) y D (piel). Luego los complejos DNA:proteína fueron fraccionados en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes. Los geles fueron expuestos a una película autorradiográfica; los resultados se presentan en la figura.



a. ¿Qué tejidos contienen una actividad de unión que reconoce la secuencia del gen X? ¿Es el factor de transcripción el mismo en cada tejido?

b. Si la actividad de unión fue purificada, ¿qué prueba podría efectuarse para verificar que este factor es realmente un factor de transcripción?

c. ¿Qué tipo de ensayo podría realizarse para determinar la(s) secuencia(s) de DNA específica(s) a la(s) cual(es) se une el factor de transcripción?

d. Si el gen X se transcribe en el tejido del pulmón y del cerebro, pero no en los tejidos óseo y epitelial, ¿qué tipo de factor de transcripción es la actividad de unión? Especule de forma tal de identificar los otros factores que podrían estar formando complejo en el promotor del gen *X* en los tejidos óseo y epitelial.

BIBLIOGRAFÍA

Panorama general del control génico en los eucariontes y las RNA polimerasas

Cramer, P. 2002. Multisubunit RNA polymerases. Curr. Opin. Struc. Biol. 12:89-97.

Secuencias reguladoras en los genes codificantes de proteínas

Blackwood, E. M., and J. T. Kadonaga. 1998. Going the distance: a current view of enhancer action. Science 281:60-63.

Butler, J. E., and J. T. Kadonaga. 2002. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. Genes Dev. 16:2583-2592.

http://www.epd.isb-sib.ch/promoter_elements

Activadores y represores de la transcripción

Brivanlou, A. H., and J. E. Darnell, Jr. 2002. Signal transduction and the control of gene expression. Science 295:813-818.

Luscombe, N. M., et al. 2000. An overview of the structures of protein-DNA complexes. Genome Biol. 1:1-37.

Riechmann, J. L., et al. 2000. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. Science 290:2105-2110.

Tupler, R., G. Perini, and M. R. Green. 2001. Expressing the human genome. Nature 409:832-833.

Iniciación de la transcripción por la RNA polimerasa II

Woychik, N. A., and M. Hampsey. 2002. The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. Cell 108:453-463.

Mecanismos moleculares de la activación y represión de la transcripción

Berger, S. L. 2002. Histone modifications in transcriptional regulation. Curr. Opin. Genet. Dev. 12:142-148.

Boube, M., et al. 2002. Evidence for a mediator of RNA polymerase II transcriptional regulation conserved from yeast to man. Cell 110:143-151.

Courey, A. J., and S. Jia. 2001. Transcriptional repression: the long and the short of it. Genes Dev. 15:2786-2796.

Horn, P. J., and C. L. Peterson. 2002. Chromatin Higher Order Folding—Wrapping up Transcription. Science 297:1824-1827.

Richards, E. J., and S. C. Elgin. 2002. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. Cell 108:489-500.

Regulación de la actividad de los factores de transcripción

Hermanson, O., C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld. 2002. Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. Trends Endocrinol. Metab. 13:55-60.

Lin, R. J., et al. 1998. The transcriptional basis of steroid physiology. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 63:577-585.

McKenna, N. J., and B. W. O'Malley. 2002. Minireview: nuclear receptor coactivators—an update. Endocrinol. 143:2461-2465.

Yamamoto, K. R. 1995. Multilayered control of intracellular receptor function. Harvey Lect. 91:1-19.

Elongación regulada y terminación de la transcripción

Garber M. E., and K. A. Jones. 1999. HIV-1 Tat: coping with negative elongation factors. Curr. Opin. Immunol. 11:460-465.

Kim, D. K., et al. 2001. The regulation of elongation by eukaryotic RNA polymerase II: a recent view. Mol. Cells 11:267-274.

Lis, J. 1998. Promoter-associated pausing in promoter architecture and postinitiation transcriptional regulation. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 63:347-356.

Price, D. H. 2000. P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. Mol. Cell Biol. 20:2629-2634.

Otros sistemas de transcripción en los eucariontes

Paule, M. R., and R. J. White. 2000. Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. Nucl. Acids Res. 28: 1283-1298.

Schramm, L., and N. Hernandez. 2002. Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. Genes Dev. 16:2593-2620.

12

CONTROL GÉNICO POSTRANSCRIPCIONAL Y TRANSPORTE NUCLEAR



Porción de un "cromosoma en escobilla" (plumulado) de un ovocito del tritón *Nophthalmus viridescens;* las proteínas hnRNP asociadas con los transcriptos de RNA nacientes presentan fluorescencia roja luego de ser teñidas con un anticuerpo monoclonal (Cortesía de M. Roth y J. Gall.)

En los capítulos anteriores vimos que la regulación de la mayoría de los genes se produce en el primer paso de la expresión génica, sobre todo, la iniciación de la transcripción. Sin embargo, una vez que la transcripción se ha iniciado la síntesis del RNA codificado requiere que la RNA polimerasa transcriba el gen entero y no termine prematuramente. Más aún, los transcriptos primarios producidos a partir de los genes eucariontes deben sufrir diversas reacciones de procesamiento para producir los RNA correspondientes funcionales. Una vez formados en el núcleo, los RNA funcionales maduros se transportan al citoplasma como componentes de las ribonucleoproteínas. Tanto el procesamiento del RNA como su salida desde el núcleo ofrecen oportunidades adicionales para regulaciones génicas en etapas posteriores a la iniciación de la transcripción. El control adicional de la expresión génica puede tener lugar en el citoplasma. En el caso de los genes codificantes de proteínas, por ejemplo, la cantidad de proteína producida depende de la estabilidad de los mRNA correspondientes en el citoplasma y de la velocidad de su traducción. Además, las localizaciones celulares de algunos mRNA están reguladas de manera tal que las proteínas recién sintetizadas se concentren donde es necesario.

Todos los mecanismos que regulan la expresión génica después de la transcripción se agrupan bajo el nombre de *control postranscripcional de genes* (fig. 12-1). Aunque estos mecanismos suelen cumplir un papel general más pequeño en el control génico que la activación o represión de la iniciación de la transcripción, son críticos en la regulación de la expresión de algunos genes. En este capítulo consideramos los eventos que tienen lugar en el procesamiento de mRNA que siguen a la iniciación de la transcripción y a los diversos mecanismos que se sabe regulan estos eventos. En la última sección, presentamos brevemente el procesamiento de los transcriptos primarios producidos a partir de los genes que codifican rRNA y tRNA.

12.1 Procesamiento del pre-mRNA eucarionte

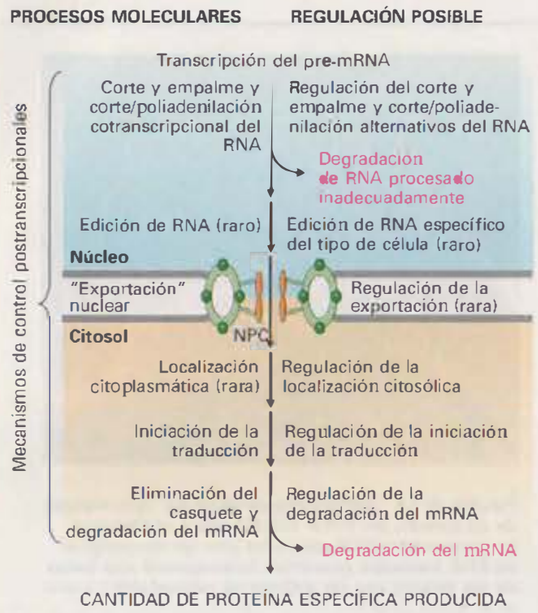
En esta sección observamos con mayor detalle cómo las células eucariontes convierten el transcripto primario inicial sintetizado por la RNA polimerasa II en un mRNA funcional. Tres eventos principales tienen lugar durante el proceso: *la formación del casquete 5', corte/poliadenilación 3',* y el *corte y empalme del RNA* (fig. 12-2). El procesamiento tiene lugar en el núcleo a medida que el precursor de mRNA naciente se transcribe y el mRNA funcional producido es transportado al citoplasma mediante mecanismos que se comentan más adelante.

El casquete 5' se añade a los RNA nacientes poco después de la iniciación por la RNA polimerasa II

Después de que las moléculas de RNA nacientes producidas por la RNA polimerasa II alcanzan una longitud de 25-30 nucleótidos, se añaden a sus extremos 5' la 7-metilguanosina

CONTENIDO

12.1 Procesamiento del pre-mRNA eucarionte
12.2 Regulación del procesamiento del pre-mRNA
12.3 Transporte de macromoléculas a través de la envoltura nuclear
12.4 Mecanismos citoplasmáticos de control postranscripcional
12.5 Procesamiento del rRNA y del tRNA



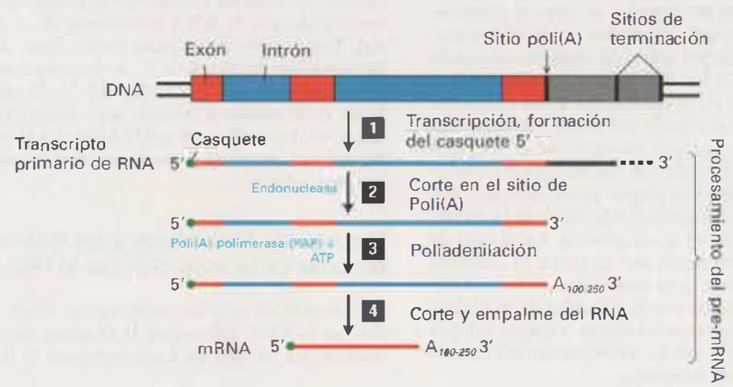
▲ Fig. 12-1. Visión general del control postranscripcional de los genes codificantes de proteínas. El control puede ejercerse a medida que se procesa el transcripto primario en el núcleo, durante la salida de un mRNA hacia el citoplasma, o en el citoplasma. Cualquiera de los genes probablemente sería regulado sólo por uno o unos pocos mecanismos de control posibles.

y los otros componentes del *casquete 5'* hallado en los mRNA eucariontes (véase fig. 4-13). Este paso inicial en el procesamiento del RNA es catalizado por una enzima dimérica formadora del casquete, la cual se asocia con el *dominio carboxilo terminal (CTD)* de la RNA polimerasa II. Cabe recordar que el CTD se fosforila durante la iniciación de la transcripción (véase fig. 11-27). Debido a que la enzima formadora del casquete no se asocia con la polimerasa I o III, que no contienen un CTD, la formación del casquete es específica de los transcriptos producidos por la RNA polimerasa II.

Una subunidad de la enzima formadora del casquete elimina el fosfato γ del extremo 5' del RNA naciente, que emerge de la superficie de una RNA polimerasa II. Otro dominio de esta subunidad transfiere la parte GMP del GTP al difosfato 5' del transcripto naciente y crea la estructura inusual guanosina 5'-5'-trifosfato. En los pasos finales, enzimas diferentes transfieren grupos metilo de la *S*-adenosilmetionina a la posición N_7 de la guanina y a los oxígenos 2' de las ribosas en el extremo 5' del RNA naciente.

Los pre-mRNA se asocian con proteínas hnRNP que contienen dominios de unión al RNA conservados

Los transcriptos de RNA nacientes de los genes codificantes de proteínas y los intermediarios del procesamiento del mRNA, denominados colectivamente pre-mRNA, no existen como moléculas de RNA libres en el núcleo de las células eucariontes. Desde el momento en que los transcriptos nacientes emergen de la RNA polimerasa II hasta que los mRNA maduros son transportados hasta el citoplasma, las moléculas de RNA se asocian con un abundante conjunto de proteínas



▲ Fig. 12-2. Visión general del procesamiento del mRNA en los eucariontes. Poco después de que la RNA polimerasa II inicia la transcripción en el primer nucleótido del primer exón de un gen, el extremo 5' del RNA naciente adquiere un casquete de 7-metilguanilato (paso 1). La transcripción por la RNA polimerasa II termina en cualquiera de los múltiples sitios de terminación en dirección 3' del sitio poli(A), que está localizado en el extremo 3' del último exón. Después que el transcripto primario es cortado en el sitio poli(A) (paso 2), se añade una cadena de residuos de adenosina (A) (paso 3). La cola de poli(A) contiene ≈250 residuos A en los mamíferos, ≈150 en los insectos y ≈100 en las levaduras. Para los transcriptos primarios cortos con pocos intrones, el corte y empalme (paso 4) suele seguir al corte y poliadenilación, como se muestra aquí. Para genes grandes con múltiples intrones, los intrones suelen ser eliminados del RNA naciente, mediante corte y empalme, durante su transcripción, es decir, antes de que se complete la transcripción del gen. Nótese que el casquete 5' y la secuencia adyacente a la cola de poli(A) son retenidos en los mRNA maduros.

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación general: Ciclo de vida de un mRNA

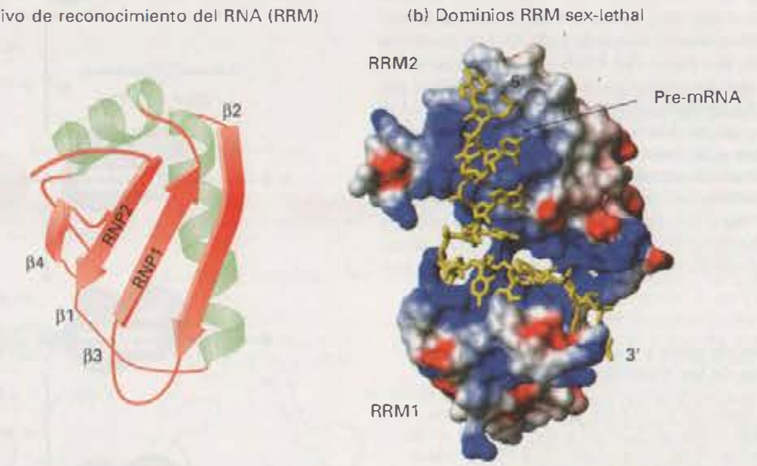
nucleares. Estas proteínas son los componentes proteicos principales de las *partículas ribonucleoproteicas heterogéneas (hnRNP)*, que contienen *RNA heterogéneo nuclear (hnRNA)*, un término colectivo para los pre-mRNA y otros RNA nucleares de diversos tamaños. Las proteínas en estas partículas ribonucleoproteicas pueden visualizarse de manera espectacular con anticuerpos monoclonales marcados con fluorescencia (véase fig. de apertura del capítulo).

Los investigadores identificaron inicialmente las proteínas de hnRNP exponiendo células cultivadas a altas dosis de radiación UV, lo cual hace que se formen enlaces cruzados covalentes entre las bases del RNA y las proteínas estrechamente asociadas. Se hizo una cromatografía de los extractos nucleares de células tratadas usando columnas de celulosa con oligo-dT, que une los RNA con una cola poli(A), para recuperar las proteínas que se habían unido mediante enlaces cruzados con los RNA nucleares poliadenilados. El tratamiento posterior de los extractos celulares de células no irradiadas con anticuerpos monoclonales específicos contra las principales proteínas identificadas mediante esta técnica de entrecruzamiento permitió revelar un grupo complejo de abundantes proteínas hnRNP cuyo tamaño oscila entre 34 y 120 kDa.

Al igual que los factores de transcripción, la mayoría de las proteínas hnRNP tienen una estructura modular. Contienen uno o más dominios de unión al RNA y al menos otro dominio que, según se cree, interactúa con otras proteínas. Se identificaron varios motivos diferentes de unión al RNA mediante construcciones con deleciones de proteínas hnRNP y probando su capacidad para unir RNA.

Motivos de unión al RNA conservados. El *motivo de reconocimiento del RNA (RRM)*, también denominado motivo RNP y dominio de unión al RNA (RBD), es el dominio de unión al RNA más común en las proteínas de hnRNP. Este dominio de ≈80 residuos, presente en muchas otras proteínas de unión al RNA, contiene dos secuencias altamente conservadas (RNP1 y RNP2) que permiten que el motivo sea reconocido en los genes recién secuenciados. El análisis cristalográfico de rayos X permitió mostrar que el dominio RRM consiste en una hoja β de cuatro hebras flanqueada en un lado por dos hélices α. Las secuencias RNP1 y RNP2 conservadas se ubican a cada lado sobre las dos hebras β centrales, y sus cadenas laterales establecen múltiples contactos con una región monocatenaria de RNA (fig. 12-3). El RNA monocatenario se ubica a lo largo de la superficie de la hoja β, con las hebras RNP1 y RNP2 que forman una superficie cargada positivamente que interactúa con los fosfatos del RNA cargados negativamente.

La *caja RGG*, otro motivo de unión al RNA que se encuentra en proteínas hnRNP, contiene cinco repeticiones Arg-Gly-Gly (RGG) con varios aminoácidos aromáticos entremezclados. Aunque aún no se determinó la estructura de este motivo, su naturaleza rica en arginina es similar a la de los dominios de unión al RNA de la proteína Tat del HIV. El *motivo KH* de 45 residuos se encuentra en la proteína hnRNP denominada K y en otras proteínas de unión al RNA; comúnmente hay dos o más copias del motivo KH intercaladas con repeticiones RGG. La estructura tridimensional de los dominios KH representativos es similar a la de los dominios RRM, pero más pequeña, compuesta de una lámina β de tres hebras sustentadas desde uno de los lados por dos hélices α. El RNA se une al motivo KH mediante interacciones con una superficie hidrófoba formada por las hélices α y una cadena β. Por lo tanto, a pesar de



▲ Fig. 12-3. Estructura del dominio RRM y su interacción con el RNA. (a) Diagrama del dominio RRM que muestra las dos hélices α y las cuatro hebras β que caracterizan este motivo. Las regiones conservadas RNP1 y RNP2 se localizan en las dos hebras β centrales. (b) Representación de la superficie de los dos dominios RRM en la proteína Sex-lethal (Sxl) de *Drosophila* que une una secuencia de seis bases en el pre-mRNA *transformer* (verde). Los dos RRM están orientados como las dos partes de un par de castañuelas abiertas, con la hoja β del RRM1 orientada hacia arriba y la hoja β del RRM2 orientada hacia abajo. Las regiones cargadas positivamente en la proteína Sxl se muestran en sombreado azul; las regiones cargadas negativamente, en sombreado rojo. El pre-mRNA está unido a las superficies de las láminas β cargadas positivamente y hace contacto mayormente con las regiones RNP1 y RNP2 de cada RRM. [Parte (a) adaptada de K. Nagai et al., 1995, *Trends Biochem. Sci.* 20:235; parte (b) N. Harada et al., 1999, *Nature* 398:579.]

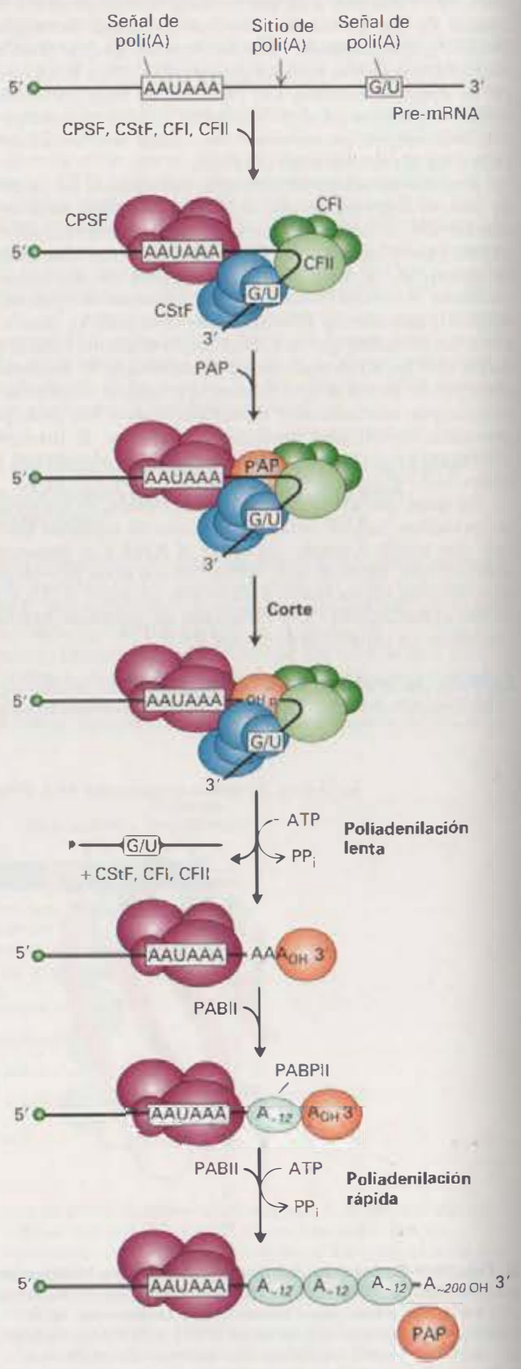
la similitud en sus estructuras, los dominios RRM y KH interactúan en forma diferente con el RNA.

Funciones de las proteínas hnRNP. La asociación de los pre-mRNA con proteínas hnRNP evita la formación de estructuras secundarias cortas dependientes del apareamiento de bases de regiones complementarias, con lo cual los pre-mRNA se tornan accesibles para la interacción con otras moléculas de RNA o proteínas. Los pre-mRNA asociados con proteínas hnRNP presentan un sustrato más uniforme para los pasos de procesamiento adicionales que el que presentarían los pre-mRNA libres no unidos a proteínas, de los cuales cada tipo forma una estructura secundaria única dependiente de su secuencia específica.

Los estudios de unión con proteínas hnRNP purificadas sugieren que diferentes proteínas hnRNP se asocian con distintas regiones de una molécula de pre-mRNA recién sintetizada. Por ejemplo, las proteínas hnRNP A1, C y D se unen con frecuencia a las secuencias ricas en pirimidina en los extremos 3' de los intrones (véase sección posterior). Esta observación sugiere que algunas proteínas hnRNP pueden interactuar con las secuencias de RNA que especifican el corte y empalme del RNA o el corte/poliadenilación y contribuyen a la estructura reconocida por los factores de procesamiento del RNA. Por último, los experimentos de fusión celular demostraron que algunas proteínas hnRNP permanecen en el núcleo, mientras que otras circulan hacia adentro y hacia afuera del citoplasma, lo que sugiere que intervienen en el transporte del mRNA. En la sección 12.3 tratamos el papel de estas proteínas en el transporte nuclear.

El corte y la poliadenilación 3' de los pre-mRNA están estrechamente acoplados

En las células eucariontes, todos los mRNA, excepto el mRNA de las histonas, tienen una *cola poli(A)*. Los primeros estudios de marcado por pulso del RNA de adenovirus y del SV40 demostraron que los transcriptos virales primarios se extienden más allá del sitio en los mRNA virales desde el cual se extienden las colas poli(A). Estos resultados indicaron que los residuos A se añaden a un hidroxilo 3' generado por escisión endonucleolítica de un transcripto más largo, pero los fragmentos de RNA previstos en dirección 3' nunca se detectaron in vivo, debido tal vez a su rápida degradación. Que el corte de un transcripto primario precede a su poliadenilación se estableció firmemente mediante la detección de ambos productos de corte pronosticados en las reacciones de procesamiento in vitro realizadas con extractos nucleares de células HeLa.



▶ Fig. 12-4. Modelo de corte y poliadenilación de los pre-mRNA en las células de los mamíferos. El factor de especificidad de corte y poliadenilación (CPSF) se une a la señal de poli(A) AAUAAA en dirección 5'. El CStF interactúa con una secuencia en dirección 3' rica en GU o U y con el CPSF unido, formando un bucle en el RNA; la unión de CFI y CFII ayuda a estabilizar el complejo. Luego, la unión de las poli(A) polimerasas (PAP) estimula el corte en un sitio poli(A), el cual suele ubicarse 10-35 nucleótidos 3' de la señal de poli(A). Los factores de corte se liberan, al igual que el producto del corte del RNA, que se degrada rápidamente. Las PAP unidas luego añaden lentamente ≈12 residuos A al grupo hidroxilo 3' generado por la reacción de corte. La unión de la proteína de unión a poli(A) II (PABPII) a la cola de poli(A) corta inicial acelera la velocidad de adición por la PAP. Luego de que se han añadido 200-250 residuos A, la PABPII envía una señal a la PAP para que detenga la polimerización.

Las primeras secuenciaciones de clones de cDNA de células animales mostraron que casi todos los mRNA contienen la secuencia AAUAAA 10-35 nucleótidos en dirección 5' de la cola poli(A). La poliadenilación de los transcriptos de RNA se elimina virtualmente cuando la secuencia correspondiente en el DNA molde es mutada a cualquier otra secuencia a excepción de una que codifique una secuencia estrechamente relacionada (AUUAAA). Los transcriptos de RNA no procesados producidos a partir de tales moldes mutantes no se acumulan en el núcleo, sino que son degradados enseguida. Los estudios adicionales de mutagénesis revelaron que es necesaria una segunda señal en dirección 3' del sitio de corte para el corte y poliadenilación eficientes de la mayoría de los pre-mRNA de las células animales. Esta señal en dirección 3' no es una secuencia específica sino una región rica en U o rica en GU dentro de los ≈50 nucleótidos del sitio de corte.

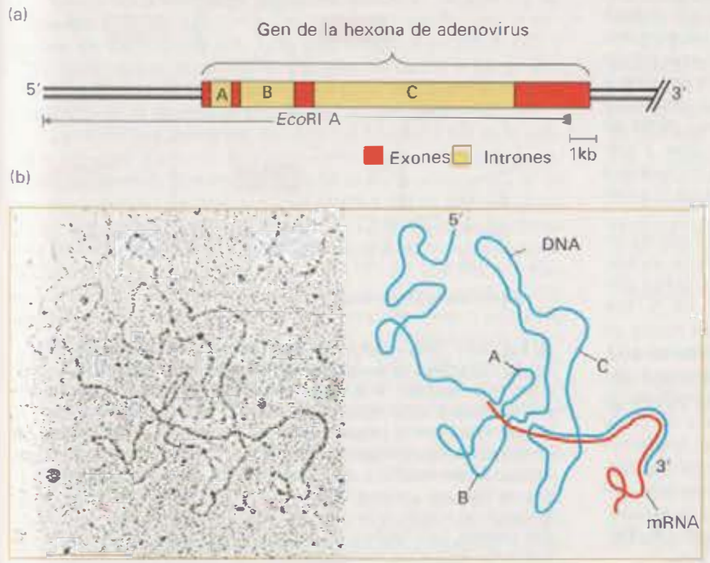
La identificación y purificación de las proteínas necesarias para el corte y la poliadenilación del pre-mRNA condujo al modelo mostrado en la figura 12-4. De acuerdo con este modelo, un *factor de especificidad de corte y poliadenilación (cleavage and polyadenylation specificity factor, CPSF)*, de 360 kDa, compuesto de cuatro polipéptidos diferentes, forma primero un complejo inestable con la señal poli(A) AAUAAA en dirección 5'. Luego al menos tres proteínas adicionales se unen al complejo CPSF-RNA: un heterodímero de 200-kDa llamado *factor estimulante del corte (cleavage stimulatory factor, CStF)*, que interactúa con la secuencia rica en G/U; un heterodímero de 150 kDa denominado *factor de corte I (cleavage factor I, CFI)*; y un segundo factor de corte mal caracterizado (CFII). Por último, una *poli(A) polimerasa (PAP)* se une al complejo *antes* de que ocurra el corte. Este requisito para la fijación de la PAP vincula el corte y la poliadenilación, de manera tal que el extremo 3' generado es poliadenilado con rapidez.

El ensamblaje del gran complejo de corte/poliadenilación multiproteico alrededor de la señal poli(A) rica en AU en un pre-mRNA es análogo en muchos aspectos a la formación del complejo de preiniciación de la transcripción en la caja TATA rica en AT de una molécula de DNA molde (véase fig. 11-27). En ambos casos, los complejos multiproteicos se ensamblan cooperativamente a través de una red de interacciones ácido nucleico-proteína y proteína-proteína.

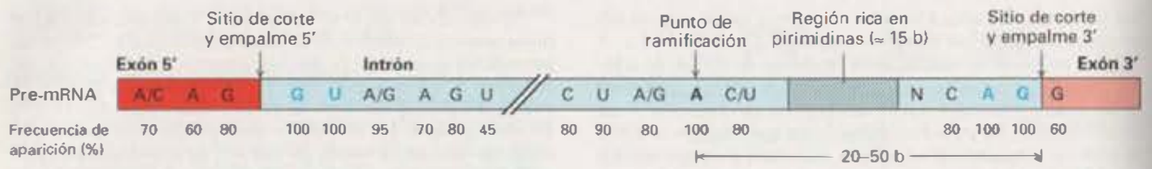
Tras el corte en el sitio poli(A), la poliadenilación se realiza en dos fases. La adición de los primeros 12 residuos A, aproximadamente, se lleva a cabo con lentitud, seguida de una rápida adición de otros de 200-250 residuos A. La fase rápida requiere la unión de múltiples copias de una *proteína de unión a poli(A)* que contiene el motivo RRM. Esta proteína se designa PABPII para distinguirla de la proteína de unión a poli(A) presente en el citoplasma. La PABPII se une a la corta cola A agregada inicialmente por la PAP y estimula la polimerización de residuos A adicionales por la PAP (véase fig. 12-4). La PABPII también da señal a la poli(A) polimerasa para terminar la polimerización cuando la cola poli(A) alcanza una longitud de 200-250 residuos, aunque el mecanismo para controlar la longitud de la cola aún se desconoce.

El corte y empalme se produce en secuencias conservadas cortas de los pre-mRNA mediante dos reacciones de transesterificación

Durante la formación de un mRNA funcional se eliminan los intrones y se empalman juntos los exones. Para las unidades de transcripción cortas, el corte y empalme del RNA suele seguir al corte y poliadenilación del extremo 3' del transcripto primario, como se representa en la figura 12-2. Sin embargo, para las unidades de transcripción largas que contienen múltiples exones, el corte y empalme de exones en el RNA naciente comienza casi siempre antes de que se complete la transcripción del gen.



◀ FIGURA EXPERIMENTAL 12-5 Estudios de hibridación RNA-DNA muestran que los intrones son eliminados por corte y empalme durante el procesamiento del pre-mRNA. La microscopia electrónica de un híbrido de RNA-DNA entre el adenovirus de DNA y el mRNA codificante de hexona, una importante proteína viral, revela segmentos de DNA (intrones) que están ausentes en el mRNA de la hexona. (a) Diagrama del fragmento A *Eco*RI A del DNA adenoviral, que se extiende desde el extremo izquierdo del genoma justo antes del extremo del último exón del gen de la hexona. El gen contiene tres exones cortos y un exón largo (≈3,5 kb) separados por tres intrones de ≈1, 2.5 y 9 kb. (b) Microfotografía electrónica (*izquierda*) y esquema (*derecha*) del híbrido entre un fragmento A *Eco*RI y un mRNA de hexona. Los bucles marcados A, B, y C corresponden a los intrones indicados en (a). Puesto que estas secuencias de intrones en el DNA genómico del virus no están presentes en el mRNA maduro de la hexona, éstas describen bucles entre las secuencias exónicas que se hibridan con sus secuencias complementarias en el mRNA. (Microfotografía de S. M. Berget et al., 1977, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 74:3171; cortesía de P. A. Sharp.)

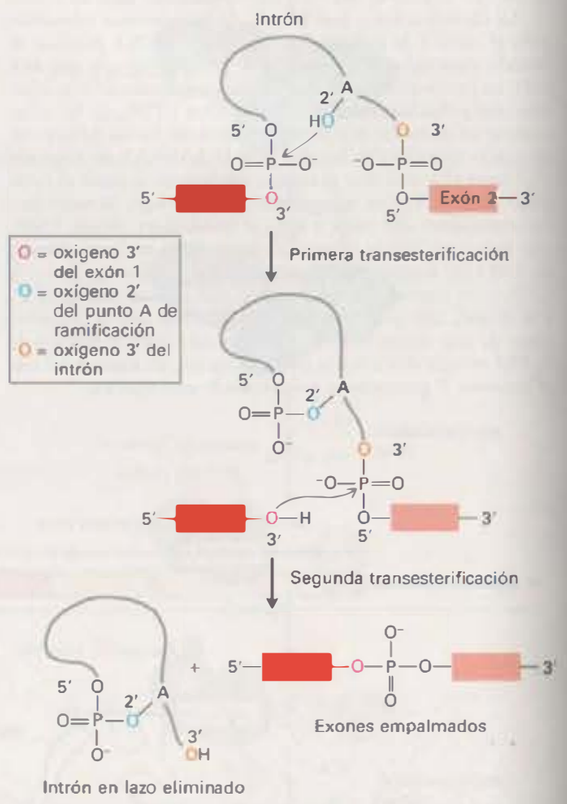


▲ Fig. 12-6. Secuencias consenso alrededor de los sitios de corte y empalme 5' y 3' en los pre-mRNA de los vertebrados. Las únicas bases casi invanables son la 5' GU y la 3'AG del intrón (azul), aunque las bases flanqueantes indicadas se encuentran con frecuencias supenores a las esperadas basadas en una distribución aleatoria. En muchos casos se encuentra una región rica en pirimidina (líneas oblicuas) cerca del extremo 3' del intrón. La adenosina del punto de ramificación, también invariable, casi siempre está a 20-50 bases del sitio de corte y empalme 3'. La región central del intrón, que puede comprender de 40 a 50 kilobases de longitud, en general no es necesaria para que el corte y empalme tenga lugar. (Véase R. A. Padgett et al., 1986, *Ann. Rev. Biochem.* 55:1119, y E. B. Keller y W. A. Noon, 1984, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 81:7417.)

La evidencia inicial de que los intrones se eliminan durante el corte y empalme del RNA provino de observaciones con el microscopio electrónico de híbridos de RNA-DNA entre el adenovirus del DNA y el mRNA que codifica el exón de una importante proteína de la cápside del virión (fig. 12-5). Otros estudios revelaron RNA virales nucleares que fueron colineales con el DNA viral (transcriptos primarios) y los RNA con uno o dos de los intrones eliminados (intermediarios del procesamiento). Estos resultados, junto con los hallazgos de que el casquete 5' y la cola poli(A) 3' a cada extremo de los precursores largos de mRNA son retenidos en los mRNA citoplasmáticos maduros más cortos, hicieron comprender que los intrones se eliminan de los transcriptos primarios a medida que los exones se empalman juntos.

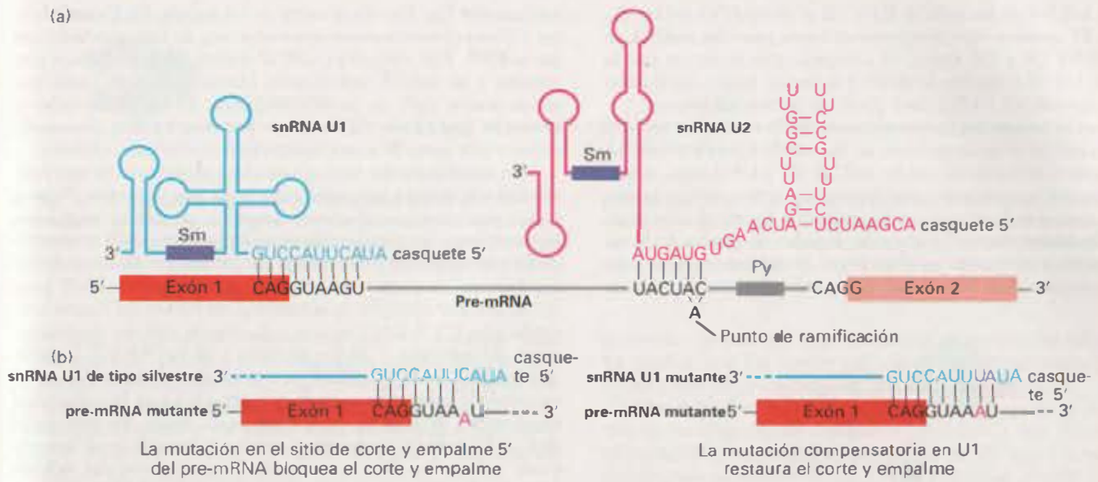
La ubicación de los *sitios de corte y empalme* –es decir, las uniones exón-intrón– en un pre-mRNA puede determinarse al comparar la secuencia del DNA genómico con la del cDNA preparado a partir del mRNA correspondiente. Las secuencias presentes en el DNA genómico, pero ausentes en el cDNA, representan intrones e indican las posiciones de los sitios de corte y empalme. Estos análisis de un gran número de diferentes mRNA revelaron secuencias consenso cortas moderadamente conservadas en los sitios de corte y empalme que flanquean los intrones en los pre-mRNA eucariontes; en los organismos superiores, también es común una región rica en pirimidina apenas en dirección 5' del sitio de corte y empalme 3' (fig. 12-6). Los estudios con mutantes obtenidos por deleción mostraron que puede eliminarse gran parte de la porción central de los intrones sin afectar el corte y empalme; por lo general, sólo son necesarios 30-40 nucleótidos en cada extremo de un intrón para que se produzca el corte y empalme en una proporción normal.

Los análisis de los intermediarios formados durante el corte y empalme de los pre-mRNA in vitro condujeron al descubrimiento de que el empalme de los exones se efectúa mediante dos *reacciones de transesterificación* (fig. 12-7). Los intrones son eliminados como una estructura con forma de lazo en la cual la G 5' del intrón se une en un inusual enlace fosfodiéster 2',5' a una adenosina cerca del extremo 3' del intrón. Este residuo A se denomina *punto de ramificación* porque forma una rama de RNA en la estructura del lazo. En cada reacción de transesterificación, un enlace fosfoéster se intercambia por otro. Puesto que el número de enlaces fosfoéster en la molécula no se altera en ninguna reacción, no se consume energía. El resultado neto de estas dos reacciones es que se ligan dos exones y el intrón interpuesto se libera como una estructura ramificada en forma de lazo.



▲ Fig. 12-7. Dos reacciones de transesterificación que dan como resultado el empalme de exones en el pre-mRNA. En la primera reacción, el enlace éster entre el fósforo 5' del intrón y el oxígeno 3' (rojo oscuro) del exón 1 se intercambia por un enlace éster con el oxígeno 2' (azul) del residuo A del sitio de ramificación. En la segunda reacción, el enlace éster entre el fósforo 5' del exón 2 y el oxígeno 3' (rojo suave) del intrón se intercambia por un enlace éster con el oxígeno 3' del exón 1, liberando el intrón como una estructura de lazo y juntando los dos exones. Las flechas muestran dónde los oxígenos de los hidroxilos activados reaccionan con los átomos de fósforo.

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación localizada: Corte y empalme del mRNA



▲ Fig. 12-8. Apareamientos de bases entre pre-mRNA, snRNA U1 y snRNA U2 al comienzo del proceso de corte y empalme. (a) En este diagrama se esquematizan las estructuras secundarias de los snRNA que no se alteran durante el proceso de corte y empalme. Se muestra la secuencia del punto de ramificación de la levadura. Nótese que el snRNA U2 se aparea con una secuencia que incluye la A del punto de ramificación, aunque este residuo no está apareado. Los rectángulos violetas representan secuencias que unen proteínas snRNP reconocidas por anticuerpos anti-Sm. Por razones desconocidas, los antisueros de los pacientes con la enfermedad autoinmune lupus eritematoso sistémico (LES) contienen estos anticuerpos. Estos antisueros fueron útiles para caracterizar componentes de la reacción de corte y empalme. (b) Sólo se muestran los extremos 5' de los snRNA U1 y los sitios de corte y empalme 5' en los pre-mRNA. (*Izquierda*) Una mutación (A) en un sitio de corte y empalme del pre-mRNA que interfiere en el apareamiento de bases en el extremo 5' del snRNA U1 bloquea el corte y empalme. La expresión de un snRNA U1 con una mutación compensatoria (U) que restablece el apareamiento de bases también restaura el corte y empalme del pre-mRNA mutante. (Parte (a) adaptada de M. J. Moore et al., 1993, in R. Gesteland y J. Atkins, eds, *The RNA World*, Cold Spring Harbor Press, pp. 303-357, parte (b) véase Y. Zhuang y A. M. Weiner, 1986, *Cell* 46:827.)

Los snRNA se aparean con los pre-mRNA y entre sí durante el corte y empalme del RNA

Cinco RNA nucleares pequeños (snRNA) ricos en U, designados U1, U2, U4, U5 y U6, participan en el corte y empalme de los pre-mRNA. Con una longitud de entre 107 y 210 nucleótidos, estos snRNA se asocian con 6 a 10 proteínas en *particulas de ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP)* en el núcleo de las células eucariontes.

La evidencia definitiva del papel del snRNA U1 en el corte y empalme provino de experimentos que indicaron que el apareamiento de bases entre el sitio de corte y empalme 5' de un pre-mRNA y la región 5' del snRNA U1 es necesario para el corte y empalme del RNA (fig. 12-8a). Los experimentos in vitro mostraron que un oligonucleótido sintético que se hibrida con la región del extremo 5' del snRNA U1 bloquea el corte y empalme del RNA. Los experimentos in vivo mostraron que las mutaciones en el sitio de corte y empalme 5' del pre-mRNA que interrumpen el apareamiento de bases bloquea el corte y empalme del RNA, pero ese corte y empalme puede restablecerse mediante la expresión de un snRNA U1 mutante con una mutación compensatoria que restablece el apareamiento de bases al sitio de corte y empalme del pre-mRNA 5' mutante (fig- 12-8b). La participación del snRNA U2 en el corte y empalme se sospechó inicialmente cuando se descubrió que poseía una secuencia interna que es en gran parte complementaria a la secuencia consenso que flanquea el punto de ramificación en los pre-mRNA (véase fig. 12-6). Los experimentos de mutación compensatoria, similares a los realizados con snRNA U1 y los sitios de corte y empalme 5' demostraron que el apareamiento de bases entre snRNA U2 y la secuencia del punto de ramificación en el pre-mRNA también es decisivo para el corte y empalme.

En la figura 12-8a se ilustran las estructuras generales de los snRNA U1 y U2 y cómo forman pares de bases con el pre-mRNA durante el corte y empalme. De manera significativa, el mismo punto de ramificación A que no está apareado por sus bases al snRNA U2, "se proyecta" para permitir que su hidroxilo 2' participe en la primera reacción de transesterificación del corte y empalme de RNA (véase fig. 12-7).

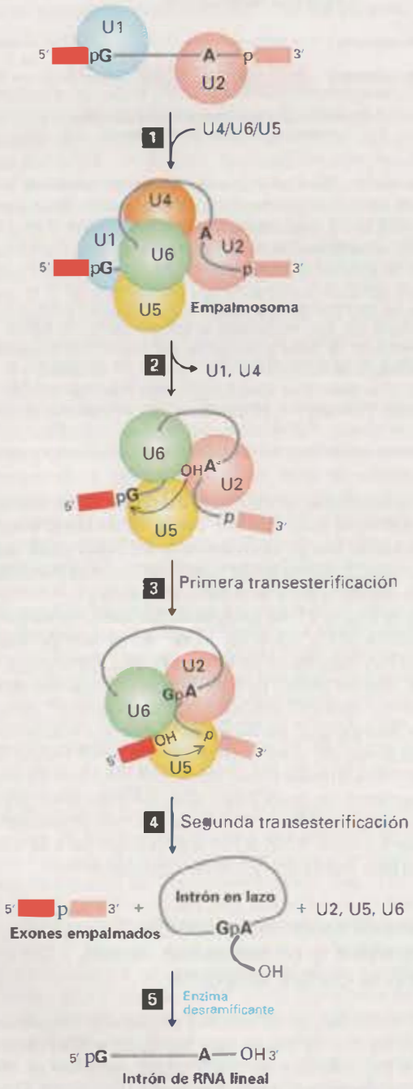
Estudios similares con otros snRNA demostraron que el apareamiento de bases entre ellos también tiene lugar durante el corte y empalme. Más aún, los reordenamientos de estas interacciones RNA-RNA son críticos para la vía de corte y empalme, como describimos a continuación.

Los empalmosomas, ensamblados a partir de los snRNP y un pre-mRNA, llevan a cabo el corte y empalme

De acuerdo con el modelo de corte y empalme del pre-mRNA vigente, se piensa que los cinco snRNP se ensamblan sobre el pre-mRNA y forman un gran complejo de ribonucleoproteínas denominado empalmosoma (fig. 12-9). El ensamblaje de un empalmosoma comienza con el apareamiento de bases

de los snRNA de las snRNP U1 y U2 al pre-mRNA (véase fig. 12-8). El apareamiento extensivo de bases entre los snRNA en las snRNP U4 y U6 forma un complejo que se asocia con la snRNP U5. El complejo U4/U6/U5 se asocia luego con el complejo pre-mRNA U1/U2 para producir un empalmosoma.

Tras la formación del empalmosoma, los reordenamientos extensivos en el aparcamiento de los snRNA y el pre-mRNA conducen a la liberación de los snRNP U1 y U4. Luego, el empalmosoma reordenado, catalíticamente activo, media la primera reacción de transesterificación que forma el enlace 2', 5'-fosfodiéster entre el hidroxilo 2' sobre el punto A de ramificación y el fosfato en el extremo 5' del intrón. Tras otro reordenamiento de las snRNP, la segunda reacción de transesterificación liga los dos exones en un enlace 3', 5'-fosfodiéster y libera el intrón como una estructura de lazo asociada con las snRNP. Este complejo snRNP-intrón final se disocia con rapidez y las snRNP individuales liberadas pueden participar en un nuevo ciclo de corte y empalme. El intrón cortado es entonces degradado rápidamente por una enzima desramificante y por otras RNasas nucleares tratadas más adelante.



◀ Fig. 12-9. Modelo del corte y empalme del pre-mRNA mediado por empalmosoma. Paso 1: Luego de que las snRNP U1 y U2 se asocian con el pre-mRNA, a través de interacciones de pares de bases mostradas en la figura 12-8, un complejo trimérico de snRNP de U4, U5 y U6 se junta con el complejo inicial para formar el empalmosoma. Paso 2: Los reordenamientos de las interacciones de pares de bases entre los snRNA hacen que el empalmosoma adopte una conformación catalíticamente activa y desestabiliza las snRNP U4 y U1, que son liberadas. Paso 3: El núcleo catalítico, a pesar de estar formado por U6 y U2, cataliza luego la primera reacción de transesterificación y forman el intermediario que contiene un enlace 2', 5'-fosfodiéster que se muestra en la figura 12-7. Paso 4: Tras reordenamientos posteriores entre las snRNP, la segunda reacción de transesterificación une los dos exones mediante un enlace 3', 5'-fosfodiéster estándar y libera el intrón como una estructura de lazo al igual que a las snRNP que quedan. Paso 5: El intrón cortado con forma de lazo es convertido a un RNA lineal mediante una enzima desramificante. (Adaptado de T. Villa et. al., 2002, *Cell* 109:149.)

Algunos pre-mRNA contienen intrones cuyos sitios de corte y empalme no son adecuados para la secuencia consenso estándar. Esta clase de intrones comienza con AU y termina con AC en lugar de seguir la regla "GU-AG" habitual (véase fig. 12-6). El corte y empalme de esta clase especial de intrones parece ocurrir a través de un ciclo de corte y empalme análogo al mostrado en la figura 12-9, excepto que intervienen cuatro snRNP nuevas de baja abundancia junto con la snRNP U5 estándar.

Casi todos los mRNA funcionales de los vertebrados, insectos y células vegetales derivan de una única molécula del pre-mRNA correspondiente por eliminación de los intrones internos y del empalme de exones. Sin embargo, en dos tipos de protozoos –tripanosomas y euglenoides– los mRNA se forman por medio de corte y empalme de moléculas de RNA

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación focalizada: Corte y empalme del mRNA



▲ Fig. 12-10. Esquema de la RNA polimerasa II con el CTD extendido. Se muestra la longitud del dominio carboxilo terminal (CTD) de la RNA polimerasa II de levadura y la región conectora que la vincula a la polimerasa en relación con el dominio globular de la polimerasa. El CTD de la RNA polimerasa II de los mamíferos es el doble de largo. En su forma extendida, el CTD puede asociarse simultáneamente con múltiples factores de procesamiento del RNA. (De P. Cramer, D. A. Bushnell, y R. D. Kornberg, 2001, *Science* 292:1863.)

separadas. Este proceso, denominado *corte y empalme trans (trans-splicing)*, también se emplea en la síntesis del 10-15% de los mRNA en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, un importante organismo modelo para el estudio del desarrollo embrionario. El corte y empalme trans es llevado a cabo por snRNP mediante un proceso similar al corte y empalme de exones en un único pre-mRNA.

La elongación de la cadena por la RNA polimerasa II está acoplada a la presencia de factores de procesamiento del RNA

El dominio carboxilo terminal (CTD) de la RNA polimerasa II está compuesto de múltiples repeticiones de una secuencia de siete residuos (heptapéptido). Cuando está totalmente extendido, el dominio CTD en la enzima de las levaduras mide alrededor de 65 nm de largo (fig. 12-10); el CTD en la polimerasa humana es de alrededor del doble de largo. La notable longitud del CTD permitiría que múltiples proteínas se asocien simultáneamente con una única molécula de RNA polimerasa II. Por ejemplo, como ya se mencionó, la enzima que añade el casquete 5' a los transcriptos nacientes se asocia con el CTD fosforilado poco después de la iniciación de la transcripción. Además, se descubrió que los factores del corte y empalme del RNA y de la poliadenilación se asocian con el CTD fosforilado. Como consecuencia, estos factores de procesamiento están presentes en altas concentraciones cuando los sitios de corte y empalme y las señales de poli(A) son transcriptas por la polimerasa, amplificando la velocidad y la especificidad del procesamiento del RNA.

Los resultados recientes indican que la asociación de los factores de corte y empalme del RNA con el CTD fosforilado también estimula la elongación de la transcripción. Por lo tanto, la elongación de la cadena está acoplada a la unión de factores de procesamiento del RNA al CTD fosforilado. Este mecanismo puede asegurar que un pre-mRNA no sea sintetizado a menos que la maquinaria para procesarlo esté posicionada de manera apropiada.

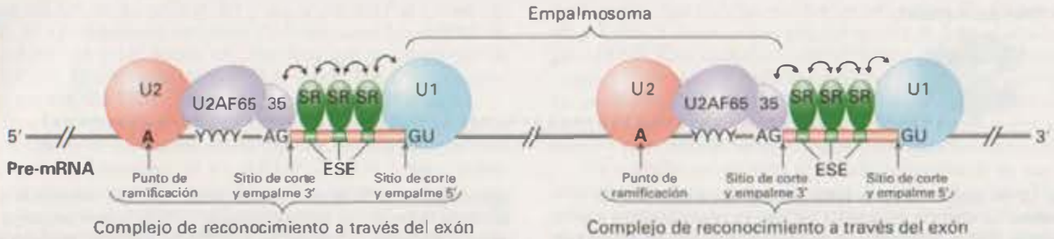
Las proteínas SR contribuyen a la definición de exones en los pre-mRNA largos

La longitud promedio de un exón en el genoma humano es de ≈150 bases, mientras que la longitud promedio de un intrón es mucho mayor (≈3500 bases). Los intrones más largos contienen más de 500 kb. Dado que las secuencias de los sitios de corte y empalme 5' y 3' y los puntos de ramificación están tan degenerados, es muy posible que aparezcan múltiples copias en forma aleatoria en los intrones largos. En consecuencia, se necesita la información de secuencias adicionales para definir los exones que deben ser empalmados juntos en los organismos superiores con intrones largos.

El mecanismo más sofisticado de reconocimiento de exones en los organismos superiores involucra a una familia de proteínas de unión al RNA, las *proteínas SR*, que interactúan con secuencias dentro de los exones llamadas *amplificadores del corte y empalme de exones*. Las proteínas SR se caracterizan por tener uno o más dominios RRM de unión al RNA y varios dominios de interacción proteína-proteína ricos en residuos de serina y arginina. Cuando se unen a amplificadores del corte y empalme exónico, las proteínas SR median la unión cooperativa de la snRNP U1 a un verdadero sitio de corte y empalme 5' y la snRNP U2 a un punto de ramificación a través de una red de interacciones proteína-proteína que se extiende a lo largo de todo un exón (fig. 12-11). El complejo de proteínas SR, las snRNP y otros factores de corte y empalme (p. ej., U2AF) que se ensamblan a través de un exón, llamado complejo de reconocimiento a través del exón (*cross-exon recognition complex*), permiten la especificación precisa de los exones en los pre-mRNA largos.

MEDICINA

En las unidades de transcripción de los organismos superiores con intrones largos, los exones no sólo codifican las secuencias de aminoácidos de diferentes porciones de una proteína sino que también contienen sitios de unión para proteínas SR. Las mutaciones que interfieren en la unión de una proteína SR a un amplificador exónico de corte y empalme, aun si no cambian la secuencia de aminoácidos codificada, evitarían la formación del complejo de reconocimiento a través del exón. Como resultado, el exón afectado es "salteado" durante el corte y empalme y no es incluido en el mRNA procesado final. El mRNA truncado producido en este caso se degrada o se traduce a una proteína mutante de funcionamiento anormal. Estudios recientes implicaron este tipo de mutaciones en las enfermedades genéticas humanas. Por ejemplo, la *atrofia muscular espinal* es una de las causas genéticas más comunes de mortalidad infantil. Esta enfermedad es el resultado de mutaciones en una región del genoma que contiene dos genes estrechamente relacionados, el *SMN1* y el *SMN2*, que surgieron por replicación de genes. El *SMN2* codifica una proteína idéntica a la *SMN1*, pero se expresa a un nivel mucho menor debido a una mutación silenciosa en un exón que interfiere en la unión de una proteína SR, llevando al salteo de exones en la mayoría de los mRNA *SMN2*. El gen homólogo *SMN* en el ratón, donde hay una única copia, es esencial para la viabilidad celular. La atrofia muscular espinal en los seres humanos es resultado de mutaciones homocigóticas que inactivan el *SMN1*. El



▲ Fig. 12-11. Reconocimiento de exones a través de la unión cooperativa de las proteínas SR y los factores de corte y empalme a los pre-mRNA. Los sitios de corte y empalme adecuados 5' GU y 3' AG son reconocidos por factores de corte y empalme basándose en su proximidad a los exones. Los exones contienen amplificadores del corte y empalme exónicos (ESE) que son sitios de unión para las proteínas SR. Cuando se unen a las ESE, las proteínas SR interactúan entre sí y promueven la unión cooperativa de la snRNP U1 al sitio de corte y empalme 5' corriente abajo del intrón, de la snRNP U2 al punto de ramificación corriente abajo del intrón, de las subunidades de 65 y 35 kD del U2AF a la región rica en pirimidina y al sitio de corte y empalme 3' AG corriente arriba del intrón y de otros factores de corte y empalme (no mostrados). El complejo de reconocimiento proteína-RNA-exón resultante abarca un exón y activa los sitios de corte y empalme correctos para el corte y empalme de RNA. Nótese que las snRNP U1 y U2 en esta unidad no son parte del mismo empalmosoma. La snRNP U2 de la derecha forma un empalmosoma con la snRNP U1 unido al extremo 5' del mismo intrón. La snRNP U1 mostrada en la derecha forma un empalmosoma con la snRNP U2 unida al punto de ramificación corriente abajo del intrón (no mostrado), y la snRNP U2 en la izquierda forma un empalmosoma con una snRNP U1 unido al sitio de corte y empalme 5' comente arriba del intrón (no mostrado). Las flechas de dos puntas indican las interacciones proteína-proteína. (Adaptado de T. Maniatis, 2002, *Nature* 418:236; véase también S. M. Berget, 1995 *J. Biol. Chem.* 270:2411.)

bajo nivel de proteínas traducidas a partir de la pequeña fracción de mRNA *SMN2* que están correctamente cortadas y empalmadas es suficiente para mantener la viabilidad celular durante la embriogénesis y el desarrollo fetal, pero no lo es para mantener la viabilidad de las neuronas motoras de la médula espinal durante la infancia, lo que da como resultado su muerte y la enfermedad asociada.

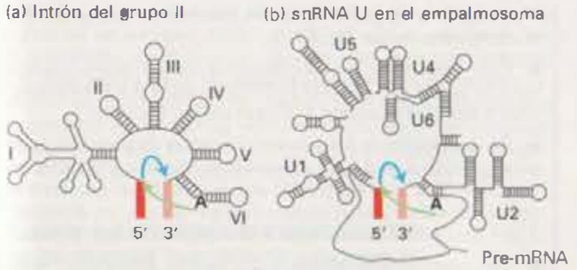
Aproximadamente el 15% de las mutaciones de un solo par de bases que causan enfermedades genéticas humanas interfieren en la definición apropiada del exón. Algunas de estas mutaciones tienen lugar en los sitios de corte y empalme 5' o 3', a menudo dando como resultado el uso de sitios cercanos de corte y empalme "crípticos" alternativos presentes en la secuencia génica normal. En ausencia del sitio de corte y empalme normal, el complejo de reconocimiento a través del exón reconoce estos sitios alternativos. Otras mutaciones que provocan el corte y empalme anormal dan como resultado una nueva secuencia consenso del sitio de corte y empalme que es reconocido en lugar del sitio de corte y empalme normal. Por último, algunas mutaciones pueden interferir con la unión al mRNA de proteínas hnRNP específicas que amplifican o reprimen el corte y empalme en sitios normales, como en el caso del gen *SMN2*. ▮

Los intrones del grupo II que sufren autoprocesamiento proporcionan pistas acerca de la evolución de los snRNA

En ciertas condiciones no fisiológicas in vitro, las preparaciones puras de algunos transcriptos de RNA eliminan lentamente los intrones en ausencia de cualquier proteína. Esta observación condujo al reconocimiento de que algunos intrones son *autoeliminados* o *autoprocesados*. Se descubrieron dos tipos de intrones que sufren autoprocesamiento: los *intrones del grupo I*, presentes en los genes del rRNA nuclear de los protozoos y los *intrones del grupo II* presentes en los genes codificantes de proteínas y en algunos genes de rRNA y de tRNA de las mitocondrias y los cloroplastos de plantas y hongos. El descubrimiento de la actividad catalítica de los intrones autoprocesables revolucionó los conceptos acerca de las funciones del RNA. Como se comentó en el capítulo 4, se piensa que el RNA cataliza la formación de enlaces peptídicos durante la síntesis proteica en los ribosomas. Aquí comentamos el posible papel de los intrones del grupo II, que hasta ahora se encontraron sólo en el DNA mitocondrial y de los cloroplastos, en la evolución de los snRNA; el funcionamiento de los intrones del grupo I se trata en la sección ulterior sobre el procesamiento del rRNA.

Aunque sus secuencias precisas no están muy conservadas, todos los intrones del grupo II se pliegan en una estructura secundaria compleja conservada que presenta numerosos tallos y bucles (fig. 12-12a). La autoeliminación de un intrón del grupo II tiene lugar a través de dos reacciones de transesterificación, que involucran intermediarios y productos análogos a los hallados en el empalme nuclear del pre-mRNA. Las similitudes de mecanismos entre el autoprocesamiento de los intrones del grupo II y el procesamiento empalmosómico condujeron a la hipótesis de que los snRNA funcionan de manera análoga a la de los tallos y bucles en la estructura secundaria de los intrones del grupo II. De acuerdo con esta hipótesis, los snRNA interactúan con los sitios de corte y empalme 5' y 3' de los pre-mRNA y entre sí para producir una estructura de RNA tridimensional funcionalmente análoga a la de los intrones autoprocesables del grupo II (fig. 12-12b).

Una extensión de esta hipótesis es que los intrones en los pre-mRNA ancestrales evolucionaron a partir de los intrones autoprocesables del grupo II a través de la pérdida progresiva de estructuras de RNA internas, que de manera concurrente evolucionaron hacia snRNA que actúan en *trans* y realizan las mismas funciones. El sustento para este tipo de modelo evolutivo proviene de experimentos con mutantes de intrones del grupo II en los cuales se eliminan el dominio V y parte del dominio I. Los transcriptos de RNA que contienen esos intrones mutantes tienen autoprocesamiento defectuoso, pero cuando a la reacción in vitro se añaden moléculas de RNA equivalentes



▲ Fig. 12-12. Esquemas que permiten comparar las estructuras secundarias de los intrones autoprocesables del grupo II (a) y los snRNA U presentes en los empalmosomas (b). La primera reacción de transesterificación está indicada por flechas verdes; la segunda reacción, por flechas azules. El punto de ramificación aparece en negrita. La similitud en estas estructuras sugiere que los snRNA empalmosómicos evolucionaron a partir de los intrones del grupo II, siendo los snRNA que actúan en trans funcionalmente análogos a los dominios correspondientes en los intrones del grupo II. Las barras coloreadas que flanquean los intrones en (a) y (b) representan exones. (Adaptado de P. A. Sharp, 1991, *Science* 254:663.)

a las regiones eliminadas se produce el autoprocesamiento normalmente. Este hallazgo demuestra que los dominios de los intrones del grupo II pueden actuar en *trans*, como el snRNA.

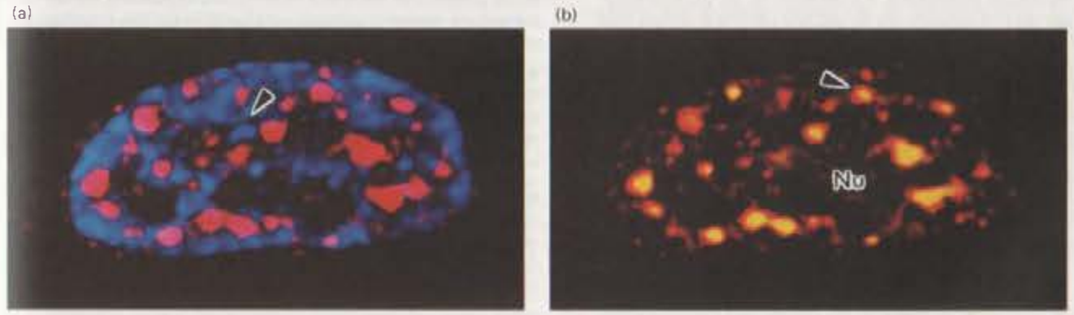
La similitud entre los mecanismos de autoeliminación de los intrones del grupo II y del procesamiento empalmosómico del pre-mRNA también sugiere que la reacción de corte y empalme está catalizada por el componente snRNA de los empalmosomas, no por la proteína. Aunque los intrones del grupo II pueden autoprocesarse in vitro a temperaturas y concentraciones de Mg^{2+} elevadas, en condiciones in vivo se necesitan proteínas denominadas *madurasas*, que se unen al RNA de los intrones del grupo II, para un corte y empalme rápido. Se cree que las madurasas estabilizan las interacciones tridimensionales precisas del RNA de los intrones necesarias para catalizar las dos reacciones de transesterificación. Por analogía, se piensa que las proteínas de las snRNP en los empalmosomas estabilizan la geometría precisa de los snRNA y de los nucleótidos intrónicos necesarios para catalizar el corte y empalme del pre-mRNA.

La evolución de los snRNA habría sido un paso importante en la rápida evolución de los eucariontes superiores. A medida que las secuencias intrónicas internas se perdieron y sus funciones en el corte y empalme del RNA fueron suplantadas por snRNA que actúan en *trans*, las secuencias de intrones remanentes quedaron libres para seguir con camino divergente. Es probable que esto, a su vez, facilitara la evolución de nuevos genes a través del mezclado de exones (*exon shuffling*), puesto que existen pocas restricciones en la secuencia de nuevos intrones generados en el proceso (véase fig. 10-17). Esto también permitió el aumento de la diversidad proteica, que resulta del corte y empalme alternativo del RNA, y un nivel adicional de control génico, consecuencia del corte y empalme regulado del RNA.

La mayor parte de la transcripción y del procesamiento del RNA tiene lugar en un número limitado de dominios del núcleo celular de los mamíferos

Varios tipos de estudios sugieren que la transcripción y el procesamiento del RNA tienen lugar en gran medida dentro de focos definidos del núcleo de las células eucariontes. Por ejemplo, las imágenes digitales microscópicas de los fibroblastos humanos revelan que la mayoría del RNA nuclear poliadenilado (p. ej., el pre-mRNA parcial y totalmente cortado y empalmado y el mRNA nuclear) se localiza en alrededor de 100 focos (fig. 12-13). Una proteína SR que participa en la definición de exones (SC-35) se ubica en el centro de esos mismos focos.

Esta información implica que el núcleo no es sólo un contenedor desorganizado de la cromatina y las proteínas que llevan a cabo la replicación cromosómica, la transcripción y el procesamiento del RNA. Al contrario, existe una subes-



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 12-13 La tinción indica que los RNA poliadenilados y los factores de corte y empalme del RNA están aislados en áreas definidas del núcleo de fibroblastos de mamíferos. Se utilizó microscopia digital para reconstruir una sección de 1-μm de espesor del núcleo de un fibroblasto humano teñido. (a) Sección teñida con poli(dT) marcada con rodamina para detectar el RNA poliadenilado (rojo) y con DAPI para detectar el DNA (azul). El RNA poliadenilado se localiza en un número limitado de focos definidos (motas) entre las regiones de cromatina, aunque no todas las regiones que contienen niveles bajos de DNA contenían RNA poliadenilado detectable (flecha). (b) Las mismas secciones mostradas en (a) teñidas para detectar RNA poliadenilado (rojo) y la proteína SC-35, que fue visualizada con un anticuerpo monoclonal marcado con fluoresceína verde. Las regiones donde las manchas se superponen aparecen en amarillo. La SC-35 está presente en el centro de muchos focos (flecha). Nu: nucléolo (De K. C. Carter et al., 1993, *Science* 259:1330.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Naturaleza dinámica del movimiento del factor de corte y empalme del pre-mRNA en células vivas

tructura nuclear subyacente altamente organizada. Una red fibrilar poco entendida denominada *matriz nuclear* y que comprende múltiples proteínas puede observarse en el núcleo tras la digestión de la mayor parte del DNA y de la extracción con alta concentración salina. Esta red de proteínas fibrosas probablemente contribuye a la organización nuclear al igual que las fibras citoesqueléticas contribuyen a la organización del citoplasma. Aún resta mucho por aprender acerca de los mecanismos moleculares que subyacen a esta organización y de sus consecuencias para los procesos nucleares.

Las exonucleasas nucleares degradan el RNA que es eliminado de los pre-mRNA

Como el genoma humano contiene intrones largos, sólo un 5% de los nucleótidos que son polimerizados por la RNA polimerasa II durante la transcripción quedan en el mRNA procesado maduro. Los intrones que son eliminados y la región del sitio de corte y poliadenilación en dirección 3' son degradados por exonucleasas nucleares que hidrolizan una base a la vez a partir del extremo 5' o 3' de una hebra de RNA.

Como ya se mencionó, el enlace 2', 5'-fosfodiéster en los intrones cortados es hidrolizado por una enzima desramificante y produce una molécula lineal con extremos no protegidos que pueden ser atacados por exonucleasas (véase fig. 12-9). La vía de degradación nuclear predominante es la hidrólisis 3'→5' mediante 11 exonucleasas que se asocian entre sí en un gran complejo proteico denominado exosoma. Otras proteínas en el complejo incluyen RNA helicasas que interrumpen el apareamiento de bases y las interacciones proteína-RNA que de otra manera bloquearían las exonucleasas. Los exosomas también funcionan en el citoplasma como se verá más adelante. Además, parecen degradar los pre-mRNA que no fueron cortados y empalmados o poliadenilados en forma apropiada. Aún no está claro cómo los exosomas reconocen los pre-mRNA procesados inapropiadamente.

Para evitar ser degradados por exonucleasas nucleares, los transcriptos nacientes, los intermediarios del procesamiento del pre-mRNA y los mRNA maduros en el núcleo deben tener sus extremos protegidos. El extremo 5' de un transcripto naciente está protegido por la adición de la estructura casquete 5' tan pronto como el extremo 5' emerge de la polimerasa. La interacción del casquete con un *complejo nuclear de unión al casquete*, que también participa en la salida del mRNA al citoplasma, ofrece una protección adicional. El extremo 3' de un transcripto naciente se ubica dentro de la RNA polimerasa y por lo tanto es inaccesible a las exonucleasas (véase fig. 4-10). Como ya se dijo, el extremo 3' generado por el corte de un pre-mRNA en dirección 3' de la señal poli(A) es poliadenilado rápidamente por la poli(A) polimerasa asociada con los otros factores del procesamiento 3', y a la cola poli(A) resultante se unen por PABPII (véase fig. 12-4). Este estrecho acoplamiento del corte y la poliadenilación protege el extremo 3' del ataque de la exonucleasa.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 12.1

Procesamiento del pre-mRNA eucarionte

- En el núcleo de las células eucariontes, los pre-mRNA están asociados con proteínas hnRNP y son procesados mediante la adición del casquete 5', el corte y poliadenilación 3', y el corte y empalme del RNA antes de ser transportados al citoplasma (véase fig. 12-2).
- Poco después de la iniciación de la transcripción, una enzima se asocia con el CTD fosforilado de la RNA polimerasa II y añade el casquete 5' al transcripto naciente.
- En la mayoría de los genes codificantes de proteínas, una señal poli(A) AAUAAA conservada se localiza levemente en dirección 5' de un sitio poli(A) donde tiene lugar el corte y la poliadenilación. Una secuencia rica en GU o U en dirección 3' del sitio poli(A) contribuye a la eficiencia de este proceso.
- Un complejo multiproteico que incluye una poli(A) polimerasa (PAP) lleva a cabo el corte y poliadenilación de un pre-mRNA. Una proteína nuclear de unión a poli(A), PABPII estimula la adición de residuos A por la PAP y detiene la adición una vez que la cola poli(A) alcanza los 200-250 residuos (véase fig. 12-4).
- Cinco diferentes snRNP interactúan a través del apareamiento de bases entre sí y con el pre-mRNA para formar el empalmosoma (véase fig. 12-9). Este enorme complejo de ribonucleoproteínas cataliza dos reacciones de transesterificación que junta dos exones y elimina el intrón como una estructura de lazo, la cual luego se degrada (véase fig. 12-7).
- La asociación de factores del procesamiento del pre-mRNA con el CTD de la RNA polimerasa II estimula la elongación de la cadena. Esta asociación asegura que un pre-mRNA no sea sintetizado hasta que los factores necesarios para su procesamiento estén en su lugar para interactuar con las señales de corte y empalme, y corte y poliadenilación en el pre-mRNA a medida que emerge de la polimerasa.
- Las proteínas SR que se unen dentro de los exones a las secuencias amplificadoras de corte y empalme de exones son críticas para definir los exones en los pre-mRNA largos de los organismos superiores. Una red de interacciones entre las proteínas SR, las snRNP y los factores del corte y empalme forman un complejo de reconocimiento a través del exón que especifica los sitios de corte y empalme del RNA adecuados (véase fig. 12-11).
- Se piensa que los snRNA en el empalmosoma tienen una estructura terciaria general similar a la de los intrones autoempalmantes del grupo II.
- Para las unidades de transcripción largas de los organismos superiores, el empalme de exones suele comenzar mientras el pre-mRNA aún está en formación. El corte y poliadenilación para formar el extremo 3' del mRNA tiene lugar luego de que se transcribe el sitio de poli(A).
- Los intrones cortados son degradados principalmente por los exosomas, complejos multiproteína que contienen once exonucleasas 3'→5' al igual que RNA helicasas. Los exosomas también degradan los pre-mRNA procesados inapropiadamente.

12.2 Regulación del procesamiento del pre-mRNA

Ahora que hemos visto cómo los pre-mRNA se procesan para formar mRNA funcionales maduros, consideraremos cómo la regulación de este proceso puede contribuir al control génico. En el capítulo 10 dijimos que los eucariontes superiores contienen unidades de transcripción tanto simples como complejas. Los transcriptos primarios producidos a partir de las primeras contienen un solo sitio poli(A) y exhiben sólo un patrón de corte y empalme del RNA, aun cuando estén presentes múltiples intrones; por lo tanto, las unidades de transcripción simples codifican un único mRNA. En cambio, los transcriptos primarios producidos a partir de las unidades de transcripción complejas pueden procesarse en formas alternativas para producir diferentes mRNA que codifican proteínas distintas (véase fig. 10-2).

El corte y empalme alternativo del RNA es el principal mecanismo para regular el procesamiento del mRNA

Los resultados de estudios genómicos recientes sugieren que el número de unidades de transcripción complejas puede ser mucho mayor de lo pensado. Los investigadores estiman que hasta un 60% de todas las unidades de transcripción en el genoma humano son complejas. Esta estimación proviene de la comparación de las secuencias de DNA genómico con etiquetas de secuencia expresada (*expressed sequence tags*, EST) que son segmentos de cDNA secuenciados aleatoriamente (cap. 9). La comparación de estas secuencias de cDNA con secuencias de DNA genómico muestra las localizaciones de los exones e intrones en el DNA genómico. El hallazgo de combinaciones alternativas de exones expresados a partir de una región de DNA genómico revela la existencia de una unidad de transcripción compleja. Aun cuando esta estimación puede ser un poco elevada por la inclusión en la base de datos EST de RNA raros que son el resultado de errores en el procesamiento del RNA, está claro que las unidades de transcripción complejas dan cuenta de una larga porción de la secuencia codificante de proteínas en los seres humanos. Este hallazgo y el descubrimiento de múltiples ejemplos de procesamiento regulado del RNA indican que el procesamiento alternativo de RNA a partir de pre-mRNA complejo producido por esas unidades de transcripción es un mecanismo de control génico importante en los eucariontes superiores.

Aunque se conocen ejemplos de corte en sitios poli(A) alternativos en los pre-mRNA, el *corte y empalme alternativo* o *procesamiento alternativo* de diferentes exones es el mecanismo más común para expresar diferentes proteínas a partir de una unidad de transcripción compleja. Estas vías de procesamiento alternativo suelen estar reguladas de manera específica según el tipo de célula; es decir, un posible mRNA se expresa en un tipo de célula o tejido, mientras que otro se expresa en diferentes tejidos o células. En el capítulo 4, por ejemplo, mencionamos que los fibroblastos producen un tipo de la proteína extracelular fibronectina, mientras que los hepatocitos producen otro tipo. Ambas isoformas de la fibronectina están codificadas por la misma unidad transcripcional, que se corta y empalma de manera diferente en los dos tipos de células para producir dos mRNA diferentes (véase fig. 4-15). En otros casos, el procesamiento alternativo puede tener lugar en el mismo tipo celular en respuesta a diferentes señales de desarrollo o medioambientales. Primero veremos uno de los ejemplos mejor comprendidos acerca del procesamiento regulado del RNA y luego consideraremos sus consecuencias en el desarrollo del sistema nervioso.

Una cascada de procesamiento del RNA regulado controla la diferenciación sexual de *Drosophila*

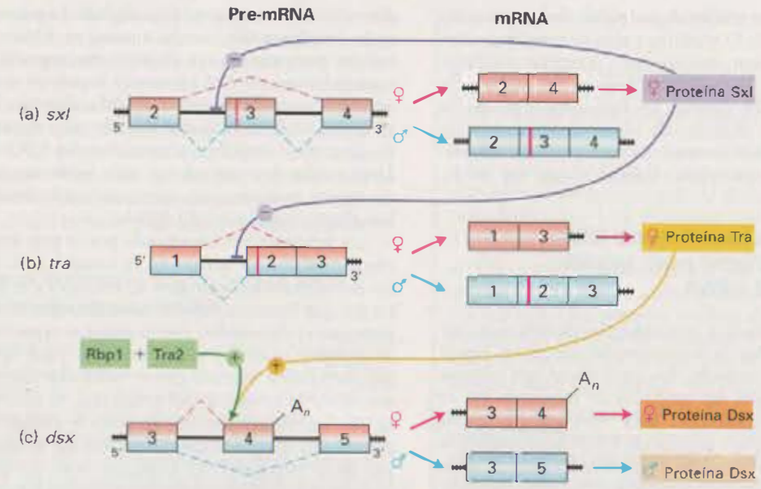
Uno de los primeros ejemplos de corte y empalme alternativo regulado de los pre-mRNA proviene de estudios de la diferenciación sexual en *Drosophila*. Los genes necesarios para la diferenciación sexual normal en *Drosophila* se caracterizaron por primera vez aislando mutantes de *Drosophila* que eran defectuosos en el proceso. Cuando se caracterizaron bioquímicamente las proteínas codificadas por los genes de tipo silvestre, se descubrió que dos de ellas regulaban una cascada de corte y empalme alternativo del RNA en embriones de *Drosophila*. Investigaciones más recientes han proporcionado mayor comprensión acerca de cómo estas proteínas regulan el procesamiento del RNA.

La proteína Sxl, codificada por el gen *sex-lethal*, es la primera proteína en actuar en la cascada. En las etapas iniciales del desarrollo, este gen se transcribe a partir de un promotor que funciona sólo en los embriones hembras. Conforme prosigue el desarrollo, este promotor específico de la hembra se apaga y se activa otro promotor para *sex-lethal* tanto en los embriones machos como hembras. Sin embargo, en ausencia de la proteína Sxl temprana, el pre-mRNA *sex-lethal* en los embriones machos se corta y empalma para producir un mRNA que contiene un codón de terminación al principio de la secuencia. El resultado neto es que los embriones machos no producen ninguna proteína funcional Sxl al inicio del desarrollo ni más adelante.

Por el contrario, la proteína Sxl expresada en los embriones hembras tempranos dirige el corte y empalme del pre-mRNA *sex-lethal* de manera tal que se produce un mRNA *sex-lethal* (fig. 12-14a). La Sxl logra esto al unirse a una secuencia en el pre-mRNA cerca del extremo 3' del intrón entre el exón 2 y el exón 3, bloqueando por lo tanto la asociación apropiada del U2AF y la snRNP U2. Como consecuencia, la snRNP U1 unida al extremo 3' del exón 2 se ensambla y forma un empalmosoma con la snRNP U2 unida en el punto de ramificación en el extremo 3' del intrón entre los exones 3 y 4, conduciendo al empalme de los exones 2 a 4 y omitiendo el exón 3. El mRNA *sex-lethal* resultante específico de la hembra se traduce a la proteína funcional Sxl, la cual refuerza su propia expresión en los embriones hembras al continuar provocando la omisión del exón 3. La ausencia de la proteína funcional Sxl en los embriones machos permite la inclusión del exón 3 y, en consecuencia, del codón de terminación que evita la traducción de la proteína Sxl funcional.

La proteína Sxl también regula el corte y empalme alternativo del pre-mRNA del gen *transformer* (fig. 12-14b). En los embriones machos, en los que no se expresa ninguna Sxl, el exón 1 es empalmado al exón 2, el cual contiene un codón de terminación que evita la síntesis de una proteína funcional. En los embriones hembras, sin embargo, la unión de la proteína Sxl al extremo 3' del intrón entre los exones 1 y 2 bloquea la unión del U2AF a este sitio. La interacción de Sxl con el pre-mRNA *transformer* está mediada por dos dominios RRM en la proteína (véase fig. 12-3). Cuando la Sxl está unida, el U2AF se une a un sitio de menor afinidad más distante hacia 3' en el pre-mRNA; como resultado, el exón 1 es empalmado en ese sitio de empalme alternativo 3' y se elimina el exón 2 con su codón de terminación. El mRNA *transformer* específico de la hembra resultante, que contiene exones adicionales empalmados constitutivamente, es traducido a la proteína funcional Transformer (Tra).

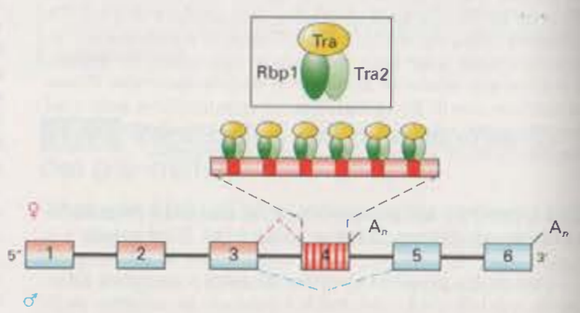
Por último, la proteína Tra regula el procesamiento alternativo del pre-mRNA transcripto a partir del gen *double-sex* (fig. 12-14c). En los embriones hembras, un complejo de Tra y dos proteínas expresadas constitutivamente, Rbp1 y Tra2, dirigen el empalme del exón 3 con el exón 4 y también promueven el corte/poliadenilación en el sitio poli(A) alternati-



▲ Fig. 12-14. Cascada de corte y empalme regulados que controlan la determinación del sexo a través de la expresión de los genes *sex-lethal (sxl), transformer (tra)* y *double-sex (dsx)* en los embriones de *Drosophila*. Para mayor claridad, sólo se muestran los exones (cajas) y los intrones (líneas negras) donde tiene lugar el corte y empalme regulado. El corte y empalme se indica con líneas discontinuas por arriba (hembras) y líneas azules discontinuas por debajo (machos) de los pre-mRNA. Las líneas verticales rojas en los exones indican codones de terminación en el marco de lectura, los cuales evitan la síntesis de proteínas funcionales. Sólo los embriones hembras producen proteína Sxl funcional, que *reprime* el corte y empalme entre los exones 2 y 3 en el pre-mRNA (a) de *sxl* y entre los exones 1 y 2 en el pre-mRNA *tra* (b). (c) En cambio, la unión cooperativa de la proteína Tra y dos proteínas SR, Rbp 1 y Tra2, *activa* el corte y empalme entre los exones 3 y 4 y el corte/poliadenilación A_n en el extremo 3' del exón 4 en el pre-mRNA *dsx* de los embriones hembras y en consecuencia el exón 3 es empalmado al exón 5. Como resultado de esta cascada de empalmes regulados, en los embriones hembras y machos se producen proteínas Dsx diferentes que reprimen la transcripción de genes necesarios para la diferenciación sexual del sexo opuesto. (Adaptado de M. J. Moore et al., 1993, en R. Gesteland y J. Atkins, eds., *The RNA World*, Cold Spring Harbor Press, pp. 303-357.)

vo del extremo 3' del exón 4. En los embriones machos, que no producen la proteína Tra, el exón 4 es omitido, de manera tal que el exón 3 se empalme con el exón 5. Éste se empalma constitutivamente con el exón 6, que está poliadenilado en su extremo 3'. Como resultado de la cascada del procesamiento regulado del RNA, representado en la figura 12-14, en los embriones machos y hembras se expresan diferentes proteínas Dsx. La proteína Dsx del macho es un represor transcripcional que inhibe la expresión de genes necesarios para el desarrollo de la hembra. A la inversa, la proteína Dsx de la hembra reprime la transcripción de genes necesarios para el desarrollo del macho.

En la figura 12-15 se ilustra cómo se supone que el complejo Tra/Tra2/Rbp1 interactúa con el pre-mRNA *double-sex*. Estudios recientes mostraron que Rbp1 y Tra2 son proteínas SR, similares a las ya detalladas. Éstas median la unión cooperativa del complejo Tra/Tra2/Rbp1 a seis amplificadores del empalme exónico en el exón 4. Luego, las proteínas Tra2 y Rbp1 promueven la unión del U2AF y la snRNP U2 al extremo 3' del intrón entre los exones 3 y 4, exactamente como las otras proteínas SR hacen para los exones empalmados constitutivamente (véase fig. 12-11). Los complejos Tra/Tra2/Rbp1 también pueden amplificar la unión del complejo de corte/poliadenilación al extremo 3' del exón 4.



▶ Fig. 12-15. Modelo de la activación del corte y empalme por la proteína Tra y las proteínas SR Rbp1 y Tra2. En los embriones hembra de *Drosophila*, el empalme de los exones 3 y 4 en el pre-mRNA de *dsx* es activado por la unión de los complejos Tra/Tra2/Rbp1 a seis sitios del exón 4. Debido a que Rbp1 y Tra2 no pueden unirse al pre-mRNA en ausencia de Tra, el exón 4 es omitido en los embriones machos. Para mayores detalles véase el texto. A_n: poliadenilación. (Adaptado de T. Maniatis y B. Tasic, 2002, *Nature* 418:236.)

Represores y activadores del corte y empalme del RNA controlan este procesamiento en sitios alternativos

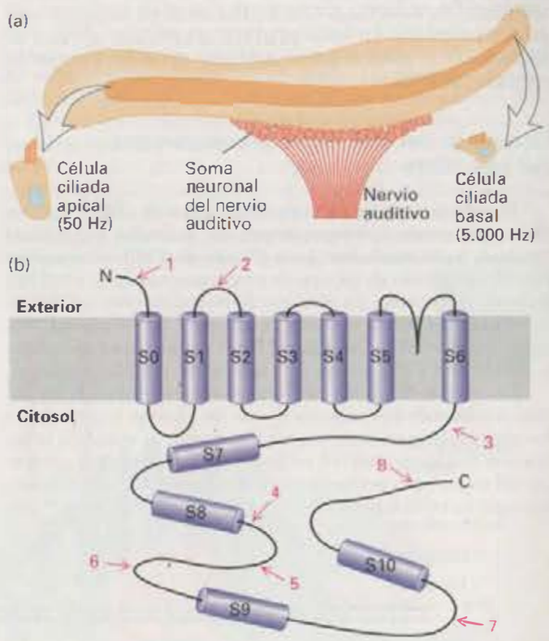
Como se evidencia a partir de la figura 12-14, la proteína Sxl *Drosophila* y la proteína Tra tienen efectos opuestos: la Sxl evita el corte y empalme, y causa que los exones sean omitidos, mientras que Tra promueve el corte y empalme. La acción de proteínas similares puede explicar la expresión específica del tipo de célula de las isoformas de la fibronectina en los seres humanos. Por ejemplo, un represor del corte y empalme símil-Sxl expresado en los hepatocitos puede unirse a sitios de corte y empalme para los exones EIIIA y EIIIB en el pre-mRNA de la fibronectina, y provocar que sean omitidos durante el empalme del RNA (véase fig. 4-15). En forma alternativa, un activador del corte y empalme símil-Tra expresado en los fibroblastos puede activar los sitios de corte y empalme asociados con los exones EIIIA y EIIIB de la fibronectina y conducir a la inclusión de estos exones en el mRNA maduro. En algunos sistemas se reveló experimentalmente que la inclusión de un exón en algunos tipos celulares o la omisión del mismo exón en otros tipos celulares es el resultado de la influencia combinada de varios represores y amplificadores del corte y empalme.

El empalme alternativo de los exones es especialmente común en el sistema nervioso y genera múltiples isoformas de muchas proteínas necesarias para el desarrollo y el funcionamiento neuronal, tanto en vertebrados como en invertebrados. Los transcriptos primarios de estos genes a menudo muestran patrones de corte y empalme bastante complejos que pueden generar varios mRNA diferentes, con distintas formas empalmadas expresadas en diferentes localizaciones anatómicas dentro del sistema nervioso central. Consideraremos dos ejemplos notables que ilustran el papel crítico de este proceso en el funcionamiento neuronal.

Expresión de las isoformas *Slo* en las células ciliadas de los vertebrados En el oído interno de los vertebrados, las "células ciliadas" individuales, que son neuronas ciliadas, responden con mayor intensidad a frecuencias sonoras específicas. Las células sintonizadas a frecuencias bajas (≈50 Hz) se hallan en un extremo del conducto coclear que forma el oído interno; las células que responden a frecuencias altas (≈5000 Hz) se encuentran en el otro extremo (fig. 12-16a). Las células del medio responden a un gradiente de frecuencias entre estos extremos. Un componente de la sintonía de las células ciliadas de los reptiles y las aves es la apertura de los canales iónicos de K^+ en respuesta al aumento de concentraciones intracelulares de Ca^{2+}. La concentración de Ca^{2+} a la cual el canal se abre determina la frecuencia con la que oscila el potencial de la membrana y, por ende, la frecuencia a la que está sintonizada la célula.

El gen que codifica este canal (denominado *slo*, como el gen homólogo de *Drosophila*) se expresa como múltiples mRNA procesados alternativamente. Las diversas proteínas codificadas por estos mRNA alternativos se abren a diferentes concentraciones de Ca^{2+}. Las células ciliadas con diferentes frecuencias de respuestas expresan diferentes isoformas del canal, es decir de la proteína Slo, según su posición a lo largo de la longitud de la cóclea. La variación de secuencia en la proteína es muy compleja; existen al menos ocho regiones en el mRNA donde se utilizan exones alternativos, lo que permite la expresión de 576 isoformas posibles (fig. 12-16b). Los análisis por PCR de los mRNA *slo* de las células ciliadas individuales permitieron comprobar que cada célula ciliada expresa una mezcla de diferentes mRNA *slo* alternativos, con diferentes formas que predominan en distintas células de acuerdo con su posición a lo largo de la cóclea. Esta notable disposición sugiere que el corte y empalme del pre-mRNA *slo* es regulado en respuesta a señales extracelulares que informan a la célula de su posición a lo largo de la cóclea.

Resultados recientes mostraron que el corte y empalme en uno de los sitios alternativos de corte y empalme del pre-mRNA *slo* de rata se suprime cuando una proteincinasa específica se activa por despolarización de la neurona en respuesta a la actividad sináptica de las neuronas con las que interactuó. Esta observación sugiere la posibilidad de que pueda activarse un represor del corte y empalme específico para este sitio cuando es fosforilado por la proteincinasa, cuya actividad a su vez está regulada por la actividad sináptica. Puesto que las proteínas SR y hnRNP son modificadas extensamente por fos-



▲ Fig. 12-16. Función del corte y empalme alternativo del mRNA de *slo* en la percepción de sonidos de diferente frecuencia. (a) La cóclea de pollo, un tubo de 5 mm de largo, contiene un epitelio de células ciliadas auditivas que están sintonizadas con un gradiente de frecuencias vibratorias de 50 Hz en el extremo apical (*izquierda*) a 5.000 Hz en el extremo basal (*derecha*). (b) La proteína Slo contiene siete hélices α transmembrana (S0-S6), que se asocian para formar un canal de K^+. El dominio citosólico, que incluye cuatro regiones hidrófobas (S7-S10), regula la apertura del canal en respuesta al Ca^{2+}. Las isoformas del canal del Slo, codificadas por los mRNA empalmados alternativamente producidos a partir del mismo transcripto primario, se abren a diferentes concentraciones de Ca^{2+} y por ende responden a diferentes frecuencias. Los números rojos se refieren a regiones donde el corte y empalme alternativo produce secuencias de aminoácidos diferentes en las diversas isoformas de Slo. (Adaptado de K. P. Rosenblatt et al., 1997, *Neuron*, 19:1061.)

forilación y otras modificaciones postraduccionales, parece probable que la regulación compleja del corte y empalme alternativo del RNA a través de modificaciones postraduccionales de los factores de corte y empalme cumpla un papel importante en la modulación de la función de las neuronas.

Expresión de las isoformas *Dscam* en las neuronas retinales de *Drosophila* El ejemplo más extremo del procesamiento alternativo del RNA regulado revelado hasta el momento tiene lugar en la expresión del gen *Dscam* en *Drosophila*. Las mutaciones en este gen interfieren en las conexiones normales hechas por los axones de neuronas retinales con neuronas en una región específica del cerebro durante el desarrollo de la mosca. Los análisis del gen *Dscam* muestran que contiene 95 exones que pueden empalmarse en forma alternativa para generar más de 38.000 isoformas posibles. Estos resultados sugieren la posibilidad de que la expresión de diferentes isoformas *Dscam* a través del corte y empalme regulado del RNA, ayude a especificar las decenas de miles de diferentes conexiones sinápticas específicas establecidas entre las neuronas retinales y cerebrales. En otras palabras, el cableado correcto de neuronas en el cerebro puede depender del corte y empalme regulado del RNA.

La edición del RNA altera las secuencias del pre-mRNA

El secuenciamiento de numerosos clones de cDNA y de los DNA genómicos correspondientes de múltiples organismos condujo, hacia mediados de la década de 1980, al descubrimiento inesperado de un tipo de procesamiento del pre-mRNA antes no reconocido. En este tipo de procesamiento denominado **edición del RNA**, se altera la secuencia de un pre-mRNA; como resultado, la secuencia del RNA maduro correspondiente difiere de los exones que lo codifican en el DNA genómico.

La edición del RNA está ampliamente difundida en las mitocondrias de los protozoos y de las plantas y también en los cloroplastos; en estos orgánulos, más de la mitad de la secuencia de algunos mRNA está alterada respecto de la secuencia del transcripto primario correspondiente. En los eucariontes superiores, la edición del RNA es mucho más rara, y por ende hasta ahora sólo se han observado cambios de bases individuales. Sin embargo, esta edición menor reveló tener consecuencias funcionales importantes en algunos casos.

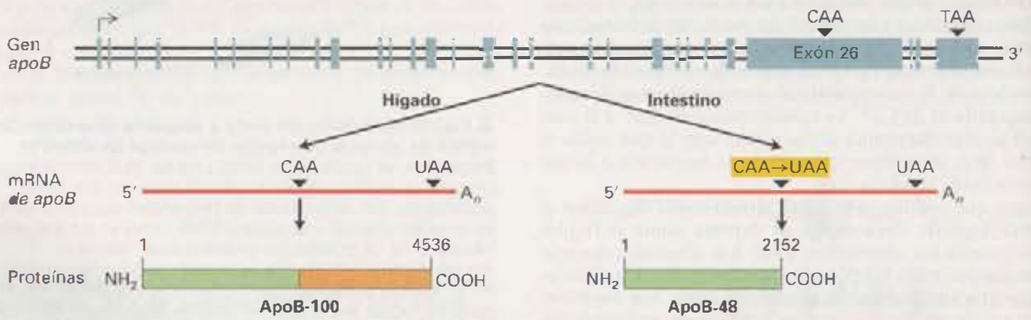
Un ejemplo interesante de la edición del RNA en los mamíferos involucra al gen *apoB*, que codifica dos formas alternativas de la proteína del suero apolipoproteína B (apoB): la apoB-100 se expresa en los hepatocitos y la apoB-48 se expresa en las células epiteliales intestinales. La apoB-48 de ≈ 240-kDa corresponde a la región N-terminal de la apoB-100 de ≈500 kDa. Como detallamos en el capítulo 18, ambas proteínas apoB son componentes de grandes complejos lipoproteicos que transportan lípidos en el suero. Sin embargo, sólo los complejos lipoproteicos de baja densidad (LDL), que contienen apoB-100 sobre su superficie, entregan colesterol a los tejidos del cuerpo al unirse al receptor LDL presente en todas las células.

La expresión de las dos formas de la apoB específica del tipo de célula resulta de la edición del pre-mRNA *apoB* de manera tal de cambiar el nucleótido en la posición 6666 en la secuencia, de una C a una U. Esta alteración, que sucede sólo en las células intestinales, convierte un codón CAA para la glutamina en un codón de terminación UAA y conduce a la síntesis de la apoB-48 más corta (fig. 12-17). Los estudios con la enzima parcialmente purificada que realiza la desaminación postranscripcional de la C_{6666} a U muestran que puede reconocer y editar un RNA tan corto como de 26 nucleótidos con la secuencia que circunda la C_{6666} en el transcripto primario *apoB*.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 12.2

Regulación del procesamiento del pre-mRNA

- Debido al corte y empalme alternativo de los transcriptos primarios y a la escisión en diferentes sitios de poli(A), pueden expresarse diferentes mRNA a partir del mismo gen en diferentes tipos de células o en distintas etapas del desarrollo (véase fig. 12-14).
- El corte y empalme alternativo puede estar regulado por proteínas de unión al RNA que se unen a secuencias específicas cerca de los sitios de corte y empalme regulados. Los represores del corte y empalme pueden bloquear estéricamente la unión de los factores de corte y empalme a sitios específicos en los pre-mRNA o inhibir sus funciones. Los activadores del corte y empalme amplificarían este procesamiento interactuando con factores del corte y empalme, promoviendo de esta forma su asociación con un sitio de corte y empalme regulado.
- En la edición del RNA se altera la secuencia nucleotídica de un pre-mRNA en el núcleo. En los vertebrados, este proceso es bastante raro e involucra la desaminación de un único par de bases en la secuencia de mRNA, que da lugar a un cambio en el aminoácido especificado por el codón correspondiente y a la producción de una proteína funcionalmente diferente (véase fig. 12-17).



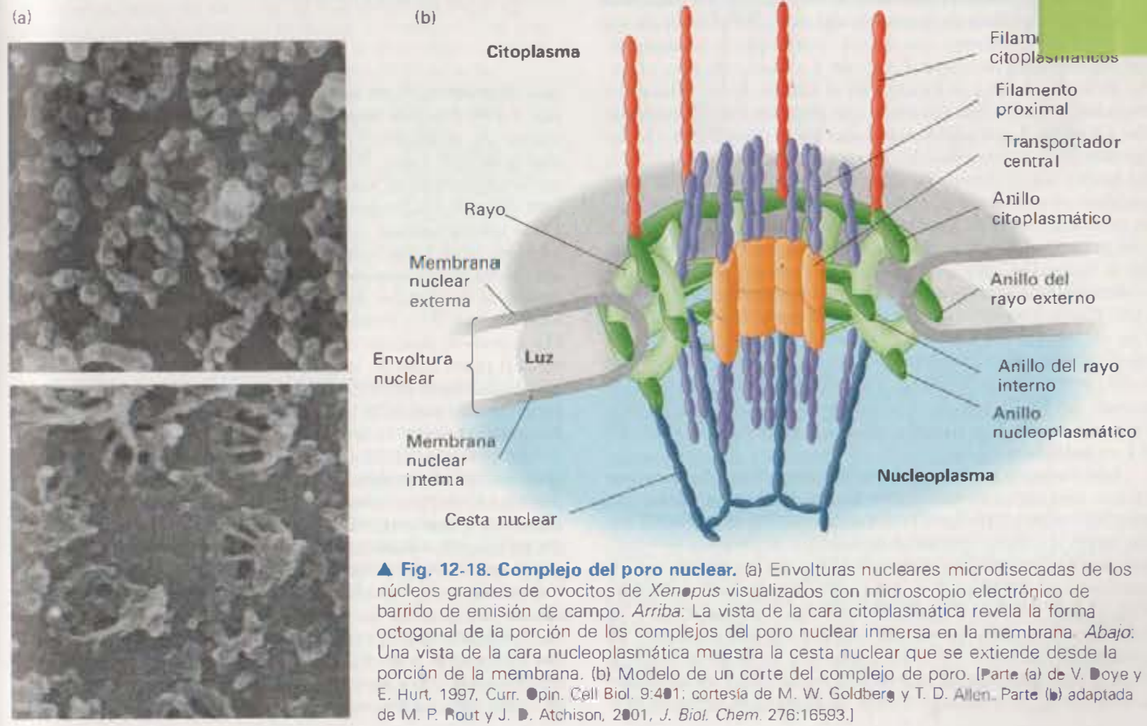
▲ **Fig. 12-17. Edición del pre-mRNA de *apo-B*.** El RNA *apoB* producido en el hígado tiene la misma secuencia que los exones del transcripto primario. Este mRNA es traducido a apoB-100, que tiene dos dominios funcionales; un dominio N-terminal (verde) que se asocia con lípidos y con un dominio C-terminal (naranja) que se une a los receptores LDL sobre las membranas celulares. En el mRNA *apo-B* producido en el intestino, el codón CAA del exón 26 es editado a un codón de terminación UAA. Como resultado, las células intestinales producen apoB-48, que corresponde al dominio N-terminal de la apoB-100. (Adaptado de P. Hodges y J. Scott, 1992, Trends Biochem. Sci.17:77.)

12.3 Transporte de macromoléculas a través de la envoltura nuclear

Una vez completado el procesamiento de un mRNA en el núcleo, éste permanece asociado con proteínas hnRNP específicas en un *complejo ribonucleoproteico mensajero*, o *mRNP*. Antes de que pueda ser traducido a la proteína codificada, debe ser transportado del núcleo al citoplasma. El núcleo está separado del citoplasma por dos membranas que forman la **envoltura nuclear** (véase fig. 5-19). Al igual que la membrana plasmática que rodea las células, cada membrana nuclear consiste de una bicapa fosfolipídica y diversas proteínas asociadas. El transporte de macromoléculas incluidas mRNP, tRNA y subunidades ribosómicas, fuera del núcleo y el transporte de todas las proteínas nucleares traducidas en el citoplasma hacia el núcleo ocurre a través de los *poros nucleares* en un proceso que difiere fundamentalmente del transporte de moléculas pequeñas y iones a través de otras membranas celulares (cap. 7). La profundización de la comprensión de los mecanismos del transporte a través de los poros nucleares provino inicialmente de estudios de los poros nucleares y de la entrada y salida de proteínas individuales, que consideraremos primero, antes de retornar a la salida de los mRNP.

Las moléculas grandes y pequeñas ingresan y abandonan el núcleo a través de los complejos del poro nuclear

Numerosos poros perforan la envoltura nuclear en todas las células eucariontes. Cada poro nuclear está formado por una estructura elaborada denominada **complejo del poro nuclear** (NPC), el cual es inmenso para los estándares moleculares, ≈125 millones de daltons en los vertebrados, o unas 30 veces más grande que un ribosoma. Un NPC está constituido por múltiples copias de unas 50 (en las levaduras) hasta 100 (en los vertebrados) proteínas diferentes denominadas **nucleoporinas**. Las fotografías electrónicas de los complejos del poro nuclear revelan una estructura aproximadamente octogonal inmersa en la membrana de la cual se extienden ocho filamentos de ≈100 nm de largo hacia el nucleoplasma (fig. 12-18). Los extremos distales de estos filamentos están unidos por el anillo terminal y forman una estructura denomi-



▲ **Fig. 12-18. Complejo del poro nuclear.** (a) Envolturas nucleares microdisecadas de los núcleos grandes de ovocitos de *Xenopus* visualizados con microscopio electrónico de barrido de emisión de campo. *Arriba*: La vista de la cara citoplasmática revela la forma octogonal de la porción de los complejos del poro nuclear inmersa en la membrana. *Abajo*: Una vista de la cara nucleoplasmática muestra la cesta nuclear que se extiende desde la porción de la membrana. (b) Modelo de un corte del complejo de poro. [Parte (a) de V. Doye y E. Hurt, 1997, Curr. Opin. Cell Biol. 9:401; cortesía de M. W. Goldberg y T. D. Allen. Parte (b) adaptada de M. P. Rout y J. D. Atchison, 2001, *J. Biol. Chem.* 276:16593.]

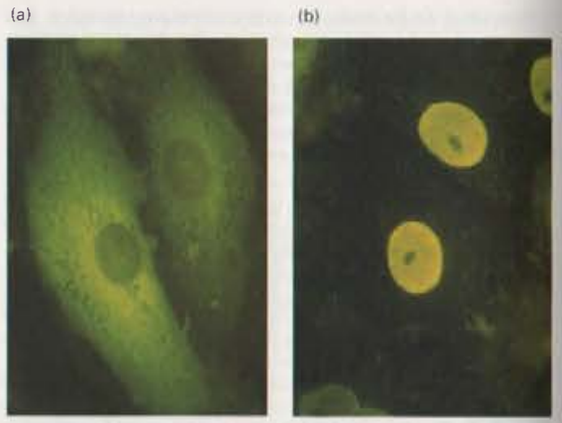
nada *cesta o jaula nuclear*. La porción embebida en la membrana también está adherida directamente a la **lámina nuclear**, una red de filamentos intermedios de laminina que se extienden por encima de la superficie interna de la envoltura nuclear (véase fig. 21-16). Los filamentos citoplasmáticos se extienden desde el lado citoplasmático del NPC hacia el citosol.

Los iones, los pequeños metabolitos y las proteínas globulares de hasta ≈60 kDa pueden difundirse a través de un canal lleno de agua en el complejo del poro nuclear; estos canales se comportan como si tuvieran ≈0,9 nm de diámetro. Sin embargo, los grandes complejos proteicos y ribonucleoproteicos no pueden difundirse hacia adentro y hacia afuera del núcleo. En vez de ello, estas macromoléculas son transportadas selectivamente hacia adentro y hacia afuera del núcleo con la asistencia de proteínas transportadoras solubles que unen macromoléculas y también interactúan con ciertas nucleoporinas. Los principios que subyacen al transporte de macromoleculas a través de los complejos de poro nuclear fueron determinados por primera vez para el transporte de proteínas individuales hacia el núcleo, lo cual discutiremos primero antes de concentrarnos en la pregunta de cómo se transportan los mRNA completamente procesados hacia el citoplasma.

Las importinas transportan hacia el núcleo proteínas que contienen señales de localización nuclear

Todas las proteínas halladas en el núcleo son sintetizadas en el citoplasma y se transportan hacia el núcleo a través de complejos de poro nuclear. Estas proteínas contienen una *señal de localización nuclear (NLS)* que dirige su transporte selectivo hacia el núcleo. Las NLS fueron descubiertas a través del análisis de mutantes del virus 40 (SV40) de los simios, que produjeron una forma anormal de la proteína viral denominada antígeno T grande. La forma de tipo silvestre de esta proteína se localiza en el núcleo de las células infectadas por el virus, mientras que algunas formas mutadas del antígeno T grande se acumulan en el citoplasma. Todas las mutaciones responsables de esta ubicación celular alterada tienen lugar dentro de una secuencia específica de siete residuos rica en aminoácidos básicos cerca del C-terminal de la proteína: Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val. Los experimentos con proteínas híbridas diseñadas genéticamente, en las cuales se fusionaba esta secuencia a una proteína citosólica, demostraron que esta secuencia dirige el transporte hacia el núcleo, y, en consecuencia, funciona como una NLS (fig. 12-19). Las secuencias NLS posteriormente se identificaron en numerosas otras proteínas dirigidas hacia el núcleo. Muchas de estas proteínas son similares a la NLS básica del antígeno T grande del SV40, mientras que otras son químicamente bastante diferentes. Por ejemplo, una NLS de la proteína hnRNP A1 es hidrófoba.

Los trabajos iniciales acerca del mecanismo de incorporación nuclear se centraron en las proteínas que contenían una NLS básica, similar a la del antígeno T grande del SV40. Un sistema celular permeabilizado con digitonina proveyó un experimento in vitro para analizar los componentes citosólicos solubles necesarios para la incorporación nuclear (fig. 12-20). Utilizando este sistema de experimentación, se purificaron cuatro proteínas necesarias: Ran, factor de transporte nuclear 2 (NTF2), importina α e importina β. La *Ran* es una proteína G monomérica que existe en dos conformaciones, una cuando forma un complejo con el GTP y



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 12-19 La fusión de una señal nuclear de señalización (NLS) a una proteína citoplasmática hace que la proteína entre en el núcleo celular. (a) La piruvatocinasa normal, visualizada mediante inmunofluorescencia luego de tratar células cultivadas con un anticuerpo específico (amarillo), se localiza en el citoplasma. Esta gran proteína citosólica participa en el metabolismo de los carbohidratos. (b) Cuando una proteína piruvatocinasa química, que contiene la NLS del SV40 en su N-terminal, se expresó en las células, se localizó en el núcleo. Esta proteína química se expresó mediante la transfección de un gen diseñado genéticamente al fusionar un fragmento génico viral que codifica la NLS del SV40 con el gen de la piruvatocinasa (De D. Kalderon et al., 1984, *Cell* 39:499 cortesía del doctor Alan Smith.)

una alternativa cuando el GTP se hidroliza a GDP (véase fig. 3-29). Las dos importinas forman un heterodímero *receptor de incorporación (importación) nuclear*: la subunidad α se une a una NLS básica en una proteína "carga" a ser transportada al núcleo, y la subunidad β interactúa con una clase de nucleoporinas denominada *nucleoporinas FG*. Estas nucleoporinas, que revisten el canal del complejo del poro nuclear y también se hallan en la cesta nuclear y en los filamentos citoplasmáticos, contienen múltiples repeticiones de secuencias hidrófobas cortas ricas en residuos de fenilalanina (F) y residuos de glicina (G) (repeticiones FG). Hace poco se descubrió que varios homólogos de las importinas β participan en la incorporación nuclear de proteínas con otras clases de NLS. Estas importinas interactúan directamente con sus NLS afines sin necesidad de una proteína adaptadora como la importina α.

En la figura 12-21 se muestra un modelo actual de la incorporación de proteínas "carga" citoplasmáticas mediada por una importina monomérica. La importina libre en el citoplasma se une a su NLS afín en una proteína carga formando un *complejo bimolecular "carga"*. El complejo carga luego es translocado a través del canal NPC a medida que la importina se une transitoriamente a repeticiones FG individuales sucesivas en las nucleoporinas FG que revisten el canal. Se piensa que las repeticiones FG actúan como "escalones" a medida que el complejo carga se difunde desde una nucleoporina FG a otra en su propio camino a través del canal mediante un proceso que no requiere un aporte directo

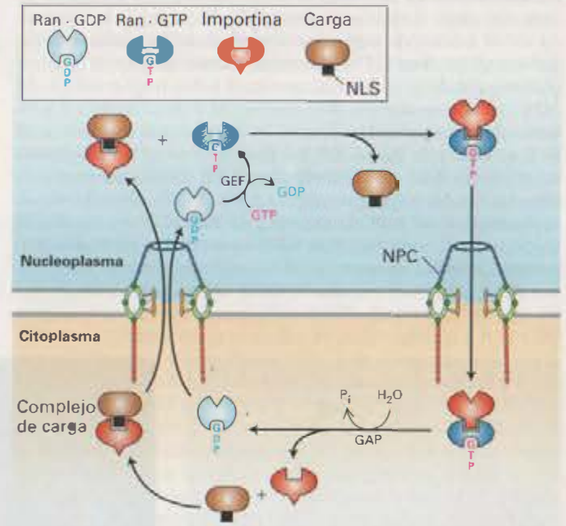


▲ FIGURA EXPERIMENTAL 12-20 La falla del transporte nuclear que ocurre en cultivo de células permeabilizadas en ausencia de lisado demuestra la participación de componentes citosólicos solubles en el proceso. (a) Microfotografías de contraste de fase de células HeLa no tratadas y permeabilizadas con digitonina. El tratamiento de una capa individual de células cultivadas con el detergente no iónico suave digitonina permeabiliza la membrana plasmática de manera que los constituyentes citosólicos se filtran hacia el exterior, pero dejan la envoltura nuclear y los NPC intactos. (b) Microfotografías de fluorescencia de células HeLa permeabilizadas con digitonina incubadas con una proteína fluorescente acoplada químicamente a un péptido sintético NLS de antígeno T del SV40 en presencia y ausencia de citosol (lisado). La acumulación de este sustrato de transporte en el núcleo sólo se produjo cuando se incluyó citosol en la incubación (*abajo derecha*). (De S. Adam et al., 1990, *J. Cell. Biol.* 111:807; cortesía del doctor Larry Gerace.)

de energía de la hidrólisis de ATP u otro mecanismo. Se piensa que las repeticiones FG hidrófobas se presentan en regiones de cadenas polipeptídicas hidrófilas extendidas que llenan el canal transportador central. Se propuso que las cadenas extendidas forman un entramado de cadenas hidrófilas asociadas a través de interacciones hidrófobas entre las repeticiones FG. Se cree que este entramado molecular restringe la difusión de proteínas superiores a los ≈60 kD. Sin embargo, se piensa que las importinas que transportan proteínas penetran el entramado molecular realizando sucesivas interacciones con las repeticiones FG.

Cuando el complejo carga alcanza el nucleoplasma, la importina interactúa con la Ran·GTP, lo que provoca un cambio conformacional en la importina que disminuye su afinidad por la NLS, liberando la proteína carga hacia el nucleoplasma. El complejo Ran·GTP-importina se difunde luego de regreso a través del NPC, de vuelta, a través de interacciones de importina con repeticiones FG. Una vez que el complejo Ran·GTP-importina alcanza el lado citoplasmático del NPC, la Ran interactúa con una *proteína aceleradora de la GTPasa (Ran-GAP)* específica, es decir, un componente de los filamentos citoplasmáticos NPC. Esto estimula a la Ran a hidrolizar el GTP unido a GDP, haciendo que se convierta a una conformación que tiene baja afinidad por la importina, de manera que la importina libre se libera hacia el citoplasma, donde puede participar en otro ciclo de incorporación.

La Ran regresa al núcleo por el NTF2. El dímero NTF2 se une específicamente a la Ran·GDP y también interactúa con las repeticiones FG de las nucleoporinas FG. En consecuencia, el complejo NTF2-Ran·GDP puede difundirse a tra-



▲ Fig. 12-21. Mecanismos para la incorporación nuclear de las proteínas "carga". En el citoplasma (*abajo*), una importina libre se une a la NLS de una proteína carga y forma un complejo de carga bimolecular. En el caso de una NLS básica, la proteína adaptadora importina α establece un puente con la NLS y la importina β y forman un complejo de carga trimolecular (no se muestra). El complejo de carga se difunde a través del NPC mediante interacciones con sucesivas nucleoporinas FG. En el nucleoplasma, la interacción de la Ran·GTP con la importina provoca un cambio conformacional que disminuye su afinidad por la NLS y libera la carga. Para sustentar otro ciclo de incorporación, el complejo importina-Ran·GTP es transportado de regreso al citoplasma. Una proteína aceleradora de GTPasa (GAP) asociada con los filamentos citoplasmáticos del NPC estimula a la Ran a hidrolizar el GTP unido. Esto genera un cambio de conformación que provoca la disociación de la importina, la cual puede luego iniciar otro ciclo de incorporación. La Ran·GDP es unida mediante el NTF2 (no se muestra) y devuelta al nucleoplasma, donde un factor de intercambio de nucleótido de guanina (GEF) provoca la liberación de GDP y el restablecimiento de la unión de GTP.

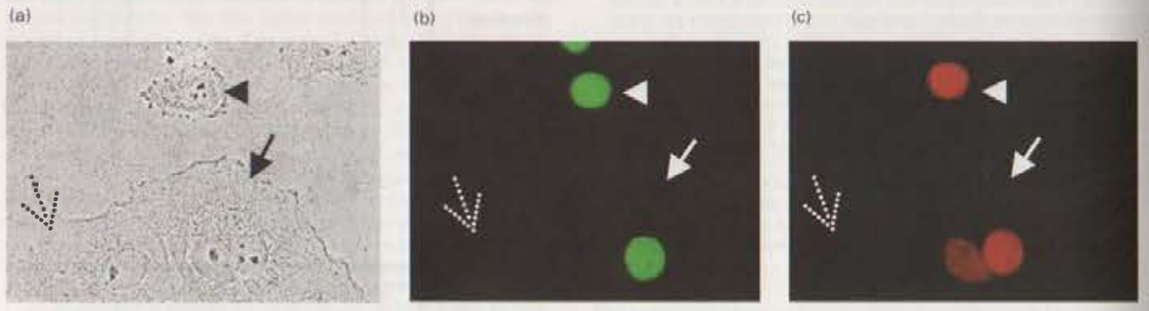
vés del poro por medio de interacciones transitorias entre la NTF2 y las repeticiones FG. Cuando este complejo alcanza el nucleoplasma, encuentra un *factor de intercambio de nucleótido de guanina (Ran-GEF)* que hace que la Ran libere su GDP unido y vuelva a unir el GTP que está presente en concentraciones mucho mayores. El cambio conformacional resultante en la Ran disminuye su afinidad por la NTF2 de manera que la Ran·GTP libre se libere hacia el nucleoplasma y el NTF2 quede libre para difundirse de regreso a través del poro.

Los complejos de incorporación viajan a través del poro por difusión, un proceso aleatorio. Aún así, el transporte es unidireccional. La dirección de transporte es una consecuencia de la rápida disociación del complejo de incorporación cuando éste alcanza el nucleoplasma. Como resultado, hay un gradiente de concentración del complejo carga-importina a través del NPC: alto en el citoplasma donde el complejo se ensambla y bajo en el nucleoplasma donde se disocia. Este gradiente de concentración es responsable de la naturaleza unidireccional de la incorporación nuclear. Un gradiente de concentración similar es responsable de conducir la importina en el núcleo de regreso al citoplasma. La concentración del complejo Ran·GTP-importina es más alto en el nucleoplasma, donde se ensambla, que en el lado citoplasmático del NPC, donde se disocia. Por último, la dirección de los procesos de transporte depende de la distribución asimétrica de la Ran-GEF y la Ran-GAP. La Ran-GEF en el nucleoplasma mantiene la Ran en el estado Ran·GTP, donde promueve la disociación del complejo carga. La Ran-GAP sobre el lado citoplasmático del NPC convierte a la Ran·GTP en Ran·GDP, disociando el complejo Ran·GTP-importina y liberando importina libre al citosol.

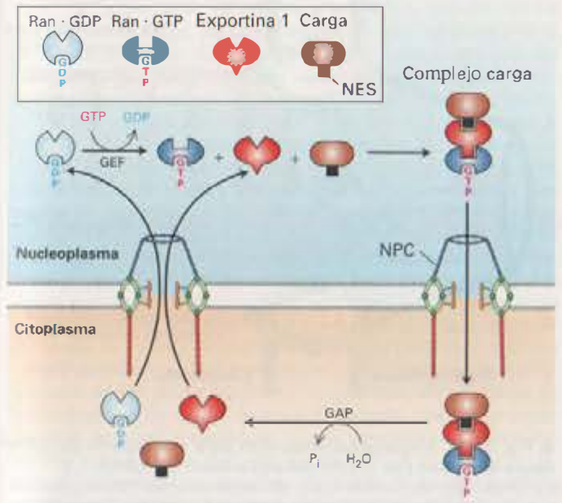
Las exportinas transportan proteínas que contienen señales para la salida del núcleo

Un mecanismo muy similar se utiliza para transportar proteínas, tRNA y subunidades ribosómicas del núcleo al citoplasma. Este mecanismo fue dilucidado a partir de estudios de ciertas proteínas hnRNP que realizan "transbordos" entre el núcleo y el citoplasma. Por ejemplo, los experimentos de fusión celular descritos en la figura 12-22 mostraron por primera vez que algunas proteínas hnRNP realizan un ciclo hacia adentro y hacia afuera del citoplasma, mientras que otras permanecen ubicadas en el núcleo. Estas proteínas "transbordadoras" contienen una *señal de salida nuclear (NES)* que estimula su salida desde el núcleo al citoplasma a través de los poros nucleares, además de una NLS que resulta en su reincorporación al núcleo. Los experimentos con genes híbridos diseñados genéticamente que codifican una proteína restringida al núcleo fusionada a diversos segmentos de una proteína que realiza transbordos hacia adentro y hacia afuera del núcleo identificaron al menos tres clases diferentes de NES: una secuencia rica en leucina hallada en el PKI (un inhibidor de la proteincinasa A) y en la proteína Rev del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), una secuencia de 38 residuos en la hnRNP A1 y una secuencia en la hnRNP K. Hasta la fecha no se han identificado rasgos estructurales funcionalmente significativos (p. ej., aminoácidos repetidos) en las últimas dos clases.

El mecanismo por el cual las proteínas transbordadoras salen del núcleo se comprende mejor para aquellas que contienen una NES rica en leucina. De acuerdo con el modelo actual que se muestra en la figura 12-23, un *receptor específico de salida nuclear* en el núcleo, la exportina 1, primero



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 12-22 El movimiento de la proteína hnRNP A1 humana entre los núcleos de un heterocarionte demuestra que puede circular hacia adentro y hacia afuera del citoplasma, mientras que la proteína hnRNP C humana, que no mostró ese movimiento, no puede hacerlo. Células HeLa y células de *Xenopus* cultivadas se fusionaron mediante tratamiento con polietilenglicol, produciendo heterocariontes que contenían el núcleo de cada tipo celular. Las células híbridas fueron tratadas con cicloheximida inmediatamente después de la fusión para evitar la síntesis proteica. Luego de 2 horas, las células se fijaron y se tiñeron con anticuerpos marcados con fluorescencia específicos contra las proteínas humanas hnRNP A1 y C. Estos anticuerpos no se unen a las proteínas de *Xenopus* homólogas. (a) Una preparación fijada vista con microscopio de contraste de fase incluye células HeLa no fusionadas (punta de flecha) y células de *Xenopus* (flecha de puntos), al igual que heterocariontes fusionados (flechas sólidas). En el heterocarionte de esta microfotografía, el núcleo redondo de la célula HeLa está a la derecha del núcleo de forma ovalada del *Xenopus*. (b, c) Cuando la misma preparación se vio mediante microscopia de fluorescencia, la proteína hnRNP C teñida apareció verde y la proteína hnRNP A1 teñida apareció roja. Nótese que la célula de *Xenopus* no fusionada de la izquierda no está teñida, lo que confirma que los anticuerpos son específicos contra las proteínas humanas. En el heterocarionte, la proteína hnRNP C aparece sólo en el núcleo de la célula HeLa (b), mientras que la proteína A1 aparece en ambos núcleos (c). Puesto que la síntesis de proteínas fue bloqueada tras la fusión celular, algunas de las proteínas humanas hnRNP A1 debieron haber abandonado el núcleo de las células HeLa, moverse a través del citoplasma y entrar en el núcleo de *Xenopus* en el heterocarionte. (Véase S. Pinol-Roma y G. Dreyfuss, 1992, *Nature* 355:730; cortesía de G. Dreyfuss.)



▲ Fig. 12-23. Mecanismo para la salida nuclear de proteínas carga que contienen una señal de exportación nuclear (NES) rica en leucina. En el nucleoplasma, la proteína exportina 1 se une de manera cooperativa a la NES de la proteína carga por ser transportada y a la Ran·GTP. Luego de que el complejo carga resultante se difunde a través de un NPC mediante interacciones transitorias con las repeticiones FG en las nucleoporinas FG, la Ran GAP asociada con los filamentos citoplasmáticos del NPC estimulan la conversión de Ran·GTP a Ran·GDP. El consiguiente cambio conformacional en la Ran conduce a la disociación del complejo. La proteína carga que contiene NES es liberada hacia el citosol, mientras que la exportina 1 y la Ran·GDP son transportadas de regreso al núcleo a través de los NCP. La Ran·GDP es transportada a través de su interacción con la NTF2. La Ran-GEF en el nucleoplasma luego estimula la conversión de Ran·GDP a Ran·GTP.

forma un complejo con la Ran·GTP y luego une la NES de una proteína carga. La unión de la exportina 1 a la Ran·GTP provoca un cambio conformacional en la exportina 1 que incrementa su afinidad por la NES de manera que se forma un *complejo nuclear trimolecular carga*. Al igual que las importinas, la exportina 1 interactúa transitoriamente con las repeticiones FG en las nucleoporinas FG y se difunde a través del NPC. El complejo carga se disocia cuando encuentra la Ran-GAP en los filamentos citoplasmáticos del NPC que estimulan a la Ran a hidrolizar el GTP unido, cambiándolo a una conformación que tiene menos afinidad por la exportina 1. La exportina 1 liberada cambia de conformación a una estructura que tiene baja afinidad por la NES, liberando la carga hacia el citosol. La dirección del proceso de salida es conducida por esta disociación del complejo carga de la exportina 1 en el citoplasma que provoca un gradiente de concentración del complejo carga a través del NPC de manera que sea alto en el nucleoplasma y bajo en el citoplasma. La exportina 1 y la Ran·GDP son luego transportadas de regreso hacia el núcleo a través de un NPC. La Ran·GDP es transportada mediante el NTF2, como ya se vio en relación con la incorporación nuclear. Este luego es convertido a Ran·GTP mediante la Ran-GEF en el nucleoplasma.

Si se compara este modelo para la salida nuclear con el de la figura 12-21 para la importación nuclear, se puede ver una diferencia obvia: la Ran·GTP es parte del complejo carga durante la salida, pero no durante la importación. Aparte de esta diferencia, los dos procesos de transporte son notablemente similares. En ambos procesos, la asociación de un receptor de señal de transporte con Ran·GTP en el nucleoplasma induce un cambio conformacional que afecta a su afinidad por la señal de transporte. Durante la importación, la interacción provoca la liberación de la carga, mientras que durante la exportación, la interacción promueve la asociación con la carga. Tanto en la salida como en la importación, la estimulación de la hidrólisis de Ran·GTP en el citoplasma por la Ran·GAP asociado con los filamentos citoplasmáticos NPC produce un cambio conformacional en la Ran que libera al receptor de señal de transporte. Durante la salida nuclear, también se libera la carga. Se piensa que tanto las importinas como las exporrinas se difunden a través del canal NPC mediante interacciones sucesivas con las repeticiones FG de las nucleoporinas FG. La localización de la Ran-GAP y la Ran-GEF en el citoplasma y el núcleo, respectivamente, es la base del transporte unidireccional de proteínas carga a través del NPC.

Con respecto al mantenimiento de la similitud de funciones de las importinas y exportinas, los dos tipos de proteínas de transporte son altamente homólogas en secuencia y estructura. Toda la familia se denomina familia de importinas β, o **carioferinas**. Existen 14 carioferinas en las levaduras y más de 20 en las células de los mamíferos. Las NES o NLS a las cuales se unen sólo han sido determinadas para una fracción de ellas. Notablemente, algunas carioferinas individuales funcionan como importina y como exportina.

Se ha demostrado que un mecanismo de transbordo similar exporta otras cargas desde el núcleo. Por ejemplo, la *exportina-t* se encarga de exportar tRNA. La exportina t une los tRNA completamente procesados en un complejo con Rna·GTP que se difunde a través de los NPC y se disocia cuando interactúa con la Ran·GAP en los filamentos citoplasmáticos de los NPC, liberando el tRNA en el citosol. Un proceso dependiente de Ran también es necesario para la salida nuclear de subunidades ribosómicas a través de los NPC. Asimismo, ciertos mRNA específicos que se asocian con proteínas hnRNP (p. ej., las Rev del HIV tratadas posteriormente) pueden exportarse mediante un mecanismo dependiente de la Ran. Sin embargo, la mayoría de los mRNA salen del núcleo mediante otro tipo de transportador que no interactúa con la Ran. Esto se tratará después que veamos la regulación génica a través del control de entrada y salida de los factores de transcripción.

El control de algunos genes se logra regulando el transporte de los factores de transcripción

La regulación de algunos genes se logra regulando el transporte nuclear de factores de transcripción específicos que controlan su transcripción. Por ejemplo, en el capítulo 11 aprendimos que los receptores nucleares homodiméricos, como el receptor de glucocorticoides, son retenidos en el citoplasma en ausencia de ligando. La unión del ligando estimula su traslación al núcleo, donde pueden unirse a elementos de respuesta hormonal en genes diana y activar la transcripción (véanse figs. 11-43 y 11-44). El dominio de unión al ligando de estos factores de transcripción contiene una NLS, pero en ausencia de ligando, la NLS está enmascarada por interacciones con un complejo citoplasmático enlazante. El cambio conformacional

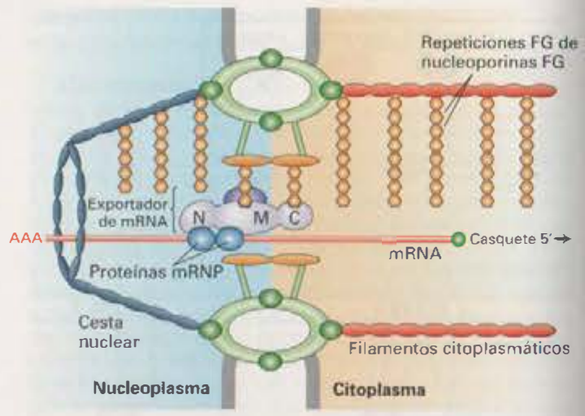
que resulta de la unión de la hormona libera el dominio del complejo enlazante, exponiendo la NLS de manera que esté libre para interactuar con su correspondiente importina y sufra la incorporación nuclear, como se vio antes. En los capítulos subsiguientes que describen la transducción de señales se analizan otros ejemplos de incorporación nuclear regulada de factores de transcripción a través del enmascaramiento y exposición controlados de sus NLS asociadas.

En algunos casos, se logra regular el transporte nuclear de factores de transcripción expresándolos en forma fusionada con dominios que los localizan en las membranas citoplasmáticas, como la membrana plasmática o el RE. En respuesta a señales específicas, se activan proteasas específicas que los cortan, liberando los dominios del factor de transcripción de manera tal que éstos puedan ser transportados al núcleo por una importina. En otros casos, la salida de factores de transcripción nucleares está regulada por modificaciones postraduccionales, como la fosforilación que incrementa su afinidad por una exportina específica. La regulación de la incorporación o la salida del núcleo es un mecanismo poderoso para controlar la actividad de los factores de transcripción, ya que un factor de transcripción puede unirse a sus sitios correspondientes en los genes que regula sólo cuando se encuentra en el núcleo.

La mayoría de las mRNP salen del núcleo con la ayuda de un exportador de mRNA

Estudios recientes con levaduras mutantes sensibles a la temperatura con defectos en el transporte nuclear identificaron una proteína heterodimérica exportadora de mRNA (o directamente exportador de mRNA) que parece dirigir la mayoría de las mRNP a través de los poros nucleares. Las células de levadura con mutaciones en las subunidades de esta proteína acumulan RNA poliadenilados en el núcleo a la temperatura no permisiva, lo que indica que la proteína es necesaria para el transporte de la mayoría de las mRNP. En todos los eucariontes se encuentran homólogos altamente conservados de las subunidades grandes y pequeñas del exportador de mRNA de levaduras, y varias líneas de evidencia indican que se necesita el exportador de mRNA para la salida de la mayoría de las mRNP en las células de los vertebrados, al igual que en las células de las levaduras. Sorprendentemente, como se mencionó antes, los experimentos tanto en las células de los vertebrados como en las de levaduras indican que la Ran no es necesaria para la salida de la gran mayoría de las mRNP.

La subunidad pequeña del exportador de mRNA es homóloga al NTF2 e interactúa con una región de la subunidad más grande que también comparte homología con el NTF2. Juntos forman un dominio que interactúa con las repeticiones FG de las nucleoporinas FG, similarmente al dímero NTF2. Un dominio C-terminal de la subunidad grande también interactúa con las repeticiones FG. Aunque otras diversas proteínas son asimismo necesarias para el transporte de mRNP, los investigadores consideran que este exportador de mRNP es la principal proteína de transporte debido a la importancia de la unión de la repetición FG para el mecanismo del transporte de carga por medio de las carioferinas. La subunidad exportadora de mRNA grande también contiene dominios de unión al RNA que parecen unirse al RNA cooperativamente con proteínas mRNP específicas. Este hallazgo de que el exportador de mRNA está asociado con las mRNP y se unen directamente a las repeticiones FG condujo al modelo de transporte de mRNP representado en la figura 12-24. Este modelo propone que el exportador de mRNA transloca las mRNP a través del canal del poro nuclear de manera similar a las carioferinas, es decir, uniéndose de manera transitoria a repeticiones FG individuales sucesivas a medida que se difunde a través del canal.



▲ Fig. 12-24. Mecanismo propuesto para el trasporte de mRNP desde el núcleo por medio del exportador de mRNA. La subunidad grande (violeta claro) del exportador de mRNA contiene tres dominios clave: un dominio medio (M) y un dominio carboxilo (C) los cuales se unen a repeticiones hidrófobas de fenilalanina-glicina (FG) en las nucleoporinas FG, y una región N-terminal que tiene una leve actividad de unión al RNA para la mayoría de las secuencias. La unión a la mayoría de las mRNP requiere la unión cooperativa con otras proteínas hnRNP específicas. La subunidad pequeña (violeta oscuro) se une al dominio del medio de la subunidad grande y contribuye a la unión de las repeticiones FG. Para simplicidad, las repeticiones FG no se muestran en la mitad inferior del complejo del poro nuclear. Nótese que el exportador de mRNA no está dibujado a escala: es mucho más pequeño que el complejo del poro nuclear. Se propuso que el exportador de mRNA se difunde a través del poro realizando interacciones transitorias con nucleoporinas adyacentes a medida que éste progresa. (Adaptado de R. Reed y E. Hurt, 2002, *Cell* 108:523.)

Aún no está claro qué proporciona la direccionalidad a este mecanismo de transporte de mRNP a través de los poros nucleares. Por analogía con el transporte de carioferinas, una hipótesis es que el complejo mRNP-exportador de mRNA se disocia a medida que alcanza el citoplasma. Esto producirá una alta concentración del complejo mRNP-exportador de mRNA en la cesta nuclear, donde se asocia con nucleoporinas FG, y una baja concentración del complejo en el citoplasma, donde se disocia. Al igual que para el transporte de carioferinas, este gradiente de concentración podría conducir la translocación vectorial de la mRNP. Sin embargo, aún resta mucho por aprender acerca de las proteínas hnRNP asociadas con las mRNP durante el transporte a través del poro y el mecanismo por el cual se disocian de la mRNP en el lado citoplasmático del poro.

Otras proteínas que asisten en la salida de mRNP. Además del exportador de mRNA y las nucleoporinas FG, otros varios tipos de proteínas están involucradas en el transporte de mRNP mediante este mecanismo. Como ya se mencionó, se piensa que el exportador de mRNA se une a los mRNA de manera cooperativa con proteínas de mRNP específicas. Por ejemplo, las proteínas SR asociadas con exones parecen estimular la unión del exportador de mRNA a mRNA procesados en las mRNP. Por lo tanto, las proteínas SR no sólo participan en la definición de exones durante el proceso de corte y empalme del RNA (véase fig. 12-11) sino que también participan en el proceso de salida que traslada la mayoría de las mRNP al citoplasma.

Se han identificado hace poco otras proteínas nucleares de unión a RNA que probablemente participan en el transporte de mRNP. Estas proteínas, que inicialmente se encontraron asociadas con los mRNA procesados in vitro, se unen a una región de alrededor de 20 bases en dirección 5' de las secuencias del exón unidas por corte y empalme. Los análisis de las proteínas presentes en estos *complejos de unión de exones* revelaron que varias son homólogas a las proteínas de las levaduras que están alteradas en los mutantes con defectos en la salida de mRNP. Estos resultados sugieren que los complejos de unión de exones depositados sobre los mRNA durante el corte y empalme del RNA estimulan el transporte de las mRNP a través de los poros nucleares. Algunas de las proteínas de los complejos de unión de exones también funcionan como factores de corte y empalme. Como veremos en la próxima sección acerca de los mecanismos de control postranscripcional citoplasmático, el complejo de unión de exones también participa en un tipo de control postranscripcional que evita la traducción de mRNA procesados inadecuadamente.

Otro participante en el transporte de mRNP al citoplasma es el complejo nuclear de unión al casquete, mencionado antes como protección del extremo 5' de los transcriptos nacientes y de los pre-mRNA contra el ataque de exonucleasas. Los experimentos con microscopia electrónica tratados más adelante demostraron que el extremo 5' de los mRNA conduce el camino a través del complejo del poro nuclear. Experimentos recientes con levaduras indican que la cola poli(A) 3' cumple un papel importante en el transporte de mRNP, sugiriendo la participación de una proteína de unión a poli(A). Además de las nucleoporinas FG se necesitan nucleoporinas asociadas con los filamentos citoplasmáticos del NPC para la salida del mRNA y podrían participar en la disociación del exportador del mRNA y otras proteínas mRNP que acompañan a la mRNP a través del poro.

Una vez que la mRNP alcanza el citoplasma, la mayoría de las proteínas de la mRNP que se asociaron con el mRNA en el núcleo, el complejo nuclear de unión al casquete y la proteína nuclear de unión a poli(A) (PABPII) se disocian y se transbordan de regreso al núcleo. En el citoplasma, el factor de iniciación de la traducción eIF4E se une al casquete 5' de un mRNA exportado, a la cola poli(A) se unen múltiples copias de la proteína citoplasmática de unión a poli(A) (PABPI) y otras proteínas de unión al RNA se asocian con el cuerpo del mRNA formando una mRNP citoplasmática que tiene una menor proporción de proteínas con respecto al RNA que las mRNP nucleares.

Salida nuclear de las mRNP del anillo de Balbiani. Las glándulas salivales de la larva del insecto *Chironomous tentans* proporcionaron un buen sistema modelo para el estudio de la formación de las hnRNP y la salida de mRNP. En esta larva, los genes en los grandes engrosamientos (*puffs*) cromosómicos denominados *anillos de Balbiani* se transcriben de manera abundante a pre-mRNA nacientes que se asocian con proteínas hnRNP y son procesados para formar mRNP enrolladas, con un mRNA de ≈75 kb (fig. 12-25a, b). Estos mRNA gigantes codifican grandes proteínas cohesivas que adhieren la larva en desarrollo a una hoja. Luego del procesamiento del pre-mRNA en las hnRNP del anillo de Balbiani, las mRNP resultantes se mueven hacia el citoplasma a través de los poros nucleares. Microfotografías electrónicas de secciones de estas células muestran las mRNP que parecen desenrollarse durante su pasaje a través de poros nucleares y luego se unen a ribosomas a medida que ingresan en el citoplasma. La observación de que las mRNP se asocian con ribosomas durante el transporte indica que el extremo 5' conduce el camino a través del complejo del poro nuclear, como se mencionó antes. Estudios detallados de microscopia electrónica del transporte de mRNP del anillo del Balbiani a través de complejos de poros nucleares condujeron al modelo representado en la figura 12-25c.

Los pre-mRNA en los empalmosomas no salen del núcleo

Es crítico que sólo salgan del núcleo mRNA maduros completamente procesados porque la traducción de pre-mRNA procesados incompletamente y que contienen intrones produciría proteínas defectuosas que podrían interferir en el funcionamiento de la célula. Por medio de mecanismos que no se comprenden en su totalidad, se evita que los pre-mRNA asociados con snRNP en los empalmosomas sean transportados al citoplasma.

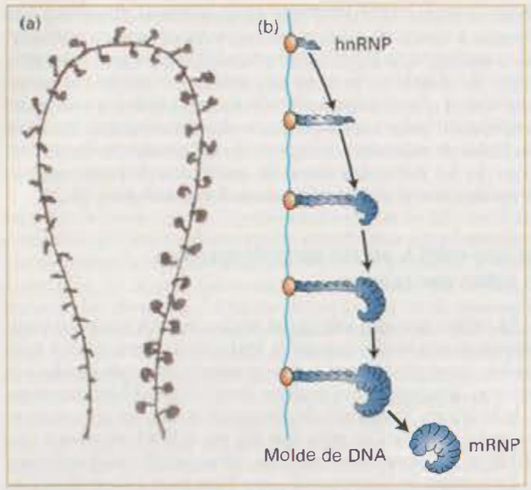
En un tipo de experimento que demuestra esta restricción, un gen que codifica un pre-mRNA con un único intrón que normalmente es eliminado por corte y empalme, es mutado para introducir desviaciones de las secuencias consenso de los sitios de corte y empalme. La mutación de alguna de las bases invariantes de los sitios de corte y empalme 5' o 3' en los extremos del intrón dio como resultado pre-mRNA que fueron unidos por snRNP para formar empalmosomas; sin embargo, el corte y empalme del RNA se bloqueó, y el pre-mRNA fue retenido en el núcleo. Por el contrario, la mutación de *ambos* sitios de corte y empalme 5' y 3' en el mismo pre-mRNA dio como resultado la salida del pre-mRNA no procesado, aunque de manera menos eficiente que para el mRNA procesado. Cuando se mutaron ambos sitios de corte y empalme, los pre-mRNA no fueron unidos eficientemente por snRNP, y en consecuencia, no se bloqueó su salida.

MEDICINA

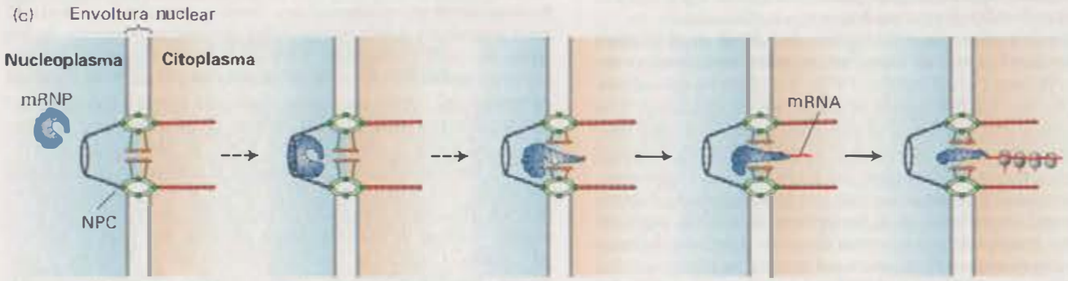
Muchos casos de talasemia, una enfermedad hereditaria que trae aparejados niveles anormalmente bajos de proteínas globinas, se deben a mutaciones en los sitios de corte y empalme del gen de la globina que disminuyen la eficiencia del proceso de corte y empalme, pero no evitan la asociación del pre-mRNA con snRNP. Los pre-mRNA de la globina no procesados resultantes quedan retenidos en el núcleo del reticulocito y se degradan con rapidez. ▮

La proteína Rev HIV regula el transporte de los mRNA virales no procesados

Como ya se comentó, el transporte de las mRNP que contienen mRNA funcionales maduros del núcleo al citoplasma comprende un mecanismo complejo que es crucial para la expresión génica (véanse figs. 12-24 y 12-25). En teoría la regulación de este transporte podría proporcionar otros medios para el control génico, aunque parece ser relativamente raro. En realidad, los únicos ejemplos de salida regulada de mRNA descubiertos hasta la fecha tienen lugar durante la respuesta celular a condiciones que provocan la desnaturalización proteica (p. ej., choque térmico) y durante la infección viral cuando las alteraciones inducidas por el virus en el transporte nuclear incrementan la replicación viral al máximo. Aquí describimos la regulación de la salida de las mRNP mediada por una proteína codificada por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV).



◀ Fig. 12-25. Formación de partículas ribonucleoproteicas (hnRNP) y salida de las mRNP desde el núcleo. (a) Modelo de un bucle de transcripción de la cromatina y ensamblaje de la mRNP del anillo de Balbiani (BR) en *Chironomous tentans*. Los transcriptos de RNA nacientes producidos a partir del molde de DNA se asocian rápidamente con proteínas y forman hnRNP. El incremento gradual en el tamaño de las hnRNP refleja la longitud cada vez mayor de los transcriptos de RNA a distancias mayores del sitio de inicio de la transcripción. El modelo se reconstruyó a partir de microfotografías electrónicas de cortes finos seriados de células de glándula salival. (b) Esquema de la biogénesis de las hnRNP. Tras el procesamiento del pre-mRNA, la partícula de ribonucleoproteína resultante es denominada mRNP. (c) Modelo del transporte de las mRNP de BR a través del complejo del poro nuclear (NPC) basado en estudios de microscopia electrónica. Nótese que las mRNP curvadas parecen desenrollarse a medida que pasan a través de los poros nucleares. A medida que el mRNA ingresa en el citoplasma, se asocia rápidamente con ribosomas, lo que indica que el extremo 5′ pasa primero a través del NPC. [Parte (a) desde C. Erricson et al., 1989, *Cell* 56:631; cortesía de B. Daneholt. Partes (b) y (c) adaptadas de B. Daneholt, 1997, *Cell* 88:585. Véase también B. Daneholt, 2001, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 98:7012.]



Como retrovirus que es, el HIV integra una copia de DNA de su genoma de RNA en el DNA de la célula huésped (véase fig. 4-43). El DNA integrado viral, o provirus, contiene una única unidad transcripcional. El único transcripto primario producido a partir del provirus de HIV por la RNA polimerasa II celular puede ser cortado y empalmado de formas alternativas para generar tres clases de mRNA: un mRNA no procesado de 9 kb; un mRNA de 4 kb formado por eliminación de un intrón; y un mRNA de ≈2 kb formado por eliminación de dos o más intrones (fig. 12-26). Después de su síntesis en el núcleo de la célula huésped, las tres clases de mRNA del HIV son transportadas al citoplasma y traducidas a proteínas virales; algo del RNA no procesado de 9 kb se utiliza como genoma viral en la progenie de viriones que brotan de la superficie celular.

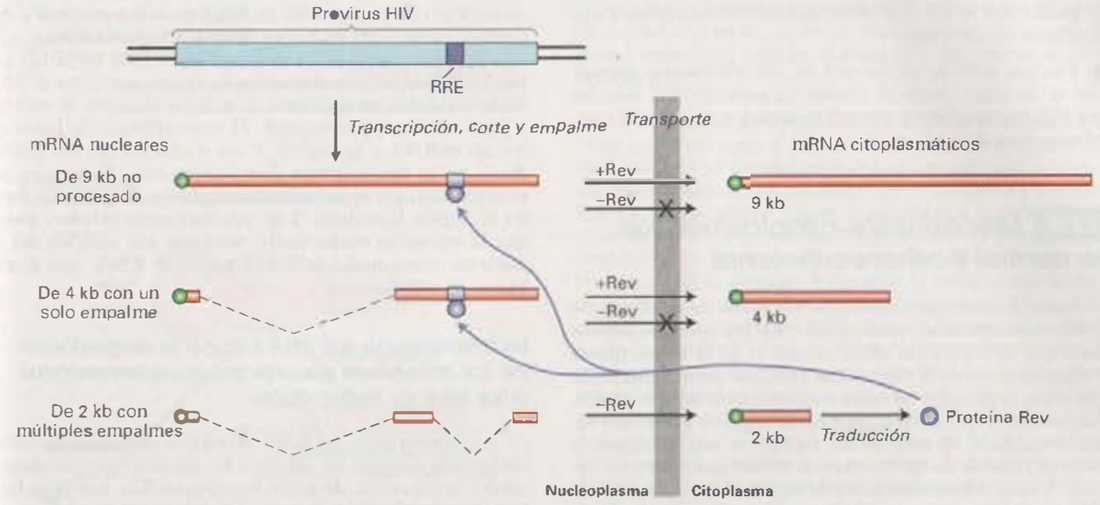
Puesto que los mRNA del HIV de 9 kb y 4 kb contienen sitios de corte y empalme, se los puede considerar mRNA procesados en forma incompleta. Sin embargo, como ya se comentó, la asociación de tales mRNA procesados en forma incompleta con snRNP en los empalmosomas normalmente bloquea su salida desde el núcleo. Por lo tanto el HIV, al igual que otros retrovirus, debe tener algún mecanismo para superar ese bloqueo, permitiendo la salida de los mRNA virales más largos. Algunos retrovirus desarrollaron una secuencia denominada *elemento de transporte constitutivo (CTE)* que se une al exportador de mRNA con alta afinidad y permite, por lo tanto, la salida de RNA retroviral no procesados al citoplasma. El HIV solucionó el problema de manera diferente.

Los estudios con mutantes de HIV mostraron que el transporte de los mRNA virales de 9 kb no procesado y de 4 kb con un solo empalme desde el núcleo al citoplasma requiere la *proteína Rev* codificada por el virus. Experimentos bioquímicos posteriores demostraron que la Rev se une a un elemento de respuesta a Rev (RRE) específico, presente en el RNA del HIV. En las células infectadas con mutantes de HIV que carecen de RRE, los mRNA no procesados y los procesados una sola vez permanecen en el núcleo, lo que demuestra que el RRE es necesario para la estimulación del transporte mediada por Rev. La Rev contiene una NES rica en leucina que interactúa con la exportina 1 en complejo con la Ran-GTP. Como resultado, la Rev exporta los mRNA del HIV no procesados y con un solo empalme a través de interacciones con la exportina 1 y el complejo del poro nuclear.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 12.3

Transporte de macromoléculas a través de la envoltura nuclear

- La envoltura nuclear contiene numerosos complejos de poros nucleares (NPC), estructuras grandes y complicadas compuestas por múltiples copias de ≈50-100 proteínas denominadas *nucleoporinas* (véase fig. 12-18). Las nucleoporinas FG, que contienen múltiples repeticiones de una secuencia hidrófoba corta (repeticiones FG), revisten el canal transportador central y cumplen un papel en el transporte de todas las macromoléculas a través de los poros nucleares.
- El transporte de macromoléculas superiores a ≈60 kDa a través de los poros nucleares requiere la asistencia de proteínas que interactúan tanto con la molécula transportada como con las repeticiones FG de las nucleoporinas FG.
- Las proteínas incorporadas al núcleo o introducidas en él contienen una secuencia de aminoácidos específica que funciona como una señal de localización nuclear (NLS) o una señal de salida nuclear (NES). Las proteínas restringidas al núcleo contienen una NLS, pero no una NES, mientras que las proteínas que van y vuelven entre el núcleo y el citoplasma contienen ambas señales.
- Se identificaron diversos tipos diferentes de NES y NLS. Se piensa que cada tipo de señal de transporte nuclear interactúa con una proteína receptora específica (exportina o importina) perteneciente a una familia de proteínas homólogas denominadas *carioferinas*.
- Una proteína "carga" que transporta una NES o una NLS se transloca a través de los poros nucleares unida a su correspondiente proteína receptora (carioferina), que también interactúa con las nucleoporinas FG. Se piensa que las importinas y exportinas se difunden a través del canal al unirse transitoriamente a diferentes repeticiones FG que actúan como "escalones" a través del poro. Ambos procesos de transporte también requieren la participación de Ran, una proteína G monomérica que existe en diferentes conformaciones cuando está unida a GTP o GDP.
- Después que un complejo de carga alcanza su destino (el citoplasma durante la salida y el núcleo durante la incorporación), se disocia, y libera la proteína carga y otros componentes. Estos últimos luego son transportados a través de los poros nucleares en la dirección inversa para participar en el transporte de moléculas adicionales de proteínas carga (véanse figs. 12-21 y 12-23).
- La naturaleza unidireccional de la entrada y salida de proteínas a través de los poros nucleares es resultado de la localización del factor de intercambio de nucleótido de guanina (GEF) Ran en el núcleo y de la proteína aceleradora de la GTPasa (GAP) Ran en el citoplasma. La interacción de los complejos de incorporación de carga con la Ran-GEF en el nucleoplasma provoca la disociación del complejo y la liberación de la carga al nucleoplasma (véase fig. 12-21). Los complejos de salida de carga se disocian en el citoplasma cuando interactúan con la Ran-GAP localizada en los filamentos citoplásmicos del NPC (véase fig. 12-23).
- La mayoría de las mRNP son transportadas desde el núcleo por un exportador de mRNA heterodimérico que interactúa con las repeticiones FG (véase fig. 12-24). La dirección de transporte (núcleo→citoplasma) puede ser producto de las disociaciones del complejo exportador de mRNP en el citoplasma por medio de un mecanismo aún no caracterizado que no depende de Ran.
- El exportador de mRNA se une a la mayoría de los mRNA de manera cooperativa con proteínas SR unidas a los exones, a los complejos de unión de los exones que se asocian con los mRNA que siguen el proceso de corte y



▲ Fig. 12-26. Función de la proteína Rev en el transporte de los mRNA del HIV desde el núcleo al citoplasma. El genoma del HIV, que contienen varias regiones codificantes, se transcribe a un solo transcripto primario de 9 kb. Varios mRNA de ≈4 kb surgen del corte y empalme alternativo de cualquiera de los diversos intrones (líneas discontinuas) y varios mRNA de ≈2kb son el resultado de la eliminación mediante corte y empalme alternativo de dos o más intrones. Después del transporte al citoplasma, las diversas especies de RNA se traducen a diferentes proteínas virales. La proteína Rev, codificada por un mRNA de 2 kb, interactúa con el elemento de respuesta a Rev (RRE) en los mRNA no procesados y con los de un solo empalme, estimulando su transporte al citoplasma. (Adaptado de B. R. Cullen y M. H. Malim, 1991, *Trends Biochem. Sci* 16:346.)

empalme del RNA, y a proteínas mRNP adicionales que aún falta caracterizar.

■ Los pre-mRNA unidos por un empalmosoma normalmente no salen desde el núcleo, asegurando que sólo los mRNA funcionales totalmente procesados alcancen el citoplasma para su traducción.

12.4 Mecanismos citoplasmáticos de control postranscripcional

Antes de continuar, revisemos los pasos de la expresión génica en los cuales se ejerce control. En los capítulos previos vimos que la regulación de la iniciación de la transcripción de algunos genes es el mecanismo principal para controlar la regulación génica. En las secciones anteriores de este capítulo aprendimos que la transcripción de algunos genes está regulada mediante el control del transporte hacia adentro y afuera del núcleo de los factores de transcripción que los regulan. También aprendimos que la expresión de las isoformas de las proteínas está controlada por el proceso regulado de corte y empalme alternativo del RNA. Aunque el transporte de los mRNA completamente procesados al citoplasma rara vez está regulado, el transporte de los RNA retrovirales no procesados se controla específicamente.

En esta sección consideraremos otros mecanismos de control postranscripcional que contribuyen a regular la expresión de algunos genes. La mayoría de estos mecanismos funcionan en el citoplasma, controlando la estabilidad o localización del mRNA o su traducción a proteínas. Comenzamos tratando dos mecanismos de control génico recientemente descubiertos y relacionados.

Los micro RNA reprimen la traducción de mRNA específicos

Los micro RNA (miRNA) fueron descubiertos durante el análisis de mutaciones en los genes *lin-4* y *let-7* del nematodo *C. elegans*. La clonación y el análisis de *lin-4* y *let-7* de tipo silvestre revelaron que no codificaban ningún producto proteico, sino sólo RNA de 21 y 22 nucleótidos de largo, respectivamente, que se hibridan a las regiones 3' no traducidas de mRNA diana específicos. Por ejemplo, el miRNA del *lin-4*, que se expresa temprano en la embriogénesis, se hibrida a las regiones no traducidas 3' de los mRNA de *lin-14* y de *lin-28*, reprimiendo por lo tanto la traducción de estos mRNA mediante un mecanismo desconocido hasta el momento. La expresión del miRNA del *lin-4* cesa más tarde en el desarrollo y permite la traducción de los mRNA de *lin*-28 y de *lin*-14 recién sintetizados. La expresión del miRNA de *let-7* sucede en momentos comparables durante la embriogénesis de todos los animales con simetría bilateral. El papel de los mRNA de *lin-4* y *let-7* en la coordinación de tiempo de los eventos del desarrollo temprano en *C. elegans* se analiza en el capítulo 22. Aquí nos centramos en cómo los miRNA reprimen la traducción.

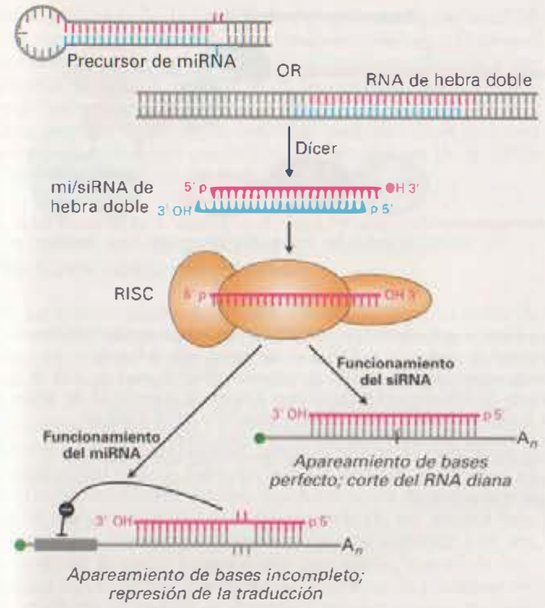
Esta forma de regulación traduccional probablemente no esté limitada a los mRNA de *lin-4* y *let-7* en *C. elegans*; se hallaron alrededor de 100 miRNA diferentes en *C. elegans*, y al menos la misma cantidad en los seres humanos. Todos los miRNA parecen haberse formado mediante procesamiento de precursores de RNA de ≈70 nucleótidos que forman estructuras en horquilla con un apareamiento erróneo de unos pocos pares de bases en el tallo de la horquilla. Una ribonucleasa denominada *Dicer*, que corta el RNA de hebra doble, es necesaria para la producción de miRNA a partir de estos precursores. El apareamiento de bases entre un miRNA y la región 3' no traducida de sus mRNA diana no es precisamente complementario, de manera que ocurren algunos apareamientos erróneos de pares de bases en la región hibridada. Este apareamiento erróneo distingue la represión traduccional mediada por miRNA del fenómeno relacionado de interferencia de RNA, que describimos a continuación.

La interferencia del RNA induce la degradación de los mRNA con secuencias complementarias a los RNA de hebra doble

La interferencia del RNA (RNAi) se descubrió en forma inesperada durante los intentos de manipular experimentalmente la expresión de genes específicos. Los investigadores trataron de inhibir la expresión de un gen en *C. elegans* mediante la microinyección de un RNA complementario de hebra simple que se hibridaría al mRNA codificado y evitaría su traducción, un método denominado *inhibición antisentido*. Pero en los experimentos de control, el RNA de hebra doble, con un apareamiento de bases perfecto y de unos cientos de pares de bases de largo, fue mucho más efectivo en la inhibición de la expresión de los genes que la hebra antisentido sola. En las plantas pronto se observó una inhibición similar de la expresión génica por un RNA de hebra doble. En cada caso, la introducción del RNA de hebra doble indujo la degradación de todos los RNA celulares que contenían una secuencia que era exactamente la misma que la de una hebra del RNA de hebra doble. Debido a la especificidad de la interferencia del RNA para seleccionar los RNA para la destrucción, se ha convertido en una herramienta experimental poderosa para el estudio de la función génica (véase fig 9-43).

Estudios bioquímicos posteriores con extractos de embriones de *Drosophila* mostraron que un RNA de hebra doble largo que media la interferencia es procesado inicialmente para formar un intermediario de hebra doble denominado *RNA de interferencia corto o RNA interferente corto (siRNA)*. Las hebras del siRNA contienen 21-23 nucleótidos hibridados entre sí de manera que las dos bases del extremo 3' de cada hebra son monocatenarias. El hallazgo de que la ribonucleasa Dícer es necesaria para la formación de los siRNA sugirió que la interferencia del RNA y la represión traduccional mediada por miRNA son procesos relacionados.

Estudios recientes indican que los siRNA de hebra doble y los miRNA son luego procesados para formar un complejo multiproteico que sólo contiene una de las dos hebras de RNA (fig. 12-27). A continuación, este complejo silenciador inducido por RNA (**RISC**) corta los RNA diana, que son *precisamente* complementarios con sus correspondientes siRNA de hebra simple. Estos complejos también parecen funcionar en la inhibición de la traducción por miRNA. El miRNA del *let-7* humano, por ejemplo, se encuentra en un complejo silenciador inducido por RNA que puede cortar un RNA diana sintético que es complementario al miRNA del *let-7*. Sin embargo, el mismo complejo no corta un RNA cuya secuencia difiere en unas pocas bases con respecto a la secuencia



▲ Fig. 12-27. Modelo de la represión traduccional por la interferencia de RNA mediada por el complejo de interferencia inducido por RNA (RISC). El procesamiento de los precursores de miRNA para formar miRNA y de los RNA de hebra doble largos para formar RNA de interferencia cortos (siRNA) necesita la ribonucleasa Dícer. En ambos casos, el corte por la Dícer produce un intermediario de RNA de doble hebra que contiene 21-23 nucleótidos por hebra 3' con colas de hebra simple de dos nucleótidos. Una hebra de este intermediario se ensambla con múltiples proteínas para formar un complejo silenciador inducido por RNA (RISC). En el funcionamiento del siRNA, el mRNA diana se hibrida perfectamente con el RNA RISC, lo que conduce al corte del mRNA diana. En el funcionamiento del miRNA, el RNA RISC forma un híbrido con el mRNA diana que contiene algunos apareamientos de pares de bases erróneos; en este caso la traducción del mRNA diana se bloquea. Esta es la situación de los miRNA *lin-4* y *let-7* en *C. elegans*. (Adaptado de G. Hutvagner y P. D. Zamore, 2002, *Science* 297:2056; véase también V. Ambrose, 2001, *Cell* 107:823.)

let-7. Este hallazgo condujo a la hipótesis de que los complejos RISC tienen dos funciones distintas: 1) una función de siRNA (es decir, interferencia de RNA) que conduce al corte de los mRNA exactamente complementarios y 2) una función de miRNA que conduce a la represión traduccional de los mRNA con unos pocos apareamientos de bases erróneos (véase fig. 12-27).

MEDICINA

Las mutaciones en el gen del cromosoma X frágil (*FMR1*), que codifica una proteína que contiene un motivo KH de unión al RNA, están asociadas con la forma más común de retraso mental hereditario. Resultados recientes indican que la proteína FMR1 es una subunidad de complejos RISC humanos. En consecuencia, el retraso mental asociado con las mutaciones FMR1 puede ser resultado de un defecto en la represión traduccional de los mRNA dianas específicos durante el desarrollo del sistema nervioso central. ■

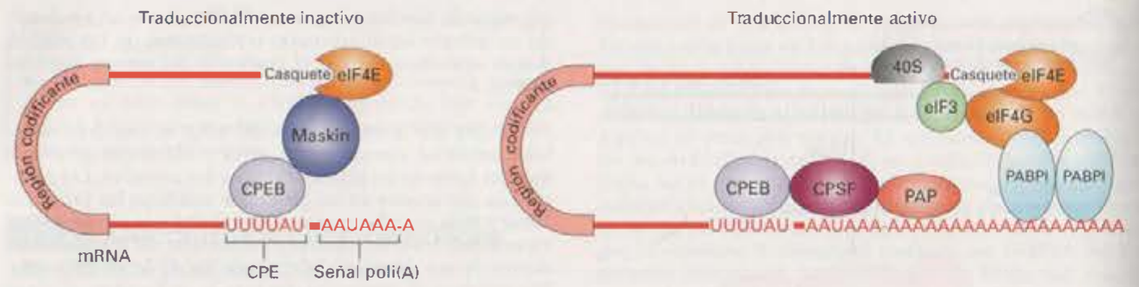
Se cree que la interferencia del RNA es una defensa celular ancestral contra ciertos virus y elementos genéticos móviles tanto en las plantas como en los animales. Las plantas con mutaciones en los genes que codifican las proteínas Dícer y RISC exhiben mayor sensibilidad a la infección por virus RNA y un movimiento aumentado de transposones dentro de sus genomas. Se cree que los RNA de hebra doble intermedios generados durante la replicación de virus de RNA son reconocidos por la ribonucleasa Dícer, induciendo una respuesta de RNAi que en última instancia degrada los mRNA virales. Durante la transposición, los transposones se insertan en los genes celulares en una orientación aleatoria, y su transcripción a partir de diferentes promotores produce RNA complementarios que pueden hibridarse entre sí, iniciando el sistema de RNAi que luego interfiere en la expresión de proteínas de los transposones necesarias para transposiciones adicionales.

En las plantas y en *C. elegans* la respuesta de la RNAi puede inducirse en todas las células del organismo mediante la introducción de RNA de hebra doble en sólo algunas células. Tal inducción que abarca todo el organismo requiere una proteína producida en las plantas y en *C. elegans* que es homóloga a las RNA replicasas de virus de RNA. Esta observación sugiere que los siRNA de hebra doble se replican y luego son transferidos a otras células en estos organismos. En las plantas, la transferencia de los siRNA podría producirse a través de los plasmodesmos, las conexiones citoplasmáticas entre las células vegetales que atraviesan las paredes celulares entre ellas (véase fig. 6-34). La inducción en todo el organismo de la interferencia de RNA no sucede en *Drosophila* o en los mamíferos, presumiblemente porque sus genomas no codifican RNA replicasas homólogas. En las plantas, el RNA de hebra doble también induce la metilación del DNA de los genes con la misma secuencia mediante un mecanismo desconocido. Esta metilación génica en respuesta a la RNAi inhibe la transcripción del gen, probablemente a través de la unión de histonas desacetilasas. Este tipo de metilación génica inducida por RNAi no se produce en los animales.

La poliadenilación citoplasmática promueve la traducción de algunos mRNA

Además de la represión de la traducción mediante los micro RNA, el control de la traducción *mediado por proteínas* ayuda a regular la expresión de algunos genes. Las secuencias o elementos reguladores de los mRNA que interactúan con proteínas específicas para controlar la traducción suelen estar presentes en la región no traducida (UTR) del extremo 3' o 5' de un mRNA. Aquí veremos un tipo de control traduccional mediado por proteínas que involucra los elementos reguladores 3'. Luego comentaremos un mecanismo diferente que involucra las proteínas de unión al RNA que interactúan con los elementos reguladores 5'.

Las proteínas de control traduccional específicas de secuencia pueden unirse en forma cooperativa a sitios vecinos en los UTR 3' y operar de manera combinatoria, similarmente a la unión cooperativa de los factores de transcripción a los sitios reguladores en una región amplificadora de un gen.



▲ Fig. 12-28. Modelo del control de la poliadenilación citoplasmática e iniciación de la traducción. *Izquierda:* en los ovocitos inmaduros, los mRNA que contienen el elemento de poliadenilación citoplasmático rico en U (CPE) tienen colas de poli(A) cortas. La proteína de unión a CPE (CPEB) media la represión de la traducción a través de las interacciones representadas, las cuales evitan el ensamblaje de un complejo de iniciación en el extremo 5' del mRNA. *Derecha:* la estimulación hormonal de los ovocitos activa una proteincinasa que fosforila la CPEB, haciendo que libere la maskin. El factor de especificidad de corte y poliadenilación (CPSF) se une luego al sitio poli(A) e interactúa tanto con la CPEB unida como con la forma citoplasmática de la poli(A) polimerasa (PAP). Luego de que se alarga la cola de poli(A), múltiples copias de la proteína de unión a poli(A) I citoplasmática (PABPI) pueden unirse a ella e interactuar con eIF4G, que participa con otros factores de iniciación para unir la subunidad ribosómica 40S e iniciar la traducción. (Adaptado de R. Mendez y J. D. Richter, 2001, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2:521.)

En la mayoría de los casos estudiados, la traducción está reprimida por unión de proteínas a elementos reguladores 3'. El mecanismo de esa represión se entiende mejor para los mRNA que deben sufrir *poliadenilación citoplasmática* antes de que puedan ser traducidos.

La poliadenilación citoplásmica es un aspecto crítico de la expresión génica en el embrión temprano. Las células huevo (ovocitos) de los organismos multicelulares contienen muchos mRNA, que codifican numerosas proteínas distintas, que no se traducen hasta después de que el huevo sea fertilizado por una célula espermática. Algunos de estos mRNA "almacenados" tienen una cola poli(A) corta, que consiste en sólo ≈20-40 residuos A, al cual sólo pueden unirse algunas moléculas de la proteína citoplasmática de unión a la poli(A) (PABPI). Como se trató en el capítulo 4, múltiples moléculas PABPI unidas a la cola poli(A) de un mRNA interactúan con el factor de inciación eIF4G, estabilizando la interacción del casquete 5' mRNA con el eIF4E, que es necesario para la iniciación de la traducción (véase fig. 4-31). Debido a que esta estabilización no puede suceder con los mRNA que tienen colas de poli(A) cortas, tales mRNA almacenados en los ovocitos no son traducidos de manera eficiente. En el momento apropiado durante la maduración de los ovocitos o después de la fertilización de una célula huevo, casi siempre en respuesta a una señal externa, se añaden unos 150 residuos A a las colas de poli(A) cortas sobre estos mRNA en el citoplasma y estimulan su traducción.

Estudios recientes con los mRNA almacenados en los ovocitos de *Xenopus* ayudaron a dilucidar el mecanismo de este tipo de control traduccional. Los experimentos en los cuales unos mRNA de cola corta se inyectaron en los ovocitos han mostrado que se necesitan dos secuencias de la UTR 3' para su poliadenilación en el citoplasma: la señal de poli(A) AAUAAA que también es necesaria para la poliadenilación nuclear del pre-mRNA, y una o más copias de un *elemento de poliadenilación citoplasmática (CPE)* rico en U en dirección 5'. Este elemento regulador es unido por una *proteína de unión al CPE (CPEB)* que contiene un dominio RRM y un dominio en dedo de cinc.

De acuerdo con el modelo actual, en ausencia de una señal estimuladora la CPEB unida al CPE rico en U interactúa con la proteína maskin, que a su vez se une al eIF4E asociado con el casquete 5' del mRNA (fig. 12-28, *izquierda*). Como resultado, eIF4E no puede interactuar con otros factores de iniciación y con la subunidad ribosómica 40S, de manera que se bloquea la iniciación de la traducción. La fosforilación de la CPEB, inducida por señal en una serina específica, provoca el desplazamiento de maskin, permitiendo que las formas citoplasmáticas del factor de especificidad de poliadenilación y corte (CPSF) y la poli(A) polimerasa se unan al mRNA. Una vez que la poli(A) polimerasa cataliza la adición de residuos A, la PABPI puede unirse a la cola poli(A) alargada, conduciendo a la estabilización de la interacción de todos los participantes necesarios para iniciar la traducción (véase fig. 12-28, *derecha*; véase también fig. 4-25). En el caso de la maduración del ovocito de *Xenopus*, la proteincinasa que fosforila la CPEB se activa en respuesta a la hormona progesterona. Por lo tanto, el tiempo que demora la traducción de los mRNA almacenados que codifican proteínas necesarias para la maduración de los ovocitos está regulado por esta señal externa.

Evidencia considerable indica que un mecanismo similar de control traduccional cumple un papel en el aprendizaje y la memoria. En el sistema nervioso central, los axones de aproximadamente mil neuronas pueden realizar conexiones (sinapsis) con las dendritas de una única neurona postsináptica (véase fig. 7-48). Cuando uno de estos axones es estimulado, la neurona postsináptica "recuerda" cuál sinapsis fue estimulada. La próxima vez que la sinapsis es estimulada, la fuerza de la respuesta desencadenada en la célula postsináptica difiere de la primera vez. Este cambio en la respuesta ha mostrado ser en gran medida resultado de la activación traduccional de los mRNA almacenados en la región de la sinapsis, conduciendo a la síntesis local de nuevas proteínas que incrementan el tamaño y alteran las características neurofisiológicas de la sinapsis. El descubrimiento de que la CPEB está presente en las dendritas neuronales condujo a la proposición de que la poliadenilación citoplasmática estimula la traducción de mRNA específicos en las dendritas, en gran parte de manera similar a como lo hace en los ovocitos. En este caso, presumiblemente, la actividad sináptica (más que una hormona) es la señal que induce la fosforilación de la CPEB y la posterior activación de la traducción.

Los mRNA son degradados en el citoplasma mediante varios mecanismos

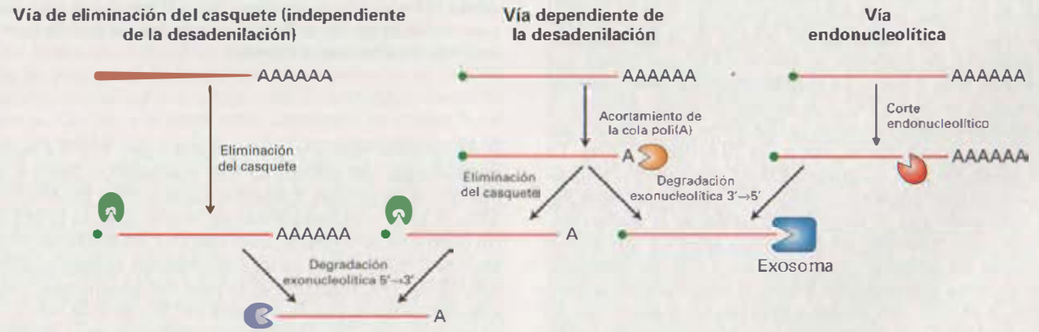
La concentración de un mRNA es una función tanto de su velocidad de síntesis como de su velocidad de degradación. Por este motivo, si dos genes se transcriben a la misma velocidad, la concentración del estado de equilibrio dinámico del mRNA correspondiente que es más estable será superior a la concentración del otro. La estabilidad de un mRNA también determina cuán rápidamente puede apagarse la síntesis de la proteína codificada. Para un mRNA estable, la síntesis de la proteína codificada persiste mucho después de que se reprime la transcripción del gen. La mayoría de los mRNA bacterianos son inestables y decaen exponencialmente con una vida media de pocos minutos. Por esta razón, una célula bacteriana puede ajustar rápidamente la síntesis de proteínas para adaptarse a cambios en el medio ambiente celular. Por otra parte, la mayoría de las células en los organismos multicelulares existen en un medio ambiente bastante constante y desempeñan un conjunto específico de funciones durante períodos de días a meses o incluso el tiempo de vida del organismo (las células nerviosas, por ejemplo). Por lo tanto, la mayoría de los mRNA de los eucariontes superiores tienen vidas medias de muchas horas.

Sin embargo, algunas proteínas en las células eucariontes se necesitan sólo durante períodos breves y deben expresarse en "estallidos". Por ejemplo, ciertas moléculas señalizadoras denominadas **citocinas**, que participan en la respuesta inmune de los mamíferos, se sintetizan y se secretan en estallidos cortos. De manera similar, muchos de los factores de transcripción que regulan el inicio de la fase S del ciclo celular, como el c-Fos y el c-Jun, sólo se sintetizan durante períodos cortos (cap. 21). La expresión de esas proteínas se produce en estallidos breves debido a que la transcripción de sus genes puede activarse y desactivarse con rapidez y sus mRNA tienen períodos de vida media inusualmente cortos de 30 minutos o menos.

Los mRNA citoplasmáticos se degradan por una de las vías mostradas en la figura 12-29. Para la mayoría de los mRNA, la longitud de la cola poli(A) decrece gradualmente con el tiempo a través de la acción de una nucleasa desadenilante. Cuando se acorta lo suficiente, las moléculas de PABPI ya no pueden unir y estabilizar la interacción del casquete 5' y los factores de iniciación (véase fig. 4-31). El casquete expuesto luego es eliminado por una enzima de eliminación del casquete, y el mRNA desprotegido es degradado por una exonucleasa 5'→3'. La eliminación de la cola poli(A) también hace a los mRNA susceptibles a la degradación por exosomas citoplasmáticos que contienen exonucleasas 3'→5'. Las exonucleasas 5'→3' predominan en las levaduras y el exosoma 3'→5' parece predominar en las células de los mamíferos.

Para los mRNA degradados en estas vías dependientes de la desadenilación, la velocidad a la cual son desadenilados controla la velocidad a la cual son degradados. La velocidad de desadenilación varía de manera inversa a la frecuencia de iniciación de la traducción para un mRNA: cuanto mayor sea la frecuencia de la iniciación, más lenta será la velocidad de desadenilación. Esta relación probablemente se deba a las interacciones recíprocas entre los factores de iniciación y la PABPI que estabiliza la unión de PABPI a la cola poli(A), protegiéndola de este modo de la exonucleasa de desadenilación.

Muchos mRNA de vida corta en las células de los mamíferos contienen múltiples copias, a veces superpuestas, de la secuencia AUUUA en la región 3' no traducida. Se descubrió



▲ Fig. 12-29. Vías para la degradación de los mRNA eucariontes. En las vías dependientes de la desadenilación (*centro*), la cola poli(A) se acorta progresivamente por una desadenilasa (naranja) hasta que alcanza una longitud de 20 residuos A o menos en el cual la interacción con la PABPI se desestabiliza, lo que conducen a interacciones debilitadas entre el casquete 5' y los factores de iniciación de la traducción. Luego al mRNA desadenilado se le puede 1) extraer el casquete y ser degradado por una exonucleasa 5'→3' o 2) ser degradado por una exonucleasa 3'→5' en los exosomas citoplasmáticos. Algunos mRNA (*derecha*) son cortados internamente mediante una endonucleasa y los fragmentos degradados por un exosoma. A otros mRNA (*izquierda*) se les quita el casquete antes de que sean desadenilados y luego se los degrada mediante una exonucleasa 5'→3'. (Adaptado de M. Tucker y R. Parker, 2000, *Ann. Rev. Biochem.* 69:571.)

que proteínas de unión al RNA específicas se unen a estas secuencias 3' ricas en AU. Experimentos recientes sugieren que las proteínas unidas interactúan con una enzima desadenilante y con el exosoma, promoviendo en consecuencia la rápida desadenilación y la subsiguiente degradación 3'→5' de estos mRNA. En este mecanismo, la velocidad de degradación del mRNA está desacoplada de la frecuencia de traducción. Por lo tanto, los mRNA que contienen la secuencia AUUUA deben ser traducidas a frecuencias altas, y aún así también degradarse enseguida, lo que permite que las proteínas codificadas se expresen en estallidos cortos.

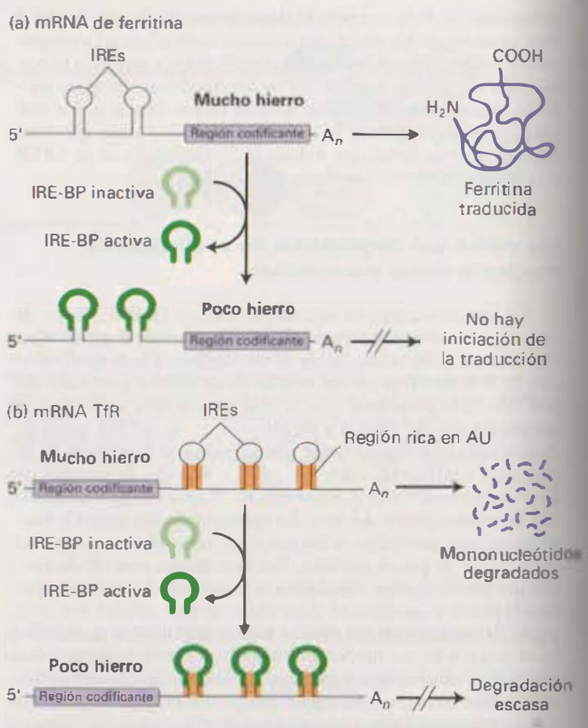
Como se muestra en la figura 12-29, algunos mRNA se degradan en vías que no involucran una desadenilación significativa. En una de ellas se elimina el casquete de los mRNA antes de que la cola poli(A) sea acortada extensamente. Parece que ciertas secuencias del mRNA hacen al casquete sensible a la enzima de eliminación del casquete, pero el mecanismo exacto se ignora. En la otra vía alternativa, los mRNA primero se cortan internamente mediante endonucleasas. El complejo silenciador inducido por RNA (RISC) mencionado con anterioridad es un ejemplo de esa endonucleasa (véase fig. 12-27). Los fragmentos generados por los cortes internos luego son degradados por exonucleasas.

Una proteína de unión al RNA sensible al hierro regula la traducción y degradación del mRNA

El control de las concentraciones intracelulares de hierro mediante la *proteína de unión a los elementos de respuesta al hierro (IRE-BP)* es un ejemplo excelente de una única proteína que regula la traducción de un mRNA y la degradación de otro. Cuando las reservas de hierro intracelular son bajas, este sistema de control dual funciona de manera de incrementar el nivel de iones de hierro libre disponible para las enzimas que requieren hierro; cuando el hierro está presente en exceso, el sistema funciona de manera de evitar la acumulación de niveles tóxicos de iones libres. Es uno de los ejemplos más simples y mejor comprendidos de control traduccional mediado por proteína.

Un componente en este sistema es la regulación de la producción de *ferritina*, una proteína intracelular fijadora de hierro. La región 5' no traducida del mRNA de la ferritina contiene *elementos de respuesta al hierro (IRE)* que tienen una estructura de tallo y bucle. La IRE-BP reconoce cinco bases específicas en el bucle del IRE y la naturaleza doble del tallo. A bajas concentraciones de hierro, la IRE-BP se encuentra en una conformación activa que se une a los IRE (fig- 12-30a). La IRE-BP unida bloquea la capacidad de la subunidad ribosómica 40S de rastrear o buscar el codón AUG de inicio (véase fig. 4-25), inhibiendo por lo tanto la iniciación de la traducción. La disminución resultante en la ferritina significa que menos hierro forma un complejo con la ferritina y está así disponible para las enzimas que requieren hierro. A altas concentraciones de hierro, la IRE-BP está en una conformación inactiva que no se une a los IRE 5', de manera que la traducción puede proseguir. Luego la ferritina recién sintetizada une iones de hierro libres y evita su acumulación hasta niveles dañinos.

La otra parte de este sistema regulador controla la entrada de hierro en las células. En los vertebrados, el hierro ingerido es transportado a través de la circulación unido a una proteína denominada *transferrina*. Luego de unirse al receptor de transferrina (TfR) en la membrana plasmática, el complejo transferrina-hierro es introducido en las células mediante endocitosis mediada por receptor (cap. 17). La región 3' no traducida del mRNA de TfR contiene los IRE cuyos tallos tienen secuencias desestabilizadoras ricas en AU (fig. 12-30b). A altas concentraciones de hierro, cuando la IRE-BP se encuentra en la conformación inactiva no unida, se cree que estas secuencias ricas en AU promueven la degradación del mRNA de TfR mediante el mismo mecanismo que conduce a la degradación rápida de otros mRNA de vida corta, como ya se describió. La disminución resultante en la producción del receptor de transferrina reduce velozmente la entrada de hierro y protege así a la célula. Sin embargo, a bajas concentraciones de hierro, se cree que la IRE-BP unida bloquea el reconocimiento de las secuencias desestabilizantes ricas en AU por parte de las proteínas que de otra manera degradarían rápidamente los mRNA. Como resultado, la producción del receptor de transferrina se incrementa y se introduce más hierro al interior celular.



▲ Fig. 12-30. Regulación dependiente de hierro de la traducción y degradación del mRNA. La proteína de unión al elemento de respuesta al hierro (IRE-BP) controla la traducción del mRNA de la ferritina (a) y la degradación del mRNA del receptor de transferrina (TfR) (b). A concentraciones intracelulares bajas de hierro, la IRE-BP se une a elementos de respuesta al hierro (IRE) en la región no traducida 5' o 3' de estos mRNA. A altas concentraciones de hierro, la IRE-BP experimenta un cambio conformacional y no puede unir ningún mRNA. El control dual mediante IRE-BP regula precisamente el nivel de iones de hierro libre dentro de las células. Para mayores detalles véase el texto.

Otras proteínas de unión al RNA reguladas también pueden funcionar en el control de la traducción o degradación del mRNA, de la misma forma que la IRE-BP de doble acción. Por ejemplo, una proteína de unión al RNA sensible al hemo controla la traducción del mRNA que codifica la aminolevulinato sintasa (ALA), una enzima clave en la síntesis del hemo. Los estudios in vitro mostraron que el mRNA que codifica la proteína caseína de la leche está estabilizado por la hormona prolactina y se degrada con rapidez en su ausencia.

La degradación mediada por mutaciones sin sentido y otros mecanismos de vigilancia del mRNA evitan la traducción de los mRNA procesados inadecuadamente

La traducción de un mRNA procesado inadecuadamente puede conducir a la producción de una proteína anormal que interfiere en el funcionamiento de la proteína normal codificada por el mRNA. (Este efecto es equivalente al que proviene de mutaciones dominantes negativas, comentadas en el capítulo 9, aunque la causa es diferente.) Varios mecanismos denominados vigilancia del mRNA ayudan a las células a evitar la traducción de moléculas de mRNA procesadas inadecuadamente. Ya mencionamos dos de esos mecanismos de vigilancia: el reconocimiento de los pre-mRNA procesados inadecuadamente en el núcleo y su degradación por el exosoma, y la restricción general contra el transporte nuclear de los pre-mRNA procesados incompletamente que permanecen asociados con un empalmosoma.

Otro mecanismo denominado *degradación mediada por mutaciones sin sentido (nonsense-mediated decay)* ocasiona la degradación de los mRNA en los cuales uno o más exones han sido omitidos durante el corte y empalme. A excepción de los pre-mRNA que normalmente sufren corte y empalme alternativo, esa omisión del exón a menudo altera el marco abierto de lectura del mRNA 3' para la unión incorrecta del exón, lo que da como resultado la introducción de un codón de terminación incorrecto. Para casi todos los mRNA procesados adecuadamente, el codón de terminación se encuentra en el último exón. La degradación mediada por codones sin sentido conduce a la degradación de los mRNA con codones de terminación ubicados antes de la última unión de empalme en el mRNA.

Una búsqueda de posibles señales moleculares que podrían indicar las posiciones de las uniones de empalme en un mRNA procesado condujo al descubrimiento de complejos de unión de exones. Como ya se notó, estos complejos estimulan la salida de los mRNP del núcleo. Análisis de mutantes de las levaduras sugieren que algunas de las proteínas en los complejos de unión de exones participan en la degradación mediada por codones sin sentido. Una propuesta basada en este y en otros hallazgos es que los complejos de unión de exones interactúan con una desadenilasa que elimina rápidamente la cola poli(A) de un mRNA asociado, lo que conduce a la rápida eliminación de su casquete y su degradación por una exonucleasa 5→3 (véase fig. 12-29). En el caso de los mRNA cortados y empalmados de manera adecuada, se cree que los complejos de unión de exones se desprenden del mRNA al pasar por el primer ribosoma "pionero" durante la traducción del mRNA, protegiendo por lo tanto al mRNA de la degradación. Para los mRNA con un codón de terminación anterior a la unión del exón final, sin embargo, uno o más complejos de unión de exones permanecen asociados con el mRNA, lo que da como resultado la degradación mediada por las mutaciones sin sentido.

La degradación mediada por codones sin sentido se produce en el citoplasma de células de levaduras. Notablemente, en las células de los mamíferos existe evidencia de que el ribosoma pionero traduce el mRNA mientras que el extremo 5' está asociado con el complejo nuclear de unión al casquete y su cola poli(A) está asociada con la PABPII nuclear. Este hallazgo y otros resultados aumentan la posibilidad de que en las células de los organismos superiores, el primer ciclo de la traducción pueda ocurrir en el núcleo como parte de la degradación mediada por mutaciones sin sentido del mecanismo de supervisión del mRNA.

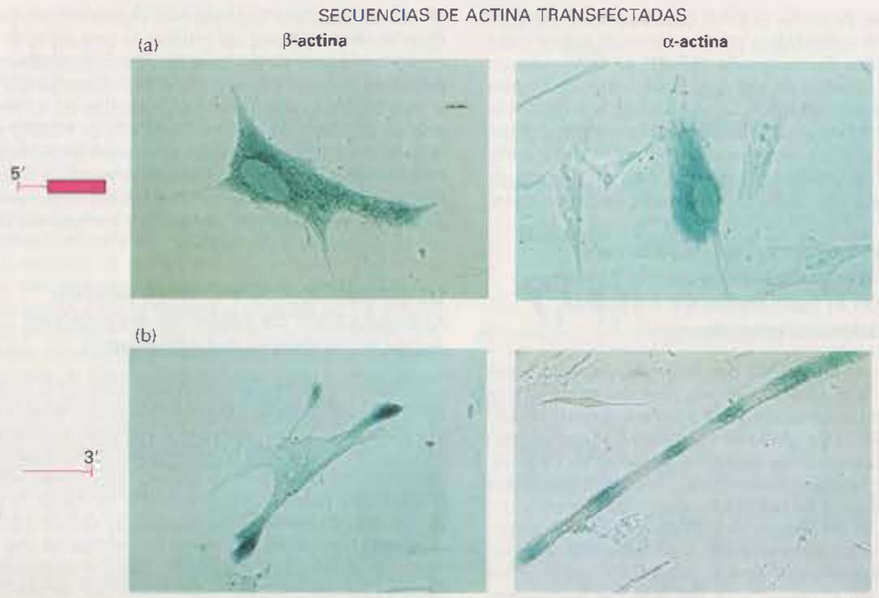
La localización de los mRNA permite la producción de proteínas en regiones específicas dentro del citoplasma

Muchos procesos celulares dependen de la localización de proteínas particulares para especificar las estructuras o regiones de la célula. En capítulos posteriores analizaremos cómo algunas proteínas son transportadas a localizaciones celulares apropiadas *luego* de su síntesis. De manera alternativa, la localización proteica puede lograrse mediante la localización de los mRNA en regiones específicas del citoplasma celular en donde funcionan las proteínas codificadas por ellos. En la mayoría de los casos analizados hasta el momento, esa localización del mRNA está especificada por secuencias de la región 3' no traducida del mRNA.

Un ejemplo bien documentado de la ubicación del mRNA tiene lugar en los mioblastos (células musculares precursoras) de mamíferos a medida que se diferencian en miotubos, las células multinucleadas fusionadas que constituyen las fibras musculares. Los mioblastos son células móviles que extienden regiones citoplasmáticas, denominadas *lamelipodios*, desde el borde delantero en la dirección del movimiento. Las extensiones de lamelipodios durante el movimiento celular requieren la polimerización de β-actina (cap. 19). El mRNA de la β-actina se concentra convenientemente en los bordes delanteros de los mioblastos, la región del citoplasma celular donde la proteína codificada es necesaria para la movilidad. Cuando los mioblastos se fusionan para formar miotubos sincitiales, la expresión de la β-actina se reprime y se induce la de la α-actina específica del músculo. A diferencia del mRNA de la β-actina, el mRNA de la α-actina está restringido a las regiones perinucleares de los miotuhos. Cuando los mioblastos cultivados en el proceso de diferenciación son teñidos con sondas fluorescentes específicas para los mRNA de α- o β-actina, ambos mRNA se localizan en sus respectivas regiones celulares.

Para probar la capacidad de las secuencias del mRNA de la actina para dirigir la localización citoplasmática de un mRNA, se insertaron fragmentos de cDNA de α- o β-actina en vectores plasmídicos separados que expresan la β-galactosidasa a partir de un promotor viral fuerte. Los plásmidos resultantes fueron transfectados a células cultivadas y se analizaron en busca de la actividad de la β-galactosidasa. Estos experimentos mostraron que la inclusión del extremo 3' no traducido de los cDNA de la α- o β-actina dirige la localización de la β-galactosidasa expresada, mientras que las regiones 5' no traducidas y las codificantes no lo hacen (fig. 12-31).

El tratamiento de mioblastos cultivados con citocalasina D, que perturba los microfilamentos de actina, conduce a la rápida deslocalización de los mRNA de actina, lo que indica que los microfilamentos citoesqueléticos de actina participan en el proceso de localización. Sin embargo, la perturbación de otros componentes citoesqueléticos no altera la localiza-



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 12-31 La inserción de diversas secciones de los genes de actina en la posición no traducida 3' de un vector de expresión mostró que las UTR 3' de los mRNA de la α- y β -actina dirigen la ubicación del mRNA informante. Se construyeron vectores de expresión plasmídicos que codifican mRNA de β-galactosidasa que contienen como secuencias 3' no traducidas ya sea la secuencia 5' no traducida y la región que codifica el mRNA de α- o β -actina (*paneles superiores*), o la secuencia 3' no traducida de estos mRNA (*paneles inferiores*), como se indica a la izquierda. Los plásmidos recombinantes se transfectaron separadamente en mioblastos diferenciados. Después de un período de expresión, se fijaron las células y luego se analizaron para la actividad de β-galactosidasa mediante incubación con X-gal, un sustrato que es hidrolizado por la β-galactosidasa para dar un producto azul. (a) Células transfectadas que expresaron los mRNA de β-galactosidasa genéticamente diseñados cuyas regiones no traducidas 3' se correspondían con la secuencia 5' no traducida y a la región codificadora de mRNA de la actina α y β. Estas secuencias de actina no causaron la localización del mRNA de la β galactosidasa, como quedó evidenciado por la tinción azul difuso. (b) Células transfectadas que expresaron los mRNA de β-galactosidasa genéticamente diseñados cuyas regiones no traducidas 3' se correspondían con las secuencias 3' no traducidas del mRNA de la α- o β-actina. Estas secuencias condujeron a la ubicación del mRNA de la β-galactosidasa a los lamelipodios en los mioblastos (β-actina) o a regiones perinucleares en los miotubos (α-actina), como se evidencia por la tinción intensa en estas regiones. (Microfografías de E. H. Kislaukis et al., 1993. *J. Cell Biol.* 123:165.)

ción de los mRNA de actina. Otros tipos de evidencia también implican el citoesqueleto de actina en la localización del mRNA. Presumiblemente ciertas proteínas de unión al RNA interactúan con secuencias específicas en las regiones 3' no traducidas de un mRNA y con componentes específicos de los microfilamentos, incluidas las proteínas motoras que mueven una carga a lo largo de la longitud de los microfilamentos. El ejemplo mejor comprendido de este mecanismo de localización del mRNA tiene lugar durante la división celular en *S. cerevisiae*, como describimos en el capítulo 22.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 12.4

Mecanismos citoplasmáticos de control postranscripcional

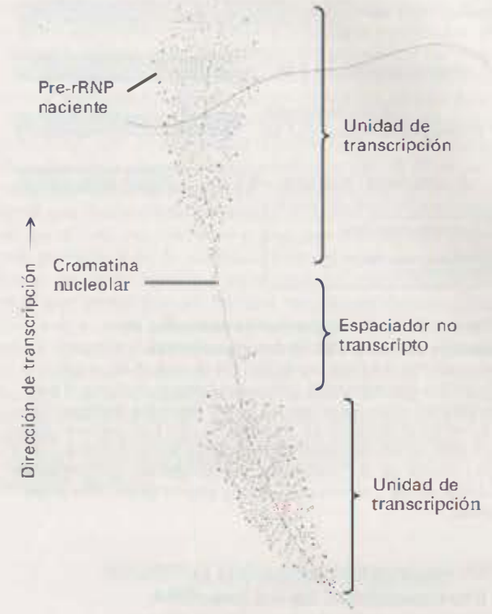
- La traducción puede ser reprimida mediante micro RNA (miRNA), que forman híbridos imperfectos con secuencias en la región 3' no traducida (UTR) de mRNA diana específicos.
- El fenómeno de interferencia del RNA relacionado con el anterior, que probablemente evolucionó como un sistema de defensa primitivo contra virus y transposones, lleva a la degradación de los mRNA que forman híbridos perfectos con los RNA de interferencia corto (siRNA).
- Tanto los miRNA como los siRNA contienen 21-23 nucleótidos, son generados a partir de moléculas precursoras más largas y se ensamblan en un complejo silenciador multiproteico inducido por RNA (RISC) que reprime la traducción del mRNA diana o lo corta (véase fig. 12-27).
- La poliadenilación citoplásmica es necesaria para la traducción de los mRNA con una cola poli(A) corta. La unión de una proteína específica a elementos reguladores en sus UTR 3' reprime la traducción de estos mRNA. La fosforilación de esta proteína de unión al RNA, inducida por una señal externa, conduce al alargamiento de la cola poli(A) 3' y a la traducción (véase fig. 12-28).
- La mayoría de los mRNA se degradan como resultado del acortamiento gradual de su cola poli(A) (desadenilación) seguida de la digestión 3'→5' mediada por exosoma o la eliminación del casquete 5' y la digestión mediada por una exonucleasa 5'→3' (véase fig. 12-29).
- Los mRNA eucariontes que codifican las proteínas que se expresan en estallidos cortos suelen tener copias repetidas de una secuencia rica en AU en su UTR 3'. Las proteínas específicas que se unen a estos elementos también interactúan con la enzima desadenilante y los exosomas citoplasmáticos y promueven la degradación rápida del RNA.
- La unión de diversas proteínas a elementos reguladores de las UTR 3' o 5' de los mRNA regula la traducción o degradación de muchos mRNA en el citoplasma.
- La traducción del mRNA de ferritina y la degradación del mRNA del receptor de transferrina (TfR) son reguladas por la misma proteína de unión al RNA sensible al hierro. A bajas concentraciones de hierro, esta proteína se encuentra en una conformación que se une a elementos específicos de los mRNA, inhibiendo la traducción o degradación del mRNA del TfR (véase fig. 12-30). Este control dual regula exactamente el nivel de hierro dentro de las células.
- La degradación mediada por codones sin sentido y otros mecanismos de supervisión del mRNA evitan la traducción de los mRNA procesados inadecuadamente que codifican proteínas anormales que pueden interferir en el funcionamiento de las proteínas normales correspondientes.
- Algunos mRNA se dirigen a ubicaciones subcelulares específicas mediante secuencias generalmente halladas en el UTR 3', que conducen a la localización de las proteínas codificadas.

12.5 Procesamiento del rRNA y del tRNA

Alrededor del 80% del RNA total de las células de mamíferos en rápido crecimiento (p. ej., células HeLa cultivadas) es rRNA, y el 15% es tRNA; por lo tanto, el mRNA que codifica proteínas constituye sólo una pequeña porción del RNA total. Los transcriptos primarios producidos a partir de la mayoría de los genes de rRNA y a partir de los genes de tRNA, al igual que los pre-mRNA, son procesados extensamente para producir las formas funcionales maduras de estos RNA.

Los genes de pre-rRNA son similares en todos los eucariontes y funcionan como organizadores nucleolares

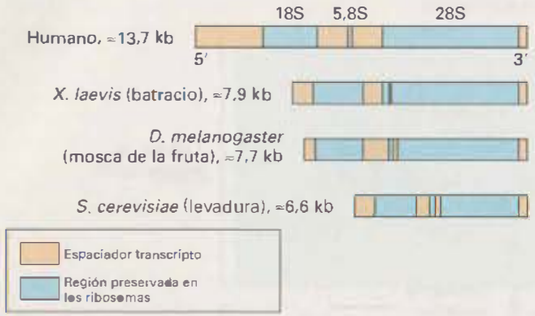
Los rRNA 28S y 5,8S asociados con la subunidad ribosómica mayor (60S) y el rRNA 18S asociado con la subunidad ribosómica menor (40S) en los eucariontes superiores (y los rRNA más pequeños funcionalmente equivalentes en todos los otros eucariontes) están codificados por un único tipo de unidades de transcripción de los pre-rRNA. La transcripción por la RNA polimerasa I produce un transcripto primario 45S (pre-rRNA), que es procesado para obtener los rRNA 28S, 18S y 5,8S maduros hallados en los ribosomas citoplasmáticos. La secuenciación del DNA codificante de pre-rRNA a partir de muchas especies demostró que este DNA comparte varias propiedades en todos los eucariontes. Primero, los genes pre-rRNA están dispuestos en largos arreglos en tándem separados por regiones espaciadoras no transcriptas



▲ Fig. 12-32. Microfotografía electrónica de unidades de transcripción de pre-rRNA de nucléolos de un ovocito de rana. Cada "pluma" representa una molécula de pre-rRNA asociada con proteínas en una partícula de pre-ribonucleoproteína (pre-RNP) que emerge de una unidad de transcripción. Las unidades de transcripción de pre-rRNA están dispuestas en tándem, separadas por regiones espaciadoras no transcriptas de cromatina nucleolar. (Cortesía de Y. Osheim y O. J. Miller, Jr.)

cuya longitud oscila entre ≈2 kb en los batracios a ≈30 kb en los seres humanos (fig. 12-32). Segundo, las regiones genómicas correspondientes a los tres rRNA maduros están siempre dispuestas en el mismo orden 5'→3': 18S, 5,8S y 28S. Tercero, en todas las células eucariontes (e incluso en las bacterias), el gen del pre-rRNA codifica y el transcripto primario correspondiente contiene, regiones que se eliminan durante el procesamiento y se degradan rápidamente. La estructura general de los pre-rRNA se diagrama en la figura 12-33.

Tanto la síntesis como el procesamiento del pre-rRNA se producen en el nucléolo. Cuando los genes del pre-rRNA fueron identificados inicialmente en el nucléolo mediante hibridación in situ, no se sabía si se necesitaba algún otro DNA para formar el nucléolo. Experimentos posteriores con cepas transgénicas de *Drosophila* demostraron que una única unidad transcripcional de pre-rRNA completa induce la formación de un nucléolo pequeño. Por lo tanto, un único gen de pre-rRNA basta para ser un *organizador nucleolar*, y todos los otros componentes del ribosoma se difunden hacia el pre-RNA recién formado. La estructura del nucléolo observada mediante microscopio óptico y electrónico es resultado del procesamiento del pre-RNA y el ensamblaje de las subunidades ribosómicas.



▲ Fig. 12-33. Estructura general de unidades de transcripción de pre-rRNA en los eucariontes. Las tres regiones codificantes (azul) codifican rRNA 18S, 5,8S y 28S hallados en los ribosomas de los eucariontes superiores o sus equivalentes en otras especies. El orden de estas regiones codificantes en el genoma es siempre 5′→3′. Las variaciones en las longitudes de las regiones espaciadoras transcriptas (en ocre claro) dan cuenta de las principales diferencias en las longitudes de las unidades de transcripción de los pre-rRNA en diferentes organismos.

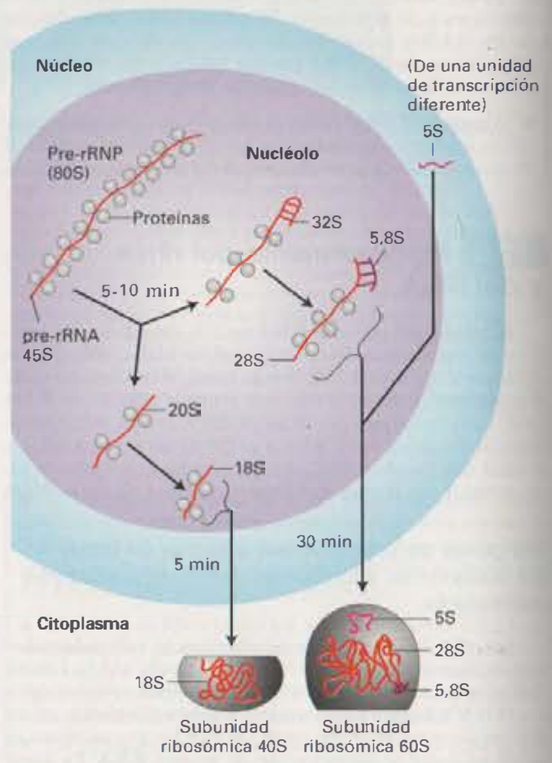
Los RNA nucleolares pequeños colaboran en el procesamiento de los pre-rRNA y en el ensamblaje de las subunidades ribosómicas

Tras su síntesis en el nucléolo, los transcriptos de pre-rRNA nacientes se unen inmediatamente a proteínas, formando *partículas ribonucleoproteicas prerribosómicas (pre-rRNP)*. La mayor parte de estas (80S) contienen una molécula de pre-rRNA de 45S, que es cortada en una serie de pasos exonucleolíticos y de escisión que finalmente producen los rRNA maduros hallados en los ribosomas (fig. 12-34). Durante el procesamiento, el pre-rRNA también es extensamente modificado, en mayor medida por metilación del grupo hidroxilo 2' de ribosas específicas y conversión de residuos de uridina a seudouridina. Algunas de las proteínas de los pre-rRNP hallados en los nucléolos permanecen asociadas con las subunidades ribosómicas maduras, mientras que otras están restringidas al nucléolo y asisten en el ensamblaje de las subunidades.

Las posiciones de los sitios de corte y los sitios específicos de la 2'-●-metilación y la formación de seudouridinas en los pre-rRNA son determinadas por aproximadamente 150 especies de RNA pequeño restringidas al nucléolo, denominados *RNA nucleolares pequeños (snoRNA)*, que se hibridan transitoriamente a moléculas de pre-rRNA. Al igual que los snRNA que participan en el procesamiento del pre-mRNA, los snoRNA se asocian con proteínas y forman partículas ribonucleoproteicas denominadas *snoRNP*. Una gran clase de snoRNP ayudan a posicionar una enzima metiltransferasa cerca de los sitios de metilación en el pre-mRNA. Otra posiciona la enzima que convierte la uridina a seudouridina. Otras participan en las reacciones de escisión que eliminan las regiones espaciadoras transcriptas. Una vez escindidas de los pre-rRNA, estas secuencias son degradadas por las mismas exonucleasas nucleares 3′→5′ asociadas con los exosomas que degradan los intrones procesados a partir del pre-mRNA.

Algunos snoRNA se expresan a partir de sus propios promotores por la RNA polimerasa II o III. Sin embargo, la gran mayoría de los snoRNA son intrones eliminados por corte y empalme de genes codificantes de mRNA funcionales que codifican proteínas involucradas en la síntesis de ribosomas o en la traducción. Algunos snoRNA son intrones cortados a partir de mRNA aparentemente no funcionales. Los genes que codifican estos mRNA parecen existir sólo para expresar snoRNA de intrones cortados.

A diferencia de los genes de pre-rRNA, los genes de rRNA 5S son transcriptos por la RNA polimerasa III en el nucleoplasma fuera del nucléolo. Sin un procesamiento adicional, el RNA 5S se difunde hacia el nucléolo, donde se ensambla con los rRNA 28S y 5,8S y con proteínas para formar las subunidades ribosómicas mayores (véanse figs. 12-34 y 4-28). Cuando el ensamblaje de subunidades ribosómicas en el nucléolo se completa, se las transporta a través de los complejos del poro nuclear al citoplasma, en donde por primera vez aparecen como subunidades libres. Las subunidades ribosómicas son las estructuras celulares conocidas más grandes en ser transportadas a través de los complejos del poro nuclear.



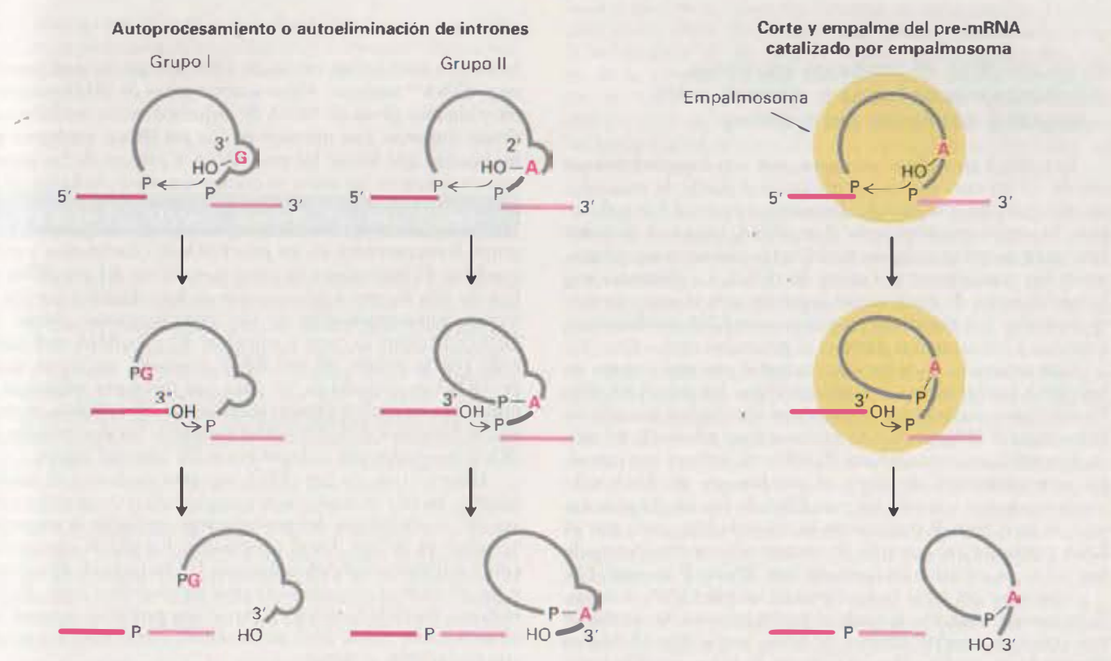
▲ Fig. 12-34. Procesamiento del pre-rRNA y ensamblaje de los ribosomas en los eucariontes superiores. Las proteínas ribosómicas y nucleolares se asocian con el pre-RNA 45S a medida que es sintetizado y forman una pre-rRNP 80S. Los sitios de corte y modificaciones químicas están determinados por RNA nucleolares pequeños (no se muestran). Nótese que la síntesis del rRNA 5S se produce fuera del nucléolo.

Los intrones autoprocesados del grupo I fueron los primeros ejemplos de RNA catalítico

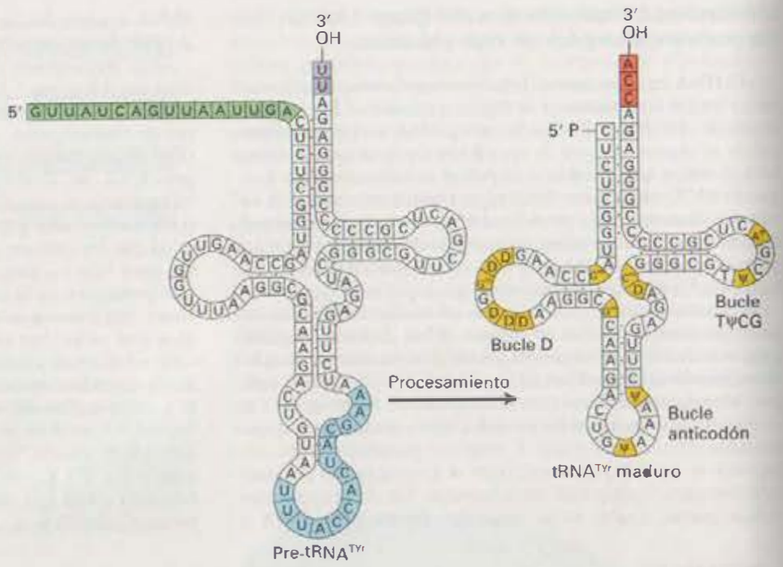
El DNA en el protozoo *Tetrahymena thermophila* contiene un intrón interpuesto en la región que codifica la gran molécula de pre-rRNA. Búsquedas minuciosas no pudieron descubrir ni siquiera un gen de pre-rRNA sin la secuencia extra, lo que indica que el corte y empalme es necesario para producir rRNA maduro en estos organismos. Los estudios in vitro que demostraron que el pre-rRNA fue cortado y empalmado en los sitios correctos en ausencia de cualquier proteína proporcionaron los primeros indicios de que el RNA puede funcionar como un catalizador, al igual que las enzimas.

Posteriormente se encontró una colección completa de secuencias autoprocesadas en los pre-rRNA de otros organismos unicelulares, en los pre-rRNA de cloroplastos y mitocondrias, en varios pre-mRNA de ciertos bacteriófagos de *E. coli*, y en algunas transcriptos primarios de tRNA bacterianos. Las secuencias autoprocesables en todos estos precursores, denominadas *intrones del grupo I*, emplean guanosina como cofactor y se pueden plegar mediante el apareamiento de bases internas para yuxtaponer estrechamente los dos exones que deben unirse. Como ya se comentó, ciertos pre-mRNA y tRNA mitocondriales y de cloroplastos contienen un segundo tipo de intrón autoprocesable designado *grupo II*.

Los mecanismos de corte y empalme empleados por los intrones del grupo I, los intrones del grupo II y los empalmosomas son casi siempre similares y comprenden dos reacciones de transesterificación que no requieren aporte de energía (fig. 12-35). Estudios estructurales de intrones del grupo I del pre-rRNA de *Tetrahymena* combinados con experimentos bioquímicos y mutacionales revelaron que el RNA se pliega para formar una estructura tridimensional precisa que, al igual que las enzimas proteicas, contiene profundas hendiduras para fijar los sustratos y regiones inaccesibles al solvente que participan en la catálisis. El intrón del grupo I funciona como una metaloenzima para orientar precisamente los átomos que participan en las dos reacciones de transesterificación adyacentes a los iones de Mg^{2+} catalíticos. Actualmente existe considerable evidencia que indica que el proceso de corte y empalme mediante los intrones del grupo II y mediante los snRNA en el empalmosoma también involucra iones Mg^{2+} catalíticos unidos. En los intrones autoprocesables de los grupos I y II y probablemente en el empalmosoma, el RNA funciona como una **ribozima**, una secuencia de RNA con capacidad catalítica.



▲ Fig. 12-35. Mecanismos del corte y empalme en los intrones autoprocesables de los grupos I y II y del proceso de corte y empalme del pre-mRNA catalizado por el empalmosoma. El intrón aparece en gris, los exones que deben ligarse, en rojo. En los intrones del grupo I, un cofactor guanosina (G) que no es parte de la cadena de RNA se asocia con el sitio activo. El grupo hidroxilo 3' de esta guanosina participa en una reacción de transesterificación con el fosfato en el extremo 5' del intrón; esta reacción es análoga a la que involucra los grupos hidroxilo 2' del sitio de ramificación A en los intrones del grupo II y en los intrones del pre-mRNA procesados en los empalmosomas (véase fig. 12-7). La transesterificación ulterior que une los exones 5' y 3' es similar en los tres mecanismos de transesterificación. Nótese que los intrones del grupo I eliminados por corte y empalme son estructuras lineales, a diferencia de los productos intrónicos ramificados en los otros dos casos. (Adaptado de P. A. Sharp, 1987, *Science* 235:769.)



▶ Fig. 12-36. Cambios que se producen durante el procesamiento del pre-tRNA de la tirosina. Un intrón de 14 nucleótidos (en azul) en el bucle anticodón es eliminado por corte y empalme. Una secuencia de 16 nucleótidos (verde) en el extremo 5′ se corta mediante RNasa P. Los residuos U en el extremo 3′ se reemplazan por la secuencia CCA (rojo) que se encuentra en todos los tRNA maduros. Numerosas bases en los tallos-bucles se convierten en las bases modificadas características (amarillo). No todos los pre-tRNA contienen intrones que son eliminados por corte y empalme durante el procesamiento, pero todos sufren los otros tipos de cambios que se muestran aquí. D: dihidrouridina; Ψ: seudouridina.

En los pre-tRNA se producen escisiones, modificaciones de bases y, a veces, corte y empalme catalizado por proteínas

Los tRNA citosólicos maduros, con una longitud promedio de 75-80 nucleótidos, se producen a partir de precursores más grandes (pre-tRNA) sintetizados por la RNA polimerasa III en el nucleoplasma. Los tRNA maduros también contienen numerosas bases modificadas que no están presentes en los transcriptos primarios de tRNA. La eliminación y la modificación de bases tienen lugar durante el procesamiento de todos los pre-tRNA; algunos pre-tRNA también son cortados y empalmados durante el procesamiento.

Una secuencia 5′ de longitud variable que está ausente en los tRNA maduros está presente en todos los pre-tRNA (fig. 12-36). Estos nucleótidos 5′ extra son eliminados por una *ribonucleasa P (RNasa P)*, una endonucleasa ribonucleoproteica. Los estudios con la RNasa P de *E. coli* indican que con altas concentraciones de Mg^{2+}, el componente de RNA sólo puede reconocer y cortar los pre-tRNA de *E. coli*. El polipéptido de la RNasa P incrementa la velocidad de corte por el RNA y permite que continúe a concentraciones fisiológicas de Mg^{2+}. En los eucariontes funciona una RNasa P comparable.

Alrededor del 10% de las bases en los pre-tRNA se modifican enzimáticamente durante el procesamiento. Se producen tres clases de modificaciones de bases (véase fig. 12-36): el reemplazo de residuos U en el extremo 3′ de los pre-tRNA por una secuencia CCA, que se encuentra en el extremo 3′ de todos los tRNA y que es necesario para su carga por la aminoacil-tRNA sintetasa durante la síntesis proteica; la adición de grupos metilo e isopentenilo al anillo heterocíclico de las bases de purina y la metilación del grupo OH 2′ de la ribosa de cualquier residuo; y la conversión de uridinas específicas a dihidrouridina, seudouridina o residuos de ribotimidina.

Como se muestra en la figura 12-36, el pre-tRNA expresado a partir del gen del tRNA de la tirosina de las levaduras ($tRNA^{Tyr}$) contiene un intrón de 14 bases que no está presente en el $tRNA^{Tyr}$ maduro. Algunos otros genes de tRNA eucariontes y algunos genes de tRNA de arqueobacterias también contienen intrones. Los intrones en los pre-tRNA nucleares son más cortos que los de los pre-mRNA y carecen de las secuencias consenso en los sitios de corte y empalme, halladas en los pre-mRNA (véase fig. 12-6). Los intrones de los pre-tRNA también son claramente distintos de los intrones del grupo I y del grupo II encontrados en los pre-rRNA de cloroplastos y mitocondrias. El mecanismo de corte y empalme del pre-tRNA difiere en tres formas fundamentales de los utilizados por los intrones autoempalmables y los empalmosomas (véase fig. 12-35). Primero, el corte y empalme del pre-tRNA está catalizado por proteínas, no por RNA. Segundo, un intrón de un pre-tRNA es cortado en un paso que involucra escisiones simultáneas en ambos extremos del intrón. Por último, se necesita la hidrólisis de GTP y ATP para unir las dos mitades del tRNA generadas por la escisión a cada lado del intrón.

Después que los pre-tRNA son procesados en el nucleoplasma, los tRNA maduros se transportan al citoplasma a través de los complejos del poro nuclear mediante la exportina 1, como ya se vio. En el citoplasma, los tRNA interactúan con las aminoacil-tRNA sintetasas, los factores de elongación y los ribosomas durante la síntesis de proteínas (cap. 4). Por lo tanto, los tRNA suelen asociarse con proteínas y pasan poco tiempo en forma libre en la célula, como también ocurre con los mRNA y rRNA.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 12.5

Procesamiento del rRNA y del tRNA

- Un gran precursor de pre-rRNA (45S en los seres humanos) sintetizado por la RNA polimerasa I sufre escisión, digestión exonucleolítica y modificación de bases para producir los rRNA 28S, 18S y 5,8S, que se asocian con proteínas ribosómicas para formar subunidades ribosómicas (véase fig. 12-34).
- La síntesis y el procesamiento del pre-rRNA se producen en el nucléolo. El componente rRNA 5S de la subunidad ribosómica mayor es sintetizado en el nucleoplasma por la RNA polimerasa III y no se procesa.
- Los intrones autoprocesables del grupo I y el grupo II y los snRNA en los empalmosomas funcionan como ribozimas, o como secuencias de RNA catalíticamente activas, que llevan a cabo el proceso de corte y empalme mediante reacciones de transesterificación análogas que requieren iones Mg^{+2} unidos (véase fig. 12-35).
- Los pre-tRNA sintetizados por la RNA polimerasa III en el nucleoplasma son procesados mediante la eliminación de la secuencia del extremo 5′, la adición de CCA al extremo 3′ y la modificación de múltiples bases internas (véase fig. 12-36).
- Algunos pre-tRNA contienen un intrón corto que es eliminado por un mecanismo catalizado por proteína distinto del corte y empalme del pre-mRNA y del autoprocesamiento de intrones.
- Todas las especies de moléculas de RNA están asociadas con las proteínas en diversos tipos de partículas ribonucleoproteicas tanto en el núcleo como después del transporte al citoplasma.

PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO

En este capítulo y en el anterior hemos visto que en las células eucariontes, los mRNA son sintetizados y procesados en el núcleo, transportados a través de los complejos del poro nuclear al citoplasma, y luego, en algunos casos, transportados a regiones específicas del citoplasma antes de que sean traducidos por los ribosomas. Cada uno de estos procesos fundamentales es llevado a cabo por maquinarias macromoleculares complejas compuestas por múltiples proteínas y en muchos casos también por RNA. La complejidad de estas maquinarias macromoleculares asegura precisión en el hallazgo de promotores y sitios de corte y empalme en la extensa longitud de las secuencias de DNA y RNA y proporciona diversas vías para regular la síntesis de una cadena polipeptídica. Todavía hay mucho por aprender acerca de la estructura, el funcionamiento y la regulación de maquinarias tan complejas como los empalmosomas y los aparatos de corte/poliadenilación.

Ejemplos recientes de la regulación del corte y empalme del pre-mRNA plantearon interrogantes de cómo las señales extracelulares podrían controlar tales eventos, sobre todo en el sistema nervioso de los vertebrados. Un caso a propósito es la situación destacable del oído interno del pollo, en donde se producen múltiples isoformas del canal de K^+ activado por Ca^{2+} llamado *Slo*, mediante corte y empalme alternativo del RNA. Las interacciones intercelulares parecen informar a las células de su posición en la cóclea, conduciendo al corte y empalme alternativo del pre-mRNA del Slo. El desafío que enfrentan los investigadores es descubrir cómo tales interacciones entre células regulan la actividad de los factores de procesamiento del RNA.

El mecanismo del transporte de mRNP a través de los complejos de poros nucleares plantea muchas preguntas intrigantes. Las futuras investigaciones probablemente revelarán actividades adicionales de las proteínas de hnRNP y de las nucleares de mRNP y clarificarán sus mecanismos de acción. Por ejemplo, hay una pequeña familia de genes que codifican proteínas homólogas a la subunidad mayor del exportador de mRNA. ¿Cuáles son las funciones de estas proteínas relacionadas? ¿Participan en el transporte de conjuntos de mRNP con secuencias solapantes? Algunas proteínas de las hnRNP contienen señales de retención nuclear que evitan la salida nuclear cuando se fusionan a proteínas hnRNP con señales de salida nuclear (NES). ¿Cómo son eliminadas selectivamente estas proteínas de hnRNP del mRNA procesado en el núcleo, permitiendo que los mRNA sean transportados al citoplasma?

La localización de ciertos mRNA en una ubicación subcelular específica es fundamental para el desarrollo de organismos multicelulares. Como se verá en el capítulo 22, durante el desarrollo una célula individual se divide en células hijas que funcionan de manera diferente entre sí. En el lenguaje de la biología del desarrollo se dice que las dos células hijas tienen diferentes destinos en el desarrollo. En muchos casos, estas diferencias en el destino es el resultado de la localización de un mRNA en una región de la célula antes de la mitosis, así que tras la división celular éste se encuentra en una célula hija y no en la otra. Queda mucho trabajo excitante por hacer para comprender por completo los mecanismos moleculares que controlan la ubicación de los mRNA y que son críticos para el desarrollo normal de los organismos multicelulares.

Algunos de los descubrimientos más excitantes e imprevistos de la biología molecular y celular en los últimos años conciernen a la existencia y a la función de los miRNA y al proceso de interferencia del RNA. La interferencia del RNA (RNAi) provee a los biólogos moleculares y celulares de un poderoso método para estudiar la función de un gen. El descubrimiento de más de cien miRNA en los seres humanos y en otros organismos sugiere que esperan su caracterización múltiples ejemplos significativos del control de la traducción mediante estos mecanismos. Estudios recientes en plantas vinculan a RNA nucleares cortos similares con el control de la metilación del DNA y la formación de heterocromatina. ¿Controlará la expresión génica procesos similares a través del ensamblaje de la heterocromatina en los seres humanos y en otros animales? ¿Qué otro proceso regulador podría ser dirigido por los micro RNA? Puesto que el control de estos mecanismos depende del apareamiento de bases entre los miRNA y los mRNA diana o genes, métodos genómicos y bioinformáticos probablemente sugieran genes que podrían estar controlados por estos mecanismos. ¿Qué otros procesos además del control traduccional, la degradación del mRNA y el ensamblaje de la heterocromatina pueden estar controlados por los miRNA?

Éstas son sólo algunas de las fascinantes preguntas que conciernen al procesamiento del RNA, al control postranscripcional y al transporte nuclear que desafiarán a los biólogos moleculares y celulares en las próximas décadas. Estos asombrosos descubrimientos de mecanismos no esperados de control génico por los miRNA nos deparan, sin duda, muchas más sorpresas futuras.

PALABRAS CLAVE

carioferinas *513*
casquete 5' *493*
cola poli(A) *496*
complejo carga *510*
complejo de corte/poliadenilación *497*
complejo de reconocimiento a través del exón *501*
complejo del poro nuclear (NPC) *509*
complejo silenciador inducido por RNA (RISC) *518*
corte y empalme alternativo *505*
corte y empalme del RNA *497*
edición del RNA *508*
empalmosomas *499*
exosoma *504*
exportador de mRNA *514*
exportina 1 *512*
importinas *510*
intrones del grupo I *502*
intrones del grupo II *502*
micro RNA (miRNA) *518*
motivo de reconocimiento del RNA (RRM) *495*
nucleoporinas FG *510*
pre-mRNA *494*
pre-rRNA *525*
proteína Ran *510*
proteínas de unión al elemento de respuesta al hierro (IRE-BP) *522*
proteínas SR *501*
ribozima *527*
RNA nucleares pequeños (snRNA) *499*
supervisión de mRNA *523*

REVISIÓN DE CONCEPTOS

1. Describa tres tipos de regulación postranscripcional de los genes que codifican proteínas.

2. ¿Cuál es la evidencia de que la terminación de la transcripción por la RNA polimerasa II está acoplada a la poliadenilación?

3. Se ha sugerido que la manipulación de la antiterminación del HIV podría proporcionar terapias efectivas para combatir el SIDA. ¿Qué efectos tendrá una mutación en la secuencia TAR que impida la unión que tiene Tat en la transcripción de HIV luego de la infección por HIV y por qué? Una mutación en el Cdk9 ¿qué actividad suprime?

4. Algunos genes de choque térmico (*heat shock*) codifican proteínas que actúan rápidamente para proteger otras proteínas de condiciones severas. Describa el mecanismo que ha evolucionado para regular la expresión de esos genes.

5. Usted está investigando la regulación transcripcional de genes de un organismo eucarionte recién descubierto. Encuentra que este organismo tiene tres enzimas similares a las RNA polimerasas y que los genes que codifican proteínas se transcriben utilizando una enzima similar a la RNA polimerasa II. Examinando los mRNA de longitud completa producidos encuentra que no hay una estructura 5' (es decir, casquete). ¿Se sorprende? ¿Por qué/por qué no?

6. ¿Por qué los investigadores creen que el síndrome del cromosoma X frágil tiene que ver con una aberración en la unión del RNA?

7. ¿Cuál es la diferencia entre hnRNA, snRNA, miRNA, siRNA y snoRNA?

8. Describa cómo se descubrió que los intrones son eliminados durante el proceso de corte y empalme. ¿Cómo se predicen las localizaciones de las uniones exón-intrón?

9. ¿Cuáles son las similitudes mecanicistas entre el autoprocesamiento de los intrones del grupo II y el corte y empalme empalmosómico? ¿Cuál es la evidencia de una posible relación evolutiva entre ambos?

10. ¿Dónde creen los investigadores que se producen la mayoría de los eventos de transcripción y de procesamiento del RNA? ¿Cuál es la evidencia que lo apoya?

11. Usted obtiene la secuencia de un gen que contiene 10 exones, 9 intrones y una UTR 3' que contiene una secuencia consenso de poliadenilación. El quinto intrón también contiene un sitio de poliadenilación. Para probar si se usan ambos sitios de poliadenilación, usted aísla el mRNA y encuentra un transcripto más largo proveniente de tejido muscular y un transcripto de mRNA más corto a partir de otros tejidos. Piense qué mecanismo está implicado en la producción de estos dos transcriptos.

12. ¿Cuál es la evidencia de que un transportador de mRNA dirija las mRNP a través de los poros nucleares? ¿Cuál es la evidencia de que la mayoría de los vertebrados también utilizan tal transportador?

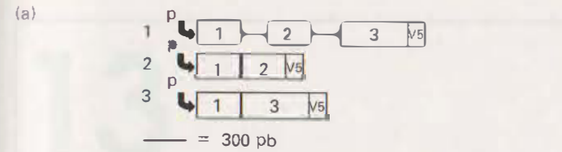
13. ¿Por qué la localización de la Ran GAP en el núcleo y el factor de intercambio de nucleótido Ran (RCC1) en el citoplasma) son necesarios para el transporte unidireccional de proteínas "carga" que contienen una NES?

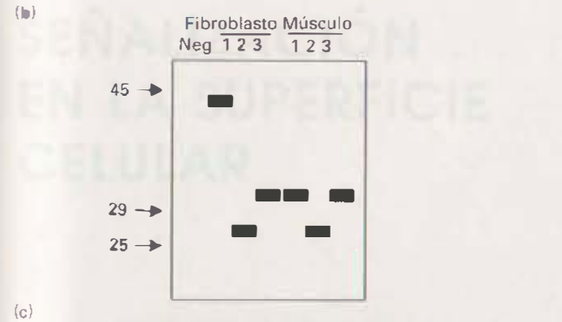
14. Analice por qué las plantas deficientes en actividad Dicer muestran mayor sensibilidad a la infección por virus de RNA.

15. ¿Cuál es la evidencia de que algunos mRNA tienden a acumularse en ubicaciones subcelulares específicas?

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Se piensa que el gen de una proteincinasa (PK) es procesado en forma diferencial en el tejido muscular. Este gen comprende tres secuencias de exones y dos de intrones y en las células de los fibroblastos codifica una proteína de 38,5 kD. Los investigadores transfectaron diversas porciones de un gen PK genómico o de una copia de cDNA tanto a las células musculares como a las de los fibroblastos (véanse las construcciones en la parte [a] de la figura). El sistema de expresión utiliza un promotor activo en ambos tipos de células y una fusión C-terminal a un epítopo etiqueta pequeño llamado V5, que contribuye con ~5,5 kD a la proteína de fusión. La parte (b) de la figura muestra los resultados de un experimento de inmunoprecipitación diseñado para analizar los productos de expresión de las células transfectadas. Se incluye un control negativo (Neg) de las células musculares no transfectadas. Los marcadores de peso molecular en kD se indican a la izquierda. Las proteínas inmunoprecipitadas como se muestra en la parte (b) fueron luego utilizadas en dos ensayos de proteincinasa con dos sustratos diferentes, A y B, para discernir la actividad de las proteínas expresadas.





a. ¿Qué puede concluirse acerca del corte y empalme diferencial del gen PK en los fibroblastos respecto de las células musculares? ¿Existen otros experimentos que puedan confirmar estos resultados?

b. ¿Qué secuencia o secuencias contribuyen a la regulación del proceso de corte y empalme alternativo?

c. ¿De qué manera la presencia o ausencia del exón 3 altera la actividad catalítica de la proteína PK codificada? ¿Qué datos apoyan sus conclusiones?

BIBLIOGRAFÍA

Procesamiento del pre-mRNA eucarionte

Bentley, D. 2002. The mRNA assembly line: transcription and processing machines in the same factory. Curr. Opin. Cell Biol. 14:336-342.

Bonen, L., and J. Vogel. 2001. The ins and outs of group II introns. Trends Genet. 17:322-331.

Butler, J. S. 2002. The yin and yang of the exosome. Trends Cell Biol. 12:90-96.

Dreyfuss, G., V. N. Kim, and N. Kataoka. 2002. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. Nature Rev Mol. Cell Biol. 3:195-205.

Moore, M. J. 2002. Nuclear RNA turnover. Cell 108:431-434.

Shatkin, A. J., and J. L. Manley. 2000. The ends of the affair: capping and polyadenylation. Nature Struct. Biol. 7:838-842.

Villa, T., J. A. Pleiss, and C. Guthrie. 2002. Spliceosomal snRNAs: Mg(2+)-dependent chemistry at the catalytic core? Cell 109:149-152.

Regulación del procesamiento del pre-mRNA

Black, D. L. 2003. Mechanisms of alternative pre-mRNA splicing. Ann. Rev Biochem. 72:291-336.

Blanc, V., and N. O. Davidson. 2003. C-to-U RNA editing: mechanisms leading to genetic diversity. J. Biol. Chem. 278:1395-1398.

Faustino, N. A., and T. A. Cooper. 2003. Pre-mRNA splicing and human disease. Genes Devel. 17:419-437.

Maas, S., A. Rich, and K. Nishikura. 2003. A-to-I RNA editing: recent news and residual mysteries. J. Biol. Chem. 278:1391-1394.

Maniatis, T., and B. Tasic. 2002. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in merazoans. Nature 418: 236-243.

Transporte de macromoléculas a través de la envoltura nuclear

Chook, Y. M., and G. Blobel. 2001. Karyopherins and nuclear import. Curr. Opin. Struct. Biol. 11:703-715.

Conti, E., and F. Izaurralde.2001. Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. Curr. Opin. Cell Biol. 13:310-319.

Johnson, A. W., E. Lund, and J. Dahlberg.2002. Nuclear export of ribosomal subunits. Trends Biochem Sci. 27:580-585.

Reed, R., and E. Hurt. 2002. A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. Cell 108:523-531.

Ribbeck, K., and D. Gorlich. 2001. Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. Embo. J. 20:1320-1330.

Rout, M. P., and J. D. Aitchison. 2001. The nuclear pore complex as a transport machine. J. Biol. Chem. 276:16593-16596.

Mecanismos citoplasmáticos de control postranscripcional

Ambros, V. 2001. MicroRNAs: tiny regulators with great potential. Cell 107:823-826.

Cerutti, H. 2003. RNA interference: traveling in the cell and gaining functions? Trends Genet. 19:39-46.

Hannon, G. J. 2002. RNA interference. Nature 418:244-251.

Kloc, M., N. R. Zearfoss, and L. D. Etkin. 2002. Mechanisms of subcellular mRNA localization. Cell 108:533-544.

Maquat, L. E., and G. G. Carmichael. 2001. Quality control of mRNA function. Cell 104:173-176.

Mendez, R., and J. D. Richter. 2001. Translational control by CPEB: a means to the end. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2:521-529.

Van Hoof, A., and R. Parker. 2002. Messenger RNA degradation: beginning at the end. Curr. Biol. 12:R285-R287.

Wilkinson, M. F., and A. B. Shyu. 2002. RNA surveillance by nuclear scanning? Nature Cell Biol. 4:E144-E147.

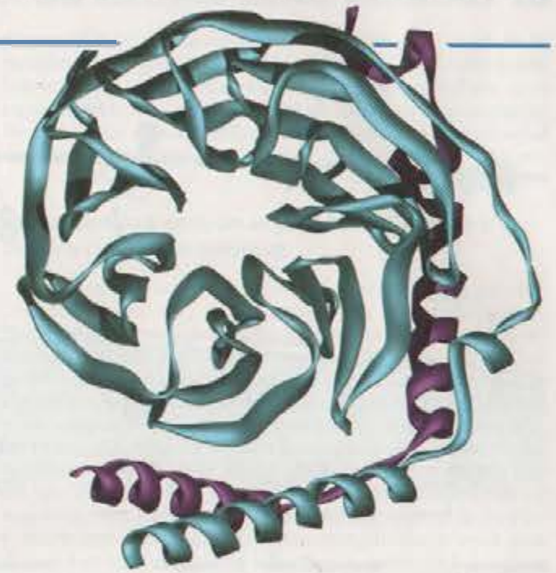
Procesamiento del rRNA y del tRNA

Fatica, A., and D. Tollervey. 2002. Making ribosomes. Curr. Opin. Cell Biol. 14:313-318.

Hopper, A. K., and E. M. Phizicky. 2003. tRNA transfers to the limelight. Genes Devel. 17:162-180.

13

SEÑALIZACIÓN EN LA SUPERFICIE CELULAR



Estructura tridimensional del complejo de la proteína G β (azul) y γ (violeta) obtenida por cristalografía de rayos X.

Ninguna célula vive aislada. En microorganismos eucariontes como levaduras, hongos filamentosos y protozoos, las moléculas segregadas denominadas feromonas coordinan la agregación de células de vida libre para el apareamiento sexual o la diferenciación en determinadas condiciones ambientales. Los factores que determinan el tipo de apareamiento de las levaduras son ejemplos bien comprendidos de la señalización entre las células mediadas por feromonas (cap. 22). En plantas y animales son más importantes las **moléculas de señalización** extracelulares que actúan *dentro* de un organismo para controlar los procesos metabólicos intracelulares, el crecimiento y la diferenciación de tejidos, la síntesis y la secreción de proteínas, así como la composición de los líquidos intracelulares y extracelulares. Las células adyacentes suelen comunicarse por contacto célula-célula directo. Por ejemplo, las uniones en hendidura (tipo gap o uniones comunicantes) en las membranas plasmáticas de células adyacentes les permiten intercambiar moléculas pequeñas y coordinar respuestas metabólicas. Otras uniones entre células adyacentes determinan la forma y la rigidez de muchos tejidos; otras interacciones adhieren las células a la matriz extracelular. Estas interacciones célula-célula y célula-matriz, que se describen en el capítulo 6, también pueden iniciar la señalización intracelular por medio de vías similares a las descritas en este capítulo y en los posteriores.

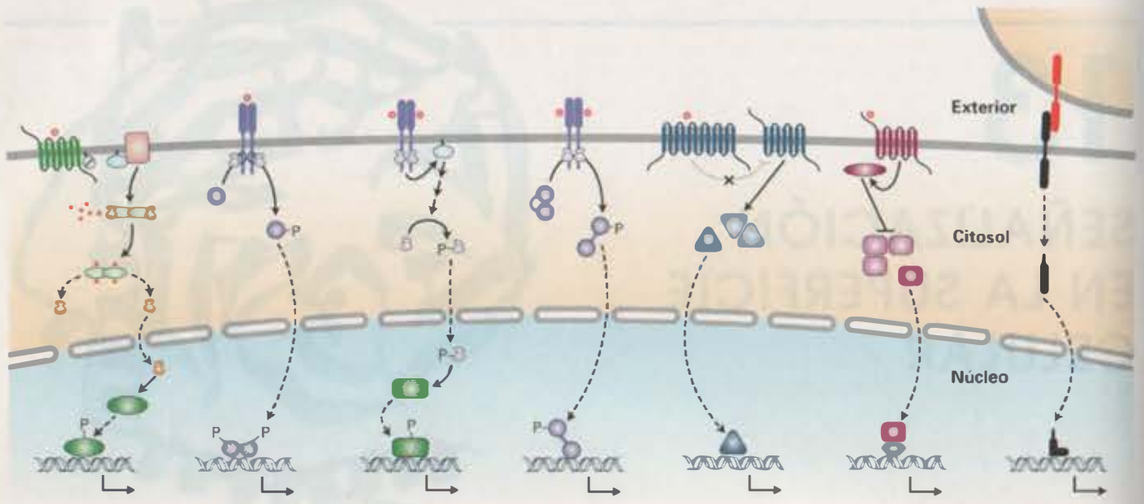
Las moléculas de señalización extracelular se sintetizan y liberan por *células de señalización* y producen una respuesta específica sólo en *células diana* que tienen receptores para las moléculas de señalización. En los organismos multicelulares, en este tipo de comunicación intercelular se utiliza una enorme diversidad de sustancias químicas, que incluyen moléculas pequeñas (p. ej., derivados de aminoácidos o lípidos, acetilcolina), péptidos y proteínas. Algunas moléculas de señalización, en especial moléculas hidrófobas como esteroides, retinoides y tiroxina, se difunden en forma espontánea a través de la membrana plasmática y se fijan a los receptores intracelulares. La señalización proveniente de los receptores intracelulares se describe en el capítulo 11.

En este y en los dos capítulos siguientes, nos centramos en la señalización de un grupo diverso de proteínas receptoras localizadas en la membrana plasmática (fig. 13-1). La molécula de señalización actúa como un **ligando**, que se une a un sitio con estructura complementaria sobre el dominio extracelular del receptor o el que se extiende en la membrana. La unión de un ligando a su receptor causa un cambio conformacional en el dominio citosólico o en los dominios del receptor que por último induce respuestas celulares específicas.

El proceso global de conversión de señales en respuestas celulares, así como los pasos individuales en este proceso, se denomina **transducción de la señal.** Como veremos, las vías de transducción de la señal pueden abarcar relativamente pocos o muchos componentes.

CONTENIDO

13.1 **Moléculas de señalización y receptores de la superficie celular**
13.2 **Transducción intracelular de la señal**
13.3 **Receptores acoplados a la proteína G que activan o inhiben a la adenililciclasa**
13.4 **Receptores acoplados a la proteína G que regulan a los canales iónicos**
13.5 **Receptores acoplados a la proteína G que activan a la fosfolipasa C**
13.6 **Activación de la transcripción génica por receptores acoplados a la proteína G**



Receptores acoplados a la proteína G	Receptores para citocinas	Receptor tirosincinasa	Receptores TGFβ	Receptores Hedgehog (Hh)	Receptores Wnt	Receptor Notch
Ligado a la proteína G trimérica que controla la actividad de una proteína efectora (aquí adenililciclasa)	Asociada con cinasas citosólicas JAK	Dominio citosólico con actividad de tirosincinasa	Dominio citosólico con actividad de serina/treonina cinasa	Ligando Hh adherido a la membrana de la célula de señalización por un anclaje de colesterol	El ligando Wnt palmitoilado se une a un complejo receptor de siete proteínas transmembrana	Ligando, Delta, es una proteína transmembrana en la célula señalizadora
Factores de transcripción citosólicos o nucleares activados por diversas vías (aquí una que comprende la proteincinasa A)	Factores de transcripción STAT citosólicos activados por fosforilación	Cinasas citosólicas activadas (aquí MAP cinasa) que se translocan al núcleo y activan los factores de transcripción nucleares por fosforilación	Factores de transcripción Smad activados en el citosol por fosforilación	Control del procesamiento del factor de transcripción por proteólisis; la unión de Hh causa la liberación del complejo citosólico	Liberación de un factor de transcripción activado a partir de un complejo multiproteico en el citosol	El dominio citosólico de Notch liberado por proteólisis actúa en asociación con factores de transcripción nucleares

▲ Fig. 13-1. Esquema general de las siete clases principales de receptores de la superficie celular descritas en este libro. En diversas vías de señalización, la fijación del ligando a un receptor conduce a la activación de factores de transcripción en el citosol, lo que les permite translocarse al interior del núcleo y estimular (o en ocasiones suprimir) la transcripción de sus genes diana. De manera alternativa, la estimulación del receptor puede llevar a la activación de las proteincinasas citosólicas que luego se translocan al interior del núcleo y regulan la actividad de los factores de transcripción nucleares. Algunos receptores activados, en particular ciertos receptores acoplados a la proteína G, también pueden inducir cambios en la actividad de las proteínas G preexistentes. (De A. H. Brivanlou y J. Darnell, 2002, *Science* 295:813.)

Comenzamos este capítulo con dos secciones que describen los principios generales y las técnicas que son importantes para la mayor parte de los sistemas de señalización. En el resto del capítulo, nos concentramos en la enorme clase de receptores de la superficie celular que activan a las proteínas G triméricas. Los receptores de este tipo, denominados con frecuencia **receptores acoplados a la proteína G (GPCR)**, se encuentran en todas las células eucariontes desde las levaduras hasta los seres humanos. El genoma humano, por ejemplo, codifica varios miles de receptores acoplados a la proteína G. Éstos incluyen los receptores en los sistemas de la vista, del olfato (olor) y del gusto (sabor), muchos receptores para neurotransmisores y la mayoría de los receptores para hormonas que controlan el metabolismo de los hidratos de carbono, los aminoácidos y las grasas.

13.1 Moléculas de señalización y receptores de la superficie celular

La comunicación mediante señales extracelulares suele abarcar los pasos siguientes: 1) la síntesis y 2) la liberación de la molécula de señalización mediante la célula de señalización; 3) el transporte de la señal a la célula diana; 4) la fijación de la señal mediante un receptor proteico específico que conduce a su activación; 5) la iniciación de una o más vías de transducción de la señal intracelular por el receptor activado; 6) cambios específicos en la función, el metabolismo o el desarrollo celular; y 7) la eliminación de la señal, que a menudo finaliza la respuesta celular (véase fig. 13-1). La enorme mayoría de los receptores es activada mediante la fijación de moléculas segregadas o unidas a la membrana (p. ej., hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores y feromonas).

Sin embargo, algunos receptores son activados por cambios en la concentración de un metabolito (p. ej., oxígeno o nutrientes) o por estímulos físicos (p. ej., luz, tacto, calor). Por ejemplo, en *E. coli* los receptores en la membrana de la superficie celular activan las vías de señalización que ayudan a la célula a responder a cambios de fosfato y otros nutrientes en el medio externo (véase fig. 4-18).

Las moléculas de señalización en los animales operan en distancias diversas

En los animales, la señalización mediante moléculas extracelulares solubles pueden clasificarse en tres tipos –endocrina, paracrina o autocrina– sobre la base de la distancia en la que actúa la señal. Además, ciertas proteínas fijadas a la membrana actúan como señales.

En la señalización endocrina, las moléculas de señalización, denominadas hormonas, actúan sobre células diana distantes de sus sitios de síntesis por células de diversos órganos endocrinos. En los animales, una hormona endocrina suele ser transportada por la sangre o por otros líquidos extracelulares desde su sitio de liberación hasta su sitio diana.

En la señalización paracrina, las moléculas de señalización liberadas por una célula afectan a las células diana sólo cuando se encuentran muy próximas. La conducción de una señal por un neurotransmisor de una célula nerviosa a otra o desde una célula nerviosa a una célula muscular (que induce o inhibe la contracción muscular) se produce por señalización paracrina (cap. 7). Muchos factores de crecimiento que regulan el desarrollo en organismos multicelulares también actúan a corta distancia. Algunas de estas moléculas se fijan de manera muy firme a la matriz extracelular, incapaces de actuar como señal, pero con posterioridad pueden ser liberadas en forma activa. Muchas señales importantes en el desarrollo se difunden desde la célula de señalización, forman un gradiente de concentración e inducen varias respuestas celulares de acuerdo con su concentración en una célula diana particular (cap. 15).

En la señalización autocrina, las células responden a sustancias que ellas mismas liberan. Algunos factores de crecimiento actúan de este modo y las células cultivadas suelen segregar factores de crecimiento que estimulan su propio crecimiento y proliferación. Este tipo de señalización es muy común en las células tumorales, muchas de las cuales producen y liberan un exceso de factores de crecimiento que estimulan su propia proliferación no regulada e inadecuada, así como la de las células no tumorales adyacentes; este proceso puede conducir a la formación de masas tumorales.

Las moléculas de señalización que son proteínas integrales de membrana localizadas en la superficie celular también desempeñan un papel importante en el desarrollo. En algunos casos, como en las señales unidas a la membrana de una célula, une receptores en la superficie de una célula diana adyacente para activar su diferenciación. En otros casos, el corte proteolítico de una proteína de señalización unida a la membrana libera la región exoplasmática, la que funciona como una proteína de señalización soluble.

Algunas moléculas de señalización actúan tanto a corta como a larga distancia. Por ejemplo, la adrenalina funciona como un neurotransmisor (señalización paracrina) y como una hormona sistémica (señalización endocrina). Otro ejemplo es el factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*, EGF), sintetizado como una proteína integral de la membrana plasmática. El EGF unido a la membrana puede fijarse a una célula adyacente y actuar como señal por contacto directo. El corte por acción de una proteasa extracelular libera una forma soluble de EGF, que actúa como señal de manera autocrina o paracrina.

Los receptores activan una cantidad limitada de vías de señalización

La cantidad de receptores y vías de señalización que describimos en este libro al comienzo parece abrumadora. Además, la terminología para la designación de las vías puede ser confusa. Las vías suelen denominarse sobre la base de la clase general de receptor involucrado (p. ej., GPCR, receptor tirosincinasas), el tipo de ligando (p. ej., TGFβ, Wnt, Hedgehog) o un componente clave de la transducción de señal intracelular (p. ej., NF-κB). En algunos casos, la misma vía puede denominarse con nombres diferentes. Felizmente, a medida que los investigadores describen los detalles moleculares de más y más receptores y vías, comienzan a emerger algunos principios y mecanismos. Estas características compartidas pueden ayudarnos a esclarecer la nueva información acerca de la señalización intercelular.

Primero, las señales externas inducen dos tipos principales de respuestas celulares: 1) cambios en la actividad o función de las proteínas específicas preexistentes y 2) cambios en las cantidades de proteínas específicas producidas por una célula, con más frecuencia como resultado de la modificación de factores de transcripción que conduce a la activación o la represión de la transcripción génica. En general, el primer tipo de respuesta aparece con más rapidez que el segundo. La señalización proveniente de receptores acoplados a la proteína G, descrita en secciones posteriores, a menudo produce cambios en la actividad de proteínas preexistentes, si bien la activación de estos receptores en algunas células también puede inducir cambios en la expresión génica.

Las otras clases de receptores representadas en la figura 13-1 operan sobre todo como moduladoras de la expresión génica. En algunos casos, el receptor activado estimula en forma directa un factor de transcripción en el citosol (p. ej., vías del receptor TGFβ y citocina) o ensambla un complejo de señalización intracelular que activa un factor de transcripción citosólico (p. ej., vías Wnt). En otras vías, el corte proteolítico específico de un receptor de la superficie celular activado o proteína citosólica libera un factor de transcripción (p. ej., vías Hedgehog, Notch y NF-κB). Los factores de transcripción activados en el citosol por estas vías se movilizan al interior del núcleo, donde estimulan (o en ocasiones inhiben) la transcripción de genes diana específicos. La señalización proveniente del receptor tirosincinasa conduce a la activación de diversas proteínas cinasas citosólicas que se translocan al núcleo y regulan la actividad de factores de transcripción nucleares. En los dos capítulos siguientes consideramos estas vías de señalización, que regulan la transcripción de muchos genes esenciales para la división celular y para muchos procesos de diferenciación celular.

Segundo, algunas clases de receptores pueden iniciar la señalización por más de una vía de transducción de la señal intracelular, que conduce a respuestas celulares diferentes. Esta complicación es típica de los receptores acoplados a la proteína G, del receptor para tirosincinasas y de los receptores para citocina.

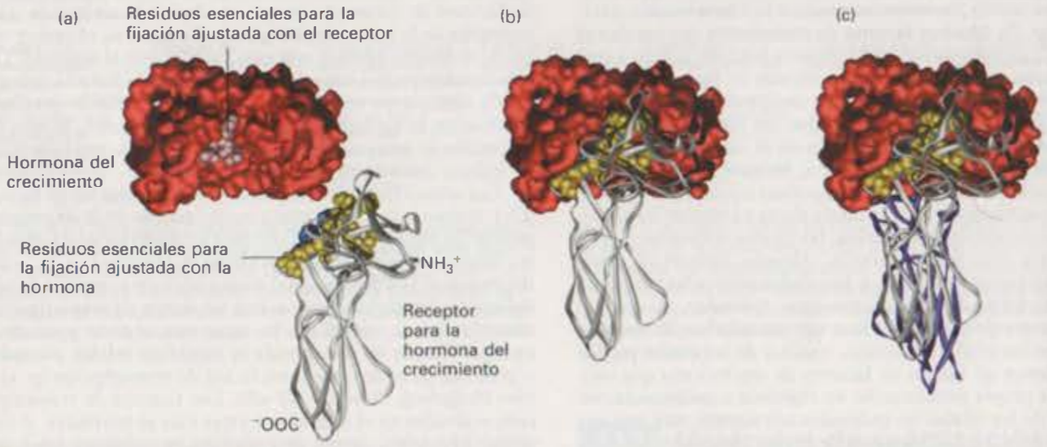
Tercero, a pesar de la gran cantidad de clases diferentes de ligandos y sus receptores específicos, una cantidad relativamente pequeña de mecanismos de transducción de la señal y proteínas intracelulares altamente conservadas desempeñan un papel fundamental en las vías de señalización intracelular. Nuestro conocimiento de estos temas comunes avanzó mucho en los últimos años. Por ejemplo, podemos trazar la vía de señalización completa desde la fijación del ligando a los receptores en varias clases para la respuesta celular final.

Antes de profundizar en los detalles de vías de señalización individuales, nos referiremos a las propiedades básicas de los receptores de la superficie celular, así como a los métodos para su identificación y estudio, en el resto de esta sección; las características generales importantes de la transducción de señales intracelulares se presentan en la sección 13.2.

Las proteínas receptoras muestran especificidad de unión del ligando y de efector

La respuesta de una célula o un tejido a señales externas específicas está determinada por los receptores particulares que posee, por las vías de transducción de señal que ellos activan y por los procesos intracelulares afectados por último. Por lo general, cada receptor se fija sólo a una molécula de señalización individual o a un grupo de moléculas muy estrechamente relacionadas (fig. 13-2). Por el contrario, muchas moléculas de señalización se fijan a múltiples tipos de receptores, cada uno de los cuales activa vías de señalización intracelulares diferentes y por eso induce respuestas celulares distintas. Por ejemplo, los tipos diferentes de receptores de acetilcolina se encuentran en la superficie de las células del músculo estriado, las células del músculo cardíaco y las células acinares pancreáticas. La liberación de acetilcolina a partir de la neurona adyacente a una célula del músculo estriado activa la contracción mediante la activación del canal iónico regulada por el ligando, mientras que la liberación adyacente en el músculo cardíaco enlentece la frecuencia de contracción por medio de la activación del receptor acoplado a la proteína G. La liberación adyacente a una célula del ácino pancreático activa la exocitosis de los gránulos secretorios que contienen enzimas digestivas. De manera similar, la adrenalina se fija a diversos receptores acoplados a la proteína G diferentes, cada uno de los cuales mduce una respuesta celular distinta. Así, cada receptor proteico está caracterizado por la *especificidad de fijación* para un ligando particular y el complejo resultante receptor-ligando exhibe *especificidad de efector* (es decir, media una respuesta celular específica).

Por otra parte, receptores diferentes de la misma clase que se fijan a ligandos distintos a menudo inducen las mismas respuestas celulares en una célula. En los hepatocitos, por ejemplo, las hormonas adrenalina, glucagón y ACTH se fijan a miembros diferentes de la familia de receptores acoplados a



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 13-2 Los estudios mutacionales identificaron los sitios de la hormona del crecimiento y su receptor que contienen aminoácidos que determinan su interacción altamente específica. La superficie externa de la membrana plasmática está hacia la parte inferior de la figura y cada receptor está anclado a la membrana por una extensión hélice alfa hidrófoba que no se muestra. Como surge de la estructura tridimensional del complejo hormona del crecimiento-receptor de la hormona del crecimiento, 28 aminoácidos en la hormona están en la interfaz de unión con un receptor. Cada uno de estos aminoácidos fueron mutados, de a uno por vez, a alanina y se determinó el efecto en la unión al receptor. (a) De este estudio surge que sólo ocho aminoácidos en la hormona del crecimiento (rosa) contribuyen al 85% de la energía de unión: estos aminoácidos están distantes en la secuencia primaria, pero adyacentes en la proteína plegada. Estudios similares mostraron que dos residuos triptófano (azul) del receptor contribuyen a la mayor parte de la energía para la unión de la hormona del crecimiento, si bien otros aminoácidos en la interfaz con la hormona (amarillo) también son importantes. (b) La fijación de la hormona del crecimiento a una molécula receptora es seguida por (c) la unión de un segundo receptor en el lado opuesto de la hormona; esto involucra el mismo conjunto de aminoácidos amarillo y azul sobre el receptor, pero diferentes residuos sobre la hormona. Como veremos en el capítulo siguiente, esta quimerización del receptor inducida por la hormona es un mecanismo común para la activación de receptores. (De B. Cunningham y J. Wells, 1993, *J. Mol. Biol.* 234:554 y T. Clackson y J. Wells, 1995, *Science* 267:383.)

la proteína G, si bien todos estos receptores activan la misma vía de transducción de la señal, que estimula la síntesis de **AMP cíclico (cAMP)**. A su vez, esta molécula de señalización pequeña regula diversas funciones metabólicas, que incluyen la degradación del glucógeno. Como resultado, las tres hormonas tienen el mismo efecto en el metabolismo de la célula hepática.

La respuesta celular máxima para una molécula de señalización puede no requerir la activación de todos los receptores

Como hemos visto, la activación de un receptor de superficie celular y la posterior transducción de la señal son desencadenadas por la unión de una molécula de señalización (ligando) al receptor. Esta unión depende de fuerzas no covalentes débiles (es decir, interacciones iónicas, de van der Waals e hidrófobas) y complementaridad molecular entre las superficies de interacción del receptor y del ligando (cap. 2). La especificidad de un receptor se refiere a la capacidad para distinguir sustancias estrechamente relacionadas. Por ejemplo, el receptor de insulina une a la insulina y a una hormona relacionada denominada factor de crecimiento 1 similar a la insulina, pero no a otras hormonas peptídicas.

Por lo general, la unión del ligando puede verse como una reacción simple reversible,

$$R + L \underset{k_{off}}{\overset{k_{on}}{\rightleftharpoons}} RL$$

que puede describirse por la ecuación

$$K_d = \frac{[R]\,[L]}{[RL]} \qquad (13\text{-}1)$$

donde [R] y [L] son las concentraciones del receptor y del ligando libre, respectivamente, en equilibrio y [RL] es la concentración del complejo receptor-ligando. K_d, la constante de disociación del complejo receptor-ligando, mide la *afinidad* del receptor por el ligando. Esta ecuación de equilibrio de unión puede escribirse como

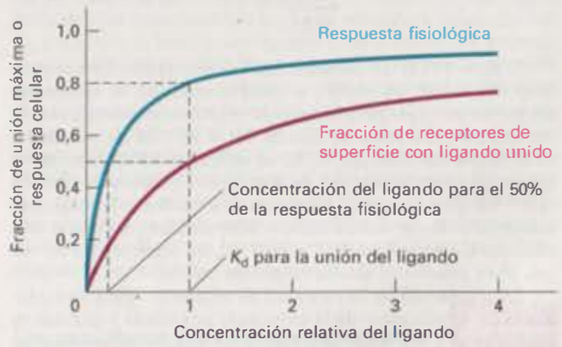
$$\frac{[RL]}{R_T} = \frac{1}{1 + \dfrac{K_d}{[L]}} \qquad (13\text{-}2)$$

donde $R_T = [R] + [RL]$, la concentración total de receptores libres y unidos; por consiguiente, $[RL]/R_T$ es la fracción de receptores que tienen un ligando unido. Cuanto menor es el valor de K_d, mayor es la afinidad de un receptor por su ligando. El valor de K_d es equivalente a la concentración del ligando en la cual la mitad de los receptores contienen el ligando fijado. Si $[L] = K_d$, entonces de la ecuación 13-2 podemos ver que $[RL] = 0{,}5\ R_T$. La ecuación 13-2 tiene la misma forma general que la ecuación de Michaelis-Menten, la cual describe reacciones enzimáticas simples de un sustrato (cap. 3). La K_d para una reacción de unión es equivalente a la constante de Michaelis K_m, que refleja la afinidad de una enzima por su sustrato.

Aplicada a una reacción de unión simple, $K_d = k_{off}/k_{on}$, donde k_{off} es la constante de velocidad para la disociación de un ligando desde su receptor y k_{on} es la constante de velocidad para la formación de un complejo receptor-ligando a partir del ligando y del receptor libre. Cuanto más baja k_{off} en relación con k_{on}, más estable el complejo RL y, por lo tanto, más bajo el valor de K_d. Sin embargo, a semejanza de todas las constantes de equilibrio, el valor de K_d no depende de los valores *absolutos* de k_{off} y k_{on}, sólo de su relación. Por esta razón, la fijación del ligando por dos receptores diferentes puede tener los mismos valores de K_d, pero muy diferentes constantes de velocidad.

En general, el valor de K_d de un receptor de superficie celular para una hormona circulante es mayor que el nivel sanguíneo normal (no estimulado) de esa hormona. En estas circunstancias, los cambios en la concentración de la hormona se reflejan en cambios proporcionales en la fracción de receptores ocupados. Supongamos, por ejemplo, que la concentración normal de una hormona en la sangre es 10^{-9} M y que la K_d para su receptor es 10^{-7} M; mediante la sustitución de estos valores en la ecuación 13-2 podemos calcular que la fracción de receptores con hormona fijada, $[RL]/R_T$, en equilibrio es 0,0099. Por lo tanto, cerca del 1% de los receptores totales estará ocupado con la hormona. Si la concentración de la hormona se eleva diez veces a 10^{-8} M, la concentración del complejo receptor-hormona se elevará en forma proporcional, de modo que cerca del 10% del total de receptores debiera tener unida la hormona. Si la magnitud de la respuesta celular inducida sigue un paralelismo con la cantidad de RL, como a menudo es el caso, entonces las respuestas celulares también se incrementarán diez veces.

Sin embargo, muchas veces la respuesta celular máxima para un ligando particular se induce cuando menos del 100% de sus receptores están unidos al ligando. Este fenómeno puede revelarse mediante la determinación de la magnitud de la respuesta y de la fijación receptor-ligando a diferentes concentraciones de ligando (fig. 13-3). Por ejemplo, una célula



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 13-3 La respuesta fisiológica máxima para muchas señales externas se produce sólo cuando una fracción de las moléculas de receptor está ocupada por el ligando. En esta situación, los gráficos de la magnitud de la unión del ligando y de la respuesta fisiológica en concentraciones diferentes de ligando son distintos. En el ejemplo mostrado aquí, el 50% de la respuesta fisiológica máxima es inducida en una concentración de ligando en la cual sólo el 18% de los receptores están ocupados. Asimismo, el 80% de la respuesta máxima es inducida cuando la concentración del ligando iguala el valor de K_d, en la cual el 50% de los receptores está ocupado.

progenitora eritroide tiene cerca de 1.000 receptores de superficie para la eritropoyetina, la cual induce la proliferación de las células progenitoras y su diferenciación en glóbulos rojos. Dado que sólo 100 de estos receptores necesitan unir eritropoyetina para inducir la división de una célula diana, la concentración del ligando necesario para inducir el 50% de la respuesta máxima celular es proporcionalmente más bajo que el valor K_d para la fijación. En estos casos, un gráfico del porcentaje de la unión máxima en comparación con la concentración del ligando difiere de un gráfico del porcentaje de respuesta celular máxima comparado con la concentración del ligando.

La sensibilidad de una célula a las señales externas está determinada por la cantidad de receptores de superficie

Como la respuesta celular para una molécula de señalización particular depende de la cantidad de complejo receptor-ligando, cuanto menos receptores estén presentes en la superficie de una célula, menos *sensible* es la célula para ese ligando. Como consecuencia, es necesaria una concentración mayor de ligando para inducir la respuesta fisiológica habitual que podría ser el caso si más receptores estuvieran presentes.

Para ilustrar este importante punto, ampliaremos el ejemplo de una célula progenitora eritroide típica. La K_d para la fijación de eritropoyetina (Epo) a su receptor es de alrededor de 10^{-10} M. Como ya dijimos, sólo el 10% de los casi 1.000 receptores de la superficie celular para eritropoyetina sobre la superficie de una célula debe estar unido al ligando para inducir la respuesta celular máxima. Podemos determinar la concentración del ligando, [L], necesaria para inducir la respuesta máxima mediante la ecuación 13-2 como sigue:

$$[L] = \frac{K_d}{\frac{R_T}{[RL]} - 1} \qquad (13\text{-}3)$$

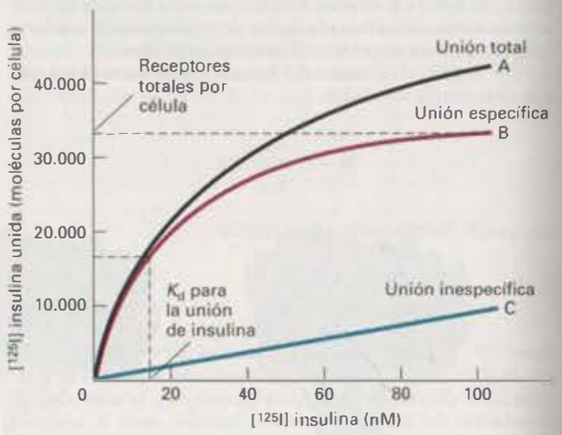
Si R_T = 1.000 (la cantidad total de receptores Epo por célula), $K_d = 10^{-10}$ M y [RL] = 100 (la cantidad de receptores ocupados por Epo para inducir la respuesta máxima), entonces una concentración de Epo de $1{,}1 \times 10^{-11}$ M desencadenará la respuesta máxima. Si R_T se reduce a 200/célula, se requiere una concentración de Epo nueve veces más elevada (10^{-10} M) para ocupar 100 receptores e inducir la respuesta máxima. Si R_T se reduce más, a 120/célula, es necesaria una concentración de Epo de 5×10^{-10} M, un aumento de 50 veces, para generar la misma respuesta celular.

La regulación de la cantidad de receptores para una molécula de señalización dada expresada por célula y por eso su sensibilidad a esa señal desempeña un papel fundamental en la dirección de acontecimientos fisiológicos y del desarrollo. De manera alternativa, la endocitosis de receptores en la superficie celular puede reducir lo suficiente la cantidad presente para finalizar la respuesta celular habitual en la concentración de la señal imperante.

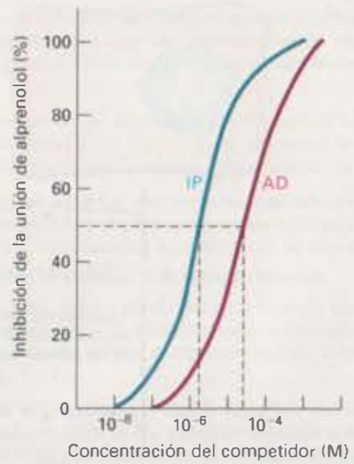
Los ensayos de fijación se utilizan para detectar receptores y determinar sus valores de K_d

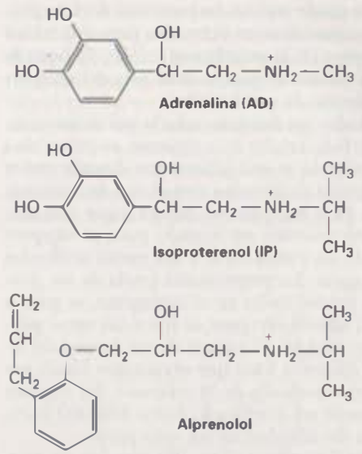
Los receptores de la superficie celular son difíciles de identificar y purificar, sobre todo porque están presentes en cantidades diminutas. El receptor para una molécula de señalización particular suele estar constituido sólo por alrededor de 10^{-6} de la proteína total en la célula, o 10^{-4} de la proteína de la membrana plasmática. La purificación también es difícil ya que estas proteínas integrales de la membrana deben ser solubilizadas primero con detergente no iónico de modo que puedan ser separadas a partir de otras proteínas (véase fig. 5-40).

De manera habitual, los receptores son detectados y medidos por su capacidad para fijar ligandos radiactivos a las células o a fragmentos de células. Los resultados de este *ensayo de fijación* se ilustran y explican en la figura 13-4. Tanto la cantidad de sitios de unión de ligando por célula como el valor de K_d se determinan con facilidad a partir de la curva de unión específica (fig. 13-4, curva B), que se describe por la ecuación 13-2. Dado que cada receptor suele unir sólo una molécula ligando, la cantidad de sitios de unión de ligando iguala la cantidad de receptores activos por célula. Los ensayos de unión categóricos como el de la figura 13-4 son factibles con receptores que tienen fuerte afinidad por sus ligandos, como el receptor de eritropoyetina ($K_d = 1 \times 10^{-10}$ M) y el receptor para insulina en el hepatocito ($K_d = 1{,}4 \times 10^{-8}$ M).



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 13-4 Los ensayos de unión para los receptores de superficie celular pueden determinar la K_d para los ligandos de alta afinidad y la cantidad de receptores por célula. Se muestran los datos para los receptores de insulina específicos en la superficie de los hepatocitos. Una suspensión de células se incuba durante 1 hora a 4° C con concentraciones crecientes de insulina marcada con ^{125}I; la temperatura baja se utiliza para prevenir la endocitosis de los receptores de la superficie celular. Las células se separan de la insulina no fijada, por lo general por centrifugación y se mide la cantidad de radiactividad unida a ellas. La curva de unión total A representa la insulina unida de manera específica a los receptores de alta afinidad, así como la insulina unida en forma inespecífica con baja afinidad a otras moléculas sobre la superficie celular. Se determina la contribución de la unión inespecífica a la unión total mediante la repetición del ensayo de fijación en presencia de un exceso de 100 veces de insulina no marcada, que satura todos los sitios de alta afinidad específicos. En este caso, toda la insulina unida se fija a los sitios inespecíficos, que resulta en la curva C. La curva B de unión específica se calcula como la diferencia entre las curvas A y C. A partir de la curva B, se puede determinar la K_d para la unión de la insulina ($\approx 1{,}4 \times 10^{-8}$ M, o 14 nM) y la cantidad de moléculas receptoras por célula (≈33.000). (Adaptado de A. Ciechanover et al., 1983, *Cell* 32:267.)





▲ FIGURA EXPERIMENTAL 13-5 La unión de ligandos de baja afinidad a los receptores de la superficie celular puede detectarse en ensayos de competición. En este ejemplo, el ligando sintético alprenolol, que se une con alta afinidad al receptor para adrenalina en los hepatocitos ($K_d = 3 \times 10^{-9}$ M), se utiliza para detectar la unión de dos ligandos de baja afinidad, la hormona adrenalina (AD) natural y un ligando sintético denominado isoproterenol (IP). Los ensayos se realizaron como se describió en la figura 13-4, pero con una cantidad constante de [^{3}H]alprenolol a la cual se agregan cantidades crecientes de adrenalina o isoproterenol no marcados. Para cada concentración del competidor, se determina la cantidad de alprenolol unido, no marcado. En un gráfico de inhibición de la unión del [^{3}H]alprenolol en comparación con la concentración de adrenalina o isoproterenol, como se muestra aquí, la concentración del competidor que inhibe la unión de alprenolol se aproxima al 50% del valor de K_d para la unión del competidor. Nótese que las concentraciones de los competidores se grafican en una escala logarítmica. La K_d para la unión de adrenalina a su receptor en los hepatocitos es sólo $\approx 5 \times 10^{-5}$ M y no podría ser medida por un ensayo directo de fijación con [^{3}H]adrenalina. La K_d para la unión del isoproterenol, que induce la respuesta celular normal, es más de 10 veces más baja.

Sin embargo, numerosos ligandos se fijan a sus receptores con afinidad mucho más baja. Si la K_d para la fijación es mayor de $\approx 1 \times 10^{-7}$ M, es probable que cualquier ligando fijado a los receptores se disocie en los pocos segundos que insume separar las células (p. ej., por centrifugación) del ligando libre (no fijado) y medir la cantidad del ligando fijado. Una manera de detectar la fijación débil de un ligando a su receptor es en un *ensayo de competición* con otro ligando que se fija al mismo receptor con alta afinidad (valor de K_d bajo). En este tipo de ensayo, se agregan cantidades crecientes de un ligando de baja afinidad (competidor) no marcado a una muestra de células con una cantidad constante de ligando de alta afinidad radiomarcado (fig. 13-5). La unión de un competidor no marcado bloquea la unión del ligando radiactivo al receptor; la concentración de competidor requerida para inhibir la unión de la mitad del ligando radiactivo se aproxima al valor de K_d para la unión del competidor al receptor.

MEDICINA

Los análogos sintéticos de las hormonas naturales son muy utilizados en la investigación de receptores de la superficie celular y como fármacos. Estos análogos pertenecen en dos clases: agonistas, que imitan la función de una hormona natural por la unión a su receptor y la inducción de la respuesta normal y antagonistas, que se unen al receptor, pero no inducen respuesta. Mediante la ocupación de sitios de unión de ligandos en un receptor, un antagonista puede bloquear la unión de la hormona natural (o agonista) y por eso reduce la actividad fisiológica habitual de la hormona.

Por ejemplo, el agregado de dos grupos metilo a la adrenalina genera isoproterenol, un agonista que se fija a los receptores para adrenalina sobre las células del músculo liso bronquial cerca de diez veces más fuerte que la adrenalina (véase fig. 13-5). Dado que la fijación del ligando a estos receptores estimula la relajación del músculo liso bronquial y por esto la apertura de las vías aéreas a los pulmones, el isoproterenol se utiliza en el tratamiento del asma bronquial, la bronquitis crónica y el enfisema. La activación de los receptores para adrenalina en las células del músculo cardíaco incrementa la frecuencia de contracción. El antagonista alprenolol y los compuestos relacionados, referidos como *betabloqueantes*, tienen una afinidad muy alta para estos receptores para adrenalina. Estos antagonistas se utilizan para disminuir las contracciones cardíacas en el tratamiento de las arritmias cardíacas y la angina de pecho. ▮

Los receptores pueden ser purificados por técnicas de afinidad o expresados a partir de genes clonados

Los receptores de la superficie celular a menudo pueden ser identificados y seguidos mediante procedimientos de aislamiento por *marcación de afinidad*. En esta técnica, las células se mezclan con un exceso de un ligando radiomarcado para el receptor de interés. Después de eliminar el ligando no fijado por lavado, las células se tratan con un agente químico que forma enlaces cruzados covalentes con las moléculas del ligando marcado y los receptores en la superficie celular. Una vez que el ligando radiomarcado forma los enlaces cruzados covalentes con

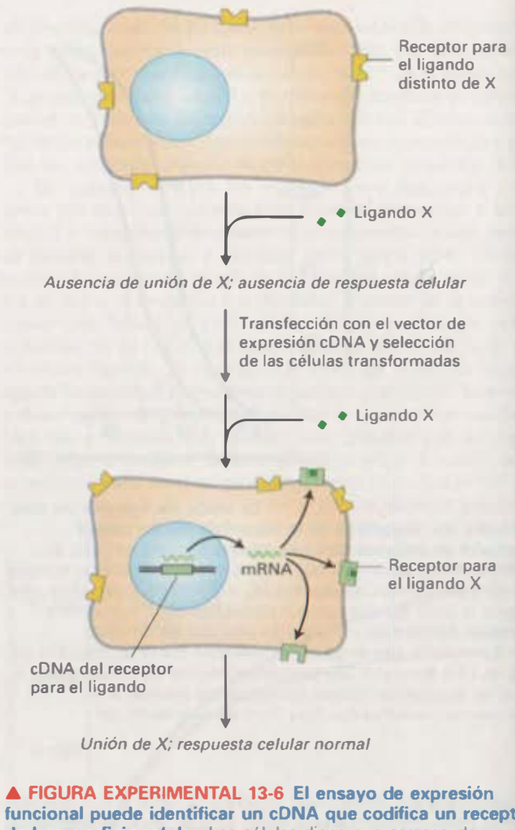
su receptor, permanece unido incluso en presencia de detergentes y otros agentes desnaturalizantes utilizados para solubilizar las proteínas del receptor de la membrana celular. El ligando marcado proporciona un medio para la detección del receptor durante los procedimientos de purificación.

Otra técnica utilizada con frecuencia en la purificación de receptores de la superficie celular que retienen su capacidad de unión al ligando cuando se solubilizan con detergentes es similar a la *cromatografía de afinidad* con el uso de anticuerpos (véase fig. 3-34). Para purificar un receptor por esta técnica, se pega en forma química un ligando para el receptor de interés, en lugar de un anticuerpo, a las perlas utilizadas para formar una columna. La preparación cruda de las proteínas de membrana, solubilizadas en el detergente, se pasa a través de la columna; sólo el receptor se fija y las otras proteínas se eliminan por lavado. El pasaje de un exceso del ligando soluble por la columna hace que el receptor fijado sea desplazado de las perlas y eluido de la columna. En algunos casos, un receptor puede ser purificado hasta 100.000 veces en una cromatografía de afinidad en un solo paso.

Una vez purificado el receptor, es posible estudiar sus propiedades y los genes pueden clonarse. Un *ensayo de expresión funcional* del cDNA clonado en una célula de mamíferos, que de modo normal carece del receptor codificado, puede proporcionar una prueba definitiva de que se obtuvo esa proteína adecuada (fig. 13-6). Estos ensayos de expresión también les permiten a los investigadores estudiar los efectos de mutaciones de aminoácidos específicos en la fijación del ligando o en la transducción de la señal corriente abajo, lo que, en consecuencia, señala los aminoácidos del receptor responsables de la interacción con el ligando o con las proteínas fundamentales de la transducción de la señal.

Los receptores de la superficie celular para muchas moléculas de señalización están presentes en cantidades tan pequeñas que no pueden ser purificados por cromatografía de afinidad y otras técnicas bioquímicas convencionales. En la actualidad, estas proteínas del receptor de abundancia baja pueden identificarse y clonarse mediante diversas técnicas del DNA recombinante, lo que elimina la necesidad de aislarlas y purificarlas a partir de extractos celulares. En una técnica, los cDNA clonados, preparados del mRNA completo extraído de las células que producen el receptor, son insertados en vectores de expresión por las técnicas descritas en el capítulo 9. Luego, los vectores recombinantes son transfectados en células que normalmente no sintetizan el receptor de interés, como se muestra en la figura 13-6. Sólo lo sintetizan las células muy poco transfectadas que contienen el cDNA que codifica el receptor deseado; otras células transfectadas producen proteínas irrelevantes. Las escasas células que expresan el receptor deseado pueden detectarse y purificarse por diversas técnicas, como el clasificador celular activado por fluorescencia que utiliza un ligando marcado con fluorescencia para el receptor de interés (véase fig. 5-34). Una vez que se identifica un clon de cDNA que codifica el receptor puede determinarse la secuencia del cDNA y se deduce la proteína del receptor a partir de la secuencia del cDNA.

En la actualidad, se utilizan los estudios genómicos junto con los ensayos de expresión funcional para identificar los genes de receptores, antes desconocidos. En este enfoque, se analizan las secuencias de DNA almacenadas para evaluar las similitudes con secuencias que se sabe que codifican proteínas del receptor (cap. 9). Luego, todos los genes putativos para receptores que se identifican en una búsqueda pueden probarse para determinar su capacidad de fijarse a una molécula de señalización o inducir una respuesta en cultivos celulares mediante un ensayo de expresión funcional.



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 13-6 El ensayo de expresión funcional puede identificar un cDNA que codifica un receptor de la superficie celular.** Las células diana que carecen de receptores para un ligando (X) particular son transfectadas en forma estable con un cDNA del vector de expresión que codifica el receptor. El diseño del vector de expresión permite la selección de células transformadas de las que no incorporan el vector en sus genomas (véase fig. 9-29b). Siempre que estas células ya expresen la totalidad de las proteínas importantes de transducción de señales, las células transfectadas exhiben la respuesta celular normal para X si el cDNA en realidad codifica el receptor funcional.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 13.1

Moléculas de señalización y receptores de la superficie celular

- Las moléculas de señalización extracelulares regulan las interacciones entre los organismos unicelulares y son reguladores fundamentales de la fisiología y desarrollo en los organismos multicelulares.
- La unión de moléculas de señalización extracelulares en los receptores de superficie celular activa la vía de transducción de la señal intracelular que por último modula el metabolismo celular, la función o la expresión génica (fig. 13-1).
- Las señales externas incluyen las proteínas y los péptidos anclados en la membrana y segregadas, y moléculas lipofílicas pequeñas (p. ej., hormonas esteroides, tiroxina), moléculas hidrófilas pequeñas derivadas de aminoácidos (p. ej., adrenalina), gases (p. ej., óxido nítrico) y estímulos físicos (p. ej., luz).
- Las señales provenientes de una célula pueden actuar sobre células cercanas (paracrina), sobre células distantes (endocrina) o en la señalización de la misma célula (autocrina).
- Los receptores unen ligandos con especificidad considerable, que está determinada por interacciones no covalentes entre un ligando y los aminoácidos específicos en la proteína del receptor (véase fig. 13-2).
- La respuesta máxima de una célula para un ligando particular por lo general sucede con concentraciones del ligando en las cuales la mayoría de sus receptores aún no están ocupados (véase fig. 13-3).
- La concentración del ligando a la cual la mitad de sus receptores está ocupada, es decir la K_d, puede determinarse en forma experimental y es una medida de la afinidad del receptor por el ligando (véase fig. 13-4).
- Debido a que la cantidad de un receptor particular expresado suele ser bastante baja (varía de 2.000 a 20.000 moléculas por célula), la purificación bioquímica puede no ser factible. Los genes que codifican receptores de abundancia baja para ligandos específicos a menudo pueden aislarse a partir de genotecas de cDNA transfectado en cultivos celulares.
- Los ensayos de expresión funcional pueden determinar si un cDNA codifica un receptor particular y son útiles para el estudio de los efectos en la función del receptor de mutaciones específicas en su secuencia (véase fig. 13-6).

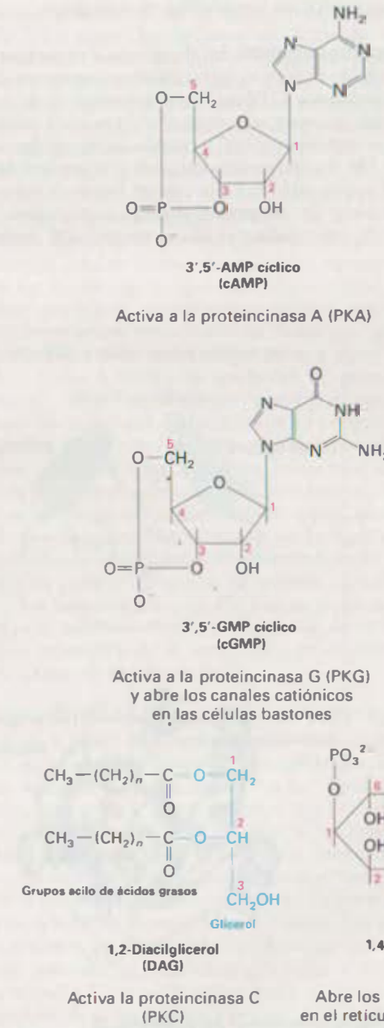
13.2 Transducción intracelular de la señal

Las diversas vías intracelulares que transducen señales corriente abajo desde los receptores de la superficie celular activados difieren en su complejidad y en el modo como transducen las señales. Los componentes y el funcionamiento de muchas vías individuales las describimos en este capítulo y en otros. Algunos principios generales de la transducción de la señal, aplicable a diferentes vías, se tratan en esta sección.

Los segundos mensajeros transportan señales provenientes de muchos receptores

La fijación de ligandos ("primeros mensajeros") a muchos receptores de la superficie celular conduce a un aumento (o disminución) de corta duración en la concentración de ciertas moléculas de señalización intracelular de peso molecular bajo denominados segundos mensajeros. Estas moléculas incluyen 3',5'-AMP cíclico (cAMP), 3',5' GMP cíclico (cGMP), 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), cuyas estructuras se muestran en la figura 13-7. Otros segundos mensajeros importantes son Ca^{2+} y diversos inositol fosfolípidos, también denominados *fosfoinosítidos*, incluidos en las membranas celulares.

La concentración intracelular elevada de uno o más segundos mensajeros después de la unión de una molécula de señalización externa induce una alteración rápida en la actividad de una o más enzimas o proteínas no enzimáticas. En el músculo, una elevación inducida por la señal en el Ca^{2+} citosólico activa la contracción (véase fig. 19-28); un incremento similar en el Ca^{2+} induce la exocitosis de vesículas secretoras en las células endocrinas y de vesículas que contienen neurotransmisores en las células nerviosas (véase fig. 7-43). De manera similar, una elevación en el cAMP induce diversos cambios en el metabolismo celular que difiere en los distintos tipos de células humanas. El modo de acción del



▲ **Fig. 13-7. Cuatro segundos mensajeros intracelulares habituales.** El efecto o los efectos directos de cada compuesto están indicados debajo de su fórmula estructural. El calcio iónico (Ca^{2+}) y los diversos fosfoinosítidos fijados a la membrana también actúan como segundos mensajeros.

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación focalizada: Segundos mensajeros en las vías de señalización

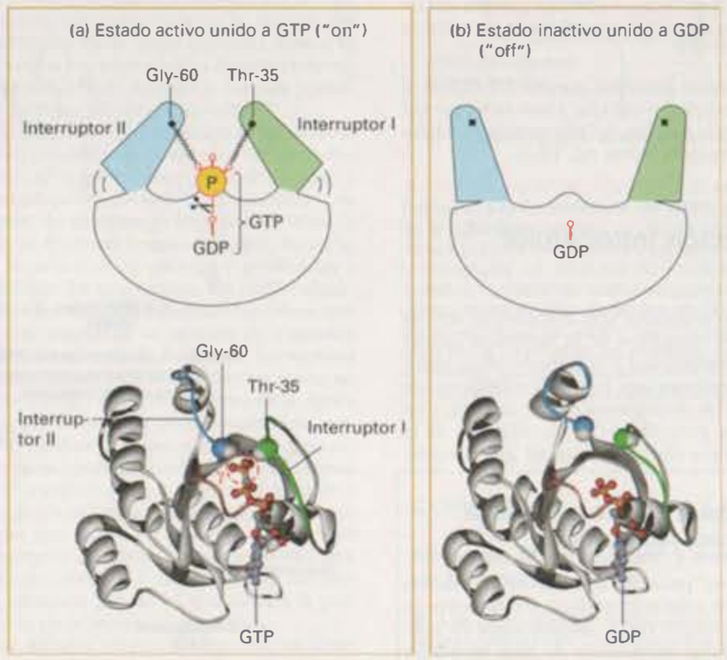
cAMP y otros segundos mensajeros se detallan en secciones posteriores.

Muchas proteínas intracelulares conservadas funcionan en la transducción de señales

Además de los receptores de la superficie celular y de los segundos mensajeros, dos grupos de proteínas conservadas durante la evolución funcionan en las vías de transducción de señales estimuladas por señales extracelulares. Consideraremos brevemente estas proteínas de señalización intracelular; el papel en las vías específicas se describe en otra parte.

Proteínas GTPasa interruptoras. En el capítulo 3 se mencionó un grupo grande de proteínas intracelulares interruptoras que forman la superfamilia GTPasa. Estas proteínas G de fijación del nucleótido guanina se activan ("*on*") cuando están unidas a GTP y se inactivan ("*off*") cuando están unidas a GDP (véase fig. 3-29). La conversión inducida por la señal del estado inactivo al activo está mediada por un *factor de intercambio de nucleótido de guanina (guanine nucleotide-exchange factor, GEF)*, que produce la liberación de GDP desde la proteína interruptora. La fijación ulterior de GTP, favorecida por su concentración intracelular elevada, induce un cambio conformacional en dos segmentos de la proteína, denominados interruptor I e interruptor II, que permite unir la proteína y activar otras proteínas de señalización corriente abajo (fig. 13-8). Entonces, la actividad GTPasa intrínseca de las proteínas interruptoras hidroliza el GTP unido a GDP y P_i, en consecuencia, cambia la conformación del interruptor I y del interruptor II desde la forma posterior activa a la forma inactiva. La velocidad de hidrólisis del GTP suele aumentar por una *proteína aceleradora de la GTPasa (GAP)*, cuya actividad también puede ser controlada por señales extracelulares. La velocidad de hidrólisis de GTP regula el tiempo que la proteína interruptora permanece en la conformación activa y permite dirigir la señal corriente abajo.

Hay dos clases de proteínas GTPasa interruptoras: proteínas G *triméricas* (grandes), que como ya se mencionó se fijan en forma directa y son activadas por ciertos receptores y las proteínas G *monoméricas* (pequeñas) como las proteínas Ras y diversas proteínas similares. Ras establece enlaces indirectos con los receptores por medio de proteínas adaptadoras y proteínas GEF descritas en el capítulo siguiente. Todas las proteínas G contienen regiones similares al interruptor I y II que modulan la actividad de proteínas efectoras específicas mediante interacciones directas proteína-proteína cuando la proteína G está unida a GTP. A pesar de estas similitudes, estas dos clases de proteínas de fijación de GTP están reguladas de maneras muy diferentes.



▲ **Fig. 13-8. Mecanismo interruptor en proteínas G monoméricas y triméricas.** La capacidad de una proteína G para interactuar con otras proteínas y así transducir una señal difiere en el estado activo unido a GTP ("on") y en el estado inactivo unido a GDP ("off"). (a) En el estado activo, dos dominios, denominados interruptor I (verde) e interruptor II (azul), están unidos al fosfato γ terminal del GTP mediante interacciones con los grupos amida del esqueleto de residuos de treonina y glicina conservados. (b) La liberación del fosfato γ por la hidrólisis catalizada por la GTPasa hace que el interruptor I y el interruptor II adquieran una conformación diferente, el estado inactivo. Aquí se muestran como modelos en cinta ambas conformaciones de Ras, una proteína G monomérica. Un mecanismo similar interrumpe la subunidad α en las proteínas G triméricas entre las conformaciones activa e inactiva. (Adaptado de I. Vetter y A. Wittinghofer, 2001, *Science* 294:1299.)

Proteincinasas y fosfatasas. La activación de todos los receptores de la superficie celular conduce en forma directa o indirecta a cambios en la fosforilación de la proteína mediante la activación de proteincinasas o proteinfosfatasas. Las células animales contienen dos tipos de proteincinasas: las que agregan fosfato al grupo hidroxilo en los residuos tirosina y las que agregan fosfato al grupo hidroxilo en los residuos de serina o treonina (o en ambos). Las fosfatasas, que eliminan grupos fosfato, pueden actuar en forma conjunta con las cinasas para cambiar la función de diversas proteínas del estado activo o inactivo (véase fig. 3-30). El genoma humano codifica al menos 500 proteincinasas y 100 fosfatasas diferentes. En algunas vías de señalización, el receptor en sí posee actividad intrínseca de cinasa o fosfatasa; en otras vías, el receptor interactúa con cinasas citosólicas o asociadas con la membrana.

En general, cada proteincinasa fosforila residuos específicos en un conjunto de proteínas diana cuyos patrones de expresión suelen diferir en los tipos celulares distintos. Muchas proteínas son sustratos para múltiples cinasas y cada fosforilación, sobre un aminoácido diferente, modifica la actividad de una proteína diana particular de maneras distintas, en algunos casos activa su función y en otros la inhibe. La actividad catalítica de una proteincinasa en sí suele estar modulada mediante fosforilación por otras cinasas, por fijación directa a otras proteínas, o por cambios en los niveles de diversos segundos mensajeros. La actividad de todas las proteincinasas se opone a la de las proteinfosfatasas, algunas de las cuales son reguladas por ellas mismas mediante señales extracelulares. En consecuencia, la actividad de una proteína en una célula puede ser una función compleja de las actividades de las múltiples cinasas y fosfatasas que actúan sobre ella. En el capítulo 21 se describen varios ejemplos de este fenómeno que sucede en la regulación del ciclo celular.

Algunos receptores y proteínas de transducción de señales están localizados

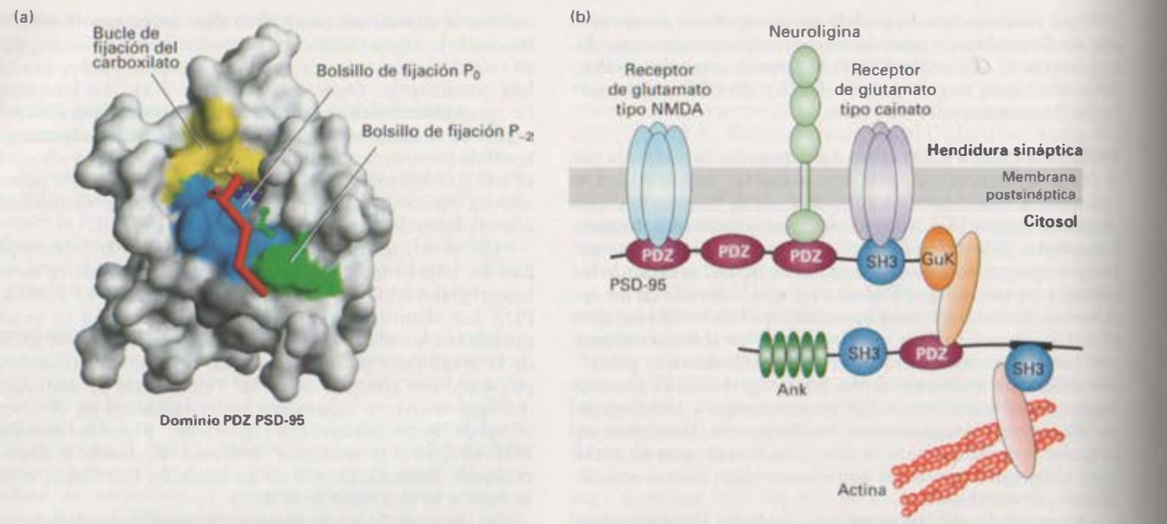
Si bien los receptores de adrenalina expresados por los adipocitos (almacenan grasa) parecen estar distribuidos de modo uniforme en la superficie de estas células esféricas, tal vez esta distribución uniforme sea poco frecuente. Más común es la formación de agrupamientos de receptores y otras proteínas de señalización asociadas con la membrana en una región particular de la superficie celular. En esta sección, mostramos el modo en que múltiples interacciones proteína-proteína y proteína-lípido pueden formar algunas proteínas de señalización en la membrana plasmática y describimos algunas ventajas conferidas por estos agrupamientos. Otros ejemplos de localización de proteínas de señalización se mencionan en otras partes.

Agrupamientos de proteínas de membrana mediados por dominios adaptadores. Tal vez el mejor ejemplo de la formación de cúmulos de receptores y otras proteínas de membrana es la sinapsis química. Cabe recordar que todas las uniones sinápticas son estructuras altamente especializadas en las cuales se liberan señales químicas (neurotransmisores) desde una célula presináptica y se fija a receptores sobre una célula postsináptica adyacente (véase fig. 7-31). La formación de agrupamientos de receptores para neurotransmisores en la región de la membrana plasmática postsináptica adyacente a la célula presináptica facilita la transmisión rápida y eficaz de la señal. Otras proteínas en la membrana de la célula postsináptica interactúan con proteínas en la matriz extracelular con el objeto de "retener" la célula en la sinapsis.

Las proteínas que contienen *dominios PDZ* desempeñan un papel fundamental en la organización de la membrana plasmática de la célula postsináptica. El dominio PDZ fue identificado como un elemento común en varias proteínas citosólicas que se fijan a las proteínas integrales de la membrana plasmática. Es un dominio relativamente pequeño, que contiene cerca de 90 residuos de aminoácidos que se fijan a secuencias de tres residuos en el C-terminal de las proteínas diana (fig. 13-9a). Algunos dominios PDZ se fijan a la secuencia Ser/Tre-X-Φ, donde X denota cualquier aminoácido y Φ un aminoácido hidrófobo; otros se fijan a la secuencia Φ-X-Φ.

La mayoría de los receptores y transportadores de la superficie celular contienen múltiples subunidades, cada una de las cuales puede fijarse al dominio PDZ. Asimismo, muchas proteínas citosólicas contienen múltiples dominios PDZ así como otros tipos de dominios que participan en las interacciones proteína-proteína y por consiguiente pueden fijarse a múltiples proteínas de membrana al mismo tiempo. Estas interacciones permiten el agrupamiento de diferentes proteínas de membrana en complejos grandes (fig. 13-9b). Otras interacciones proteína-proteína permiten que estos complejos se fijen a los filamentos de actina que recubre la parte inferior de la membrana plasmática. Dado que un filamento individual de actina puede fijar muchos grupos del tipo representado en la figura 13-9b, incluso cantidades más grandes de proteínas de la membrana plasmática pueden agruparse de manera específica. Este es uno de los mecanismos por los cuales muchos receptores, que fijan el mismo o diferentes ligandos, se localizan en una región específica de la membrana en la célula postsináptica así como en otras células.

Agrupamientos de proteína en "rafts" lipídicos. En el capítulo 5 vimos que ciertos lípidos en la membrana plasmática, en particular colesterol y esfingolípidos, están organizados en agregados, denominados "rafts" lipídicos (balsas lipídicas), que también contienen proteínas específicas (véase fig. 5-10). En las células de los mamíferos, las balsas lipídicas denominadas *cavéolas* son de particular interés porque contienen receptores diferentes y otras proteínas transductoras de señales. Estas balsas están marcadas por la presencia de *caveolina*, una familia de proteínas de ≈25 kDa. Las proteínas caveolinas tienen un segmento hidrófobo central que se considera que atraviesa la membrana dos veces y ambos extremos N-terminal y C-terminal miran hacia el citosol. Los oligómeros grandes de caveolina forman una cubierta proteinácea que es visible con el microscopio electrónico en la superficie citosólica de las cavéolas. Aún no es claro el modo en que ciertas proteínas de señalización están ancladas en las cavéolas. No obstante, la proximidad de las proteínas de señalización entre sí dentro de las cavéolas puede facilitar su interacción, lo que en consecuencia estimula ciertas vías de señalización que, de otro modo, funcionarían de manera ineficaz.



▲ Fig. 13-9. Formación de agrupamientos de proteínas de membrana mediada por proteínas adaptadoras citosólicas que contienen múltiples dominios de fijación de proteínas. El dominio PDZ, que se fija a ciertas secuencias C-terminal y el dominio SH3, que se fija a secuencias con alto contenido de prolina, son dos de los diversos dominios conservados que participan en las interacciones proteína-proteína. (a) Estructura tridimensional de la superficie de un dominio PDZ que muestra el esqueleto del péptido diana fijado en rojo. Las regiones en el dominio PDZ que se fijan al grupo COO^- y la cadena lateral del residuo C-terminal están coloreadas de amarillo y azul, respectivamente. El bolsillo de unión para el residuo dos distante desde el extremo C-terminal (P_{-2}) es verde. (b) Esquema de las interacciones proteína-proteína que agrupan varias proteínas de membrana diferentes en un segmento postsináptico de una célula nerviosa y producen el anclaje del complejo resultante a los filamentos de actina del citoesqueleto. En la proteína adaptadora PSD-95, dos de los tres dominios PDZ mostrados y un dominio SH3 unen tres proteínas de membrana diferentes en el interior de un complejo. El dominio guanilato cinasa (GuK) de la proteína PSD-95 enlaza el complejo, por medio de la participación de varias proteínas adaptadoras (que incluyen una que contiene los dominios PDZ y SH3), a la actina fibrosa subyacente a la membrana plasmática. La neuroligina es una proteína adhesiva que interactúa con componentes de la matriz extracelular. Ank: repeticiones de ankirina. Otras proteínas adaptadoras de unión múltiple se localizan y agrupan receptores diferentes en la región sináptica de la membrana plasmática. [Parte (a) adaptada de B. Harris y W. A. Lim, 2001, *J. Cell Sci.* 114:3219; parte (b) adaptada de C. Garner, J. Nash y R. Huganir, 2000, *Trends Cell Biol.* 10:274.]

Las respuestas celulares adecuadas dependen de la interacción y la regulación de las vías de señalización

En este capítulo y en el próximo nos centramos sobre todo en las vías de transducción de señales simples activadas mediante la fijación del ligando a un tipo de receptor individual. Sin embargo, la activación de un tipo de receptor individual suele conducir a la producción de múltiples segundos mensajeros, con efectos diferentes. Además, la misma respuesta celular (p. ej., degradación del glucógeno) puede ser inducida por la activación de múltiples vías de señalización. Esta interacción de diferentes vías de señalización permite el ajuste de las actividades celulares requeridas para llevar a cabo los complejos procesos fisiológicos y del desarrollo.

La capacidad de las células para responder de manera adecuada a señales extracelulares también depende de la regulación de las vías de señalización por sí mismas. Por ejemplo, una vez que disminuye la concentración de una señal externa, la señalización por medio de algunas vías intracelulares finaliza mediante la degradación de un segundo mensajero; en otras vías, la señalización finaliza mediante la desactivación de una proteína de transducción de señales. Otro mecanismo importante para asegurar respuestas celulares adecuadas es la *desensibilización* de receptores en concentraciones de señal elevada o después de la exposición prolongada a una señal. La sensibilidad de una célula a una molécula de señalización particular puede reducirse a un nivel menor por la endocitosis de sus receptores; por eso disminuye la cantidad en la superficie celular o mediante la modificación de su actividad de modo que los receptores no puedan fijar el ligando o forman un complejo receptor-ligando que no induce la respuesta celular normal. Esta modulación de la actividad del receptor con frecuencia es el resultado de la fosforilación del receptor, la fijación de otras proteínas a él, o ambas. En el análisis de las vías individuales examinamos los detalles de los diversos mecanismos para la regulación de las vías de señalización.

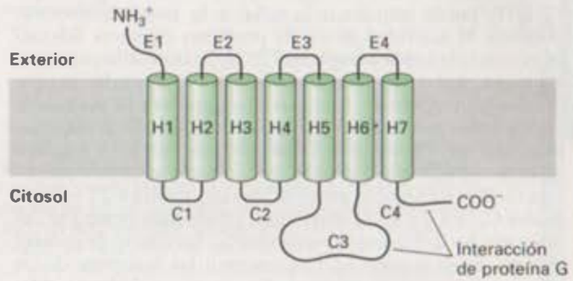
CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 13.2

Transducción intracelular de la señal

- El nivel de segundos mensajeros, como Ca^{2+}, cAMP e IP_3, aumenta o en ocasiones disminuye, en respuesta a la fijación del ligando a los receptores de la superficie celular (véase fig. 13-7). A su vez, estas moléculas de señalización intracelular no proteicas regulan las actividades de enzimas y proteínas no enzimáticas.
- Las proteínas conservadas que participan en muchas vías de transducción de señales incluyen proteínas G monoméricas y triméricas (véase fig. 13-8), proteincinasas y fosfatasas.
- Las proteínas citosólicas que contienen dominios PDZ múltiples u otros dominios de unión a proteínas agrupan receptores y otras proteínas en la membrana plasmática, como sucede en la célula postsináptica (véase fig. 13-9).
- Muchos receptores y proteínas de transducción de señales se agrupan en los "rafts" lipídicos que contienen caveolina. Este agrupamiento puede facilitar la interacción entre las proteínas de señalización, por lo que se incrementa la transducción de la señal.
- La finalización rápida de la señalización una vez que se retira un ligando particular y la desensibilización del receptor con concentraciones elevadas de ligando o después de la exposición prolongada ayuda a las células a responder de manera adecuada en diferentes circunstancias.

13.3 Receptores acoplados a la proteína G que activan o inhiben a la adenililciclasa

Ahora volvemos nuestra atención a un grupo muy grande de receptores de la superficie celular que están acoplados a las proteínas de transducción de señales G triméricas. La totalidad de los receptores acoplados a la proteína G (G *protein-coupled receptors*, GPCR) contiene siete regiones que atraviesan la membrana, con su segmento N-terminal sobre la cara exoplasmática y su segmento C-terminal sobre la cara citosólica de la membrana (fig. 13-10). La familia GPCR incluye receptores para numerosas hormonas y neurotransmisores, receptores activados por la luz (rodopsinas) en el ojo y literalmente miles de receptores olfatorios en la nariz de los mamíferos.



▲ Fig. 13-10. Esquema de la estructura general de receptores acoplados a la proteína G. Todos los receptores de este tipo tienen la misma orientación en la membrana y contienen siete regiones transmembrana α-helicoidales (H1-H7), cuatro segmentos extracelulares (E1-E4) y cuatro segmentos citosólicos (C1-C4). El segmento carboxiloterminal (C4), el bucle C3 y, en algunos receptores, también el bucle C2 están implicados en las interacciones con una proteína G trimérica acoplada.

CUADRO 13-1 Clases principales de proteínas G triméricas de mamíferos y sus efectores*

Clase G_α	Efector asociado	Segundo mensajero	Ejemplos de receptores
$G_{s\alpha}$	Adenililciclasa	cAMP (aumentado)	Receptor β-adrenérgico (adrenalina); receptores para glucagón, serotonina, vasopresina
$G_{i\alpha}$	Adenililciclasa Canal del K^+ ($G_{\beta\gamma}$ activa al efector)	cAMP (disminuido) Cambio en el potencial de membrana	Receptor α_1 adrenérgico Receptor muscarínico para acetilcolina
$G_{olf\alpha}$	Adenililciclasa	cAMP (aumentado)	Receptores olfatorios en la nariz
$G_{q\alpha}$	Fosfolipasa C	IP_3, DAG (aumentado)	Receptor α_2 adrenérgico
$G_{o\alpha}$	Fosfolipasa C	IP_3, DAG (aumentado)	Receptor para acetilcolina en células endoteliales
$G_{t\alpha}$	cGMP fosfodiesterasa	cGMP (disminuido)	Rodopsina (receptor para la luz) en las células bastones

*Una subclase G_α dada puede estar asociada con más de una proteína efectora. Hasta la fecha sólo se identificó una G_α fundamental, si bien se describieron múltiples $G_{s\alpha}$ y $G_{i\alpha}$. Las proteínas efectoras suelen estar reguladas por G_α, pero en algunos casos por $G_{\beta\gamma}$ o la acción combinada de G_α y $G_{\beta\gamma}$. IP_3: inositol 1,4,5-trifosfato; DAG: 1,2-diacilglicerol.

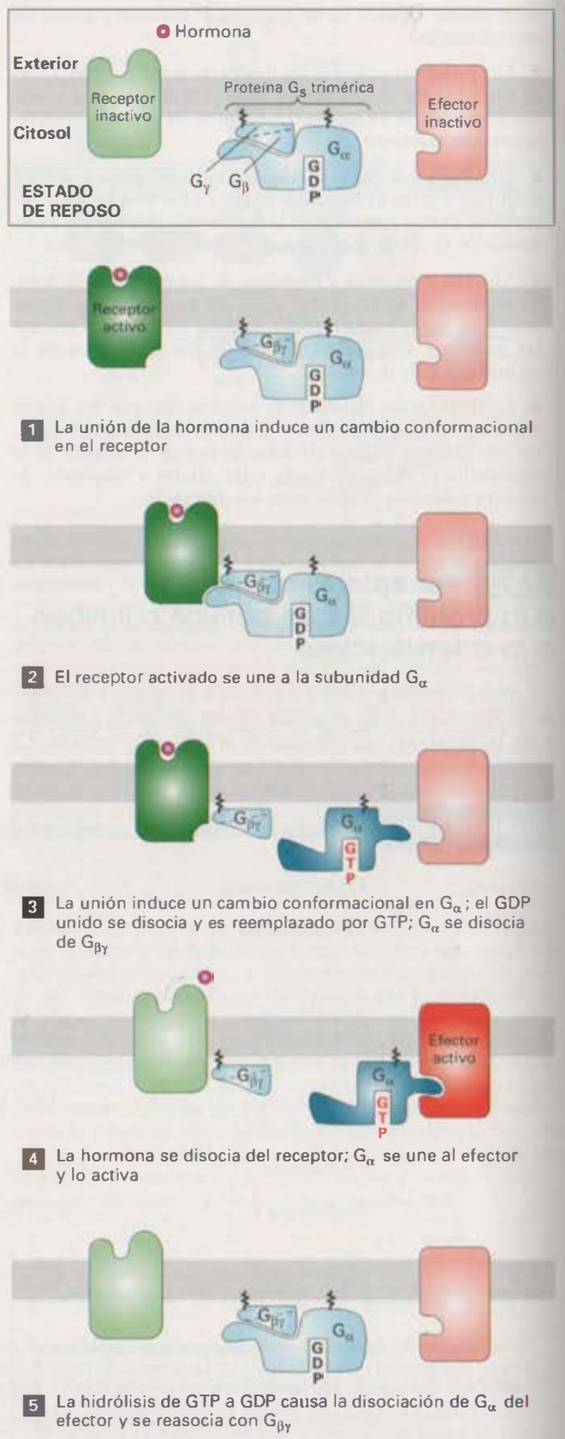
FUENTES: Véase L. Birnbaumer, 1992, *Cell* 71:1069; Z. Farfel et al., 1999, *New Eng. J. Med.* 340:1012; y K. Pierce et al., 2002, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3:639.

Las proteínas G de transducción de señales contienen tres subunidades designadas α, β y γ. Durante la señalización intracelular, las subunidades β y γ permanecen juntas y suelen denominárselas subunidad $G_{\beta\gamma}$. La subunidad G_α es una proteína GTPasa interruptora que alterna entre un estado activo ("*on*") unida a GTP y un estado inactivo ("*off*") unida a GDP (véase fig. 13-8). La estimulación de un receptor acoplado causa la activación de la proteína G, la cual a su vez modula la actividad de una *proteína efectora* asociada. Si bien la proteína efectora es activada con más frecuencia por G_α·GTP, en algunos casos es inhibida. Más aún, de acuerdo con la célula y el ligando, la subunidad $G_{\beta\gamma}$ más que G_α·GTP, puede transducir la señal a la proteína efectora. Además, la actividad de varias proteínas efectoras diferente es controlada por complejos GPCR-ligando diferentes. Sin embargo, todas las proteínas efectoras son canales iónicos fijados a membrana o enzimas que catalizan la formación de segundos mensajeros (p. ej., cAMP, DAG e IP_3). Estas variaciones en el tema de señalización por GPCR se originan porque los genomas eucariontes codifican múltiples proteínas G. Por ejemplo, el genoma humano codifica 27 subunidades G_α, 5 G_β y 13 G_γ diferentes. Desde hace tiempo se conoce que las diferentes subunidades $G_{\beta\gamma}$ funcionan de manera similar. En el cuadro 13-1 se resumen las funciones de las clases principales de proteínas G con subunidades G_α diferentes.

En esta sección nos referimos primero al modo en que las señales GPCR son transducidas a una proteína efectora, un proceso que es similar para todos los receptores de este tipo. Luego, nos centramos en las vías en las cuales el cAMP es el segundo mensajero, utilizando como ejemplo la degradación del glucógeno estimulada por la adrenalina.

La subunidad G_α de las proteínas G alterna entre las formas activa e inactiva

La figura 13-11 ilustra el modo por el cual los receptores acoplados a la proteína G transducen señales desde las hormonas extracelulares a las proteínas efectoras asociadas. Ambas subunidades G_α y Gγ están unidas a la membrana mediante lípidos adheridos en forma covalente. En el estado de reposo, cuando el ligando no está fijado al receptor, la subunidad G_α está unida a GDP y forma un complejo con $G_{\beta\gamma}$. La fijación del ligando hormonal normal (p. ej., adrenalina) o un agonista (p. ej., isoproterenol) al receptor cambia su conformación y se



1 La unión de la hormona induce un cambio conformacional en el receptor

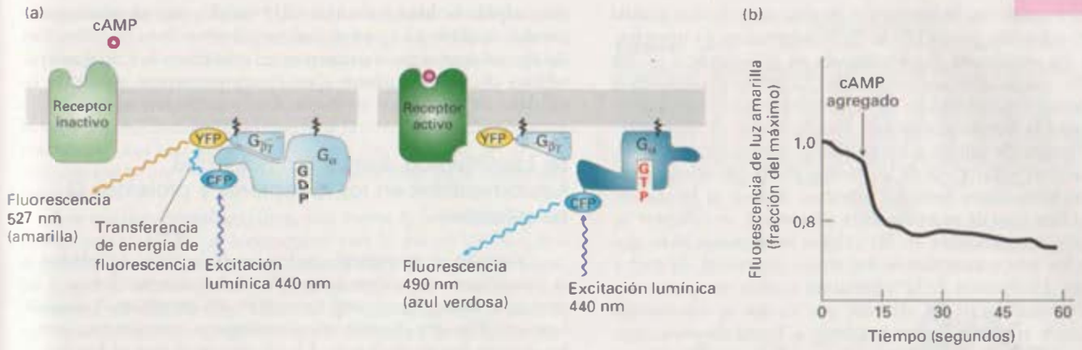
2 El receptor activado se une a la subunidad G_α

3 La unión induce un cambio conformacional en G_α; el GDP unido se disocia y es reemplazado por GTP; G_α se disocia de $G_{\beta\gamma}$

4 La hormona se disocia del receptor; G_α se une al efector y lo activa

5 La hidrólisis de GTP a GDP causa la disociación de G_α del efector y se reasocia con $G_{\beta\gamma}$

▶ **Fig. 13-11. Modelo de funcionamiento para la activación de proteínas efectoras inducidas por ligando asociada con los receptores acoplados a proteína G.** Las subunidades de proteínas G triméricas G_α y $G_{\beta\gamma}$ están ligadas a la membrana por moléculas de lípidos unidas en forma covalente (líneas negras en zigzag). Después de la fijación del ligando, la disociación de la proteína G y el intercambio de GDP con GTP (pasos 1-3), el G_α·GTP libre se fija a una proteína efectora y la activa (paso 4). La hidrólisis de GTP termina la señalización y conduce a un reensamblaje de la forma trimérica, por lo que el sistema vuelve al estado de reposo (paso 5). La fijación de otra molécula de ligando causa la repetición del ciclo. En algunas vías, la proteína efectora es activada por la subunidad $G_{\beta\gamma}$.



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 13-12 La activación mediada por receptor de proteínas G acopladas se produce en el curso de unos pocos segundos de la fijación del ligando en las células vivas.** La ameba *Dictyostelium discoideum* fue transfectada con genes que codifican dos proteínas de fusión: G_α fusionada con la proteína fluorescente azul verdosa (CFP), una forma mutante de la proteína fluorescente verde (GFP) y G_β fusionada con otra variante de GFP, la proteína fluorescente amarilla (YFP). CFP fluorece con luz a 490 nm; YFP con luz a 527 nm. (a) Cuando CFP y YFP están próximas, como en el complejo G_α·$G_{\beta\gamma}$ en reposo, puede producirse la transferencia de energía de fluorescencia entre CFP y YFP *(izquierda)*. Como resultado, la irradiación de las células en reposo con luz a 440 nm (que excita en forma directa CFP, pero no YFP) causa la emisión de luz de 527 nm (amarillo), característico de YFP. Sin embargo, si la fijación del ligando conduce a la disociación de las subunidades G_α y $G_{\beta\gamma}$, entonces puede no producirse la transferencia de energía de fluorescencia. En este caso, la irradiación de las células a 440 nm causa la emisión de luz de 490 nm (azul verdosa) característica de CFP *(derecha)*. (b) Gráfico de la emisión de luz amarilla (527 nm) de una célula amebiana transfectada individual antes y después del agregado de AMP cíclico (flechas), el ligando extracelular para el GPCR en estas células. La disminución en la fluorescencia es el resultado de la disociación de la proteína de fusión G_α·CFP desde la proteína de fusión $G_{\beta\gamma}$·YFP, que se produce en el curso de segundos tras el agregado de cAMP. (Adaptado de C. Janetopoulos et al., 2001, *Science* 291:2408.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Quimiotaxis de una célula individual *Dictyostelium* al factor quimiotáctico cAMP

fija a la subunidad G_α de modo tal que GDP es desplazado de G_α y fija GTP. Así, el receptor activado fijado al ligando funciona como un GEF para la subunidad G_α (véase fig. 3-29).

Una vez sucedido el intercambio de nucleótidos, el complejo G_α·GTP se disocia de la subunidad $G_{\beta\gamma}$ pero ambas permanecen ancladas a la membrana. En la mayoría de los casos, G_α·GTP luego interactúa con la proteína efectora asociada y la activa, como se representa en la figura 13-11. Sin embargo, esta activación es de corta duración debido a que el GTP fijado a G_α se hidroliza a GDP en segundos, catalizado por una enzima GTPasa que es una parte intrínseca de la subunidad G_α. El complejo resultante G_α·GDP se reasocia con rapidez con $G_{\beta\gamma}$ y por eso se produce la eliminación de la activación del efector. En muchos casos, una proteína denominada *RGS* (reguladora de la señalización por la proteína G) acelera la hidrólisis del GTP por la subunidad G_α, y reduce el tiempo durante el cual el efector permanece activado.

Las evidencias tempranas que apoyan el modelo mostrado en la figura 13-11 provienen de estudios con compuestos que pueden fijar las subunidades G_α así como GTP, pero no pueden ser hidrolizadas por la GTPasa intrínseca. En estos compuestos el enlace fosfodiéster P-O-P que conectan los fosfatos β y γ del GTP es reemplazado por un enlace $P\text{-}CH_2\text{-}P$ o P-NH-P no hidrolizable. El agregado de un análogo de GTP a una preparación de membrana plasmática en presencia del ligando natural o un agonista para un receptor particular da lugar a una activación mucho más prolongada que la asociada de proteína efectora de la que ocurre con GTP. Esto se produce porque una vez que el GDP fijado al G_α es desplazado por el GTP análogo no hidrolizable, éste permanece fijado en forma permanente a G_α. Dado que este complejo es tan funcional como el complejo G_α·GTP normal en la activación de la proteína efectora, el efector se mantiene permanentemente activo.

Hace poco se detectó la disociación de proteínas G triméricas mediada por GPCR en las células vivas. Estos estudios aprovecharon el fenómeno de *transferencia de energía de fluorescencia*, que puede cambiar la longitud de onda de la fluorescencia emitida cuando interactúan dos proteínas fluorescentes. La figura 13-12 muestra el modo en que este enfoque experimental demostró la disociación del complejo G_α·$G_{\beta\gamma}$ en el curso de unos pocos segundos luego del agregado del ligando y proporciona evidencia adicional para el modelo del ciclo de proteína G. Este protocolo experimental general puede utilizarse para seguir la formación y la disociación de otros complejos proteína-proteína en las células vivas.

La adrenalina se une a varios receptores diferentes acoplados a la proteína G

La adrenalina tiene una importancia particular en la mediación de la respuesta del organismo frente al estrés, como el miedo o el ejercicio intenso, cuando todos los tejidos tienen una necesidad mayor para catabolizar glucosa y ácidos grasos a fin de producir ATP. Estos combustibles metabólicos importantes pueden ser aportados a la sangre en segundos, por la degradación rápida de glucógeno en el hígado *(glucogenólisis)* y de triacilgliceroles a ácidos grasos en los adipocitos *(lipólisis)*.

En los mamíferos, la liberación de glucosa y ácidos grasos puede ser inducida por la unión de la adrenalina (o noradrenalina) a los *receptores β-adrenérgicos* en la superficie de los hepatocitos (hígado) y los adipocitos. La adrenalina unida a los receptores β-adrenérgicos en las células musculares cardíacas aumenta la frecuencia de las contracciones, lo que incrementa el aporte de sangre a los tejidos. Por el contrario, la estimulación con adrenalina de los receptores β-adrenérgicos de las células musculares lisas del intestino induce la relajación de éstas. Otro tipo de receptor para adrenalina, el *receptor α_2 adrenérgico*, se encuentra en las células musculares lisas que recubren los vasos sanguíneos del tracto intestinal, la piel y los riñones. La fijación de la adrenalina a estos receptores induce la contracción de las arterias, por lo que se interrumpe la circulación a estos órganos periféricos. Estos diversos efectos de la adrenalina están dirigidos a un fin común: aportar energía para los movimientos rápidos de los principales músculos locomotores en respuesta al estrés corporal.

Si bien todos los receptores para adrenalina están acoplados a la proteína G, los tipos diferentes se acoplan a proteínas G distintas. Por lo tanto, además de su importancia fisiológica, estos receptores son de interés porque inducen diferentes vías de transducción de señales intracelulares. Ambos subtipos de receptores β-adrenérgicos, denominados β_1 y β_2, se acoplan con *proteínas G estimuladoras (G_s)* que activan la enzima adenililciclasa fijada a la membrana (véase cuadro 13-1). Una vez activada, la adenililciclasa cataliza la síntesis del segundo mensajero cAMP. Los ensayos de expresión funcional representados en la figura 13-6 demostraron que la unión de la adrenalina a los receptores β-adrenérgicos induce una elevación en el cAMP. Cuando el cDNA clonado que codifica el receptor β-adrenérgico es transfectado en células que no poseen el receptor, las células transfectadas acumulan cAMP en respuesta a la estimulación con adrenalina. Experimentos similares en los cuales se expresan receptores mutantes ayudaron a definir las funciones de aminoácidos específicos en la fijación de hormonas y en la activación de diferentes proteínas G.

Los dos subtipos de receptores adrenérgicos α, α_1 y α_2, están acoplados a proteínas G diferentes. El receptor α_1 adrenérgico está acoplado a la proteína G_i que inhibe la adenililciclasa, el mismo efector de la enzima asociado con los receptores β-adrenérgicos. Por el contrario, la proteína G_q acoplada al receptor α_2-adrenérgico activa una enzima efectora diferente que genera segundos mensajeros distintos (véase sección 13.5).

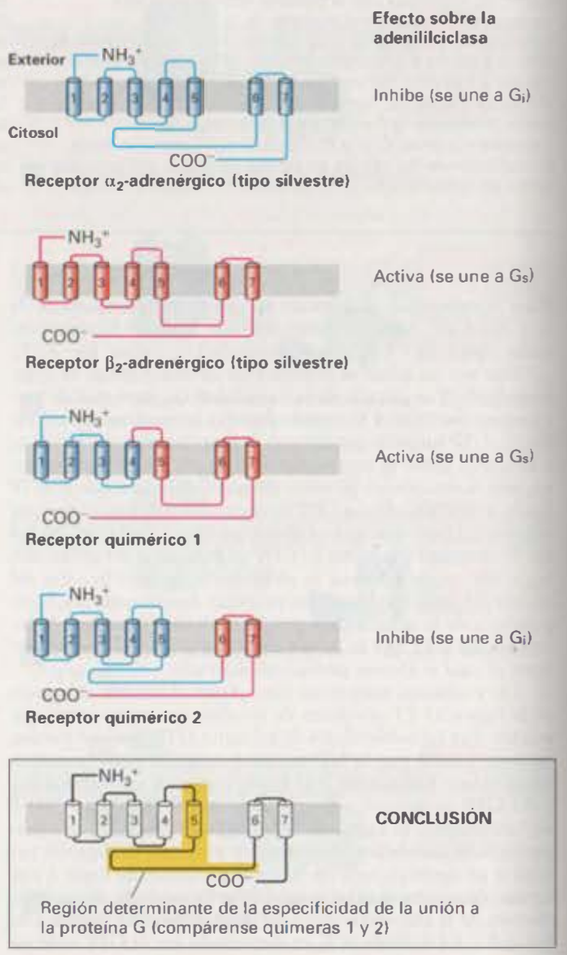
MEDICINA

Algunas toxinas bacterianas contienen una subunidad que penetra la membrana plasmática de las células y cataliza una modificación química de $G_{s\alpha}$-GTP que evita la hidrólisis del GTP unido a GDP. Como resultado, $G_{s\alpha}$ permanece en el estado activo que, de manera continua, produce la activación de la adenililciclasa en ausencia de la estimulación hormonal. La toxina del cólera producida por la bacteria *Vibrio cholerae* y las enterotoxinas producidas por ciertas cepas de *E. coli* actúan de este modo en las células del epitelio intestinal. La elevación resultante en el cAMP intracelular conduce a la pérdida de electrólitos y agua en la luz intestinal con la consiguiente diarrea acuosa característica de la infección por estas bacterias.

Bordetella pertussis, una bacteria que de manera habitual infecta las vías respiratorias, es el agente etiológico de la tos convulsa. La toxina pertussis cataliza una modificación de $G_{i\alpha}$ que impide la liberación del GDP unido, que en consecuencia deja estable a $G_{i\alpha}$ en el estado inactivo. Esta inactivación de G_i conduce a un aumento en el cAMP en las células epiteliales de las vías aéreas que, en consecuencia, estimula la pérdida de líquidos y electrólitos y la secreción mucosa. ∎

Se identificaron dominios funcionales fundamentales en los receptores y proteínas G acopladas

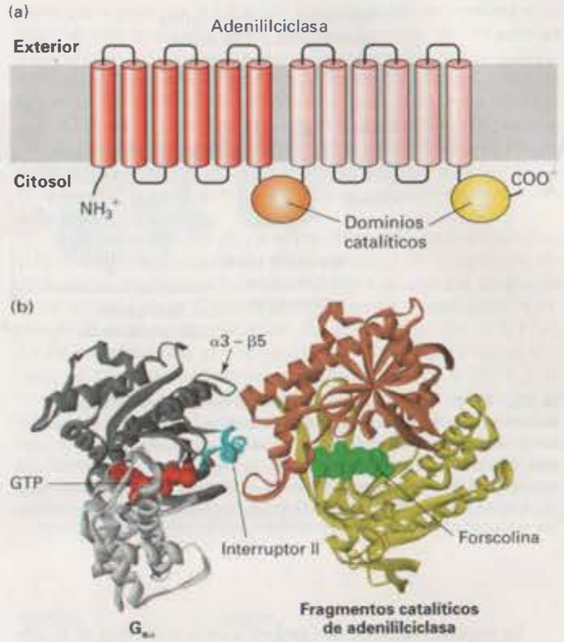
Como ya se mencionó, todos los receptores acoplados a la proteína G contienen siete hélices α transmembrana y es probable que tengan una estructura tridimensional similar. Los estudios con receptores adrenérgicos quiméricos, como los mostrados en la figura 13-13, sugieren que el bucle C3 largo entre las hélices α 5 y 6 es importante para las interacciones entre un receptor y su proteína G acoplada. Tal vez, la fijación del ligando hace que estas hélices se muevan en forma relativa entre sí. Como resultado, la conformación del bucle C3 que conecta estas dos hélices cambia de un modo



que permite fijarse al bucle y activa la transducción de la subunidad $G_{s\alpha}$. Se considera que las regiones específicas dentro del bucle C3 asumen una estructura tridimensional singular en todos los receptores que fijan la misma proteína G (p. ej., G_s o G_i). Otra evidencia indica que el bucle C2, al unir las hélices 3 y 4, también contribuye a la interacción de algunos receptores con una proteína G y que los residuos, en al menos, cuatro hélices transmembrana participan en la unión del ligando.

Los análisis cristalográficos con rayos X indicaron las regiones en $G_{s\alpha}$·GTP que interactúan con la adenililciclasa. Esta enzima es una proteína transmembrana de múltiples pasajes con dos segmentos citosólicos grandes que contienen los dominios catalíticos (fig. 13-14a). Debido a que estas proteínas transmembrana presentan gran dificultad para ser cristalizadas, los científicos prepararon dos fragmentos de proteínas que abarcan los dominios catalíticos de adenililciclasa y les permite asociarse en presencia de $G_{s\alpha}$·GTP y forscolina, para estabilizar los fragmentos catalíticos de la adenililciclasa en sus conformaciones activas. El complejo formado era activo desde el punto de vista catalítico y mostró propiedades farmacológicas y bioquímicas similares a las de la adenililciclasa intacta con su longitud completa. En este complejo, dos regiones de $G_{s\alpha}$·GTP, la hélice interruptora II y el bucle α3-β5, contactan los fragmentos de adenililciclasa (fig. 13-14b). Cabe recordar que el interruptor II es uno de los segmentos de una proteína G cuya conformación es diferente en los estados en que tiene fijado GTP o GDP (véase fig. 13-8). La conformación de $G_{s\alpha}$ inducida por GTP que favorece su disociación de $G_{\beta\gamma}$ es precisamente la conformación esencial para la fijación de $G_{s\alpha}$ a la adenililciclasa. Otros estudios indican que $G_{i\alpha}$ se fija a una región diferente de adenililciclasa, que determina su efecto diferente sobre el efector.

Para comprender el modo en que la fijación de $G_{s\alpha}$·GTP estimula la actividad de la adenililciclasa, los científicos tendrán que resolver primero la estructura de los dominios catalíticos de la adenililciclasa en sus conformaciones no activadas (es decir, en ausencia de $G_{s\alpha}$·GTP). Una hipótesis es que la fijación de la hélice del interruptor II a la hendidura en un dominio catalítico de la adenililciclasa conduce a la rotación del otro dominio catalítico. Se propone que esta rotación conduce a la estabilización del estado de transición y, en consecuencia, a la estimulación de la actividad catalítica.

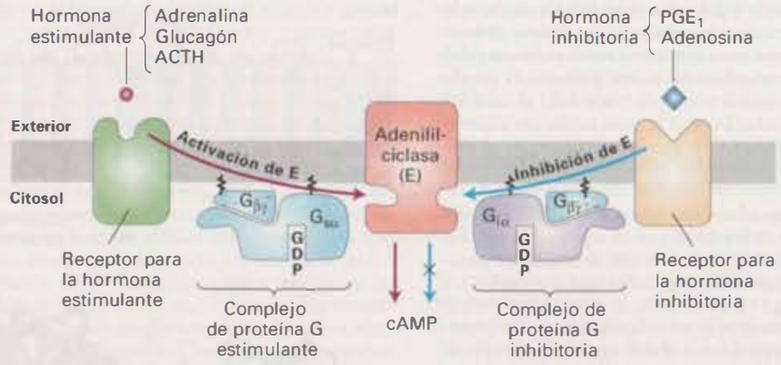


▲ Fig. 13-14. Estructura de las adenililciclasas de mamíferos y sus interacciones con $G_{s\alpha}$·GTP. (a) Diagrama de las adenililciclasas de los mamíferos. La enzima unida a la membrana contiene dos dominios catalíticos similares en la cara citosólica de la membrana y dos dominios integrales de membrana; se considera que cada uno de éstos contiene seis hélices transmembrana. (b) Estructura tridimensional de $G_{s\alpha}$·GTP en complejo con dos fragmentos que abarcan el dominio catalítico de la adenililciclasa determinada por cristalografía de rayos X. El bucle α3-β5 y la hélice en la región del interruptor II (azul) de $G_{s\alpha}$ GTP interactúan en forma simultánea con una región específica de adenililciclasa. La porción $G_{s\alpha}$ coloreada en oscuro es el dominio GTPasa, similar en estructura a Ras (véase fig. 13-8); la porción más clara es un dominio helicoidal. Los dos fragmentos de adenililciclasa se muestran en anaranjado y amarillo. La forscolina (verde) encierra los fragmentos de ciclasa en sus conformaciones activas. [Parte (a) véase W. J. Tang y A. G. Gilman, 1992, *Cell* 70:869; parte (b) adaptada de J. J. G. Tesmer et al., 1997, *Science* 278:1907.]

◀ FIGURA EXPERIMENTAL 13-13 Los estudios con receptores adrenérgicos quiméricos identifican el bucle C3 largo como de importancia fundamental para la interacción con proteínas G. Los ovocitos de *Xenopus* fueron microinyectados con mRNA que codifica un receptor de tipo silvestre α_2 adrenérgico, β_2 adrenérgico o α-β quimérico. Si bien estos ovocitos no expresan de manera habitual receptores adrenérgicos, expresan proteínas G que pueden acoplarse a los receptores extraños expresados en la superficie de los ovocitos microinyectados. Se determinó la actividad de adenililciclasa de las células inyectadas en presencia de agonistas de la adrenalina y se indicó si el receptor adrenérgico se fijaba a la proteína G de tipo estimuladora (G_s) o inhibidora (G_i) del ovocito. La comparación del receptor quimérico 1, que interactúa con G_s, y el receptor quimérico 2, que interactúa con G_i, muestra que la especificidad de la proteína G está determinada sobre todo por la fuente del bucle C3 que mira hacia el citosol (amarillo) entre las hélices α 5 y 6. (Véase B. Kobilka et al., 1988, *Science* **240**:1310.)

La adenililciclasa es estimulada e inhibida por complejos receptor-ligando diferentes

Las versátiles proteínas G triméricas permiten que distintos complejos hormona-receptor modulen la actividad de la misma proteína efectora. Por ejemplo, en el hígado, el glucagón y la adrenalina se fijan a receptores distintos, pero ambos receptores interactúan con la misma G_s y la activan, en consecuencia, activan la adenililciclasa, y por lo tanto producen la misma respuesta metabólica. La activación de la adenililciclasa y así el nivel de cAMP es proporcional a la concentración total de $G_{s\alpha}$·GTP resultante de la unión de ambas hormonas a sus respectivos receptores.



▲ Fig. 13-15. Activación e inhibición de la adenililciclasa inducida por hormona en los adipocitos. La unión del ligando a los receptores acoplados a G_s causa la activación de la adenililciclasa, mientras que la fijación del ligando al receptor acoplado a G_i causa la inhibición de la enzima. La subunidad $G_{\beta\gamma}$ en ambas proteínas G, estimuladoras e inhibidoras, es idéntica, las subunidades G_α y sus receptores correspondientes difieren. La formación de complejos activos G_α-GTP estimulados por el ligando se produce por el mismo mecanismo en ambas proteínas G_s y G_i (véase fig. 13-11). Sin embargo, $G_{s\alpha}$-GTP y $G_{i\alpha}$-GTP interactúan de manera diferente con la adenililciclasa, de modo que uno estimula y el otro inhibe su actividad catalítica. (Véase A G. Gilman, 1984 *Cell* 36:577.)

La regulación positiva y negativa de la actividad de la adenililciclasa sucede en algunos tipos de células, lo que proporciona un control ajustado del nivel de cAMP. Por ejemplo, la estimulación de los adipocitos por adrenalina, glucagón o ACTH activa a la adenililciclasa, mientras que la prostaglandina PGE1 o la adenosina inhibe la enzima (fig. 13-15). Los receptores para PGE1 y adenosina interactúan con la G_i inhibidora, la cual contiene las mismas subunidades β y γ como G_s estimuladora, pero una subunidad α diferente ($G_{i\alpha}$). En respuesta a la fijación de un ligando inhibidor a su receptor, la proteína G_i asociada libera su GDP unido y une GTP; luego el complejo $G_{i\alpha}$-GTP activo se disocia de $G_{\beta\gamma}$ e inhibe (en lugar de estimular) a la adenililciclasa.

La proteincinasa A activada por cAMP media varias respuestas en diferentes células

En los animales multicelulares casi todos los efectos diversos del cAMP están mediados por proteincinasa A (PKA), también denominada *proteincinasa dependiente de cAMP*. Como se describió en el capítulo 3, la PKA inactiva es un tetrámero que consiste en dos subunidades reguladoras (R) y dos catalíticas (C). Cada subunidad R tiene dos sitios de fijación al cAMP separados; la fijación del cAMP a ambos sitios en una subunidad R conduce a la liberación de la subunidad C asociada, desenmascarando su sitio catalítico y activando su actividad de cinasa (véase fig. 3-27a). La fijación de cAMP por una subunidad R sucede de modo cooperativo; es decir, la fijación de la primera molécula de cAMP disminuye la K_d para la fijación del segundo. Así, pequeños cambios en el nivel de cAMP citosólico pueden causar cambios proporcionalmente grandes en la cantidad de subunidades C disociadas y, por eso, en la actividad de cinasa. La activación rápida de una enzima por la disociación de un inhibidor inducida por la hormona es una característica común de varias vías de señalización.

La mayoría de las células de los mamíferos expresan receptores acoplados a proteína G_s. La estimulación de estos receptores por diversas hormonas conduce a la activación de PKA, si bien la respuesta celular resultante depende de la isoforma particular de PKA y de los sustratos de PKA expresados por la célula. Por ejemplo, los efectos de la adrenalina en el metabolismo del glucógeno, mediados por cAMP y PKA, están confinados sobre todo a las células hepáticas y musculares, las cuales expresan enzimas para formar y degradar el glucógeno. En los adipocitos, la activación de PKA inducida por adrenalina facilita la fosforilación y la activación de la fosfolipasa que cataliza la hidrólisis de los triglicéridos almacenados para dar ácidos grasos libres y glicerol. Estos ácidos grasos son liberados en la sangre y captados como una fuente de energía por las células en otros tejidos como riñón, corazón y músculos. Asimismo, la estimulación de los receptores acoplados a la proteína G en las células del ovario por ciertas hormonas hipofisarias conduce a la activación de PKA, la que a su vez estimula la síntesis de dos hormonas esteroides, estrógeno y progesterona, esenciales para el desarrollo de las características sexuales femeninas.

Si bien la PKA actúa sobre diferentes sustratos en distintos tipos de células, siempre fosforila un residuo de serina o treonina que se produce en la misma secuencia del motivo: X-Arg(Arg/Lys)-X-(Ser/Tre)-Φ, donde X denota cualquier aminoácido y Φ indica un aminoácido hidrófobo. Otras serina o treonina cinasas fosforilan residuos diana en motivos con secuencia diferentes.

El metabolismo del glucógeno es regulado por activación de proteincinasa A inducida por hormona

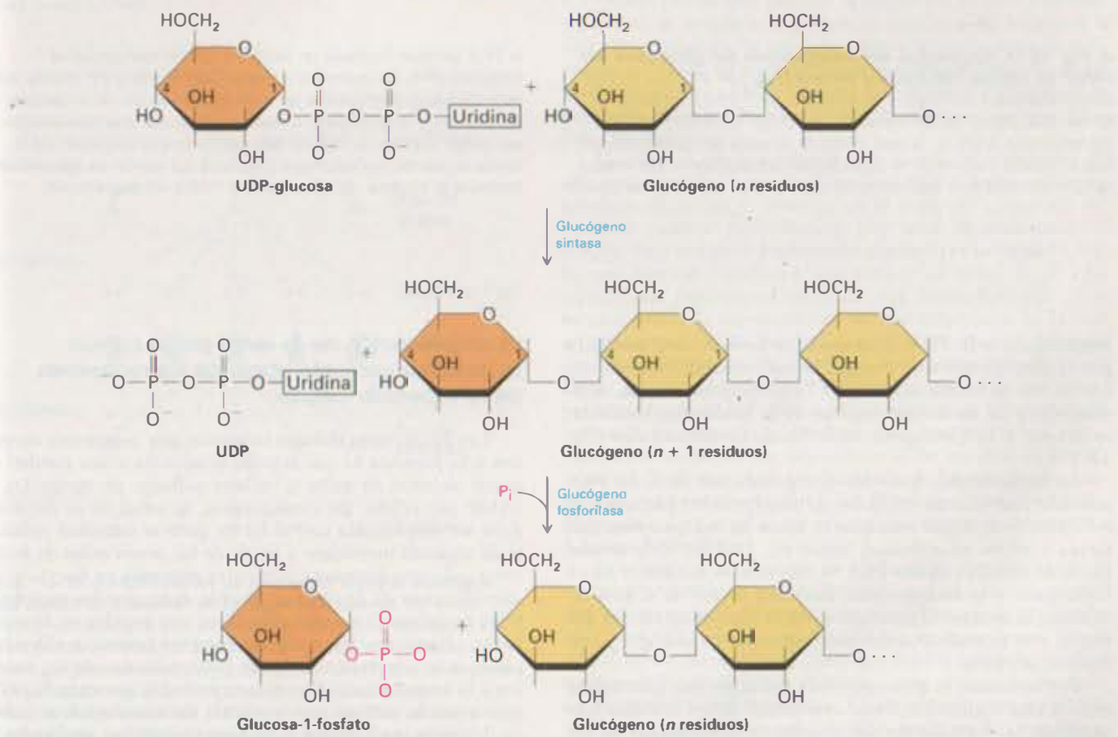
La primera respuesta celular mediada por cAMP en ser descubierta –la liberación de glucosa a partir del glucógeno– se produce en las células del músculo y del hígado estimula-

das por adrenalina u otras hormonas cuyos receptores están acoplados a proteínas G_s. Esta respuesta ejemplifica el modo en que la activación de PKA puede coordinar la actividad de un grupo de enzimas intracelulares hacia un propósito común.

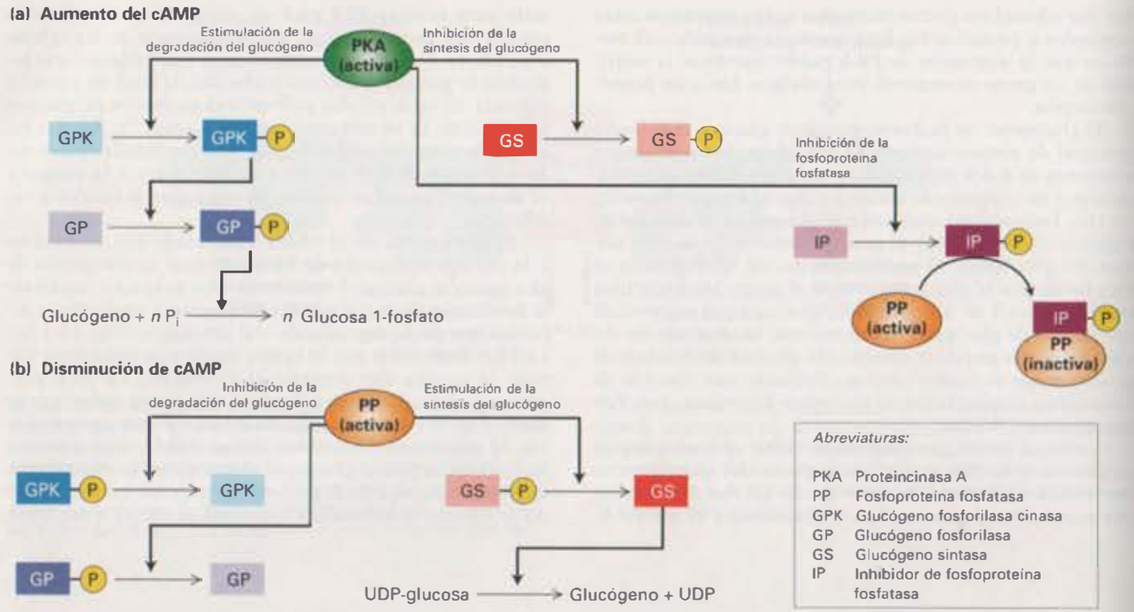
El glucógeno, un polímero grande de glucosa, es la forma principal de almacenamiento de glucosa en los animales. A semejanza de todos los biopolímeros, el glucógeno es sintetizado por un conjunto de enzimas y degradado por otro (fig. 13-16). Tres enzimas convierten la glucosa en uridina difosfoglucosa (UDP-glucosa), el principal intermediario en la síntesis del glucógeno. El residuo glucosa de UDP-glucosa es transferido por la *glucógeno sintasa* al grupo hidroxilo libre en el carbono 4 de un residuo de glucosa en el extremo de una cadena de glucógeno en crecimiento. La degradación del glucógeno comprende la eliminación gradual de residuos de glucosa desde el mismo extremo mediante una reacción de fosforólisis, catalizada por la *glucógeno fosforilasa*, para formar glucosa-1-fosfato.

Tanto en las células musculares como en las hepáticas, la glucosa-1-fosfato producida a partir del glucógeno es convertida a glucosa-6-fosfato. En las células musculares, este metabolito ingresa en la vía glucolítica y es metabolizado para generar ATP para ser utilizado en fortalecer la contracción muscular (cap. 8). A diferencia de las células musculares, los hepatocitos contienen una fosfatasa que hidroliza la glucosa-6-fosfato a glucosa, la cual en parte es liberada de estas células por un transportador de glucosa (GLUT2) de la membrana plasmática (cap. 7). Así, las reservas de glucógeno en el hígado son degradadas sobre todo a glucosa, la que se libera de inmediato a la sangre y se transporta a otros tejidos, en particular músculos y cerebro.

El incremento en el cAMP estimulado por adrenalina y la ulterior activación de PKA aumenta la conversión de glucógeno a glucosa-1-fosfato de dos maneras: mediante la *inhibición* de la síntesis del glucógeno y mediante la *estimulación* de la degradación del glucógeno (fig. 13-17a). La PKA fosforila y, por lo tanto, inactiva la glucógeno sintasa, la enzima que sintetiza el glucógeno. La PKA promueve la degradación del glucógeno en forma indirecta por fosforilación y así la activación de una cinasa intermediaria, la glucógeno fosforilasa cinasa (GPK), que a su vez fosforila y activa la glucógeno fosforilasa, la enzima que degrada el glucógeno. El proceso completo se invierte cuando se elimina la adrenalina y el nivel de cAMP disminuye,



▲ Fig. 13-16. Síntesis y degradación del glucógeno. La incorporación de glucosa a partir de UDP-glucosa en el glucógeno es catalizada por la glucógeno sintasa. La eliminación de unidades de glucosa desde el glucógeno es catalizada por la glucógeno fosforilasa. Dado que dos enzimas diferentes catalizan la formación y la degradación del glucógeno, las dos reacciones pueden ser reguladas en forma independiente.



▲ Fig. 13-17. Regulación del metabolismo del glucógeno por cAMP en células hepáticas y musculares. Las enzimas activas están resaltadas en tonos más oscuros; las formas inactivas en tonos más claros. (a) Un aumento del cAMP citosólico activa la proteincinasa A (PKA), la cual inhibe la síntesis del glucógeno en forma directa y estimula la degradación del glucógeno por medio de una cascada de proteincinasas. Con niveles elevados de cAMP, la PKA también fosforila un inhibidor (IP) de fosfoproteína fosfatasa (PP). La unión del inhibidor fosforilado a PP impide que esta fosfatasa desfosforile las enzimas activadas en la cascada de las cinasas o la glucógeno sintasa inactiva. (b) Una disminución del cAMP inactiva la PKA, lo que conduce a la liberación de la forma activa de fosfoproteína fosfatasa. La acción de esta enzima estimula la síntesis del glucógeno e inhibe su degradación.

inactivando a la PKA. Este proceso inverso está mediado por la *fosfoproteína fosfatasa*, la cual elimina los residuos fosfato de la forma inactiva de la glucógeno sintasa, activándola, y de las formas activas de la glucógeno fosforilasa cinasa y la glucógeno fosforilasa, inactivándolas (fig. 13-17b).

La fosfoproteína fosfatasa es regulada por PKA. La PKA activada fosforila un inhibidor de fosfoproteína fosfatasa; el inhibidor fosforilado entonces se fija a la fosfoproteína fosfatasa e inhibe su actividad (véase fig. 13-17a). Con niveles bajos de cAMP, cuando PKA es inactiva, el inhibidor no es fosforilado y la fosfoproteína fosfatasa es activa. Como resultado, la síntesis de glucógeno por la glucógeno sintasa aumenta y la degradación del glucógeno por la glucógeno fosforilasa se inhibe.

Por lo tanto, la glucogenólisis inducida por adrenalina exhibe una regulación dual: activación de las enzimas que catalizan la degradación del glucógeno e inhibición de las enzimas que estimulan la síntesis del glucógeno. Esta regulación coordinada de vías estimuladoras e inhibidoras proporciona un mecanismo eficaz para lograr una respuesta celular particular y es un fenómeno común en la biología reguladora.

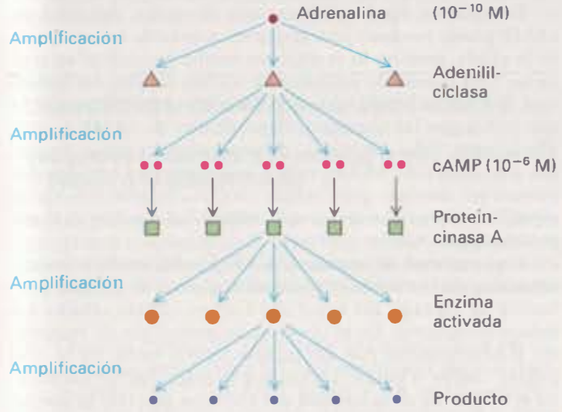
La amplificación de la señal por lo común se produce corriente abajo de los receptores de la superficie celular

Las respuestas celulares inducidas por receptores acoplados a la proteína G que activan la adenililciclasa pueden requerir decenas de miles o incluso millones de moléculas de cAMP por célula. En consecuencia, la señal de la hormona debe ser amplificada con el fin de generar cantidad suficiente de segundo mensajero a partir de los pocos miles de receptores para una hormona particular presentes en la célula. La *amplificación de la señal* es posible dado que los receptores y las proteínas G pueden difundirse con rapidez en la membrana plasmática. Un complejo receptor-hormona individual produce la conversión de hasta 100 moléculas de $G_{s\alpha}$ inactivas a la forma activa. A su vez, es probable que cada $G_{s\alpha}$-GTP activo pueda activar una molécula de adenililciclasa individual, que luego cataliza la síntesis de muchas moléculas de cAMP durante el tiempo que $G_{s\alpha}$-GTP está unido a ellas. Si bien es difícil medir la magnitud exacta de esta amplificación, la fijación de una molécula individual de hormona a una molécula de receptor puede producir la síntesis de, al menos, varios cientos de moléculas de cAMP antes de que el complejo

receptor-hormona se disocie y cese la activación de la adenililciclasa. Es probable que una amplificación similar suceda en la señalización desde receptores acoplados a otras proteínas G y algunos otros tipos de receptores cuya activación induce la síntesis de segundos mensajeros.

Un segundo nivel de amplificación está ilustrado por la estimulación de la glucogenólisis mediada por cAMP. Como ya vimos, el cAMP estimula la degradación del glucógeno por una *cascada* en tres pasos, es decir, una serie de reacciones en las cuales la enzima que cataliza un paso es activada (o inhibida) por el producto de un paso previo (véase fig. 13-17a). La amplificación que se produce en una cascada depende de la cantidad de pasos que comprende.

Ambos niveles de amplificación están representados en la figura 13-18. Por ejemplo, los niveles sanguíneos de adrenalina tan bajos como 10^{-10} M pueden estimular la glucogenólisis hepática y la liberación de glucosa. Un estímulo de adrenalina de esta magnitud genera una concentración de cAMP intracelular de 10^{-6} M, una amplificación de 10^4. Debido a que la liberación de glucosa está precedida por tres pasos catalíticos más, puede haber otra amplificación de 10^4. En el músculo estriado, las concentraciones de las tres enzimas sucesivas en la cascada glucogenolítica –proteincinasa A, glucógeno fosforilasa cinasa y glucógeno fosforilasa– están en una relación 1:10:240, lo cual ejemplifica de manera espectacular la amplificación de los efectos de la adrenalina y del cAMP.



▲ Fig. 13-18. Amplificación de una señal externa corriente abajo desde un receptor de la superficie celular. En este ejemplo, la fijación de una molécula de adrenalina individual a una molécula de receptor acoplado con proteína G_s induce la síntesis de gran cantidad de moléculas de cAMP, el primer nivel de amplificación. Cuatro moléculas de cAMP activan dos moléculas de proteincinasa A (PKA), pero cada PKA activada fosforila y activa múltiples moléculas producto. Este segundo nivel de amplificación puede abarcar varias reacciones secuenciales en las que el producto de una reacción activa la enzima que cataliza la reacción siguiente. Cuanto más pasos hay en una cascada, mayores son las posibilidades de amplificación de la señal.

Si bien esta cascada puede parecer demasiado complicada, no sólo amplifica una señal externa sino que también permite que un grupo completo de reacciones catalizadas por enzimas sea regulado de manera coordinada por un tipo individual de molécula de señalización. Además, los pasos múltiples entre estímulo y respuesta final ofrecen posibilidades para la regulación por otras vías de señalización, que por eso ajusta la respuesta celular. Describimos otros ejemplos de cascadas en las vías de señalización en el próximo capítulo.

Varios mecanismos regulan la señalización de los receptores acoplados a la proteína G

Diversos factores contribuyen a la finalización de la respuesta para hormonas reconocidas por receptores β-adrenérgicos y otros receptores acoplados a G_s. Primero, la afinidad del receptor para la hormona disminuye cuando el GDP fijado a $G_{s\alpha}$ es reemplazado con un GTP luego de la fijación de la hormona. Este aumento en la K_d del complejo receptor-hormona incrementa la disociación de la hormona del receptor. Segundo, el GTP fijado a $G_{s\alpha}$ se hidroliza con rapidez, por lo que se revierte la activación de adenililciclasa y la producción de cAMP (véase fig. 13-11). Tercero, la *cAMP fosfodiesterasa* actúa para hidrolizar cAMP a 5'-AMP, por lo que finaliza la respuesta celular. Por consiguiente, se requiere la presencia continua de hormona a una concentración lo suficientemente elevada para la activación continua de adenililciclasa y el mantenimiento de un nivel elevado de cAMP. Una vez que la concentración de la hormona disminuye lo suficiente, la respuesta celular finaliza con rapidez.

Cuando se expone un receptor acoplado a proteína G_s a la estimulación hormonal durante varias horas, diversos residuos de serina y treonina en el dominio citosólico del receptor sufren fosforilación por una proteincinasa A (PKA). Este receptor fosforilado puede fijar su ligando, pero este proceso conduce a una activación reducida de adenililciclasa; por esto el receptor está desensibilizado. Este es un ejemplo de *supresión por retroalimentación*, en la cual el producto final de una vía (aquí PKA activada) bloquea un paso temprano en la vía (aquí, activación del receptor). Dado que la actividad de PKA es incrementada por el nivel elevado de cAMP inducido por cualquier hormona que activa G_s, la exposición prolongada a una hormona, digamos, adrenalina, causa desensibilización no sólo de los receptores β-adrenérgicos sino también de los receptores acoplados a la proteína G_s que fijan diferentes ligandos (p. ej., glucagón). Esta regulación cruzada se denomina *desensibilización heteróloga*.

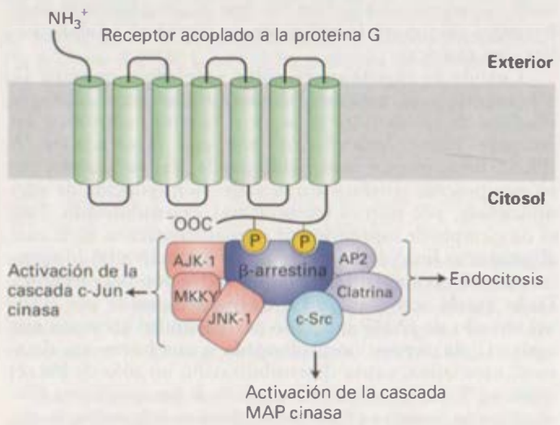
Los residuos adicionales en el dominio citosólico del receptor β-adrenérgico son fosforilados por una enzima específica del receptor denominada *cinasa del receptor β-adrenérgico (BARK)*, pero sólo cuando el receptor tiene fijado adrenalina o un agonista. Dado que BARK fosforila sólo los receptores β-adrenérgicos activados, este proceso se denomina *desensibilización homóloga*. El tratamiento prolongado de células con adrenalina produce una fosforilación extensa y, como consecuencia, la desensibilización del receptor β-adrenérgico por ambas, PKA y BARK.

Los receptores fosforilados (desensibilizados) se resintetizan en forma continua debido a la desfosforilación por fosfatasas constitutivas. Así, la cantidad de fosfatos por molé-

cula de receptor refleja cuánto ligando fue fijado en el pasado reciente (p. ej., 1-10 minutos). Esto significa que si una célula es expuesta en forma constante a cierta concentración de una hormona, esa concentración de hormona por último cesará para estimular el receptor. Si la concentración de hormona luego aumenta a un nuevo valor, el receptor activará las vías de señalización corriente abajo, pero en menor grado que lo que sucedería si la célula fuera cambiada de un medio sin hormona a uno con este nivel de hormona. Si la hormona es luego eliminada por completo, el receptor se vuelve totalmente desfosforilado y se "recompone" a su sensibilidad máxima, caso en el cual puede responder a niveles de hormona muy bajos. En consecuencia, un mecanismo de retroalimentación que comprende la fosforilación y desfosforilación del receptor modula la actividad de los receptores β-adrenérgicos y de los acoplados a proteína G_s relacionados, lo que permite que una célula pueda ajustar la sensibilidad del receptor al nivel de la hormona al cual está siendo estimulada.

Otro participante fundamental en la regulación de los receptores β-adrenérgicos es la *β-arrestina*. Esta proteína citosólica se fija a los receptores muy fosforilados por BARK e inhibe por completo su interacción con G_s y la capacidad para activarla. Una función adicional de la β-arrestina en la regulación de los receptores de la superficie celular fue sugerida en un comienzo por la observación de que la pérdida de los receptores β-adrenérgicos de la superficie celular en respuesta a la fijación del ligando es estimulada por la sobreexpresión de BARK y β-arrestina. Los estudios posteriores revelaron que la β-arrestina se fija no sólo a los receptores fosforilados sino también a la clatrina y a una proteína asociada denominada AP2, dos componentes esenciales de las vesículas recubiertas que están involucradas en un tipo de endocitosis. Estas interacciones estimulan la formación de fosas recubiertas y endocitosis de los receptores asociados; en consecuencia, disminuye la cantidad de receptores expuestos en la superficie celular (fig. 13-19). Por último, los receptores internalizados se desfosforilan en los endosomas, la β-arrestina se disocia y los receptores resintetizados se reciclan en la superficie celular, similar al reciclado del receptor para LDL (cap. 17). También se considera que la regulación de otros receptores acoplados a la proteína G participan en la endocitosis de receptores ocupados por ligandos y su secuestro en el interior celular.

Como veremos más adelante, la β-arrestina también funciona como una proteína adaptadora en la transducción de señales desde los receptores acoplados a la proteína G_s al núcleo. Las múltiples funciones de la β-arrestina ejemplifican la importancia de las proteínas adaptadoras tanto en la regulación de la señalización como en la transducción de las señales de los receptores de la superficie celular.



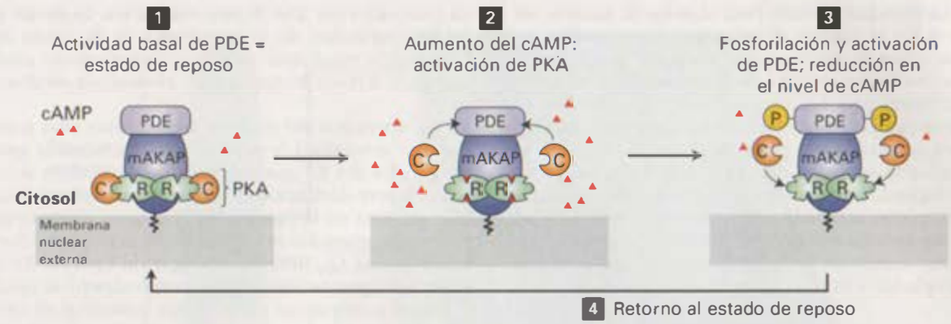
▲ Fig. 13-19. Papel de la β-arrestina en la desensibilización y transducción de señales de GPCR. La β-arrestina se fija a los residuos de serina y tirosina fosforilados en el segmento C-terminal de los receptores acoplados a la proteína G (GPCR). La clatrina y el AP2, otras dos proteínas fijadas por β-arrestina, estimulan la endocitosis del receptor. β-arrestina también actúa en la transducción de señales de receptores activados mediante la unión y activación de diversas proteincinasas citosólicas. C-Src activa la vía de MAP cinasa, que conduce a la fosforilación de factores de transcripción importantes (cap. 14). La interacción de la β-arrestina con otras tres proteínas, que incluyen JNK-1 (una cinasa Jun N-terminal), produce la fosforilación y activación del factor de transcripción c-Jun. (Adaptado de W. Miller y R. J. Lefkowitz, 2001, *Curr. Opin. Cell Biol.* 13:139 y K. Pierce et al., 2002, Nature *Rev. Mol. Cell Biol.* 3:639.)

Las proteínas de anclaje localizan los efectos de cAMP en regiones subcelulares específicas

En muchos tipos celulares, una elevación del nivel de cAMP puede producir una respuesta requerida en una parte de la célula, pero no lo es o tal vez resulta perjudicial en otra parte. Una familia de proteínas de anclaje localiza las isoformas de PKA en localizaciones subcelulares específicas, por lo que restringen las respuestas dependientes de cAMP a estas ubicaciones. Estas proteínas, denominadas *proteínas asociadas a la cinasa A* (AKAP), tienen una estructura con dos dominios: un dominio que confiere una localización subcelular específica y otro que se fija a la subunidad reguladora de la proteincinasa A.

Una proteína de anclaje (AKAP15) está unida a la cara citosólica de la membrana plasmática cerca de un tipo particular de entrada del canal del Ca^{2+} en ciertas células del músculo cardíaco. En el corazón, la activación de receptores β-adrenérgicos por adrenalina (como parte de la respuesta "lucha o huida" conduce a la fosforilación catalizada por PKA de estos canales del Ca^{2+} que por ello se abren; el flujo de entrada de Ca^{2+} resultante incrementa la frecuencia de contracción del músculo cardíaco. La interacción de AKAP15 con PKA localiza la PKA próxima a estos canales; en consecuencia, reduce el tiempo que de otro modo se requeriría para la difusión de las subunidades catalíticas de PKA desde sus sitios de generación a su sustrato, el canal del Ca^{2+}.

Otra proteína asociada con la cinasa A (mAKAP) en el músculo cardíaco produce el anclaje tanto de PKA como de cAMP fosfodiesterasa (PDE) a la membrana nuclear externa. Debido a la proximidad estrecha de la PDE a la PKA, un mecanismo de retroalimentación negativa proporciona un control íntimo local del nivel de cAMP y, por lo tanto, de la actividad de PKA (fig. 13-20). La localización de PKA cerca de la membrana nuclear también facilita el ingreso de las subunidades catalíticas en el interior del núcleo, donde fosforilan y activan ciertos factores de transcripción (sección 13.6).



▲ Fig. 13-20. Localización de la proteincinasa A (PKA) en la membrana nuclear del músculo cardíaco. Esta proteína asociada con la cinasa A mAKAP produce el anclaje tanto de PKA como de cAMP fosfodiesterasa (PDE) a la membrana y las mantiene en un mecanismo de retroalimentación negativa que proporciona un control local ajustado del nivel de cAMP. Paso **1**: El nivel basal de la actividad de PDE en ausencia de la hormona (estado de reposo) mantiene los niveles de cAMP por debajo de los necesarios para la activación de PKA. Paso **2**: La activación de los receptores β-adrenérgicos causa un incremento del nivel de cAMP mayor del que puede degradar la PDE. La unión resultante de cAMP a las subunidades reguladoras (R) de PKA libera las subunidades catalíticas (C) activas. Paso **3**: La fosforilación ulterior de PDE por PKA estimula su actividad catalítica, y por eso disminuye los niveles de cAMP a los valores basales y produce la reformación de la PKA inactiva. La desfosforilación ulterior de PDE (paso **4**) retorna el complejo al estado de reposo. (Adaptado de K. L. Dodge et al., 2001, *EMBO J.* 20:1921.)

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 13.3

Receptores acoplados a la proteína G que activan o inhiben a la adenililciclasa

- Las proteínas G triméricas transducen señales desde los receptores acoplados de la superficie celular a las proteínas efectoras asociadas, que son enzimas que forman segundos mensajeros o proteínas del canal catiónico (véase cuadro 13-1).
- Con más frecuencia, las señales son transducidas por G_α, una proteína interruptora GTPasa que alterna entre un estado activo ("*on*") con GTP fijado y un estado inactivo ("*off*") con GDP. En ocasiones, las subunidades β y γ que permanecen fijadas juntas, transducen señales.
- Los receptores ocupados por hormona actúan como GEF para las proteínas G_α, que catalizan la disociación de GDP y permiten que se fije GTP. El cambio resultante en la conformación de las regiones interruptoras en G_α hace que se disocie de la subunidad $G_{\beta\gamma}$ e interactúe con una proteína efectora (véase fig. 13-11).
- $G_{s\alpha}$, activada por múltiples tipos de GPCR, se fija y activa la adenililciclasa, lo que incrementa la síntesis de 3',5'-AMP cíclico (cAMP).
- La activación de proteincinasa A dependiente del cAMP (PKA) media los diversos efectos del cAMP en diferentes células. Los sustratos para PKA y, por lo tanto, la respuesta celular a la activación de PKA inducida por hormona varían entre los tipos celulares.
- En células hepáticas y musculares, la activación de PKA inducida por adrenalina y otras hormonas ejerce un efecto dual: inhibe la síntesis del glucógeno y estimula la degradación del glucógeno por medio de una cascada de cinasas (véase fig. 13-17).
- Las vías de señalización que comprenden segundos mensajeros y cascadas de cinasas amplifican de manera espectacular una señal externa (véase fig. 13-18).
- BARK fosforila receptores β-adrenérgicos fijados a ligando, que conducen a la fijación de β-arrestina y la endocitosis de los receptores. La reducción consecuente en la cantidad de receptores en la superficie celular deja a la célula menos sensible a la hormona adicional.
- La localización de PKA en regiones específicas de la célula por proteínas de anclaje restringe el efecto de cAMP en localizaciones subcelulares particulares.

13.4 Receptores acoplados a la proteína G que regulan a los canales iónicos

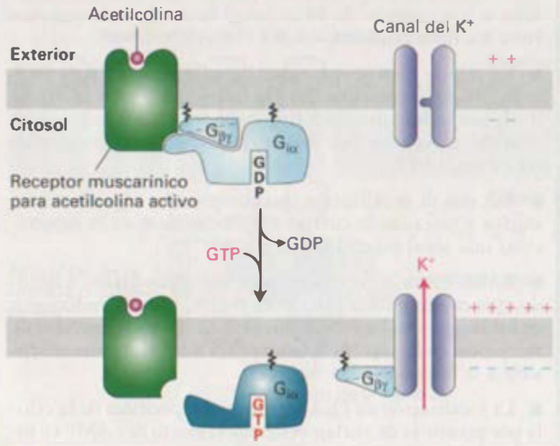
Como vimos en el capítulo 7, muchos receptores para neurotransmisores son canales iónicos regulados por ligandos. Éstos incluyen algunos tipos de receptores de glutamato y serotonina, así como el receptor nicotínico para acetilcolina encontrado en las sinapsis neuromusculares. Sin embargo, muchos receptores para neurotransmisores están acoplados a la

proteína G. La proteína efectora para algunos de éstos es un canal de Na^+ o K^+; la fijación de los neurotransmisores a estos receptores causa la apertura o el cierre del canal iónico asociado, que conduce a cambios en el potencial de membrana. Otros receptores para neurotransmisores, así como los receptores olfatorios en la nariz y los fotorreceptores en los ojos, son receptores acoplados a la proteína G que, de manera indirecta, modulan la actividad del canal iónico por medio de la acción de segundos mensajeros. En esta sección, consideramos dos receptores acoplados a la proteína G que ilustran los mecanismos directos e indirectos para la regulación de los canales iónicos: receptores muscarínicos para acetilcolina y receptores acoplados a G_t.

Los receptores cardíacos muscarínicos para acetilcolina activan una proteína G que abre los canales del K^+

La fijación de la acetilcolina a los receptores nicotínicos para acetilcolina en las células del músculo estriado genera un potencial de acción que activa la contracción muscular (véase fig. 7-45). Por el contrario, los *receptores muscarínicos para acetilcolina* en el músculo cardíaco son inhibidores. La fijación de acetilcolina a estos receptores disminuye la frecuencia de contracción del músculo cardíaco porque causa una hiperpolarización de larga duración (varios segundos) de la membrana de la célula muscular. Esto puede estudiarse en forma experimental mediante el agregado directo de acetilcolina al músculo cardíaco en cultivo.

La activación del receptor muscarínico para acetilcolina, que está acoplada a la proteína G_i, conduce a la apertura de los canales del K^+ asociados; la salida ulterior de iones K^+ causa hiperpolarización de la membrana plasmática. Como se representa en la figura 13-21, la señal proveniente de los receptores activados es transducida a la proteína efectora por la subunidad $G_{\beta\gamma}$ liberada en lugar de G_α·GTP. Mediante la técnica del pinzamiento zonal (*patch clamp*) se puede medir el flujo a través de un canal iónico individual en una pequeña placa de membrana (véase fig. 7-17). Cuando se agregó proteína $G_{\beta\gamma}$ purificada a la cara citosólica de una placa de membrana plasmática de músculo cardíaco, los canales del K^+ se abrieron de inmediato, incluso en ausencia de acetilcolina u otros neurotransmisores.



▲ Fig. 13-21. Modelo de funcionamiento del receptor muscarínico para acetilcolina en la membrana plasmática del músculo cardiaco. Estos receptores están ligados por medio de una proteína G trimérica a los canales del K^+. La unión de acetilcolina induce la activación de la subunidad $G_{i\alpha}$ y su disociación de la subunidad $G_{\beta\gamma}$ de la manera habitual (véase fig. 13-11). En este caso, la subunidad $G_{\beta\gamma}$ liberada (en lugar de $G_{i\alpha}$·GTP) se une al efector asociado y lo abre, un canal del K^+. El aumento de la permeabilidad al K^+ hiperpolariza la membrana, lo cual reduce la frecuencia de contracción del músculo cardíaco. Si bien no se muestra aquí, la activación finaliza cuando el GTP fijado a $G_{i\alpha}$ es hidrolizado a GDP y $G_{i\alpha}$·GDP se recombina con $G_{\beta\gamma}$. (Véase K. Ho et al., 1993, *Nature* 362:31 y Y. Kubo et al., 1993, *Nature* 362:127.)

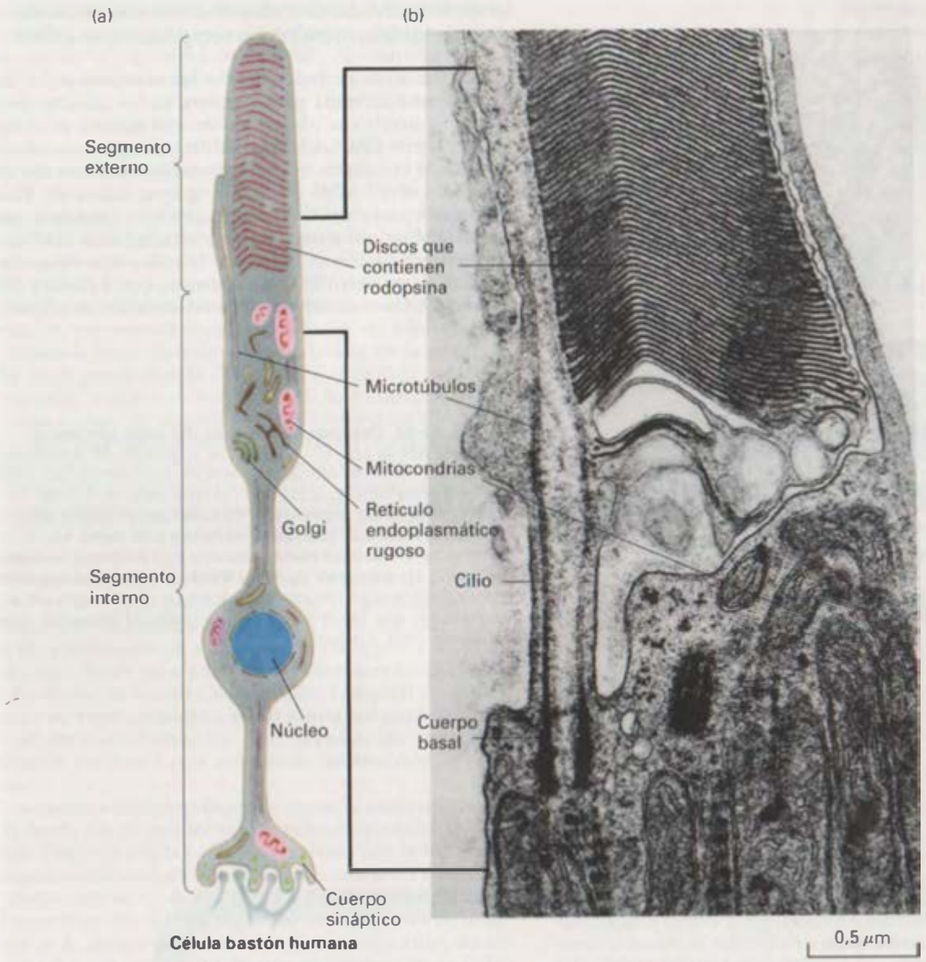
Los receptores acoplados a G_t son activados por la luz

La retina humana contiene dos tipos de fotorreceptores, *bastones* y *conos*, que son los receptores primarios de la estimulación visual. Los conos participan en la visión del color, mientras que los bastones son estimulados por la luz débil, como la de la luna, en un espectro de longitud de ondas. Los fotorreceptores forman sinapsis en capas superpuestas de interneuronas que están inervadas por diferentes combinaciones de células fotorreceptoras. Todas estas señales son procesadas e interpretadas por una parte del cerebro denominada *corteza visual*.

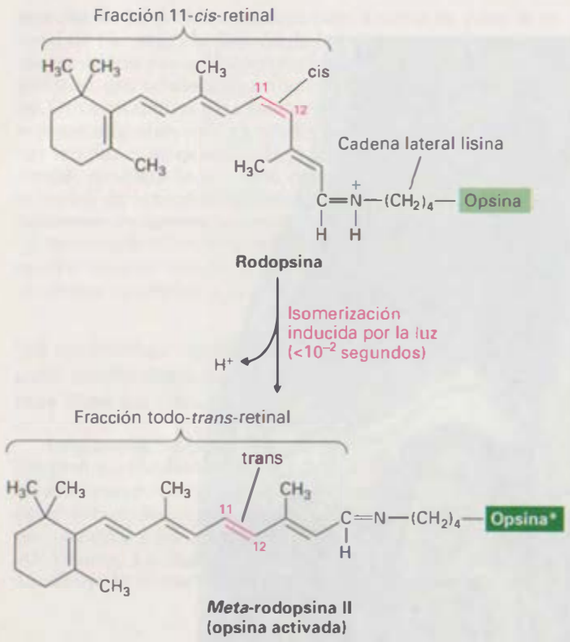
La *rodopsina*, un receptor acoplado a la proteína G que es activada por la luz, está localizada en los casi mil discos membranosos aplanados que forman el segmento externo de los bastones (fig. 13-22). La proteína G trimérica acoplada a la rodopsina, a menudo denominada *transducina* (G_t), se encuentra sólo en los bastones. Un bastón humano contiene cerca de 4×10^7 moléculas de rodopsina, que consiste en una proteína *opsina* de siete fragmentos a la cual se le fija en forma covalente el pigmento 11-*cis*-retinal que absorbe la luz. Con la absorción de un fotón, la molécula retinal de la rodopsina se convierte con rapidez al isómero todo-trans, que produce un cambio conformacional en la porción de la opsina que lo activa (fig. 13-23). Esto es equivalente al cambio conformacional que sucede con la fijación del ligando por otros receptores acoplados a la proteína G. La forma resultante en la cual la opsina está fijada en forma covalente al isómero todo-*trans*-retinal se denomina *metarrodopsina II* u *opsina activada*. De manera similar a otros receptores acoplados a proteína G, esta forma de rodopsina activada por la luz interactúa con la proteína G asociada y la activa (es decir, G_t). La opsina activada es inestable y se disocia en forma espontánea en sus partes componentes, que liberan opsina y todo-*trans*-retinal, que, en consecuencia, finaliza la señalización visual. En la oscuridad, el todo-*trans*-retinal libre se convierte de nuevo en 11-*cis*-retinal, que puede volver a unirse a la opsina, y reformar rodopsina.

En la oscuridad, el potencial de membrana de un bastón es de alrededor de -30 mV, considerablemente menor que el potencial en reposo (-60 a -90 mV) típico de las neuronas y otras células activas desde el punto de vista eléctrico. Como consecuencia de esta despolarización, los bastones en la oscuridad segregan neurotransmisores en forma constante y las interneuronas bipolares con las cuales hacen sinapsis se estimulan en forma continua. El estado despolarizado de la membrana plasmática de los bastones en reposo se debe a la presencia de gran cantidad de canales iónicos *no selectivos* abiertos que admiten Na^+ y Ca^{2+}, así como K^+. La absorción de la luz por rodopsina conduce al cierre de estos canales y hace que el potencial de membrana se torne *más* negativo.

Cuanto más fotones son absorbidos por rodopsina, más canales se cierran, menor cantidad de iones Na^+ atraviesan la membrana desde el exterior, el potencial de membrana se torna más negativo y se liberan menos neurotransmisores. Este cambio es transmitido al cerebro donde es percibido como luz. Cabe destacar que un fotón individual absorbido por un bastón en reposo produce una respuesta que puede medirse, una disminución en el potencial de membrana de alrededor de 1 mV, que en los anfibios dura un segundo o dos. Los seres humanos pueden detectar un destello de sólo cinco fotones.



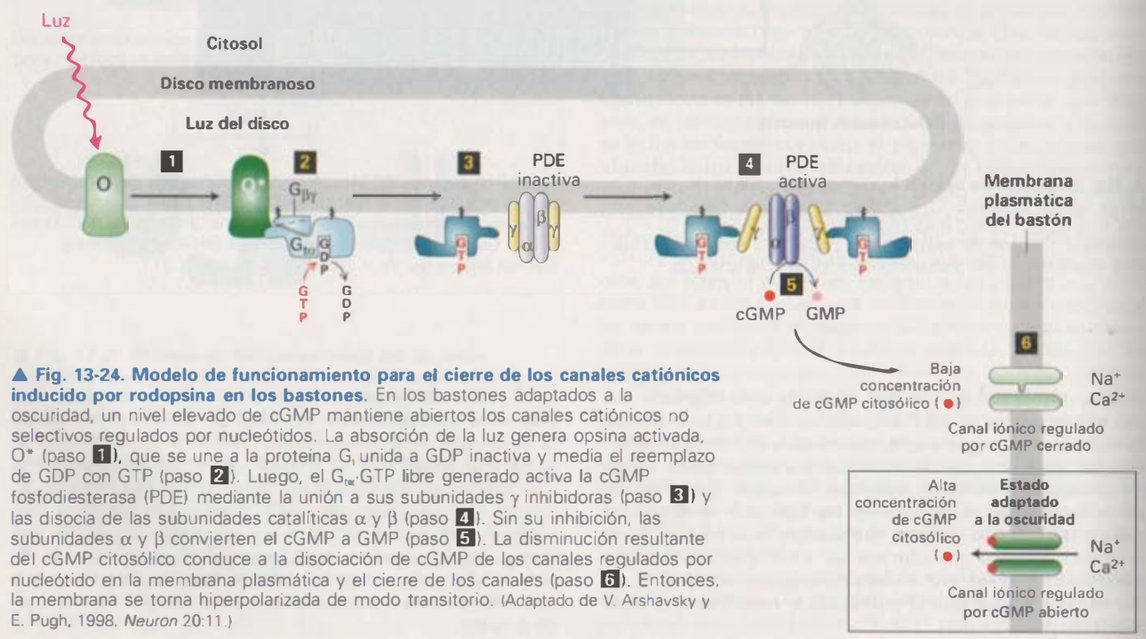
▲ Fig. 13-22. Célula bastón humana. (a) Esquema de una célula bastón completa. En el cuerpo sináptico, el bastón forma una sinapsis con una o más interneuronas bipolares. La rodopsina, un receptor acoplado a la proteína G sensible a la luz, está localizada en los discos membranosos aplanados del segmento externo. (b) Microfotografía electrónica de la región del bastón indicada por el corchete en (a). Esta región incluye la unión de los segmentos interno y externo. [Parte (b) de R. G. Kessel y R. H. Kardon, 1979, *Tissues and Organs: A Text-Atlas of Scanning Electron Microscopy*, W. H. Freeman y Company, p. 91.]



La activación de la rodopsina induce el cierre de los canales catiónicos regulados por cGMP

La molécula de transducción fundamental en la unión de la opsina activada para el cierre de los canales catiónicos en la membrana plasmática de los bastones es el segundo mensajero GMP cíclico (cGMP). Los segmentos externos del bastón contienen una concentración más elevada de lo habitual (≈0,07 mM) de cGMP, que se forma de manera continua a partir del GTP en una reacción catalizada por la guanililciclasa que parece no ser afectada por la luz. Sin embargo, la absorción de la luz por la rodopsina induce la activación de una *cGMP fosfodiesterasa*, que hidroliza cGMP a 5'-GMP. Como resultado, la concentración de cGMP disminuye con la iluminación. El nivel elevado de cGMP presente en la oscuridad actúa para mantener abiertos *los canales catiónicos regulados por cGMP*; la disminución de cGMP inducida por la luz conduce al cierre del canal, la hiperpolarización de la membrana y la reducción en la liberación de neurotransmisores.

◀ **Fig. 13-23. Desencadenamiento del estímulo visual inducido por la luz.** El 11-*cis*-retinal, pigmento de absorción de la luz, está unido en forma covalente al grupo amino del residuo de lisina en la opsina, la porción proteica de la rodopsina. La absorción de la luz causa una fotoisomerización rápida del isómero *cis*-retinal al todo-*trans*-retinal, lo que forma el intermediario inestable *meta*-rodopsina II, o la opsina activada, que activa las proteínas G_t. En el transcurso de unos segundos todo-*trans*-retinal se disocia de la opsina y se convierte en el isómero *cis*, que luego se une a otra molécula de opsina. (Véase J. Nathans, 1992, *Biochemistry* 31:4923.)



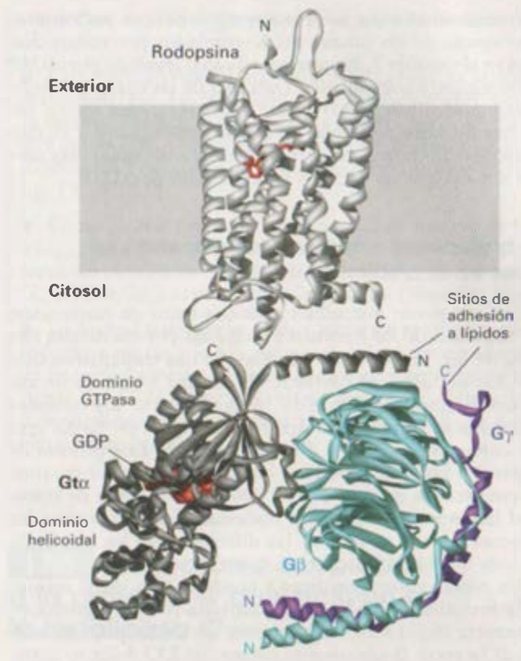
▲ **Fig. 13-24. Modelo de funcionamiento para el cierre de los canales catiónicos inducido por rodopsina en los bastones.** En los bastones adaptados a la oscuridad, un nivel elevado de cGMP mantiene abiertos los canales catiónicos no selectivos regulados por nucleótidos. La absorción de la luz genera opsina activada, O* (paso 1), que se une a la proteína G_t unida a GDP inactiva y media el reemplazo de GDP con GTP (paso 2). Luego, el $G_{t\alpha}$·GTP libre generado activa la cGMP fosfodiesterasa (PDE) mediante la unión a sus subunidades γ inhibidoras (paso 3) y las disocia de las subunidades catalíticas α y β (paso 4). Sin su inhibición, las subunidades α y β convierten el cGMP a GMP (paso 5). La disminución resultante del cGMP citosólico conduce a la disociación de cGMP de los canales regulados por nucleótido en la membrana plasmática y el cierre de los canales (paso 6). Entonces, la membrana se torna hiperpolarizada de modo transitorio. (Adaptado de V. Arshavsky y E. Pugh, 1998, *Neuron* 20:11.)

Como se representa en la figura 13-24, la cGMP fosfodiesterasa es la proteína efectora para G_t. El complejo $G_{t\alpha}$·GTP libre que se genera después de la absorción de la luz por rodopsina se fija a las dos subunidades inhibidoras γ de cGMP fosfodiesterasa, que libera las subunidades catalíticas activas α y β, que con posterioridad convierten el cGMP a GMP. Éste es otro ejemplo del modo por el cual la eliminación de un inhibidor inducido por la señal activa una enzima, un mecanismo común en las vías de señalización. Una molécula individual de opsina activada en la membrana del disco puede activar 500 moléculas de $G_{t\alpha}$, cada una de las cuales activa a su vez la cGMP fosfodiesterasa; éste es el primer paso de amplificación de la señal en el sistema visual. Aun cuando la activación de cGMP fosfodiesterasa conduce a una disminución del segundo mensajero, cGMP, esta activación sucede por el mismo mecanismo general descrito antes, excepto que la absorción de la luz por rodopsina, en lugar de la fijación del ligando, es la señal de activación (véase fig. 13-11).

La conversión del $G_{t\alpha}$·GTP activo a su forma de $G_{t\alpha}$·GDP inactivo es acelerada por una proteína de activación de la GTPasa (GAP) específica para $G_{t\alpha}$·GTP. En los mamíferos $G_{t\alpha}$ suele permanecer en su estado activo fijado a GTP sólo por fracción de un segundo. En consecuencia, la cGMP fosfodiesterasa se inactiva con rapidez y el nivel de cGMP aumenta en forma gradual a su nivel original cuando se elimina el estímulo lumínico. Esto permite las respuestas rápidas de los ojos hacia objetos en movimiento o cambiantes.

Los estudios cristalográficos de rayos X recientes revelaron el modo por el cual las subunidades de proteína G_t interactúan entre sí y con la rodopsina activada por la luz y proporcionan indicios acerca de cómo la fijación de GTP conduce a la disociación de G_α de $G_{\beta\gamma}$ (fig. 13-25). Dos superficies de $G_{t\alpha}$ interactúan con G_β: una región N-terminal cerca de la superficie de la membrana y las dos regiones adyacentes del interruptor I y del interruptor II, que se encuentran en todas las proteínas G_α. Si bien G_β y G_γ también contactan entre sí, G_γ no contacta con $G_{t\alpha}$.

Los estudios con receptores adrenérgicos descritos antes indican que la fijación del ligando a un receptor acoplado a la proteína G hace que las hélices transmembrana en el receptor se deslicen en forma relativa entre sí, lo que produce un cambio conformacional en los bucles citosólicos que crean un sitio de fijación para la proteína G trimérica acoplada. Las estructuras cristalográficas de la figura 13-25 sugieren que el dominio de fijación al nucleótido de $G_{t\alpha}$, junto con el lípido fijo en el C-terminal de G_γ y en el N-terminal de $G_{t\alpha}$ forma una superficie que se fija a la rodopsina activada por la luz (O* en la figura 13-24), que estimula la liberación de GDP de $G_{t\alpha}$ y la fijación ulterior de GTP. Los cambios conformacionales posteriores en $G_{t\alpha}$, en particular los producidos dentro de los interruptores I y II, alteran las interacciones moleculares entre $G_{t\alpha}$ y $G_{\beta\gamma}$, que conduce a su disociación. Los estudios estructurales con rodopsina y G_t se corresponden con los datos de otros receptores acoplados a la proteína G y se considera que pueden aplicarse a todos los receptores de este tipo.



▲ **Fig. 13-25. Modelos estructurales de rodopsina y su proteína G_t asociada.** Las estructuras de rodopsina y de las subunidades $G_{t\alpha}$ y $G_{\beta\gamma}$ se obtuvieron por cristalografía de rayos X. En este modelo no se muestra el segmento C-terminal de la rodopsina. La orientación de $G_{t\alpha}$ con respecto a la rodopsina y la membrana es hipotética; está basada en la carga y la hidrofobicidad de las superficies proteicas y los sitios de fijación conocidos de la rodopsina sobre $G_{t\alpha}$. Como en otras proteínas G triméricas, las subunidades $G_{t\alpha}$ y G_α contienen lípidos unidos en forma covalente que se considera están insertados en la membrana. En la forma unida a GDP mostrada aquí (GDP, rojo), la subunidad α (gris) y la subunidad β (celeste) interactúan entre sí, como lo hacen las subunidades β y γ (violeta), si bien la subunidad γ pequeña, que contiene sólo dos hélices α, no contacta con la subunidad α. Se considera que los diversos segmentos de la subunidad α interactúan con un receptor activado, que produce un cambio conformacional que estimula la liberación de GDP y la unión de GTP. A su vez, esta última induce cambios conformacionales grandes en las regiones interruptoras de $G_{t\alpha}$, que conduce a la disociación de $G_{t\alpha}$ de $G_{\beta\gamma}$. La estructura de una subunidad $G_{s\alpha}$ en la forma unida de GTP que interactúa con una proteína efectora, se muestra en la figura 13-14b. (Adaptada de H. Hamm, 2001, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 98:4819 y D. G. Lambright et al., 1996, *Nature* 379:311.)

El apoyo directo del papel del cGMP en la actividad de los bastones se obtuvo mediante la técnica de patch-clamp, que utiliza placas aisladas de segmentos externos de la membrana plasmática de los bastones, que contienen abundantes canales catiónicos regulados por cGMP. Cuando se agrega cGMP a la superficie citosólica de estas placas, hay un aumento rápido en la cantidad de canales iónicos abiertos. El efecto aparece en ausencia de proteincinasas o fosfatasas y el cGMP actúa en forma directa en los canales para mantenerlos abiertos; esta

observación indica que son canales regulados por nucleótidos. A semejanza de los canales del K^+ regulados por voltaje descritos en el capítulo 7, la proteína del canal regulado por cGMP contiene cuatro subunidades, cada una de las cuales puede fijar una molécula de cGMP (véase fig. 7-36a). Para abrir el canal, tres o cuatro moléculas de cGMP deben fijarse a él; esta interacción alostérica convierte la abertura del canal muy sensible a los pequeños cambios en los niveles de cGMP.

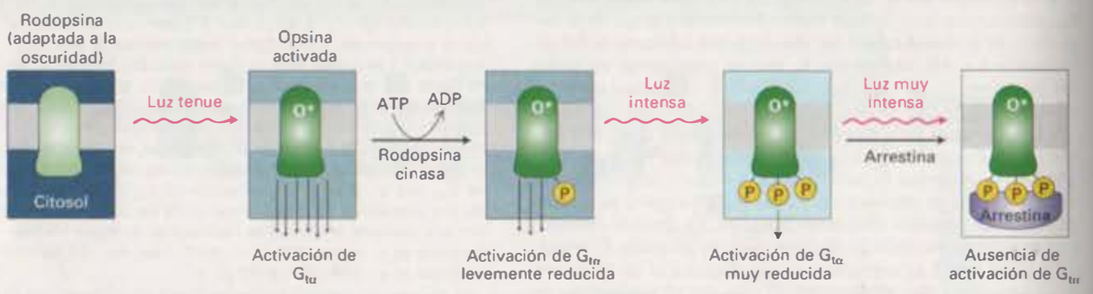
Los bastones se adaptan a niveles variados de luz en el ambiente

Los conos son insensibles a niveles bajos de iluminación y la actividad de los bastones es inhibida por los niveles elevados de luz. En consecuencia, cuando nos trasladamos desde la luz del día a una habitación con luz tenue, en un comienzo estamos enceguecidos. A medida que los bastones lentamente se tornan sensibles a la luz tenue, en forma gradual comenzamos a ver y distinguir objetos. Este proceso de *adaptación visual* le permite a los bastones percibir contrastes que exceden en más de 100.000 veces el rango de intensidad luminosa ambiental; en consecuencia, para formar las imágenes visuales se utilizan las diferencias en los niveles de luz, más que la cantidad absoluta de luz absorbida.

Un proceso que contribuye a la adaptación visual involucra la fosforilación de la opsina activada (O^*) por la *rodopsina cinasa* (fig. 13-26). Esta enzima de los bastones es análoga al receptor β-adrenérgico cinasa (BARK) descrito antes. Cada molécula de opsina tiene tres sitios principales de fosforilación de serina; cuanto más sitios están fosforilados, es menos posible que O^* active G_t y por esto induzca el cierre de los canales catiónicos regulados por cGMP. En efecto, los bastones provenientes de ratones con rodopsinas mutantes que no poseen ninguno o sólo uno de estos residuos de serina muestran una velocidad más lenta que lo normal de desactivación en la luz brillante. Debido a que la magnitud de la fosforilación de la opsina es proporcional a la cantidad del tiempo que cada molécula de opsina insume en la forma activada por la luz, es una medida del nivel de luz de base (ambiente). En condiciones de iluminación alta, la opsina fosforilada es abundante y la activación de G_t es reducida; por consiguiente, será necesario un aumento mayor en el nivel de luz para generar una señal visual. Cuando el nivel de luz ambiente es reducido, las opsinas se desfosforilan y aumenta la capacidad para activar G_t; en este caso, serán necesarios menos fotones adicionales para generar una señal visual.

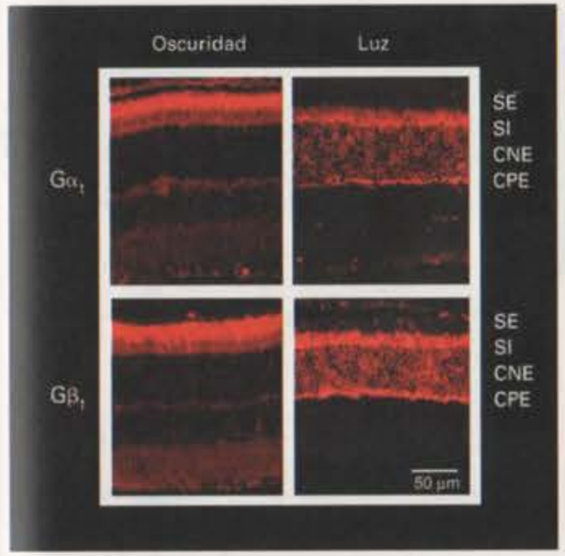
En ambientes muy iluminados (como sucede a plena luz del mediodía), el nivel de fosforilación de la opsina es tal que la proteína β-arrestina se fija al segmento C-terminal de la opsina. La β-arrestina fijada impide la interacción de G_t con O^*, bloquea por completo la formación del complejo $G_{t\alpha}$·GTP activo y produce la interrupción de toda actividad del bastón. El mecanismo por el cual se controla la actividad de los bastones por la rodopsina cinasa y la arrestina es similar a la adaptación (o desensibilización) de otros receptores acoplados a la proteína G en presencia de niveles elevados de ligando.

Un segundo mecanismo de adaptación visual parece ser singular para los bastones. En las células adaptadas a la oscuridad casi todas las subunidades $G_{t\alpha}$ y $G_{t\beta\gamma}$ están en los segmentos externos. Pero la exposición durante 10 minutos a intensidades moderadas de la luz del día hace que más del 80% de las subunidades $G_{t\alpha}$ y $G_{t\beta\gamma}$ se muevan desde los segmentos externos al interior de otros compartimientos celulares (fig. 13-27). Se desconoce el mecanismo por el cual estas proteínas se movilizan, pero como resultado de esta adaptación las proteínas G_t son incapaces de fijarse en forma física a la opsina activada. Como sucede en otras vías de señalización, se utilizan múltiples mecanismos para inactivar la señalización durante la adaptación visual, quizá para permitir el control estricto de la activación de las vías de señalización con amplias variaciones de iluminación.



▲ Fig. 13-26. Papel de la fosforilación de la opsina en la adaptación de los bastones a los cambios en la intensidad luminosa. La opsina activada por la luz (O^*), pero no la rodopsina adaptada a la oscuridad, es un sustrato para la rodopsina cinasa. La magnitud de la fosforilación de la opsina es directamente proporcional a la cantidad de tiempo que cada molécula de opsina insume en la forma activada por la luz y, por lo tanto, el nivel de la luz ambiente promedio en los pocos minutos previos. La capacidad de O^* para activar $G_{t\alpha}$ es inversamente proporcional a la cantidad de residuos fosforilados. Por consiguiente, cuanto mayor es la intensidad luminosa ambiental, mayor la magnitud de la fosforilación de la opsina y mayor el incremento en el nivel de luz necesario para activar la misma cantidad de moléculas de $G_{t\alpha}$ (transducina). Ante niveles muy elevados de luz, la arrestina se fija a la opsina completamente fosforilada y forma un complejo que no puede activar en absoluto la transducina. (Véase L. Lagnado y D. Baylor, 1992, *Neuron* 8:995 y A. Mendez et al., 2000, *Neuron* 28:153.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación general: Señalización extracelular



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 13-27 El movimiento de G_t desde los segmentos externos de los bastones contribuye a la adaptación visual. Como se muestra por tinción con inmunofluorescencia de retinas en ratas adaptadas a la oscuridad, ambas subunidades α y β de la transducina ($G\alpha_t$ y $G\beta_t$) están localizadas en los segmentos externos (SE) de los bastones, donde pueden ser activadas por los fotorreceptores rodopsina, en los discos membranosos (véase fig. 13-22). Después de varios minutos de luz brillante, la mayoría de las subunidades α y β de transducina se han movido al segmento interno (SI) de los bastones, donde no pueden interactuar con la opsina activa; esto contribuye a la desensibilización de los bastones a intensidades de luz elevadas. CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa. (De M. Sokolov et al., 2002, *Neuron* 33:95. Gentileza de Vadim Arshavsky, Harvard Medical School.)

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 13.4

Receptores acoplados a la proteína G que regulan a los canales iónicos

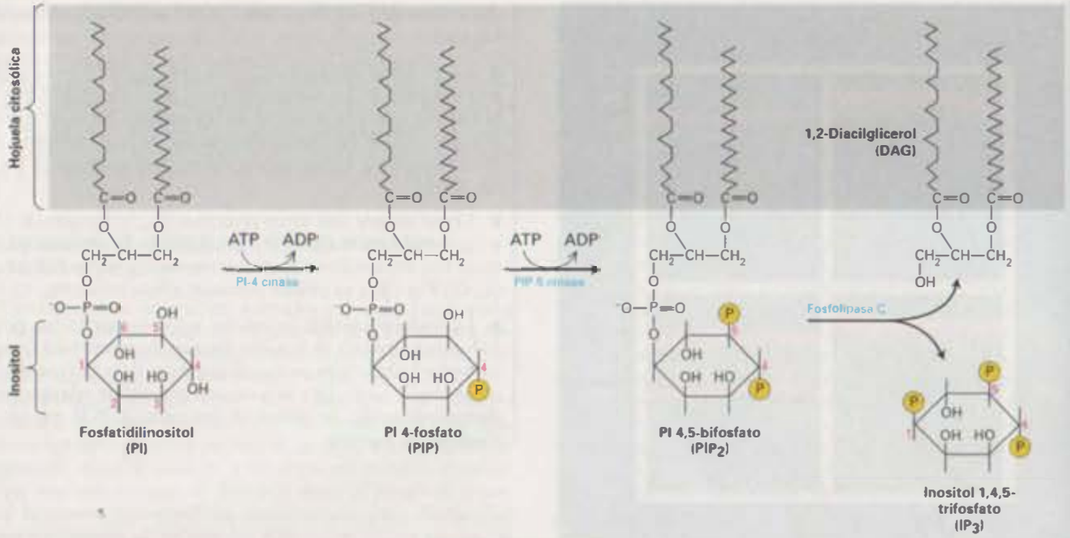
- El receptor muscarínico para acetilcolina cardíaco es un GPCR cuya proteína efectora es un canal del K^+. La activación del receptor causa la liberación de la subunidad $G_{\beta\gamma}$, que abre los canales del K^+ (véase fig. 13-21). La hiperpolarización de la membrana celular resultante disminuye la frecuencia de la contracción del músculo cardíaco.
- La rodopsina, el GPCR fotosensible en los bastones, comprende la proteína opsina ligada al 11-*cis*-retinal. La isomerización inducida por la luz de la molécula 11-*cis*-retinal produce opsina activada, la cual activa luego la proteína G trimérica transducina (G_t) que cataliza el intercambio de GTP libre por el GDP unido a la subunidad $G_{t\alpha}$.
- La proteína efectora activada por $G_{t\alpha}$·GTP es la cGMP fosfodiesterasa. La reducción en el nivel de cGMP por esta enzima conduce al cierre de los canales Na^+/Ca^{2+} regulados por cGMP, la hiperpolarización de la membrana y la disminución en la liberación de neurotransmisores (véase fig. 13-24).
- Como sucede con otras proteínas G_α, la fijación de GTP a $G_{t\alpha}$ causa cambios conformacionales en la proteína que alteran sus interacciones moleculares con $G_{\beta\gamma}$ y posibilitan que $G_{t\alpha}$·GTP se fije a su efector corriente abajo (véase fig. 13-25).
- La fosforilación de la opsina activada por la luz por la rodopsina cinasa y la fijación ulterior de arrestina a la opsina fosforilada inhibe su capacidad de activar la transducina (véase fig. 13-26). Este mecanismo general de adaptación, o desensibilización, es utilizado por otros GPCR en niveles elevados de ligando.

13.5 Receptores acoplados a la proteína G que activan a la fosfolipasa C

En esta sección, describimos las vías de transducción de señales activadas por GPCR que involucran diversos segundos mensajeros y los mecanismos por los cuales regulan diversas actividades celulares. Muchos de estos segundos mensajeros derivan del *fosfatidilinositol* (PI). El grupo inositol en este fosfolípido, que se extiende al interior del citosol adyacente a la membrana, puede ser fosforilado en forma reversible en varias posiciones mediante la acción combinada de diversas cinasas y fosfatasas. Estas reacciones producen varios *fosfoinosítidos* fijados a la membrana diferentes, dos de los cuales están representados en la figura 13-28.

Los niveles de muchos fosfoinosítidos en las células están regulados en forma dinámica por señales extracelulares, en especial los que se fijan al receptor tirosincinasa o receptores citocina, descritos en el próximo capítulo. El fosfoinosítido PIP_2 (PI 4,5-bifosfato) fija muchas proteínas citosólicas a la membrana plasmática. Algunas de estas proteínas son requeridas para formar y remodelar el citoesqueleto de actina (cap. 19); otras lo son para la fijación de proteínas importantes para la endocitosis y fusiones de vesículas (cap. 17).

PIP_2 también es hidrolizado por la enzima fosfolipasa C (PLC) asociada con la membrana plasmática para generar dos segundos mensajeros importantes: 1,2-diacilglicerol (DAG), una molécula lipofílica que permanece asociada con la membrana e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), que se difunde al interior del citosol (véase fig. 13-28). Nos referiremos a los acontecimientos corriente abajo que involucran a estos dos segundos mensajeros en conjunto como *vía IP_3/DAG*. La fijación de la hormona a los receptores acoplados, ya sea a la proteína G_o o a la G_q (véase cuadro 13-1) induce la activación de la isoforma β de la fosfolipasa C (PLCβ) por el mecanismo general que se ejemplifica en la figura 13-11.



▲ Fig. 13-28. Síntesis de DAG e IP3 a partir del fosfatidilinositol (PI) de la membrana. Cada PI cinasa unida a la membrana coloca un fosfato (círculos amarillos) en un grupo hidroxilo específico en el anillo inositol y produce fosfoinosítidos PIP y PIP_2. La hidrólisis de PIP_2 por la fosfolipasa C (PLC) da los dos segundos mensajeros importantes DAG e IP_3. (Véase A. Toker y L. C. Cantley, 1997, *Nature* 387:673 y C. L. Carpenter y L. C Cantley, 1996, *Curr. Opin. Cell Biol.* 8:153.)

El inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) activa la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático

La mayor parte de los iones Ca^{2+} intracelular es secuestrada en las mitocondrias y en la luz del retículo endoplasmático (RE) y otras vesículas. Las células emplean varios mecanismos para la regulación de la concentración de iones Ca^{2+} en el citosol, que suele mantenerse por debajo de 0,2 μM. Por ejemplo, las Ca^{2+} ATPasas bombean los iones Ca^{2+} citosólico a través de la membrana plasmática al exterior de la célula o hacia la luz de los compartimientos que almacenan Ca^{2+} intracelular (véase fig. 7-7). Como veremos más adelante, una elevación pequeña del Ca^{2+} citosólico induce diversas respuestas celulares y en consecuencia la concentración de Ca^{2+} citosólico es controlada de manera cuidadosa.

La unión de muchas hormonas a sus receptores de la superficie celular en hepatocitos, adipocitos y otras células induce una elevación del Ca^{2+} citosólico aun cuando los iones de Ca^{2+} están ausentes en el líquido extracelular circulante. En esta situación, el Ca^{2+} se libera al citosol proveniente de la luz del RE mediante la participación de un *canal del Ca^{2+} regulado por IP_3* en la membrana del RE. Esta proteína grande se compone de cuatro subunidades idénticas, cada una de las cuales contiene un sitio de fijación al IP_3 en el dominio citosólico N-terminal. La fijación del IP_3 induce la apertura del canal que permite salir los iones Ca^{2+} desde el RE al citosol (fig. 13-29). Cuando diversos inositoles fosforilados encontrados en las células se agregan a las preparaciones de las vesículas del RE, sólo IP_3 produce la liberación de iones Ca^{2+} desde las vesículas. Este simple experimento demuestra la especificidad del efecto IP_3.

La elevación del nivel de Ca^{2+} citosólico mediada por el IP_3 es sólo transitoria porque las Ca^{2+} ATPasas localizadas en la membrana plasmática y en la membrana del RE realizan el bombeo activo del Ca^{2+} desde el citosol hacia el exterior de la célula y la luz del RE, respectivamente. Además, en el transcurso de un segundo desde su generación, se hidroliza un fosfato específico en IP_3 para dar inositol 1,4-bifosfato, que no estimula la liberación de Ca^{2+} desde el RE.

Sin algunos medios para reponer las reservas deplecionadas de Ca^{2+} intracelular, una célula pronto sería incapaz de incrementar el nivel de Ca^{2+} citosólico en respuesta a IP_3 inducido por hormona. Los estudios mediante patch-clamp revelaron que un canal del Ca^{2+} de la membrana plasmática, denominado canal TRP o canal operado por las reservas, se abre en respuesta a la depleción de las reservas de Ca^{2+} del RE (véase fig. 13-29). De un modo no comprendido en su totalidad, la depleción de Ca^{2+} en la luz del RE conduce a un cambio conformacional en el canal del Ca^{2+} regulado por IP_3 que le permite fijarse al canal del Ca^{2+} TRP en la membrana plasmática y produce su apertura más tardía. De hecho, la expresión en células de un fragmento específico de canal del Ca^{2+} regulado por IP_3 de la membrana del RE evita la apertura del canal TRP ante la depleción de las reservas de Ca^{2+} del RE, lo que implica una interacción entre los dos canales del Ca^{2+} en la apertura del canal TRP.

La apertura de los canales del Ca^{2+} regulados por IP_3 es potenciada por los iones de los canales del Ca^{2+}, que incrementa la afinidad de estos receptores del canal para IP_3 y conduce a una mayor liberación del Ca^{2+} almacenado. Sin embargo, las concentraciones más elevadas de Ca^{2+} citosólico inhiben la liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 desde las reservas intracelulares al disminuir la afinidad del receptor para IP_3. Esta regulación compleja de los canales del Ca^{2+} regulados por IP_3 en las membranas del RE por el Ca^{2+} citosólico puede conducir a oscilaciones rápidas en el nivel del Ca^{2+} citosólico cuando se estimula la vía IP_3 en las células. Por ejemplo, la estimulación de las células que segregan hormona en la hipófisis por la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) causa elevaciones bruscas y repetidas (espigas) en el nivel de Ca^{2+} citosólico; cada espiga se asocia con un estallido en la secreción de la hormona luteinizante (LH). No se comprende el objetivo de las fluctuaciones de Ca^{2+}, en lugar de las elevaciones sostenidas citosólicas. Una posibilidad es que una elevación sostenida del Ca^{2+} puede ser tóxica para las células.

El diacilglicerol (DAG) activa la proteincinasa C, que regula muchas otras proteínas

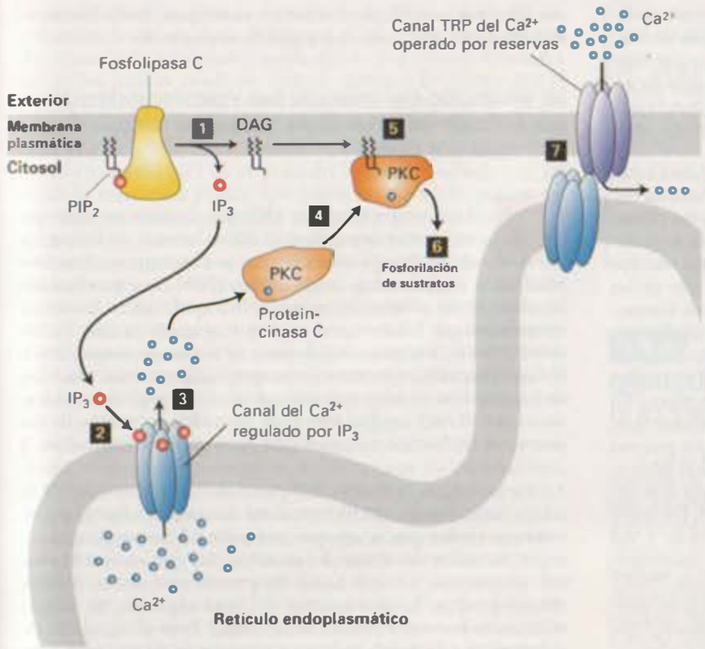
Después de su formación por hidrólisis de PIP_2 u otros fosfoinosítidos, DAG permanece asociado con la membrana plasmática. La función principal de DAG es activar una familia de proteincinasas denominadas en conjunto proteincinasa C (PKC). En ausencia de estimulación hormonal, la proteincinasa C está presente como una proteína citosólica soluble que es inactiva desde el punto de vista catalítico. Una elevación del nivel de Ca^{2+} citosólico hace que la proteincinasa C se fije a la hoja citosólica de la membrana plasmática, donde el DAG asociado con la membrana pueden activarla. En consecuencia, la activación de proteincinasa C depende del aumento tanto de los iones de Ca^{2+} como de DAG, lo que sugiere una interacción entre las dos ramas de la vía IP$_3$/DAG (véase fig. 13-29).

La activación de la proteincinasa C en diferentes células produce diversas respuestas celulares, lo cual indica que desempeña un papel fundamental en muchos aspectos del crecimiento y de metabolismo celular. Por ejemplo, en los hepatocitos la proteincinasa C ayuda a regular el metabolismo del glucógeno por fosforilación y por esto inhibe a la glucógeno sintasa. También fosforila varios factores de transcripción, de acuerdo con el tipo celular; éstos inducen la síntesis de distintos mRNA que activan la proliferación celular.

El complejo Ca^{2+}/calmodulina media muchas respuestas celulares para señales externas

La fijación del ligando a diversos tipos de receptores, además de los receptores acoplados a la proteína G, puede activar la isoforma de fosfolipasa C, que conduce a un aumento del nivel de Ca^{2+} libre en el citosol mediado por IP_3. Este aumento localizado del Ca^{2+} en tipos celulares específicos es fundamental para su función como segundo mensajero. Por ejemplo, la estimulación por acetilcolina de los receptores acoplados a la proteína G en las células secretoras del páncreas y de la parótida induce una elevación del Ca^{2+} mediado por IP_3 que activa la fusión de las vesículas secretoras con la membrana plasmática y la liberación de sus contenidos dentro del espacio extracelular. En las plaquetas, la elevación del Ca^{2+} inducida por la estimulación con trombina activa un cambio conformacional en estos fragmentos celulares que conduce a su agregación, un paso importante en el taponamiento de las soluciones de continuidad en los vasos sanguíneos. La secreción de insulina por las células pancreáticas β también es estimulada por el Ca^{2+}, si bien el aumento en el Ca^{2+} se produce por un mecanismo diferente (véase fig. 15-7).

Una proteína citosólica pequeña denominada calmodulina, con una distribución ubicua en las células eucariontes, funcio-



◀ Fig. 13-29. Vía IP_3/DAG y elevación del Ca^{2+} citosólico. Esta vía puede ser activada mediante la unión del ligando a ciertos receptores acoplados a la proteína G y otros varios tipos de receptores, que conducen a la activación de la fosfolipasa C. La escisión de PIP_2 por la fosfolipasa C da IP_3 y DAG (paso 1). Después de la difusión al citosol, IP_3 interactúa y abre los canales del Ca^{2+} en la membrana del retículo endoplasmático (paso 2), que produce la liberación de los iones de Ca^{2+} almacenados dentro del citosol (paso 3). Una de las diversas respuestas celulares inducidas por una elevación del Ca^{2+} citosólico es el reclutamiento de la proteincinasa C (PKC) en la membrana plasmática (paso 4), donde es activada por DAG (paso 5). La cinasa activada puede fosforilar diversas enzimas y receptores celulares, que, en consecuencia, alteran su actividad (paso 6). Cuando se deplecionan las reservas de Ca^{2+} del retículo endoplasmático, los canales del Ca^{2+} regulados por IP_3 se unen y abren a los canales TRP (*transient receptor potencial*) del Ca^{2+} operado por reservas en la membrana plasmática, lo que permite el ingreso del Ca^{2+} extracelular (paso 7). (Adaptado de J. W. Putney, 1999, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 96:14669.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación focalizada: Segundos mensajeros en las vías de señalización

na como una proteína interruptora multipropósito que media muchos efectos celulares de los iones Ca^{2+}. La fijación de Ca^{2+} a cuatro sitios de la calmodulina forma un complejo que interactúa con muchas enzimas y otras proteínas, y modula su actividad (véase fig. 3-28). Debido a que el Ca^{2+} se fija a la calmodulina de un modo cooperativo, un cambio pequeño en el nivel de Ca^{2+} citosólico conduce a un gran cambio en el nivel de la calmodulina activa. Una enzima activada bien estudiada por el complejo Ca^{2+}/calmodulina es la miosina cinasa de cadena liviana, que regula la actividad de miosina en las células musculares (cap. 19). Otra es la cAMP fosfodiesterasa, la enzima que degrada cAMP a 5'-AMP y finaliza sus efectos. Por consiguiente, esta reacción relaciona Ca^{2+} y cAMP, uno de los muchos ejemplos en los que dos segundos mensajeros interactúan para ajustar ciertos aspectos de la regulación celular.

En ciertas células, la elevación del Ca^{2+} citosólico luego de la señalización del receptor por IP_3 generado por PLC conduce a la activación de factores de transcripción específicos. En algunos casos, Ca^{2+}/calmodulina activa las proteincinasas que, a su vez, fosforilan a los factores de transcripción, que por eso modifican su actividad y la regulación de la expresión génica. En otros casos, Ca^{2+}/calmodulina activa una fosfatasa que elimina grupos fosfato desde un factor de transcripción. Un ejemplo importante de este mecanismo es el de las células T del sistema inmunitario en las cuales los iones de Ca^{2+} incrementan la actividad de un factor de transcripción esencial, NFAT (factor nuclear de las células T activadas). En células no estimuladas, el NFAT fosforilado está localizado en el citosol. Luego de la estimulación del receptor y la elevación del Ca^{2+} citosólico, el complejo Ca^{2+}/calmodulina se fija a la calcineurina, una proteína serina fosfatasa, y la activa. Entonces, esta calcineurina activada desfosforila residuos de fosfato importantes en el NFAT citosólico, la exposición de una secuencia de localización nuclear permite la movilización del NFAT al interior del núcleo y estimula la expresión de genes esenciales para la activación de las células T.

El complejo Ca^{2+}/calmodulina también desempeña un papel fundamental en el control del diámetro de los vasos sanguíneos y, en consecuencia, su capacidad de proporcionar oxígeno a los tejidos. Esta vía comprende una molécula de señalización novedosa y constituye otro ejemplo de funcionamiento de cGMP como un segundo mensajero.

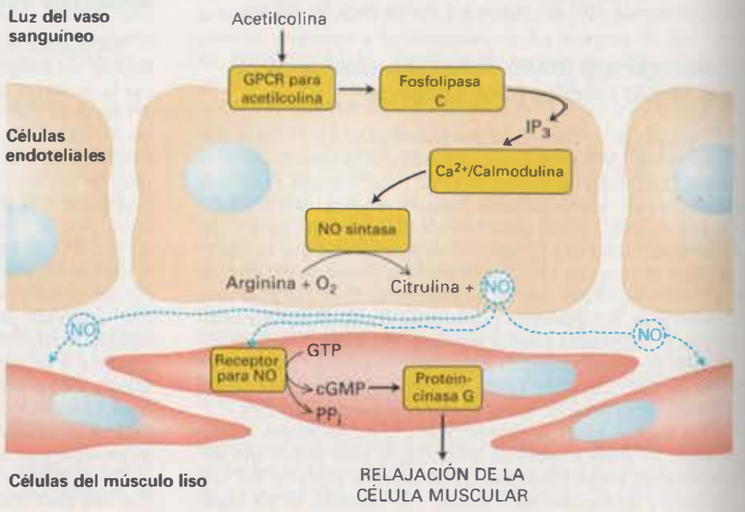
La relajación del músculo liso vascular inducida por señales está mediada por proteincinasa G activada por cGMP



La nitroglicerina fue utilizada durante un siglo como tratamiento para el dolor intenso de la angina de pecho. Se conocía que se descompone con lentitud en el organismo a *óxido nítrico* (NO), que produce relajación de las células del músculo liso que rodean los vasos sanguíneos que "alimentan" al propio músculo cardíaco y, en consecuencia, aumenta el diámetro de los vasos sanguíneos y el flujo sanguíneo que transporta oxígeno a ese músculo. Uno de los descubrimientos más intrigantes de la medicina moderna es que el NO, un gas tóxico de los caños de escape de los autos, es de hecho una molécula natural de señalización.

La evidencia definitiva del papel del NO para inducir la relajación del músculo liso proviene de un conjunto de experimentos en los que se agregó acetilcolina a las preparaciones experimentales de células del músculo liso que rodean los vasos sanguíneos. La aplicación directa de acetilcolina a estas células produjo la contracción, el efecto esperado de la acetilcolina sobre estas células musculares. Pero el agregado de acetilcolina a la luz de los vasos sanguíneos de pequeño calibre aislados produjo la relajación del músculo liso subyacente, no la contracción. Los estudios ulteriores mostraron que en respuesta a la acetilcolina, las células endoteliales que recubren la luz de los vasos sanguíneos liberaban alguna sustancia que a su vez inducía la relajación de la célula muscular. Esta sustancia producida es el NO.

Ahora sabemos que las células endoteliales contienen una proteína G_q acoplada al receptor que une acetilcolina, activa a la fosfolipasa C y conduce a un aumento del nivel de Ca^{2+} citosólico. Después que el Ca^{2+} se fija a la calmodulina, el complejo resultante estimula la actividad de la NO sintasa, un enzima que cataliza la formación de NO a partir del O_2 y el aminoácido arginina. Dado que el NO tiene una vida media corta (2-30 segundos), puede difundirse sólo en forma local en los tejidos desde su sitio de síntesis. En particular, el NO se difunde desde la célula endotelial al interior de las células del músculo liso vecinas, donde induce la relajación muscular (fig. 13-30).



▶ Fig. 13-30. Regulación de la contractilidad del músculo liso arterial por el óxido nítrico (NO) y cGMP. El óxido nítrico es sintetizado en las células endoteliales en respuesta a la acetilcolina y la elevación ulterior del Ca^{2+} citosólico. El NO se difunde en forma local por los tejidos y activa un receptor para NO intracelular con actividad de guanililciclasa en las células del músculo liso vecinas. La elevación resultante de los niveles de cGMP conduce a la activación de la proteincinasa G (PKG), la relajación del músculo y como consecuencia, vasodilatación. El receptor de la superficie celular para el factor natriurético auricular (ANF) también tiene actividad intrínseca de guanililciclasa (no mostrado); la estimulación de este receptor sobre las células del músculo liso también produce aumento del cGMP y la relajación posterior del músculo. PP_i: pirofosfato. (Véase C. S. Lowenstein et al., 1994, *Ann. Intern. Med.* 120:227.)

El efecto del NO en el músculo liso está mediado por un segundo mensajero cGMP, que puede ser formado por un receptor intracelular para NO expresado por las células del músculo liso. La unión del NO al grupo hemo en este receptor produce un cambio conformacional que incrementa su actividad intrínseca de guanililciclasa, que conduce a una elevación del nivel de cGMP. La mayor parte de los efectos de cGMP está mediada por una proteína cinasa dependiente de cGMP, también conocida como *proteincinasa G* (PKG). En el músculo liso vascular, la proteincinasa G activa una vía de señalización que produce la inhibición del complejo actinamiosina, la relajación de la célula y la dilatación del vaso sanguíneo. En este caso, el cGMP actúa en forma indirecta por medio de una proteincinasa G, mientras que en los bastones, el cGMP actúa directamente mediante la fijación y apertura de los canales catiónicos en la membrana plasmática.

La relajación del músculo liso vascular también es inducida por la unión del factor natriurético auricular (ANF) y algunas otras hormonas peptídicas a sus receptores en las células del músculo liso. El dominio citosólico de estos receptores de la superficie celular, a semejanza del receptor para NO intracelular, posee actividad intrínseca de guanililciclasa. Cuando un aumento en el volumen sanguíneo estira las células del músculo cardíaco en la aurícula, éstas liberan ANF. El ANF circulante se fija a los receptores para ANT en las células del músculo liso que rodean los vasos sanguíneos e induce la activación de la actividad guanililciclasa y la formación de cGMP. La activación ulterior de la proteincinasa G causa la dilatación del vaso por el mecanismo descrito antes. Esta vasodilatación reduce la presión arterial y contrarresta el estímulo que provocó la liberación inicial de ANF.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 13.5

Receptores acoplados a la proteína G que activan a la fosfolipasa C

- La estimulación de algunos GPCR y otros receptores de la superficie celular conduce a la activación de la fosfolipasa C, que genera dos segundos mensajeros: IP_3 difusible y DAG fijado a la membrana (véase fig. 13-28).
- IP_3 induce la apertura de los canales del Ca^{2+} regulados por IP_3 en el retículo endoplasmático y la elevación del Ca^{2+} libre citosólico. En respuesta a esta elevación, se recluta la proteincinasa C en la membrana plasmática, donde es activada por DAG (véase fig. 13-29).
- El complejo Ca^{2+}/calmodulina regula la actividad de muchas proteínas diferentes, que incluyen cAMP fosfodiesterasa, óxido nítrico sintasa y proteincinasas o fosfatasas que controlan la actividad de diversos factores de transcripción.
- La estimulación del GPCR para acetilcolina en las células endoteliales induce un incremento en el Ca^{2+} citosólico y la síntesis ulterior de NO. Después de difundirse al interior de las células del músculo liso circundantes el NO activa a la guanililciclasa intracelular para sintetizar cGMP (véase fig. 13-30).
- La síntesis de cGMP en las células del músculo liso vascular conduce a una activación de la proteincinasa G, la que activa la vía que produce la relajación muscular y la vasodilatación.
- El cGMP también es producido en las células del músculo liso vascular mediante la estimulación de receptores de la superficie celular que tienen actividad intrínseca de guanililciclasa. Incluyen receptores para el factor natriurético auricular (ANF).

13.6 Activación de la transcripción génica por receptores acoplados a la proteína G

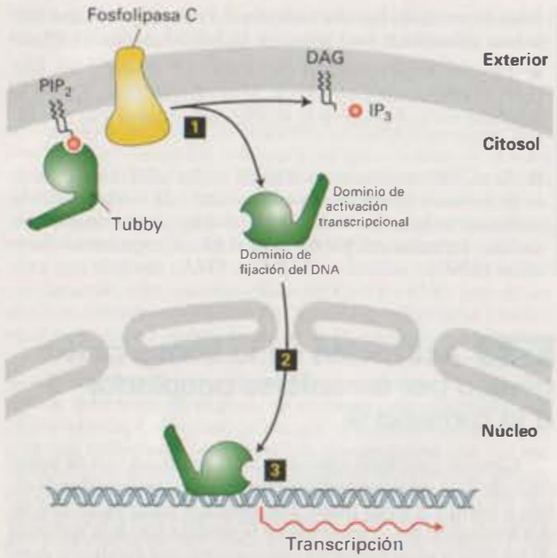
Como se mencionó antes en este capítulo, las vías de transducción de la señal intracelular pueden tener efectos sobre la célula a corto y a largo plazo. Los efectos a corto plazo (segundos a minutos) son el resultado de la modulación de la actividad de enzimas u otras proteínas preexistentes, que conduce a cambios en el metabolismo o la función celular. La mayoría de las vías activadas por receptores acoplados a la proteína G pertenecen a esta categoría. Sin embargo, las vías de señalización GPCR también pueden tener efectos a largo plazo (horas a días) debido a la activación o represión de transcripción génica que conduce en algunos casos a la proliferación o diferenciación celular en tipos de células diferentes. Antes describimos el modo en que la elevación en el Ca^{2+} citosólico inducido por señales puede conducir a la activación de factores de transcripción. Aquí consideramos otros mecanismos por los cuales algunos receptores acoplados a proteína G regulan la expresión génica.

El factor de transcripción Tubby es liberado por la activación de la fosfolipasa C

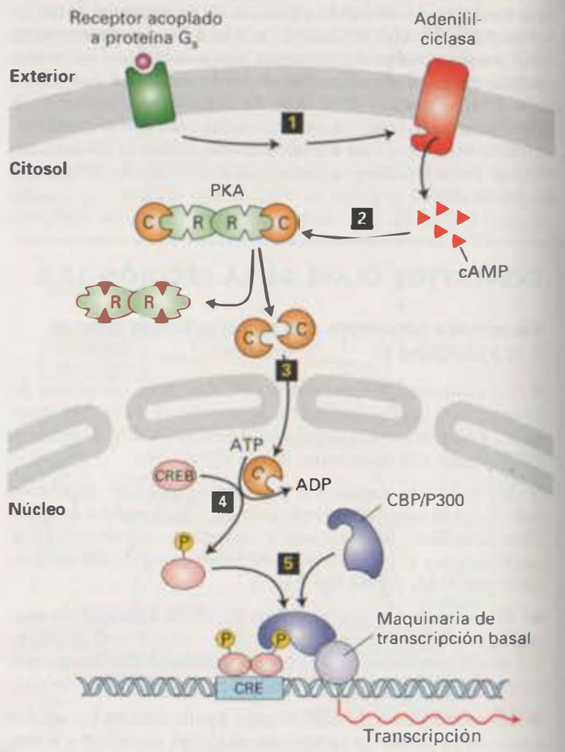


El gen *tubby*, expresado sobre todo en ciertas áreas del cerebro que participan en el control del comportamiento alimentario, atrajo la atención en un primer momento debido a su compromiso en la obesidad. Los ratones que portan mutaciones en el gen desarrollan obesidad de comienzo en el adulto y ciertos aspectos de su metabolismo se asemejan a los de los seres humanos obesos.

La secuenciación del gen *tubby* clonado sugirió que su proteína codificada contiene tanto un dominio para la fijación del DNA como un dominio para la activación de la transcripción (cap. 11). Sin embargo, se encontró que la proteína Tubby está localizada cerca de la membrana plasmática, lo que la hace una candidata improbable como factor de transcripción. Los estudios posteriores revelaron que Tubby se fija de manera estrecha a PIP_2, que produce el anclaje de la proteína a la membrana plasmática (fig. 13-31). La fijación de la hormona a los receptores acoplados G_q o G_a, que activan la fosfolipasa C, conduce a la hidrólisis de PIP_2 y la liberación de Tubby dentro del citosol. Tubby entra luego en el núcleo y activa la transcripción de un gen o varios genes aún desconocidos. Su identificación proporcionará indicios acerca del modo en que las proteínas que codifican se relacionan con la obesidad.



◀ Fig. 13-31. Activación del factor de transcripción Tubby luego de la unión del ligando a los receptores acoplados a G_o o G_q. En las células en reposo, Tubby está unido de modo ajustado a PIP_2 en la membrana plasmática. La estimulación del receptor (no mostrado) produce la activación de la fosfolipasa C, la hidrólisis de PIP_2 y la liberación de Tubby en el citosol (1). Dirigido por dos secuencias de localización nuclear (NLS) funcionales en su dominio N-terminal, Tubby se transloca al interior del núcleo (2) y activa la transcripción de los genes diana (3). No se sabe si IP_3 permanece unido a Tubby. (Adaptado de S. Santagata et al., 2001, *Science* 292:2041.)



▶ Fig. 13-32. Activación de la expresión génica luego de la fijación del ligando a los receptores acoplados a la proteína G_s. La estimulación del receptor (1) conduce a la activación de PKA (2). Las subunidades catalíticas de PKA se translocan al núcleo (3), allí se fosforilan y activan el factor de transcripción CREB (4). El CREB fosforilado se asocia con el coactivador CBP/P300 (5) para estimular varios genes diana controlados por el elemento regulador CRE. Para más detalles, véase el texto. (Véase K. A. Lee y N. Masson, 1993, *Biochim. Biophys. Acta* 1174:221 y D. Parker et al., 1996, *Mol. Cell Biol.* 16[2]:694.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación general: Señalización extracelular

CREB liga las señales del cAMP a la transcripción

En las células de los mamíferos, una elevación del nivel de cAMP citosólico estimula la expresión de muchos genes. Por ejemplo, el aumento del cAMP en ciertas células endocrinas induce la producción de somatostatina, un péptido que inhibe la liberación de varias hormonas; en los hepatocitos, el cAMP induce la síntesis de diversas enzimas involucradas en la conversión de compuestos de tres carbonos a glucosa.

Todos los genes regulados por cAMP contienen una secuencia de DNA de acción cis, el *elemento de respuesta cAMP (CRE)*, que fija la forma fosforilada de un factor de transcripción denominada *proteína de unión CRE (CREB)*, que se encuentra sólo en el núcleo. Como ya se mencionó, la unión de neurotransmisores y hormonas a los receptores acoplados a la proteína G_s activa la adenililciclasa, que conduce a un incremento en el cAMP y la ulterior liberación de la subunidad catalítica activa de PKA. Algunas de las subunidades catalíticas luego se translocan al núcleo y fosforilan la proteína CREB en la serina-133.

La proteína CREB fosforilada se une a los genes diana que contienen CRE y también interactúa con un *coactivador* denominado *CBP/300*, que enlaza CREB a la maquinaria transcripcional basal, y por consiguiente permite que CREB estimule la transcripción (fig. 13-32). Los estudios más tempranos sugirieron que la fosforilación inducía un cambio conformacional en la proteína CREB, pero las investigaciones más recientes indican que CBP/P300 se fija de manera específica a la fosfoserina-133 en la CREB activada. Como se mencionó en el capítulo 11, otros factores de transcripción regulados por la señal se basan en CBP/P300 para ejercer su efecto de la activación. Así, este coactivador desempeña un papel importante en las señales de integración a partir de múltiples vías de señalización que regulan la transcripción génica.

La arrestina unida a GPCR activa diversas cascadas de cinasas que controlan la expresión génica

Vimos con anterioridad que la unión de β-arrestina a las serinas fosforiladas en el dominio citosólico de los receptores acoplados a la proteína G bloquea la activación de G_α y media la endocitosis del complejo GPCR-arrestina. Tal vez sorprendente, el complejo GPCR-arrestina también actúa como una estructura para la unión y activación de diversas cinasas citosólicas (véase fig. 13-19). Incluyen c-Src, que activa la vía MAP cinasa y otras vías que conducen a la transcripción de genes necesarios para la división celular. Un complejo de tres proteínas unidas a arrestina entre las que se encuentra una Jun cinasa N-termmal (JNK-1), inicia una cascada de cinasas que por último activa el factor de transcripción c-Jun, que en esta forma estimula la expresión de ciertas enzimas que promueven el crecimiento y otras proteínas que ayudan a las células a responder ante situaciones de estrés.

MEDICINA

La fijación de adrenalina a los receptores β-adrenérgicos en el músculo cardíaco estimula la glucogenólisis y aumenta la frecuencia de contracción muscular. Sin embargo, el tratamiento prolongado con adrenalina induce la proliferación de estas células del músculo cardíaco. En casos extremos, la *hipertrofia cardíaca* produce falla del músculo cardíaco, causa principal de enfermedad cardíaca. Esta proliferación celular inducida por adrenalina es, en parte, el resultado de la activación de la cascada MAP cinasa. Como se describió, el complejo GPCR-arrestina puede activar esta cascada.

Otra manera, quizá más importante, por la que la activación de los receptores β-adrenérgicos potencia la hipertrofia cardíaca incluye otro tipo de receptor. La proteína G_s activada por receptores β-adrenérgicos puede de algún modo conducir a la activación de una proteasa extracelular específica que contiene metal que, a su vez, corta al precursor transmembrana del factor de crecimiento epidérmico (EGF). El EGF soluble liberado en el espacio extracelular se fija y activa los receptores para EGF en la misma célula de una manera autocrina. Como se verá en el próximo capítulo, el receptor para EGF pertenece a la clase de receptores tirosincinasa (RTK), que suele activar la cascada MAP cinasa y producir la proliferación celular. Interferencias similares entre dos tipos de receptores suceden en muchos otros sistemas de señalización. Como no hay ninguna célula que viva en aislamiento, no hay ningún receptor ni señal de transducción que funcione por sí mismo. ▮

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 13.6

Activación de la transcripción génica por receptores acoplados a la proteína G

- La activación de la fosfolipasa C por receptores acoplados a las proteínas G_o o G_q libera al factor de transcripción Tubby, fijado a PIP_2 incluido en la membrana plasmática de las células en reposo (véase fig. 13-31).
- La activación de la proteincinasa A (PKA) inducida por señales suele conducir a la fosforilación de la proteína CREB, que junto con el coactivador CBP/300 estimula la transcripción de muchos genes diana (véase fig. 13-32).
- El complejo GPCR-arrestina activa diversas cinasas citosólicas, que inician las cascadas que conducen a la activación transcripcional de muchos genes que controlan el crecimiento celular.

PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO

Muy pronto conoceremos la identidad de todas las piezas en muchas vías de transducción de señales, si bien permanece difícil de dilucidar el enigma de colocarlas en forma conjunta para predecir las respuestas celulares. Por ejemplo, podemos enumerar las proteínas G, las cinasas, las fosfatasas, las arrestinas y otras proteínas que participan en la señalización de receptores β-adrenérgicos en hepatocitos, pero aún falta mucho para predecir, de manera cuantitativa, el modo en que los hepatocitos reaccionan en el transcurso del tiempo a una dosis dada de adrenalina. En parte, esto se debe a los mecanismos de retroalimentación compleja, y en algunos casos de proalimentación *(feed-forward)*, que regulan la actividad de múltiples enzimas y otros componentes en la vía. Si bien de los experimentos bioquímicos y de biología celular surge el modo en que suceden estas interacciones, no podemos describir de manera cuantitativa las velocidades o la magnitud de estas reacciones en las células vivas.

El campo emergente del análisis de los sistemas biológicos intenta desarrollar una visión integral de la respuesta de las células frente a señales externas. Las ecuaciones matemáticas están formuladas de modo que incorporan constantes de velocidad para catálisis enzimática, formación de complejos proteína-proteína y concentración y velocidades de difusión de todas las diversas proteínas que participan en la transducción de señales. Estos modelos incorporan información acerca de cambios en la localización subcelular de las proteínas en función del tiempo (p. ej., movilización de factores de transcripción al interior del núcleo o endocitosis de los receptores de superficie) y el efecto sobre la actividad de cualquier proteína dada (p. ej., glucógeno fosforilasa) de la concentración local de Ca^{2+} y la presencia de múltiples cinasas y fosfatasas. Mediante la comparación entre los resultados de estos cálculos y los reales experimentales (es decir, mediante el aumento o la disminución selectiva de la concentración de un componente de vía) podemos determinar, en principio, si hemos considerado todos los componentes de la vía. Este modelado matemático también podrá ayudar a la industria farmacéutica para el desarrollo de fármacos nuevos que podrían activar o inhibir vías específicas. El modelado permite extrapolar los resultados de experimentos de fármacos o proteínas en tubos de ensayo o en cultivos celulares a fin de predecir su eficacia y efectos colaterales en organismos vivos.

En este capítulo nos centramos sobre todo en las vías de transducción de señales activadas por receptores individuales acoplados a la proteína G. Sin embargo, incluso estas vías relativamente simples presagian la situación más compleja dentro de las células vivas. Como hemos visto, la activación de un tipo de receptor individual a menudo conduce a la producción de múltiples segundos mensajeros o a la activación de varios tipos de proteínas de transducción corriente abajo. Es más, la misma respuesta celular (p. ej., degradación del glucógeno) es afectada por múltiples vías de señalización activadas por múltiples tipos de receptores. La interacción de vías de señalización diferentes permite el ajuste de las actividades celulares requeridas para llevar a cabo los procesos fisiológicos complejos de desarrollo y, la capacidad de las células para responder de manera adecuada a las señales extracelulares también depende de la regulación de las vías de señalización en sí.

PALABRAS CLAVE

adaptación visual *560*
adenililciclasa *548*
agonistas *539*
amplificación de la señal *552*
calmodulina *563*
cAMP *537*
desensibilización *544*
dominios PDZ *543*
ensayo de expresión funcional *540*
ensayos de competición *539*
fosfolipasa C (isoforma β) *561*
proteína G estimuladora *548*
proteínas G triméricas *534*
proteincinasa A *550*
proteincinasa C *563*
receptores acoplados a la proteína G *534*
receptores adrenérgicos *548*
receptores muscarínicos para acetilcolina *556*
rodopsina *556*
segundos mensajeros *541*
señalización autocrina *535*
señalización endocrina *535*
señalización paracrina *535*
transducción de la señal *534*
transducina *556*
vía IP_3/DAG *561*

REVISIÓN DE CONCEPTOS

1. La señalización por moléculas extracelulares solubles pueden clasificarse en tres tipos: endocrina, paracrina y autocrina. Describa en qué difieren estos tres métodos de señalización celular. La hormona del crecimiento es segregada por la hipófisis, localizada en la base del cerebro y actúa a través de los receptores para la hormona del crecimiento localizados en el hígado. ¿Es éste un ejemplo de señalización endocrina, paracrina o autocrina? ¿Por qué?

2. Un ligando se fija a dos receptores diferentes con un valor de K_d de 10^{-7} M para el receptor 1 y un valor de K_d de 10^{-9} M para el receptor 2. ¿Para cuál receptor el ligando muestra mayor afinidad? Calcular la fracción de receptores que tienen un ligando unido ($[RL]/R_T$) para el ligando con el receptor 1 y para el ligando con el receptor 2, si la concentración del ligando libre es 10^{-8} M.

3. Un estudio de las propiedades de los receptores de la superficie celular puede ser en gran parte reforzado por aislamiento o clonación del receptor de la superficie celular. Describa cómo un receptor de la superficie celular puede ser aislado por cromatografía de afinidad. ¿Cómo puede clonar un receptor de la superficie celular mediante un ensayo de expresión funcional?

4. Las proteínas G triméricas de la transducción de señales consisten en tres subunidades designadas α, β, γ. La subunidad G_α es una proteína interruptora GTPasa que cicla entre el estado activo e inactivo según si está unida a GTP o a GDP. Revise los pasos para la activación de las proteínas efectoras inducidas por ligando mediadas por el complejo proteína G trimérica. Suponga que ha aislado una subunidad G_α mutante que tiene incrementada su actividad de GTPasa. ¿Qué efectos tendría esta mutación sobre la proteína G y la proteína efectora?

5. Las proteínas de membrana a menudo están agrupadas. Describa el modo en que la agrupación de cúmulos de proteínas puede estar mediada por proteínas adaptadoras o por "rafts" lipídicos especializados denominados cavéolas. ¿Qué ventajas brindaría la presencia de agrupamientos de proteínas de membrana involucradas en las vías de señalización más que diseminadas en la membrana?

6. La adrenalina se fija a receptores β-adrenérgicos y α-adrenérgicos. Describa las acciones opuestas sobre la proteína efectora, adenililciclasa, desencadenada por la unión de la adrenalina a estos dos tipos de receptores. Describa el efecto o agregado de un agonista o antagonista a un receptor β-adrenérgico sobre la actividad de la adenililciclasa.

7. En las células hepáticas y musculares, la adrenalina estimula la liberación de glucosa a partir del glucógeno mediante la inhibición de la síntesis del glucógeno y la estimulación de la degradación del glucógeno. Mencione los acontecimientos que se producen después que la adrenalina se fija al receptor y se obtiene un aumento de la concentración de cAMP intracelular. ¿Cómo vuelven los niveles de cAMP a los valores normales? Describa los acontecimientos que suceden después que los niveles de cAMP disminuyen.

8. La exposición continua de un receptor acoplado a la proteína G_s a su ligando conduce a un fenómeno conocido como desensibilización. Describa los diversos mecanismos moleculares para la desensibilización del receptor. ¿Cómo puede volverse un receptor a su estado sensibilizado original? ¿Qué efecto tendría sobre una célula un receptor mutante que carece de sitios de fosforilación de serina o treonina?

9. Varias moléculas diferentes actúan como segundos mensajeros. La activación de rodopsina por la luz induce el cierre de los canales catiónicos regulados por GMP cíclico como segundo mensajero. Describa el efecto de la luz sobre la rodopsina. ¿Sobre qué proteína efectora actúa la proteína G trimérica? ¿Qué tipo de proteína G trimérica está involucrada en este acontecimiento?

10. La adaptación visual y la desensibilización del receptor comprenden mecanismos de fosforilación similares. Describa por qué la cinasa del receptor β-adrenérgico (BARK) y la rodopsina cinasa desempeñan papeles importantes en estos procesos. ¿Qué papel desempeña la fosforilación en estas reacciones?

11. El inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y el diacilglicerol (DAG) son moléculas segundos mensajeros provenientes de la hidrólisis del fosfoinosítido PIP_2 (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato) por la fosfolipasa C activada. Describa el papel del IP_3 en la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático. ¿Cómo reponen las células las reservas de Ca^{2+} del retículo endoplasmático? ¿Cuál es la función principal de la DAG?

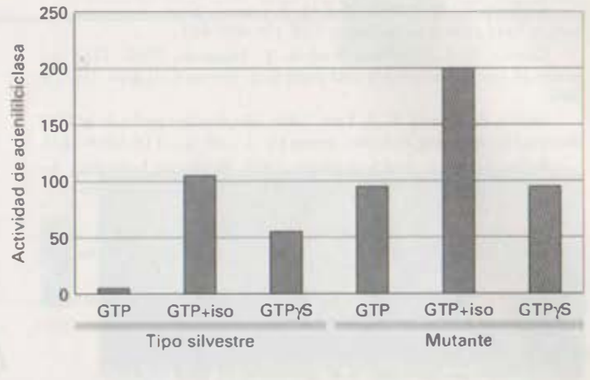
12. En 1992, la revista *Science* llamó al óxido nítrico la "molécula del año". Describa cómo se sintetiza este segundo mensajero. ¿Cómo causa el óxido nítrico la relajación de las células del músculo?

13. La fijación del ligando a los receptores acoplados a la proteína G pueden producir la activación de la transcripción génica. Describa cómo los segundos mensajeros PIP_2 y cAMP pueden activar la transcripción génica.

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Las mutaciones en las proteínas G triméricas pueden causar muchas enfermedades en los seres humanos. Los pacientes con acromegalia suelen tener tumores hipofisarios que segregan en exceso la hormona hipofisaria denominada hormona del crecimiento (*growth hormone*; GH). Un subgrupo de estos tumores hipofisarios que segregan GH se producen por mutaciones en las proteínas G. La hormona liberadora de GH (GHRH) estimula la liberación de GH desde la hipófisis mediante la fijación a los receptores GHRH y la estimulación de la adenililciclasa. La clonación y la secuenciación del gen de tipo silvestre y de la mutante $G_{s\alpha}$ de individuos normales y pacientes con tumores de hipófisis revelaron una mutación sin sentido en la secuencia del gen $G_{s\alpha}$.

a. Para investigar el efecto de la mutación en la actividad $G_{s\alpha}$, el cDNA del tipo silvestre y de la mutante $G_{s\alpha}$ fue transfectado en células que carecen del gen $G_{s\alpha}$. Estas células expresan un receptor β_2-adrenérgico que puede ser activado por isoproterenol, un receptor agonista β_2-adrenérgico. Las membranas aisladas provenientes de células transfectadas fueron evaluadas para su actividad de adenililciclasa en presencia de GTP o del análogo de GTP resistente a la hidrólisis, GTP-γS.



A partir de la figura, ¿qué conclusión saca acerca del efecto de la mutación en la actividad de $G_{s\alpha}$ en presencia de GTP en comparación con GTP-γS solo o GTP más isoproterenol (iso)?

b. En las células transfectadas descritas en la parte a, ¿cuáles serían los niveles de cAMP en las células transfectadas con $G_{s\alpha}$ de tipo silvestre y $G_{s\alpha}$ mutante? ¿Qué efecto podría tener esto sobre las células?

c. A fin de caracterizar el defecto molecular causado por esta mutación, se evaluó la actividad de GTPasa intrínseca tanto en el tipo silvestre como en la mutante $G_{s\alpha}$. Los ensayos para la actividad de GTPasa mostraron que la mutación reducía la $K_{cat\,GTP}$ (constante de velocidad de la catálisis para la hidrólisis del GTP) desde un valor para el tipo silvestre de 4,1 min^{-1} al valor para la mutante de 0,1 min^{-1}. ¿Qué conclusión puede sacar acerca del efecto de la mutación sobre la actividad de GTPasa presente en la subunidad $G_{s\alpha}$ mutante? ¿Cómo explican estos resultados de la GTPasa los resultados de la adenililciclasa mostrados en la parte a?

BIBLIOGRAFÍA

Moléculas de señalización y receptores de la superficie celular

Coughlin, S. R. 2000. Thrombin signaling and protease-activated receptors. Nature 407:258-264.

Farfel, Z., H. Bourne, and T. Iiri. 1999. The expanding spectrum of G protein diseases. New Eng. J. Med. 340:1012-1020.

Simonsen, H., and H. F. Lodish. 1994. Cloning by function: expression cloning in mammalian cells. Trends Pharmacol. Sci. 15:437-441.

Stadel, J. M., S. Wilson, and D. J. Bergsma. 1997. Orphan G protein-coupled receptors: a neglected opportunity for pioneer drug discovery. Trends Pharmacol. Sci. 18:430-437.

Wilson, J. D., D. W. Foster, H. M. Kronenberg, and R. H. Williams. 1998. Williams Textbook of Endocrinology, 9th ed. W. B. Saunders.

Transducción intracelular de la señal

Anderson, R. G., and K. Jacobson. 2002. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. Science 296:1821-1825.

Bourne, H. R. 1997. How receptors talk to trimeric G proteins. Curr. Opin. Cell Biol. 9:134-142.

Galbiati, F., B. Razani, and M. P. Lisanti. 2001. Emerging themes in lipid rafts and caveolae. Cell 106:403-411.

Garner, C. C., J. Nash, and R. L. Huganir. 2000. PDZ domains in synapse assembly and signaling. Trends Cell Biol. 10:274-280.

Harris, B. Z., and W. A. Lim. 2001. Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. J. Cell Sci. 114:3219-3231.

Rebecchi, M. J., and S. Scarlata. 1998. Pleckstrin homology domains: a common fold with diverse functions. Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struc. 27:503-528.

Van Deurs, B., K. Roepstorff, A. Hommelgaard, and K. Sandvig. 2003. Caveolae: anchored multifunctional platforms in the lipid ocean. Trends Cell Biol. 13:92-100.

Vetter, I. R., and A. Wittinghofer. 2001. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. Science 294:1299-1304.

Receptores acoplados a la proteína G que activan o inhiben a la adenililciclasa

Browner, M., and R. Fletterick. 1992. Phosphorylase: a biological transducer. Trends Biochem. Sci. 17:66-71.

Diviani, D., and J. D. Scott. 2001. AKAP signaling complexes at the cytoskeleton. J. Cell Sci. 114:1431-1437.

Ferguson, S. S., and M. G. Caron. 1998. G protein-coupled receptor adaptation mechanisms. Semin. Cell. Develop. Biol. 9:119-127.

Hurley, J. H. 1999. Structure, mechanism and regulation of mammalian adenylyl cyclase. J. Biol. Chem. 274:7599-7602.

Johnson, L. N.1992. Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. FASEB J. 6:2274-2282.

Luttrell, L. M., and R. J. Lefkowitz. 2002. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-prorein-coupled receptor signals. J. Cell Sci. 115:455-465.

Mickel, J. J., and J. D. Scott. 2002. AKAP mediated signal transduction. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 42:235-257.

Perry, S. J., and R. J. Lefkowitz. 2002. Arresting developments in heptahelical receptor signaling and regulation. Trends Cell Biol. 12:130-138.

Pierce, K. L., R. T. Premont, and R. J. Lefkowitz. 2002. Seven-transmembrane receptors. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 3: 639-652.

Sprang, S. R. 1997. G protein mechanisms: insights from structural analysis. Ann. Rev. Biochem. 66:639-678.

Tesmer, J. J., R. K. Sunahara, A. G. Gilman, and S. R. Sprang. 1997. Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with Gsol GTPS. Science 278:1907-1916.

Receptores acoplados a la proteína G que regulan a los canales iónicos

Borhan, B., et al. 2000. Movement of retinal along the visual transduction path. Science 288:2209-2212.

Bourne, H. R., and E. C. Meng. 2000. Structure. Rhodopsin sees the light. Science 289:733-734.

Hamm, H. E. 2001. How activated receptors couple to G proteins. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 98:4819-4821.

Hurley, J. H., and J. A. Grobler. 1997. Protein kinase C and phospholipase C: Bilayer interactions and regulation. Curr. Opin. Struc. Biol. 7:557-565.

Mendez, A., et al. 2000. Rapid and reproducible deactivation of rhodopsin requires multiple phosphorylation sites. Neuron 28:153-164.

Nathans, J. 1999. The evolution and physiology of human color vision: insights from molecular genetic studies of visual pigments. Neuron 24:299-312.

Palczewski, K., et al. 2000. Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. Science 289:739-745.

Sokolov, M., et al. 2002. Massive light-driven translocation of transducin between the two compartments of rod cells: a novel mechanism of light adaptation. Neuron 33:95-106.

Receptores acoplados a la proteína G que activan a la fosfolipasa C

Berridge, M. J. 1997. Elementary and global aspects of calcium signaling. J. Exp. Biol. 200:315-319.

Chin, D., and A. R. Means. 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. Trends Cell Biol. 10:322-328.

Czech, M. P. 2000. PIP2 and PIP3: complex roles at the cell surface. Cell 100:603-606.

Delmas, P., and D. Brown. 2002. Junctional signaling microdomains: bridging the gap between neuronal cell surface and Ca^{2+} stores. Neuron 36:787-790.

Hobbs, A. J. 1997. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. Trends Pharmacol. Sci. 18:484-491.

Jaken, S. 1996. Protein kinase C isozymes and substrates. Curr. Opin. Cell Biol. 8:168-173.

Putney, J. W. 2001. Cell biology: channeling calcium. Nature 410:648-649.

Singer, W. D., H. A. Brown, and P. C. Sternweis. 1997. Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. Ann. Rev. Biochem. 66:475-509.

Toker, A., and L. C. Cantley. 1997. Signaling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. Nature 387:673-676.

Wedel, B. J., and D. L. Garbers. 1997. New insights on the functions of the guanylyl cyclase receptors. FEBS Lett. 410:29-33.

Activación de la transcripción génica por receptores acoplados a la proteína G

Cantley, L. C. 2001. Transcription. Translocating tubby. Science 292:2019-2021.

Luttrell, L. M., Y. Daaka, and R. J. Lefkowitz. 1999. Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. Curr Opin. Cell Biol. 11:177-183.

Mayr, B., and M. Montminy. 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. Nacure Rev. Mol. Cell Biol. 2:599-609.

Pierce, K. L., L. M. Luttrell, and R. J. Lefkowitz. 2001. New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades. Oncogene 20:1532-1539.

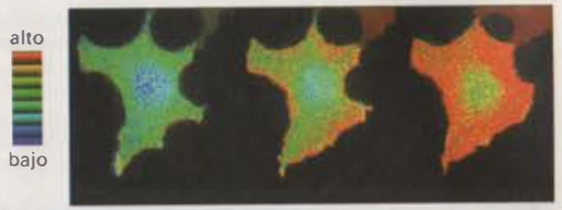
Santagata, S., et al. 2001. G-protein signaling through tubby proteins. Science 292:2041-2050.

Shaywitz, A., and M. Greenberg. 1999. CREB: a stimulus induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. Ann. Rev. Biochem. 68:821-861.

Vo, N., and R. Goodman.2001. CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. J. Biol. Chem. 276:13505-13508.

14

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE CONTROLAN LA ACTIVIDAD GÉNICA



La transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) detecta el momento y la localización de la activación de la proteína Ras en hepatocitos inducida por el factor de crecimiento epidérmico. [Michiyuki Matsuda, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University.]

El desarrollo de todos los organismos requiere la ejecución de un programa complejo por el cual genes específicos se activan y reprimen en conjuntos específicos de células y en una secuencia de tiempo precisa. Muchos cambios de la expresión génica en el desarrollo se generan mediante moléculas de señalización extracelular que actúan sobre receptores de la superficie celular. La mayoría de estas señales son factores solubles, secretados, que actúan de una manera paracrina sobre las células que los reciben (diana) cerca de la célula que los liberan. Sin embargo, algunas proteínas de señalización están adheridas por sí mismas en la superficie celular, donde interactúan con los receptores de la superficie celular en células adyacentes para alterar el patrón de expresión génica de la célula que las recibe.

Incluso las células maduras que son parte de un tejido diferenciado cambian de modo constante sus patrones de expresión génica. En gran parte esto se debe a la cantidad de receptores diferentes de la superficie celular que en forma continua reciben información proveniente de señales extracelulares y transducen esta información en activación de factores de transcripción específicos que estimulan o reprimen la expresión de genes diana específicos. Muchas de estas vías de señalización conducen a alteraciones en las actividades metabólicas de las células. Por ejemplo, el hígado responde a fluctuaciones de los niveles de muchas hormonas (p. ej., insulina, glucagón y adrenalina) mediante la alteración de la expresión de muchos genes que codifican enzimas del metabolismo de la glucosa y las grasas. Otras vías de señalización ejercen su influencia en los niveles de proteínas que afectan la capacidad de las células para progresar en el ciclo celular y dividirse.

Una célula de mamífero típica a menudo expresa receptores de superficie celular para más de 100 tipos diferentes de moléculas de señalización extracelular que funcionan sobre todo para regular la actividad de los factores de transcripción (véase fig. 13-1). La activación de factores de transcripción inducida por señal se produce por varios mecanismos. En el capítulo anterior, por ejemplo, vimos que la estimulación de algunos receptores acoplados a la proteína G conduce a una elevación del cAMP y a la activación de la proteincinasa A dependiente de cAMP. Después de translocarse al núcleo, la proteincinasa A se fosforila y, en consecuencia, activa al factor de transcripción CREB.

En este capítulo, nos centramos en otras cinco clases de receptores de la superficie celular que ilustran los mecanismos de activación de factores de transcripción adicionales inducidos por señal. La estimulación de los receptores del *factor de crecimiento transformador β (TGFβ)* y de los *receptores de citocinas* conduce a la activación directa de los factores de transcripción citosólicos como resultado de la fosforilación por una cinasa que es parte del receptor o asociada con él. Los factores de transcripción activados luego se translocan al

CONTENIDO

14.1 Receptores del TGFβ y activación directa de Smad
14.2 Receptores para citocina y vía JAK-STAT
14.3 Receptores tirosincinasas y activación de Ras
14.4 Vías MAP cinasas
14.5 Fosfoinosítidos como transductores de señales
14.6 Vías que involucran la degradación de la proteína inducida por la señal
14.7 Modulación negativa de receptores de señalización

CUADRO 14-1 Apreciación global de las principales clases de receptores y vías de señalización

Clase de receptor /vía*	Características distintivas
RECEPTORES LIGADOS A LAS PROTEÍNAS G TRIMÉRICAS	
Receptores acoplados a la proteína G (13)	*Ligandos:* Adrenalina, glucagón, serotonina, vasopresina, ACTH, adenosina y muchos otros (mamíferos); moléculas aromáticas, luz; factores de apareamiento (levadura) *Receptores:* Siete hélices α transmembrana; dominio citosólico asociado con una proteína G trimérica fijada a la membrana *Transducción de la señal:* 1) vías de segundo mensajero que incluye cAMP o IP_3/DAG; 2) canales iónicos asociados; 3) vía MAP cinasa
RECEPTORES CON ACTIVIDAD ENZIMÁTICA INTRÍNSECA O ASOCIADA	
Receptores para TGFβ (14, 15)	*Ligandos:* Superfamilia del factor de crecimiento transformador β (TGFβ, BMP), activina, inhibinas (mamíferos); Dpp *(Drosophila)* *Receptores:* Proteína intrínseca con actividad serina/treonina en el dominio citosólico (tipos I y II) *Transducción de la señal:* Activación directa de los factores de transcripción Smad citosólicos
Receptores para citocina (14, 15)	*Ligandos:* Interferones, eritropoyetina, hormona del crecimiento, algunas interleucinas (IL-2, IL-4), otras citocinas *Receptores:* Hélices α transmembrana individual; plegamiento de la hebra multi-β conservada en el dominio extracelular; JAK cinasa asociada con el dominio intracelular *Transducción de la señal:* 1) Activación directa de los factores de transcripción STAT citosólico; 2) vía PI-3 cinasa; 3) vía IP_3/DAG; 4) vía Ras-MAP cinasa
Receptores tirosincinasas (14)	*Ligandos:* Insulina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), neurotrofinas, otros factores de crecimiento *Receptor:* Hélice α transmembrana individual; proteína intrínseca con actividad tirosincinasa en el dominio citosólico *Transducción de la señal:* 1) Vía Ras-MAP cinasa; 2) vía IP_3/DAG; 3) vía PI-3 cinasa
Receptores guanililciclasas (13)	*Ligandos:* Factor natriurético auricular y hormonas peptídicas relacionadas *Receptor:* Hélice α transmembrana individual; proteína intrínseca con guanilato ciclasa en el dominio citosólico *Transducción de la señal:* Generación de cGMP
Receptores fosfotirosina fosfatasas	*Ligandos:* Pleiotrofinas, otras hormonas proteicas *Receptores:* Actividad intrínseca de fosfotirosinfosfatasa en el dominio citosólico inhibida por la fijación del ligando *Transducción de la señal:* Hidrólisis del residuo de activación fosfotirosina en las proteintirosincinasas citosólicas
Receptores de linfocitos T	*Ligandos:* Péptidos pequeños asociados con proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) en la membrana plasmática de macrófagos y otras células presentadoras de antígenos *Receptores:* Hélice α transmembrana individual; diversas proteincinasas asociadas con dominios citosólicos; encontrados sólo en los linfocitos T *Transducción de la señal:* 1) Activación de proteínas tirosincinasas citosólicas; 2) vía PI-3 cinasa; 3) vía IP_3/DAG; 4) vía Ras-MAP cinasa

CUADRO 14-1 Apreciación global de las principales clases de receptores y vías de señalización

Clase de receptor /vía*	Características distintivas
RECEPTORES QUE SON CANALES IÓNICOS	
Canales iónicos regulados por ligando (7, 13)	*Ligandos:* Neurotransmisores (p. ej., acetilcolina, glutamato), cGMP, estímulos físicos (p. ej., tacto, estiramiento), IP_3 (receptor en la membrana del RE) *Receptores:* Cuatro o cinco subunidades con un segmento homólogo en cada subunidad que recubre el canal iónico *Transducción de la señal:* 1) Cambio localizado en el potencial de membrana debido al ingreso de iones, 2) elevación del Ca^{2+} citosólico
VÍAS QUE COMPRENDE LA PROTEÓLISIS	
Vía Wnt (15)	*Ligandos:* Wnt segregados (mamíferos); Wg *(Drosophila)* *Receptores:* Frizzled (Fz) con siete hélices α transmembrana; proteína relacionada con el receptor (Lrp) LDL fijado, asociada con la membrana requerida para la actividad del receptor *Transducción de la señal:* Ensamblaje del complejo multiproteico en la membrana que inhibe la proteólisis mediado por proteosoma del factor de transcripción β-catenina citosólico, que da por resultado su acumulación
Vía Hedgehog (Hh) (15)	*Ligandos:* Hedgehog ligado a la célula *Receptores:* Fijación de Hh a Patched (Ptc), que tiene 12 hélices α transmembrana; activación de señalización de Smoothened (Smo), con 7 hélices α transmembrana *Transducción de la señal:* Liberación proteolítica de un activador transcripcional de un complejo multiproteico en el citosol
Vía Notch/Delta (14, 15)	*Ligandos:* Proteína Delta o Serrate fijada a la membrana *Receptores:* Subunidad extracelular del receptor Notch asociada en forma no covalente con la subunidad citosólica transmembrana *Transducción de la señal:* Corte proteolítico intramembrana del dominio transmembrana del receptor con liberación del segmento citosólico que funciona como coactivador para los factores de transcripción nucleares
Vías NF-κB (14, 15)	*Ligandos:* Factor de necrosis tumoral α (TNF-α), interleucina 1 (mamíferos); Spätzle *(Drosophila)* *Receptores:* Varios en los mamíferos; receptores Toll y similar al Toll en *Drosophila* *Transducción de la señal:* Proteína inhibidora de la degradación dependiente de la fosforilación con liberación del fáctor de transcripción activo NF-κB (Dorsal en *Drosophila)* en el citosol
VÍAS DE RECEPTORES INTRACELULARES	
Vía del óxido nítrico (13)	*Ligandos:* Óxido nítrico (NO) *Receptor:* Guanililciclasa citosólica *Transducción de la señal:* Generación de cGMP
Vías de receptor nuclear (11)	*Ligandos:* Moléculas lipófilas que incluyen hormonas esteroides, tiroxina, retinoides y ácidos grasos en los mamíferos y ecdisona en *Drosophila* *Receptores:* Dominio de fijación del DNA altamente conservado, dominio de fijación de la hormona algo conservado y un dominio variable; localizado dentro del núcleo o del citosol *Transducción de la señal:* Activación de la actividad del factor de transcripción del receptor por fijación del ligando

*A menos que esté indicado de otro modo, los receptores están localizados en la membrana plasmática. Los números entre paréntesis indican los capítulos en los cuales se describe con profundidad la vía o el receptor.

FUENTES: J. Gerhart, 1999, *Teratology* 60:226, y A. Brivanlou y J. E. Darnell, 2002, *Science* 295:813.

interior del núcleo y actúan sobre genes diana específicos. En el caso del *receptor tirosincinasa*, la fijación de un ligando a su receptor pone en movimiento una cascada de acontecimientos intracelulares que conduce a la activación de una cinasa citosólica que se transfiere dentro del núcleo y activa uno o más factores de transcripción por fosforilación. La señalización proveniente de los *receptores del factor de necrosis tumoral α (TNF-α)* genera un factor de transcripción NF-κB activo por corte proteolítico de una proteína inhibidora citosólica y el corte proteolítico de un *receptor Notch* libera el dominio citosólico del receptor que luego funciona como un coactivador para los factores de transcripción en el núcleo. La proteólisis también desempeña un papel en las vías de señalización inducida por la fijación de proteínas ligandos denominadas Wnt y Hedgehog (Hh) a sus receptores. En el capítulo 15 nos referimos a estas dos vías, que cumplen una función fundamental durante el desarrollo y la diferenciación.

Para simplificar, a menudo describimos las diversas clases de receptores en forma independiente, haciendo especial hincapié en la principal vía de transducción de la señal iniciada por cada clase de receptor. Sin embargo, como se muestra en el cuadro 14-1, las diversas clases de receptores pueden transducir las señales por más de una vía. Es más, muchos genes son regulados por múltiples factores de transcripción, cada uno de los cuales puede ser activado por una o más señales extracelulares. En especial durante el desarrollo temprano, estas interferencias entre las vías de señalización y las alteraciones secuenciales resultantes en el patrón de expresión génica puede tornarse por último tan extensas que la célula asume un destino diferente en el desarrollo.

Los investigadores emplearon diversos enfoques y sistemas experimentales para identificar y estudiar la función de las moléculas de señalización extracelular, los receptores y las proteínas de transducción de la señal intracelular. Por ejemplo, la proteína de señalización segregada Hedgehog (Hh) y su receptor se identificaron por primera vez en mutantes de *Drosophila* con defectos del desarrollo. Con posterioridad se clonaron homólogos de estas proteínas en los seres humanos y ratones y se observó que participaban en una cantidad importante de acontecimientos de señalización durante la diferenciación. Algunas de las proteínas de transducción de señales se identificaron por primera vez cuando las mutaciones con ganancia de función en los genes que las codifican o la expresión en exceso de la proteína normal producían proliferación celular anormal que conduce a la malignidad. De esta manera, se identificó la proteína Ras mutante que exhibe actividad no regulada (es decir, constitutiva); más tarde se encontró que Ras del tipo silvestre era un participante fundamental en muchas vías de señalización. En un comienzo se purificaron numerosas moléculas de señalización extracelular a partir de extractos celulares sobre la base de su capacidad de estimular crecimiento y proliferación de tipos celulares específicos. Estos pocos ejemplos ilustran la importancia de estudiar las vías de señalización tanto desde el punto de vista genético –moscas, ratones, helmintos, levaduras y otros organismos– como bioquímico.

14.1 Receptores del TGFβ y activación directa de Smad

Varias moléculas de señalización extracelular relacionadas que desempeñan gran variedad de papeles en la regulación del desarrollo en invertebrados y vertebrados constituyen la *superfamilia* del *factor de crecimiento transformador β (transforming growth factor β, TGFβ)*. Un miembro de esta superfamilia, la *proteína morfogenética ósea (bone morphogenetic protein, BMP)*, se identificó por su capacidad para inducir la formación ósea en células cultivadas. En la actualidad denominada *BMP7*, se la utiliza en clínica para fortalecer el hueso después de fracturas graves. De las numerosas proteínas BMP reconocidas con posterioridad, muchas ayudan a inducir pasos fundamentales en el desarrollo, que incluyen la formación de células mesodérmicas y las células formadoras de la sangre más tempranas.

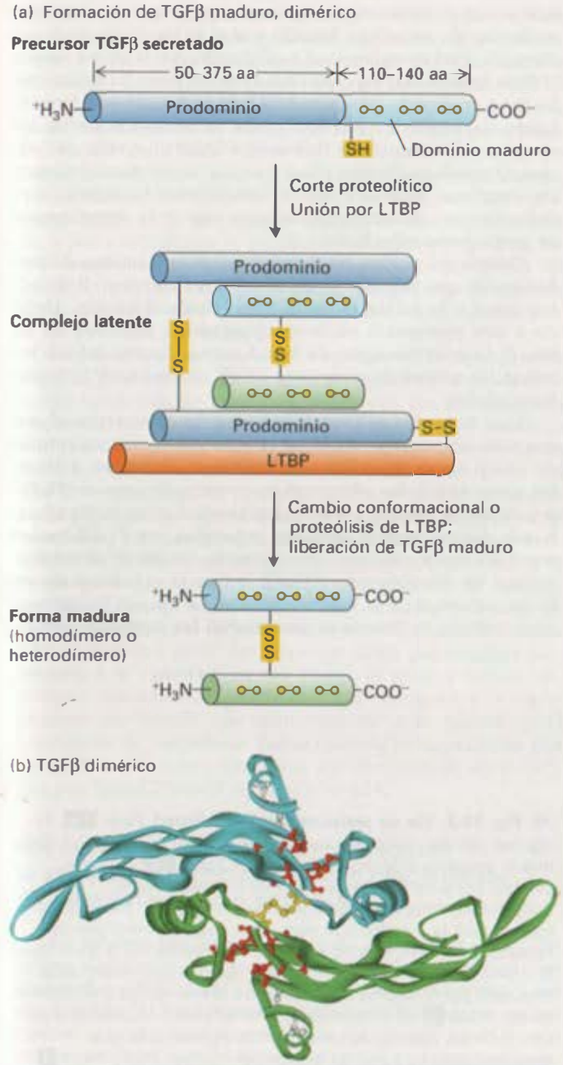
Otro miembro de la superfamilia del TGFβ, denominada ahora *TGFβ-1*, fue identificado sobre la base de su capacidad para inducir un fenotipo transformado de ciertas células en cultivo. Sin embargo, las tres isoformas de TGFβ humanas son conocidas por poseer efectos antiproliferativos potentes en muchos tipos de células de los mamíferos. La pérdida de receptores de TGFβ o de ciertas proteínas de señal de traducción intracelular en la vía TGFβ y, en consecuencia, la liberación de células de esta inhibición del crecimiento, se producen con frecuencia en tumores humanos. Las proteínas TGFβ también estimulan la expresión de moléculas de adhesión celular y moléculas de la matriz extracelular. El TGFβ señala ciertos tipos de células para sintetizar y segregar factores de crecimiento que pueden, en equilibrio, vencer la inhibición del crecimiento inducido por TGFβ; esto explica la razón por la cual el TGFβ se detecta en un origen como un factor de crecimiento. Un homólogo del TGFβ de *Drosophila*, denominado *proteína Dpp*, controla el patrón de modelado dorsoventral en embriones de moscas, como detallamos en el capítulo 15. Otros miembros de la superfamilia del TGFβ, las activinas y las inhibinas, afectan el desarrollo temprano del tracto genital.

A pesar de la complejidad de los efectos celulares inducidos por diversos miembros de la superfamilia del TGFβ, la vía de señalización básicamente es simple. Una vez activada, los receptores para estos ligandos se fosforilan y activan un tipo particular de factor de transcripción. La respuesta de una célula dada a este factor de transcripción activado depende de la constelación de otros factores de transcripción que ya contiene.

El TGFβ se forma por el corte de un precursor inactivo secretado

En los seres humanos, el TGFβ consiste en tres isoformas proteicas, TGFβ-1, TGFβ-2 y TGFβ-3, cada una codificada por un gen singular, expresado de una manera específica para el tejido y regulado por el desarrollo. Cada isoforma de TGFβ se sintetiza como parte de un precursor más grande que contiene un prodominio. Este dominio es cortado a partir del precursor, pero permanece asociado de modo no covalente con el dominio maduro después de la secreción de la proteína. La mayor parte del TGFβ secretado está almacenada en la matriz extracelular como un complejo latente inactivo que contiene el precursor TGFβ y una proteína de fijación al TGFβ unida en forma covalente denominada *proteína de fijación al TGFβ latente* o *LTBP*. La fijación de LTBP por la proteína de matriz trombospondina o por ciertas integrinas de la superficie celular induce un cambio conformacional en LTBP que causa la liberación del TGFβ dimérico activo y maduro. De manera alternativa, la digestión de las proteínas de fijación por metaloproteasas de la matriz puede dar por resultado la activación del TGFβ (fig. 14-1a).

La forma monomérica de los factores de crecimiento TGFβ contiene 110-140 aminoácidos y tiene una estructura compacta con cuatro hebras β antiparalelas y tres enlaces disulfuro intramoleculares conservados (fig. 14-1b). Estas forman una estructura, denominada *nudo de cistina*, que es relativamente resistente a la desnaturalización. Una cisteína N-terminal adicional en cada monómero une los monómeros del TGFβ en homodímeros y heterodímeros funcionales. Gran parte de la variación de las secuencias entre diferentes proteínas TGFβ se observó en las regiones N-terminal, los bucles que unen las hebras β y las hélices α. Diferentes combinaciones heterodiméricas pueden incrementar la diversidad funcional de estas proteínas más allá de las generadas por diferencias en la secuencia primaria del monómero.



◀ Fig. 14-1. Formación y estructura de la superfamilia de moléculas de señalización TGFβ. (a) Los precursores de TGFβ son cortados enseguida de su segregación. El prodominio y el dominio maduro se almacenan en la matriz extracelular en un complejo que también contiene la proteína de fijación TGFβ latente (LTBP). El dominio maduro contiene seis residuos conservados de cisteína (círculos amarillos), que forman tres puentes disulfuro intracatenarios y también un puente disulfuro individual que conecta dos monómeros. Después de la proteólisis o de un cambio conformacional en LTBP, se libera una proteína homodimérica o heterodimérica activa. (b) En este diagrama de cintas del dímero TGFβ maduro, las dos subunidades se muestran en verde y azul. Los residuos de cisteína unidos por puente disulfuro se muestran en la forma de varilla y esferas. Los tres puentes disulfuro intracatenarios (rojo) en cada monómero forman un dominio que es el nudo de cisteína, resistente a la degradación. [Parte (a) véase J. Massagué y Y-G. Chen, 2000, Genes and Devel. 14:627; parte (b) de S. Daopin et al., 1992, Science 257:369.]

Los receptores de señalización del TGFβ tienen actividad de serina o treonina cinasa

Para identificar los receptores de TGFβ de la superficie celular, los investigadores hicieron reaccionar primero el factor de crecimiento purificado con el radioisótopo yodo-125 (^{125}I) en condiciones en las que el radioisótopo se une en forma covalente a los residuos de tirosina expuestos. La proteína TGFβ marcada con ^{125}I se incubó con células cultivadas y la mezcla fue luego tratada con un agente químico que forma enlaces cruzados covalentes entre el TGFβ y sus receptores sobre la superficie celular. La purificación de los receptores marcados reveló tres polipéptidos diferentes con pesos moleculares aparentes de 55, 85 y 280 kDa, denominados receptores para TGFβ *tipos RI, RII* y *RIII*, respectivamente.

El receptor del TGFβ más abundante, RIII, es un proteoglucano de la superficie celular, también denominado *β-glucano*, que se fija y concentra TGFβ cerca de la superficie celular. Los receptores tipo I y tipo II son proteínas diméricas transmembrana con serina/treonina cinasas como parte de sus dominios citosólicos. RII es una cinasa constitutivamente activa que fosforila en ausencia de TGFβ. La fijación del TGFβ induce la formación de complejos que contienen dos copias cada uno de RI y RII. Una subunidad RII luego fosforila los residuos de serina y treonina en una secuencia altamente conservada de la subunidad RI adyacente a la cara citosólica de la membrana plasmática, que por eso activa la actividad de RI cinasa.

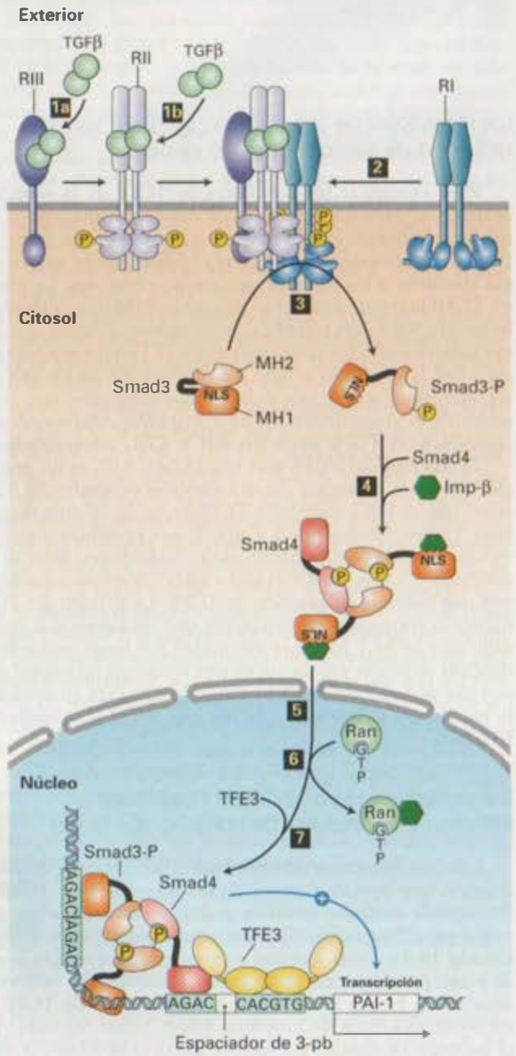
Los receptores para TGFβ tipo I activados fosforilan a los factores de transcripción Smad

Los investigadores identificaron a los factores de transcripción que operan a partir de los receptores de TGFβ en *Drosophila* mediante estudios genéticos similares a los utilizados para disecar las vías tirosincinasas del receptor (véase sección 14.3). Estos factores de transcripción en *Drosophila* y las proteínas de vertebrados relacionadas reciben el nombre de Smad. En las vías de señalización de TGFβ intervienen tres tipos de proteínas Smad: Smad reguladas por el receptor (R-Smad), co-Smad y Smad inhibidores o antagonistas (I-Smad).

Como se representa en la figura 14-2, las proteínas R-Smad contienen dos dominios, MH1 y MH2, separados por una región de enlace flexible. El dominio N-terminal MH1 contiene el segmento específico de fijación al DNA y también una secuencia denominada *señal de localización nuclear (nuclear localization signal, NLS)* requerida para el transporte de la proteína al interior del núcleo (cap. 12). Cuando las R-Smad están en su estado inactivo, no fosforilado, la NLS está enmascarada y los dominios MH1 y MH2 se asocian de un modo que no pueden fijarse al DNA o a una co-Smad. La fosforilación de tres residuos de serina cerca del extremo C-terminal de una R-Smad (Smad2 o Smad3) por los receptores para TGFβ tipo I activados separa los dominios, por lo que permite la fijación de importina β a la NLS. Al mismo tiempo, en el citosol se forma un complejo que contiene dos moléculas de Smad3 (o Smad2) y una molécula de co-Smad (Smad4). Este complejo está estabilizado por la unión de dos serinas fosforiladas en cada Smad3 a los sitios de unión fosfoserina en ambos dominios MH2 de la Smad3 y la Smad4. Luego, la importina β unida media la translocación de los complejos heteroméricos R-Smad/co-Smad al interior del núcleo. Después que la importina β se disocia dentro del núcleo, los complejos Smad2/Smad4 o Smad3/Smad4 cooperan con otros factores de transcripción para activar la transcripción de genes diana específicos.

Dentro del núcleo, las R-Smads están en continua desfosforilación, que produce la disociación del complejo R-Smad/co-Smad y la salida de estas Smad desde el núcleo. Debido a este transporte nucleocitoplasmático continuo de las Smad, la concentración de Smad activa dentro del núcleo refleja los niveles de receptores TGFβ activados en la superficie celular.

Casi todas las células de los mamíferos secretan al menos una isoforma de TGFβ y la mayoría tienen receptores de TGFβ en su superficie. Sin embargo, dado que diferentes tipos de células contienen conjuntos distintos de factores de transcripción a los cuales puede fijarse la Smad activada, las respuestas celulares inducidas por TGFβ varían entre los tipos celulares. Por ejemplo, en las células epiteliales y los fibroblastos el TGFβ induce la expresión no sólo de proteínas de la matriz extracelular (p. ej., colágenos) sino también de proteínas que inhiben las proteasas séricas,



◀ **Fig. 14-2. Vía de señalización TGFβ-Smad.** Paso **1a**: En algunas células, TGFβ se une al receptor para TGFβ tipo III (RIII), que lo presenta al receptor tipo II (RII). Paso **1b**: En otras células, TGFβ se fija directamente al RII, una cinasa constitutivamente fosforilada y activa. Paso **2**: El RII fijado al ligando recluta y fosforila el segmento yuxtamembranoso del receptor tipo I (RI), que no fija en forma directa TGFβ. Éste libera la inhibición de la actividad RI cinasa que, de otro modo, está impuesta por el segmento de RI entre la membrana y el dominio cinasa. Paso **3**: El RI activado fosforila Smad3 (mostrado aquí) u otro R-Smad, que causa un cambio conformacional que desenmascara su señal de localización nuclear (NLS). Paso **4**: Dos moléculas fosforiladas de Smad3 interactúan con un co-Smad (Smad4), que no está fosforilado y con importina β (Imp-β), que forma un complejo citosólico grande. Pasos **5** y **6**: Después que el complejo se transloca al interior del núcleo, Ran-GTP causa la disociación de Imp-β como se describió en el capítulo 12. Paso **7**: Un factor de transcripción nuclear (p. ej., TFE3) se asocia con el complejo Smad3/Smad4 y forma un complejo de activación 1 que de manera cooperativa se fija en una geometría precisa a secuencias reguladoras de un gen diana. En la parte inferior se muestra el complejo de activación para el gen que codifica el inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1). Para los detalles adicionales véase el texto. (Véase Z. Xiao et al., 2000, J. Biol. Chem. 275:23425; J. Massagué y D. Wotton, 2000, EMBO J. 19:1745; X. Hua et al., 1999, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 96:13130; y A. Moustakas and C.-H. Heldin, 2002, Genes Devel.16:1867.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación focalizada: Vías de señalización TGFβ

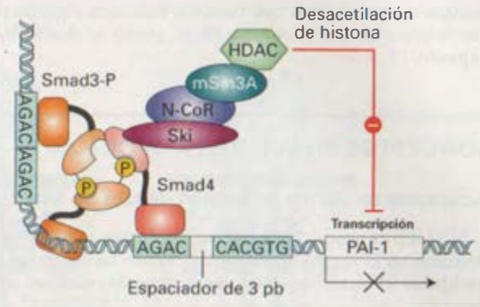
que de otro modo podrían degradar la matriz. Esta última categoría incluye el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1). La transcripción del gen PAI-1 requiere la formación de un complejo del factor de transcripción TFE3 con el complejo Smad3/Smad4 y la fijación de todas estas proteínas a secuencias específicas dentro de la región reguladora del gen PAI-1 (véase fig. 14-2, *parte inferior*). En conjunto con otros factores de transcripción, los complejos Smad2/Smad4 y Smad3/Smad4 inducen la expresión de proteínas como p15, que detiene el ciclo celular en el estadio G_1 y por eso bloquea la proliferación celular (cap. 21). Estos complejos Smad también reprimen la transcripción del gen *myc*, en consecuencia, reducen la expresión de muchos genes que estimulan el crecimiento cuya transcripción suele ser activada por Myc.

Los diversos factores de crecimiento en la superfamilia del TGFβ se unen a sus propios receptores y activan diferentes conjuntos de proteínas Smad, con las consiguientes respuestas celulares diferentes. La especificidad exhibida por estos receptores relacionados es un fenómeno común en la señalización intercelular y la vía de señalización del TGFβ proporciona un ejemplo excelente de una estrategia para alcanzar la especificidad de respuesta. Como ya se mencionó, por ejemplo, la fijación de una isoforma cualquiera de TGFβ a sus receptores específicos conduce a la fosforilación de Smad2 o Smad3, la formación de complejos Smad2/Smad4 o Smad3/Smad4 y, por último, la activación transcripcional de genes diana específicos (p. ej., el gen PAI-1). Por otra parte, las proteínas BMP, que también pertenecen a la superfamilia del TGFβ, se unen y activan diferentes conjuntos de receptores, que conducen a la fosforilación de Smad1, su dimerización con Smad4 y la activación de respuestas transcripcionales específicas por Smad1/Smad4. Estas respuestas son distintas de las inducidas por Smad2/Smad4 o Smad3/Smad4.

Las oncoproteínas y las I-Smad regulan la señalización Smad mediante mecanismos de retroalimentación negativa

La señalización Smad es regulada por proteínas intracelulares adicionales, que incluyen dos proteínas citosólicas denominadas *SnoN y Ski (Ski* significa "Sloan-Kettering Cancer Institute"). Estas proteínas fueron identificadas en un comienzo como oncoproteínas porque causan proliferación celular anormal cuando están expresadas en exceso en cultivos de fibroblastos. No se comprendía el modo en que se lograba ese efecto hasta que años más tarde se encontró que SnoN y Ski se fijaban a los complejos Smad2/Smad4 o Smad3/Smad4 formados después de la estimulación por TGFβ. SnoN y Ski no afectan la capacidad de los complejos Smad para fijarse a las regiones control del DNA. Más bien, bloquean la activación de la transcripción por complejos Smad, y en consecuencia hacen a las células resistentes a las acciones inhibidoras del crecimiento normalmente inducidas por TGFβ (fig. 14-3). Es interesante destacar que la estimulación por TGFβ causa la degradación rápida de Ski y SnoN, pero después de unas pocas horas, la expresión de Ski y SnoN es inducida con firmeza. Se considera que los niveles aumentados de estas proteínas amortiguan los efectos de señalización prolongada debido a la exposición continua al TGFβ.

Entre las proteínas inducidas después de la estimulación con TGFβ están las I-Smad, en especial Smad7. Ésta bloquea la capacidad de los receptores tipo I activados para fosforilar las proteínas R-Smad. En este sentido Smad7, como Ski y SnoN, participa en un mecanismo de retroalimentación negativa; su inducción hace que se inhiba la señalización intracelular por la exposición prolongada a la hormona estimuladora. En las secciones pasadas vimos cómo la señalización por otros receptores de la superficie celular es también controlada por mecanismos de retroalimentación negativa.



▲ **Fig. 14-3. Esquema de la regulación negativa mediada por Ski de la respuesta a la estimulación de TGFβ.** Ski se fija a Smad4 en los complejos de señalización Smad3/Smad4 o Smad2/Smad4 (no mostrado) y puede alterar en parte las interacciones entre las proteínas Smad. Ski también recluta una proteína denominada *N-CoR* que se fija de modo directo a mSin3A, la que a su vez interactúa con la histona desacetilasa (HDAC), una enzima que estimula la desacetilación de la histona (cap. 11). Como resultado, la activación de la transcripción inducida por TGFβ y mediada por los complejos Smad se interrumpe. (Véase S. Stroschein et al., 1999, Science 286:771; X. Liu et al., 2001, Cytokine and Growth Factor Rev. 12:1; y J.-W. Wu et al., 2002, Cell 111:357.)

La pérdida de la señalización TGFβ contribuye a la proliferación celular anormal y a la formación de tumores

MEDICINA

Muchos tumores humanos contienen mutaciones inactivantes ya sea en receptores de TGFβ o en las proteínas Smad y, por consiguiente, son resistentes a la inhibición del crecimiento por TGFβ (véase fig. 23-20). La mayoría de los cánceres pancreáticos humanos, por ejemplo, contienen una deleción en el gen que codifica Smad4 y, por lo tanto, no pueden inducir p15 y otros inhibidores del ciclo celular en respuesta al TGFβ. Este gen definido por la mutación se denominó en un comienzo *DPC* (*d*eleted in *p*ancreatic *c*ancer). El retinoblastoma, los cánceres de colon y gástrico, el hepatoma y algunos procesos malignos de células T y de células B son también insensibles a la inhibición del crecimiento por TGFβ. Esta pérdida de receptividad se correlaciona con la pérdida de receptores de TGFβ tipo I o tipo II; la sensibilidad a TGFβ puede restablecerse mediante la expresión recombinante de la proteína "perdida". Las mutaciones en Smad2 también suceden con frecuencia en diversos tipos de tumores humanos. No sólo es esencial la señalización del TGFβ para el control de la proliferación celular, como mues-

tran estos ejemplos, sino que también hace que algunas células se diferencien por vías específicas, como se describirá en el capítulo 15. ▮

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 14.1

Receptores de TGFβ y activación directa de Smad

- El TGFβ es producido como un precursor inactivo que se almacena en la matriz extracelular. Varios mecanismos pueden liberar el factor de crecimiento dimérico maduro activo (véase fig. 14-1).
- La estimulación por TGFβ conduce a la activación de la actividad intrínseca serina/treonina cinasa en el dominio citosólico del receptor tipo I (RI), que luego fosforila una R-Smad, exponiendo una señal de localización nuclear.
- Después de fosforilado R-Smad se fija a un co-Smad, el complejo resultante se transloca al interior del núcleo, donde interactúa con varios factores de transcripción para inducir la expresión de los genes diana (véase fig. 14-2).
- Las oncoproteínas (p. ej., Ski y SnoN) e I-Smads (p. ej., Smad7) actúan como reguladores negativos de la señalización por TGFβ.
- La señalización por TGFβ por lo general inhibe la proliferación celular. La pérdida de varios componentes de la vía de señalización contribuye a la proliferación celular anormal y a la formación de tumores.

14.2 Receptores para citocinas y vía JAK-STAT

Nos referiremos ahora a una segunda clase importante de receptores de la superficie celular, los receptores para citocinas, cuyos dominios citosólicos están estrechamente asociados con un miembro de una familia de proteínas tirosincinasas citosólicas, las *cinasas JAK*. Una tercera clase de receptores, los receptores de tirosincinasas (**RTK**), contienen actividad intrínseca de proteína tirosincinasa en sus dominios citosólicos. Los mecanismos por los cuales los receptores para citocinas y los receptores tirosincinasas se activan por ligandos, son muy similares y hay considerable superposición en las vías de transducción de la señal intracelular inducida por la activación de los receptores de ambas clases. En esta sección, describimos en primer lugar algunas similitudes en la señalización proveniente de estas dos clases de receptores. Luego nos referimos a la vía JAK-STAT, que se inicia sobre todo por la activación de receptores para citocinas.

Los receptores para citocinas y los receptores tirosincinasas comparten muchas características de señalización

La unión del ligando a ambos receptores para citocinas y RTK en algunos casos induce la formación de receptores diméricos funcionales, el ligando induce la asociación de dos subunidades monoméricas del receptor que se difunde en el plano de la membrana plasmática (fig. 14-4). En otros, el receptor es un dímero en ausencia de ligando y la fijación del ligando altera la conformación de los dominios extracelulares de las dos subunidades. En cada caso, la formación de un receptor dimérico funcional hace que una de las cinasas citosólicas menos activa fosforile un residuo de tirosina particular en el *labio de activación* ("*activation lip*") de la segunda cinasa. Esta fosforilación activa la actividad cinasa y conduce a la fosforilación de la segunda cinasa en el dímero, así como diversos residuos de tirosina en el dominio citosólico del

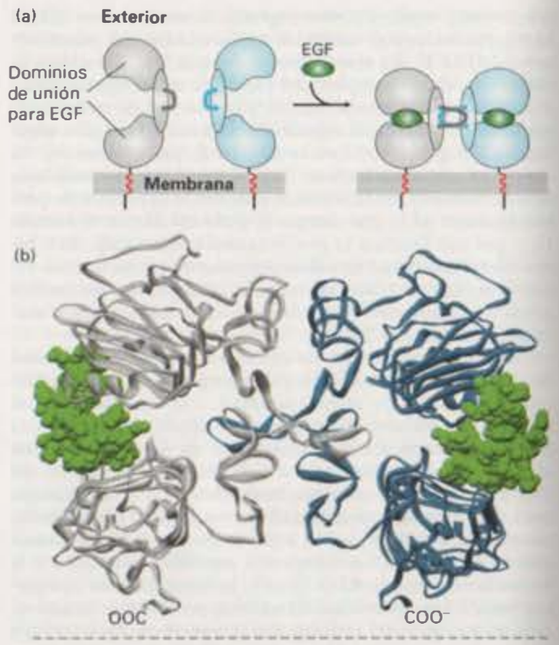
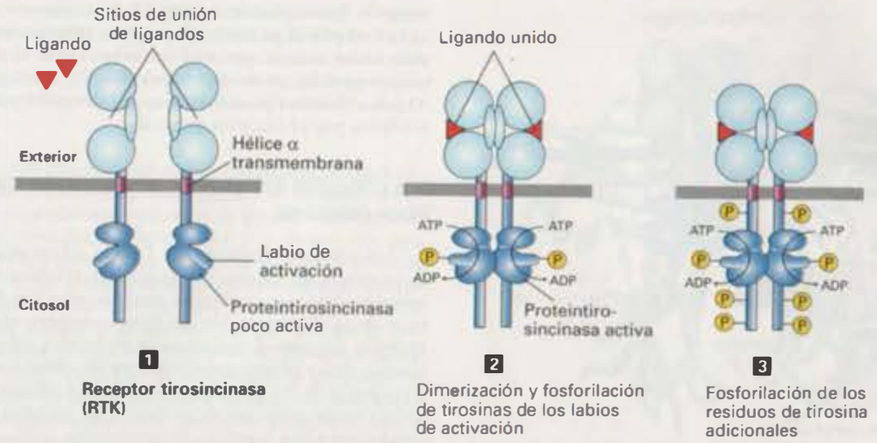


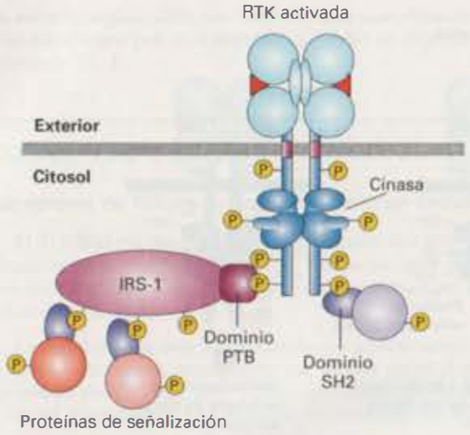
Fig. 14-4. Dimerización del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGF), un receptor tirosincinasa. (a) Esquema de los dominios extracelular y transmembrana del receptor para EGF. La fijación de una molécula EGF a un receptor monomérico causa una alteración en la estructura de un bucle situado entre los dos dominios de fijación para EGF. La dimerización de dos monómeros idénticos del receptor fijados al ligando en el plano de la membrana sucede sobre todo por interacciones entre los dos segmentos de bucles "activados". (b) Estructura del dominio extracelular del receptor dimérico para EGF unido al factor de crecimiento transformador α (TGFα), un homólogo de EGF. Los dominios extracelulares del receptor para EGF se muestran en blanco (*izquierda*) y azul (*derecha*). Las dos moléculas más pequeñas de TGFα están coloreadas de verde. Nótese la interacción entre los segmentos de bucles "activados" en los dos receptores. [Parte (a) adaptada de J. Schlessinger, 2002, Cell 110:669; parte (b) de T. Garrett et al., 2002, Cell 110:763.]



▲ **Fig. 14-5. Estructura general y activación de receptores tirosincinasas (RTK) inducidos por ligandos y receptores para citocina.** El dominio citosólico de RTK contiene un sitio catalítico para la proteína tirosincinasa, mientras que el dominio citosólico de los receptores para citocina se asocia con una JAK cinasa separada (paso 1). En ambos tipos de receptor, la fijación del ligando causa un cambio conformacional que estimula la formación de un receptor dimérico funcional, que reúne las dos cinasas, intrínseca o asociada, cada una de las cuales fosforila un residuo de tirosina en el labio de activación (paso 2). La fosforilación hace que el labio se mueva fuera del sitio catalítico de la cinasa, por lo tanto, permite que se fije el ATP o una proteína sustrato. Luego, la cinasa activada fosforila otros residuos de tirosina en el dominio citosólico del receptor (paso 3). Las fosfotirosinas resultantes funcionan como sitios de acoplamiento para varias proteínas de transducción de señales (véase fig. 14-6).

receptor (fig. 14-5). Como veremos más adelante, la fosforilación de residuos en el bucle de activación es un mecanismo general por el cual se activan muchas cinasas.

Ciertos residuos de fosfotirosina formados en los receptores para citocinas activados y RTK sirven como sitios de unión o "acoplamiento" para los *dominios SH2 o dominios PTB*, que están presentes en un gran complejo de proteínas de transducción de señales intracelulares. Una vez unidas a un receptor activado, algunas proteínas de transducción de señales son fosforiladas por una cinasa intrínseca o asociada al receptor para lograr su forma activa. La unión de otras proteínas de transducción de señales, presentes en el citosol en células no estimuladas, las coloca cerca de sus sustratos localizados en la membrana plasmática. Ambos mecanismos pueden activar la señalización corriente abajo (*downstream*). Diversos receptores para citocina (p. ej., receptor para IL-4) y RTK (p. ej., receptor para insulina) fijan IRS1 u otras proteínas de acoplamiento múltiples por un dominio PTB en la

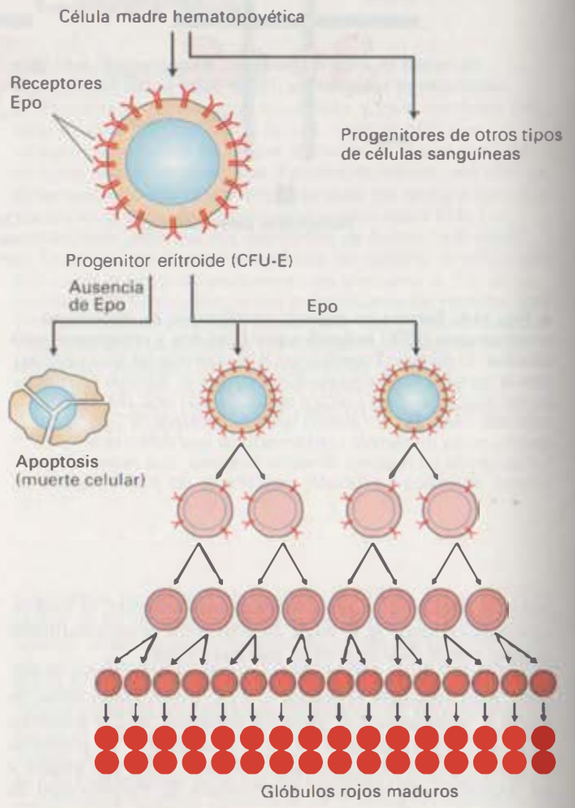


▲ Fig. 14-6. Reclutamiento de proteínas de transducción de señales en la membrana celular por fijación a los residuos fosfotirosina en los receptores activados. Las proteínas citosólicas con dominios SH2 o PTB pueden fijarse a residuos de fosfotirosina específicos en RTK (mostrado aquí) o receptores para citocina activados. En algunos casos, estas proteínas de transducción de señales son luego fosforiladas por la proteína tirosincinasa intrínseca o la asociada, que refuerza su actividad. Ciertos RTK y receptores para citocina utilizan proteínas de acoplamiento múltiples como IRS-1 para incrementar la cantidad de proteínas de señalización que son reclutadas y activadas. La fosforilación ulterior de IRS-1 por la actividad cinasa del receptor crea sitios de acoplamiento adicionales para las proteínas de señalización que contienen SH2.

proteína de acoplamiento (fig. 14-6). Luego, el receptor activado fosforila la proteína de acoplamiento unida y forma muchas fosfotirosinas que a su vez sirven como sitios de acoplamiento para las proteínas de señalización que contienen SH2. Algunas de estas proteínas a su vez también pueden ser fosforiladas por el receptor activado.

Las citocinas influyen en el desarrollo de muchos tipos celulares

Las citocinas forman una familia relativamente pequeña de proteínas secretadas (por lo general, contienen cerca de 160 aminoácidos) que controlan muchos aspectos del crecimiento y de la diferenciación de tipos celulares específicos. Por ejemplo, durante el embarazo la prolactina induce la diferenciación de las células epiteliales que recubren los conductillos inmaduros de las glándulas mamarias a células acinares que producen las proteínas de la leche y las secretan dentro de los conductos. Otra citocina, la interleucina 2 (IL-2), es esencial para la proliferación y funcionamiento de las células T del sistema inmunitario; la IL-4, que está estrechamente relacionada, es esencial para la formación de células B productoras



▶ Fig. 14-7. Papel de la eritropoyetina en la formación de glóbulos rojos (eritrocitos). Las células progenitoras eritroides, denominadas *unidades formadoras de colonias eritroides* (CFU-E), derivan de células madre hematopoyéticas, que también dan origen a progenitores de otros tipos celulares sanguíneos. En ausencia de eritropoyetina (Epo), las células CFU-E sufren apoptosis. La unión de eritropoyetina a sus receptores en una CFU-E induce la transcripción de varios genes cuyas proteínas codificadas impiden la muerte celular programada (apoptosis) y le permite a la célula sobrevivir y sufrir un programa de tres a cinco divisiones celulares terminales. La estimulación Epo también induce la expresión de proteínas específicas de eritrocitos como las globinas, que forman hemoglobina, y la proteína de membrana glucoforina y la proteína de intercambio aniónico. El receptor para Epo y otras proteínas de membrana se pierden cuando estas células sufren diferenciación. Si las células CFU-E se cultivan con eritropoyetina en un medio semisólido (p. ej., que contiene metilcelulosa), las células hijas no pueden cambiar de lugar y por eso cada CFU-E produce una colonia de 30-100 células eritroides; de ahí su nombre. (Véase M. Socolovsky et al., 2001, Blood 98:3261.)

de anticuerpos funcionales. Algunas citocinas, como el interferón α, son producidas y secretadas por muchos tipos de células luego de la infección viral. Los interferones secretados actúan sobre células próximas para inducir enzimas que mantienen a estas células más resistentes a la infección viral.

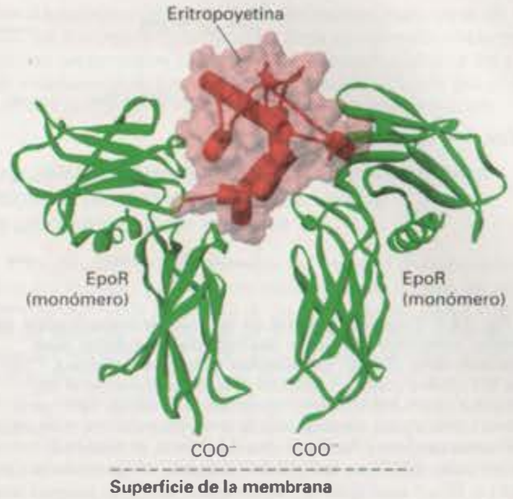
MEDICINA

Muchas citocinas inducen la formación de tipos importantes de células sanguíneas. Por ejemplo, el factor estimulante de colonias de granulocitos (*granulocyte colony stimulating factor*, G-CSF) induce un tipo particular de célula progenitora en la médula ósea a dividirse varias veces y luego diferenciarse en granulocitos, el tipo de glóbulos blancos que inactiva bacterias y otros patógenos. Dado que muchos tratamientos antineoplásicos reducen la formación de granulocitos por el organismo, a menudo se le administra a los pacientes G-CSF para estimular la proliferación y la diferenciación de células progenitoras de granulocitos, que de este modo restablecen el nivel normal de granulocitos en la sangre. La trombopoyetina, una "prima" del G-CSF, actúa de manera similar en los progenitores megacariocíticos para dividirse y diferenciarse en megacariocitos. Luego, éstos se fragmentan en las piezas celulares denominadas *plaquetas*, fundamentales en la coagulación de la sangre.

Otra citocina relacionada, la eritropoyetina (Epo), activa la producción de glóbulos rojos mediante la inducción a la proliferación y a la diferenciación de la célula progenitora eritroide en la médula ósea (fig. 14-7). La eritropoyetina es sintetizada por las células renales que controlan la concentración de oxígeno en la sangre. Una disminución en el oxígeno de la sangre significa un nivel más bajo de lo óptimo de eritrocitos (glóbulos rojos), cuya función principal es transportar el oxígeno formando un complejo con la hemoglobina. Por medio del factor de transcripción sensible al oxígeno, HIF-1α, las células renales responden a los niveles bajos de oxígeno mediante la síntesis de más eritropoyetina, la cual es secretada a la sangre (véase fig. 15-9). A medida que el nivel de eritropoyetina se eleva, más y más progenitores eritroides son salvados de la muerte, lo que permite que cada uno produzca ≈50 o más glóbulos rojos en un período de sólo dos días. De este modo, el organismo puede responder a pérdidas de sangre mediante la aceleración de la producción de glóbulos rojos.

Todas las citocinas y sus receptores tienen estructuras similares y activan vías de señalización similares

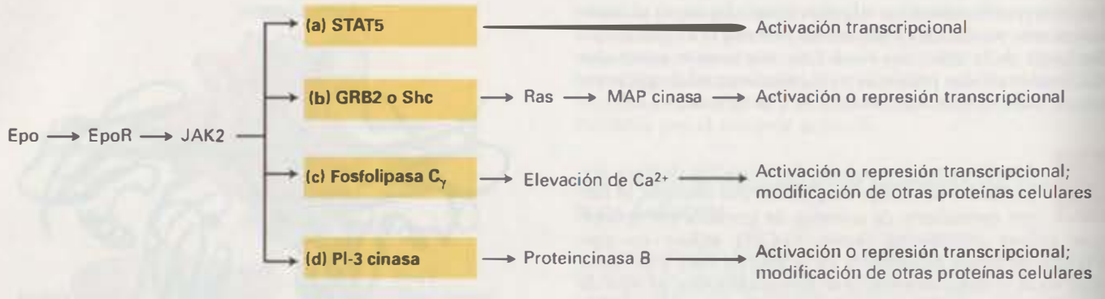
Es llamativo que todas las citocinas tienen una estructura terciaria similar, que consiste en cuatro hélices α muy conservadas, plegadas juntas en una orientación específica. Asimismo, las estructuras de todos los receptores para citocinas son muy similares, con sus dominios extracelulares formados por dos subdominios, cada uno de los cuales contiene siete hebras β conservadas, plegadas juntas de un modo característico. La interacción de eritropoyetina con el receptor dimérico para eritropoyetina (EpoR), representada en la figura 14-8, ejemplifica la unión de una citocina a su receptor. La homología estructural entre las citocinas es evidencia de que éstas evolucionaron de una proteína antecesora común. Asimismo, los diversos receptores sin duda evolucionaron de un antepasado común.



▲ Fig. 14-8. Estructura de la eritropoyetina unida a los dominios extracelulares de un receptor dimérico para eritropoyetina (EpoR). La eritropoyetina contiene cuatro hélices α largas y conservadas que están plegadas en una disposición particular. El dominio extracelular de un monómero EpoR está construido por dos subdominios, cada uno de los cuales contiene siete hebras β conservadas, plegadas juntas de un modo característico. Las cadenas laterales de residuos sobre dos de las hélices en la eritropoyetina contactan con los bucles sobre un monómero EpoR, mientras que los residuos sobre las otras dos hélices Epo se fijan a los mismos segmentos de bucles en un segundo monómero del receptor, por esto estabilizan el receptor dimérico. Las estructuras de otras citocinas y sus receptores son similares a la eritropoyetina y EpoR. (Adaptado de R. S. Syed et al., 1998, Nature 395:511.)

Si una célula responde o no a una citocina particular depende simplemente de si expresa o no el receptor correspondiente (cognado). Si bien todos los receptores para citocina activan vías de señalización intracelular similares, la respuesta de cualquier célula particular a una señal de citocina depende de una constelación de factores de transcripción de la célula, estructuras de la cromatina y otras proteínas que se relacionan con la historia del desarrollo de la célula. Por ejemplo, si los receptores para prolactina o trombopoyetina están expresados en forma experimental en una célula progenitora eritroide, la célula responderá a estas citocinas mediante la división y la diferenciación en glóbulos rojos, no en células mamarias o megacariocitos.

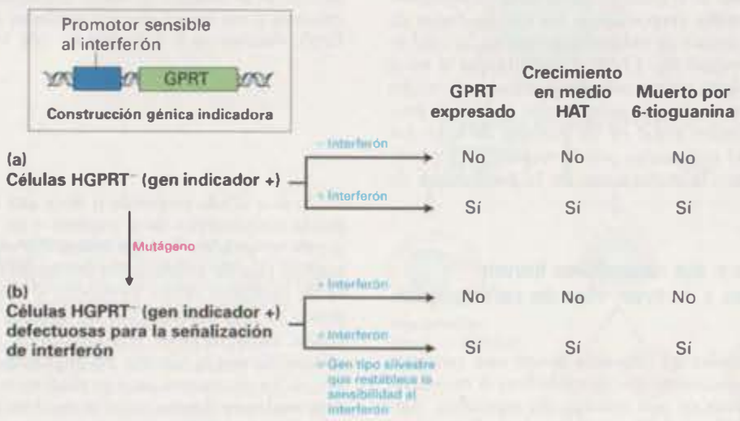
En la figura 14-9 se resumen las vías de señalización intracelular activadas cuando el EpoR une a la eritropoyetina. La estimulación de otros receptores para citocina por sus ligandos específicos activa vías similares. Todas estas vías conducen por último a la activación de factores de transcripción, que causan un aumento o una disminución de la expresión de genes diana particulares. Aquí, nos centramos en *la vía JAK-STAT*; otras vías se describen en secciones posteriores.



▲ Fig. 14-9. Esquema general de las vías de transducción de señales inducidas por unión del ligando al receptor para eritropoyetina (EpoR), un receptor típico para citocina. Cuatro vías principales pueden transducir una señal proveniente del complejo EpoR-JAK activado, fosforilado (véase fig. 14-5, parte inferior). Por último, cada vía regula la transcripción de conjuntos diferentes de genes. (a) En la vía más directa, el factor de transcripción STAT5 es fosforilado y activado en forma directa en el citosol. (b) La fijación de proteínas conectoras (GRB2 o Shc) a un EpoR activado conduce a la activación de la vía Ras-MAP cinasas. (c, d) Dos vías de fosfoinosítidos son inducidas por reclutamiento de la fosfolipasa C_γ y la PI-3 cinasa a la membrana luego de la activación de EpoR. Los niveles elevados de Ca^{2+} y la proteincinasa B activada también modulan la actividad de proteínas citosólicas que no participan en el control de la transcripción.

La genética de las células somáticas reveló que JAK y STAT son proteínas esenciales en la transducción de señales

Después del descubrimiento y la clonación de las citocinas, se aisló la mayor parte de sus receptores mediante expresión de la clonación u otras estrategias. Sin embargo, la dilucidación de los componentes esenciales de sus vías de señalización intracelular recién se produjo con el desarrollo de nuevos tipos de enfoques genéticos mediante el empleo de cultivo de células de mamíferos. En estos estudios, un gen indicador (*reporter*) bacteriano que codifica guaninfosforribosiltransferasa (GPRT) fue unido a un promotor en dirección 5', sensible al interferón. La construcción génica resultante fue introducida en células de mamíferos cultivadas que eran genéticamente deficientes en el homólogo humano HGPRT. Es necesario GPRT o HGPRT para la incorporación de purinas presentes en el medio de cultivo dentro de los ribonucleótidos y luego dentro del DNA o del



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 14-10 Para identificar JAK y STAT como proteínas esenciales en la transducción de señales se utilizaron células mutagenizadas que portan un gen indicador sensible al interferón utilizadas. Se construyó un gen indicador que consiste en un promotor sensible al interferón en el extremo 5' del gen bactenano que codifica GPRT, una enzima fundamental en la vía de salvataje de la purina (véase fig. 6-39). (a) La introducción de esta construcción dentro de células de mamíferos que carecen del homólogo mamífero HGPRT produjo células indicadoras que crecieron en medio HAT y eran muertas por 6-tioguanina en presencia de interferón, pero no en su ausencia. (b) Luego del tratamiento de las células indicadoras con un mutágeno, las células con defectos en la vía de señalización iniciadas por interferón no inducen GPRT en respuesta al interferón y, por tanto, no pueden incorporar la purina tóxica 6-tioguanina. El restablecimiento de la sensibilidad al interferón por complementación funcional con genes identificó clones de DNA de tipo silvestre que codifican JAK y STAT. Para los detalles, véase el texto. (Véase R. McKendry et al., 1991, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 88:11455; D. Watling et al., 1993, Nature 366:166; y G. Stark and A. Gudkov, 1999, Human Mol. Genet., 8:1925.)

RNA. Como se muestra en la figura 14-10a, HGPRT negativa que portan el gen indicador responden al tratamiento con interferón mediante la expresión de GPRT y así adquieren la capacidad de crecer en el medio HAT. Este medio no permite el crecimiento de células que carecen de GPRT o HGPRT, dado que la síntesis de purinas por las células es bloqueada por la aminopterina (la A en HAT) y, en consecuencia, la síntesis de DNA depende de la incorporación de purinas provenientes del medio de cultivo (véase fig. 6-39). De manera simultánea las células adquieren sensibilidad a la muerte por el análogo de purina 6-tioguanina, que es convertido en el ribonucleótido correspondiente por GPRT; la incorporación de esta purina en el DNA en lugar de la guanosina causa, por último, la muerte celular.

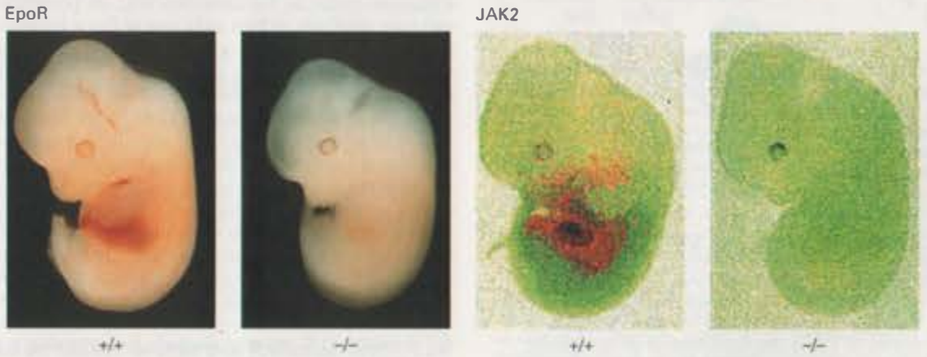
Luego, las células indicadoras fueron tratadas intensamente con mutágenos en un intento de inactivar ambos alelos de los genes que codifican las proteínas fundamentales de la transducción de la señal en la vía de señalización del interferón. Los investigadores buscaron células mutantes que expresaban el receptor para interferón (evidenciado por la capacidad de la célula de fijar al interferón radiactivo), pero no expresaban GPRT en respuesta al interferón y por eso sobrevivían a la muerte por 6-tioguanina cuando eran cultivadas en presencia de interferón (fig. 14-10b). Después de haber obtenido muchas de estas líneas celulares no respondedoras al interferón, se las utilizó para estudiar una genoteca de cDNA para los genes de tipo silvestre que complementaran los genes mutados en las células que no responden, una técnica denominada **complementación funcional** (véase fig. 9-20). En este caso, las células mutantes que expresan el gen de tipo silvestre recombinante correspondiente crecieron en medio HAT y fueron sensibles a la muerte por 6-tioguanina en presencia de interferón. Es decir, actuaron como las células del tipo silvestre.

La clonación de los genes identificados por este procedimiento condujo al reconocimiento de dos proteínas fundamentales en la transducción de señales: una JAK tirosincinasa y un factor de transcripción STAT. Las investigaciones posteriores mostraron que una (a veces dos) de las cuatro proteínas JAK humanas y al menos una de las diversas proteínas STAT están involucradas en las etapas de señalización posteriores de todos los receptores para citocina. Para comprender cómo funcionan las proteínas JAK y STAT, examinamos una de las vías de señalización de citocinas mejor estudiadas, la vía que se desarrolla corriente abajo del receptor para eritropoyetina.

Las JAK cinasas asociadas al receptor activan factores de transcripción STAT unidos a un receptor para citocina

La cinasa JAK2 está firmemente unida al dominio citosólico del receptor para eritropoyetina (EpoR). Como los otros tres miembros de la familia de las JAK cinasas, JAK2 contiene un dominio N-terminal de unión al receptor, un dominio cinasa C-terminal que suele ser poco activo desde el punto de vista catalítico y un dominio medial de función desconocida. JAK2, eritropoyetina y EpoR son requeridos para la formación de eritrocitos del tipo adulto que, en los ratones, por lo general comienza el día 12 del desarrollo embrionario. Como se muestra en la figura 14-11, los embriones de ratones que carecen de genes funcionales que codifican EpoR o JAK2 no pueden formar eritrocitos del tipo adulto y, por último, mueren debido a la incapacidad para transportar oxígeno a los órganos fetales.

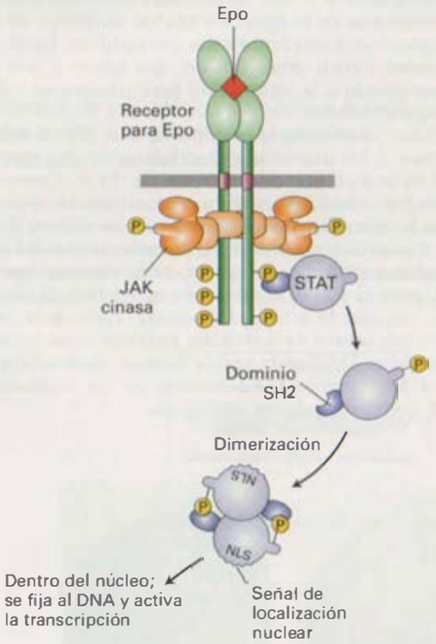
Como ya se notó, la eritropoyetina se fija de manera simultánea a los dominios extracelulares de dos monómeros EpoR en la superficie celular (véase fig. 14-8). Como resultado, las JAK asociadas aparecen tan juntas que una puede fosforilar la otra sobre una tirosina crítica en el labio de activación. Como con otras cinasas, la fosforilación del labio de activación conduce a un cambio conformacional que reduce la K_m para el ATP o el sustrato por ser fosforilado, por lo tanto, aumenta la actividad de cinasa. Parte de la evidencia de este mecanismo de activación proviene de un estudio con una mutante JAK2 en la cual la tirosina fundamental es mutada a fenilalanina. JAK2 mutante se fija normalmente a EpoR, pero no puede ser fosforilada.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 14-11 Estudios con ratones mutantes revelan que el receptor para eritropoyetina (EpoR) y JAK2 son esenciales para el desarrollo de los eritrocitos. Los ratones en los que ambos alelos de los genes EpoR o JAK2 están desactivados (*knocked out*) se desarrollan en forma normal hasta el día 13 de la vida embrionaria, momento en el cual comienzan a morir por anemia debida a la falta de transporte de oxigeno mediado por eritrocitos a los órganos fetales. El órgano rojo en los embriones de tipo silvestre (+/+) es el hígado fetal, el principal sitio de producción de eritrocitos en las etapas del desarrollo. La ausencia de color en los embriones mutantes (-/-) indica la ausencia de eritrocitos que contienen hemoglobina. Los embriones mutantes parecen normales en otros aspectos, lo que indica que la principal función de EpoR y JAK2 en las primeras etapas del desarrollo del ratón es apoyar la producción de eritrocitos. (Imágenes de EpoR de H. Wu et al., 1995, Cell 83:59, imágenes de JAK2 de H. Neubauer et al., 1998, Cell 93:307.)

La expresión de esta mutante JAK2 en las células eritroides en cantidades mayores que lo normal bloquea en forma total la señalización EpoR, así como la mutante JAK2 bloquea la función de la proteína de tipo silvestre. Este tipo de mutación, denominado *dominante negativa*, causa pérdida de la función incluso en células que portan copias del gen de tipo silvestre (cap. 9).

Una vez que las JAK cinasas se activan, fosforilan diversos residuos de tirosina en el dominio citosólico del receptor. Algunos de estos residuos de fosfotirosina actúan entonces como sitios de fijación para un grupo de factores de transcripción denominados en conjunto *STAT*. Todas las proteínas STAT contienen un dominio SH2 N-terminal que se fija a fosfotirosina en el dominio citosólico del receptor, un dominio de fijación al DNA central y un dominio C-terminal con un residuo de tirosina fundamental. Cuando STAT está unida al receptor, la tirosina C-terminal es fosforilada por una JAK cinasa asociada (fig. 14-12). Este ordenamiento asegura que en una célula particular sólo serán activadas las proteínas STAT con un dominio SH2 que pueden unirse a una proteína receptor particular. Una STAT fosforilada se disocia del receptor en forma espontánea y dos proteínas STAT fosforiladas forman un dímero en el cual el dominio SH2 de cada una se fija a la fosfotirosina en la otra. Debido a que la dimerización expone la señal de localización nuclear (*nuclear-localization signal*; NLS), los dímeros STAT se movilizan hacia el interior del núcleo, donde se fijan a secuencias potenciadoras que controlan a los genes diana.



▲ **Fig. 14-12. Vía de señalización JAK-STAT.** Luego de la fijación del ligando a un receptor para citocina y la activación de una JAK cinasa asociada, JAK fosforila varios residuos de tirosina sobre el dominio citosólico del receptor (véase fig. 14-5, *parte inferior*). Después que un factor de transcripción STAT monomérico inactivo se une a una fosfotirosina en el receptor, es fosforilada por JAK activa. Las STAT fosforiladas se disocian en forma espontánea del receptor y se dimerizan espontáneamente. Dado que el homodímero STAT tiene dos interacciones con los dominios SH2-fosfotirosina, mientras el complejo receptor-STAT está estabilizado sólo por una de estas interacciones, los STAT fosforilados tienden a no volver a fijarse con el receptor. El dímero STAT, que tiene dos señales de localización nuclear (NLS) expuestas, se moviliza al interior del núcleo, donde puede fijarse a secuencias promotoras y activar la transcripción de los genes diana.

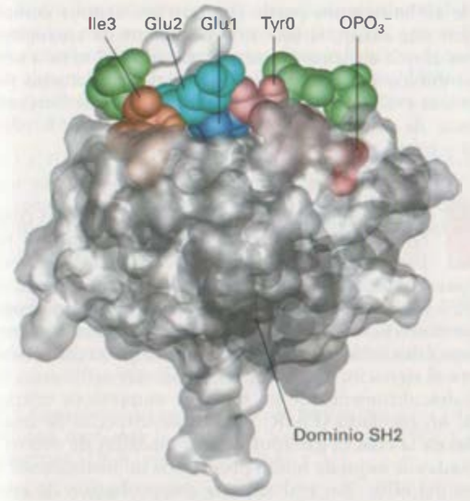
Las diferentes STAT activan genes distintos en células diferentes. Por ejemplo, en los progenitores eritroides la estimulación con eritropoyetina conduce a la activación de STAT5. La principal proteína inducida por STAT5 activa es Bcl-x_L, que impide la muerte celular programada, o apoptosis, de estos progenitores, lo cual les permite proliferar y diferenciarse en células eritroides (véase fig. 14-7). De hecho, los ratones que carecen de STAT5 presentan una anemia muy pronunciada debido a que muchos de los progenitores eritroides sufren apoptosis incluso en presencia de niveles elevados de eritropoyetina. Estos ratones mutantes producen *algunos* eritrocitos y por esto sobreviven, ya que el receptor para eritropoyetina está ligado a otras vías antiapoptóticas en las que no participan las proteínas STAT (véase fig. 14-9).

Los dominios SH2 y PTB se fijan a secuencias específicas que rodean a los residuos fosfotirosina

Como ya se mencionó, muchas proteínas de transducción de señal intracelular contienen un dominio SH2 o PTB por los cuales se fijan a un receptor activado u otro componente de una vía de señalización que contiene un residuo fosfotirosina (véase fig. 14-6). El dominio SH2 deriva de su nombre completo en inglés *Src homology 2 domain* (dominio 2 de homología Src), por su homología con una región tirosincinasa citosólica prototípica codificada por el gen *src*. Las estructuras tridimensionales de los dominios SH2 en proteínas diferentes son muy similares, si bien cada una se fija a secuencias de aminoácidos diferentes que rodean un residuo de fosfotirosina. La secuencia del aminoácido única de cada dominio SH2 determina los residuos fosfotirosina específicos a los que se fija.

Por ejemplo, el dominio SH2 de la Src tirosincinasa se fija con firmeza a cualquier péptido que contiene una secuencia central fundamental de cuatro residuos: fosfotirosina-ácido glutámico-ácido glutámico-isoleucina (fig. 14-13). Estos cuatro aminoácidos permiten el contacto íntimo con el sitio de fijación del péptido en el dominio Src SH2. La fijación recuerda la inserción de un "enchufe" de dos clavijas –las cadenas laterales de fosfotirosina e isoleucina del péptido– en un "tomacorrientes" para dos clavijas en el dominio SH2. Los dos ácidos glutámicos ajustan perfectamente en la superficie del dominio SH2 entre el enchufe fosfotirosina y el tomacorriente hidrófobo que acepta el residuo isoleucina.

Las variaciones en el "tomacorriente" hidrófobo en los dominios SH2 de STAT diferentes y otras proteínas de transducción de señales les permite fijarse a fosfotirosinas adyacentes en secuencias diferentes, lo cual determina las diferencias en sus parejas de fijación. La especificidad de unión de los dominios SH2 está determinada en gran parte por los residuos C-terminal a la fosfotirosina en el péptido diana. Por el contrario, la especificidad de unión de los dominios PTB



▲ **Fig. 14-13. Modelo de superficie del dominio SH2 de Src cinasa fijada a un péptido que contiene fosfotirosina.** El péptido fijado a este dominio SH2 (gris) se muestra en un diagrama espacial. La fosfotirosina (Tyr0 y OPO_3^-, anaranjado) y los residuos de isoleucina (Ile3, anaranjado) encajan en un tomacorrientes de dos clavijas sobre la superficie del dominio SH2; los dos residuos de glutamato (Glu1, azul oscuro; Glu2, azul claro) están fijados a los sitios en la superficie del dominio SH2 entre los dos tomacorrientes. Los residuos no fijados en el péptido diana están coloreados de verde. (Véase G. Waksman et al., 1993, Cell 72:779.)

está determinada por residuos específicos a cinco a ocho residuos N-terminal del residuo fosfotirosina. Algunas veces un dominio PTB se fija a un péptido diana aún si la tirosina no está fosforilada.

La señalización proveniente de los receptores para citocinas es modulada por señales negativas

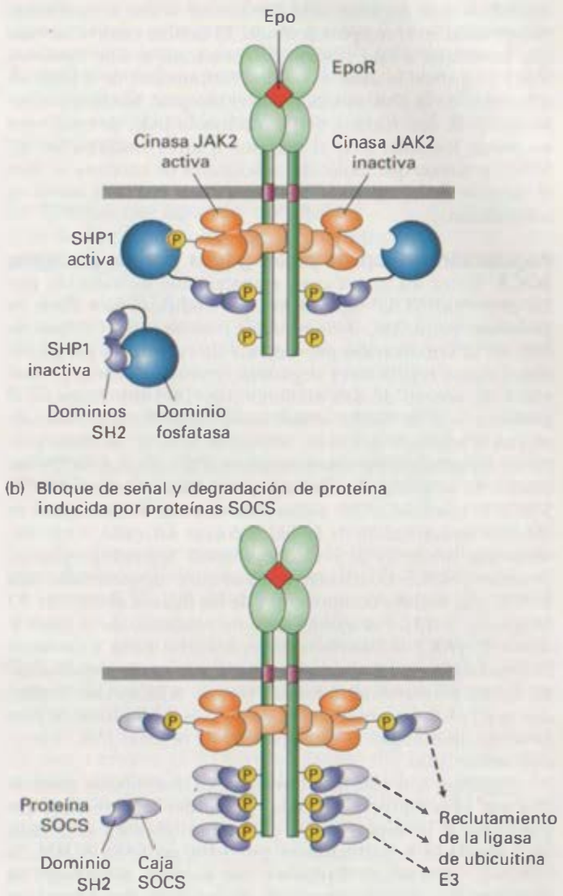
La transcripción de los genes diana inducida por señales durante un período demasiado prolongado puede ser tan perjudicial para la célula como la inducción demasiado corta. Por esto, las células deben poder interrumpir una vía de señalización con rapidez a menos que la señal extracelular esté presente en forma continua. En varias células progenitoras, dos clases de proteínas actúan para amortiguar la señalización proveniente de los receptores para citocinas, una en lapsos breves (minutos) y la otra en lapsos más prolongados.

Regulación en lapsos breves por fosfatasa SHP1. Los ratones mutantes que carecen de *fosfatasa SHP1* mueren debido a la producción excesiva de eritrocitos y otros diversos tipos de células sanguíneas. El análisis de estos ratones mutantes brindó la primera sugerencia de que SHP1, una fosfatasa de fosfotirosina, regula negativamente la señalización proveniente de diversos tipos de receptores para citocinas en varios tipos de células progenitoras.

El modo en que SHP1 amortigua la señalización por citocinas está representado en la figura 14-14a. Además de un dominio catalítico fosfatasa, SHP1 tiene dos dominios SH2. Cuando las células no son estimuladas por una citocina (están en estado de reposo), uno de los dominios SH2 se fija en forma física

(a) Desactivación de JAK2 inducida por la fosfatasa SHP1

(b) Bloque de señal y degradación de proteína inducida por proteínas SOCS



▲ **Fig. 14-14. Dos mecanismos para la finalización de la transducción de la señal del receptor para eritropoyetina (EpoR).** (a) SHP1, una proteintirosina fosfatasa, está presente en una forma inactiva en células no estimuladas. La fijación de un dominio SH2 en SHP1 para una fosfotirosina particular en el receptor activado desenmascara su sitio catalítico fosfatasa y lo posiciona cerca de la tirosina fosforilada en la región del labio de JAK2. La eliminación del fosfato de esta tirosina inactiva la JAK cinasa. (b) Las proteínas SOCS, cuya expresión es inducida en las células eritroides estimuladas por eritropoyetina, inhiben en forma permanente la señalización en períodos más prolongados. La fijación de SOCS a los residuos de fosfotirosina en EpoR o JAK2 bloquea la fijación de otras proteínas de señalización (*izquierda*). La caja SOCS también puede dirigir proteínas como JAK2 para la degradación por la vía de ubicuitina-proteasoma (*derecha*). Mecanismos similares regulan la señalización proveniente de otros receptores para citocina. [Parte (a) adaptado de S. Constantinescu et al., 1999, Trends Endocrin. Metabol. 10:18; parte (b) adaptado de B. T. Kile y W. S. Alexander, 2001, Cell. Mol. Life Sci. 58: 1.]

e inactiva el sitio catalítico en SHP1. Sin embargo, en el estado estimulado este dominio SH2 bloqueante se fija a un residuo fosfotirosina en el receptor activado. El cambio conformacional que acompaña a esta fijación desenmascara el sitio catalítico SHP1 y también lo atrae al residuo fosfotirosina en el labio de activación de la JAK asociada con el receptor. Mediante la eliminación de este fosfato, SHP1 inactiva la JAK, de modo que no puede fosforilar más el receptor u otros sustratos (p. ej., STAT) a menos que moléculas adicionales de citocinas se fijen al receptor de la superficie celular e inicien una serie nueva de señalización.

Regulación en lapsos prolongados por las proteínas SOCS. Entre los genes cuya transcripción es inducida por las proteínas STAT figuran los que codifican una clase de proteínas pequeñas, denominadas *proteínas SOCS*, que finalizan la señalización proveniente de receptores para citocinas. Estos reguladores negativos, conocidos como *proteínas CIS*, actúan de dos maneras (fig. 14-14b). Primero, el dominio SH2 de varias proteínas SOCS se fija a fosfotirosinas en el receptor activado, impide la fijación de otras proteínas de señalización que contienen SH2 (p. ej., STAT) y así inhibe la señalización del receptor. Una proteína SOCS, SOCS-1, también se fija a una fosfotirosina fundamental en el labio de activación de la JAK2 cinasa activada, y en consecuencia inhibe su actividad catalítica. Segundo, todas las proteínas SOCS contienen un dominio, denominado *caja SOCS*, que recluta componentes de las ligasas ubicuitina E3 (véase fig. 3-13). Por ejemplo, como resultado de la fijación SOCS-1, JAK2 se convierte en poliubicuitinada y entonces es degradada en los proteosomas; por lo tanto, interrumpe en forma permanente todas las vías de señalización mediadas por JAK2. La observación de que los inhibidores de proteosomas prolongan la transducción de la señal JAK2 apoya este mecanismo.

Estudios con células cultivadas de mamíferos mostraron que el receptor para la hormona del crecimiento, que pertenece a la superfamilia de receptores para citocinas, está regulado negativamente por otra proteína SOCS, la SOCS-2. De manera llamativa, los ratones deficientes en esta proteína SOCS tienen un crecimiento mucho mayor que sus contrapartes de tipo silvestre, con mayor longitud de los huesos largos y agrandamiento proporcionado de la mayor parte de los órganos. Por lo tanto, las proteínas SOCS desempeñan un papel negativo esencial en la regulación de la señalización intracelular proveniente de los receptores para eritropoyetina, hormona del crecimiento y otras citocinas.

El receptor mutante de eritropoyetina que no puede ser regulado negativamente conduce a un aumento del hematocrito

En hombres y mujeres adultos sanos, el porcentaje de eritrocitos en la sangre (*hematocrito*) se mantiene muy próximo al 45-47%. Una disminución del hematocrito produce un aumento de la producción de eritropoyetina por los riñones. El nivel elevado de eritropoyetina determina que más progenitores eritroides sufran por último proliferación y diferenciación en eritrocitos maduros, que rápidamente restablecen el hematocrito a su nivel normal. En deportes de resistencia, como esquí de fondo, en el que el transporte de oxígeno a los músculos puede ser un factor limitante, un exceso de glóbulos rojos puede conferir una ventaja competitiva. Por esta razón, el uso de suplementos de eritropoyetina para elevar el hematocrito por encima del nivel normal está prohibido en muchas competencias de atletismo y los atletas son evaluados de manera regular para determinar la presencia de eritropoyetina recombinante comercial en su sangre y orina.



Los suplementos de eritropoyetina no sólo confieren una posible ventaja competitiva sino que también pueden ser perjudiciales. Demasiados glóbulos rojos pueden hacer que la sangre circule con lentitud y se coagule en los vasos sanguíneos de pequeño calibre, en especial en el cerebro. Varios atletas que se automedicaron con eritropoyetina fallecieron a causa de un accidente cerebrovascular durante el ejercicio.

El descubrimiento de un receptor mutante de eritropoyetina, no regulado (EpoR) explicó la sospecha de una situación en la cual el ganador de tres medallas de oro en las olimpíadas de esquí de fondo presentaba un hematocrito por encima del 60%. Sin embargo, la comprobación de eritropoyetina en su sangre y orina reveló cantidades menores que lo normal. Los análisis de DNA ulteriores mostraron que el atleta era heterocigótico para una mutación en el gen que codifica el receptor para eritropoyetina. El alelo mutante codificó un receptor truncado al que le faltan varias tirosinas que normalmente se fosforilan después de la estimulación por eritropoyetina. Como consecuencia, el receptor mutante era capaz de activar STAT5 y otras proteínas de señalización en forma normal, pero era incapaz de fijarse a la fosfatasa SHP1 que actúa en forma negativa, la cual suele finalizar la señalización (véase fig. 14-14a). Así, los niveles muy bajos de eritropoyetina producidos por este atleta indujeron señalización intracelular prolongada en sus células progenitoras eritroides, lo que dio por resultado una producción de eritrocitos más alta que lo normal. Este ejemplo describe vívidamente el nivel de control fino sobre la señalización proveniente del receptor para eritropoyetina en el organismo humano. ▮

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 14.2

Receptores para citocinas y vía JAK-STAT

- Dos clases de receptores, receptores para citocinas y receptores tirosincinasas, transducen señales mediante sus proteínas tirosincinasas asociadas o intrínsecas. La fijación del ligando activa la formación de receptores diméricos funcionales y la fosforilación del "labio" de activación en las cinasas, lo que refuerza su actividad catalítica (véase fig. 14-5).
- Todas las citocinas están formadas por cuatro hélices α que están plegadas en una disposición característica.
- La eritropoyetina, una citocina secretada por las células renales, evita la apoptosis y estimula la proliferación y la diferenciación de la célula progenitora eritroide en la médula ósea. Un exceso de eritropoyetina o mutaciones en su receptor que impiden la regulación negativa da por resultado la producción de cantidades elevadas de glóbulos rojos.
- Todos los receptores para citocinas están estrechamente asociados con una proteína tirosincinasa JAK, que puede activar corriente abajo varias vías de señalización que conducen a cambios en la transcripción de los genes diana o en la actividad de proteínas que no regulan la transcripción (véase fig. 14-9).
- La vía JAK-STAT opera corriente abajo de todos los receptores para citocinas. Los monómeros STAT fijados a los receptores son fosforilados por las JAK asociadas con el receptor, luego se dimerizan y se movilizan hacia el núcleo, donde activan la transcripción (véase fig. 14-12).
- Las secuencias cortas de péptidos que contienen residuos fosfotirosinas están unidas por dominios SH2 y PTB, los cuales se encuentran en muchas proteínas que transducen señales. Estas interacciones proteína-proteína son importantes en muchas vías de señalización.
- La señalización proveniente de receptores para citocinas termina mediante la fosfatasa fosfotirosina SHP1 y varias proteínas SOCS (véase fig. 14-14).

14.3 Receptores tirosincinasas y activación de Ras

Volvemos ahora al receptor tirosincinasa (RTK), que tiene actividad intrínseca de proteína tirosincinasa en su dominio citosólico. Los ligandos para RTK son péptidos solubles o fijados a la membrana u hormonas proteicas que incluyen el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la insulina. La activación de un RTK inducida por el ligando estimula su actividad de tirosincinasa, la cual estimula luego la *vía de Ras-MAP cinasa* y varias otras vías de transducción de señales. Las vías de señalización RTK tienen un amplio espectro de funciones que incluyen la regulación de la proliferación y la diferenciación celular, la estimulación de la supervivencia celular y la modulación del metabolismo celular.



Algunos RTK fueron identificados en estudios sobre cánceres humanos asociados con formas mutantes de receptores para factores de crecimiento, que envían una señal proliferativa a las células, incluso en ausencia del factor de crecimiento. Por ejemplo, una forma mutante activa constitutivamente de Her2, un receptor para proteínas similares a EGF, posibilita la proliferación descontrolada de las células cancerosas incluso en ausencia de EGF, requerido para la proliferación de células normales (véase fig. 23-14). De manera alternativa, la producción excesiva del receptor de tipo silvestre para EGF en ciertos cánceres mamarios humanos produce la proliferación en niveles bajos de EGF que no estimulan a las células normales; los anticuerpos monoclonales dirigidos contra su receptor EGF resultaron ser útiles desde el punto de vista terapéutico en estas pacientes. Otros RTK fueron descubiertos durante el análisis de mutaciones del desarrollo que conduce al bloqueo en la diferenciación de ciertos tipos celulares en *C. elegans*, en *Drosophila* y en el ratón. ▮

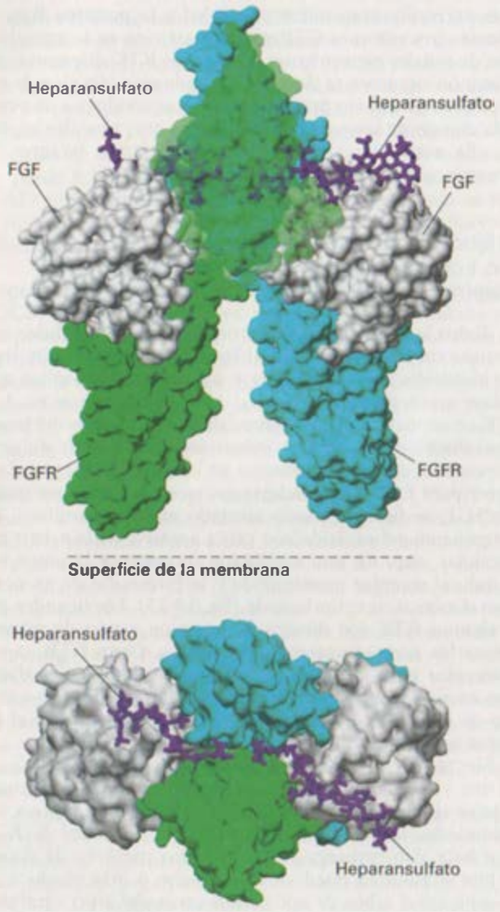
Aquí describimos el modo por el cual la unión del ligando conduce a la activación de RTK y cómo los receptores activados transmiten una señal a la **proteína Ras**, la proteína interruptora GTPasa que participa en la transducción de señales provenientes de muchos RTK diferentes. En la sección siguiente se describe cómo la transducción de señales corriente abajo proveniente de Ras conduce a una cascada común de serina/treonina cinasas que, por último, lleva a la activación de MAP cinasa y ciertos factores de transcripción.

La fijación del ligando conduce a la transfosforilación de los receptores tirosincinasas

Todos los RTK constituyen un dominio extracelular que contiene un sitio de fijación al ligando, una hélice alfa simple hidrófoba transmembrana y un dominio citosólico que incluye una región con actividad de proteintirosincinasa. Los RTK en su mayoría son monoméricos y la fijación del ligando al dominio extracelular induce la formación de dímeros del receptor, como se representa en la figura 14-4 para el receptor para EGF. Algunos ligandos monoméricos, que incluyen FGF, se fijan de modo ajustado al heparansulfato, un componente polisacárido con carga negativa de la matriz extracelular (cap. 6); esta asociación incrementa la unión del ligando al receptor monomérico y la formación de un complejo dimérico receptor-ligando (fig. 14-15). Los ligandos para algunos RTK son diméricos; su unión asocia de manera directa los dos receptores monoméricos. Otros RTK, como el receptor para insulina, forma dímeros con enlaces disulfuro en ausencia de la hormona; la unión del ligando a este tipo de RTK altera su conformación de modo tal que el receptor es activado.

Sin tener en cuenta el mecanismo por el cual el ligando une y retiene el RTK en un estado dimérico funcional, el paso siguiente es universal. En el estado de reposo, no estimulado, la actividad de cinasa intrínseca del RTK es muy baja. Sin embargo, en el receptor dimérico la cinasa en una subunidad puede fosforilar uno o más residuos de tirosina en el labio de activación cerca del sitio catalítico en la otra subunidad. Esto lleva a un cambio conformacional que facilita la fijación de ATP en algunos receptores (p. ej., receptor para insulina) y la fijación de sustratos proteicos en otros receptores (p. ej., receptor FGF). El aumento de la actividad de cinasa resultante fosforila entonces otros sitios en el dominio citosólico del receptor. Esta activación de la actividad RTK cinasa inducida por el ligando es análoga a la de las JAK cinasas asociadas con receptores para citocinas (véase fig. 14-5). La diferencia reside en la localización del sitio catalítico de la cinasa, que se ubica dentro del dominio citosólico de los RTK, pero dentro de una JAK cinasa separada en el caso de receptores para citocinas.

Como en la señalización por receptores para citocinas, los residuos fosfotirosinas en RTK activados actúan como sitios de acoplamiento para proteínas involucradas en la progresión de la transducción de la señal. Muchos residuos fosfotirosinas en los RTK activados interactúan con *proteínas adaptadoras*, proteínas pequeñas que contienen dominios SH2, PTB o SH3, pero no tienen actividades enzimáticas intrínsecas ni de señalización (véase fig. 14-6). Estas proteínas acoplan a los RTK activados a otros componentes de las vías de transducción de señales como la que comprende la activación de Ras.



▲ Fig. 14-15. Estructura del receptor fijado al ligando dimerizado para el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el cual es estabilizado por heparansulfato. Aquí se muestran imágenes laterales y superiores del complejo que comprenden los dominios extracelulares de dos monómeros del receptor FGF (FGFR) (verde y azul), dos moléculas FGF fijadas (blanco) y dos cadenas cortas de heparansulfato (violeta), que se fijan de manera ajustada al FGF en la imagen lateral, el dominio superior de un receptor (azul) está situado detrás de otro (verde). En la imagen vista desde arriba, las cadenas del heparansulfato se ensartan entre los dominios superiores de ambos monómeros del receptor y forman numerosos contactos. Estas interacciones estimulan la fijación del ligando al receptor y la dimerización del receptor. (Adaptado de J. Schlessinger et al., 2000, Mol. Cell 6:743.)

La proteína Ras, una GTPasa interruptora, cicla entre los estados activo e inactivo

Ras es una proteína interruptora monomérica de fijación del GTP que, como las subunidades G_α en las proteínas G triméricas, alterna entre un estado activo *"on"* con un GTP unido y un estado inactivo *"off"* con un GDP unido. Como se mencionó en el capítulo 13, las proteínas G triméricas están ligadas en forma directa a los receptores de la superficie celular y transduce señales, por medio de la subunidad G_α, a varios efectores como adenililciclasa. Por el contrario, Ras no está ligada directamente a los receptores de la superficie celular.

La activación de Ras es acelerada mediante un *factor de intercambio del nucleótido guanina (GEF)*, que se une al complejo Ras·GDP y causa la disociación del GDP unido (véase fig. 3-29). Dado que GTP está presente en las células en una concentración más elevada que la del GDP, el GTP se une de modo espontáneo a las moléculas Ras "vacías", con liberación de GEF y formación de Ras·GTP activa. La hidrólisis posterior del GTP fijado a GDP desactiva Ras. A diferencia de la desactivación de G_α·GTP, la desactivación de Ras·GTP requiere la asistencia de otra proteína, la *proteína de activación de la GTPasa (GAP)* que se une al complejo Ras·GTP y acelera su actividad intrínseca de GTPasa más de cien veces. Así, la vida media promedio de un GTP fijado a Ras es de alrededor de 1 minuto, que es mucho más prolongada que la vida media promedio de G_α·GTP. En las células, la GAP se fija a fosfotirosinas específicas en RTK activados, lo que los acerca lo suficiente al Ras·GTP fijado a la membrana como para ejercer su efecto acelerador sobre la hidrólisis de GTP. La hidrólisis real de GTP está catalizada por aminoácidos provenientes de Ras y GAP. En particular, la inserción de una cadena lateral de arginina sobre GAP dentro del sitio activo de Ras estabiliza un intermediario en la reacción de hidrólisis.

Las diferencias en los mecanismos de ciclado de Ras y G_α se reflejan en sus estructuras. Ras (≈170 aminoácidos) es más pequeña que las proteínas G_α (≈300 aminoácidos), si bien su estructura tridimensional es similar a la del dominio GTPasa de G_α (véase fig. 13-8). Los estudios estructurales y bioquímicos recientes muestran que G_α también contiene otro dominio que, en apariencia, funciona como GAP para aumentar la velocidad de hidrólisis de GTP por G_α. Además, la interacción directa entre un receptor activado y la proteína G inactiva estimula la liberación de GDP y la fijación de GTP, de modo que no se requiere un factor de intercambio de nucleótido separado.

Ambas, las proteínas G triméricas y Ras son miembros de una familia de proteínas interruptoras de fijación de GTP intracelulares que en conjunto se denominan superfamilia GTPasa, mencionadas en el capítulo 3. Las similitudes entre la estructura y la función de Ras y G_α y la identificación de ambas proteínas en todas las células eucariontes indican la existencia de un solo tipo de GTPasa transductora de señales originada muy temprano en la evolución. De hecho, sus estructuras son similares a las de los factores de fijación de GTP involucrados en la síntesis de proteínas, encontrados en todas las células procariontes y eucariontes. El gen que codifica esta proteína ancestral luego se replicó y evolucionó en tal magnitud que el genoma humano codifica una superfamilia de estas GTPasas, que comprenden tal vez un centenar de proteínas interruptoras intracelulares diferentes. Estas proteínas relacionadas controlan muchos aspectos del crecimiento y del metabolismo celular.

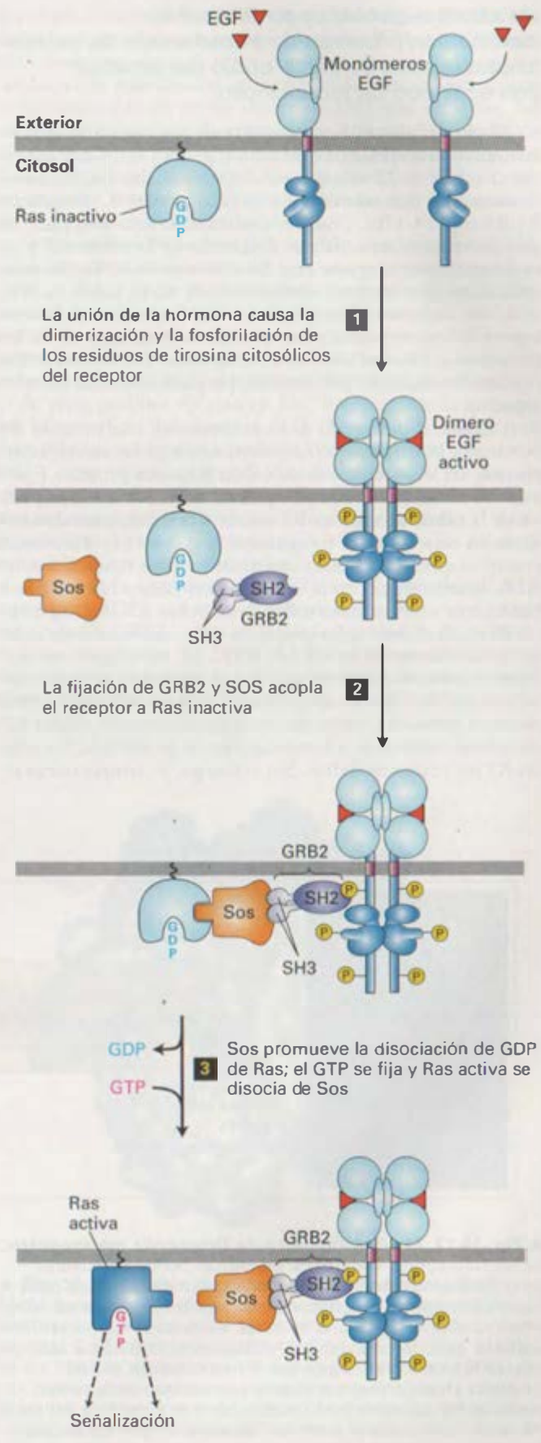
MEDICINA

Las proteínas Ras de los mamíferos fueron estudiadas en profundidad debido a que las proteínas Ras mutantes están asociadas con muchos tipos de cánceres humanos. Estas proteínas mutantes, que se fijan al GTP, pero no pueden hidrolizarlo, están en forma permanente en el estado activo "on" y contribuyen a la transformación neoplásica (cap. 23). La determinación de la estructura tridimensional del complejo Ras·GAP explicó la observación enigmática de que la mayor parte de las proteínas Ras oncogénicas, constitutivamente activas (Ras^D) contienen una mutación en la posición 12. El reemplazo de la glicina-12 normal con cualquier otro aminoácido (excepto prolina) bloquea la fijación funcional de GAP y en esencia "inmoviliza" la Ras en el estado fijado al GTP activo. ▮

Una proteína adaptadora y el factor intercambiador de nucleótido de guanina unen el receptor tirosincinasa activado a la Ras

La primera indicación de que Ras funciona corriente abajo desde RTK en una vía de señalización común proviene de experimentos en los cuales los fibroblastos cultivados fueron inducidos a proliferar mediante el tratamiento con una mezcla de PDGF y EGF. La microinyección de anticuerpos anti-Ras en estas células bloqueó la proliferación celular. A la inversa, la inyección de Ras^D, una proteína Ras mutante constitutivamente activa que hidroliza GTP de modo muy poco eficaz y por esto persiste en el estado activo, hizo que las células proliferaran en ausencia de factores de crecimiento. Estas observaciones son compatibles con los estudios que muestran que el agregado de FGF a los fibroblastos conduce a un aumento rápido en la proporción de Ras presente en la forma activa unida a GTP.

¿De qué modo la unión de un factor de crecimiento (p. ej., EGF) a un RTK (p. ej., el receptor para EGF) conduce a la activación de Ras? Dos proteínas citosólicas –GRB2 y Sos– proporcionan los enlaces fundamentales (fig. 14-16). Un dominio SH2 en GRB2 se fija a un residuo fosfotirosina específico en el receptor activado. GRB2 también contiene dos *dominios SH3*, que se fijan a Sos y la activan. Así, GRB2 funciona como una proteína adaptadora para el receptor EGF. Sos es una proteína de intercambio del nucleótido guanina (GEF), que cataliza la conversión de Ras inactiva unida a GDP, a la forma activa unida a GTP. Los análisis genéticos de mutantes en el gusano *C. elegans* y en la mosca *Drosophila* bloqueados en estadios de diferenciación particulares fueron fundamentales para dilucidar los papeles que desempeñan estas dos proteínas en relacionar un RTK a la activación de Ras. Con la finalidad de ilustrar este enfoque experimental, consideramos el desarrollo de un tipo celular particular en el ojo compuesto de *Drosophila*.



▶ Fig. 14-16 Activación de Ras luego de la fijación del ligando al receptor tirosincinasa (RTK). Los receptores para el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y muchos otros factores de crecimiento son RTK. La proteína adaptadora citosólica GRB2 se fija a una fosfotirosina específica en un receptor activado fijado al ligando y a la proteína SOS citosólica, que lo acerca a su sustrato, el Ras·GDP inactivo. La actividad del factor de intercambio del nucleótido guanina (GEF) de SOS estimula entonces la formación de Ras GTP activo. Nótese que Ras está ligado a la membrana por un anclaje farnesilo hidrófobo (véase fig. 5-15). (Véase J. Schlessinger, 2000, Cell 103:211 y M. A. Simon, 2000, Cell 103:13.)

Los estudios genéticos en *Drosophila* identificaron proteínas de transducción de señales fundamentales corriente abajo del receptor con actividad de tirosincinasa

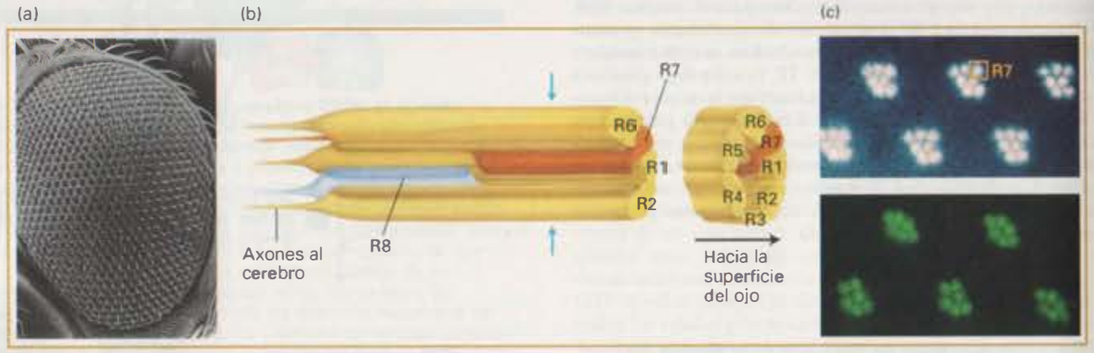
El ojo de la mosca está compuesto por unos 800 ojos individuales denominados *omatidio* (fig. 14-17a). Cada omatidio consiste en 22 células, ocho de las cuales son neuronas fotosensibles denominadas *retínulas* o células R, designadas R1-R8 (fig. 14-17b). Un RTK denominado *Sevenless (Sev)* regula de manera específica el desarrollo de la célula R7 y no es esencial para ninguna otra función conocida. En las moscas con un gen mutante *sevenless (sev)*, no se forma la célula R7 en cada omatidio (fig. 14-17c). Dado que el fotorreceptor R7 es necesario para que las moscas vean en la luz ultravioleta, pueden aislarse con facilidad las mutantes que carecen de células R7 funcionales, pero son normales en otros aspectos.

Durante el desarrollo de cada omatidio, una proteína denominada *Boss* (*Bride of Sevenless*, novia de Sevenless) es expresada en la superficie de la célula R8. Esta proteína fijada a la membrana es el ligando para el RTK Sev en la superficie de la célula precursora R7 vecina y la señala para desarrollarse en una neurona fotosensible (fig. 14-18a). En moscas mutantes que no expresan una proteína Boss funcional o Sev RTK, la interacción entre las proteínas Boss y Sev no puede producirse y no se desarrollan las células R7 (fig. 14-18b).

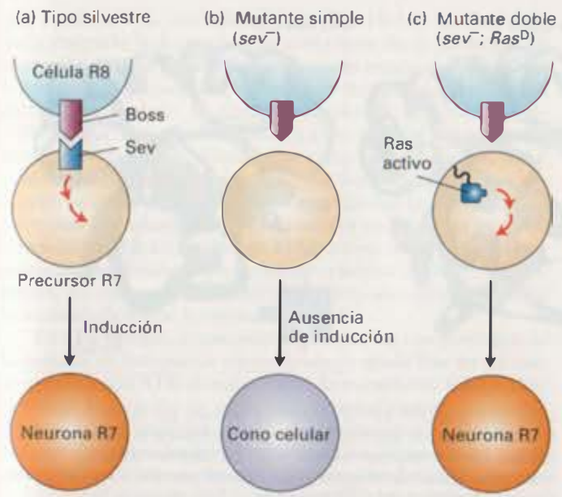
Para identificar a las proteínas de transducción de señales intracelulares en la vía Sev RTK, los investigadores produjeron moscas mutantes que expresaban una proteína Sev termosensible. Cuando estas moscas se mantenían a una temperatura permisiva, todos sus omatidios contenían células R7; cuando se mantenían a temperaturas no permisivas, las células R7 no se desarrollaban. Sin embargo, en temperaturas intermedias particulares, sólo la cantidad suficiente de Sev RTK era funcional para mediar el desarrollo de R7 normal. Los investigadores presupusieron que a esta temperatura intermedia, la vía de señalización debería tornarse deficiente (y por esto no se desarrollarían células R7) si se reducía el nivel de *otra* proteína involucrada en la vía, que en consecuencia reducía la actividad de la vía en forma global por debajo del nivel requerido para formar una célula R7. Una mutación recesiva que afecta una proteína tendría este efecto porque, en organismos diploides como *Drosophila*, un heterocigoto que contiene un alelo de tipo silvestre y un alelo mutante de un gen producirá la mitad de la cantidad normal del producto génico; por lo tanto, aunque esta mutación recesiva sea un gen esencial, el organismo será viable. Sin embargo, en una mosca que porta una mutación termosensible en el gen *sev* y una segunda mutación que afecta otra proteína en la vía de señalización sería de esperar la falta de células R7 en las temperaturas intermedias.

Mediante el estudio de esta prueba, los investigadores identificaron los genes que codifican tres proteínas importantes en la vía Sev (véase fig. 14-16): una proteína adaptadora que contiene SH2 y exhibe el 64% de identidad con el GRB2 humano; un factor de intercambio de nucleótido guanina denominado *Sos* (*Son of Sevenless*, hijo de Sevenless) que exhibe un 45% de identidad con su contraparte de ratón; y una proteína Ras que exhibe el 80% de identidad con sus contrapartes de mamíferos. Más tarde se encontró que estas tres proteínas participaban en otras vías de señalización iniciadas por la fijación de ligandos a diferentes receptores RTK y utilizados en lugares y momentos diferentes en el desarrollo de la mosca.

En estudios posteriores los investigadores introdujeron un gen mutante ras^b dentro de embriones de la mosca que porta la mutación *sevenless*. Como ya se mencionó, el gen ras^b codifica una proteína Ras constitutiva que está presente en la forma activa unida al GTP incluso en ausencia de una hormona señal. Si bien Sev RTK no funcional estaba presente en estas mutantes dobles (sev^-; ras^b), las células R7 se formaron de manera normal, lo que indica que la activación de Ras es suficiente para la inducción del desarrollo de la célula R7 (fig. 14-18c). Este hallazgo, compatible con los resultados de fibroblastos cultivados descritos antes, apoya la conclusión de que la activación de Ras es un paso fundamental en la señalización intracelular para la mayor parte, si no para todos, los RTK.



▲ **Fig. 14-17. El ojo compuesto de *Drosophila melanogaster*.** (a) Microfotografía electrónica de barrido donde se observa un omatidio individual que compone el ojo de la mosca de la fruta. (b) Imágenes longitudinal y corte transversal de un omatidio simple. Cada una de estas estructuras tubulares contiene ocho fotorreceptores, designados R1-R8, que son células fotosensibles largas, con forma cilíndrica. R1-R6 (amarillo) se extienden por toda la profundidad de la retina, mientras R7 (castaño) está ubicada hacia la superficie del ojo y R8 (azul) hacia la parte posterior, donde emergen los axones. (c) Comparación de los ojos de moscas de tipo silvestre y de la mutante *sevenless* observados por una técnica especial que puede distinguir los fotorreceptores en un omatidio. El plano de corte está indicado por las flechas azules en (b) y la célula R8 está fuera del plano de estas imágenes. Los siete fotorreceptores en este plano se observan con facilidad en el omatidio de tipo salvaje (*parte superior*), mientras que sólo seis son visibles en el omatidio mutante (*parte inferior*). Las moscas con la mutación *sevenless* carecen de la célula R7 en sus ojos. [Parte (a) de E. Hafen and K. Basler, 1991, Development 1 (suppl.):123; parte (b) adaptado de R. Reinke and S. L. Zipursky, 1988, Cell 55:321; parte (c) gentileza de U. Banerjee.]



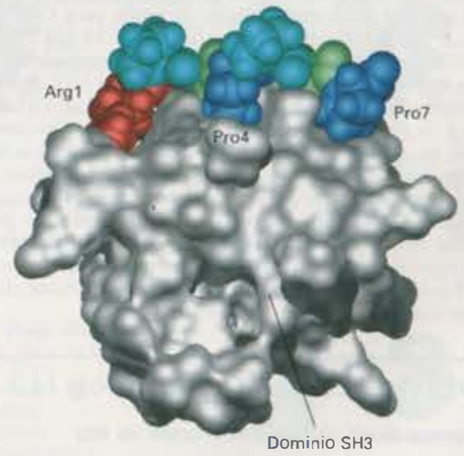
▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 14-18 Los estudios genéticos revelan que la activación de Ras induce el desarrollo de fotorreceptores R7 en el ojo de *Drosophila*.** (a) Durante el desarrollo larvario de las moscas de tipo silvestre, la célula R8 en cada omatidio en desarrollo expresa una proteína de la superficie celular, denominada *Boss*, que se fija al Sev RTK en la superficie de su célula precursora R7 vecina. Esta interacción induce cambios en la expresión génica que resulta en la diferenciación de la célula precursora en una neurona R7 funcional. (b) En los embriones de moscas con una mutación en el gen *sevenless* (sev), las células R7 precursoras no pueden fijarse a Boss y, por consiguiente, no se diferencian normalmente en células R7. Por el contrario, la célula precursora ingresa en una vía de desarrollo alternativa y, por último se convierte en un cono. (c) Las larvas con mutantes dobles (sev^-; Ras^D) expresan una Ras constitutivamente activa (Ras^D) en la célula R7 precursora, la cual induce la diferenciación de las células R7 precursoras en ausencia de la señal mediada por Boss. Este hallazgo muestra que Ras activada es suficiente para mediar la inducción de una célula R7. (Véase M. A. Simon et al., 1991, Cell 67:701 y M. E. Fortini et al., 1992, Nature 355:559.)

La fijación de la proteína Sos a la Ras inactiva causa un cambio conformacional que activa a la proteína Ras

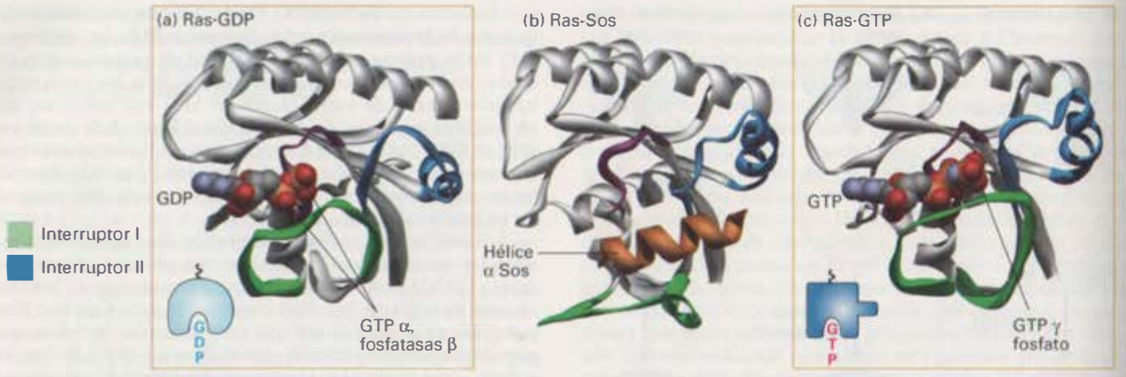
La proteína adaptadora GRB2 contiene dos dominios SH3, que se fijan a Sos, un factor de intercambio del nucleótido guanina, además de un dominio SH2, que se fija al residuo fosfotirosina en los RTK. Como los dominios SH2 de fijación a la fosfotirosina y los dominios PTB, los dominios SH3 están presentes en gran cantidad de proteínas involucradas en la señalización intracelular. Si bien las estructuras tridimensionales de varios dominios SH3 son similares, sus secuencias específicas de aminoácido difieren. Los dominios SH3 en GRB2 se fijan en forma selectiva a las secuencias con alto contenido en prolina en Sos; los dominios SH3 diferentes en otras proteínas se fijan a secuencias con alto contenido en prolina distintas de las de Sos.

Los residuos de prolina desempeñan dos papeles en la interacción entre un dominio SH3 en una proteína adaptadora (p. ej., GRB2) y una secuencia con alto contenido en prolina en otra proteína (p. ej., Sos). Primero, la secuencia con alto contenido en prolina asume una conformación extendida que permite un contacto amplio con el dominio SH3, lo que en consecuencia facilita la interacción. Segundo, un subconjunto de estas prolinas encajan en los "bolsillos" de fijación sobre la superficie del dominio SH3 (fig. 14-19). Varios residuos diferentes de prolina también interactúan con el dominio SH3 y determinan la especificidad de la fijación. Por lo tanto, la fijación de proteínas a los dominios SH3 y SH2 sigue una estrategia similar: ciertos residuos proporcionan el motivo estructural global necesario para la fijación y los residuos vecinos confieren especificidad a la fijación.

Luego de la activación de un RTK (p. ej., Sevenless o el receptor para EGF), se forma un complejo que contiene el receptor activado, GRB2, y Sos en la cara citosólica de la membrana plasmática (véase fig. 14-16). La formación de este complejo depende de la capacidad de GRB2 para fijarse de manera simultánea al receptor y a Sos. Así, la activación del receptor conduce



▲ **Fig. 14-19. Modelo de superficie de un dominio SH3 fijado a un péptido diana, corto y con alto contenido de prolina.** Este péptido diana se muestra como un modelo espacial. En él, dos prolinas (Pro4 y Pro7, azul) encajan dentro de los bolsillos de fijación en la superficie del dominio SH3. Las interacciones que comprenden una arginina (Arg1, rojo), otras dos prolinas (celeste) y otros residuos en el péptido diana (verde) determinan la especificidad de la fijación. [De H. Yu et al., 1994, Cell 76:933.]



▲ Fig. 14-20. Estructuras de Ras unidas a GDP, proteína Sos y GTP. (a) En Ras-GDP, los segmentos Interruptor I e Interruptor II no interactúan directamente con GDP (véase fig. 13-8). (b) Una hélice α (anaranjado) en Sos se une a ambas regiones interruptoras de Ras-GDP, lo que conduce a un cambio conformacional masivo en Ras. En efecto, Sos se interpone en la abertura de Ras por desplazamiento de la región del Interruptor I, que por esto permite que GDP se difunda hacia afuera. (c) Se considera que GTP se fija a Ras-Sos primero por su base; la fijación ulterior de los fosfatos de GTP completa la interacción. El cambio conformacional resultante en los segmentos del Interruptor I y del Interruptor II de Ras les permite a ambos fijarse al fosfato γ del GTP (véase fig. 13-8), despliaza Sos y estimula la interacción de Ras-GTP con sus efectores (descritos más adelante). (Adaptado de P. A. Boriack-Sjodin and J. Kuriyan, 1998, Nature 394:341.)

ce a la relocalización de Sos desde el citosol a la membrana, que aproxima Sos a su sustrato, es decir, Ras·GDP unido a la membrana. Los estudios bioquímicos y genéticos indican que el extremo C-terminal de Sos inhibe su actividad de intercambio de nucleótido y que la fijación de GRB2 libera esta inhibición.

La fijación de Sos a Ras·GDP conduce a cambios conformacionales en los segmentos del Interruptor I e Interruptor II de Ras, que por eso abre el bolsillo de unión para GDP de modo que puede difundirse hacia afuera (fig. 14-20). Dado que GTP está presente en las células en una concentración unas 10 veces mayor que GDP, se produce la unión de GTP de manera preferencial que conduce a la activación de Ras. En consecuencia, la activación de Ras y G_α sucede por mecanismos similares: un cambio conformacional inducido por la fijación de una proteína –Sos y un receptor acoplado a la proteína G activada, respectivamente– que abre la estructura proteica de modo que el GDP fijado se libera para ser reemplazado por GTP. A su vez, la unión de GTP a la Ras induce una conformación específica de Interruptor I e Interruptor II que permite que Ras·GTP active las moléculas efectoras corriente abajo, como describimos en la próxima sección.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 14.3

Receptores tirosincinasas y activación de Ras

- Los receptores tirosincinasas (RTK), que se fijan a péptidos y hormonas proteicas, pueden existir como dímeros preformados o dimerizados durante la fijación a ligandos.
- La fijación del ligando conduce a la activación de la actividad intrínseca de la proteína tirosincinasa del receptor y a la fosforilación de los residuos de tirosina en su dominio citosólico (véase fig. 14-5, *parte superior*). El receptor activado también puede fosforilar otras proteínas que actúan como sustratos.
- Ras es una proteína GTPasa interruptora intracelular que actúa corriente abajo desde la mayor parte de los RTK. Como G_α, la Ras cicla entre una forma inactiva, unida a GDP y una forma activa, unida a GTP. Este ciclado de Ras requiere la participación de dos proteínas, un factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF) y una proteína activadora de GTPasa (GAP).
- Los RTK están relacionados de manera indirecta con Ras por medio de dos proteínas: GRB2, una proteína adaptadora y Sos, que tiene actividad de GEF (véase fig. 14-16).
- El dominio SH2 en GRB2 se fija a una fosfotirosina en el RTK activado, mientras que sus dos dominios SH3 se fijan a Sos, que por eso acerca Sos al complejo Ras·GDP fijado a la membrana y activa su actividad de intercambio de nucleótido.
- La fijación de Sos a la Ras inactiva causa un gran cambio conformacional que permite la liberación de GDP y la unión de GTP, formando Ras activa (véase fig. 14-20). GAP, que acelera la hidrólisis de GTP, está localizada cerca de Ras·GTP mediante la fijación al RTK activado.
- De manera habitual, la activación de Ras y la respuesta celular ulterior requiere la fijación del ligando a un RTK o a un receptor para citocina. En células que contienen una Ras activa constitutiva, la respuesta celular sucede en ausencia de fijación del ligando.

14.4 Vías MAP cinasas

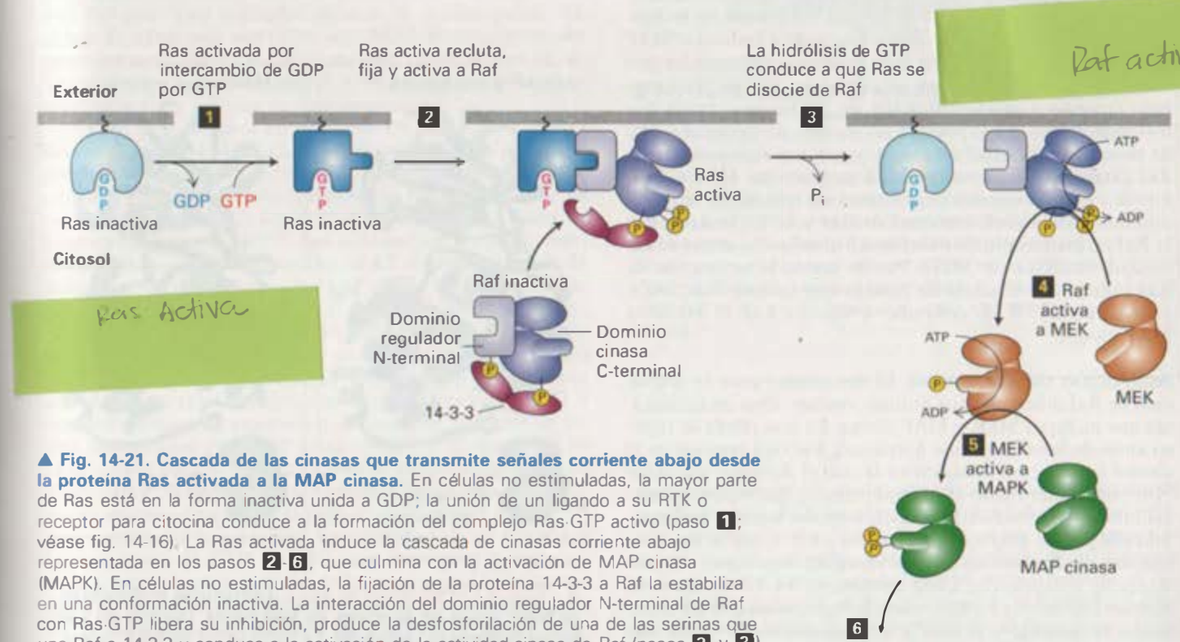
En las células de los mamíferos, todos los receptores tirosincinasas (RTK), así como la mayoría de los receptores para citocina, parecen utilizar una vía de transducción de la señal altamente conservada en la cual la señal inducida por la fijación del ligando es transportada por GRB2 y Sos a Ras, que conduce a su activación (véase fig. 14-16). La Ras activada estimula la formación de complejos de señalización en la membrana que contienen tres proteincinasas que actúan en forma secuencial asociadas con una proteína plataforma (*scaffold*). Esta *cascada de cinasas* culmina en la activación de MAP cinasa, una serina/treonina cinasa conocida también como ERK. Después de translocarse al interior del núcleo, MAP cinasa puede fosforilar muchas proteínas diferentes, que incluyen factores de transcripción que regulan la expresión de proteínas importantes en el ciclo celular y específicas en la diferenciación. La activación de MAP cinasa en dos células distintas puede conducir a respuestas celulares similares o diferentes, así como a la activación en la misma célula luego de la estimulación por hormonas diferentes.

En esta sección, examinamos primero los componentes de la cascada de las cinasas corriente abajo desde Ras en las vías de señalización RTK-Ras en células de mamíferos. Luego, describimos la relación de otras vías de señalización con cascadas de cinasas similares y examinamos estudios recientes que indican que tanto las levaduras como las células de los eucariontes superiores contienen múltiples vías de MAP cinasas.

Las señales pasan desde una Ras activada a una cascada de proteincinasas

Una convergencia sorprendente de estudios bioquímicos y genéticos en levaduras, *C. elegans*, *Drosophila* y mamíferos reveló una cascada de proteincinasas altamente conservada que funciona de modo secuencial corriente abajo desde la Ras activada (fig. 14-21). El complejo Ras·GTP activo se fija al dominio regulador N-terminal de *Raf*, una serina/treonina cinasa, que en consecuencia sufre su activación (paso 2). La hidrólisis de Ras-GTP a Ras·GDP libera Raf activa (paso 3), la cual fosforila y en consecuencia activa *MEK* (paso 4). La MEK activa luego fosforila y activa la MAP cinasa, otra serina/treonina cinasa (paso 5). (Una proteincinasa de especificidad dual, MEK, fosforila sus proteínas diana en los residuos tirosina y serina o treonina.) MAP cinasa fosforila muchas proteínas diferentes, que incluyen los factores de transcripción nucleares, que median las respuestas celulares (paso 6).

Varios tipos de experimentos demostraron que Raf, MEK y MAP cinasa se encuentran corriente abajo a partir de Ras y revelaron el orden secuencial de estas proteínas en la vía. Por ejemplo, las proteínas Raf mutantes que perdieron el dominio regulador N-terminal son constitutivamente activas e inducen la proliferación de células cultivadas inactivas en ausencia de estimulación por factores de crecimiento. Estas proteínas Raf mutantes se identificaron en un comienzo en células tumorales; de manera similar a la proteína Ras^D activa en forma constitutiva se consideró que estaban codificadas por oncogenes (cap. 23). A la inversa, las células cultivadas de mamíferos que expresan una proteína Raf mutante, no funcional, no pueden ser estimuladas para proliferar en forma descontrolada por una proteína Ras^D acti-



▲ Fig. 14-21. Cascada de las cinasas que transmite señales corriente abajo desde la proteína Ras activada a la MAP cinasa. En células no estimuladas, la mayor parte de Ras está en la forma inactiva unida a GDP; la unión de un ligando a su RTK o receptor para citocina conduce a la formación del complejo Ras·GTP activo (paso 1; véase fig. 14-16). La Ras activada induce la cascada de cinasas corriente abajo representada en los pasos 2 6, que culmina con la activación de MAP cinasa (MAPK). En células no estimuladas, la fijación de la proteína 14-3-3 a Raf la estabiliza en una conformación inactiva. La interacción del dominio regulador N-terminal de Raf con Ras·GTP libera su inhibición, produce la desfosforilación de una de las serinas que une Raf a 14-3-3 y conduce a la activación de la actividad cinasa de Raf (pasos 2 y 3). Nótese que al contrario de lo que sucede con muchas otras proteincinasas, la activación de Raf no depende de la fosforilación del labio de activación. Después que Ras·GDP inactiva se disocia de Raf, es probable que pueda ser reactivada por señales provenientes de receptores activados; así, recluta moléculas adicionales de Raf en la membrana. Para más detalles, véase el texto. (Véase E. Kerkhoff y U. Rapp, 2001, Adv. Enzyme Regul. 41:261; J. Avruch et al., 2001, Recent Prog. Hormone Res. 56:127; y M. Yip-Schneider et al., 2000, Biochem. J. 351:151.)

va en forma constitutiva. Este hallazgo estableció una relación entre las proteínas Raf y Ras. Estudios posteriores de fijación in vitro mostraron que el complejo Ras·GTP purificado se fija en forma directa al dominio regulador N-terminal de Raf y activa su actividad catalítica. También se demostró una interacción entre las proteínas Ras y Raf de mamíferos en el *sistema de dos híbridos de levaduras*, un sistema genético en levaduras utilizado para seleccionar cDNA que codifican proteínas que se fijan a proteínas diana o "anzuelo" (véase fig. 11-39).

Se demostró que la MAP cinasa es activada en respuesta a la activación de Ras en células cultivadas en reposo que expresan una proteína Ras^{D} constitutivamente activa. En estas células activadas MAP cinasa se genera en ausencia de estimulación por hormonas estimuladoras del crecimiento. Es importante destacar que los fotorreceptores R7 se forman de manera normal durante el desarrollo de las mutantes de *Drosophila* que carecen de la proteína Ras o Raf funcional, pero expresan una MAP cinasa constitutivamente activa. Este hallazgo indica que la activación de MAP cinasa es suficiente para transmitir una señal de proliferación o diferenciación iniciada de modo habitual por la fijación del ligando a un receptor tirosincinasa como Sevenless (véase fig. 14-18). Sin embargo, los estudios bioquímicos mostraron que Raf no puede fosforilar de manera directa a MAP cinasa o, de otro modo, activar su actividad.

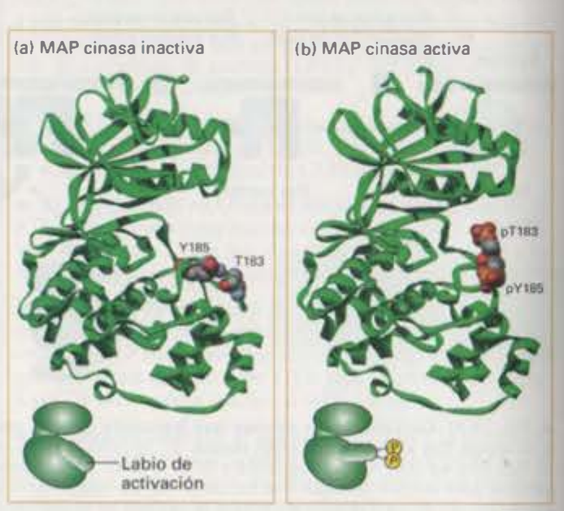
La relación final en la cascada de las cinasas activada por Ras·GTP emergió de estudios en los cuales los científicos fraccionaron extractos de células cultivadas en la búsqueda de una actividad de cinasa que podría fosforilar MAP cinasa y que estaba presente sólo en células estimuladas con factores de crecimiento, no en células en reposo. Este trabajo condujo a la identificación de MEK, una cinasa que fosforila de manera específica un residuo de treonina y uno de tirosina en la MAP cinasa, que por eso activa su actividad catalítica. (El acrónimo MEK proviene de *M*AP y *E*RK *k*inase.) Estudios posteriores mostraron que MEK se fija al dominio catalítico C-terminal de Raf y es fosforilado por la Raf serina/treonina cinasa; esta fosforilación activa la actividad catalítica de MEK. Por lo tanto, la activación de Ras induce una cascada de cinasas que incluye Raf, MEK y MAP cinasa: RTK activada → Ras → Raf → MEK → MAP cinasa.

Activación de Raf cinasa. El mecanismo para la activación de Raf difiere del que utilizan muchas otras proteincinasas que incluyen MEK y MAP cinasa. En una célula en reposo antes de la estimulación hormonal, Raf está presente en el citosol en una conformación en la cual el dominio regulador N-terminal está fijado al dominio cinasa, que en consecuencia inhibe su actividad. Esta conformación inactiva está estabilizada por un dímero de la *proteína 14-3-3*, que se fija a los residuos de fosfoserina en una cantidad importante de proteínas de señalización. Cada monómero 14-3-3 se fija a un residuo fosfoserina en Raf, uno a la fosfoserina-259 en el dominio N-terminal y el otro a la fosfoserina-621 (véase fig. 14-21). Se considera que estas interacciones son esenciales para que Raf alcance un estado conformacional tal que pueda fijarse a la Ras activada.

La fijación de Ras·GTP, que está anclada a la membrana, al dominio N-terminal de Raf libera la inhibición de la actividad cinasa de Raf y también induce un cambio conformacional en Raf que rompe su asociación con 14-3-3. Luego, la fosfoserina-259 de Raf es desfosforilada (por una fosfatasa desconocida) y otros residuos de serina o treonina de Raf se vuelven a fosforilar por otras cinasas. Estas reacciones incrementan cada vez más la actividad de Raf cinasa por mecanismos no comprendidos en su totalidad.

Activación de MAP cinasa. Los estudios bioquímicos y cristalográficos de rayos X proporcionaron una imagen detallada del modo por el cual la fosforilación activa a la MAP cinasa. Como en las JAK cinasas y el dominio citosólico del receptor de tirosincinasas, el sitio catalítico en la forma inactiva, no fosforilada de la MAP cinasa, está bloqueado por una extensión de aminoácidos, el labio de activación (fig. 14-22a). La fijación de MEK a la MAP cinasa desestabiliza la estructura del labio y por eso expone la tirosina-185, que se oculta en la conformación inactiva. Luego de la fosforilación de la tirosina fundamental, MEK fosforila la treonina-183 vecina (fig. 14-22b).

Tanto la tirosina fosforilada como los residuos de treonina fosforilados en la MAP cinasa interactúan con aminoácidos adicionales, en consecuencia confieren una conformación alterada en la región del labio, que a su vez permite la fijación de ATP al sitio catalítico. El residuo fosfotirosina (pY185) también desempeña un papel fundamental en la fijación de proteínas sustrato específicas a la superficie de MAP cinasa. La fosforilación estimula no sólo la actividad catalítica de MAP cinasa sino también su dimerización. La forma dimérica de MAP cinasa (pero no la



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 14-22 Estructuras moleculares de MAP cinasa en su forma no fosforilada, inactiva (a) y su forma fosforilada, activa (b).** La fosforilación de MAP cinasa por MEK en la tirosina-185 (Y185) y treonina-183 (T183) conduce a un cambio conformacional marcado en el labio de activación. Este cambio estimula la dimerización de MAP cinasa y la fijación de sus sustratos, ATP y ciertas proteínas. Un mecanismo similar dependiente de la fosforilación activa JAK cinasas, la actividad intrínseca de cinasa de RTK y MEK. (De B. J. Canagarajah et al., 1997, Cell 90:859.)

forma monomérica) puede ser translocada al núcleo, donde regula la actividad de muchos factores de transcripción nucleares.

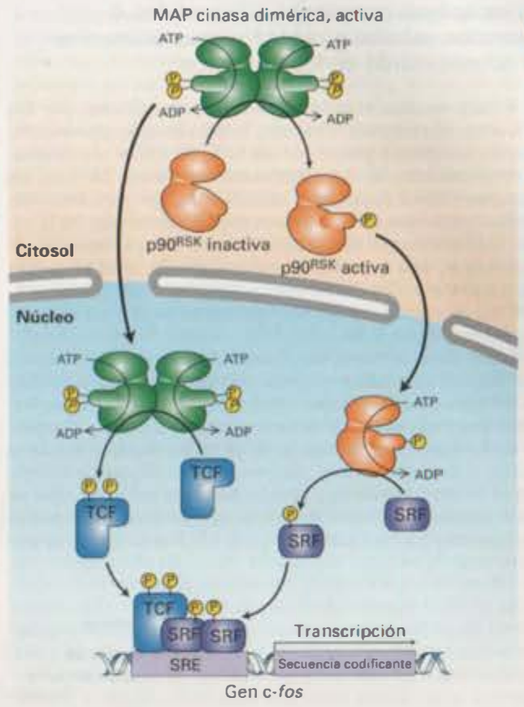
MAP cinasa regula la actividad de muchos factores de transcripción que controlan a los genes de respuesta temprana

El agregado de un factor de crecimiento (p. ej., EGF o PDGF) a células de mamíferos cultivadas inactivas en la fase Go causa un aumento rápido en la expresión de, al menos, 100 genes diferentes. Se denominan *genes de respuesta temprana* debido a que son inducidos bastante antes de que las células entren en la fase S y repliquen su DNA (véase fig. 21-29). Un gen de respuesta temprana importante codifica el factor de transcripción c-Fos. Junto con otros factores de transcripción, como c-Jun, c-Fos induce la expresión de muchos genes que codifican las proteínas necesarias para la progresión en el ciclo celular. La mayor parte de los RTK que fijan factores de crecimiento utilizan la vía de MAP cinasa para activar los genes que codifican proteínas como c-Fos que impulsan a la célula a continuar el ciclo celular.

El potenciador que regula al gen *c-fos* contiene un *elemento de respuesta sérico* (*SRE*), denominado así porque es activado por muchos factores de crecimiento presentes en el suero. Este complejo potenciador contiene secuencias de DNA que fijan múltiples factores de transcripción. Algunos de éstos son activados por MAP cinasa, otros por proteincinasas distintas que participan en otras vías de señalización (p. ej., proteincinasa A en las vías cAMP y proteincinasa C en las vías de fosfoinositidos).

Como se representa en la figura 14-23, la MAP cinasa dimérica activada (fosforilada) induce la transcripción del gen *c-fos* mediante la modificación de dos factores de transcripción, el *factor de complejo ternario (TCF)* y el *factor de respuesta sérica (SRF)*. En el citosol, MAP cinasa fosforila y activa otra cinasa, p90^{RSK}, que se transloca al núcleo, donde fosforila una serina específica en RF. Además, después de la translocación al núcleo, la MAP cinasa fosforila directamente serinas específicas en TCF. La asociación de TCF fosforilado con dos moléculas de SRF fosforilado forma un factor trimérico activo que se fija en forma firme al segmento DNA, SRE. Como evidencia de este modelo, la expresión abundante en células cultivadas de mamíferos de un TCF mutante dominante negativo que carece de residuos de serina fosforilados por MAP cinasa bloquea la capacidad de MAP cinasa para activar la expresión génica dirigida por el potenciador SRE. Además, los estudios bioquímicos mostraron de manera directa que la fosforilación de SRF por p90^{RSK} activo aumenta la velocidad y la afinidad de su fijación a las secuencias de DNA en SRE, que determina el aumento en la frecuencia de iniciación de la transcripción. En consecuencia, se requieren ambos factores de transcripción para lograr la estimulación máxima de la expresión génica inducida por el factor de crecimiento por medio de la vía MAP cinasa, si bien sólo TCF es activado en forma directa por la MAP cinasa.

La fosforilación de los factores de transcripción por MAP cinasa puede producir múltiples efectos sobre la expresión génica. Por ejemplo, dos factores de transcripción relacionados de *Drosophila*, Pointed y Yan, que son fosforilados directamente por MAP cinasa, son efectores fundamentales de la señalización RTK en el ojo y otros tejidos. La fosforilación aumenta la actividad de Pointed, un activador transcripcional. Por el contrario, Yan no fosforilado es un represor transcripcional que se acumula en el núcleo e inhibe el desarrollo de células R7 en el ojo. Luego de la fosforilación inducida por la señal, Yan se acumula en el citosol y no tiene acceso a los genes que controla, que por lo tanto alivia su represión. Las formas mutantes de Yan, que no pueden ser fosforiladas por MAP cinasa, son represores constitutivos del desarrollo de R7. Este ejemplo sugiere que para el desarrollo celular es fundamental la presencia de una compleja interacción entre múltiples factores de transcripción, regulada por cinasas activadas por señales.



▲ **Fig. 14-23. Inducción de la transcripción génica mediante la MAP cinasa activada.** En el citosol, MAP cinasa fosforila y activa la cinasa p90^{RSK}, la cual se moviliza luego al interior del núcleo y fosforila el factor de transcripción SRF. Después de la translocación al núcleo, MAP cinasa fosforila de modo directo el factor de transcripción TCF. Juntos, estos acontecimientos de fosforilación estimulan la transcripción de genes (p. ej., c-*fos*) que contienen una secuencia SRE en su promotor. Para más detalles, véase el texto. (Véase R. Marais et al., 1993, Cell 73:381 y V. M. Rivera et al., 1993, Mol. Cell Biol. 13:6260.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación general: Señalización extracelular

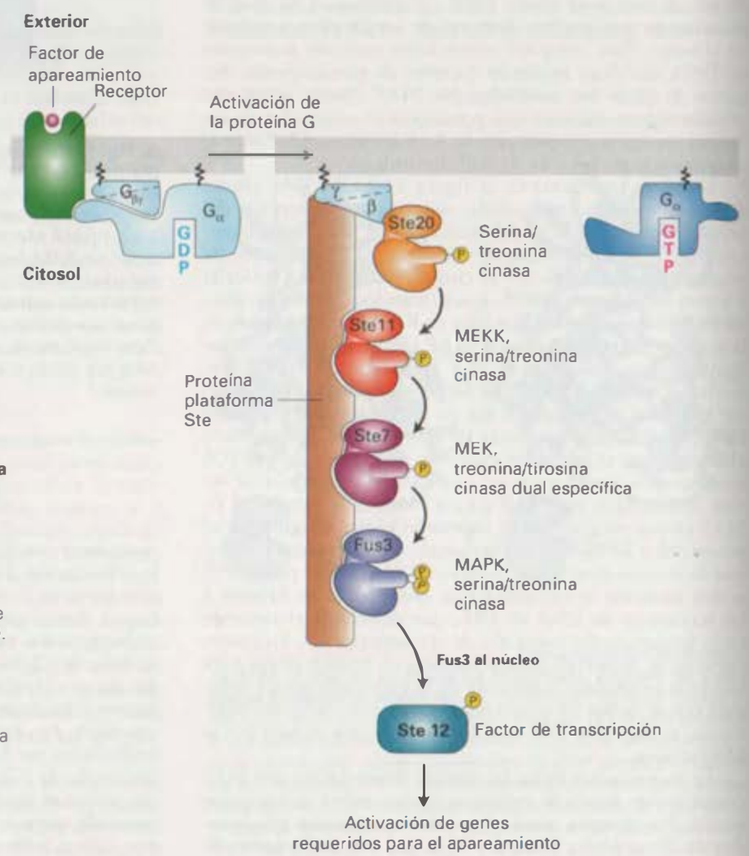
Los receptores acoplados a la proteína G transmiten señales a la MAP cinasa en las vías de apareamiento de las levaduras

Si bien muchas vías MAP cinasa están iniciadas por los RTK o receptores para citocinas, la señalización proveniente de otros receptores puede activar la MAP cinasa en diferentes tipos celulares de los eucariontes superiores. Es más, las levaduras y otros eucariontes unicelulares, que carecen de receptores para citocina o RTK, poseen diversas vías MAP cinasa. Como ejemplo, consideramos la vía de apareamiento de *S. cerevisiae*, una cascada bien estudiada de la MAP cinasa relacionada con los receptores acoplados a la proteína G (GPCR), en este caso para dos feromonas peptídicas segregadas, los factores a y α.

Como describiremos en el capítulo 22, estas feromonas controlan el apareamiento entre células de levadura haploides del tipo de apareamiento opuesto, a o α. Una célula haploide a segrega el factor de apareamiento a y tiene receptores en la superficie celular para el factor α; una célula α segrega el factor α y tiene receptores en la superficie celular para el factor a (véase fig. 22-13). Por lo tanto, cada tipo de célula reconoce al factor de apareamiento producido por el tipo opuesto. La activación de la vía MAP cinasa, ya sea por los receptores a o α, induce la transcripción de genes que inhiben la progresión del ciclo celular y otros que posibilitan que células de tipo de apareamiento opuestos se fusionen y formen por último una célula diploide.

La fijación del ligando a cualquiera de los dos receptores para las feromonas de las levaduras induce el intercambio de GDP con la subunidad individual G_α y la disociación de G_α·GTP del complejo $G_{\beta\gamma}$. Este proceso de activación es idéntico al de GPCR descrito en el capítulo anterior (véase fig. 13-11) En la mayoría, pero no en todas las vías de mamíferos iniciadas por GPCR, G_α transduce la señal. Por el contrario, los estudios con mutantes mostraron que el complejo $G_{\beta\gamma}$ disociado media todas las respuestas fisiológicas inducidas por la activación de los receptores para feromonas de las levaduras. Por ejemplo, en las levaduras que carecen de G_α, la subunidad $G_{\beta\gamma}$ está siempre libre. Estas células pueden aparearse en ausencia de factores de apareamiento; es decir, la respuesta de apareamiento es constitutiva. Sin embargo, en células defectuosas para la subunidad G_β o G_γ, la vía de apareamiento no puede ser inducida. Si G_α disociada fuera el transductor, sería de esperar que la vía estuviese constitutivamente activa en estas células mutantes.

En las vías de apareamiento de levaduras, $G_{\beta\gamma}$ funciona mediante la inducción de la cascada de las cinasas que es análoga a la vía corriente abajo desde Ras. Los componentes de esta cascada fueron revelados sobre todo mediante análisis de mutantes que poseen receptores funcionales a y α y proteínas G, pero son estériles *(Ste)*, o deficientes en respuestas de apareamiento. Las interacciones físicas entre los componentes se evaluaron mediante experimentos de inmunoprecipitación con extractos de levaduras y otros tipos de estudios. Sobre la base de estos estudios, los científicos propusieron la cascada de las cinasas representadas en la figura 14-24. $G_{\beta\gamma}$ que está inserto en la membrana por medio de la subunidad γ, se fija y activa Ste20, una proteincinasa que a su vez fosforila y activa Ste11, una serina/treonina cinasa análoga a las proteínas Raf y otras MEKK de mamíferos. Luego, Ste11 activada fosforila Ste7, una MEK de especificidad dual que entonces fosforila y activa Fus3, una serina/treonina cinasa equivalente a la MAP cinasa. Después de la translocación al núcleo, Fus3 estimula la expresión de genes diana por fosforilación y, por lo tanto, la activación de factores de transcripción nucleares (p. ej., Ste12) que controlan la expresión de proteínas involucradas en respuestas celulares específicas de apareamiento. El otro componente de la cascada de apareamiento de la levadura, Ste5, interactúa con $G_{\beta\gamma}$, así como Ste11, Ste7 y Fus3. Ste5 no tiene una función catalítica evidente y actúa como una plataforma para el ensamble de otros componentes de la cascada.



▶ Fig. 14-24. Cascada de cinasas que transmite las señales corriente abajo desde los receptores para el factor de apareamiento en *S. cerevisiae*. Los receptores para los factores de apareamiento **a** y α de la levadura están acoplados a la misma proteína G trimérica. La fijación del ligando conduce a la activación y a la disociación de la proteína G (véase fig. 13-10). En la vía de apareamiento de la levadura, la $G_{\beta\gamma}$ disociada activa una cascada de proteincinasa análoga a la cascada corriente abajo de Ras que conduce a la activación de MAP cinasa (véase fig. 14-21). El componente final, Fus3, es equivalente desde el punto de vista funcional a la MAP cinasa (MAPK) en los eucariontes superiores. La asociación de diversas cinasas con la proteína plataforma (*scaffold*) Ste5 contribuye a la especificidad de la vía de señalización porque impide la fosforilación de otros sustratos. (Véase A. Whitmarsh y R. Davis, 1998, Trends Biochem. Sci. 23:481 y H. Dohlman y J. Thorner, 2001, Ann. Rev. Biochem. 70:703.)

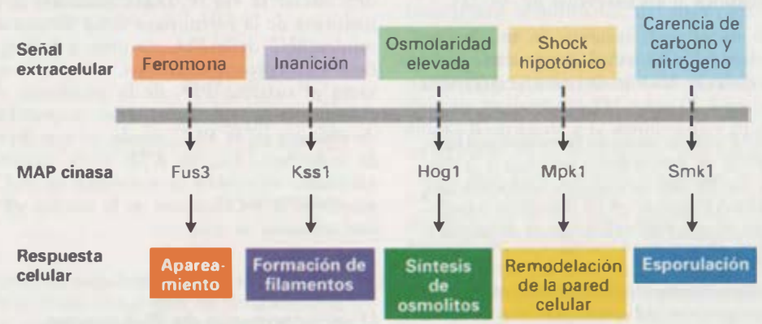
Las proteínas plataforma (*scaffold*) aíslan múltiples vías de MAP cinasas en células eucariontes

Además de las MAP cinasas descritas antes, tanto las levaduras como las células eucariontes superiores contienen otros miembros de la superfamilia MAP cinasas. Incluyen las *cinasas Jun N-terminal* (JNK) y *p38* que se activan mediante diversos tipos de situaciones de estrés y seis cinasas de levaduras descritas más adelante. Denominadas en forma conjunta *MAP cinasas*, todas estas proteínas son serina/treonina cinasas y se activan en el citosol en respuesta a señales extracelulares específicas y luego se translocan al núcleo. La activación de todas las MAP cinasas conocidas requiere la fosforilación de un residuo de tirosina y uno de treonina en la región del labio (véase fig. 14-22). De manera similar, todas las células eucariontes contienen diversos miembros de la superfamilia MEK cinasas de especificidad dual que fosforilan diferentes miembros de la superfamilia MAP cinasa. Por consiguiente, en todas las células eucariontes, la fijación de una amplia variedad de moléculas extracelulares de señalización induce cascadas de cinasas altamente conservadas que culminan con la activación de una MAP cinasa particular. Las distintas MAP cinasas median respuestas celulares específicas, que incluyen morfogénesis, muerte celular y respuestas de estrés.

Los estudios genéticos y bioquímicos actuales en ratones y *Drosophila* apuntan a determinar cuáles de las MAP cinasas se requieren para mediar la respuesta ante una señal en los eucariontes superiores. Esto ya ha sido logrado en gran medida para el organismo más simple *S. cerevisiae*. Cada una de las seis MAP cinasas codificadas en el genoma de *S. cerevisiae* fueron asignadas por análisis genéticos para vías de señalización específicas inducidas por varias señales extracelulares, como feromonas, falta de nutrientes, osmolaridad elevada, shock hipotónico y carencia de carbono y nitrógeno. Cada una de estas MAP cinasas media respuestas celulares muy específicas (fig. 14-25).

En las levaduras y las células eucariontes superiores, la cascada de las MAP cinasas diferentes comparte algunos componentes comunes. Por ejemplo, Ste11 funciona en las vías de señalización de las levaduras que regulan el apareamiento, el crecimiento filamentoso y la osmorregulación. No obstante, cada vía activa su propia MAP cinasa: Fus3 en las vías de apareamiento, Kss1 en las vías de formación de filamentos y Hog1 en la vía de osmorregulación. De manera similar, en las células de los mamíferos, proteínas de transducción de señales comunes participan corriente arriba en la activación de múltiples JNK cinasas.

Una vez que se reconocieron componentes compartidos en las diferentes vías MAP cinasas, los investigadores se preguntaron cómo podría lograrse la especificidad de las respuestas celulares para señales particulares. Estudios con levadura proporcionaron la evidencia inicial de que las *proteínas plataforma* específicas de la vía posibilitan que las cinasas de una vía particular de transducción de señales interactúen entre sí, pero no con cinasas de otras vías. Por ejemplo, la proteína plataforma Ste5 estabiliza un complejo grande que incluye Ste11 y otras cinasas de la vía de apareamiento (véase fig. 14-



▲ Fig. 14-25. Esquema de cinco vías MAP cinasa en *S. cerevisiae*. Cada vía es inducida por una señal extracelular específica y conduce a la activación de una MAP cinasa individual diferente, que media respuestas celulares características. La formación de complejos de MAP cinasas específicas para la vía y de proteínas plataforma impide la "interferencia" entre vías que contienen un componente común como MEKK Ste11, la cual sucede en las vías de apareamiento, formación de filamentos y osmorregulación (véase fig. 14-24). (Adaptado de H. D. Madhani y G. R. Fink, 1998, Trends Genet. 14(4):152.)

24). Sin embargo, las proteínas plataforma diferentes que se fijan a Ste11 estabilizan los complejos que contienen los componentes de las vías de formación de filamentos y osmorregulación. En cada vía en la cual Ste11 participa, está constreñida dentro de un gran complejo que se forma en respuesta a una señal extracelular específica y, la señalización corriente abajo desde Ste11 está restringida al complejo en el cual está localizada. Como resultado, la exposición de las levaduras al factor de apareamiento induce la activación de una MAP cinasa individual, Fus3, mientras que la exposición a una osmolaridad elevada o la falta de nutrientes induce la activación de MAP cinasas diferentes (véase fig. 14-25).

Las proteínas plataforma para las vías MAP cinasa están bien documentadas en células de levaduras, moscas y gusanos, pero su presencia en células de mamíferos fue difícil de demostrar. Tal vez, la proteína plataforma mejor documentada es la *Ksr* (cinasa supresora de Ras), la cual se une a ambas cinasas, MEK y MAP. La pérdida de la homóloga Ksr en *Drosophila* bloquea la señalización por una proteína Ras constitutiva activa, lo que sugiere un papel positivo para Ksr en la señalización Ras-MAP cinasa en las células de la mosca. Si bien los ratones con desactivación génica (*knockout*) que carecen de Ksr son normales desde el punto de vista macroscópico, la activación de MAP cinasa por los factores de crecimiento o citocinas es menor que lo normal en varios tipos de células en estos animales. Este hallazgo sugiere que Ksr funciona como una plataforma que aumenta, pero no es esencial, para la señalización de Ras-MAP cinasa en las células de los mamíferos. También se encontraron otras proteínas que se unen a MAP cinasas específicas de mamíferos. Por lo tanto, la especificidad de la señal de diferentes MAP cinasas en células animales puede originarse de su asociación con diversas proteínas de tipo plataforma, si bien para probar esta posibilidad se requieren investigaciones adicionales.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 14.4

Vías MAP cinasas

- La proteína Ras activada induce una cascada de cinasas en la cual Raf, MEK y MAP cinasa son fosforiladas en forma secuencial y, en consecuencia, son activadas. La MAP cinasa activada se dimeriza y transloca al núcleo (véase fig. 14-21).
- La fosforilación de uno o más residuos en una región conservada del labio activa MAP cinasas y muchas otras proteincinasas involucradas en las vías de transducción de la señal.
- La activación de MAP cinasa luego de la estimulación de un receptor para el factor de crecimiento conduce a la fosforilación y la activación de dos factores de transcripción, TCF y SRF. Éstos se asocian dentro de un complejo trimérico que estimula la transcripción de varios genes de respuesta temprana (véase fig. 14-23).
- Las levaduras y los eucariontes superiores contienen múltiples vías MAP cinasas que son inducidas por la activación de varias clases de receptores que incluyen los receptores acoplados a la proteína G.
- Diferentes señales extracelulares inducen la activación de diferentes MAP cinasas, que regulan procesos celulares diversos (véase fig. 14-25).
- Los componentes corriente arriba de la cascada de las MAP cinasas se ensamblan en complejos grandes específicos de la vía, estabilizados por proteínas plataforma (véase fig. 14-24). Esto asegura que la activación de una vía por una señal extracelular particular no produce la activación de otras vías que contienen componentes compartidos.

14.5 Fosfoinosítidos como transductores de señales

En las secciones anteriores vimos el modo en que la transducción de señales proveniente de receptores para citocina y receptor tirosincinasa (RTK) comienza con la formación de complejos multiproteicos asociados con la membrana plasmática. Aquí describimos la manera por la cual estos receptores inician las vías de señalización que comprenden los lípidos inositol fosforilados de membrana, denominados en conjunto fosfoinosítidos. Comenzamos con la rama de la vía de los fosfoinosítidos que también está mediada por los receptores acoplados a la proteína G y luego consideramos otra rama que no es compartida con estos receptores.

La fosfolipasa C_γ es activada por algunos RTK y receptores para citocina

Como se describió en el capítulo 13, la estimulación hormonal de algunos receptores acoplados a proteínas conduce a la activación de la isoforma β de la fosfolipasa C (PLC_β). Esta enzima asociada con la membrana luego degrada al fosfatidilinositol 4,5-hifosfato (PIP_2) para generar dos segundos mensajeros importantes, 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). La vía de señalización, la *vía IP_3/DAG*, conduce a un aumento del Ca^{2+} citosólico y a la activación de la proteincinasa C (véase fig. 13-29).

Muchos RTK y receptores para citocina también pueden iniciar la vía IP_3/DAG mediante la activación de otra isoforma de la fosfolipasa C, la isoforma γ (PLC_γ). Los dominios SH2 de la PLC_γ se unen a fosfotirosinas específicas de los receptores activados, así posicionan la enzima próxima al sustrato PIP_2 de la membrana (véase fig. 13-28). Además, la actividad cinasa del receptor fosforila los residuos de tirosina en la PLC_γ unida, lo que aumenta su actividad de hidrolasa. Así, los RTK y los receptores para citocina activados estimulan la actividad de PLC_γ de dos maneras: mediante la localización de la enzima en la membrana y la fosforilación de ésta.

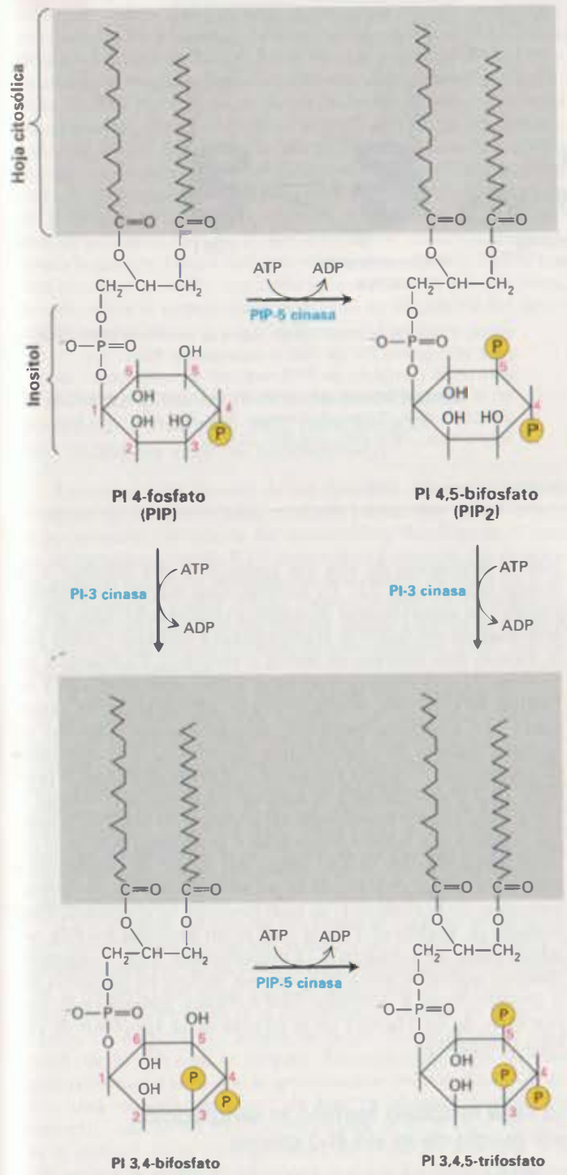
El reclutamiento de PI-3 cinasa en los receptores estimulados por hormona conduce a la activación de la proteincinasa B

Además de iniciar la vía IP_3/DAG, algunos RTK y receptores para citocina activados pueden iniciar otra vía de fosfoinosítidos, la *vía PI-3 cinasa*, mediante el reclutamiento de la enzima fosfatidilinositol-3 cinasa a la membrana. La PI-3 cinasa se identificó por primera vez como una cinasa que copurifica con diversas oncoproteínas virales como la proteína "T media" codificada por el virus polioma. Cuando en las células transformadas por el virus se expresan las versiones dominante negativas de PI-3 cinasa, inhiben la proliferación celular descontrolada característica de las células transformadas por el virus. Este hallazgo sugirió que la cinasa normal es importante en ciertas vías de señalización esenciales para la proliferación celular o para la prevención de la apoptosis. Investigaciones posteriores mostraron que las PI-3 cinasas participan en muchas vías de señalización relacionadas con el crecimiento celular y la apoptosis. De las nueve PI-3 cinasas homólogas codificadas por el genoma humano, la mejor caracterizada contiene una subunidad p110 con actividad catalítica y una subunidad p85 con un dominio SH2.

El dominio SH2 en PI-3 cinasa se fija al residuo fosfotirosina en el dominio citosólico de muchos RTK y receptores para citocina activados. El reclutamiento de PI-3 cinasa en la membrana plasmática por receptores activados posiciona su dominio catalítico cerca de sus sustratos fosfoinosítidos en la cara citosólica de la membrana plasmática, que conduce a la formación de PI 3,4-bifosfato o PI 3,4,5 trifosfato (fig. 14-26). Porque actúan como sitios de acoplamiento para varias proteínas transductoras de señales, estos PI 3-fosfatos fijados a la membrana a su vez transducen señales corriente abajo en varias vías importantes.

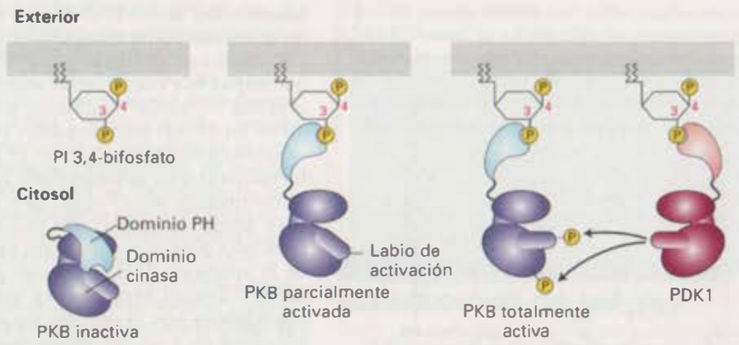
Un sitio diana primario de fijación del PI 3-fosfato es la proteincinasa B (PKB), una serina/treonina cinasa. Además de su dominio cinasa, PKB contiene un dominio PH que se fija en forma ajustada al 3-fosfato tanto en PI 3,4-bifosfato como en PI 3,4,5 trifosfato. En las células en reposo, no estimuladas, el nivel de ambos compuestos es bajo y la proteincinasa B está presente en el citosol en forma inactiva. Luego de la estimulación con la hormona y la elevación resultante en PI 3-fosfatos, la proteincinasa B se une a ellos y se localiza en la superficie de la membrana celular.

La unión de la proteincinasa B a los PI 3-fosfato no sólo recluta la enzima en la membrana plasmática sino también libera la inhibición del sitio catalítico mediante el dominio PH en el citosol. Sin embargo, la activación máxima de la proteincinasa B depende del reclutamiento de otra cinasa, PDK1, a la membrana plasmática mediante la fijación de su dominio PH a los PI 3-fosfato. Ambas, proteincinasa B asociada a la membrana y PDK1 pueden difundirse en el plano de la membrana, que las acerca lo suficiente de modo que PDK1 puede fosforilar la proteincinasa B (fig. 14-27). PDK1 fosforila un residuo serina en el labio de activación de la proteincinasa B, lo que proporciona otro ejemplo de activación de la cinasa por fosforilación en este segmento. La fosforilación de una segunda serina, no en el segmento del labio, es necesaria para la actividad máxima de la proteincinasa B. En consecuencia, como sucede con Raf, un dominio inhibidor y la fosforilación por otras cinasas regulan la actividad de la proteincinasa B. Una vez activada por completo, la proteincinasa B puede disociarse de la membrana plasmática y fosforilar sus diversas proteínas diana.



▲ **Fig. 14-26. Generación de fosfatidilinositol 3-fosfato.** La enzima fosfatidilinositol-3 cinasa (PI-3 cinasa) es reclutada en la membrana por muchos receptores de tirosincinasas (RTK) y receptores para citocina activados. El 3-fosfato agregado por esta enzima es un sitio de fijación para diversas proteínas de transducción de señales. (Véase L. Rameh y L. C. Cantley, 1999, J. Biol. Chem. 274:8347.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Dinámica de proteínas en respuesta a la estimulación por cAMP de una célula



▲ Fig. 14-27. Reclutamiento y activación de la proteincinasa B (PKB) en las vías PI-3 cinasa. En células no estimuladas, la PKB está en el citosol con su dominio PH fijado al dominio catalítico, lo que inhibe su actividad. La estimulación hormonal conduce a la activación de la PI-3 cinasa y la formación posterior de fosfatidilinositol (PI) 3-fosfato (véase fig. 14-26). Los grupos 3-fosfato actúan como sitios de acoplamiento sobre la membrana plasmática para el dominio PH de PKB y otra cinasa, PDK1. La activación completa de PKB requiere la fosforilación tanto en el labio de activación como en el C-terminal por PDK1. (Adaptado de A. Toker y A. Newton, 2000, Cell 103:185 y M. Scheid et al., 2002, Mol. Cell Biol. 22:6247.)

El receptor para insulina actúa a través de la vía PI-3 cinasa en concentraciones bajas de glucemia

El receptor para insulina es un receptor tirosincinasa dimérico que puede iniciar la vía Ras-MAP cinasa y conduce a cambios en la expresión génica. La estimulación con insulina también puede iniciar la vía PI-3 cinasa descrita antes, que lleva a la activación de la proteincinasa B. En hepatocitos, células musculares y adipocitos estimulados por insulina, la proteincinasa B activada actúa de diversas maneras para disminuir la glucemia y estimular la síntesis de glucógeno.

El principal mecanismo por el cual la insulina causa una reducción del nivel de glucemia es mediante la entrada creciente de glucosa en los adipocitos y en las células musculares. Este efecto está mediado por la proteincinasa B, que por mecanismos no comprendidos en su totalidad, causa el movimiento del transportador de la glucosa GLUT4 desde las membranas intracelulares a la superficie celular (cap. 15). El incremento de la entrada de glucosa en estas células disminuye los niveles de glucemia.

Tanto en el hígado como en el músculo, la estimulación por insulina también conduce a la activación de la glucógeno sintasa (GS), que sintetiza glucógeno a partir de UDP-glucosa (véase fig. 13-16). Éste representa otro mecanismo para la reducción de la concentración de glucosa en la circulación. En las células en reposo (es decir, en ausencia de insulina), la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3) se activa y fosforila la glucógeno sintasa, que por consiguiente bloquea su actividad. La proteincinasa B activada fosforila y por eso inactiva GSK3. Como consecuencia, se libera la inhibición de glucógeno sintasa mediada por GSK3 y estimula la síntesis del glucógeno.

La proteincinasa B activada estimula la supervivencia de las células mediante varias vías

En diversas células, la proteincinasa B activada fosforila en forma directa proteínas proapoptóticas como Bad, e impide la activación de una vía apoptótica que conduce a la muerte celular (cap. 22). La proteincinasa B activada también estimula la supervivencia de muchas células cultivadas por la fosforilación del factor de transcripción Forkhead-1 sobre por lo menos, tres residuos de serina o treonina. En ausencia de factores de crecimiento, Forkhead-1 está desfosforilado y se localiza en el núcleo, donde activa la transcripción de varios genes que codifican proteínas proapoptóticas. Cuando se agregan factores de crecimiento a las células, la proteincinasa B se activa y fosforila Forkhead-1. Esto permite que la proteína 14-3-3 de fijación a la fosfoserina se una a Forkhead-1 y por consiguiente lo secuestre en el citosol. (14-3-3 es la misma proteína que retiene fosforilada a la proteína Raf en el citosol; véase fig. 14-21.) El retiro del factor de crecimiento conduce a la inactivación de la proteincinasa B y a la desfosforilación de Forkhead-1, lo cual favorece la apoptosis. Una mutante de Forkhead-1 en la cual están mutados los tres residuos diana de serina para la proteincinasa B es "constitutivamente activa" e inicia la apoptosis incluso en presencia de la proteincinasa B activada. Este hallazgo demuestra la importancia de Forkhead-1 en el control de la apoptosis de células cultivadas.

La PTEN fosfatasa termina la señalización por medio de la vía PI-3 cinasa

Como casi todos los acontecimientos de señalización intracelular, la fosforilación por la PI-3 cinasa es reversible. La fosfatasa relevante, denominada *PTEN fosfatasa*, tiene una especificidad inusualmente amplia. Si bien PTEN puede eliminar grupos fosfato adheridos a residuos serina, treonina y tirosina en las proteínas, se considera que su función principal en las células es su capacidad para eliminar el 3-fosfato de PI 3,4,5-trifosfato. La expresión en exceso de PTEN en las células cultivadas de los mamíferos estimula la apoptosis porque reduce el nivel de PI 3,4,5-trifosfato y, en consecuencia, la activación y el efecto antiapoptótico de la proteincinasa B.

MEDICINA

El gen que codifica PTEN está eliminado en múltiples tipos de cánceres humanos avanzados y se considera que su pérdida conduce al crecimiento descontrolado. De hecho, las células que carecen de PTEN tienen niveles elevados de PI 3,4,5-trifosfato y actividad PKB. Dado que la proteincinasa B ejerce un efecto antiapoptótico, la pérdida de PTEN reduce en forma indirecta la muerte celular programada, que es el destino normal de las células controladas de modo anormal. En ciertas células, como las células madre (*stem cells*) neuronales, la ausencia de PTEN no sólo evita la apoptosis sino que también conduce a la estimulación de la progresión del ciclo celular y al aumento de la velocidad de proliferación. En consecuencia, los ratones con desactivación génica (*knockout*) que no pueden expresar PTEN tienen cerebros grandes con cantidades excesivas de neuronas, lo que avala la importancia de PTEN en el control del desarrollo normal. ■

El receptor para un factor de crecimiento particular a menudo está relacionado con múltiples vías de señalización

La interacción de vías de señalización diferentes permite el ajuste de las actividades celulares requeridas para llevar a cabo procesos complejos del desarrollo y fisiológicos. Como ya se mencionó, tanto RTK como los receptores para citocina pueden iniciar la señalización por medio de las vías Ras-MAP, DAG/IP_3 y PI-3 cinasa (véase cuadro 14-1). Además, los receptores para citocina pueden actuar a través de sus JAK cinasas asociadas con factores de transcripción STAT activados de modo directo.

La activación de vías múltiples de transducción de la señal por muchos receptores permite que conjuntos diferentes de genes sean controlados de manera independiente por los mismos receptores o diferentes. En ocasiones estas vías pueden inducir efectos opuestos. Por ejemplo, la manipulación genética de las vías Ras-MAP cinasa y PI-3 cinasa durante la diferenciación muscular indica que estas vías tienen efectos fenotípicos opuestos: la activación de la vía Ras-MAP cinasa inhibe la diferenciación de miocitos en miotubos, mientras que la activación de la vía PI-3 cinasa la estimula.

La iniciación de vías de señalización específicas de tejido por estimulación del *mismo* receptor en células diferentes es ejemplificada por el receptor EGF. Estudios genéticos similares a los descritos antes para el desarrollo de células R7 en *Drosophila* demostraron la importancia central de la señalización estimulada por medio de la vía Ras-MAP en el desarrollo de la vulva en *C. elegans*. Sin embargo, otros estudios genéticos mostraron que la estimulación del receptor EGF activa una vía independiente de Ras en algunos tejidos. Por ejemplo, una de las muchas funciones de EGF en *C. elegans* es el control de la contractilidad del músculo liso, que a su vez regula la salida de los ovocitos desde un compartimiento de la gónada hermafrodita a otro, donde son fecundados. El acoplamiento del receptor EGF a Ras no es requerido para las contracciones de la gónada inducidas por EGF. El análisis de varios tipos diferentes de mutaciones llevó a los investigadores a concluir que en el músculo liso de *C. elegans*, el receptor EGF está relacionado con la vía IP_3/DAG. La fijación del ligando al receptor conduce a la activación de la actividad de PLC_γ, aumento de IP_3 y liberación de las reservas de Ca^{2+} intracelular. El aumento del nivel del Ca^{2+} citosólico luego estimula la contracción muscular.

En el capítulo 15 encontraremos otros varios ejemplos del modo en que la estimulación del mismo receptor en tipos celulares diferentes activa vías de señalización distintas que producen efectos muy diversos en el metabolismo y el destino de la célula.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 14.5

Fosfoinosítidos como transductores de señales

- Diversos RTK y receptores para citocina pueden iniciar la vía de señalización IP_3/DAG mediante la activación de la fosfolipasa C_γ(PLC_γ), una isoforma diferente de PLC que la activada por los receptores acoplados a la proteína G.
- Los RTK y receptores para citocina activados pueden iniciar otra vía de fosfoinosítidos por fijación de las PI-3 cinasas, lo que en consecuencia permite que la subunidad catalítica tenga acceso a los sustratos fosfoinosítidos (PI) fijados a la membrana, que son fosforilados en la posición 3 (véase fig. 14-26).
- El dominio PH en varias proteínas se fija a los PI 3-fosfato, lo que forma complejos de señalización asociados con la membrana plasmática.
- La proteincinasa B (PKB) se torna parcialmente activada por fijación a los PI 3-fosfato. Su activación completa requiere la fosforilación por otra cinasa (PDK1), que también es reclutada a la membrana mediante la fijación a los PI 3-fosfato (véase fig. 14-27).
- La proteincinasa B activada estimula la supervivencia de muchas células mediante la inactivación directa de diversas proteínas proapoptóticas y la regulación negativa de la expresión de otras.
- La señalización por medio de la vía PI-3 cinasa termina por la PTEN fosfatasa, que hidroliza el 3-fosfato en los PI 3-fosfato. La pérdida de PTEN, un hecho común en los tumores humanos, estimula la supervivencia y proliferación celulares.
- Un RTK o receptor para citocina individual a menudo inicia vías de señalización diferentes en múltiples tipos celulares. Las vías diferentes pueden ser esenciales en ciertos acontecimientos de señalización, pero no en otros.

14.6 Vías que involucran la degradación de la proteína inducida por la señal

Hasta ahora hemos descrito vías de señalización reversibles, donde la inactivación es tan importante como la activación inicial. Por el contrario, las vías irreversibles son aquellas en las cuales un componente es degradado por proteólisis. Consideramos aquí dos de estas vías: la *vía NF-κB*, que posibilita que las células respondan en forma inmediata y vigorosa a ciertas condiciones inductoras de estrés y la *vía Notch/Delta*, la cual determina los destinos de muchos tipos de células durante el desarrollo. La activación proteolítica del receptor Notch de la superficie celular es facilitada por la presenilina 1, una proteína de la membrana que también fue implicada en la enfermedad de Alzheimer.

La degradación inducida por señales de una proteína inhibidora citosólica activa al factor de transcripción NF-κB

Los ejemplos en las secciones previas demostraron la importancia de la fosforilación inducida por señales para modular la actividad de diversos factores de transcripción. Otro mecanismo para la regulación de la actividad de factores de transcripción en respuesta a las señales extracelulares fue revelado en estudios con células de mamíferos y de *Drosophila*. Este mecanismo, que implica la fosforilación y la degradación mediada por ubicuitina de una proteína inhibidora, es ejemplificado por el factor de transcripción NF-κB.

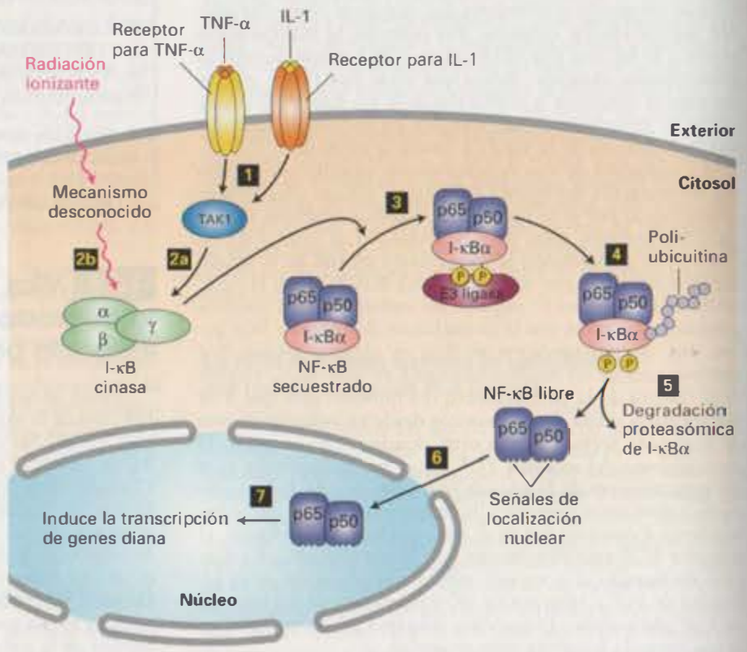
Descubierto sobre la base de la activación transcripcional del gen que codifica la cadena liviana κ de los anticuerpos (inmunoglobulinas) en las células B, en la actualidad se considera que NF-κB es el principal regulador transcripcional del sistema inmune en los mamíferos. Si bien las moscas no elaboran anticuerpos, homólogos de NF-κB en *Drosophila* median la respuesta inmune contra la infección bacteriana y viral mediante la inducción de la síntesis de gran cantidad de péptidos antimicrobianos que son segregados desde las células. Esto indica que el sistema regulador NF-κB tiene más de 500 millones de años. NF-κB se activa con rapidez en las células del sistema inmune de los mamíferos en respuesta a la infección, la inflamación y ciertas otras situaciones de estrés, como la radiación ionizante. También es activado por las denominadas citocinas inflamatorias como el *factor de necrosis tumoral α (TNF-α)* y la interleucina 1 (IL-1), que son liberadas por células vecinas en respuesta a la infección.

Los estudios bioquímicos en células de mamíferos y los estudios genéticos en moscas proporcionaron conocimientos importantes en el funcionamiento de la vía NF-κB (fig. 14-28). Las dos subunidades de NF-κB heterodimérico (p65 y p50) comparten una región de homología en sus N-terminal requeridos para su dimerización y fijación al DNA. En las células en reposo, NF-κB es secuestrado en un estado inactivo en el citosol mediante la fijación directa a un inhibidor denominado I-κB. Una molécula individual de I-κB se fija al dominio N-terminal de cada subunidad en el heterodímero p50/p65, que en consecuencia enmascara las señales de localización nuclear. Una proteincinasa compleja denominada *I-κB cinasa* es el punto de convergencia de todas las señales extracelulares que activan NF-κB. En el curso de minutos luego de la estimulación, I-κB cinasa se activa y fosforila dos residuos de serina N-terminal en I-κB. Luego, una ligasa E3 ubicuitina se fija a estas fosfoserinas y poliubicuitina I-κB, lo que induce la degradación inmediata por un proteasoma (véase fig. 3-13). En las células que expresan formas mutantes de I-κB en las cuales estas dos serinas fueron cambiadas a alanina y, por lo tanto no pueden ser fosforiladas, NF-κB es reprimido en forma permanente, lo cual demuestra que la fosforilación de I-κB es esencial para la activación de la vía.

La degradación de I-κB expone las señales de localización nuclear en NF-κB, el cual se transloca entonces al interior del núcleo y activa la transcripción de una gran cantidad de genes diana. A pesar de su activación por proteólisis, la señalización NF-κB por último se interrumpe por un mecanismo de retroalimentación negativa, ya que uno de los genes cuya transcripción es inmediatamente inducida por NF-κB codifica I-κB. El aumento resultante en los niveles de la proteína I-κB se fija a NF-κB activo en el núcleo y lo retorna al citosol.

La NF-κB estimula la transcripción de más de 150 genes, incluidos los que codifican citocinas y quimiocinas que atraen otras células del sistema inmune y fibroblastos a los sitios de infección. También estimula la expresión de proteínas receptoras que permite a los neutrófilos (un tipo de glóbulo blanco) migrar desde la sangre al interior del tejido subyacente (véase fig. 6-30). Además, NF-κB estimula la expresión de iNOS, la isoforma inducible de la enzima que produce óxido nítrico, el cual es tóxico para las células bacterianas y de varias proteínas antiapoptóticas, que impiden la muerte celular. Por lo tanto, este factor de transcripción individual coordina y activa las defensas del organismo ya sea en forma directa respondiendo a los patógenos y al estrés o, en forma indirecta respondiendo a moléculas de señalización liberadas desde otros tejidos y células infectados o lesionados.

Además de su participación en la inflamación o en la inmunidad, NF-κB desempeña un papel fundamental durante el desarrollo mamífero. Por ejemplo, los embriones de ratones que no pueden expresar una de las subunidades de I-κB cinasa mueren en la mitad del período de gestación por degeneración hepática causada por apoptosis excesiva de las células que normalmente sobrevivirían; por lo tanto, NF-κB es esencial para el desarrollo normal de este tejido. Como veremos en el capítulo 21, la degradación dependiente de la fosforilación de un inhibidor dependiente de una ciclina cinasa desempeña un papel central en la regulación de la progresión a través del ciclo celular en *S. cerevisiae*. Parece probable que la degradación de la proteína dependiente de la fosforilación surja como un mecanismo regulador común en muchos procesos celulares diferentes.

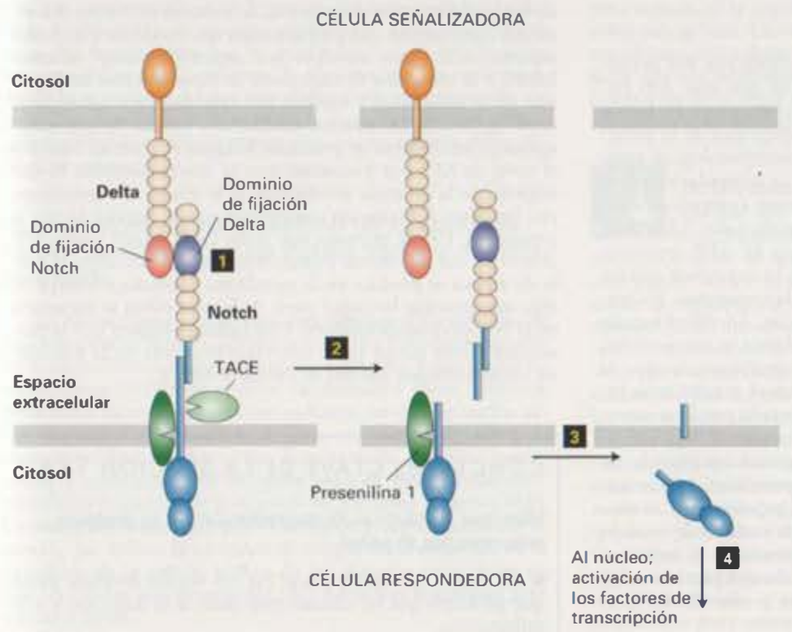


▶ Fig. 14-28. Vía de señalización NF-κB. En las células en reposo, el factor de transcripción dimérico NF-κB, compuesto de p50 y p65, es secuestrado en el citosol, fijado al inhibidor I-κB. La estimulación por TNFα o IL-1 induce la activación de TAK1 cinasa (paso 1), que conduce a la activación de la I-kB cinasa trimérica (paso 2a). La radiación ionizante y otras situaciones de estrés pueden activar en forma directa I-κB cinasa por un mecanismo desconocido (paso 2b). Luego de la fosforilación de I-κB por I-κB cinasa y la fijación de la ubicuitina ligasa E3 (paso 3), la poliubicuitinación de I-κB (paso 4) dirige su degradación por proteasomas (paso 5). La eliminación de I-κB desenmascara las señales de localización nuclear (NLS) en ambas subunidades de NF-κB, lo que permite su translocación al núcleo (paso 6). Aquí, NF-κB activa la transcripción de numerosos genes diana (paso 7), incluso el gen que codifica la subunidad α de I-κB, que actúa para terminar la señalización. (Véase M. Karin y Y. Ben-Neriah, 2000, Ann. Rev. Immunol. 18:621 y R. Khush, F. Leulier and B. Lemaitre, 2001, Trends Immunol. 22:260.)

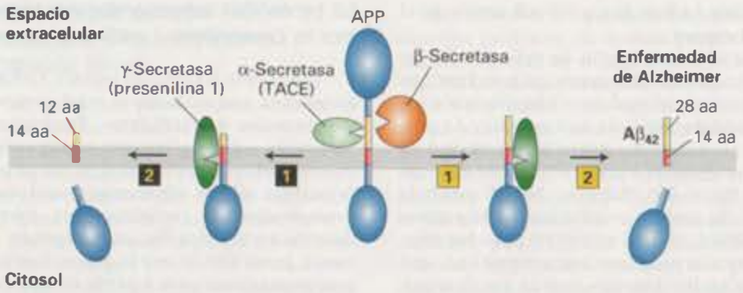
La proteólisis intramembrana regulada catalizada por la presenilina 1 activa el receptor Notch

Tanto Notch como su ligando Delta son proteínas transmembrana con numerosas repeticiones similares a EGF en sus dominios extracelulares. Participan en un tipo de diferenciación celular altamente conservado e importante en invertebrados y vertebrados, denominada inhibición lateral, en la cual las células adyacentes y equivalentes en el desarrollo asumen destinos completamente diferentes. Este proceso, descrito en sus detalles en el capítulo 15, tiene una importancia particular en evitar que se formen demasiadas células precursoras nerviosas a partir de una capa indiferenciada de células epiteliales.

La proteína Notch es sintetizada como una proteína de membrana monomérica en el retículo endoplasmático, donde se une a la *presenilina 1*, una proteína que atraviesa la membrana varias veces; el complejo se dirige primero hacia el Golgi y luego a la membrana plasmática. En el Golgi, Notch sufre un corte proteolítico que genera una subunidad extracelular y una subunidad citosólica transmembrana; las dos subunidades permanecen asociadas en forma no covalente en ausencia de interacción con Delta que reside en otra célula. La unión de Notch a Delta induce dos cortes proteolíticos en la célula respondedora (fig. 14-29). El segundo corte, dentro de la región transmembrana hidrófoba de Notch, es catalizado por presenilina 1 y libera el segmento citosólico de Notch, que de inmediato se transloca al núcleo. Esta *proteólisis intramembrana regulada (RIP)* inducida por la señal también se produce como respuesta de las células ante niveles elevados de colesterol (cap. 18) y a la presencia de proteínas no plegadas en el retículo endoplasmático (cap. 16).



◀ Fig. 14-29. Vía de señalización Notch/Delta. La subunidad extracelular de Notch en la célula respondedora no está asociada en forma covalente con su subunidad transmembrana-citosólica. La fijación de Notch a su ligando Delta sobre una célula de señalización adyacente (paso 1) induce primero el corte de Notch por la metaloproteasa fijada a la membrana TACE (enzima convertidora del factor de necrosis tumoral alfa), que libera el segmento extracelular (paso 2). Luego, la presenilina 1, una proteína integral de membrana, cataliza un corte intramembrana que libera el segmento citosólico de Notch (paso 3). Después de la translocación al núcleo, este segmento Notch interactúa con varios factores de transcripción que afectan la expresión de genes que a su vez influye en la determinación del destino celular durante el desarrollo (paso 4). (Véase M. S. Brown et al., 2000, Cell 100:391 y Y-M. Chan y Y. Jan, 1999, Neuron 23:201.)



▲ Fig. 14-30. Corte proteolítico de APP, una proteína de membrana plasmática de las neuronas. (*Izquierda*) El corte proteolítico secuencial por una secretasa α (paso 1) y secretasa γ (paso 2) produce un péptido inocuo de 26 aminoácidos incluido en la membrana. La secretasa γ es un complejo de varias proteínas, si bien es probable que el sitio proteolítico que cataliza el corte dentro de la membrana resida dentro de la presenilina 1. (*Derecha*) El corte en el dominio extracelular por la secretasa β (paso 1) seguido por el corte dentro de la membrana por la secretasa γ genera el péptido $A\beta_{42}$ de 42 residuos que fue implicado en la formación de placas amiloides en la enfermedad de Alzheimer. En ambas vías el segmento citosólico de APP se libera dentro del citosol, pero su función se desconoce. (Véase W. Esler y M. Wolfe, 2001, Science 293:1449 y C. Haass y H. Steiner, 2002, Trends Cell Biol. 12:556.)

En *Drosophila* el segmento intracelular de Notch liberado forma un complejo con una proteína de fijación al DNA denominada Supresor de Hairless, o Su(H) y estimula la transcripción de muchos genes cuyo efecto neto es influir en la determinación del destino celular durante el desarrollo. Una de las proteínas que aumenta de esta manera es Notch y la producción de Delta está disminuida en la misma proporción (véase fig. 15-38). Como veremos en el capítulo 15, la regulación mutua del receptor y del ligando de este modo es una característica esencial de la interacción entre células inicialmente equivalentes que las hace asumir destinos celulares diferentes.

MEDICINA

La presenilina 1 (PS1) fue identificada por primera vez como el producto de un gen que, con frecuencia, está mutado en pacientes con la forma autosómica dominante de comienzo temprano de la enfermedad de Alzheimer. Un cambio anatomopatológico principal asociado con esta enfermedad es la acumulación en el cerebro de placas amiloides que contienen agregados de un péptido pequeño con 42 residuos denominado $A\beta_{42}$. Este péptido proviene del corte proteolítico de APP (proteína precursora amiloide), una proteína de la superficie celular de función desconocida expresada por las neuronas. En realidad, APP sufre el corte por dos vías (fig. 14-30). En cada vía el corte inicial sucede dentro del dominio extracelular, catalizado por la α-secretasa o la β-secretasa; luego, la γ-secretasa cataliza un segundo corte en el mismo sitio intramembrana en ambas vías. La vía iniciada por la α-secretasa, que comprende la misma metaloproteasa TACE fijada a la membrana que corta Notch, genera un péptido de 26 residuos que en apariencia no es perjudicial. La vía iniciada por la β-secretasa genera la $A\beta_{42}$ patológica. Las mutaciones de aminoácidos (mutaciones de cambio de sentido –*missense*–) en la presenilina 1 involucrada en la enfermedad de Alzheimer aumentan la formación del péptido $A\beta_{42}$, que conduce a la formación de placas y por último a la muerte de las neuronas.

La evidencia que apoya el compromiso de la presenilina 1 en la señalización Notch (véase fig. 14-29) proviene de estudios genéticos en el nematodo *C. elegans*. Las mutaciones en el homólogo de la presenilina 1 del parásito causaron defectos del desarrollo similares a los producidos por las mutaciones Notch. Trabajos posteriores mostraron que los Notch de mamíferos no sufrían proteólisis intramembrana inducida por la señal en células neuronales de ratones que carecían genéticamente de presenilina 1. Aún no se sabe con certeza si la presenilina 1 es la proteasa γ-secretasa real o un cofactor esencial de la proteasa "real", ya que la presenilina 1 es parte de un gran complejo que contiene otras varias proteínas integrales de membrana. Dentro de sus segmentos transmembrana, la presenilina 1 tiene dos residuos aspartato en una configuración que recuerda a la de dos aspartatos en el sitio activo de las "aspartilproteasas" hidrosolubles, y la mutación de cualquiera de estos residuos de aspartato en la presenilina 1 suprime su capacidad para estimular el corte de Notch. De manera similar, una batería de sustancias químicas inhibidoras de proteasas bloquea el corte de Notch y el corte de APP por γ-secretasa con la misma potencia, lo que sugiere que la proteasa involucrada es la misma. En consecuencia, los datos actuales son compatibles con la noción de que la presenilina 1 es la proteasa que corta tanto Notch como APP dentro de sus segmentos transmembrana. Sin embargo, el corte de ambos se produce en la membrana plasmática o cerca de ella, mientras que la mayor parte de la presenilina se encuentra en el retículo endoplasmático. Este hallazgo sugiere que la presenilina puede actuar junto con otras proteínas en la proteólisis intramembrana inusual de Notch y APP. ▮

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 14.6

Vías que involucran la degradación de la proteína inducida por la señal

- El factor de transcripción NF-κB regula diversos genes que permiten que las células respondan a la infección y a la inflamación.
- En células no estimuladas, NF-κB está localizado en el citosol, unido a una proteína inhibidora, I-κB. En respuesta a señales extracelulares, la ubicuitinización dependiente de la fosforilación y la degradación de I-κB en los proteosomas libera NF-κB activo, el cual se transloca al núcleo (véase fig. 14-28).
- Con la fijación a su ligando Delta en la superficie de una célula adyacente, la proteína del receptor Notch sufre dos clivajes proteolíticos. El segmento citosólico de Notch liberado se transloca entonces al interior del núcleo y modula la transcripción génica (véase fig. 14-29).
- La presenilina 1, que cataliza el corte regulado intramembrana de Notch, también participa en el corte de la proteína precursora amiloide (APP) en un péptido que forma las placas características de la enfermedad de Alzheimer.

14.7 Modulación negativa de receptores de señalización

Ya hemos visto las diversas maneras en que pueden regularse las vías de transducción de señales. Los niveles de hormonas producidos y liberados desde las células de señalización son ajustados de modo constante para cubrir las necesidades del organismo. Por ejemplo, las células renales elaboran y segregan más eritropoyetina cuando el nivel de oxígeno es bajo y se requieren más glóbulos rojos. Las proteínas intracelulares como Ski y SOCS son inducidas luego de la estimulación por TGFβ o citocinas y luego regulan en forma negativa sus vías de transducción de señales respectivas. La fosforilación de receptores y las proteínas de señalización corriente abajo se revierten por acción de las fosfatasas controladas de manera cuidadosa. Aquí describimos otros dos mecanismos por los cuales las vías de señalización son reguladas negativamente: la eliminación de receptores desde la superficie celular por endocitosis y la secreción de proteínas que fijan y secuestran hormonas, que por consiguiente impiden su interacción con los receptores de la superficie celular.

La endocitosis de los receptores de la superficie celular desensibiliza a las células frente a diversas hormonas

En las secciones anteriores describimos diversas vías de transducción de señales activadas en forma inmediata después de la estimulación de receptores para citocina y receptores tirosincinasas (RTK). Si el nivel de hormona en el ambiente permanece elevado durante varias horas, las células suelen sufrir *desensibilización*, de modo que no responden más a la concentración de la hormona. Esto evita la actividad inadecuada y prolongada del receptor, pero en estas condiciones las células responderán si el nivel de hormona aumenta más. La endocitosis mediada por el receptor y dependiente del ligando, que reduce la cantidad de receptores disponibles de la superficie de la célula, es una de las maneras principales en que las células son desensibilizadas a muchas hormonas peptídicas y otras.

Por ejemplo, en ausencia del ligando EGF, el receptor para EGF es internalizado en una velocidad relativamente baja por el recambio de membrana. Además de la activación de la proteína tirosincinasa del receptor, la fijación a EGF induce un cambio conformacional en la cola citosólica del receptor. Esto expone un motivo clasificador que facilita el reclutamiento del receptor dentro de las invaginaciones recubiertas por clatrina y la internalización ulterior. Después, algunos receptores de la superficie celular (p. ej., el receptor para LDL) son reciclados de manera eficaz a la superficie (véase fig. 17-28). Por el contrario, los receptores internalizados para muchas hormonas peptídicas, junto con sus ligandos unidos, suelen ser transportados a los lisosomas donde son degradados, en lugar de ser reciclados a la superficie celular.

Por ejemplo, cada vez que un receptor para EGF es internalizado con EGF fijado, tiene cerca del 50% de posibilidades de ser degradado. La exposición de un fibroblasto a niveles elevados de EGF durante una hora induce varias rondas de endocitosis, lo que produce la degradación de la mayor parte de las moléculas del receptor. Si luego se reduce la concentración de EGF extracelular, la cantidad de receptores para EGF sobre la superficie celular se recupera mediante la síntesis de nuevas moléculas de receptores, un proceso lento que puede insumir más de un día. De este modo una célula puede tornarse desensibilizada frente a un nivel elevado continuo de hormona y, después de la eliminación de la hormona, restablecer su nivel inicial de receptores de la superficie celular, que, en consecuencia, la torna de nuevo sensible a un nivel bajo de hormona.

Los experimentos con líneas celulares mutantes demuestran que la internalización de RTK desempeña un papel importante en la regulación de respuestas celulares para EGF y otros factores de crecimiento. Por ejemplo, una mutación en el receptor para EGF que impide que sea incorporado dentro de las fosas recubiertas y, en consecuencia, lo torna resistente a la endocitosis inducida por el ligando, aumenta de manera sustancial la sensibilidad de las células a EGF como una señal mitogénica. Estas células mutantes están propensas a la transformación celular inducida por EGF. Es interesante destacar que los receptores internalizados pueden continuar con la emisión de la señal desde los compartimientos intracelulares antes de su degradación.

BIOTEC

En la mayoría de los casos, las hormonas peptídicas que son internalizadas unidas a sus receptores son degradadas en forma intracelular. Si el nivel extracelular inicial de hormona es relativamente bajo, este proceso puede reducir lo suficiente el nivel de hormona para terminar la señalización celular después de algunas horas. Por ejemplo, IL-2, una citocina que estimula el crecimiento de células T inmunes, suele ser deplecionada del ambiente extracelular por este mecanismo, que conduce a la cesación de la señalización. Las formas mutantes de IL-2 fueron obtenidas de las que se fijan al receptor para IL-2 en forma normal a pH 7,5, del medio extracelular, pero mal a pH 6, de las vesículas endocíticas iniciales o endosoma. Estas proteínas IL-2 mutantes se disocian del receptor en el endosoma y son "recicladas"; es decir, son segregadas de nuevo al medio extracelular más que acompañando al receptor al lisosoma para la degradación. Dado que la vida media de estas proteínas IL-2 mutantes es más prolongada que lo normal, son más potentes que sus contrapartes normales y pueden ser útiles desde el punto de vista terapéutico para estimular la producción de células T. ▮

Los receptores señuelo segregados se fijan a la hormona y evitan la activación del receptor

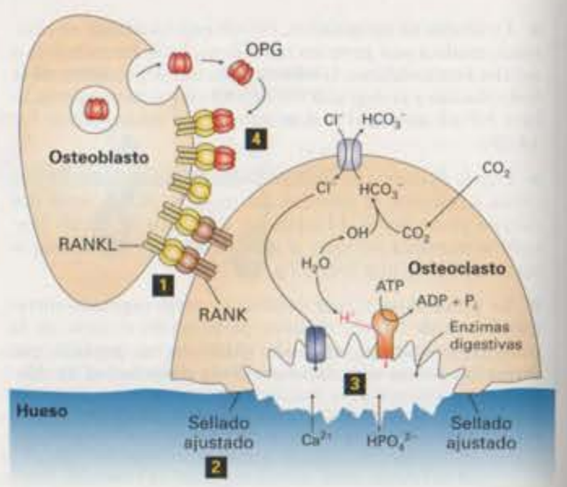
Otra manera de reducir la actividad de los receptores de la superficie celular es la secreción de una proteína que contiene un segmento de fijación a la hormona, pero no la actividad de transducción de la señal. Como podría esperarse, la fijación de la hormona a estas proteínas, denominadas *receptores señuelo*, reduce la cantidad de hormona disponible para unirse a receptores capaces de señalización. Este tipo de regulación es importante en el control de la resorción ósea, un proceso fisiológico complejo que integra diversos mecanismos moleculares.

El crecimiento óseo neto en los mamíferos disminuye después de la pubertad, pero un proceso altamente dinámico y equilibrado de manera delicada de desamblaje (resorción) y de reensamblaje (formación ósea), denominado remodelado, continúa durante la adultez. El remodelado permite la reparación de los huesos dañados y puede liberar a la sangre calcio, fosfato y otros iones a partir del hueso mineralizado para su utilización en cualquier otra parte del organismo.

Los *osteoclastos*, las células que disuelven el hueso, son un tipo de macrófagos que contienen estructuras adhesivas con integrinas muy dinámicas, denominadas *podosomas*, en la membrana plasmática (véase fig. 6-27). La integrina $\alpha v\beta 3$ en los podosomas es crucial para la fijación inicial de los osteoclastos a la superficie del hueso, ya que los anticuerpos que se unen y bloquean la actividad de esta integrina bloquean la resorción ósea. Luego de su adhesión inicial al hueso, los osteoclastos provenientes de sellados muy estrechos entre ellos y el hueso crean un espacio extracelular cerrado (fig. 14-31). Entonces, un osteoclasto adherido segrega en este espacio una mezcla erosiva de HCl y proteasas que disuelve los componentes inorgánicos del hueso y digiere sus componentes proteicos. El mecanismo de generación y secreción de HCl recuerda al utilizado por el estómago para generar los jugos digestivos (véase fig. 7-28). Como en la secreción de HCl gástrico, la anhidrasa carbónica y una proteína antiportadora de aniones son utilizadas para generar iones H^+ dentro de los osteoclastos. Sin embargo, los osteoclastos emplean una bomba protónica tipo V para sacar los iones de H^+ al espacio que mira hacia el hueso en lugar de la bomba H^+/K^+ impulsada por ATP de la clase P utilizada por las células epiteliales gástricas (véase fig. 7-6).

La resorción ósea por los osteoclastos está regulada de manera minuciosa por interacciones intercelulares con los *osteoblastos* vecinos. Estas células formadoras de hueso segregan colágeno tipo I, el componente orgánico principal de los huesos. Los osteoblastos expresan una proteína trimérica de señalización y de superficie celular denominada *RANKL*, que es un miembro de la superfamilia TNF-α de las proteínas triméricas de señalización. RANKL es el ligando para RANK, un receptor de la superficie celular expresado por los osteoclastos. La interacción de RANK con RANKL inicia múltiples vías de señalización intracelular en los osteoclastos, que incluyen la vía NF-κB que también es iniciada por la estimulación de receptores para TNF-α (véase fig. 14-28). En conjunto, estas señales inducen la diferenciación de osteoclastos y los cambios en su forma que estimulan la fijación íntima y, por lo tanto, la resorción ósea.

Los osteoblastos también producen y segregan una proteína soluble del receptor señuelo denominada *osteoprotegerina (OPG)*, denominada así por su capacidad para "proteger el hueso".



▲ **Fig. 14-31. Resorción ósea y su regulación.** Los osteoclastos se fijan, en un principio, al hueso por medio de los podosomas mediados por integrina. La activación ulterior de un osteoclasto por interacción con osteoblastos vecinos por medio de las proteínas triméricas de membrana RANKL y RANK **1** induce la reorganización del citoesqueleto, que conduce a la formación de un sellado ajustado especializado con el hueso **2**. El osteoclasto activado segrega en el espacio extracelular generado por este sellado una mezcla corrosiva de HCl y proteasas que reabsorbe el hueso **3**. Los osteoblastos pueden suprimir la resorción ósea mediante la secreción de osteoprotegerina (OPG). La fijación de este receptor señuelo a RANKL **4** bloquea la fijación de RANKL a RANK en los osteoclastos y, en consecuencia, su activación. Para la descripción véase el texto. (Adaptado de N. Takahashi et al., 1999, Biochem. Biophys. Res. Comm. 256:449.)

La OPG segregada se une a RANKL en la superficie de los osteoblastos, que por eso evita la interacción RANKL-RANK e inhibe la activación del osteoclasto y la resorción ósea (véase fig. 14-31). Los ratones con deleciones del gen OPG tienen huesos débiles y porosos característicos de la resorción excesiva. Este hallazgo apoya la función esencial de la OPG en reducir la resorción ósea.

MEDICINA

La enfermedad hereditaria rara *osteopetrosis*, caracterizada por el aumento de la densidad ósea, se debe a la resorción anormalmente baja. Mucho más común es la *osteoporosis*, que es más frecuente en las mujeres posmenopáusicas. Este trastorno metabólico es la consecuencia de una resorción ósea desproporcionada, que conduce a huesos porosos, menos densos, que se rompen o fracturan con facilidad.

Muchas hormonas esteroides (p. ej., estrógeno, glucocorticoides), vitamina D, hormonas polipeptídicas y fármacos influyen en el metabolismo óseo mediante la interacción directa con los osteoblastos y mediante la modificación del sistema de señalización RANKL/RANK. El estrógeno, por ejemplo, suele inducir la secreción de OPG y por eso inhibe la resorción ósea. Cuando el estrógeno es bajo, como sucede en muchas mujeres posmenopáusicas, la resorción aumenta y los huesos se debilitan. Puede ser posible desarrollar tratamientos nuevos para la osteoporosis basados en la modificación del sistema de señalización que controla la resorción ósea.

BIOTEC

Dado que se fijan de modo tan ajustado a sus ligandos, los dominios solubles extracelulares de la superficie celular de los receptores para hormonas son hallazgos para un uso creciente como terapéuticos. Muchos receptores de la superficie celular están orientados en la membrana plasmática de forma tal que el dominio de la transducción de señal C-terminal se extiende al interior del citosol y el dominio N-terminal de fijación al ligando se extiende en el espacio extracelular. Con las técnicas del DNA recombinante puede colocarse un codón de terminación en el cDNA que codifica este receptor de modo que la translación en un sistema de expresión adecuado genera una proteína truncada correspondiente al dominio extracelular del receptor, el cual será segregado y puede actuar como receptor señuelo. Por ejemplo, los aumentos locales en TNF-α son frecuentes en la *artritis reumatoidea*, una enfermedad inflamatoria de las articulaciones. La inyección del dominio extracelular producido en forma recombinante del receptor para TNF-α, el cual "absorbe" parte del exceso de TNF-α y reduce la inflamación, en la actualidad constituye una de las terapéuticas principales para los casos graves de esta enfermedad.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 14.7

Modulación negativa de receptores de señalización

- La endocitosis de los complejos receptor-hormona y su degradación en los lisosomas es la manera principal de reducir la cantidad de receptor tirosincinasas y receptores para citocina en la superficie celular; por esto disminuye la sensibilidad de las células a muchas hormonas peptídicas.
- La resorción ósea es inducida mediante la fijación de RANKL en los osteoblastos a su receptor, RANK, en los osteoclastos. La señalización RANKL/RANK estimula la adhesión ajustada de los osteoclastos al hueso y la secreción por parte de los osteoclastos de una mezcla de HCl y proteasas que disuelve el hueso (véase fig. 14-31).
- La osteoprotegerina, un receptor señuelo para RANKL, inhibe la activación del osteoclasto y la resorción ósea.
- Los dominios extracelulares de muchos receptores de la superficie celular pueden ser producidos por técnicas del DNA recombinante y son potenciales receptores señuelos terapéuticos. Ya se está utilizando como receptor señuelo para TNF-α, que se fija al exceso de TNF-α asociado con artritis reumatoidea y otras enfermedades inflamatorias.

PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO

La confluencia de la genética, la bioquímica y la biología estructural nos brindó una visión detallada cada vez mayor del modo como se transmiten las señales desde la superficie celular y se transducen en cambios en el comportamiento celular. La enorme cantidad de señales extracelulares diferentes, sus receptores y las vías de transducción de señales intracelulares corresponden a una cantidad relativamente pequeña de clases y un objetivo fundamental es comprender el modo en que vías de señalización similares, a menudo, regulan procesos celulares muy diferentes. Por ejemplo, STAT5 activa conjuntos de genes muy diferentes en las células precursoras eritroides, luego de la estimulación del receptor para eritropoyetina, que en las células epiteliales mamarias, luego de la estimulación del receptor para prolactina. Se presume que STAT5 se fija a grupos de factores de transcripción diferentes en este y otros tipos celulares, pero aún permanece sin ser descubierta la naturaleza de estas proteínas y el modo en que colaboran para inducir patrones de expresión génica específicos para la célula.

A la inversa, la activación del mismo componente de la transducción de señales en la misma célula a través de receptores diferentes a menudo desencadena respuestas celulares distintas. Una visión considerada con frecuencia es que la duración de la activación de la MAP cinasa y otras vías de señalización afecta el patrón de expresión génica. Pero aún sigue siendo un interrogante sobresaliente cómo se determina esta especificidad en la transducción de la señal. Los estudios genéticos y moleculares en moscas, nematodos y ratones contribuirán a nuestro conocimiento de la interacción entre los componentes diferentes de la vía y los principios reguladores subyacentes que controlan la especificidad en los organismos multicelulares.

En los últimos años, los investigadores han determinado las estructuras tridimensionales de varias proteínas de señalización, lo cual permitió un análisis más exhaustivo de las diversas vías de transducción de señales. Por ejemplo, las estructuras moleculares de diferentes cinasas exhiben similitudes sorprendentes y variaciones importantes que les imparten características reguladoras novedosas. La actividad de diversas cinasas, como Raf y proteincinasa B (PKB), es controlada por dominios inhibidores así como por múltiples fosforilaciones catalizadas por otras varias cinasas. Pero nuestro conocimiento de cómo la actividad de estas y otras cinasas es regulada de manera precisa para cubrir las necesidades de la célula requiere estudios adicionales estructurales y de biología celular.

Las anormalidades en la transducción de la señal subyacen en muchas enfermedades diferentes, que incluyen la mayoría de los cánceres y numerosas enfermedades inflamatorias. El conocimiento detallado de las vías de señalización involucradas y la estructura de sus proteínas constituyentes continuará proporcionando indicios moleculares importantes para el diseño de terapéuticas específicas. A pesar de la estrecha relación estructural entre las diferentes moléculas de señalización (p. ej., cinasas), estudios recientes sugieren que pueden diseñarse inhibidores selectivos para subclases específicas. En muchos tumores de origen epitelial, el receptor para EGF exhibe actividad constitutiva (independiente de la señal) de proteína tirosincinasa y se demostró que un inhibidor específico de esta cinasa (Iressa™) es útil en el tratamiento de estos cánceres. De manera similar, los anticuerpos monoclonales o los receptores señuelo que evitan que las citocinas proinflamatorias como IL-1 y TNF-α se fijen a sus receptores cognados se emplean en la actualidad para el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias como la artritis.

Los fármacos que se dirigen a otras proteínas de transducción de señales pueden ser útiles para controlar sus actividades anormales. Un ejemplo es Ras, que está anclada a las

membranas celulares mediante grupos farnesilos relacionados con Ras por la farnesilo transferasa. Los inhibidores de esta enzima están siendo probados como agentes terapéuticos en cánceres causados por la expresión de proteínas Ras constitutivas activas. Los estudios estructurales detallados de la interacción entre las proteínas de transducción de señales ofrecen posibilidades excitantes para el diseño de tipos nuevos de fármacos con especificidad muy elevada. Por ejemplo, el conocimiento de la interfaz entre las proteínas Sos y Ras o entre Ras y Raf podría proporcionar las bases de un fármaco que bloquee la activación de la MAP cinasa. Sin duda, a medida que se comprendan más vías de señalización a nivel molecular emergerán objetivos adicionales para el desarrollo de fármacos.

PALABRAS CLAVE

cascada de las cinasas *593*
citocinas *580*
constitutiva *574*
dominios SH2 *579*
eritropoyetina *581*
fosfoinosítidos *598*
labio de activación *578*
MAP cinasa *593*
presenilina 1 *603*
proteincinasa B *599*
proteína Ras *587*
proteínas plataforma (“*scaffold*”) *597*
proteólisis intramembrana regulada *603*
PTEN fosfatasa *600*
receptor de tirosincinasas *578*
receptores señuelo *606*
señal de localización nuclear *576*
Smad *575*
superfamilia TGFβ *574*
vía JAK-STAT *581*
vía NF-κB *601*
vía Notch/Delta *601*
vía PI-3 cinasa *598*

REVISIÓN DE CONCEPTOS

1. La unión de TGFβ a sus receptores puede desencadenar diversas respuestas en tipos celulares diferentes. Por ejemplo, TGFβ induce al inhibidor del activador del plasminógeno en las células epiteliales e inmunoglobulinas específicas en las células B. En ambos tipos celulares, Smad3 es activada. Dada la conservación de la vía de señalización, ¿qué determina la diversidad de la respuesta a TGFβ en los diversos tipos celulares?

2. ¿Cómo es la señal generada mediante la fijación de TGFβ a los receptores de la superficie celular transmitidos al núcleo donde se producen los cambios en la expresión génica diana?

3. Mencione tres características comunes para la activación de receptores para citocina y el receptor de tirosincinasas. Mencione una diferencia con respecto a la actividad enzimática de estos receptores.

4. Los acontecimientos intracelulares que continúan cuando la eritropoyetina se fija a su receptor de la superficie celular son ejemplos bien caracterizados de las vías de señalización celulares que activan la expresión génica. ¿Qué molécula se transloca desde el citosol al núcleo después que (a) JAK2 activa STAT5 y (b) GRB2 se fija al receptor Epo?

5. Una vez que la vía de señalización activada desencadenó los cambios adecuados en la expresión génica diana, la vía debe ser inactivada; si no, pueden producirse consecuencias patológicas, ejemplificado por la vía de señalización del factor de crecimiento persistente en muchos cánceres. Varias vías de señalización poseen retroalimentación intrínseca negativa por la cual un acontecimiento corriente abajo en una vía apaga un acontecimiento corriente arriba. Describa la retroalimentación negativa que regula en menos las señales inducidas por (a) TGFβ y (b) eritropoyetina.

6. GRB2 es un componente esencial de la vía de señalización del factor de crecimiento epidérmico (EGF) aun cuando GRB2 carece de actividad enzimática intrínseca. ¿Cuál es la función de GRB2? ¿Qué papel desempeñan los dominios SH2 y SH3 en la función de GRB2? Muchas otras proteínas de señalización poseen dominios SH2. ¿Qué determina la especificidad de las interacciones SH2 con otras moléculas?

7. Una mutación en la proteína Ras se traduce como Ras constitutivamente activa (Ras^D). ¿Qué es la *activación constitutiva*? ¿Cómo estimula la Ras constitutivamente activa el cáncer? ¿Qué tipo de mutación podría mantener las siguientes proteínas constitutivamente activas: (a) Smad3, (b) MAP cinasa y (c) NF-κB?

8. La enzima Ste11 participa en varias vías de señalización MAP cinasa distintas en la levadura brotante *S. cerevisiae*. ¿Cuál es el sustrato para Ste11 en la vía de señalización del factor de apareamiento? Cuando una levadura es estimulada por el factor de apareamiento, ¿qué impide la inducción de la formación de filamentos ya que Ste11 también participa en la vía de señalización MAP cinasa inducida por falta de nutrientes?

9. Describa los acontecimientos requeridos para la activación completa de la proteincinasa B. Mencione dos efectos de la insulina mediados por la proteincinasa B en las células musculares.

10. Describa la función de la PTEN fosfatasa en la vía de señalización PI-3 cinasa. ¿Por qué una mutación en PTEN con pérdida de la función estimula el cáncer? Pronostique el efecto de PTEN constitutiva activa sobre el crecimiento y la supervivencia.

11. ¿Por qué se considera que la vía de señalización que activa NF-κB es relativamente irreversible en comparación con las vías de señalización para citocina o receptor tirosincinasa? No obstante, la señalización NF-κB debe ser, por último, regulada negativamente. ¿Cómo se interrumpe la vía de señalización NF-κB?

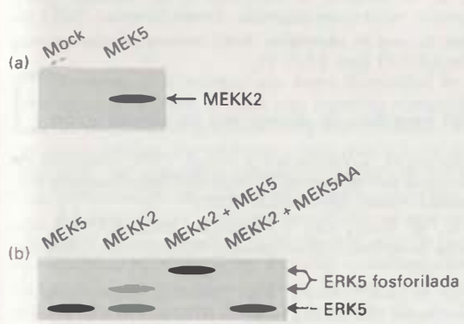
12. ¿Qué reacción bioquímica es catalizada por la enzima presenilina 1? ¿Cuál es el papel de la presenilina 1 en la transducción de la señal inducida por la fijación de Delta a su receptor? ¿Cómo se supone que estas mutaciones en la presenilina 1 contribuyen a la enfermedad de Alzheimer?

13. ¿Qué es un receptor señuelo? ¿Cómo hace la osteoprotegerina del receptor señuelo para bloquear la resorción ósea? Algunos tumores están caracterizados por el exceso en la producción del factor del crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). ¿Cómo podría funcionar un receptor señuelo recombinante como agente quimioterápico para este tipo de cáncer?

ANÁLISIS DE LOS DATOS

G. Johnson y col. han analizado la cascada de las cinasas en la cual MEKK2, una MAP cinasa cinasa cinasa, participa en las células de los mamíferos. Mediante un estudio con dos híbridos en levaduras (véase cap. 11), se encontró que MEKK2 se une a MEK5, una MAP cinasa cinasa. Para dilucidar la vía de señalización transducida por MEKK2 in vivo, se llevaron a cabo los siguientes estudios en cultivos de células de riñón embrionario humano (HEK293).

a. Las células HEK293 fueron transfectadas con un plásmido que codifica MEKK2 recombinante, marcada, junto con un plásmido que codifica MEK5 o un vector control que no codifica una proteína (mock). MEK5 recombinante fue precipitada a partir de un extracto celular por absorción a un anticuerpo específico. El material inmunoprecipitado fue luego analizado por electroforesis en gel de poliacrilamida, transferido a una membrana y examinado por inmunotransferencia por Western blot con un anticuerpo que reconoció MEKK2 marcado. Los resultados se muestran en la figura que se presenta a continuación, parte a. ¿Qué información acerca de la cascada de las cinasas MEKK2 aprendemos de este experimento? ¿Los datos en la parte a de la figura prueba que MEKK2 activa MEK5 o viceversa?



b. ERK5 es una MAP cinasa que antes se mostró que se activaba cuando era fosforilada por MEK5. Cuando ERK5 es fosforilado por MEK5, su migración en un gel de poliacrilamida está retrasada. En el experimento mostrado en la parte b de la figura, las células HEK293 fueron transfectadas con un plásmido que codifica ERK5 junto con plásmidos que codifican MEK5, MEKK2, MEKK2 y MEK5 o MEKK2 y MEK5AA. MEK5AA es una versión mutante, inactiva de MEK5 que funciona como un dominante negativo. La expresión de MEK5AA en las células HEK293 impide la señalización a través de MEK5 endógeno, activo. Los lisados de células transfectadas fueron analizados por inmunotransferencia por Western blot con un anticuerpo contra el ERK5 recombinante. De los datos en la parte b de la figura, ¿qué conclusión puede sacar acerca del papel de MEKK2 en la activación de ERK5? ¿Cómo ayudan los datos obtenidos a dilucidar el orden de los participantes en esta cascada de las cinasas cuando las células son cotransfectadas con ERK5, MEKK2 y MEK5AA?

BIBLIOGRAFÍA

Receptores de TGFβ y activación directa de Smad

Blobe, G., W. Schiemann, and H. Lodish. 2000. Role of transforming growth factor beta in human disease. N. Engl. J. Med. 342:1350-1358.

Liu, X., Y. Sun, R. Weinberg, and H. Lodish. 2001. Ski/Sno and TGF-beta signaling. Cytokine Growth Factor Rev. 12:1-8.

Massagué, J. 2000. How cells read TGF-beta signals. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178.

Massagué, J., S. Blain, and R. Lo. 2000. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. Cell 103:295-309.

Moustakas, A., S. Souchelnytskyi, and C. Heldin. 2001. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. J. Cell Sci. 114:4359-4369.

Shi, Y. 2001. Structural insights on Smad function in TGFbeta signaling. Bioessays 23:223-232.

ten Dijke, P., K. Miyazono, and C. Heldin. 2000. Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling. Trends Biochem. Sci. 25:64-70.

Wotton, D., and J. Massagué. 2001. Smad transcriptional corepressors in TGF beta family signaling. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 254:45-164.

Receptores para citocinas y vía JAK-STAT

Alexander, W. 2002. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. Nature Rev. Immunol. 2:410-416.

Chatterjee-Kishore, M., F. van den Akker, and G. Stark. 2000. Association of STATs with relatives and friends. Trends Cell Biol. 10:106-111.

Constantinescu, S. N., S. Ghaffari, and H. F. Lodish. 1999. The erythropoietin receptor: structure, activation, and intracellular signal transduction. Trends Endocrin. Metal. 10:8-23.

Kile, B. T., et al. 2002. The SOCS box: a tale of destruction and degradation. Trends Biochem. Sci. 27:235-41.

Leonard, W. 2001. Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction. Int. J. Hematol. 73:271-277.

Levy, D. E., and J. E. Darnell, Jr. 2002. Stats: transcriptional control and biological impact. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 3:651-62.

Ozaki, K., and W. Leonard. 2002. Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. J. Biol. Chem. 277:29355-29358.

Ward, A., I. Touw, and A. Yoshimura. 2000. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. Blood 95:19-29.

Yasukawa, H., A. Sasaki, and A. Yoshimura. 2000. Negative regulation of cytokine signaling pathways. Ann. Rev. Immlnol. 18:43-164.

Receptores tirosincinasas y activación de Ras

Gschwind, A., et al. 2001. Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. Oncogene 20:1594-1600.

Harari, D., and Y. Yarden. 2000. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. Oncogene 19:6102-6114.

Hubbard, S. 1999. Structural analysis of receptor tyrosine kinases. Prog. Biophys. Mol. Biol. 71:343-358.

Huse, M., and J. Kuriyan. 2002. The conformational plasticity of protein kinases. Cell 109:275-282.

Schlessinger, J. 2002. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. Cell 110:669-672.

Shawver, L., D. Slamon, and A. Ullrich. 2002. Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. Cancer Cell 1:117-123.

Simon, M. 2000. Receptor tyrosine kinases: specific outcomes from general signals. Cell 103:13-15.

Vetter, I., and A. Wittinghofer. 2001. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. Science 294:1299-1304.

Vías MAP cinasas

Avruch, J., et al. 2001. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. Recent Prog. Horm. Res. 56:127-155.

Chang, L., and M. Karin. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature 410:37-40.

Cobb, M., and E. Goldsmith. 2000. Dimerization in MAP-kinase signaling. Trends Biochem. Sci. 25:7-9.

Garrington, T., and G. Johnson. 1999. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. Curr. Opin. Cell Biol. 11:211-218.

Kerkhoff, E., and U. Rapp. 2001. The Ras-Raf relationship: an unfinished puzzle. Adv. Enz. Regul. 41:261-267.

Martin-Blanco, E. 2000. p38 MAPK signalling cascades: ancient roles and new functions. Bioessays 22:637-645.

Tzivion, G., and J. Avruch. 2002. 14-3-3 protems: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. J. Biol. Chem. 277:3061-3064.

Widmann, C., S. Gibson, M. Jarpe, and G. Johnson. 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. Physiol. Rev. 79:143-180.

Fosfoinosítidos como transductores de señales

Belham, C., S. Wu, and J. Avruch. 1999. Intracellular signalling: PDK1—a kmase at the hub of things. Curr. Biol. 9:R93-R96.

Cantley, L. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. Science 296:1655-1657.

Cantley, L., and B. Neel. 1999. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 96:4240-4245.

Chung, C., S. Funamoto, and R. Firtel. 2001. Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis. Trends Biochem. Sci. 26:557-566.

Toker, A., and A. Newton. 2000. Cellulat signaling: pivoting around PDK-I. Gll 103:185-188.

Wishart, M., and J. Dixon. 2002. PTEN and myotubularin phosphatases: from 3-phosphoinositide dephosphorylation to disease. Trends Cell. Biol. 12:579-584.

Vías que involucran la degradación de la proteína inducida por la señal

Brown, M., J. Ye, R. Rawson, and J. Goldstein. 2000. Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. Cell 100:391-398.

Esler, W., and M. Wolfe. 2001. A portrait of Alzheimer secretases—new features and familiar faces. Science 293:1449-1454.

Ghosh, S., and M. Karin. 2002. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. Cell 109 (suppl.): S81-S96.

Haass, C., and H. Steiner. 2002. Alzheimer disease g-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases. Trends Cell Biol. 12:556-561.

Karin, M., and Y. Ben-Neriah. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-|kappa|B activity. Ann. Rev. Immunol. 18:621-663.

Khush, R., and B. Lemaitre. 2000. Genes that fight infection: what the Drosophila genome says about animal immunity. Trends Genet. 16:442-449.

Silverman, N., and T. Maniatis. 2001. NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. Genes Devel. 15:2321-2342.

Sisodia, S., W. Annaert, S. Kim, and B. De Strooper. 2001. Gamma-secretase: never more enigmatic. Trends Neurosci. 24:S2-S6.

Weihofen, A., and B. Martoglio. 2003. Intramembrane-cleaving proteases. Trends Cell Biol. 13:71-78.

Modulación negativa de receptores de señalización

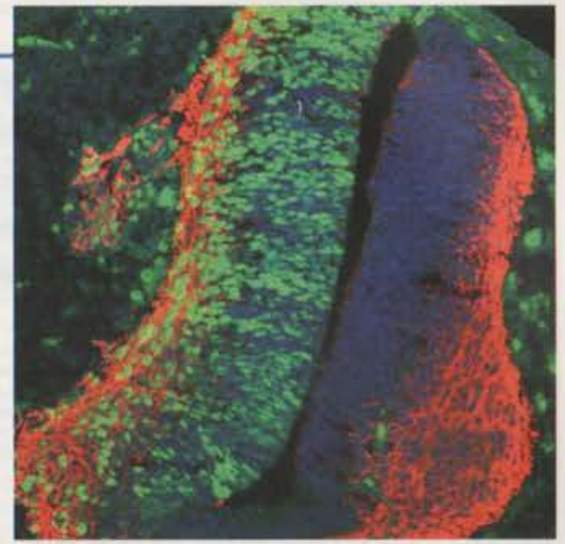
Lauffenburger, D., E. Fallon, and J. Haugh. 1998. Scratching the (cell) surface: cytokine engineering for improved ligand/receptor trafficking dynamics. Chem. Biol. 5:R257-R263.

Theill, L., W. Boyle, and J. Penninger. 2002. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. Ann. Rev. Immunol. 20:795-823.

Waterman, H., and Y. Yarden. 2001. Molecular mechanisms underlying endocytosis and sorting of ErbB receptor tyrosine kinases. FEBS Lett. 490:142-152.

15

INTEGRACIÓN DE SEÑALES Y CONTROLES GÉNICOS



Las células en división (azul) en el médula espinal en desarrollo se diferenciarán en neuronas (rojo). Las células que fueron diseñadas para formar una señal de inhibición de la diferenciación (verde) causan la división celular persistente y reducen el número de neuronas diferenciadas en el lado izquierdo. (Sean G. Megason y Andrew P. McMahon. Adaptado de Sean G. Megason and Andrew P. McMahon, 2002, *Development* 129:2087-2098.)

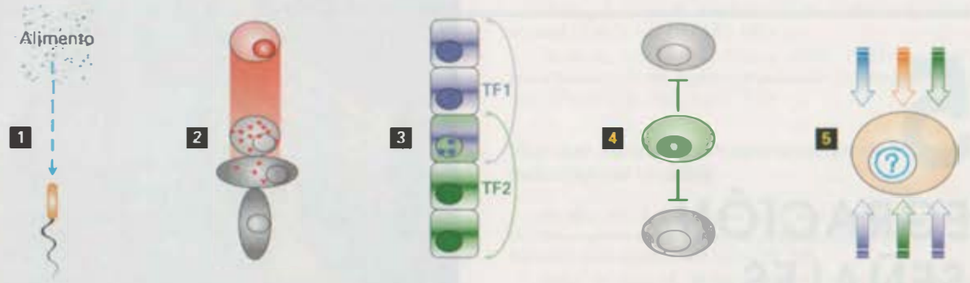
El potencial de formar una vasta diversidad de tipos celulares que llevan a cabo una inmensa variedad de tareas es inherente al genoma completo contenido en la mayoría de las células. Sin embargo, cada célula individual emplea sólo parte del repertorio genético completo de un organismo. Una composición de *señales* externas hormonales, metabólicas, del desarrollo y ambientales influye en qué gen usan las células en algún momento dado durante su vida. Las infecciones también pueden iniciar diversas respuestas. La respuesta de una célula a una señal externa depende en gran medida de sus propiedades que incluyen 1) la existencia, las localizaciones y las asociaciones de sus proteínas con otras moléculas; 2) su forma y adhesión a otras células; y 3) la estructura de su cromatina que facilita o bloquea el acceso a genes particulares. Podemos pensar en estas propiedades como la "memoria" de una célula, determinada por sus antecedentes y respuesta a las señales anteriores. Así, por ejemplo, una célula puede responder sólo a una señal si posee un receptor para esa señal. Además, una célula recibe de manera típica más de una señal en un momento: por ejemplo, una combinación de factor de crecimiento transformador β (TGFβ) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), una señal hormonal que se interpreta a la luz de la temperatura ambiente o un pulso eléctrico que se modula por condiciones iónicas locales. La respuesta a cada señal o condición a menudo está influida por otra. Esta integración de señales puede prevenir las respuestas inadecuadas y permitir respuestas con más matices a señales múltiples.

Para comprender la respuesta de una célula a una o más señales y el efecto de su memoria en esta respuesta, es útil controlar los cambios en la expresión de todos los genes y los cambios en las localizaciones de orgánulos, proteínas u otras moléculas. Los cambios inducidos por la señal en el ambiente iónico intracelular, el potencial de membrana y la forma celular también pueden ser importantes en la respuesta de una célula. Dos limitaciones formales dificultaron los esfuerzos para obtener una visión global de la naturaleza de las respuestas celulares a las señales externas. Primero, de manera habitual sólo se controla con facilidad uno o algunos pocos aspectos de la respuesta de una célula a una señal; segundo, la determinación de las respuestas en las células vivas en "tiempo real" plantea muchas dificultades técnicas. Los adelantos tecnológicos están comenzando a resolver estos problemas, aunque ninguno ha sido superado por completo.

El interrogante principal planteado en este capítulo es cómo una célula integra las señales múltiples y responde en el contexto de su memoria, sobre todo en el curso del desarrollo

CONTENIDO

15.1 Enfoques experimentales para formar una visión integral de las respuestas inducidas por señales
15.2 Respuestas de las células frente a influencias ambientales
15.3 Control de los destinos celulares por cantidades graduadas de reguladores
15.4 Creación de límites por combinaciones diferentes de los factores de transcripción
15.5 Creación de límites por señales extracelulares
15.6 Inducción recíproca e inhibición lateral
15.7 Integración y control de las señales



▲ Fig. 15-1. Sistemas de señalización y respuestas celulares. Las células son detectoras alertas exuberantes para percibir e interpretar la información a fin de adaptarse al ambiente (1) y coordinar las actividades con las células circundantes. Una célula puede responder a las señales cambiando los genes que transcribe, lo cual altera la superficie celular, modifica las proteínas y las actividades enzimáticas, moviliza los materiales entre los compartimientos, renueva su citoesqueleto, migra o muere. Las herramientas principales abarcan un número moderado de sistemas de señalización. Cada sistema se utiliza de manera repetida en los organismos diferentes, en los tejidos diferentes y en los momentos diferentes. Las señales son cruciales en la formación de organismos multicelulares en que los tipos celulares distintos son creados mediante la transmisión de la señal y la recepción controlada. Las células pueden transformarse en otras células, según la magnitud de la señal (2), con una señal mayor se da lugar a un destino celular y con una menor a otro. Entre células de tipos diferentes se forman nuevos límites, que crean tejidos y demarcaciones dentro de los tejidos. Los tipos celulares diferentes son creados por combinaciones de factores de la transcripción (3). Las señales inhibitorias emitidas por las células que sufren un paso de diferenciación pueden impedir que las células cercanas tomen la misma decisión (4), así evitan la duplicación de estructuras. Las células, por lo general, integran diversas señales para decidir cómo proceder (5).

y la diferenciación celular (fig. 15-1). Comenzamos con el estudio de varias técnicas que empiezan a proporcionar una visión global de las respuestas inducidas por señales. En particular, describimos el modo en que la determinación de los patrones de transcripción del genoma completo es una fuente de nuevas visiones en las respuestas a las señales. Luego consideramos las respuestas celulares a ciertas alteraciones ambientales en la sección 15.2. La sección siguiente introduce el concepto de reguladores graduados que causan respuestas celulares diferentes, de acuerdo con su concentración. Este tipo de sistema permite que las células a distancias diferentes de la fuente de una molécula reguladora se conviertan en tipos celulares diferentes. Examinamos el modo por el cual esta regulación crea límites dentro de un epitelio en el desarrollo temprano de *Drosophila*, con las células de una parte del borde que siguen una vía de diferenciación y las del otro lado que siguen otra vía. La creación de otros límites por los activadores transcripcionales graduados y las señales extracelulares graduadas se describen en las secciones 15.4 y 15.5, respectivamente. Cuando se forman los límites, las células refuerzan sus decisiones mediante la señalización a través de los bordes de modo que forman estructuras adyacentes compatibles. Como se ilustra por los ejemplos de la sección 15.6, esta señalización puede estimular o inhibir cambios del desarrollo particulares en las células adyacentes. En la última sección, brindamos un conocimiento más íntimo del modo en que las señales se integran y controlan en las células diferentes.

Si bien la cantidad de vías de señalización encontradas en este capítulo y otros puede parecer agobiante, en realidad hay una cantidad relativamente pequeña de vías separadas para la transducción de las señales externas. Las principales entre ellas son las vías de transducción de la señal intracelular activadas por diversas clases de receptores enumerados en el cuadro 14-1. Además, las adhesiones intercelulares y las de la célula-matriz mediadas por cadherinas e integrinas pueden iniciar las vías de señalización intracelular (cap. 6). La complejidad informativa necesaria para crear muchos tipos celulares y las propiedades de las células provienen de la combinación de señales. La dilucidación de los principios y mecanismos subyacentes importantes para todas las vías de señalización constituye la base para la comprensión de cómo las células integran las señales a fin de lograr una identidad particular u otra respuesta.

15.1 Enfoques experimentales para formar una visión integral de las respuestas inducidas por señales

Varios adelantos técnicos están ayudando a los investigadores a discernir la totalidad de la respuesta celular a las señales. Quizás el más significativo sea la secuenciación de los genomas completos de diversos organismos y los análisis ulteriores para identificar genes individuales y analizar sus funciones. Los datos reunidos en estos proyectos del genoma han llevado al desarrollo de técnicas tendientes a monitorizar los efectos de una señal en la expresión del conjunto génico completo. Mediante el empleo de métodos de inactivación génica descritos

en el capítulo 9, los investigadores pueden mutar genes específicos que codifican varios componentes de las vías de señalización. Los efectos fenotípicos de estas mutaciones a menudo proporcionan indicios sobre las funciones de componentes de la vía y el orden en que ellos funcionan. En la actualidad es posible realizar estudios in vitro de la señalización en diversos tipos celulares diferenciados e incluso tejidos complejos debido a las mejoras recientes en los métodos de cultivo de células y tejidos. Ciertas respuestas inducidas por la señal pueden supervisarse en las células vivas con el uso de diversos agentes fluorescentes y la observación de las células con un microscopio de fluorescencia. Por ejemplo, esta técnica puede revelar los cambios en las cantidades y localización de proteínas específicas, así como las variaciones en las concentraciones de H^+ o Ca^{2+} en el citosol (véanse figs. 5-46 y 5-47). El desarrollo adicional de colorantes indicadores fluorescentes permitirá la monitorización de otras moléculas en las células vivas.

Los análisis genómicos muestran conservación evolutiva y proliferación de genes que codifican señales y reguladores

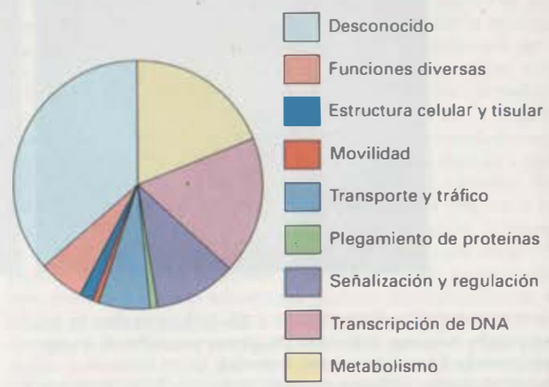
En el capítulo 9 consideramos la dificultad y ambigüedad para identificar los genes dentro de las secuencias genómicas, sobre todo en los organismos superiores. A pesar de las limitaciones, los análisis genómicos han sido fuentes de conocimientos fascinantes y a veces sorprendentes o han confirmado conclusiones más tempranas basadas en los resultados de otros tipos de estudios.

Primero, el número total de genes que codifican proteínas no se correlaciona de una manera simple con las concepciones estándares de la complejidad animal (véase fig. 9-34). Por ejemplo, los seres humanos sólo tienen alrededor de 1,75 veces más genes que el nematodo intestinal *Caenorhabditis elegans*. Asimismo, *C. elegans* tiene cerca de 1,4 veces los genes que presenta la mosca de la fruta *Drosophila*, que exhibe un esquema corporal y un comportamiento mucho más complejos.

Segundo, las comparaciones genómicas apoyan la conclusión basada en dos décadas de investigación sobre el desarrollo genético de que muchos genes reguladores, cuyas proteínas codificadas controlan la diferenciación tisular, la organogénesis y el esquema corporal, se han conservado durante cientos de millones de años. Por ejemplo, el gen *Pax6* se emplea en el desarrollo del ojo en organismos muy diversos, como las almejas, las moscas y los seres humanos, y el gen *tinman* es necesario para el desarrollo del corazón en las moscas y en los seres humanos. Como se menciona en la sección 15.4, el grupo del gen *Hox* controla la organización cefalocaudal del cuerpo en casi todos los animales examinados hasta la fecha. Debido a la conservación de los genes y las proteínas, los resultados de experimentos en un organismo son guías útiles para la investigación en otros organismos. De hecho, gran parte de la biología humana y la medicina ha sido construida y continúa basándose en el conocimiento adquirido a partir de un amplio espectro de sistemas experimentales.

Tercero, a pesar de que existen considerables similitudes de genes y proteínas entre los animales diferentes, los análisis genómicos sugieren que alrededor del 30% de los genes de cada organismo animal son únicos para ese animal. Los invertebrados *Drosophila* y *C. elegans* tienen en común ciertos genes que no son reconocibles en ninguno de los otros genomas analizados hasta la fecha. Se cree que las moscas y los nematodos tienen un antepasado común que se originó de un ancestro aún más antiguo en común con los vertebrados. Si este punto de vista es correcto, podría esperarse que cualquier gen presente en las moscas y en los seres humanos estuviera también en los gusanos; asimismo, cualquier gen común a los gusanos y los seres humanos podría tal vez estar en las moscas. Como era de esperar, una investigación reciente reveló que las tres especies tienen alrededor de 1.500 genes en común (fig. 15-2). Sin embargo, contrariamente a las expectativas, alrededor de 1.250 genes comunes a los seres humanos y las moscas no se encuentran en los gusanos y cerca de 500 genes comunes a los seres humanos y los gusanos no se encuentran en las moscas. Por lo tanto, en la evolución de *C. elegans* y *Drosophila* posterior al momento en que divergieron los linajes invertebrado y vertebrado se produjo la pérdida de genes específicos del organismo.

Cuarto, como se mencionó en los capítulos precedentes, la duplicación de ciertos genes que codifican proteínas y la divergencia posterior en el curso de la evolución ha dado lugar a familias de genes. Los miembros de una familia génica y la familia de proteínas correspondiente tienen secuencias muy similares, pero no idénticas. El análisis genómico y los hallazgos de otros estudios muestran que la cantidad de miembros en una familia particular de proteínas varía en las especies diferentes. Por ejemplo, la *familia de factores transformadores del crecimiento β* de las proteínas de señalización segregadas tiene 28 miembros en los seres humanos, pero sólo 6 en las moscas y 4 en los gusanos. Las semaforinas, que son las señales para el desarrollo neural, forman una familia de 22 integrantes en los seres humanos; las moscas tienen 6 y los gusanos poseen 2. Esta proliferación de genes podría dar origen a proteínas de señalización que pueden movilizarse a distancias diferentes a través del tejido o pueden diferir en otras propiedades. De manera alternativa, los miembros de una familia génica pueden estar regulados en forma diferente, lo que permite producir proteínas bastante similares en tiempos y lugares distintos. Ambos tipos de variación existen y las dos permiten una cantidad moderada de tipos de señales para cubrir múltiples propósitos.



▲ Fig. 15-2. Conservación evolutiva del proceso central en los genomas de seres humanos, mosca de la fruta (*Drosophila*) y nematodo (*C. elegans*). Sobre la base de criterios bastante estrictos para la similitud de las proteínas, los seres humanos, las moscas y los gusanos tienen en común cerca de 1.500 genes distribuidos entre las clases funcionales mostradas en esta figura. Alrededor del 28% de este conjunto de genes comunes codifica proteínas que actúan en la señalización y el control génico. Se desconocen las funciones moleculares de cerca de un tercio de los genes y proteínas comunes para estas especies. (Adaptado de J. C. Venter et al., 2001, *Science* 291:1304.)

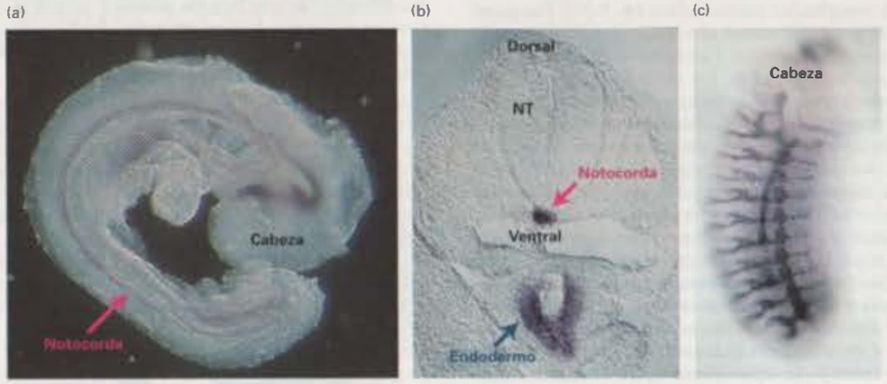
La hibridación in situ puede detectar cambios en la transcripción en tejidos intactos y embriones permeabilizados

Un efecto común de señales externas es alterar el patrón de expresión génica por una célula. Los cambios inducidos por la señal en la expresión de genes particulares suelen monitorizarse mediante la medición de los mRNA o proteínas correspondientes en presencia y ausencia de una señal. Puede extraerse el mRNA celular total, ser separado por electroforesis en gel y sujeto a inmunotransferencia por Northern blot, que detecta mRNA individuales por hibridación con sondas de DNA complementarias marcadas (véase fig. 9-26). Asimismo, las proteínas celulares pueden ser extraídas, separadas por métodos electroforéticos y sujetas a inmunotransferencia por Western blot, un procedimiento en el cual las proteínas individuales separadas en la inmunotransferencia son detectadas con anticuerpos específicos (véase fig. 3-35). Estos métodos de inmunotransferencia, por lo general, no son lo bastante sensibles como para determinar cambios dentro de una célula individual. Sin embargo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede amplificar un mRNA específico de una célula individual de modo que se torna detectable (véase fig. 9-24).

Tanto la inmunotransferencia por Northern blot como la amplificación por PCR requieren la extracción del mRNA de una célula o mezcla de células, lo cual significa que las células son eliminadas de su localización normal dentro de un organismo o tejido. Como consecuencia, se pierde la localización de una célula y su relación con sus vecinos. Para conservar esta información posicional, un tejido entero o cortes de él o incluso un embrión permeabilizado completo puede ser sujeto a métodos de hibridación in situ para detectar el mRNA codificado por un gen particular (fig. 15-3). Esta técnica permite monitorizar la transcripción génica en tiempo y espacio. La inmunohistoquímica, la técnica relacionada de tinción de tejidos con anticuerpos marcados con fluorescencia dirigidos contra una proteína particular, proporciona información similar para las proteínas, una ventaja importante para obtener ideas acerca de la función proteica provenientes de su localización subcelular (véanse figs. 5-33 y 5-45).

El análisis de las micromatrices de DNA (*microarrays*) puede evaluar la expresión de genes múltiples en forma simultánea

Una limitación importante en las técnicas de hibridación in situ y de inmunotransferencia es que el mRNA o el producto proteico de sólo unos pocos genes pueden examinarse en un ensayo. Por lo tanto, la monitorización de la actividad de muchos genes por estos métodos requiere ensayos múltiples. Por el contrario, los investigadores pueden monitorizar la expresión de miles de genes de una vez con las micromatrices de DNA (denominadas también microordenamientos, microarreglos o biochips) (véase fig. 9-35). En esta técnica, se forman cDNA marcados con un colorante fluorescente a partir del mRNA total extraído de las células en estudio. Luego, los cDNA marcados son hibridados en un portaobjetos con manchas (*spots*) de DNA.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 15-3 En la hibridación in situ se puede detectar actividad de genes específicos en los embriones completos y seccionados. La muestra es permeabilizada mediante el tratamiento con detergente y una proteasa para exponer el mRNA a la sonda. Se hace una sonda de DNA o RNA, específica para el mRNA de interés, con análogos de nucleótidos que contienen grupos químicos pasibles de ser reconocidos por los anticuerpos. Después de incubar la muestra permeabilizada con la sonda en condiciones que favorecen la hibridación, el exceso de la sonda se elimina mediante una serie de lavados. La muestra se incuba entonces en una solución que contiene un anticuerpo que se une a la sonda. Este anticuerpo está unido en forma covalente con una enzima indicadora (p. ej., peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) que produce un producto coloreado en la reacción. Después de eliminar el exceso de anticuerpo, se agrega el sustrato para la enzima indicadora. En el sitio donde la sonda forma un híbrido con el mRNA por ser detectado se observa un precipitado coloreado. (a) Un embrión de ratón completo de alrededor de 10 días de desarrollo con una sonda para mRNA *Sonic hedgehog*. La coloración marca la notocorda (flecha roja), una vara de mesodermo que corre a lo largo de la médula espinal futura. (b) Corte de embrión de ratón similar al de la parte (a). Puede observarse el eje dorsal/ventral del tubo neural (TN), con la notocorda que expresa *Sonic hedgehog* (flecha roja) debajo de él y el endodermo (flecha azul) todavía más alejado en el sentido ventral. (c) Un embrión de *Drosophila* completo con una sonda para mRNA producido durante el desarrollo de la tráquea. Se observa el patrón de repetición de los segmentos del cuerpo. Anterior (cabeza) está en la parte superior; ventral está a la izquierda. (Gentileza de L. Milenkovic y M. P. Scott.)

Cada mancha contiene una secuencia singular proveniente de un gen particular y cientos de miles de genes pueden estar representados en un portaobjetos estándar. La fluorescencia de las manchas que forman híbridos con una especie del cDNA se determina mediante un instrumento que examina el portaobjetos. Las manchas fluorescentes representan genes activos, que fueron transcriptos en sus mRNA (véase fig. 1-23).

Los experimentos de micromatrices se utilizan con frecuencia para comparar los mRNA producidos por dos poblaciones diferentes de células: por ejemplo, dos tipos de células distintos, el mismo tipo celular antes y después de algún tratamiento o células mutantes y normales. Un ejemplo de un descubrimiento basado en micromatrices proviene de los resultados de estudios de fibroblastos cultivados que se sabe desde hace mucho que inician la división celular cuando se agrega al medio suero que contiene los factores de crecimiento. El análisis de micromatrices de expresión génica en momentos diferentes después del tratamiento de los fibroblastos con el suero mostró que la transcripción de cerca de 500 de los 8.613 genes examinados cambió de manera sustancial con el tiempo (véase fig. 9-36). En el transcurso de 15 minutos se detectaron cambios transcripcionales, con genes codificadores de proteínas que controlan la progresión a través del ciclo celular que primero se torna activo. Más tarde, se activan los genes que codifican las proteínas que participan en la curación de una herida, como factores de la coagulación y quimiotácticos para las células del sistema inmune. La producción de estas proteínas sugiere que la proliferación de fibroblastos es estimulada por el suero para participar en la curación de una herida, algo que no había sido conocido. Con una visión retrospectiva, tiene sentido porque el tiempo durante el cual los fibroblastos están expuestos al suero en un organismo intacto es cuando hay una herida. Los resultados muestran la utilidad de las micromatrices para revelar las respuestas celulares inesperadas.

El período de desarrollo de la transcripción génica fue evaluado con micromatrices de DNA para el nematodo *C. elegans* y la mosca *Drosophila*. En experimentos recientes, se utilizaron micromatrices que representan alrededor del 94% de los genes de *C. elegans* para monitorizar la transcripción en los pasos diferentes del desarrollo y en ambos sexos. Los resultados mostraron que la expresión de alrededor del 58% de los genes monitorizados cambió más del doble durante el desarrollo y otro 12% se transcribe en patrones específicos del sexo. Los hallazgos de un estudio similar que evalúa alrededor de un tercio de todos los genes de *Drosophila* mostraron que la transcripción de más del 90% de ellos cambió al doble o más durante el desarrollo y que la mayoría de los genes se utilizan en forma repetida durante el desarrollo (fig. 15-5). Estos resultados muestran con claridad que el desarrollo está marcado por cambios extensos en la transcripción, con pocos genes que exhiben un patrón monótono de una transcripción sin cambios.

MEDICINA

En el futuro, el análisis de las micromatrices será una herramienta diagnóstica poderosa en medicina. Por ejemplo, se encontraron conjuntos particulares de mRNA para distinguir los tumores con mal pronóstico de los que tienen un pronóstico bueno (cap. 23). En la actualidad pueden diferenciarse variaciones mórbidas antes indistinguibles. El análisis de biopsias de tumores para estos mRNA distintivos ayudará a los médicos a seleccionar el tratamiento más adecuado. A medida que se reconozcan más patrones de expresión génica característicos de varios tejidos enfermos, el uso diagnóstico de micromatrices de DNA se extenderá a otros trastornos. ▮

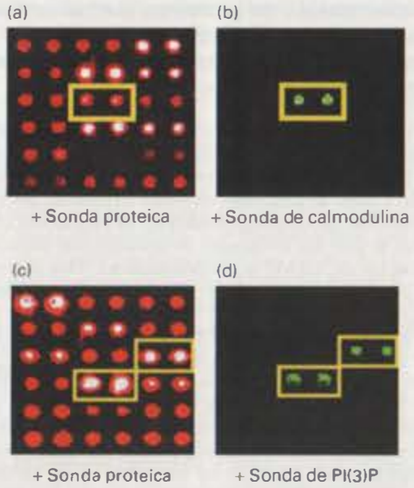
Las micromatrices de proteínas son herramientas promisorias para monitorizar las respuestas celulares que incluyen cambios en los patrones de fijación a las proteínas

La respuesta de una célula a las señales puede incluir no sólo cambios en la expresión del gen, sino también alteraciones en las modificaciones de proteínas y las asociaciones entre ellas. Como se describió en otros capítulos, las actividades de muchas proteínas dependen de su asociación con otras proteínas o con las moléculas de señalización intracelulares pequeñas (p. ej., cAMP o fosfoinosítidos). Dos ejemplos comunes son la activación de la adenililciclasa por interacción con $G_{s\alpha}$·GTP (véase fig. 13-11) y la activación de la proteincinasa A por fijación del cAMP (véase fig. 3-27). La actividad de algunos reguladores transcripcionales (p. ej., CREB) también depende de su asociación con otra proteína (véase fig. 13-32). Los resultados de estudios sistemáticos comienzan a revelar asociaciones proteína-proteína que son fundamentales para el funcionamiento celular y el modo por el que estas asociaciones cambian en respuesta a las señales. Por ejemplo, los científicos han producido cantidades grandes de 5.800 proteínas de las levaduras (40% de las proteínas totales) mediante clonación en vectores de alta expresión en levaduras y purificación de las proteínas individuales. En una técnica análoga a las micromatrices de DNA, muestras pequeñas de las proteínas purificadas de levadura pueden ser colocadas en forma de manchas sobre portaobjetos para producir una micromatriz de proteína, también denominada matriz de proteoma (*proteome chip*).

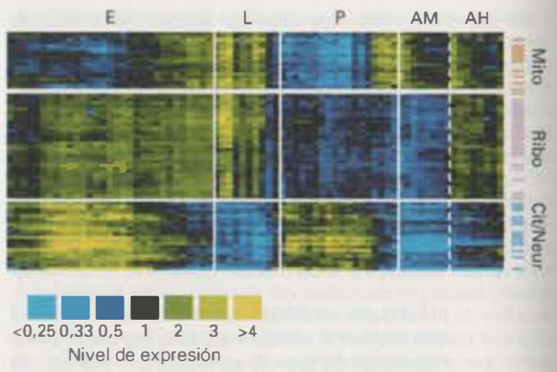
Para probar la eficacia de la evaluación de asociaciones proteína-proteína en estas matrices, los investigadores expusieron las micromatrices de proteínas de levadura a calmodulina marcada con biotina, una proteína que fija calcio. Después de eliminar el exceso de calmodulina de la micromatriz, la fijación de calmodulina a las proteínas en la matriz se detectó con un reactivo fluorescente específico para la biotina (fig. 15-4). Este experimento tuvo éxito para detectar seis proteínas ya conocidas para unirse a la calmodulina. Otras seis proteínas que se conoce se fijan a la calmodulina no pudieron detectarse, dos porque no fueron incluidas en la serie y cuatro que pueden haber sido producidas en cantidades no detectables. En principio, otras podrían perderse debido a que las proteínas se asocian sólo como parte de un complejo de más de dos proteínas o porque la proteína está pegada a la matriz en la conformación errónea para la fijación. A pesar de estos problemas posibles, también se detectaron otras 33 proteínas de levaduras fijadas a calmodulina no reconocidas con anterioridad. Las secuencias génicas correspondientes a las 39 proteínas de fijación a la calmodulina detectadas indican que 14 de estas proteínas tienen un motivo común que puede formar la superficie de fijación. Los resultados de estos experimentos muestran que las matrices proteicas serán una herramienta útil, si no completamente globales y exactas, para monitorizar asociaciones de proteínas como indicadores de respuestas celulares.

Inactivación génica sistemática mediante RNA de interferencia

Los cambios en la transcripción en las diversas etapas del desarrollo proporcionan un criterio para identificar los genes que desempeñan un papel crítico en la regulación y diferen-



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 15-4 El análisis de proteínas por micromatrices (*microarrays*) puede revelar interacciones proteína-proteína y proteína-lípido. La clonación de alto nivel de expresión fue utilizada para producir 5.800 proteínas de levaduras que fueron purificadas y luego sembradas por duplicado sobre portaobjetos. En el área de un portaobjeto estándar pueden detectarse unas 13.000 muestras de proteínas. Se preparó una sonda mediante la unión covalente de biotina a calmodulina o trifosfato de fosfatidilinositol (IP_3). Las matrices de proteoma de levaduras se incubaron con la sonda biotinilada y luego se eliminó por lavado el exceso de la sonda. La calmodulina o el IP_3 fijado a las proteínas en la micromatriz se detectó con estraptividina marcada con fluorescencia, una proteína bacteriana que se une de manera firme y específica a la biotina. (a) Una parte de una matriz de proteoma fue probada para revelar la localización y las cantidades aproximadas de todas las proteínas, las cuales están sembradas en columnas duplicadas. (b) La misma preparación probada con calmodulina biotinilada. Las dos señales verdes corresponden a una proteína con fijación a la calmodulina que se observan por duplicado. (c) Un campo diferente de manchas (spots) de proteína. (d) IP_3 se fija a dos de las proteínas en (c), cada uno por duplicado. (Gentileza de Paul Bertone, Yale University.)



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 15-5 El análisis de grupos de micromatrices de DNA detecta cambios globales en la transcripción en el desarrollo de *Drosophila*. El ciclo de vida fue dividido en alrededor de 70 períodos desde los embriones tempranos a los adultos viejos. El mRNA se extrajo de los animales en cada período, convertido en cDNA marcado con fluorescencia e hibridado para micromatrices que representan cerca de 5.000 genes. El análisis computarizado de los datos de las micromatrices originales agrupó genes que muestran cambios similares en la expresión en relación con una muestra de referencia estándar. (Véase fig. 9-35 para el protocolo general de experimentos de micromatrices de DNA.) Los tres paneles representan sólo una fracción pequeña de los genes en las micromatrices. Cada una de las filas muy estrechas en un panel representa un gen diferente. Los períodos generales están marcados como E (embriogénesis), L (larva), P (pupa) y A (adulto, macho o hembra). Cada línea vertical representa uno de los 70 períodos del desarrollo. Amarillo indica un aumento en la transcripción en comparación con la muestra de referencia; azul, una disminución en la expresión; y negro, ningún cambio significativo en la expresión. Los genes forman "grupos" por los aumentos y disminuciones similares en las cantidades de RNA durante el desarrollo. Los grupos suelen revelar genes involucrados en procesos similares. Los tres grupos aquí corresponden a los genes que codifican proteínas mitocondriales (*parte superior*), los genes para proteínas ribosómicas (*parte media*) y los genes involucrados en el citoesqueleto y el desarrollo neural (*parte inferior*). La agrupación de un gen de función desconocida con alguno de función conocida proporciona una hipótesis sobre la función del primero. (Adaptado de M. Arbeitman et al., 2002, *Science* 297:2270.)

ciación celular. Sin embargo, un criterio más importante es el fenotipo de células o animales que carecen del gen. El conocimiento de las funciones de los genes y de las relaciones entre ellos durante el desarrollo puede obtenerse mediante la eliminación sistemática de la función de cada gen que normalmente se expresa en un tejido, uno por vez y se observa cuál es el resultado erróneo. En teoría, este procedimiento es ahora posible en *C. elegans*, que tiene una sensibilidad particular al RNA de interferencia (RNAi). En esta técnica, la provisión de RNA bicatenario a los gusanos por inyección, alimentación o inmersión conduce a la destrucción del mRNA endógeno correspondiente (véase fig. 9-43). El fenotipo de los gusanos que se desarrolla a partir de los embriones tratados con RNAi suele ser similar al que resultaría de la inactivación del propio gen correspondiente. En los estudios iniciales con *C. elegans*, la interferencia por RNA con 16.700 genes (alrededor del 86% del genoma) brindó 1.722 fenotipos con anormalidades visibles. Los genes cuya inactivación funcional causa fenotipos anormales particulares pueden agruparse en conjuntos; se presume que cada miembro de un conjunto controla las mismas señales o acontecimientos. Las relaciones reguladoras entre los genes del conjunto, por ejemplo, los genes que controlan el desarrollo muscular pueden entonces funcionar.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 15.1

Enfoques experimentales para formar una visión integral de las respuestas inducidas por señales

- Alrededor de un tercio de los genes en los seres humanos, en las moscas (*Drosophila*) y los nematodos intestinales (*C. elegans*) es único para cada animal.
- La presencia y distribución de mRNA y proteínas específicas pueden detectarse en las células vivas por hibridación y tinciones inmunohistoquímicas.
- El análisis de micromatrices de DNA permite examinar el complemento total de genes para ser examinados por cambios transcripcionales que se producen en respuesta a cambios ambientales o señales extracelulares y en el desarrollo (véase fig. 15-5).
- Las micromatrices de proteína demostraron ser útiles para detectar y monitorizar los cambios en las asociaciones proteína-proteína (véase fig. 15-4).
- La función de un gen que se encuentra que es activado en ciertas condiciones puede probarse mediante su inactivación y la observación del fenotipo resultante.
- Las señales, las alteraciones en las condiciones ambientales o la infección suelen no evocar una respuesta individual por las células sino cambios múltiples en el patrón de transcripción del gen, modificaciones de las proteínas y asociaciones entre las proteínas. Mediante la monitorización de la totalidad de estas respuestas individuales, los investigadores están desarrollando puntos de vista globales acerca de cómo y por qué responden las células.

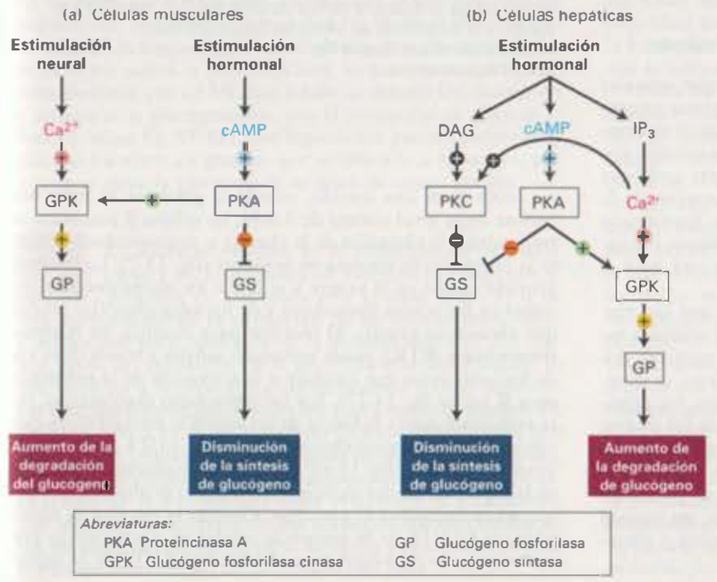
15.2 Respuestas de las células frente a influencias ambientales

Gran parte de este capítulo se refiere a las vías de señalización que controlan el modo en que las células cambian en el curso del desarrollo. Las células maduras de algunos tejidos (p. ej., sangre y piel) tienen un período de vida relativamente corto en comparación con el de otros tipos de células y sufren un reemplazo constante por la diferenciación y proliferación de las células madre *(stem cells)* (cap. 22). En cierto sentido, estos tejidos nunca detienen el desarrollo. Las células maduras de otros tejidos, como el cerebro, tienen una vida más prolongada; después de que estos tejidos alcanzan la maduración, hay poca diferenciación adicional. Sin embargo, las células maduras en todos los tejidos cambian de manera constante en respuesta a las demandas metabólicas o del comportamiento, así como frente a lesiones o infección. En esta sección, consideramos varias maneras por las cuales las células responden a las variaciones en la demanda para dos sustratos ambientales –glucosa y oxígeno– o en sus niveles.

La integración de múltiples segundos mensajeros regula la glucogenólisis

Una manera para que las células respondan de modo adecuado a las condiciones fisiológicas actuales es darse cuenta e integrar más de una señal. Un buen ejemplo proviene de la glucogenólisis, la hidrólisis del glucógeno para dar glucosa-1-fosfato. En el capítulo 13 vimos que una elevación del cAMP inducido por la estimulación con adrenalina de los receptores β-adrenérgicos promueve la degradación del glucógeno en las células musculares y en los hepatocitos (véase fig. 13-17). En ambos tipos celulares, otros segundos mensajeros también producen la misma respuesta celular.

En las células musculares, la estimulación por impulsos nerviosos produce la liberación de iones Ca^{2+} desde el reticulo sarcoplasmático y un aumento de la concentración del Ca^{2+} citosólico que activa la contracción muscular. La elevación del Ca^{2+} citosólico también activa la *glucógeno fosforilasa cinasa (GPK)*, que al estimular la degradación de glucógeno a glucosa-1-fosfato proporciona el nutriente para la contracción prolongada. Cabe recordar que la fosforilación por la proteincinasa A dependiente de cAMP también activa la glucógeno fosforilasa cinasa. Así, esta enzima reguladora importante en la glucogenólisis está sujeta a la regulación neural y hormonal en el músculo (fig. 15-6a).



◀ Fig. 15-6. Regulación integrada de la glucogenólisis mediada por varios segundos mensajeros. (a) La estimulación neuronal de las células del músculo estriado o la fijación de adrenalina a los receptores β-adrenérgicos en sus superficies conduce al aumento de las concentraciones citosólicas de los segundos mensajeros Ca^{2+} o cAMP, respectivamente. La enzima reguladora fundamental, glucógeno fosforilasa cinasa (GPK) es activada por iones Ca^{2+} y por una proteincinasa A dependiente de cAMP (PKA). (b) En las células hepáticas, la estimulación de receptores β-adrenérgicos produce el aumento en las concentraciones citosólicas de cAMP y otros dos segundos mensajeros, diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). Las enzimas están marcadas por recuadros blancos. (+): activación de la actividad de la enzima, (-): inhibición.

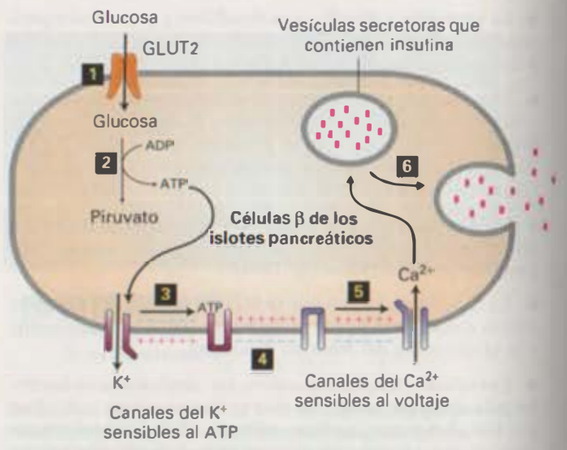
En los hepatocitos, la activación de fosfolipasa C inducida por hormonas también regula la degradación del glucógeno y la síntesis por las dos ramas de la vía de señalización de los lípidos del inositol. La fosfolipasa C genera dos segundos mensajeros, el diacilglicerol (DAG) y el inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3) (véase fig. 13-28). El DAG activa la proteincinasa C, que fosforila la glucógeno sintasa y, en consecuencia, fosforila la forma inactiva e inhibe la síntesis del glucógeno. El IP_3 induce un aumento del Ca^{2+} citosólico, que activa la glucógeno fosforilasa cinasa como en las células musculares y conduce a la degradación del glucógeno. En este caso, se activan múltiples vías de transducción de señales intracelulares por la misma señal (fig. 15-6b).

La regulación dual de la glucógeno fosforilasa cinasa es la consecuencia de su estructura con subunidades multiméricas $(\alpha\beta\gamma\delta)_4$. La subunidad γ es la proteína catalítica; las subunidades reguladoras α y β, con estructuras similares, son fosforiladas por la proteincinasa A; y la subunidad δ es la proteína calmodulina interruptora de la fijación al Ca^{2+}. La glucógeno fosforilasa cinasa alcanza su actividad máxima cuando los iones Ca^{2+} se fijan a la subunidad calmodulina y por lo menos la subunidad α es fosforilada. De hecho, la fijación de Ca^{2+} a la subunidad calmodulina puede ser esencial para la actividad enzimática de la glucógeno fosforilasa cinasa. La fosforilación de las subunidades α y β aumenta la afinidad por el Ca^{2+} de la subunidad calmodulina, lo cual posibilita que los iones Ca^{2+} se unan a la enzima en concentraciones submicromolares de Ca^{2+} encontradas en las células no estimuladas por los nervios. Así, los aumentos en la concentración citosólica del Ca^{2+} o del cAMP o de ambos inducen aumentos crecientes en la actividad de glucógeno fosforilasa cinasa. Como resultado del nivel elevado del Ca^{2+} citosólico después de la estimulación neuronal de células musculares, la glucógeno fosforilasa cinasa será activa aun cuando no está fosforilada; por lo tanto, el glucógeno puede ser hidrolizado como combustible continuo para la contracción muscular en ausencia de estimulación hormonal.

La insulina y el glucagón actúan juntos para mantener el nivel estable de la glucemia

En la regulación de la glucogenólisis, las señales neurales y hormonales regulan la misma enzima multimérica importante. Por el contrario, el mantenimiento de las concentraciones normales de glucosa en sangre depende del equilibrio entre dos hormonas que desencadenan respuestas celulares diferentes. Durante los períodos de estrés, el aumento de la glucogenólisis inducido por la adrenalina en los hepatocitos conduce a una elevación de la glucemia. Sin embargo, durante la vida diaria normal el nivel de la glucemia está bajo el control dinámico de la insulina y el glucagón.

Ambas son hormonas peptídicas producidas por las células dentro de los islotes de Langerhans, grupos celulares esparcidos por todo el páncreas. La insulina, que contiene dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro, es sintetizada por las células β de los islotes; el glucagón, un péptido monomérico, es producido por las células α de los islotes. La insulina *reduce* el nivel de la glucemia, mientras que el glucagón lo *aumenta*. La disponibilidad de glucosa para el metabolismo celular es regulada durante períodos de abundancia (luego de una comida) o escasez (luego de un ayuno) mediante el ajuste de las concentraciones de insulina y glucagón en sangre.



▲ Fig. 15-7. Secreción de insulina por las células β pancreáticas en respuesta a una elevación de la glucemia. El ingreso de glucosa en las células β está mediado por el transportador de glucosa GLUT2 (**1**). Debido a que la K_m para la glucosa de GLUT2 es ≈20 mM, una elevación en la glucosa extracelular de 5 mM, característica del estado de ayuno, causa un aumento proporcional en la tasa de ingreso de la glucosa (véase fig. 7-3). En consecuencia se acelera la conversión de glucosa a piruvato, lo que produce un aumento de la concentración de ATP en el citosol (**2**). La fijación de ATP a los canales del K^+ sensibles al ATP cierra estos canales (**3**) y en consecuencia reduce la salida de iones K^+ de la célula. La pequeña despolarización resultante de la membrana plasmática (**4**) activa la apertura de los canales del Ca^{2+} sensibles al voltaje (**5**). El ingreso del Ca^{2+} eleva la concentración citosólica de iones Ca^{2+}, activa la fusión de las vesículas secretorias que contienen insulina con la membrana plasmática y la secreción de insulina (**6**). Los pasos **5** y **6** son similares a los que tienen lugar en las terminaciones nerviosas donde una despolarización de la membrana inducida por la llegada de un potencial de acción causa la apertura de los canales del Ca^{2+} sensibles al voltaje y la exocitosis de vesículas que contienen neurotransmisores (véase fig. 7-43). (Adaptado de J.-Q. Henquin, 2000, *Diabetes* 49:1751.)

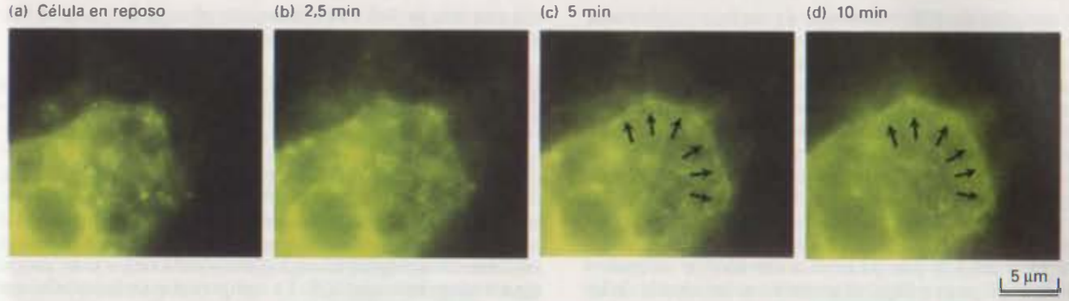
Después de una comida, cuando la glucemia se eleva por encima de su nivel normal de 5 mM, las células β pancreáticas responden a la elevación de la glucosa o aminoácidos mediante la liberación de insulina en la sangre (fig. 15-7). La insulina liberada circula en la sangre y se une a los receptores para insulina en las células musculares y en los adipocitos (las células que almacenan grasas). El receptor para insulina, un receptor tirosincinasa (RTK), puede transducir señales a través de la vía de fosfoinosítidos que conduce a la activación de la proteincinasa B (véase fig. 14-27). Por un mecanismo desconocido, esta proteína B activa la fusión de las vesículas intracelulares que contienen los transportadores de glucosa GLUT4 con la membrana plasmática (fig. 15-8). El aumento resultante de GLUT4 en la superficie celular incrementa el ingreso de glucosa, en consecuencia disminuye la glucemia. Cuando la insulina es eliminada, el GLUT4 de la superficie celular es internalizado por endocitosis, lo cual disminuye el nivel de GLUT4 de la superficie celular y así la entrada de la glucosa. La estimulación por insulina de las células musculares también promueve la unión de la glucosa y su conversión en glucógeno, y reduce la degradación de glucosa a piruvato. La insulina actúa además en los hepatocitos al inhibir la síntesis de glucosa a partir de moléculas más pequeñas, como lactato y acetato y aumentar la síntesis de glucógeno a partir de la glucosa. El efecto neto de todas estas acciones es disminuir la glucemia por debajo de la concentración en ayuno de alrededor de 5 mM.

Si la glucemia disminuye por debajo de alrededor de 5 mM, las células α pancreáticas comienzan a segregar glucagón. El receptor para glucagón, encontrado sobre todo en los hepatocitos, se acopla a la proteína G_s, como el receptor para adrenalina (cap. 13). La estimulación por glucagón de los hepatocitos activa la adenililciclasa, lo que conduce a la cascada mediada por cAMP que inhibe la síntesis del glucógeno y promueve la glucogenólisis, con la formación de glucosa-1-fosfato (véase fig. 15-6b). Los hepatocitos pueden convertir la glucosa-1-fosfato en glucosa que es liberada a la sangre, por lo que se eleva la glucemia de su nivel de ayuno normal.

MEDICINA

La *diabetes mellitus* es el resultado de una deficiencia en la cantidad de insulina liberada por el páncreas en respuesta a la glucosa (tipo 1) o de una disminución de la capacidad de las células musculares y adipocitos para responder a la insulina (tipo 2). En ambos tipos, la regulación de la glucemia está deteriorada, lo que conduce a la hiperglucemia persistente y otras numerosas complicaciones posibles en los pacientes no tratados. La diabetes tipo 1 es causada por un proceso autoinmune que destruye las células β productoras de insulina en el páncreas. También denominada diabetes dependiente de insulina, esta forma de la enfermedad suele responder al tratamiento con insulina. La mayoría de los norteamericanos con diabetes mellitus tiene tipo 2, pero la causa subyacente de esta forma de enfermedad no se comprende bien. ▮

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación técnica: Construcciones indicadoras



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 15-8 La estimulación por insulina de las células adiposas induce la translocación de GLUT4 desde las vesículas intracelulares a la membrana plasmática. En este experimento, las células adiposas fueron diseñadas para expresar una proteína quimérica cuyo N-terminal correspondía a la secuencia GLUT4, seguida por la integridad de la secuencia GFP. Cuando una célula es expuesta a la luz de longitud de onda excitante, GFP fluoresce verde amarillo, lo que indica la posición de GLUT4 dentro de la célula. En las células en reposo (a), la mayor parte de GLUT4 se localiza en las membranas internas que no están conectadas a la membrana plasmática. Las imágenes consecutivas de la misma célula después del tratamiento con insulina durante 2,5, 5 y 10 minutos muestra que, con el tiempo, cantidades crecientes de estas membranas que contienen GLUT4 se fusionan con la membrana plasmática, que en consecuencia moviliza el GLUT4 a la superficie celular (flechas) y le permite transportar la glucosa desde la sangre al interior de la célula. Las células musculares también contienen transportadores GLUT4 sensibles a la insulina. (Gentileza de J. Bogan.)

La falta de oxígeno induce un programa de respuestas celulares

En la glucogenólisis, la actividad de proteínas preexistentes era regulada por la integración de múltiples señales. Los organismos que requieren oxígeno responden a la falta de oxígeno, un estímulo individual, de maneras múltiples, algunas que se producen con rapidez y otras que insumen mucho más tiempo para desarrollarse. Además, durante el tiempo evolutivo, los animales que viven a altitudes elevadas (p. ej., llamas, guanacos, alpacas) se adaptan a niveles bajos de oxígeno. Estas adaptaciones implican cambios de un aminoácido individual en la cadena β-globina que aumenta la afinidad de la hemoglobina al oxígeno en estos animales en comparación con la hemoglobina de otros animales.

Entre las respuestas rápidas para niveles bajos de oxígeno (*hipoxia*) está la dilatación de los vasos sanguíneos, lo cual permite un aumento del flujo sanguíneo. Esta respuesta está regulada por el óxido nítrico, el GMP cíclico y la proteincinasa G (véase fig. 13-30). Un cambio rápido en el metabolismo, denominado efecto Pasteur, también sucede cuando a las células les falta el oxígeno adecuado. Esta respuesta, observada por primera vez en las levaduras, acelera el metabolismo anaerobio de la glucosa cuando se enlentece el metabolismo aerobio y la fosforilación oxidativa debido a la falta de oxígeno. La utilización de más hidratos de carbono compensa la reducción del ATP proveniente del metabolismo anaerobio. La fosfofructocinasa 1, la tercera enzima en la glucólisis, es inhibida por el ATP y estimulada por el AMP; de modo que, cuando la célula tiene poca energía, la glucólisis aumenta (véase fig. 8-12). El ajuste es rápido ya que no requiere la síntesis de nuevas moléculas.

Las respuestas de adaptación lenta para los niveles bajos de oxígeno en el organismo completo incluyen el aumento en la producción de eritrocitos, estimulado por la eritropoyetina producida en el riñón (véase fig. 14-7). La transcripción génica de la eritropoyetina está regulada sobre todo por el *factor inducido por la hipoxia 1 (HIF-1)*, un activador transcripcio-

nal. La cantidad de HIF-1 aumenta de manera espectacular cuando la presión parcial de oxígeno disminuye desde 35 mm Hg a cero, el rango típico de las variaciones normales. Aún no se conoce la naturaleza del sensor de oxígeno que causa la mayor expresión de HIF-1, pero requiere una proteína que tiene un sitio de fijación al oxígeno que contiene hemo algo similar a la hemoglobina. Además de regular el gen de eritropoyetina, HIF-1 activa de manera coordinada la transcripción de varios otros genes cuyas proteínas codificadas ayudan a las células para responder ante la hipoxia (fig. 15-9). Una de estas proteínas, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), es segregada por las células carentes de oxígeno y estimula la *angiogénesis* local, el crecimiento ramificado de los vasos sanguíneos. La expresión de VEGF no sólo requiere HIF-1 sino también un factor de transcripción Smad que es activado por una señal del TGFβ. Es probable que la capacidad de HIF-1 para controlar genes en tipos celulares diferentes sea consecuencia de este tipo de acción combinada.

Los resultados de estudios recientes revelaron que la degradación de HIF-1 es controlada por una prolilhidroxilasa sensible al oxígeno. HIF-1 es un dímero compuesto de dos subunidades, α y β. La subunidad β es abundante en el citosol en condiciones de niveles elevados o bajos de oxígeno pero, cuando el oxígeno es muy abundante, la subunidad α (HIFα) es ubicuitinada y degradada en los proteasomas (cap. 3). La ubicuitinación está estimulada por la proteína de von Hippel-Lindau (pVHL), que se fija a un "dominio de degradación" conservado de HIF-1α. A su vez, la fijación de pVHL está facilitada por la hidroxilación de una prolina en el sitio de fijación al pVHL en HIF-1α. La prolilhidroxilasa que cataliza esta reacción requiere hierro y alcanza su actividad máxima con niveles elevados de oxígeno, lo que conduce a la degradación de la subunidad α y a la falta de activación transcripcional por HIF-1. Con niveles bajos de oxígeno, cuando no se produce la hidroxilación, se forma HIF-1 dimérico activo y se transloca al núcleo. La *vía de respuesta a la hipoxia* mediada por HIF-1 y su regulación por pVHL se conservaron durante más de 500.000 millones de años, dado que es el mismo en los mamíferos, los gusanos y los insectos.

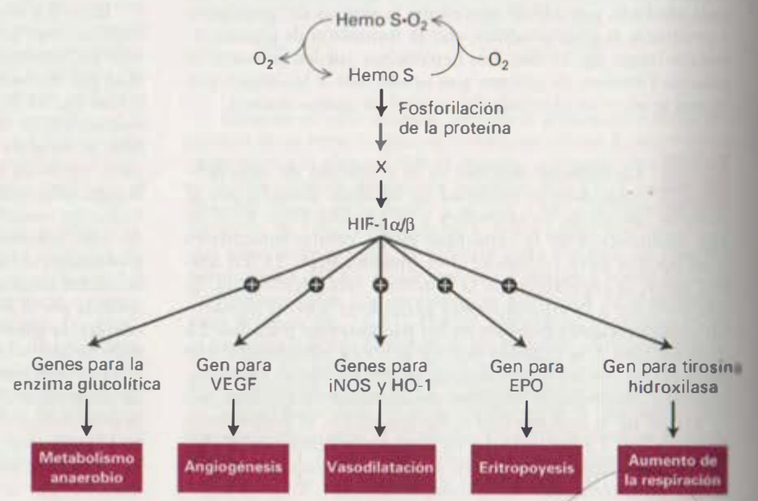
MEDICINA

La hipoxia afecta el crecimiento de los vasos sanguíneos, en particular de los capilares pequeños cuyo patrón exacto, a diferencia de los de los vasos sanguíneos principales como la aorta, no está determinado genéticamente. La angiogénesis, es decir el crecimiento ramificado de la vasculatura, está estimulada por la hipoxia; en consecuencia, asegura que todas las células estén en la proximidad adecuada al suministro de sangre oxigenada. Los tumores en crecimiento estimulan la angiogénesis para asegurar su propio aporte sanguíneo (cap. 23). La comprensión de las señales que controlan la angiogénesis podría conducir al desarrollo potencial de agentes terapéuticos que estimulen la angiogénesis en un órgano trasplantado o enfermo que está recibiendo sangre insuficiente o que inhiban la angiogénesis en los tumores en desarrollo, lo cual produciría su extinción. ▮

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 15.2

Respuestas de las células frente a influencias ambientales

- La degradación y la síntesis del glucógeno están reguladas por múltiples segundos mensajeros inducidos por la estimulación neural u hormonal (véase fig. 15-6).
- Una elevación en la glucemia estimula la liberación de insulina a partir de las células β pancreáticas (véase fig. 15-7). La unión ulterior de la insulina a su receptor en las células musculares y los adipocitos conduce a la activación de proteincinasa B que promueve la captación de la glucosa y la síntesis de glucógeno, que produce un aumento de la glucemia.
- La unión de glucagón a su receptor acoplado a la proteína G en los hepatocitos estimula la glucogenólisis y un aumento de la glucemia por la cascada de las cinasas activada por cAMP (similar a la estimulación de la adrenalina bajo situaciones de estrés).
- Los dos mecanismos sensores del oxígeno ayudan a las células a responder a la privación de oxígeno: un mecanismo activa la transcripción de factor inducido por la hipoxia 1 (HIF-1) y el otro estimula la estabilización del HIF-1 mediante la inhibición de su degradación por los proteasomas.
- Cuando el nivel de oxígeno celular es bajo, HIF-1 actúa con los factores de transcripción específicos de los tejidos para activar la expresión de varios genes diana en los tejidos diferentes (véase fig. 15-9). Una proteína inducida por esta vía es el factor de crecimiento endotelial vascular que estimula la angiogénesis local para aumentar el aporte sanguíneo y, en consecuencia, el oxígeno a las células privadas de él.



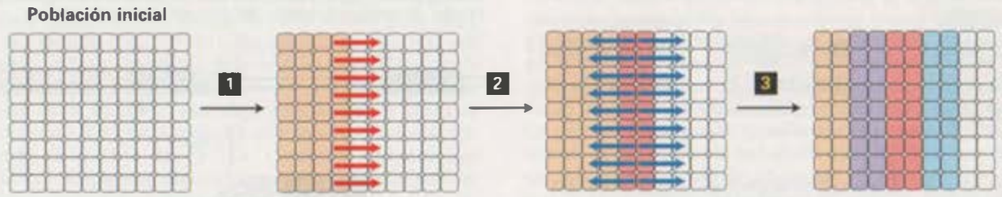
▶ **Fig. 15-9. Modelo de la vía de respuesta a la hipoxia mediada por el factor inducido por la hipoxia 1 (HIF-1).** La concentración de oxígeno local es percibida por un mecanismo desconocido que requiere una proteína asociada al hemo (hemo S). La forma privada de oxígeno activa los intermediarios del sensor (X), que a su vez estimula la mayor producción de ambas subunidades de factor inducido por la hipoxia 1 (HIF-1). Este factor activa la transcripción de genes cuyas proteínas codificadas median las respuestas a corto plazo y a largo plazo ante una deficiencia de oxígeno. HIF-1 activa los genes diana diferentes en células distintas, lo cual es un indicio probable de que actúa en combinación con otras proteínas reguladoras del gen. VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; iNOS: sintasa del óxido nítrico inducible; HO-1: hemo oxigenasa 1; EPO: eritropoyetina. (Adaptado de H. Zhu y H. F. Bunn, 2001, *Science* 292:449; véase también W. G. Kaelin, Jr., 2002, *Genes & Dev.* 16:1441.)

15.3 Control de los destinos celulares por cantidades graduadas de reguladores

En un tejido en desarrollo, cada célula debe aprender cómo contribuir a la organización global del tejido. Con frecuencia, las células en una posición particular dentro del embrión en desarrollo deben dividirse, movilizarse, cambiar de forma o elaborar productos especializados, mientras que otras células cercanas no lo hacen. En la biología moderna del desarrollo, el término **inducción** se refiere a los acontecimientos en los que una población celular influye en el destino de las células vecinas. La figura 15-10 muestra en forma esquemática el modo en que una serie de señales inductivas pueden crear varios tipos de célula, comenzando desde una población de células equivalentes en un inicio. La inducción puede crear tipos de tejido en sitios específicos (p. ej., formación de un cristalino cerca del sitio en el cual crecerá la retina) o causar cambios en la forma de células en una localización específica. Por ejemplo, los cambios en la forma de las células en el centro, pero no en la periferia de la placa neural, dan lugar al tubo neural a partir del cual se desarrolla el sistema nervioso central. Asimismo, la orientación celular es crítica. Si un epitelio produce anexos, como plumas o pelos, todos ellos pueden necesitar apuntar en la misma dirección. Estas propiedades de las células son coordinadas mediante la integración de señales en el organismo en desarrollo y cada célula interpreta las señales que recibe a la luz de su experiencia anterior y estado de diferenciación.

Algunas señales inductivas extracelulares se movilizan a través del tejido y por consiguiente pueden actuar a distancia de la célula de señalización; algunas señales están fijas a la superficie de la célula de señalización y así pueden influir sólo en las células vecinas inmediatas. Aún otras señales están muy localizadas por su unión firme a los componentes de la matriz extracelular. La velocidad de transmisión de una señal depende de las propiedades químicas de ésta, de las propiedades del tejido a través del cual pasa y de la capacidad de las células junto con el modo de captar o inactivar la señal. La distancia que puede recorrer una señal influye en el tamaño y la forma de un órgano. Por ejemplo, cuanto más distancia recorre una señal que induce la formación de la neurona, más neuronas se formarán.

En esta sección y las siguientes veremos el modo en que las diferencias cuantitativas en las señales externas y los factores de transcripción puede determinar los destinos y las propiedades celulares. Comenzamos con distinguir dos mecanismos básicos de señalización inductiva y entonces, como ejemplo, examinamos con cierto detalle los estadios tempranos del desarrollo de *Drosophila*. Para comprender el modo de acción de las señales durante las interacciones celulares en el desarrollo, se utilizaron animales transgénicos para observar los efectos de aumentar o disminuir la función de los genes en células específicas. Por ejemplo, si una célula puede enviar una señal aun cuando se elimina cierta función del gen, no se requiere del gen para enviar la señal. La eliminación de la misma función de una célula que normalmente recibe la señal puede revelar un requerimiento del gen para la recepción o transducción de la señal. De esta manera, incluso cuando se está estudiando una proteína nueva, es posible deducir su lugar en una vía de señalización. Estos métodos de manipulación génica están muy adelantados en *Drosophila* (fig. 15-11), pero se están adaptando cada vez más para otros organismos experimentales.



▲ **Fig. 15-10. Modelo simplificado de inducción secuencial de tipos celulares en un epitelio.** Paso 1: A partir de una población de células equivalentes (blanco), un acontecimiento inicial (p. ej., movimientos celulares o una señal polarizada) crea una segunda población de células (marrón claro) que segrega una señal (flechas rojas). Esta señal alcanza sólo a algunas de las células en el campo adyacente de células. Paso 2: Las células capaces de recibir e interpretar la señal roja ahora forman un nuevo tipo celular (anaranjado) que segrega una señal diferente (flechas azules) que se mueve fuera de las células rojas en ambas direcciones. Paso 3: La señal azul induce aún más tipos celulares (violeta y azul). Nótese que el efecto de la señal azul difiere, según actúe sobre las células blancas o sobre las de color marrón claro.

(a) Expresión del gen ectópico con control espacial/temporal

Un gen de la mosca de interés está ligado a un promotor regulado para expresar el gen en un momento o lugar que no es normal. Si el exceso de expresión es letal, no se puede obtener mosca transgénica (véase la parte [b] para una solución a este problema). Una variación es utilizar un promotor inducible por calor a partir de un gen con "choque térmico"; un pulso de calor (37°C, 30 min) causará la expresión en todas las células.



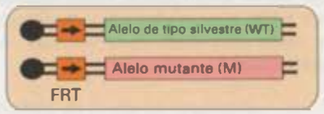
(b) Expresión del gen ectópico regulado en forma espacial y temporal mediante el empleo de *GAL4*

Una mosca transgénica codifica el factor de transcripción de levadura Gal4 bajo el control de un promotor específico de tejido. Otra porta un transgén que puede responder a Gal4 porque contiene una secuencia UAS a la cual se fija Gal4. Después de cruzar las dos moscas, cualquier gen que se había adherido a la secuencia de UAS tendrá el control de Gal4 y se expresará en ese tejido específico. Esto permite que cada línea de mosca transgénica sobreviva, aun cuando la activación del gen demostrará ser letal en la descendencia de la cruza.

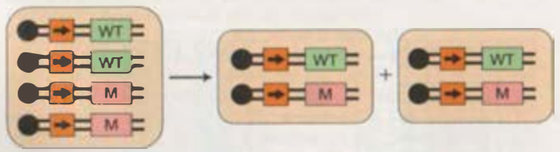


(c) Creación de tejidos mosaico con clones de células que carecen de la expresión de un gen

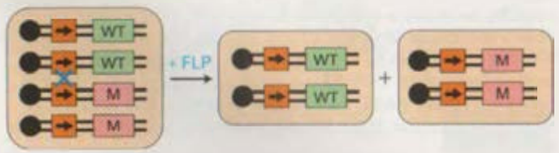
La FLP recombinasa de levadura, que actúa en secuencias de FRT insertadas cerca del centrómero, puede utilizarse para crear clones de células mutantes homocigóticos en moscas que son heterocigóticos para una mutación recesiva. La recombinasa se produce en un momento especificado mediante el empleo de un promotor inducible por calor. Se induce la recombinasa suficiente para causar un acontecimiento de recombinación ocasional. Luego, se evalúan los efectos de la función del gen perdido.



La división celular normal crea más células heterocigóticos:

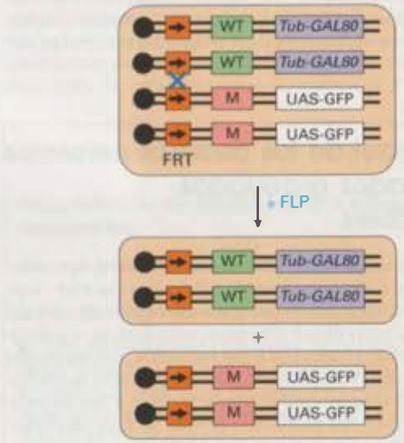


La división después de la recombinación crea un clon de células mutantes y un clon de células de tipo silvestre:



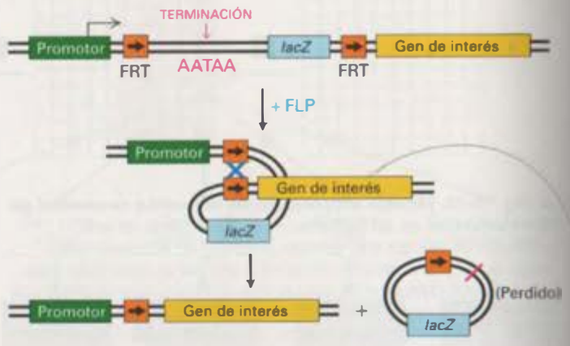
(d) Creación de mutantes marcados para evaluar los efectos de la función del gen perdido en células individuales

El objetivo es marcar las células mutantes creadas por recombinación con FLP como en (c). Las moscas contienen un gen que codifica la proteína Gal180 de las levaduras bajo el control de un promotor *tubulina* que es activo en todas las células. Este transgén está localizado en el cromosoma que porta el alelo de tipo silvestre del gen de interés. Todas las células están diseñadas para elaborar al factor de transcripción Gal4 constitutivo de las levaduras mediante el empleo de un promotor (no mostrado). Después de la recombinación, Gal80 está presente en la célula de tipo silvestre donde bloquea la actividad de Gal4. En la célula mutante, no se produce Gal80 y Gal4 actúa en una secuencia de UAS para activar la producción de una proteína fluorescente (GFP). De esta manera las células mutantes están marcadas con fluorescencia en el mismo momento que pierden su alelo de tipo silvestre.



(e) Activación inducible de la función de un gen en clones de células

El objetivo es activar el gen de interés en un clon de células durante el desarrollo. Todas las células expresan *lacZ* al inicio, lo cual está bajo el control de un promotor constitutivo y por consiguiente se tiñe de azul. Cuando un pulso moderado de FLP recombinasa se produce mediante el uso de un promotor inducible por calor activo en todas las células, se elabora suficiente recombinasa en unas pocas células para actuar en los sitios FRT y causar una deleción del DNA entre los FRT. Esto elimina el gen *lacZ* al mismo tiempo que une un promotor al gen de interés. El clon resultante de células que expresan el gen de interés puede identificarse porque las células no expresan *lacZ*. Luego, se evalúa el efecto del gen de interés en el clon.

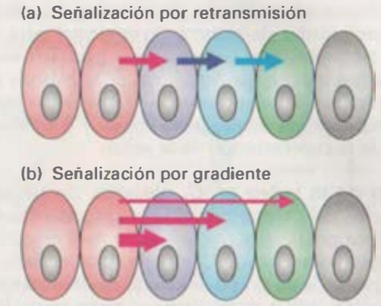


◀ Fig. 15-11. Manipulación génica en el análisis de los sistemas de señalización. (a) En el caso más simple, un gen es activado mediante el uso de un promotor que es específico para ciertas células o, como con los promotores del "choque térmico" que son inducibles en todas las células. Este procedimiento tiene la limitación de que los transgenes pueden ser perjudiciales y los animales transgénicos no pueden aislarse. (b) Una mejora es formar dos líneas transgénicas de moscas, una que porta el gen de interés bajo el control de una secuencia activadora en dirección 5' (UAS, X-ref) de las levaduras. El UAS es activado cuando está presente el factor de transcripción GAL4 de las levaduras, como lo es cuando las moscas que portan UAS se cruzan con moscas que tienen GAL4 expresado en ciertas células. (c) El objetivo opuesto es eliminar de manera selectiva una función de un gen de ciertas células. La recombinasa FLP de las levaduras actúa en secuencias FRT que han sido insertadas cerca de la base de un cromosoma. Comenzando a partir de una mosca que es heterocigótico para una mutación de interés, mutante/tipo silvestre, es posible obtener clones de células que son homocigóticos ya sea para el alelo mutante o del tipo silvestre. (d) Es difícil reconocer y analizar clones pequeños de células obtenidos como en la parte (c) si las células no están marcadas. En este refinamiento, la recombinación elimina GAL80, una proteína que inhibe la función de GAL4, al mismo tiempo cuando el alelo mutante se hace homocigoto. Luego, el GAL4 liberado activa un UAS que dirige la producción de una proteína fluorescente. Una célula mutante, como la neurona mostrada, puede analizarse para observar el efecto de la mutación, por ejemplo, las conexiones del cerebro. (e) Para activar un gen en clones pequeños de células, generados al azar, se utiliza de nuevo FLP, pero esta vez para eliminar una secuencia de terminación transcripcional intermedia que evita que se active el gen de interés. Al mismo tiempo, se elimina un *lacZ* u otro gen marcador; de modo que el clon de células con el gen activado sea identificable por la falta del marcador de la expresión génica.

La señalización inductiva opera por mecanismos de gradiente y de retransmisión

En algunos casos, la inducción de destinos celulares incluye una opción binaria: en presencia de una señal, la célula es dirigida hacia una vía de desarrollo; en ausencia de la señal, la célula asume un destino de desarrollo diferente o no se desarrolla en absoluto. A menudo, estas señales trabajan en un *modo por retransmisión (relay mode)*. Es decir, una señal inicial activa una cascada de inducción en la que las células próximas a la fuente en la señal son inducidas a asumir destinos específicos; ellas, a su vez, producen otras señales para organizar a sus vecinos (fig. 15-12a). De manera alternativa, una señal puede inducir destinos celulares diferentes, de acuerdo con su concentración. En este *modo por gradiente*, el destino de una célula receptora está determinado por la cantidad de la señal que la alcanza, relacionada con su distancia desde la fuente de la señal (fig. 15-12b). Cualquier sustancia que puede inducir respuestas diferentes que dependen de su concentración a menudo se denomina **morfógeno**.

La concentración a la cual una señal induce una respuesta celular específica se denomina *umbral*. Una señal graduada, o morfógeno, exhibe varios umbrales, cada uno corresponde a una respuesta específica en las células receptoras. Por ejemplo, una concentración baja de una señal inductiva hace que una célula asuma el destino A, pero una concentración de señal más elevada hace que la célula asuma el destino B. En la señalización del modo por gradiente, la señal se crea



▲ Fig. 15-12. Dos modos de señalización inductiva. En el modo por retransmisión (a), una señal de alcance corto (flecha roja) estimula la célula receptora para enviar otra señal (violeta) y así sucesivamente para una o más rondas. En el modo por gradiente (b), una señal producida en células fuente localizadas (flechas rojas) alcanza las células cercanas en cantidades más grandes que las que alcanzan las células distantes. Si las células receptoras responden en forma distinta a concentraciones diferentes de la señal (indicado por el grosor de las flechas), entonces una señal individual puede crear múltiples tipos de células.

recientemente y así no se genera en niveles iguales en todas partes. De manera alternativa, la señal podría producirse en un extremo de un campo de células y podría destruirse o inactivarse en el otro (la idea de "la fuente y el sumidero"), de modo que se mantiene una distribución graduada.

Destinos celulares del mesodermo en blástulas de *Xenopus*. Los estudios con activina, una proteína de señalización tipo TGFβ que determina el destino celular en los embriones tempranos de *Xenopus*, fueron la fuente del conocimiento del modo en que las células determinan la concentración de una señal inductiva graduada. La activina ayuda a organizar el mesodermo a lo largo del eje dorsoventral (de atrás hacia adelante) de un animal. El endodermo y el ectodermo se forman primero después de la fecundación de un ovocito de *Xenopus*; el mesodermo se forma enseguida después. Estas tres poblaciones celulares separadas (estratos germinales) constituyen la *blástula*, una esfera hueca de células.

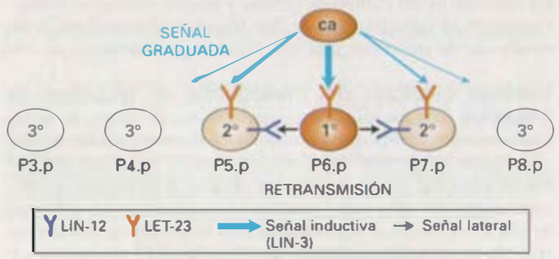
Se utilizan genes específicos como indicadores de los efectos de las señales que crean tejido como la activina. Por ejemplo, una concentración baja de activina induce la expresión del gen *Xenopus brachyury* (*Xbra*) en todo el mesodermo temprano. Xbra es un factor de transcripción necesario para el desarrollo del mesodermo. Las concentraciones más elevadas de activina inducen la expresión del gen *Xenopus goosecoid* (*Xgsc*). La proteína Xgsc puede transformar el mesodermo ventral en dorsal; de modo que la inducción local de *Xgsc* por la activina causa la formación de células del mesodermo dorsal, en lugar de ventral, cerca de la fuente de activina. Mediante el empleo de activina marcada con ^{35}S los científicos demostraron que cada una de las células de la blástula de *Xenopus* expresa unos 5.000 receptores similares a TGFβ tipo II que unen activina. Los hallazgos provenientes de experimentos adicionales mostraron que la expresión máxima de Xbra se logró cuando alrededor de 100 receptores estaban ocupados. Con una concentración de activina en la que estaban ocupados 300 receptores, las células comenzaron a expresar niveles superiores de

Xgsc. Se obtuvieron resultados similares con las células de la blástula manipuladas de manera experimental para expresar niveles de receptores siete veces mayores para activina tipo II. Estos hallazgos indican que las células de la blástula miden la cantidad absoluta de receptores unidos al ligando más que la relación de receptores unidos a no unidos y confirman la importancia de la concentración de la señal.

Desarrollo de la vulva en *C. elegans*. Un ejemplo de la determinación del destino celular mediante una combinación de señales por gradiente y retransmisión es el desarrollo de la vulva del gusano nematodo *C. elegans*. Esta estructura se desarrolla a partir de un grupo de células epidérmicas precursoras de la vulva (VPC) cuyos destinos están controlados por una señal inductiva proveniente de una célula cercana denominada célula de anclado. Todas las VPC tienen el potencial para convertirse en cualquiera de los tres tipos de células diferentes: 1° y 2°, que se refiere a tipos celulares diferentes de la vulva y 3°, un tipo que no pertenece a la vulva. Un conjunto de células, como VPC, se denomina *grupo de equivalencia* si cada célula en el conjunto tiene igual capacidad de formar más de un tipo celular. La señal inductiva secretada por la célula de anclado es LIN-3, similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF) de los vertebrados. Como el receptor para EGF, el receptor para LIN-3 es un receptor tirosincinasa, denominado LET-23, que actúa a través de una vía Ras-MAP cinasa (véase fig. 14-21).

Los resultados de estudios tempranos sugirieron que LIN-3 era una señal graduada que inducía el destino 1° en la VPC más cercana (por lo general P6.p) y el destino 2° en P5.p y P7.p, localizadas apenas más lejos de la célula de anclado (fig. 15-13a). Si la determinación del destino 2° dependía sólo de una señal LIN-3 graduada, entonces sería de esperar que las células mutantes P5.p y P7.p que carecen del receptor para LIN-3 asuman el destino 3° que no forma la vulva. De modo sorprendente, cuando se realizó este experimento, las células mutantes asumieron su destino 2° normal (fig. 15-13b). La explicación más probable de estos resultados es que, cuando las células P6.p toman el destino 1°, envían una señal diferente que, por lo general, actúa con niveles moderados de LIN-3 para asegurar la producción de células 2°. Esta segunda señal por retransmisión parece ser un ligando para LIN-12, un receptor del tipo Notch. La estimulación de LIN-12 en las células P5.p y P7.p induce la expresión de una fosfatasa que inactiva la MAP cinasa y afecta otros reguladores también, lo que evita la opción de destino 1°.

En la glucogenólisis, la integración de la señal está en el nivel de una proteína de dos subunidades, con cada señal que actúa sobre una de las subunidades. En la determinación del destino celular de la vulva, la actividad de una cinasa individual, la MAP cinasa, es controlada por dos vías: la señalización de un receptor tipo EGF activa la MAP cinasa; la señalización de un receptor de tipo Notch la desactiva. La convergencia de estas dos vías en la MAP cinasa permite la formación refinada de tipos celulares adyacentes múltiples.



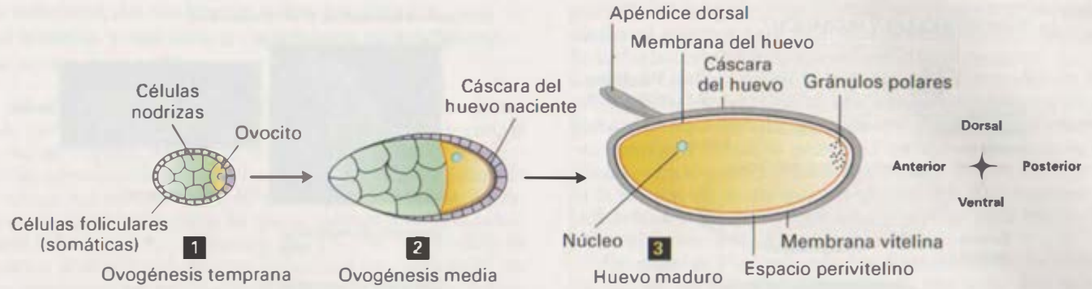
▲ Fig. 15-13. Señalización por gradiente y por retransmisión en el desarrollo de la vulva de *C. elegans*. La célula de anclaje (ca) envía una señal a las células precursoras de la vulva (P3.p-P8.p), las cuales tienen en su totalidad un potencial equivalente para formar cualquiera de los tres tipos celulares 1°, 2°, 3°. La señal relacionada con EGF, LIN-3, es recibida por el receptor LET-23. Las células que reciben la cantidad más alta de señal forman 1°, las células que reciben una cantidad moderada forman 2° y las células que reciben poco a nada forman 3°. Los destinos de las tres células se diferencian mediante el seguimiento de sus patrones posteriores de división celular. Los efectos de la señal LIN-3 graduada son controlados posteriormente por una señal de retransmisión. Después que la célula de anclaje envía LIN-3 a la célula más cercana, por lo general P6.p, ésta célula envía entonces una señal diferente a sus vecinos que resultan ser un ligando para LIN-12. La demostración del efecto de retransmisión provino de eliminar genéticamente el receptor LET-23 de las células P5.p y P7 p, lo cual les impide responder a la señal LIN-3. Si la señal graduada LIN-3 directa determina todos los tipos celulares, P5.p y P7 p deben asumir el destino 3°. Sin embargo, aún dirigen para formar las células 2°; de modo que debe operar otro sistema. Este otro sistema es la señal para LIN-12 desde la célula P6.p. (Adaptado de J. S. Simske y S. K. Kim, 1995, *Nature* 375:142.)

Los morfógenos controlan los destinos celulares en el desarrollo temprano de *Drosophila*

Drosophila ha tenido una utilidad particular en el estudio de morfógenos por tres razones. Primero, las moléculas reguladoras graduadas se utilizan extensamente en el desarrollo temprano del embrión de *Drosophila* y en el crecimiento de las patas y de las alas. Segundo, un huevo fecundado se desarrolla en una mosca adulta en sólo alrededor de 10 días. Tercero, los estudios genéticos importantes identificaron muchos mutantes de desarrollo con fenotipos anormales espectaculares. Se encontró que algunos de estos defectos se originan de mutaciones en los genes que codifican los morfógenos; otros se originan en genes que codifican las proteínas de transducción de señales.

Para comprender la manera por la cual los morfógenos determinan los destinos celulares tempranos en el embrión de la mosca, necesitamos primero colocarnos en el escenario. La ovogénesis comienza con una célula madre que se divide en forma asimétrica para generar una sola célula germinal, que se divide cuatro veces para generar 16 células. Una de estas células completará la meiosis (véase fig. 9-3) y se convierte en ovocito; las otras 15 células se transforman en *células nodrizas* que sintetizan proteínas y mRNA que son transportados a través de los puentes citoplasmáticos al ovocito (fig. 15-14). Estas moléculas son necesarias para la maduración del ovocito y para los pasos tempranos de la embriogénesis. Al menos un tercio del genoma representado en el mRNA del ovocito proviene de la madre, una dote sustancial. Cada grupo de 16 células está rodeado por una sola capa de células somáticas denominado *folículo*, que deposita la cáscara del huevo. El ovocito maduro, o huevo, es liberado en el oviducto donde se fertiliza; el huevo fecundado, o cigoto, es entonces desovado.

Las primeras 13 divisiones nucleares del cigoto de *Drosophila* son sincrónicas y rápidas, cada división se produce ca-



▲ Fig. 15-14. Desarrollo de un ovocito de *Drosophila* en un huevo maduro. Una célula germinal individual da lugar a quince células nodrizas (verde) y un solo ovocito (amarillo) (1). El ovocito temprano tiene un tamaño similar al de las células nodrizas vecinas; el folículo, una capa de células somáticas, rodea el ovocito y las células nodrizas. Las células nodrizas comienzan a sintetizar mRNA y proteínas necesarias para la maduración del ovocito y las células foliculares comienzan a formar la cáscara del huevo. En la mitad de la ovogénesis (2), el ovocito aumentó su tamaño considerablemente. El huevo maduro (3) está rodeado por la cáscara de huevo completa (gris). Las células nodrizas desaparecieron, pero los mRNA sintetizados y translocados al ovocito por las células nodrizas funcionan en el embrión temprano. Los gránulos polares localizados en la región posterior del citoplasma del huevo marcan la región en la cual se originarán las células de la línea germinal. La asimetría del huevo maduro (p. ej., la posición excéntrica del núcleo) establece la etapa de la determinación del destino celular inicial en el embrión. Después de su liberación en el oviducto, la fecundación del huevo activa la embriogénesis. (Adaptado de A. J. F. Griffiths et al., 1993, *An Introduction to Genetic Analysis*, 5th ed., W. H. Freeman and Company, p. 643.)

da 10 minutos aproximados. Esta replicación del DNA es la más rápida conocida por un eucarionte, con los 160 Mb totales del DNA cromosómico copiado en una fase S del ciclo celular que dura sólo 3 minutos. Dado que estas divisiones nucleares no se acompañan por divisiones celulares, generan una célula huevo multinucleada, un sincitio, con un citoplasma y membrana plasmática comunes (fig. 15-15a). Cuando los núcleos se dividen, comienzan a migrar hacia la periferia de la membrana plasmática. Dos a 3 horas después de la fecundación, los núcleos alcanzan la superficie, que forma el blastodermo sincitial; durante la hora siguiente, las membranas celulares se forman alrededor de los núcleos, lo que genera el blastodermo celular o blástula (fig. 15-15b). Todos los tejidos futuros derivan de las alrededor de 6.000 células epiteliales en la superficie de la blástula. Enseguida algunas de estas células se movilizan hacia adentro, un proceso denominado gastrulación, y finalmente se desarrollan los tejidos internos.

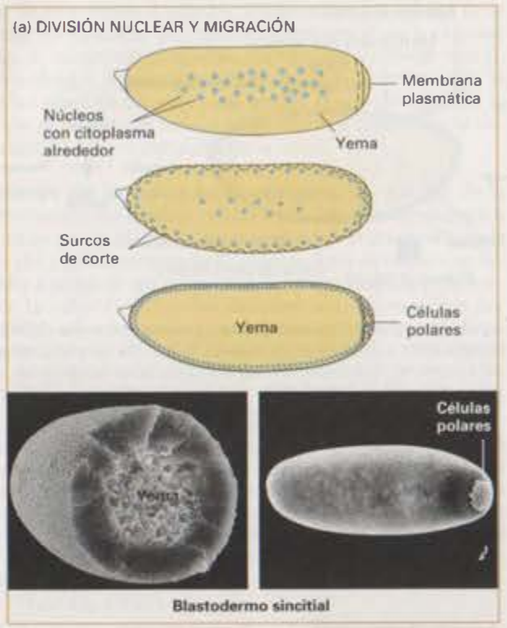
El sincitio del embrión de la mosca tiene cerca de 100 células de largo, desde la cabeza a la cola y alrededor de 60 células alrededor. Dentro del primer día de la fecundación, el cigoto se desarrolla en una larva, una forma segmentada que carece de alas y patas. El desarrollo continúa con tres estadios larvarios (~4 días) y los ~5 estadios de pupa durante los cuales tiene lugar la metamorfosis y se crean las estructuras del adulto (fig. 15-16). Al final de los estadios de pupas, alrededor de 10 días después de la fecundación, la pupa se escinde y emerge la mosca adulta.

Las células inicialmente equivalentes del embrión sincitial comienzan a asumir con rapidez destinos diferentes, lo que conduce a un patrón bien ordenado de identidades celulares separadas. Estos acontecimientos tempranos de patrones establecen el paso para el desarrollo posterior y la colocación adecuada de los tejidos diferentes (p. ej., muscular, nervioso, epidermis) y partes corporales, así como las formas de los anexos y la organización de los tipos celulares dentro de ellos. Debido a que el embrión temprano es en un comienzo simétrico de lado a lado, la creación de diferencias entre las células es un problema en dos ejes: *dorsoventral* (dorso/frente) y *anteroposterior* (cabeza-/cola). Los conjuntos diferentes de genes actúan en cada eje; así es que cada célula aprende su destino inicial respondiendo al aporte de reguladores que actúan en el sentido dorsoventral y anteroposterior en una clase de grilla bidimensional. Como veremos, ambos sistemas reguladores comienzan con la información y las moléculas que contribuyen al ovocito como una dote proveniente de la madre. Cuando el huevo maduro desova ya es asimétrico a lo largo de ambos ejes (véase fig. 15-14).

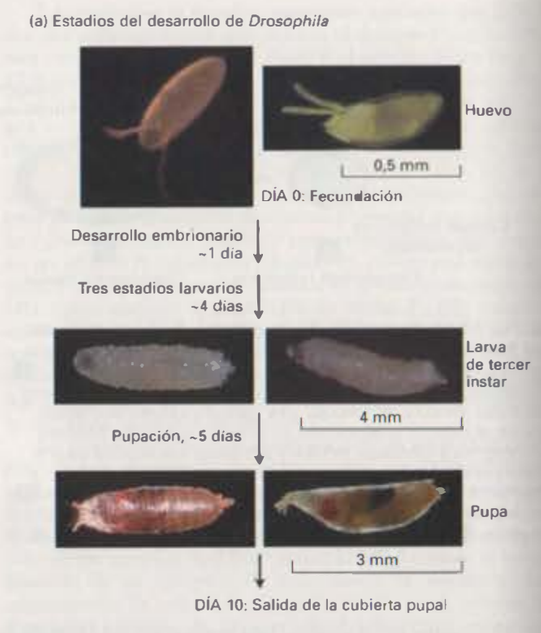
Debido a que el embrión temprano de la mosca es un sincitio, las moléculas reguladoras pueden movilizarse en el citoplasma común sin tener que atravesar las membranas plasmáticas. Algunas moléculas forman gradientes, que se utilizan en los pasos más tempranos de la determinación del destino celular en *Drosophila* antes de la subdivisión del sincitio en células individuales. Por lo tanto, los factores de transcripción, así como las moléculas segregadas, pueden funcionar como morfógenos en el embrión sincitial de la mosca. Los sincitios son menos comunes en el desarrollo temprano de otros animales y en los pasos más tardíos del desarrollo de la mosca; en estos estadios, los acontecimientos de modelado están en gran parte controlados por las interacciones entre células mediadas por las señales extracelulares, que pueden actuar en el modo por gradiente o por retransmisión.

Para descifrar la base molecular de la determinación del destino celular y el modelado global, los investigadores 1) llevaron a cabo estudios genéticos masivos para identificar todos los genes que desempeñan algún papel en el proceso de organización, 2) clonaron genes definidos por mutación; 3) determinaron modelos espaciales y temporales de producción de mRNA para cada gen y la distribución de las proteínas codificadas en el embrión y 4) evaluaron los efectos de las mutaciones en la diferenciación celular, el modelado del tejido y la expresión de otros genes reguladores. Los principios de la determinación del destino celular y el modelado del tejido aprendido a partir de *Drosophila* han tenido una amplia aplicabilidad en el desarrollo animal.

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Formación de imágenes en la embriogénesis de *Drosophila* a intervalos prefijados



▲ **Fig. 15-15. Formación del blastodermo celular durante la embriogénesis temprana de *Drosophila*.** Los estadios desde el sincitio (a) al blastodermo celular (b) se ilustran en diagramas y microfotografías electrónicas. La división nuclear no se acompaña por división celular hasta que se hayan formado alrededor de 6 000 núcleos y hayan migrado hacia la membrana plasmática. Antes de la celularización, el embrión desarrolla protrusiones superficiales que recubren núcleos individuales, pero permanecen dentro de un citoplasma común. No hay ninguna membrana excepto la que recubre todo el embrión. Después de la celularización, las membranas celulares se evidencian alrededor de los núcleos individuales. Nótese la segregación de los núcleos de las denominadas células polares, las que dan lugar a las células de la línea germinal en el extremo posterior del blastodermo sincitial. (Véase R. R. Turner y A. P. Mahowald, 1976, *Devel. Biol.* 50:95; fotografías gentileza de A. P. Mahowald; diagramas de P. A. Lawrence, *The Making of a Fly*, 1992, Blackwell Scientific, Oxford.)



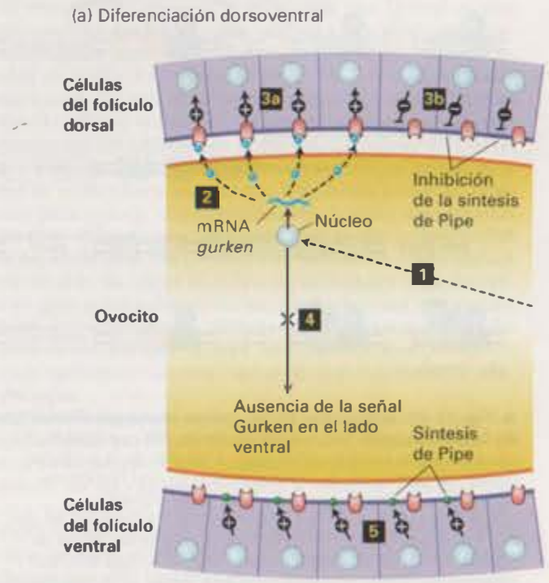
▲ **Fig. 15-16. Estadios principales en el desarrollo de *Drosophila*.** (a) El huevo fecundado desarrolla un blastodermo y sufre la celularización en unas pocas horas. La larva, una forma segmentada, aparece en alrededor de un día y pasa por tres estadios (instares) en un período de 4 días, con el desarrollo de una prepupa. La pupación insume 4-5 días, que acaba con la emergencia de la mosca adulta de la cubierta pupal. (b) Grupos de células del ectodermo denominados discos imaginales se establecen al lado, en sitios específicos en la cavidad del cuerpo larvario. Durante la pupación, éstos dan lugar a las diversas partes del cuerpo indicadas. Otras células precursoras dan lugar al músculo, el sistema nervioso y otras estructuras internas del adulto. (Parte (a) de M. W. Strickberger, 1985, *Genetics*, 3d ed., Macmillan, p. 38; reimpreso con autonzación de Macmillan Publishing Company. [Parte (b) Adaptado de la misma fuente y J. W. Fristrom et al., 1969, en E. W. Hanly, ed., *Park City Symposium on Problems in Biology*, University of Utah Press, p. 381.]

La señalización recíproca entre las células del ovocito y del folículo establece el modelado inicial en *Drosophila*

El modelado dorsoventral inicial en *Drosophila* es controlado por los acontecimientos de la ovogénesis. De hecho, la forma del ovocito maduro es un predictor exacto de la orientación dorsoventral del embrión. El proceso comienza cuando el núcleo del ovocito en su etapa temprana se mueve ligeramente, quizás al azar, hacia lo que se convertirá en el lado anterior y dorsal del huevo maduro (fig. 15-17a). Esa pérdida de simetría activa la polarización de señales que coordinan los ejes dorsoventrales del ovocito, el embrión y la cáscara de huevo circundante. Esta coordinación es necesaria para que las estructuras en la cáscara de huevo se alineen de manera adecuada con las estructuras del embrión en crecimiento. Por ejemplo, los tubos respiratorios en la cáscara del huevo deben conectarse con las regiones adecuadas del embrión.

Casi a la mitad de camino en la ovogénesis de *Drosophila* comienza la producción de Gurken, una señal similar al factor de crecimiento epidérmico. Debido a la localización excéntrica del núcleo, Gurken se produce en el lado dorsal del ovocito. El receptor para Gurken, un receptor tirosincinasa similar al receptor para EGF, está presente en las superficies de todas las células foliculares contiguas al ovocito. La señal Gurken dorsal activa sus receptores sólo en las células dorsales del folículo, que produce cambios en su aspecto y la represión del gen *pipe* dentro de ellos. Debido a esta represión dorsal, la proteína Pipe sólo se produce en las células ventrales del folículo. Pipe es una enzima que cataliza la sulfatación de glucosaminoglucanos (GAG), cadenas de polisacáridos que se agregan a las proteínas para formar los proteoglucanos (cap. 6).

La proteína Pipe estimula los destinos celulares ventrales, tal vez mediante la activación de una señal aún desconocida que activa una serie de cortes proteolíticos en el espacio perivitelino en el lado ventral del ahora huevo maduro (fig. 15-17b). La cadena resultante de acontecimientos tiene cierta similitud a la cascada de la coagulación de la sangre, cada proteína corta y activa el sustrato siguiente en una serie. El resultado de los cortes es la producción de un ligando denominado Spätzle sólo en el lado ventral. A esta altura, el huevo se ha fecundado y se está realizando la división nuclear temprana. Spätzle se fija a su receptor transmembrana,



▲ **Fig. 15-17. Determinación del eje dorsoventral en *Drosophila*.** Este proceso se basa en dos sistemas de señal, uno en las células del folículo y el otro en el ovocito, el embrión o ambos, más una cascada proteolítica dentro del espacio perivitelino. (a) El movimiento del núcleo del ovocito crea una asimetría inicial (1). La situación dorsal del núcleo del ovocito da por resultado final la producción de proteína Pipe sólo en las células del folículo ventral (2 5). (b) Los acontecimientos ulteriores en el espacio perivitelino a lo largo de la superficie ventral generan un gradiente de Spätzle activo (6–9). Por este tiempo, el huevo se ha fecundado y el embrión es un sincitio con muchos núcleos. La activación de Toll en la superficie del embrión por Spätzle hace que la proteína Dorsal ingrese en el interior del núcleo donde activa la transcripción de genes diana específicos, que dependen de su concentración. La concentración de Spätzle –por eso la activación de Toll y la localización nuclear de Dorsal– es máxima a lo largo de la línea media ventral, lo que confiere los destinos ventrales (p. ej., músculo) en las células de esta región. En forma más lateral, ingresa menos Dorsal en los núcleos y, en consecuencia, los destinos celulares son diferentes (p. ej., neural). Los destinos de las células dorsales se originan donde no ingresa Dorsal al núcleo. Las mutantes que carecen del receptor para Toll, o Dorsal, forman sólo células de tipo dorsal. (Adaptado de Gilbert y Hashimoto, 1999, *Trends Cell Biol.* 9:102.)

denominado Toll, en la superficie ventral del embrión. Así, la señalización se convierte en un círculo completo: los ligandos Gurken producidos en forma dorsal en el ovocito → activación de su receptor similar a EGF en las células dorsales del folículo y entonces retrocede en la cascada de proteasa en el lado ventral → ligando Spätzle → activación de su receptor, Toll, en el lado ventral del embrión. El efecto neto es coordinar las estructuras de la cáscara de huevo producidas por las células del folículo con las estructuras del embrión producidas en su interior.

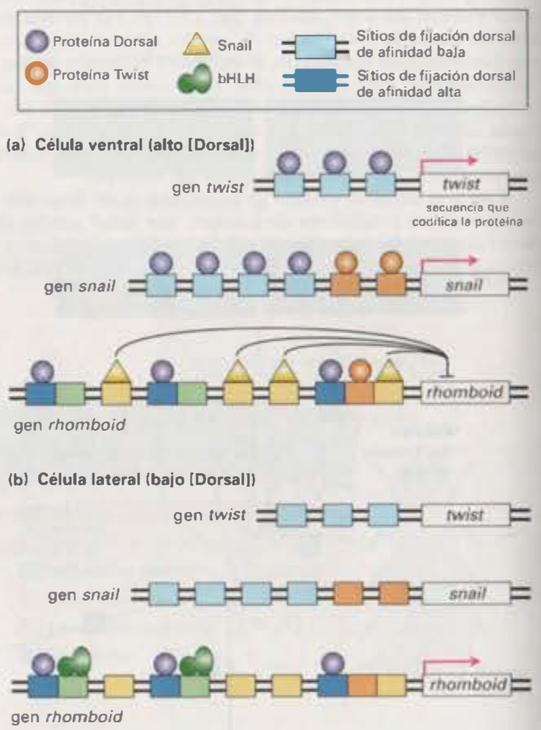
Dentro del embrión, la asociación del dominio citosólico activado de Toll con dos proteínas (Tube y Pelle) conduce a la fosforilación de la proteína Cactus. En ausencia de la señalización Toll, Cactus se fija a un factor de transcripción denominado Dorsal y lo atrapa, pero Cactus fosforilada es degradada con rapidez por el proteasoma. El Dorsal recién librado puede ingresar en los núcleos de las células del embrión y activar la transcripción. de genes diana diferentes, de acuerdo con su concentración. En consecuencia, Spätzle y Dorsal actúan como reguladores graduados, que inducen destinos ventrales donde su concentración es máxima y otros destinos hacia la parte lateral cuando sus concentraciones disminuyen. La función de Dorsal alcanza su máximo después que tuvo lugar la celularización.

Las características centrales de la *vía Toll-Dorsal* en las moscas, análogas a la de la *vía NF-κB* de los mamíferos descrita en el capítulo 14, existen en los mamíferos y tal vez en todos los animales. Dorsal es similar al factor de transcripción NF-κB; Cactus, a su inhibidor I-κB; y el receptor Toll, al receptor para interleucina 1, que actúa a través de los equivalentes Tube y Pelle para causar la fosforilación de I-κB y la liberación de NF-κB (véase fig. 14-28). NF-κB es un regulador crítico de los genes requeridos para las respuestas inmunes en los mamíferos y los insectos y también parecen funcionar en el desarrollo de los mamíferos. Esto ejemplifica muy bien la utilización de una vía de transducción de la señal para lograr tareas múltiples, como el modelado en el desarrollo más la respuesta inmune frente a la infección o la lesión. Este fenómeno parece ser bastante común y explica en parte la cantidad pequeña de vías de señalización que han evolucionado durante el tiempo biológico a pesar de la complejidad creciente de los organismos.

Dorsal nuclear y Decapentaplegic, una señal secretada, especifican los destinos celulares dorsales y ventrales

La serie notable de pasos diagramada en la figura 15-17 produce un gradiente en la localización nuclear del factor de transcripción Dorsal. La concentración de Dorsal nuclear disminuye en forma gradual desde su máximo en las células en la línea media ventral a los valores más bajos en las células laterales y por último a su ausencia en las células dorsales. Las mutantes que carecen de la función *dorsal* no pueden elaborar células con carácter ventral; de modo que el embrión completo desarrolla las estructuras dorsales. (Nótese que los genes de las moscas se denominan con acuerdo con los fenotipos mutantes; así el gen *dorsal* controla los destinos ventrales.) Una vez dentro del núcleo, Dorsal controla la transcripción de genes diana específicos mediante la fijación a sitios reguladores de alta afinidad y de baja afinidad, y por la interacción de modo combinatorio con otros factores de transcripción. Dorsal reprime la transcripción de *decapentaplegic (dpp), tolloid, short gastrulation* y *zerknüllt*, y activa la transcripción de *twist, snail, single-minded* y *rhomboid*. Cada uno de estos genes contiene una combinación singular de secuencias reguladoras de acción cis a los cuales se fijan Dorsal y otros factores de transcripción.

La figura 15-18 ilustra el modo en que Dorsal especifica patrones de expresión de genes diana diferentes, según su concentración. Por ejemplo, el gen *twist*, que contiene tres sitios de fijación con Dorsal de baja afinidad, se expresa de modo más ventral donde la concentración Dorsal es más alta. Cuando la concentración de Dorsal disminuye, lo hace por debajo del umbral necesario para activar la transcripción de *twist*. El gen *rhomboid*, que sólo se expresa en las regiones laterales, es controlado a través de un complejo de la región reguladora de acción cis que contiene tres sitios de fijación de alta afinidad con Dorsal. Dos de estos sitios son adyacentes a secuencias reguladoras que fijan proteínas con el motivo hélice-bucle-hélice básico (bHLH), presente en numerosos factores de transcripción. Cuando Twist contiene un motivo bHLH, parece que actúa de manera cooperativa con Dorsal para inducir la transcripción del gen *rhomboid* en las células laterales. La región control *rhomboid* también contiene cuatro sitios de fijación para Snail, un represor de la transcripción. La producción de Snail es inducida sólo en concentraciones altas de Dorsal porque el gen *snail* contiene sólo sitios de fijación Dorsal de baja afinidad dentro de su región control. Porque Snail está localizado en la región ventral, su actividad represora determina un límite ventral-lateral bien definido en la transcripción de *rhomboid*. Este ejemplo ilustra muy bien cómo dos reguladores de la transcripción pueden colaborar para crear un límite nítido entre tipos celulares, como se describirá en las secciones 15.4 y 15.5.



▲ Fig. 15-18. Activación de los genes diana por Dorsal luego de la señalización Toll. La activación de Toll por Spätzle conduce a una localización nuclear graduada de la proteína Dorsal. El gradiente de concentración Dorsal resultante (elevado en la región ventral y bajo en la dorsal) puede conducir a patrones diferentes de la expresión del gen. Acá se muestran los tres genes diana que tienen sitios de fijación Dorsal de alta afinidad (azul oscuro) o baja afinidad (celeste). (a) En las regiones ventrales donde la concentración de Dorsal (violeta) es alta, puede unirse a los sitios de baja afinidad en *twist* y *snail*, lo cual activa la transcripción de estos genes. La proteína Twist (anaranjado) también activa la transcripción de *snail*, que codifica un represor (amarillo) que impide la transcripción de *rhomboid* en esta región. (b) En las regiones laterales, la concentración de Dorsal no es lo bastante elevada para la fijación de Dorsal a los sitios de baja afinidad que regulan *twist* y *snail*. La fijación de Dorsal a *rhomboid* está facilitada por la presencia de sitios de alta afinidad y fijación sinérgica de los activadores heterodiméricos bHLH (verde) a los sitios vecinos. El límite muy marcado en la expresión de Rhomboid causa la formación de tipos celulares distintos en la región ventral en comparación con la región lateral. (Véase A. M. Huang et al., 1997, *Genes & Dev* 11.1963.)

El modelado dorsoventral producido por Dorsal es ampliado por Decapentaplegic (Dpp). Esta proteína de señalización segregada pertenece a la familia del TGFβ, que se encuentra en todos los animales (cap. 14). Debido a que la transcripción del gen *dpp* es reprimida por Dorsal, Dpp es producida sólo en la mayoría de las células dorsales del estadio temprano del embrión de la mosca, que carece de Dorsal en sus núcleos. Una combinación de evidencias genéticas y genéticas moleculares sugiere que Dpp actúa como un morfógeno para inducir el establecimiento de tipos celulares ectodérmicos diferentes en la región dorsal del embrión. Por ejemplo, la eliminación completa de la función Dpp conduce a una pérdida de todas las estructuras dorsales y su conversión en más estructuras ventrales. Los embriones que poseen sólo un alelo *dpp* de tipo silvestre muestran un aumento del número de células que asumen un destino ventral, mientras que los embriones con tres copias de *dpp* forman más células dorsales.

Así, dos señales secretadas graduadas, Spätzle y Dpp, desempeñan papeles críticos en la determinación del eje dorsoventral en *Drosophila* y en la inducción del modelado extenso dentro de las regiones dorsales y ventrales. Spätzle, que actúa a través de un factor de transcripción Dorsal localizado en el núcleo, induce destinos ventrales y controla la producción de Dpp, que induce destinos dorsales. A diferencia de Dorsal que sólo funciona en el desarrollo temprano, la señal Dpp se utiliza en forma repetida en el desarrollo más tardío, ya que participa en muchos procesos como desarrollo de anexos, formación del intestino y desarrollo del ojo. La señal Spätzle también tiene otras funciones que se describen más adelante.

Los miembros de la familia del TGFβ de la rana denominados BMP2 y BMP4 tienen efectos inductivos similares a los de la proteína Dpp y de hecho son las proteínas de los vertebrados con secuencias relacionadas de modo más estrecho con Dpp. La mayoría o todos los componentes de la vía de señalización del TGFβ, incluso los factores de transcripción Smad, parecen estar presentes y participar en el desarrollo en todos los animales (véase fig. 14-2). Como se menciona en la sección 15.5, las proteínas de vertebrados también controlan el modelado a lo largo del eje dorsoventral, aunque el eje está dado vuelta en los vertebrados en comparación con el de los invertebrados. La pérdida de la señalización del TGFβ, debida a mutaciones en los receptores del TGFβ o en las proteínas Smad, contribuye al comienzo del cáncer (cap. 23).

El control transcripcional por la proteína Bicoid derivada de la madre especifica la parte anterior del embrión

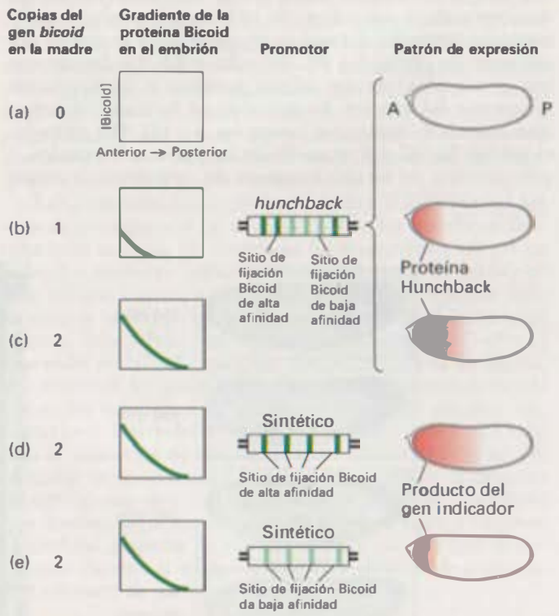
Volvemos ahora a la determinación del eje anteroposterior en el estadio temprano del embrión de la mosca mientras aún es un sincitio. Como en la determinación del eje dorsoventral, la especificación del destino celular anteroposterior comienza durante la ovogénesis. La asimetría inicial también abarca los denominados *mRNA maternos* que son producidos por las células nodrizas y transportados al interior del ovocito. En este caso se localizan en dominios espaciales separados (véase fig. 15-14). Por ejemplo, el mRNA *bicoid* está atrapado en la región más anterior, o polo anterior, del estadio temprano del embrión de la mosca

▲ FIGURA EXPERIMENTAL 15-19 El mRNA *bicoid* derivado de la madre se localiza en la región anterior de los embriones tempranos de *Drosophila*. Todos los embriones mostrados están ubicados con la parte anterior hacia la izquierda y la dorsal hacia arriba. En este experimento, la hibridación in situ con una sonda de RNA marcada en forma radiactiva específica para el mRNA *bicoid* se realizó sobre cortes del embrión completo a 2,5-3,5 horas después de la fecundación. Este lapso cubre la transición del blastodermo sincitial al comienzo de la gastrulación. Después de eliminar el exceso de la sonda, la sonda que forma un híbrido con el mRNA bicoid materno (granos plateados oscuros) se detectó por autorradiografía. La proteína bicoid es un factor de transcripción que actúa solo y con otros reguladores para controlar la expresión de ciertos genes en la región anterior del embrión. (De P. W. Ingham, 1988, *Nature* 335:25; fotografías gentileza de P. W. Ingham.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación general: Control génico en el desarrollo embrionario

(fig. 15-19). La localización anterior de mRNA *bicoid* depende de su extremo 3' no traducido y tres proteínas derivadas de la madre. Los embriones producidos por moscas hembra que son homocigotas para las mutaciones *bicoid* carecen de partes anteriores del cuerpo, lo que avala la importancia de la proteína Bicoid en la especificación de los destinos celulares anteriores.

La proteína Bicoid, un factor de transcripción tipo homeodominio, activa la expresión de ciertos genes específicos de la parte anterior descritos más adelante. En el embrión de mosca sincitial, la proteína Bicoid se disemina a través del citoplasma común fuera del extremo anterior donde se produce desde el mRNA localizado. Como resultado, se establece un gradiente de proteína Bicoid a lo largo del eje anteroposterior del embrión sincitial. La evidencia de que el gradiente de proteína Bicoid determina las estructuras anteriores se obtuvo mediante la inyección de mRNA *bicoid* sintético en diferentes localizaciones del embrión. Este tratamiento conduce a la formación de estructuras anteriores en el sitio de inyección, con estructuras progresivamente más posteriores que se forman a distancias crecientes del sitio de inyección. Otra prueba fue producir moscas con proteína Bicoid anterior extra; en estas moscas, las estructuras anteriores se extendieron para ocupar una proporción mayor del embrión.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 15-20 Bicoid derivado de la madre controla la expresión anterior/posterior del gen *hunchback* (*hb*) embrionario. (a-c) El aumento de la cantidad de genes *bicoid* en las moscas madre cambió el gradiente de Bicoid en el embrión temprano, lo que conduce a un cambio correspondiente en el gradiente de proteína Hunchback producido por el gen *hunchback* en el genoma del embrión. El promotor *hunchback* contiene tres sitios de unión de alta afinidad y tres sitios de fijación de baja afinidad para Bicoid. Se prepararon moscas transgénicas que portan un gen indicador unido a un promotor sintético que contiene ya sea cuatro sitios de alta afinidad (d) o cuatro sitios de baja afinidad (e). En respuesta al mismo gradiente de proteína Bicoid en el embrión, la expresión del gen indicador controlado por un promotor que posee sitios de fijación para Bicoid de alta afinidad se extiende de modo más posterior que el que hace la transcripción de un gen indicador que porta sitios de baja afinidad. Este resultado indica que la concentración del umbral de Bicoid que activa la transcripción de *hunchback* depende de la afinidad del sitio de fijación Bicoid. Bicoid regula otros genes diana de manera similar. (Adaptado de D. St. Johnston y C. Nüsslein-Volhard, 1992. *Cell* 68:201.)

La proteína Bicoid promueve la transcripción del gen *hunchback (hb)* del genoma del embrión. La transcripción de *hunchback* es máxima en la parte anterior del embrión donde la concentración de Bicoid es más alta. Las mutaciones en *hunchback* y varios otros genes en el genoma del embrión conducen a intervalos grandes en el patrón anteroposterior del embrión temprano; en consecuencia, estos genes se denominan en conjunto genes gap o de hendidura. Varios tipos de evidencias indican directamente que la proteína Bicoid regula la transcripción de *hunchback*. Por ejemplo, el aumento del número de copias del gen *bicoid* extiende los gradientes de proteínas Bicoid y Hunchback (Hb) hacia la parte posterior en paralelo (fig. 15-20a-c). El análisis del gen *hunchback* reveló que contiene tres sitios de fijación de baja afinidad y tres de alta afinidad para la proteína Bicoid. Los resultados de los estudios con genes sintéticos que contienen sitios de fijación para Bicoid ya sea todos de alta afinidad o todos de baja afinidad demostraron que la afinidad del sitio determina la concentración umbral de Bicoid en la cual se activa la transcripción génica (fig. 15-20d, e). Además, se mostró que la cantidad de sitios de fijación para Bicoid ocupados a una concentración dada determina la amplitud, o el nivel, de la respuesta de transcripción.

Los hallazgos de los estudios de la capacidad de Bicoid para regular la transcripción del gen *hunchback* muestran que las variaciones en los niveles de factores de transcripción, así como en el número o en la afinidad de secuencias reguladoras específicas que controlan genes diana diferentes, o ambos, contribuyen a la generación de patrones diversos de expresión génica en el desarrollo. En consecuencia, estas observaciones siguen un paralelismo con las del factor de transcripción Dorsal descrito antes. En otros organismos en desarrollo se emplean mecanismos similares.

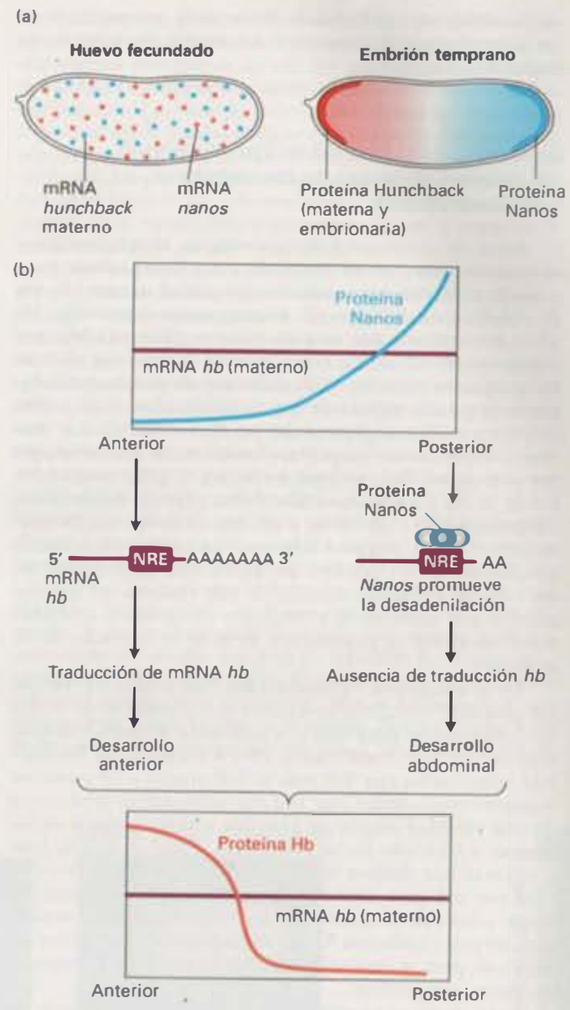
Los inhibidores de la traducción derivados de la madre refuerzan el modelado anteroposterior mediado por Bicoid

Los tipos celulares en el extremo posterior del embrión de la mosca son controlados por un mecanismo diferente, uno en el cual el control está en el nivel de la traducción en lugar del nivel de la transcripción. Como se describió, la transcripción del gen *hunchback* del embrión, que estimula los destinos celulares anteriores, produce una banda localizada en la parte anterior de mRNA *hunchback* y proteína Hunchback debido al gradiente anterior → posterior de la proteína Bicoid derivada de la madre. Sin embargo, el mRNA *hunchback* sintetizado por las células nodrizas también está presente en el embrión temprano. Aun cuando este mRNA *hunchback* materno está distribuido de manera uniforme a lo largo del embrión, su traducción está evitada en la región posterior por otra proteína derivada de la madre denominada Nanos, localizada en el extremo posterior del embrión. La proteína Nanos no sólo bloquea la traducción del mRNA *hunchback* materno en la región posterior; el conjunto de genes requerido para la localización de la proteína Nanos también es necesario para las células de la línea germinal a fin de formar el extremo posterior del embrión. La conservación evolutiva de esta función de Nanos en las moscas y en los gusanos puede indicar un sistema antiguo para la formación de células de la línea germinal. En los vertebrados existen proteínas relacionadas, pero sus funciones no se conocen todavía.

La figura 15-21 ilustra el modo por el cual la regulación de la traducción por Nanos ayuda a establecer el gradiente Hunchback anterior → posterior necesario para el desarrollo normal. La represión de la traducción del mRNA *hunchback* por Nanos depende de secuencias específicas en la región 3' del mRNA no traducido, denominadas elementos de respuesta a Nanos (NRE). Junto con otras dos proteínas de fijación al RNA, Nanos se fija al NRE en el mRNA *hunchback*. Si bien no se conoce el mecanismo preciso por el cual se logra la represión, ésta se correlaciona de modo inverso con la longitud de la cola de poli(A) en el mRNA *hunchback*, que es determinada por el equilibrio entre procesos opuestos de poliadenilación y desadenilación. En los embriones de tipo silvestre, la longitud de la cola de poli(A) aumenta inmediatamente antes de la traducción de mRNA *hunchback*. Los resultados de estudios genéticos y moleculares sugieren que Nanos estimula la desadenilación de mRNA *hunchback* y por eso disminuye su traducción. En ausencia de Nanos, una acumulación de proteína Hb materna en la región posterior conduce al fracaso de la formación normal de las estructuras posteriores y el embrión muere. Por el contrario, si Nanos se produce en la parte anterior, que en consecuencia inhibe la producción de Hb a partir de mRNA *hunchback* materno y embrionario, no pueden formarse las partes anteriores del cuerpo y, de nuevo, tiene consecuencias letales para el animal.

La localización de la proteína Nanos en la parte posterior del embrión está íntimamente acoplada a la regulación de la traducción de mRNA *nanos*. El mRNA *nanos* que no está localizado en la parte posterior no es traducido debido a una proteína denominada Smaug que se fija al 3' UTR del mRNA *nanos*. La localización de mRNA *nanos* en la parte posterior también depende de otras proteínas. Una de éstas es Oskar, cuyo mRNA proporcionado por la madre es transportado a la parte posterior por la cinesina, una proteína motora que la mueve a lo largo de los microtúbulos (cap. 20). Por consiguiente, la cinesina controla, después de varios pasos intermedios, la actividad localizada de un factor de transcripción (Hunchback).

El control de la traducción debido a la acción de un inhibidor, la localización del mRNA, o ambos, pueden ser estrategias ampliamente utilizadas para regular el desarrollo. Por ejemplo, mRNA específicos están localizados durante el desarrollo de células musculares (véase fig. 12-31) y durante la división celular en la levadura brotante *Saccharomyces cerevisiae* (véase fig. 22-22). Mecanismos similares operan durante el desarrollo de *C. elegans*. Incluso más fascinante es el descubrimiento de que la proteína Bicoid no sólo se fija al DNA para estimular la transcripción del gen *hunchback* embrionario sino también al mRNA *caudal*



▲ Fig. 15-21. Papel de la proteína Nanos en la exclusión de la proteína Hunchback (Hb) derivada de la madre de la región posterior de embriones de *Drosophila*. (a) Ambos mRNA *nanos* (rojo) y *hunchback* (*hb*) (azul) derivados de la madre están distribuidos de manera uniforme en el huevo fecundado y en el embrión temprano. La proteína Nanos, que sólo se produce en la región posterior, luego inhibe la traducción de mRNA *hb* materno (azul) en la parte posterior. (b) La difusión de la proteína Nanos desde su sitio de síntesis en la región posterior establece un gradiente de Nanos posterior → anterior. Un complejo de Nanos y otras dos proteínas inhibe la traducción de mRNA *hb* materno. Como consecuencia, la proteína Hb derivada de la madre se expresa de modo graduado que sigue un curso paralelo y refuerza el gradiente de la proteína Hb que es el resultado de la transcripción controlada por Bicoid del gen *hb* del embrión (véase fig. 15-20). (Véase C. Wreden et al., 1997, *Development* 124:3015.)

(que codifica otra proteína de *Drosophila* que participa en los acontecimientos tempranos del modelado) y regula su traducción.

La señalización tipo Toll activa un sistema de defensa ancestral en los vegetales y en los animales

Antes de continuar nuestra reseña de la señalización y el control génico en el desarrollo, nos detendremos para considerar la conexión entre la inmunidad innata y la vía de señalización Toll-Dorsal descrita antes (véase fig. 15-17c). Recordemos que esta vía tiene muchos paralelismos con la vía NF-κB de los mamíferos, en íntima relación con las respuestas inmunes. El descubrimiento de este paralelismo es el primer indicio de que la señalización Toll podría funcionar en los contextos del no desarrollo. En los últimos tiempos los investigadores encontraron que se requieren el receptor Toll, su ligando Spätzle y otros componentes de la vía para la expresión de un péptido antimicótico (drosomicina) en las larvas y adultos de la mosca. La estimulación de un receptor diferente similar a Toll activa la producción de un péptido antibacteriano (diptericina) en las moscas. El descubrimiento de este receptor en los mamíferos que controla la producción de citocinas antiinflamatorias alentó la exploración de todo el conjunto de similitudes.

En la actualidad, la señalización Toll parece ser uno de los procesos evolutivos conocidos más conservados. Todos los componentes entre Toll y la activación de Dorsal en gran medida han sido conservados. Hay 8 proteínas de *Drosophila* relacionadas con Toll más el Toll mismo y 10 proteínas humanas relacionadas con Toll que controlan la producción de una variedad amplia de péptidos antimicrobianos en las moscas y citocinas en los mamíferos. Estas moléculas proporcionan una defensa rápida e inespecífica contra la infección por una gran cantidad de patógenos. La respuesta inmune adaptable montada por los vertebrados, que implica anticuerpos y linfocitos T, está dirigida contra patógenos específicos, pero se desarrolla con más lentitud que la respuesta innata, inespecífica.

Cabe destacar que partes de la vía Toll y su función en la inmunidad se reconocen con facilidad en los vegetales. Por ejemplo, *Arabidopsis* tiene alrededor de 100 proteínas con dominios similares a los dominios citosólicos de Toll que transducen la señal intracelular. Por lo menos algunas de estas proteínas se requieren para la resistencia al virus del mosaico de tabaco y una proteína *Arabidopsis* con una secuencia similar a I-κB es necesaria para la resistencia al hongo del moho velloso. Sin embargo, la señalización similar a Toll en *Arabidopsis* parece actuar a través de factores de transcripción que no están relacionados con Dorsal o NF-κB.

Dado que el sistema de inmunidad innata basado en Toll parece estar presente en vegetales y animales, puede tener más de mil millones de años. En el transcurso de su larga evolución, al menos algunos de los genes que participan en la función de la supervivencia básica de la inmunidad fueron adaptados para actuar como reguladores del desarrollo; un ejemplo claro de la excesiva frugalidad biológica en el uso de recursos genéticos.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 15.3

Control de los destinos celulares por cantidades graduadas de reguladores

- La influencia de una población celular en el destino del desarrollo de otra cercana se denomina inducción. Las moléculas de señalización difusible y los contactos directos intercelulares median la inducción.
- Los morfógenos son señales que actúan de un modo graduado: una célula que recibe más de una señal sigue un destino, una célula que recibe menos asume un destino diferente y así sucesivamente. Otras señales actúan de un modo por retransmisión: una señal induce una célula para producir una señal diferente que instruye las células más lejanas a partir de la fuente señal original (véase fig. 15-11).
- En los embriones sincitiales de *Drosophila*, se utilizan morfógenos en diversos estadios para inducir tipos de células diferentes a lo largo de ambos ejes. Las asimetrías creadas en el huevo de la mosca durante la ovogénesis desencadenan acontecimientos que determinan los ejes dorsoventral y anteroposterior en los embriones de la mosca.
- Dos sistemas de señal –uno que actúa durante la ovogénesis y el otro en el estadio temprano del embrión de la mosca– más una cascada proteolítica dentro del espacio perivitelino conducen a una localización nuclear graduada de Dorsal, un factor de transcripción; los núcleos ventrales reciben la mayor parte de Dorsal; los núcleos laterales, menos; y los núcleos dorsales, ninguno (véase fig. 15-17). Estos acontecimientos tempranos controlan el desarrollo a lo largo del eje dorsoventral.
- En las células ventrales, Dorsal desactiva los genes (p. ej., *decapentaplegic*, o *dpp)* necesarios para formar las estructuras dorsales. Dpp, una señal del tipo TGFβ producida en las células dorsales, funciona de modo graduado para especificar las células dorsales. Los homólogos de Dpp en los vertebrados (proteínas BMP) también actúan en el modelado dorsoventral.
- El modelado anteroposterior temprano en *Drosophila* produce un gradiente anterior → posterior de Hunchback (Hb), un factor de transcripción que estimula los destinos celulares anteriores. La transcripción del gen *hb* embrionario es activada por la proteína Bicoid, que se localiza en la parte anterior (véase fig. 15-20).
- La proteína Nanos inhibe la traducción de mRNA *hb* materno en la región posterior del embrión de la mosca (véase fig. 15-21). La síntesis de Nanos a partir del mRNA *nanos* materno está restringida a la parte posterior mediante el control de la traducción relacionada con el transporte mediado por la proteína motora de otros reguladores en el polo posterior.

15.4 Creación de límites por combinaciones diferentes de los factores de transcripción

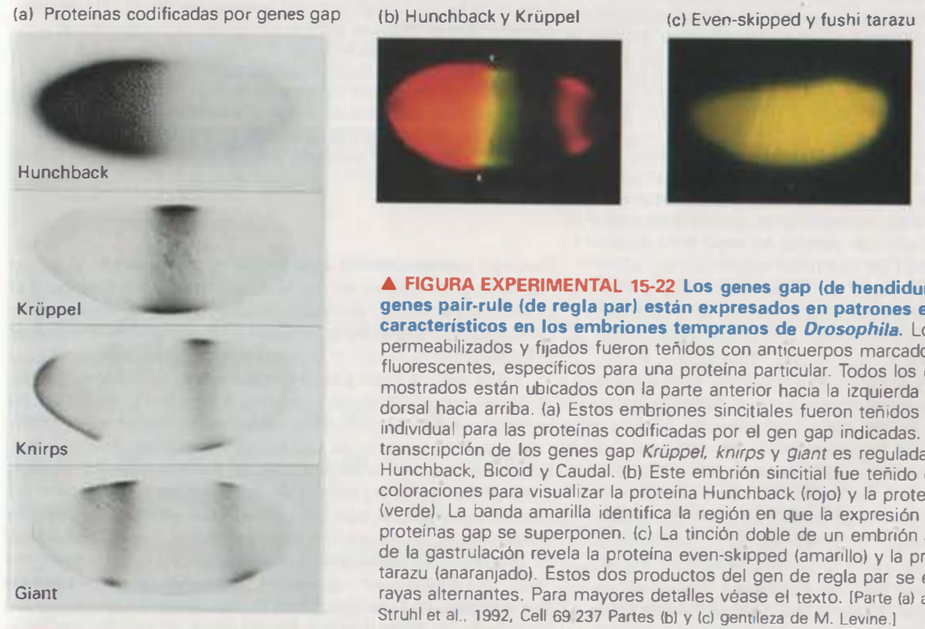
En la sección 15.3, vimos que la proteína Bicoid derivada de la madre desempeña un papel importante en iniciar la transcripción de los genes gap (p. ej., *hunchback)* en la región anterior en los primeros estadios del embrión de la mosca; otros factores maternos impiden la traducción de mRNA *hunchback* en la región posterior. Además, la especificación de los destinos celulares en *Drosophila* es controlada por *cascadas de transcripción* en las cuales un factor de transcripción activa a un gen que codifica otro factor de transcripción que a su vez actúa para estimular la expresión de un tercer factor de transcripción. Esta cascada de transcripción puede generar una población de células que pueden parecerse, pero difieren en el nivel transcripcional.

Las cascadas de transcripción tienen una dimensión temporal y una espacial. Por ejemplo, en cada paso en una cascada, la RNA polimerasa y los ribosomas pueden insumir más de una hora para producir una proteína, lo que depende de la longitud del gen correspondiente. Los factores espaciales entran en escena cuando las células en posiciones diferentes dentro de un embrión sintetizan los distintos factores de transcripción. En esta sección, continuamos la historia del modelado temprano en *Drosophila* que ilustra ambos aspectos, espacial y temporal, de las cascadas de transcripción. Los principios aprendidos del estudio del desarrollo de *Drosophila* se aplican ampliamente a la creación de la forma y el modelo en todos los organismos incluso los vegetales, como se describe al final de esta sección. Los errores en los genes que controlan la organización, la formación del límite y el tipo celular se asocian con muchas enfermedades humanas.

Los genes gap (de hendidura) de *Drosophila* se transcriben en bandas amplias de células y se regulan entre sí

El bosquejo general de los destinos celulares que está determinado en el embrión sincitial de la mosca es perfeccionado en un sistema para controlar de manera precisa los destinos de células individuales. El descubrimiento de reguladores importantes proviene de un estudio genético sistemático para mutantes con segmentos corporales del embrión alterados. Los segmentos del cuerpo embrionario siguen su crecimiento con el patrón de bandas familiar observado en cualquier avispón de paso. Además de *hunchback*, otros cuatro genes gap –*Krüppel*, *knirps*, *giant* y *tailless*– se transcriben en dominios espaciales específicos, que comienzan alrededor de 2 horas después de la fecundación y justo antes de que se complete la celularización del embrión (fig. 15-22a).

Todas las proteínas de genes gap son factores de transcripción. Debido a que estas proteínas están distribuidas en picos máximos amplios superpuestos (fig. 15-22b), cada célula a lo largo del eje anteroposterior contiene una combinación particular de proteínas de genes gap que activan o reprimen genes específicos dentro de esa célula. De hecho, sucede algo parecido a una batalla, debido a que algunas proteínas gap reprimen la transcripción de genes que codifican otras proteínas gap. Si bien no tienen ligandos extracelulares conocidos, algunas proteínas gap se parecen a receptores nucleares, que son proteínas intracelulares que se fijan a ligandos lipófilos (p. ej., hormonas esteroides) capaces de atravesar la membrana plasmática. La mayoría de los complejos ligando-receptor nuclear funcionan como factores de transcripción (véase fig. 11-44). La similitud de la secuencia entre las proteínas gap (de hendidura) y los receptores nucleares sugiere que los genes gap pueden haber evolucionado de genes cuya transcripción era controlada por señales que podrían atravesar las membranas, como las hormonas esteroides. El uso de estos genes controlados por señales, más que las cascadas de transcripción, podría explicar cómo la especificación del destino celular temprano opera en animales que no tienen un estadio sincitial.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 15-22 Los genes gap (de hendidura) y los genes pair-rule (de regla par) están expresados en patrones espaciales característicos en los embriones tempranos de *Drosophila*. Los embriones permeabilizados y fijados fueron teñidos con anticuerpos marcados con fluorescentes, específicos para una proteína particular. Todos los embriones mostrados están ubicados con la parte anterior hacia la izquierda y la parte dorsal hacia arriba. (a) Estos embriones sincitiales fueron teñidos de manera individual para las proteínas codificadas por el gen gap indicadas. La transcripción de los genes gap *Krüppel, knirps* y *giant* es regulada por Hunchback, Bicoid y Caudal. (b) Este embrión sincitial fue teñido con dos coloraciones para visualizar la proteína Hunchback (rojo) y la proteína Krüppel (verde). La banda amarilla identifica la región en que la expresión de estas dos proteínas gap se superponen. (c) La tinción doble de un embrión al comienzo de la gastrulación revela la proteína even-skipped (amarillo) y la proteína Fushi tarazu (anaranjado). Estos dos productos del gen de regla par se expresan en rayas alternantes. Para mayores detalles véase el texto. [Parte (a) adaptado de G. Struhl et al., 1992, Cell 69:237 Partes (b) y (c) gentileza de M. Levine.]

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Expresión de los genes de segmentación en un embrión de *Drosophila*

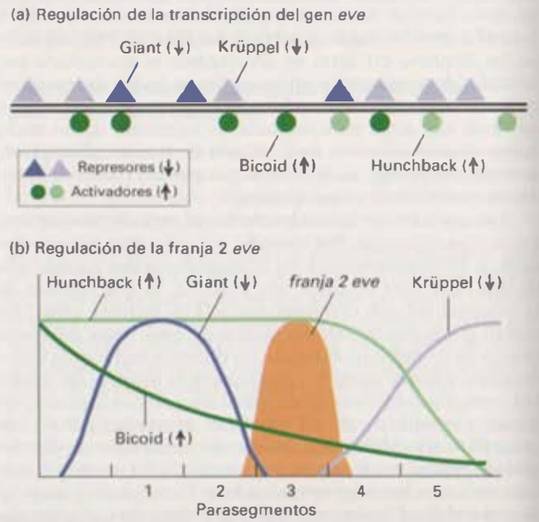
Los destinos de células distribuidos a lo largo del eje anteroposterior son especificados temprano en el desarrollo de la mosca. Al mismo tiempo, las células responden al sistema de control dorsoventral. Así, cada célula se especifica de manera singular a lo largo de ambos ejes, en una grilla bidimensional. Si cada uno de los cinco genes gap se expresara en su propia sección del embrión, sólo en una concentración, podrían formarse únicamente cinco tipos celulares. La situación real permite una diversidad mucho mayor entre las células. Como ya se mencionó, la cantidad de cada proteína gap varía de baja a alta a baja a lo largo del eje anteroposterior y los dominios de expresión de los genes gap diferentes se superponen. Esta complejidad crea combinaciones de factores de transcripción que conducen a la creación de muchos más de cinco tipos celulares. Es necesario recordar que el paso siguiente en el proceso de desarrollo de *Drosophila* genera un patrón de repetición de tipos celulares a partir del patrón de no repetición bastante caótico de los dominios de expresión del gen gap.

Combinaciones de proteínas gap (de hendidura) dirigen la transcripción de genes de regla par *(pair-rule)* en franjas

Nuestras vértebras y los segmentos del cuerpo de un insecto son ejemplos de una táctica empleada con frecuencia en la estructura y partitura del animal: repeticiones con variaciones. El primer signo de estas repeticiones en los embriones de la mosca es un patrón de franjas repetidas de transcripción de ocho genes que en conjunto se denominan genes regla par o de ***pair-rule***. El cuerpo de una larva de mosca consiste en 14 segmentos y cada gen de regla par es transcripto en la mitad de su primordio, o siete franjas, separadas por "interfranjas" donde el gen de regla par no se transcribe (fig. 15-22c). Los embriones mutantes que carecen de la función de un gen de regla par tienen sus segmentos corporales fusionados de un modo par; de ahí el nombre de esta clase de genes. La expresión de las franjas para cada gen de regla par en parte se superpone con la de otros genes de regla par; de modo que cada gen debe estar respondiendo de una manera singular al gen gap y otros reguladores más tempranos.

La transcripción de tres genes de regla par "primarios" es controlada por factores de transcripción codificados por los genes gap y maternos. Dado que los genes gap y maternos se expresan en bandas amplias, no repetitivas, surge el interrogante: ¿cómo puede conferir este patrón no repetitivo de actividades del gen un patrón de repetición como la expresión en franjas de los genes de regla par? Para responder a esta pregunta, consideramos la transcripción del gen *even-skipped* (*eve*) en la franja 2, que es controlado por la proteína Bicoid derivada de la madre y las proteínas gap Hunchback, Krüppel y Giant. Estos cuatro factores de transcripción se fijan a un conjunto agrupado de sitios reguladores, o potenciadores, localizado en dirección 5' del promotor *eve* (fig. 15-23a). Hunchback y Bicold activan la transcripción de *eve* en un dominio espacial amplio, mientras que Krüppel y Giant reprimen la transcripción de *eve*, lo que crea límites posterior y anterior nítidos. Los efectos combinados de estas proteínas, cada una de las cuales tienen un gradiente de concentración singular a lo largo del eje anteroposterior, demarcan en un comienzo los límites de expresión de la franja 2 (fig. 15-23b).

El patrón inicial de las franjas de regla par, que no es muy nítido ni preciso, se agudiza por autorregulación. La proteína



▲ Fig. 15-23. Expresión de la franja 2 Even-skipped (Eve) en el embrión de *Drosophila*. (a) Diagrama de un potenciador de 815 pb que controla la transcripción del gen de regla par (pair-rule) *eve*. Esta región reguladora contiene los sitios de fijación para las proteínas Bicoid y Hunchback, que activan la transcripción de *eve* y para las proteínas Giant y Krüppel, que reprimen su transcripción. El potenciador se muestra con todos los sitios de fijación ocupados, pero en una ocupación de sitios del embrión variará con la posición a lo largo del eje anterior/posterior. (b) Gradientes de concentración y de las cuatro proteínas que regulan la franja 2 *eve*. El efecto coordinado de los dos represores (↓) y los dos activadores (↑) determina los límites precisos de la segunda franja *eve* anterior. Sólo en la región anaranjada está la combinación de reguladores correcta para el gen *eve* por ser transcripto en respuesta al elemento de control de la franja 2. Posteriormente, Giant anterior se desactiva; luego Krüppel posterior se desactiva y el nivel de activador Bicoid es demasiado bajo. La expresión de otras franjas es regulada en forma independiente por otras combinaciones de factores de transcripción que se fijan a los potenciadores no mostrados en la parte (a). (Véase S. Small et al., 1991, Genes & Devel. 8:827.)

Eve, por ejemplo, se fija a su propio gen y aumenta la transcripción en las franjas, un circuito autorregulador positivo. Esta intensificación no sucede en los bordes de las franjas donde la concentración de la proteína Eve es baja; de modo que el límite entre la franja y la interfranja está bien ajustado.

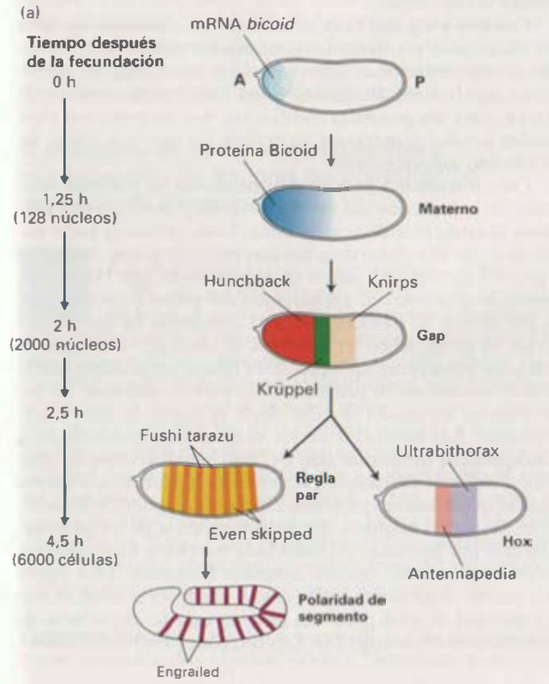
Cada gen de regla par está regulado por múltiples potenciadores, organizados en módulos. Cada franja se forma en respuesta a una combinación diferente de reguladores transcripcionales que actúa en un módulo específico, de modo que las distribuciones no repetitivas de los reguladores pueden crear patrones de repetición de la represión y activación del gen de regla par. Si aún un potenciador está unido por una combinación de activación de reguladores transcripcionales, la presencia de otros potenciadores en un estado inactivo, "off" (no fijado a un regulador) no evitará la transcripción. Por ejemplo, en la franja 2 Eve, la combinación correcta y las cantidades de Hunchback y Bicoid crean un estado "on" que

activa la transcripción aun cuando otros potenciadores estén presentes en el estado inactivo. En cada franja, al menos un potenciador está fijado por una combinación activante de reguladores. Nótese que este sistema de control génico es flexible y podría utilizarse para producir patrones de transcripción no repetitivos si eso fuera útil para un animal.

Respuestas similares para los genes gap y las proteínas maternas gobiernan los patrones de transcripción de las franjas de los otros dos genes de regla par primarios, *runt* y *hairy*. Dado que los potenciadores de *runt* y *hairy* responden a combinaciones diferentes de reguladores, la expresión de las franjas *eve*, *runt* y *hairy* en parte se superponen entre sí, con cada franja de cualquier gen compensada por una franja para otro gen. Luego, otros genes de regla par (secundarios), incluso *fushi tarazu* (*ftz*) y *paired*, se activan en respuesta a las proteínas Eve, Runt y Hairy, que son factores de transcripción, así como para las proteínas maternas y gap. El resultado es un patrón complejo de franjas superpuestas.

En los embriones tempranos cada segmento primordio tiene alrededor de cuatro células de ancho a lo largo del eje anteroposterior, que corresponde al ancho aproximado de las franjas de expresión de la regla par. Con los genes de regla par activos en modelos alternantes de cuatro activados y cuatro inactivos, la unidad de repetición tiene alrededor de ocho células. Cada célula expresa una combinación de factores de transcripción que pueden potencialmente distinguirla de cualquiera de las otras siete células en la unidad de repetición. La segmentación completa del embrión en unidades de repetición en las cuales cada célula exhibe un patrón transcripcional singular depende de la activación de un tercer conjunto de genes, los genes de polaridad segmentaria. Estos genes, que incluyen *engrailed* (*en*) y *wingless* (*wg*), también se expresan en las franjas, pero éstas son más angostas y aparecen una vez en cada segmento primordio. Dado que algunos genes de polaridad segmentaria codifican componentes de los sistemas de señalización entre las células, se describen en la sección 15.5.

La figura 15-24a esquematiza la distribución de algunos reguladores importantes en el embrión de *Drosophila* durante las primeras horas después de la fecundación. Cuando todos los genes de segmentación fueron activados, la exactitud resultante de la especificación del destino celular de la célula individual es impresionante, como ilustra el ejemplo de la figura 15-24b.



◀ Fig. 15-24. Resumen de la expresión secuencial, localizada en forma espacial de genes seleccionados en el desarrollo temprano del embrión de *Drosophila*. (a) El mRNA *bicoid* materno está localizado en el polo anterior del huevo, pero la proteína Bicoid, que se sintetiza poco después de la fecundación, se difunde para formar un gradiente en el sincitio de la mosca. En la mayoría de los casos, un mRNA y su proteína correspondiente están presentes en las mismas regiones del embrión. Las combinaciones específicas de Bicoid y diversos productos del gen gap, que incluyen Hunchback, Krüppel y Knirps, controlan la transcripción de los genes de regla par (pair-rule) como *fushi tarazu* (*ftz*) y *even-skipped* (*eve*). Los productos del gen gap se muestran en bandas separadas, pero en realidad se superponen. Las proteínas de regla par demarcan 14 franjas que corresponden a los parasegmentos (una forma de copia [offset] del segmento primordial). El gen de la polaridad de segmento (segment-polarity) *engrailed (en)* se expresa en el extremo anterior de cada parasegmento; éste y otros genes de polaridad del segmento participan en el modelado de cada parasegmento. La celularización sucede después de 2,5 horas y la gastrulación alrededor de 4,5 horas. En este momento, cada parasegmento consiste en cuatro cinturones de células. (b) Dentro de un parasegmento, cada cinturón de células (representado por un círculo) está caracterizado por la expresión de un único conjunto de proteínas codificadas por los genes de regla par y polaridad de segmento. Aquí se muestran las ubicaciones de tres proteínas de regla par y dos proteínas de polaridad de segmento en tres parasegmentos (4-6). Estos patrones de expresión actúan como valores posicionales que caracterizan de modo singular cada cinturón celular en un parasegmento y determinan dónde son transcriptos los genes Hox como *Antennapedia* (*Antp*) y *Ultrabithorax* (*Ubx*). Los genes Hox dan a los segmentos repetidos del cuerpo sus formas y accesorios distintos (indicados en la parte inferior). La expresión del gen Hox está regulada por los genes gap, de regla par y polaridad de segmento.

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Expresión de los genes de segmentación en un embrión de *Drosophila*

Las proteínas de segmentación maternas y cigóticas regulan la expresión de genes homeóticos (Hox)

Como vimos recientemente, la transcripción controlada en forma espacial de los conjuntos de genes de regla par establece unidades de repetición dentro de la hoja inicial de células que componen el embrión temprano de *Drosophila*. Más tarde, estas unidades de repetición deben diversificarse: sólo algunas de ellas producirán anexos y también se especializarán internamente. Esta diversificación temprana de los segmentos del cuerpo depende de los genes Hox, que son interruptores importantes que controlan las identidades celulares y de hecho las identidades de partes enteras de un animal.

Las mutaciones en los genes Hox a menudo causan homeosis; es decir, la formación de una parte del cuerpo que tiene las características que normalmente se encuentran en otra parte en un sitio diferente. Por ejemplo, las moscas desarrollan patas en su cabeza en lugar de antenas. La pérdida de función de un gen Hox particular en una situación donde es normalmente activo conduce a la homeosis si un gen Hox diferente se torna deprimido allí; el resultado es la formación de células y estructuras características del gen deprimido. Un gen Hox que se expresa en forma anormal donde es normalmente inactivo puede asumir e imponer su propia vía de desarrollo en su nueva situación (fig. 15-25).

Los genes Hox codifican factores de transcripción muy relacionados que contienen el motivo homeodominio. Los estudios genéticos clásicos en *Drosophila* llevaron al descubrimiento de los primeros genes Hox (p. ej., *Antennapedia* y *Ultrabithorax)*. Con posterioridad, se identificaron genes correspondientes con funciones similares (ortólogos) en la mayoría de las especies animales. Cada gen Hox es transcripto en una región particular a lo largo del eje anteroposterior en una disposición notable donde el orden de los genes a lo largo de los cromosomas es colineal con el orden en los que ellos se expresan a lo largo del eje anteroposterior. En un extremo del complejo se ubican los genes de la cabeza y los genes expresados con límites progresivamente más posteriores están en orden, con los genes de la "cola" en último lugar. Los dominios de expresión del gen Hox pueden superponerse (véase fig. 15-24). En *Drosophila*, el patrón espacial de la transcripción del gen Hox está regulado por factores de transcripción maternos, gap y de regla par. La proteína codificada por un gen Hox particular controla la organización de células dentro de la región en la cual se expresa ese gen Hox. Por ejemplo, una proteína Hox puede dirigir o evitar la producción local de una proteína de señalización secretada, el receptor de la superficie celular o el factor de transcripción que se necesita para formar un anexo sobre un segmento particular del cuerpo.

Las proteínas Hox de *Drosophila* controlan la transcripción de genes diana cuyas proteínas codificadas determinan las diversas morfologías de los segmentos del cuerpo. Las proteínas Hox de los vertebrados controlan de manera similar las morfologías diferentes de los vertebrados, de segmentos repetidos del rombencéfalo y de los dedos de los miembros. La asociación de proteínas Hox con sus sitios de fijación en el DNA está ayudada por cofactores que se fijan a ambas proteínas Hox y al DNA, lo cual agrega especificidad y afinidad a estas interacciones.

Cuando los genes Hox se activan, su transcripción debe continuar para mantener las propiedades celulares en las localizaciones específicas. Como en el gen *even-skipped*, las regiones reguladoras de algunos genes Hox contienen sitios de fijación para sus proteínas codificadas. Así, las proteínas Hox pueden ayudar a mantener su propia expresión a través de un circuito autorregulador.

Otro mecanismo para el mantenimiento de patrones normales de la expresión del gen Hox requiere proteínas que modulan la estructura de la cromatina. Estas proteínas están codificadas por dos clases de genes denominados grupo Trithorax y grupo Polycomb. El patrón de expresión del gen Hox en un comienzo es normal en los mutantes del grupo Polycomb, pero por último la transcripción está deprimida en los lugares donde los genes deben ser inactivos. El resultado son transformaciones homeóticas múltiples. Esta observación indica que la función normal de las proteínas Polycomb es mantener los genes Hox en un estado inactivo desde el punto de vista transcripcional. Los resultados de los estudios inmunohistológicos y bioquímicos mostraron que las proteínas Polycomb se fijan a localizaciones cromosómicas múltiples y forman complejos grandes que contienen proteínas diferentes del grupo Polycomb. La visión actual es que la represión transitoria de los genes establecida por proteínas del modelado temprano en el desarrollo está "encerrada" por las proteínas Polycomb. Esta represión estable dependiente de Polycomb puede ser el resultado de la capacidad de estas proteínas de congregar las estructuras de cromatina inactiva (cap. 11). Los complejos Polycomb contienen muchas proteínas, como desacetilasas de la histona y parecen inactivar la transcripción mediante la modificación de las histonas para estimular el silenciamiento del gen.

Por cuanto las proteínas Polycomb reprimen la expresión de ciertos genes Hox, las proteínas codificadas por el grupo de genes Trithorax son necesarias para mantener la expresión de genes Hox. Como las proteínas Polycomb, las proteínas Trithorax se fijan a sitios cromosómicos múltiples y forman complejos multiproteicos grandes, algunos con una masa de 2×10^6 Da, cerca de la mitad del tamaño de un ribosoma. Algunas proteínas del grupo Trithorax son homólogas a las proteínas Swi/Snf de las levaduras, cruciales para la activación transcripcional de muchos genes de levaduras. Las proteínas Trithorax estimulan la expresión génica mediante el remodelado selectivo de la estructura de la cromatina de ciertos locus a una forma activa desde el punto de vista transcripcional (véase fig. 11-37). El centro de cada complejo es una ATPasa, a menudo de la clase Brm de proteínas. Hay evidencia de que la mayoría de los genes requieren estos complejos para que tenga lugar la transcripción.



Normal



Mutante *Ubx*

▲ FIGURA EXPERIMENTAL 15-25 La expresión incorrecta del gen *Ultrabithorax* (*Ubx*) conduce al desarrollo de un segundo par de alas en *Drosophila*. Como otros genes Hox, *Ubx* controla la organización de células dentro de la región en la cual se expresa (véase fig. 15-24b). Las mutaciones en los genes Hox suelen conducir a la formación de una parte del cuerpo donde normalmente no existe. En este caso la pérdida de la función de *Ubx* del tercer segmento torácico permite que se formen alas donde de manera habitual sólo hay órganos balanceadores denominados balancines. (De E. B. Lewis, 1978, *Nature* 276:565; las fotografías son gentileza de E. B. Lewis. Reimpreso con autorización de *Nature*, copyright 1978, Macmillan Journals Limited.)

El desarrollo de la flor también requiere la producción de factores de transcripción regulada en forma espacial



Los mecanismos básicos que controlan el desarrollo en las plantas son muy similares a los de *Drosophila*: la producción diferencial de factores de transcripción, controlada en el espacio y en el tiempo, que especifica las identidades celulares. Nuestra comprensión del control de la identidad celular en las plantas se benefició en gran medida por la elección de *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo. Esta planta tiene muchas de las mismas ventajas que las moscas y los gusanos para el uso como sistema modelo: crece con facilidad, pueden obtenerse mutantes y pueden formarse plantas transgénicas. Nos centraremos en ciertos mecanismos de control de transcripción que regulan la formación de identidad celular en las flores. Estos mecanismos tienen notables similitudes con los que controlan la especificación del tipo celular y regional anteroposterior en levaduras y animales.

Órganos florales. Una flor comprende cuatro órganos diferentes denominados sépalos, pétalos, estambres y carpelos, dispuestos en círculos concéntricos denominados espiras. La espira 1 es la más externa; la espira 4, la más interna. *Arabidopsis* tiene un conjunto completo de órganos florales, que incluyen cuatro sépalos en la espira 1, cuatro pétalos en la espira 2, seis estambres en la espira 3 y dos carpelos que contienen los ovarios en la espira 4 (fig. 15-26a). Estos órganos crecen a partir de una colección de células indiferenciadas, indistinguibles desde el punto de vista morfológico, denominada meristema floral. Cuando las células dentro del centro del meristema floral se dividen, se forman de modo secuencial cuatro anillos concéntricos de primordio. El primordio del anillo exterior, que da lugar a los sépalos, se forma primero, seguido por el primordio que da lugar a los pétalos, luego los primordios del estambre y del carpelo.

Genes de identidad de los órganos florales. Los estudios genéticos mostraron que el desarrollo normal de la flor requiere tres clases de genes de identidad de los órganos florales, designados genes A, B y C. Las mutaciones en estos genes producen fenotipos equivalentes a los asociados con las mutaciones homeóticas en las moscas y los mamíferos; es decir, una parte del cuerpo es reemplazado por otro. En las plantas que carecen de todas las funciones A, B y C, los órganos florales se desarrollan como hojas (fig. 15-26b).

La figura 15-27 resume las mutaciones con pérdida de funciones que condujeron a la identificación de las clases de genes A, B y C. Sobre la base de estos fenotipos homeóticos, los científicos propusieron un modelo para explicar cómo las tres clases de genes controlan la identidad del órgano floral. Según este modelo ABC para la especificación de los órganos florales, los genes clase A especifican la identidad del sépalo en la espira 1 y no requieren los genes clase B ni C para hacerlo. De manera similar, los genes clase C especifican la identidad del carpelo en la espira 4 y, de nuevo, lo hacen de modo independiente de los genes clase A y B. Por el contrario de lo que sucede con estas estructuras, que están especificadas sólo por una clase individual de genes, los pétalos en la espira 2 están especificados por genes de la clase A y B, y los estambres en la espira 3 están especificados por los genes clase B y C. Para explicar los efectos observados al eliminar los genes A o C, el modelo también postula que los genes A reprimen los genes C en las espiras 1 y 2 y, a la inversa, los genes C reprimen los genes A en las espiras 3 y 4. Para determinar si los patrones de expresión real de los genes clase A, B y C son compatibles con este modelo, los investigadores clonaron es-

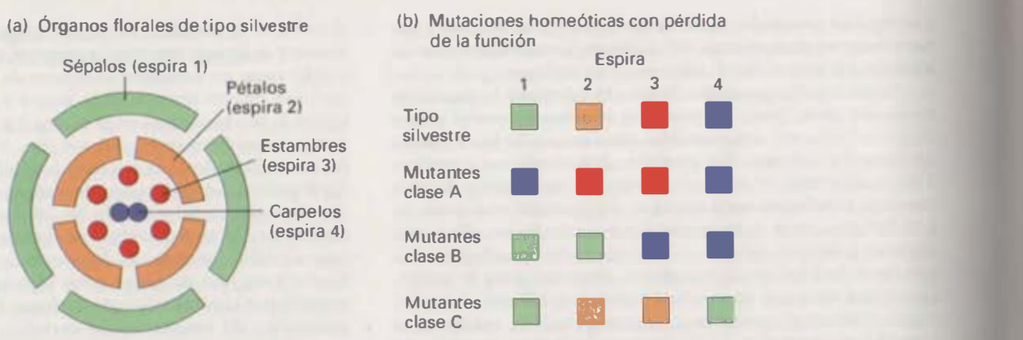
(a)



(b)



◀ FIGURA EXPERIMENTAL 15-26 Las mutaciones en los genes de identidad del órgano floral producen fenotipos homeóticos. (a) Las flores de tipo silvestre *Arabidopsis thaliana* tienen cuatro sépalos en la espira 1, cuatro pétalos en la espira 2, seis estambres en la espira 3 y dos carpelos en la espira 4. (b) En *Arabidopsis* con mutaciones en la totalidad de las tres clases de genes de identidad del órgano floral, los cuatro órganos florales se transforman en estructuras similares a hojas. (De D. Weigel y E. M. Meyerowitz, 1994, *Cell* 78:203; gentileza de E. M. Meyerowitz.)

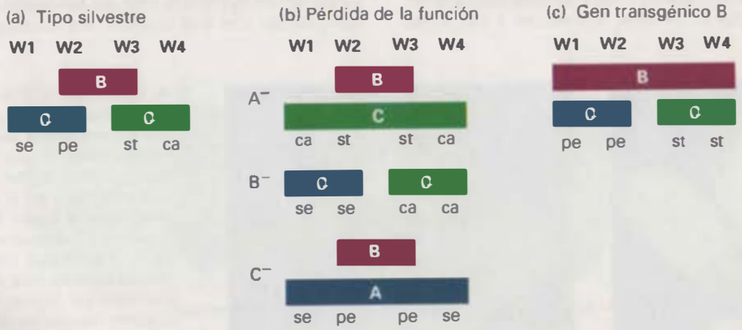


▲ FIGURA EXPERIMENTAL 15-27 El análisis fenotípico identificó tres clases de genes que controlan la especificación de órganos florales en *Arabidopsis*. (a) Diagrama de la disposición de órganos florales de tipo silvestre que se encuentran en espiras concéntricas. (b) Efecto de las mutaciones con pérdida de función que conducen a transformaciones de un órgano en otro. Las mutaciones clase A afectan la identidad del órgano en las espiras 1 y 2: los sépalos (verde) se convierten en carpelos (azul) y los pétalos (anaranjado) en estambres (rojo). Las mutaciones clase B causan transformación de las espiras 2 y 3: los pétalos se convierten en sépalos y los estambres en carpelos. En las mutaciones de clase C, las espiras 3 y 4 se transforman: los estambres en pétalos y los carpelos en sépalos. (Véase D. Wiegel y E. M. Meyerowitz, 1994, *Cell* 78:203.)

tos genes y evaluaron los patrones de expresión de sus mRNA en las cuatro espiras en las plantas *Arabidopsis* de tipo silvestre y en las mutantes con pérdida de función (fig. 15-28a, b). Concordante con el modelo ABC, los genes A se expresan en las espiras 1 y 2, los genes B en las espiras 2 y 3 y los genes C en las espiras 3 y 4. Además, en los mutantes clase A, los genes de clase C también se expresan en el órgano primordio de las espiras 1 y 2; de manera similar, en los mutantes de clase C, los genes clase A también están expresados en las espiras 3 y 4. Estos resultados son coincidentes con las transformaciones homeóticas observadas en estas mutantes.

Para probar si estos patrones de expresión son importantes desde el punto de vista funcional, los científicos produjeron plantas transgénicas de *Arabidopsis* en las cuales los genes de identidad del órgano floral estaban expresados en las espiras inadecuadas. Por ejemplo, la introducción de un transgén que porta genes clase B relacionados con un promotor clase A conduce a la expresión ubicua de genes clase B en todas las espiras (fig. 15-28c). En estos transgénicos, la espira 1, ahora bajo el control de genes clase A y B, desarrolla pétalos en lugar de sépalos; asimismo, la espira 4, bajo el control de genes clase B y C, da lugar a estambres en lugar de carpelos. Estos resultados apoyan la importancia funcional del modelo ABC para la especificación de la identidad floral.

La secuenciación de los genes de identidad de los órganos florales reveló muchas proteínas codificadas que pertenecen a la familia MADS de factores de transcripción, que forman homodímeros y heterodímeros. Así, la identidad del órgano floral puede ser especificada por un mecanismo combinatorio en el que las diferencias en las actividades de las diferentes formas homodiméricas y heterodiméricas de las diversas proteínas A, B y C regulan la expresión de genes subordinados hacia el extremo 3' necesarios para la formación de tipos celulares diferentes en cada órgano. Otros factores de transcripción MADS participan en la especificación del tipo celular en levaduras y músculo (capítulo 22). ▮



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 15-28 Los patrones de expresión de los genes clase A, B y C sustentan el modelo ABC de especificación del órgano floral. Aquí se representan los patrones de expresión observados en los genes de identidad de órganos florales en *Arabidopsis* de tipo silvestre, mutante y transgénico. Las barras coloreadas representan los mRNA A, B y C en cada espira (W1, W2, W3, W4). El órgano floral observado en cada espira se indica como sigue: sépalo: se; pe: pétalos; estambres: st y carpelo: ca. Para más detalles véase el texto. (Véase D. Wiegel y E. M. Meyerowitz, 1994, *Cell* 78:203 y B. A. Krizek y E. M. Meyerowitz, 1996, *Development* 122:11.)

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 15.4

Creación de límites por combinaciones diferentes de los factores de transcripción

- Los gradientes de los factores de transcripción, producidos a partir del mRNA materno en los primeros estadios del embrión de *Drosophila*, controlan la expresión del modelado de los genes embrionarios que conducen a la segmentación del embrión a lo largo del eje anteroposterior.
- Los genes diana cuyas regiones reguladoras contienen potenciadores múltiples se expresan de modo preferencial en regiones específicas del embrión, lo cual depende de las cantidades y las combinaciones de los factores de transcripción que los controlan (véase fig. 15-23).
- Los acontecimientos tempranos del modelado, que utilizan genes maternos, gap (hendidura), de regla par y de polaridad segmentaria, generan un patrón singular de factores de transcripción en regiones diferentes a lo largo del eje anteroposterior de los embriones de *Drosophila* (véase fig. 15-24). Estos factores de transcripción se expresan de modo transitorio y desempeñan un papel esencial en el establecimiento de los dominios en los cuales se expresan los diferentes genes Hox.
- Los genes Hox, que codifican los factores de transcripción, controlan las características morfológicas singulares de las diferentes regiones a lo largo del eje anteroposterior en la mayor parte o todos los animales.
- La expresión errónea de los genes Hox causa transformaciones homeóticas; el desarrollo de partes del cuerpo en posiciones anormales.
- Los patrones de Hox a veces se mantienen mediante circuitos autorreguladores positivos y a través de la modulación de la cromatina por proteínas codificadas por los genes del grupo Polycomb y del grupo Trithorax.
- Tres clases de genes (A, B y C) participan en la especificación de la identidad de los cuatro órganos que constituyen una flor (véase fig. 15-27). Los patrones de expresión de estos genes, muchos de los cuales codifican factores de transcripción, son coherentes con el modelo genético ABC.

15.5 Creación de límites por señales extracelulares

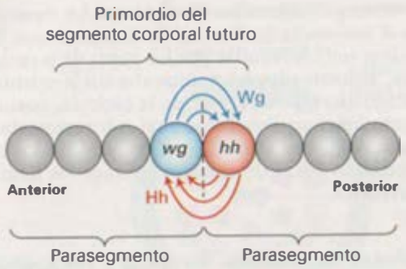
Cuando el embrión sincitial de moscas se convierte en celular y sufre el proceso de gastrulación, el movimiento de proteínas y mRNA a través del citoplasma común de un sincitio ha terminado. La especificación ulterior del destino celular está controlada sobre todo por células que se comunican entre sí por señales extracelulares secretadas. En esta sección, examinamos cómo tres vías de señalización, activadas por Hedgehog (Hh), Wingless (Wg, un miembro de la familia Wnt) y TGFβ, crean límites entre los tipos celulares durante el desarrollo de *Drosophila*. Las proteínas Wingless y Hedgehog son codificadas por los genes de polaridad segmentaria, denominados así porque afectan la orientación de las características de superficie de la cutícula, como cerdas. Los acontecimientos detallados aquí son representativos de lo que sucede en casi todos los tejidos y todos los animales para especificar los tipos celulares y crear los límites entre tipos diferentes.

Dos señales secretadas, Wingless y Hedgehog, crean límites adicionales dentro de los segmentos de embriones celulares de la mosca

Como vimos en la sección 15.4, los 14 segmentos del primordio en el estadio temprano del embrión de *Drosophila* son definidos por diversas proteínas de regla par, con cada proteína localizada en siete franjas que alternan con franjas de células que no forman proteína. El gen de polaridad del segmento *engrailed*, que codifica un factor de transcripción, se expresa en la célula más anterior en cada primordio y forma 14 franjas Engrailed. La transcripción de *engrailed* es activada y reprimida por diversas proteínas de regla par. En cada unidad de repetición de la célula establecida por las proteínas de regla par, el *engrailed* se transcribe en las células 1 y 5. Hay que recordar que las proteínas de regla par producidas en las células 1 a 4 difieren de las producidas en las células 5 a 8 (véase fig. 15-24b). Si bien la regulación transcripcional de *engrailed* es la misma en la célula 1 que en todas las repeticiones de ocho células, no puede ser la misma en las células 1 y 5 de una repetición. Así, dos combinaciones diferentes de proteínas de regla par deben activar la transcripción de *engrailed*; de modo que un patrón de repetición en apariencia simple enmascara una diferencia llamativa en la regulación.

Otro gen de polaridad de segmento denominado *wingless* se activa casi al mismo tiempo que *engrailed*. También se expresa en franjas amplias de células individuales, adyacentes a las franjas de Engrailed y simplemente una célula anterior más alejada (véase fig. 15-24b). Wingless es una proteína de señalización secretada, un miembro de la familia de proteína Wnt, encontrada en la mayoría o en todos los animales. Con la producción de Wingless, las células del embrión de la mosca detienen la ignorancia que existe entre sí y comienza la comunicación a través de señales. En las células adyacentes que producen Engrailed, la señal Wingless mantiene la expresión de otro gen de polaridad de segmento denominado *hedgehog* (*hh*), que también codifica una señal externa. La expresión de *hedgehog* es activada en un comienzo por Engrailed, un factor de transcripción que tiene propiedades tanto de activación como de represión. Engrailed activa *hedgehog* en forma directa y reprime un gen que codifica un represor de *hedgehog*, en consecuencia estimula de manera indirecta la expresión de *hedgehog*. En el embrión de la mosca, las señales Wingless y Hedgehog, producidas en franjas de células adyacentes, forman un circuito de retroalimentación positiva, en la que cada una mantiene la expresión de la otra a través del límite (fig. 15-29).

Las señales Wingless y Hedgehog controlan qué tipos celulares se forman en determinadas posiciones, lo cual crea límites adicionales más allá de los establecidos por las proteínas de regla par. Incluso antes de que se evidencien las



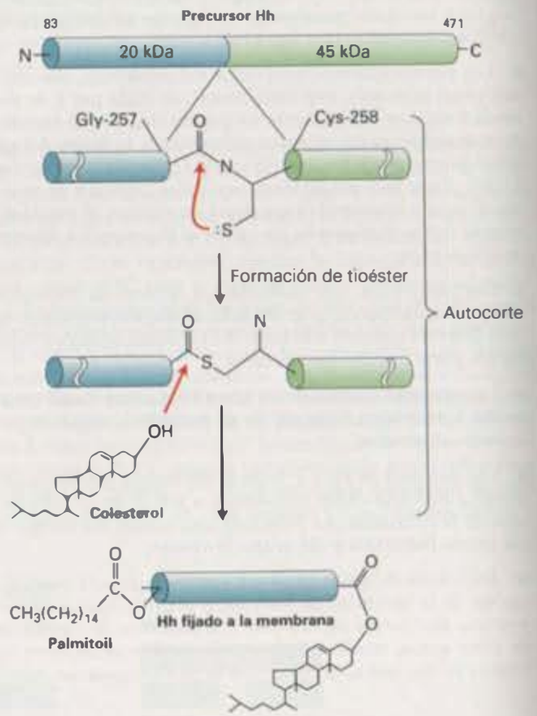
▲ Fig. 15-29. Papel de Hedgehog (Hh) y Wingless (Wg) en la creación del límite entre parasegmentos en el embrión de *Drosophila*. Hedgehog es necesaria para mantener la transcripción de *wingless* y, a la inversa, Wingless se requiere para mantener *hedgehog*. Estas dos señales secretadas desempeñan un papel importante en el modelado de la epidermis. Ambas proteínas de señalización actúan sobre las células, además de las indicadas por las flechas. Actúan a través de las vías de señalización de la transducción de señales mostradas en las figuras 15-31 y 15-32. (Véase M. Hammerschmidt et al., 1997, *Trends Genet.* 13:14.)

características morfológicas inducidas por Wingless o Hedgehog, pueden detectarse los destinos celulares prospectivos mediante la producción de factores de transcripción específicos. Tanto Hedgehog como Wingless pueden actuar como morfógenos, en los que concentraciones diferentes inducen destinos distintos en las células receptoras (véase fig. 15-11b). Las células que reciben una cantidad grande de Wingless activan ciertos genes y forman ciertas estructuras; las células que reciben una cantidad menor desactivan genes diferentes y así forman estructuras distintas. La misma idea se aplica a los efectos de cantidades diferentes de Hedgehog en las células receptoras. Cuando Wingless y Hedgehog se secretan de sus células fuente, en teoría podrían moverse y emitir señales en ambas direcciones. Sin embargo, un trabajo reciente muestra que una señal puede actuar sobre todo en una dirección, anterior en el caso de Wingless. Esta preferencia direccional es el resultado de la destrucción activa de gran parte de la proteína Wingless que se mueve hacia la región posterior.

Después de haber analizado el momento en que las señales de tipo Hedgehog y Wnt de *Drosophila* comienzan a actuar en el desarrollo de la mosca, hacemos hincapié en el funcionamiento de estas vías. Ambas vías participan en el desarrollo de muchos tejidos diferentes en *Drosophila* y la mayoría de los otros animales.

La señalización Hedgehog, que requiere dos proteínas transmembrana, libera la represión de genes diana

La señal Hedgehog es secretada desde las células como una proteína precursora de 45 kDa. El corte de este precursor produce un fragmento N-terminal de 20 kDa, que se asocia con la membrana plasmática y contiene la actividad inductiva y un fragmento C-terminal de 25 kDa. Una serie de experimentos refinados demostró el modo en que el fragmento N-terminal de Hedgehog, que no contiene ninguna secuencia hidrófoba, adquiere afinidad para la membrana. Como se esquematiza en la figura 15-30, este proceso incluye el agregado de colesterol a un residuo de glicina, lo que corta la molécula en dos fragmentos y deja el fragmento de señalización N-terminal con una molécula hidrófoba de colesterol adherida. El dominio C-terminal del precursor, que cataliza esta reacción, se encuentra en otras proteínas y puede estimular el enlace de estas proteínas a las membranas por el mismo mecanismo autoproteolítico. Una segunda modificación al Hedgehog, el agregado de un grupo palmitoil al N-terminal, torna a la proteína aún más hidrófoba. Juntas, las dos modificaciones pueden fijar Hedgehog a las células; en consecuencia, afecta su espectro de acción en el tejido. La restricción espacial desempeña un papel crucial en la represión de los efectos de señales inductivas poderosas.



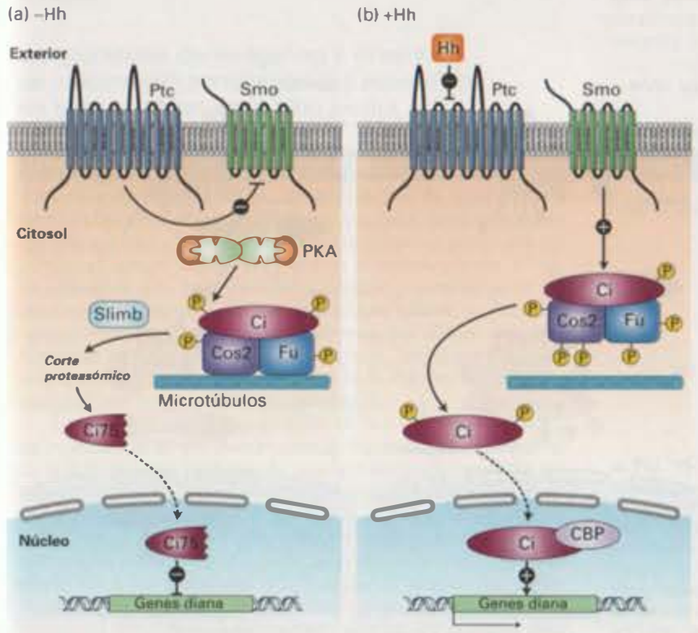
▲ Fig. 15-30. Procesamiento de la proteína precursora Hedgehog (Hh). La eliminación del péptido señal N-terminal del producto de traducción inicial produce un precursor de Hh de 45 kDa que consiste en los residuos 83-471 en la proteína original. El ataque nucleofílico por la cadena lateral tiol de la cisteína 258 (Cys 258) en el carbono carbonilo de la glicina 257 (Gly 257) forma un intermediario tioéster. El dominio C-terminal cataliza la formación de un enlace éster entre el grupo hidroxilo β 3 del colesterol y la glicina 257, por lo cual corta el precursor en dos fragmentos. El fragmento de señalización N-terminal (azul grisáceo) retiene la molécula de colesterol y es modificado por el agregado de un grupo palmitoil al N-terminal. Estas dos anclas hidrófobas fijan el fragmento de señalización a la membrana. (Adaptado de J. A. Porter et al., 1996, *Science* 274:255.)

Los resultados de los estudios genéticos en *Drosophila* indican que se necesitan dos proteínas de membrana, Smoothened (Smo) y Patched (Ptc), para recibir y transducir una señal Hedgehog al interior de la célula. Smoothened tiene siete hélices α transmembrana, de manera similar a los receptores acoplados a la proteína G (cap. 13). Se considera que Patched contiene 12 hélices α transmembrana y es muy similar a la proteína Niemann-Pick C1 (NPC1). Estas proteínas pueden actuar como bombas o transportadores. Como se verá en el capítulo 18, la proteína NPC1 es necesaria para el movimiento intracelular normal de esteroles a través de las vías del tráfico por las vesículas. En los seres humanos, las mutaciones en el gen NPC1 causan un trastorno autosómico recesivo raro marcado por defectos en el manejo lisosómico del colesterol.

Los embriones de *Drosophila* con mutaciones con pérdida de función en los genes *smoothened* o *hedgehog* tienen fenotipos muy similares. Es más, se requieren ambos genes para activar la transcripción de los mismos genes diana (p. ej., *wingless)* durante el desarrollo embrionario. Las mutaciones con pérdida de la función en *patched* producen un fenotipo bastante diferente, similar al efecto de anegamiento del embrión con Hedgehog. Así, Patched parece oponerse a los efectos de Hedgehog y viceversa. Estos hallazgos y los análisis de mutantes dobles sugieren que, en ausencia de Hedgehog, Patched reprime los genes diana mediante la inhibición de una vía de señalización necesaria para la activación del gen. La observación adicional de que Smoothened se requiere para la transcripción de genes diana en mutantes que carecen de la función *patched* coloca a Smoothened corriente abajo en la vía. Es evidente que la fijación de Hedgehog previene a Patched de la acción bloqueadora de Smoothened; en consecuencia, activa la transcripción de los genes diana.

Los resultados de estudios recientes mostraron que, en ausencia de Hedgehog, aumenta el contenido de Patched en la membrana plasmática, si bien Smoothened está en las membranas de las vesículas internas. Cuando las células reciben una señal Hedgehog, tanto Patched como Hedgehog se movilizan desde la superficie celular al interior de las vesículas internas, mientras que Smoothened se moviliza desde las vesículas internas hacia la superficie. La similitud de Patched con la proteína de Niemann-Pick C1, la unión covalente de colesterol a Hedgehog y la propiedad de los análogos del colesterol como ciclopamina para bloquear la recepción de una señal Hedgehog hacen pensar en una posible relación entre el metabolismo del colesterol y la señalización Hedgehog. De hecho, un concepto interesante es que la regulación del desarrollo por el sistema Hedgehog evolucionó desde los componentes celulares más tempranos necesarios para controlar la composición y el movimiento de la vesícula.

La figura 15-31 esquematiza un modelo actual de la *vía Hedgehog*. Si bien los mecanismos de transducción de señales sólo se comprenden en parte, la vía incluye un complejo de proteínas citoplasmáticas que consisten de Fused (Fu), una serina-treonina cinasa; Costal-2 (Cos-2), una proteína similar a la cinesina asociada con el microtúhulo; y Cubitis interruptus (Ci), un factor de transcripción. En ausencia de Hedgehog, cuando Patched inhibe Smoothened, estas tres proteínas forman un complejo que se fija a los microtúbulos en el citoplasma. El corte proteolítico de Ci en este complejo genera un fragmento Ci que se transloca al núcleo y reprime la expresión del gen diana. En presencia de Hedgehog que libe-



◀ Fig. 15-31. Modelo de funcionamiento de la vía de señalización Hedgehog (Hh). (a) En ausencia de Hh, la proteína Patched (Ptc) inhibe la proteína Smoothened (Smo) por un mecanismo desconocido. En ausencia de señalización Smo, un complejo que contiene las proteínas Fused (Fu), Costal 2 (Cos2) y Cubitis interruptus (Ci) se fija a los microtúbulos. Ci es cortada en un proceso que requiere la proteína Slimb de la caja F relacionada con ubicuitina/proteasoma, lo cual genera el fragmento Ci75 que funciona como un represor transcripcional. (b) En presencia de Hh, se elimina la inhibición de Smo por Ptc. La señalización Smo produce la hiperfosforilación de Fu y Cos2 y la disociación del complejo Fu/Cos2/Ci de los microtúbulos. Esto conduce a la estabilización de un Ci de longitud completa, con modificaciones alternadas, que funciona como un activador transcripcional junto con la proteína de fijación CREB (CBP). Se desconocen los compartimientos de la membrana exactos en los cuales Ptc y Smo responden a Hh y la función que cumplen; la señal Hh hace que Ptc se mueva desde la superficie a los compartimientos internos mientras Smo hace lo contrario. (De K. Nybakken y N. Perrimon, 2002, *Curr. Opin. Genet Devel.* 12:503.)

ra la inhibición de Smoothened, el complejo de Fu, Cos-2 y Ci no se asocia con los microtúbulos, la escisión de Ci se bloquea y se genera una forma modificada de manera alternativa de Ci. Después de translocarse al núcleo, esta forma Ci se fija a la proteína de fijación (CBP) del coactivador transcripcional CREB, que estimula la expresión de genes diana. Además de estos componentes, la proteincinasa A participa en el control de genes diana sensibles a Hedgehog, los cuales se activan de manera inadecuada cuando se inactiva la proteincinasa A. La fosforilación de Ci por la proteincinasa A parece estimular el corte proteolítico de Ci.

MEDICINA

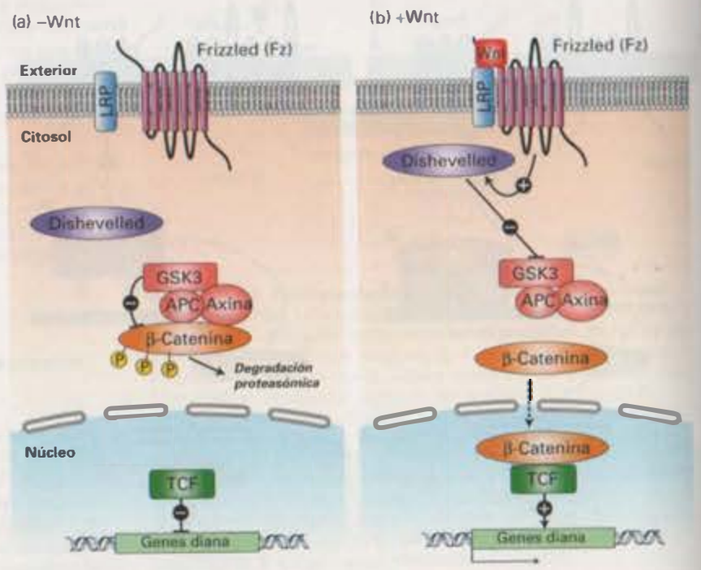
La señalización Hedgehog, que se conserva en todo el reino animal, interviene en la formación de muchos tejidos y órganos. Mutaciones en los componentes de la vía de señalización Hedgehog se han implicado en los defectos del nacimiento como la ciclopía, un ojo solo que resulta de la unión de los primordios cerebrales derecho e izquierdo, y en múltiples formas de cáncer humano. ∎

Las señales Wnt inducen el desensamblaje de un complejo intracelular y liberación de un factor de transcripción

Como ya se describió, el gen de polaridad del segmento *wingless* de *Drosophila* codifica una proteína que pertenece a la familia Wnt de señales secretadas. La inactivación de *wingless* causa defectos en la polaridad segmentaria muy similares a los producidos por la pérdida de función de Hedgehog. Esta observación es razonable porque Hedgehog y Wingless forman un circuito de retroalimentación positiva, donde cada proteína mantiene la producción de la otra (véase fig. 15-29). El primer gen Wnt de los vertebrados descubierto fue un gen murino denominado *Wnt-1* (antes *int-1*). La activación de *int-1* por inserción de un provirus del virus del tumor mamario murino (MMTV) conduce al cáncer mamario. Por lo tanto, *Wnt-1* es un protooncogén, un gen celular normal cuya expresión inadecuada estimula el comienzo del cáncer (cap. 23). La palabra Wnt es una fusión de *wingless*, el gen correspondiente de la mosca, con *int* para la integración de MMTV.

Los estudios genéticos en *Drosophila* y *C. elegans*, los estudios de protooncogenes y genes supresores de tumores en ratones y los estudios de componentes de la unión celular han contribuido a la identificación de muchos componentes de la vía de transducción de la señal Wnt. Como las proteínas Hedgehog, las proteínas Wnt están modificadas por el agregado de un grupo palmitato hidrófobo cerca de su N-terminal, que puede fijarlas a la membrana plasmática de las células secretoras y limitar su espectro de acción. Las proteínas Wnt actúan a través de dos proteínas receptoras de la superficie celular: Frizzled (Fz), que contiene siete hélices α transmembrana y se une de modo directo a Wnt; y Lrp que parece asociarse con Frizzled de una manera dependiente de la señal Wnt, al menos en los embriones de las ranas. Todas las mutaciones en los genes que codifican Wingless, Frizzled o Lrp (denominados Arrow en *Drosophila*) tienen efectos similares en el desarrollo de embriones. La proteína Frizzled y la proteína Smoothened en la señalización Hedgehog tienen similitudes de secuencia y ambas comparten cierto parecido con los receptores acoplados a la proteína G descritos en el capítulo 13. Sin embargo, hasta la fecha las evidencias de la participación de la proteína G corriente abajo de Smoothened o Frizzled son indirectas y poco convincentes.

Un modelo actual de la vía Wnt se muestra en la figura 15-32. El elemento central en la transducción central Wnt intracelular se denomina β-catenina en los vertebrados y Armadillo en *Drosophila*. Esta proteína notable funciona tanto como un activador transcripcional y como una proteína de enlace entre la membrana y el citoesqueleto (véase fig. 6-7). En ausencia de una señal Wnt, la β-catenina es fosforilada por un complejo que contiene GSK3, una proteincinasa; la proteína de la poliposis adenomatosa del colon (APC), un supresor importante de los tumores humanos; y Axin, una proteína plataforma *(scaffold)*. La β-catenina fosforilada sufre la ubicuitinación y luego es degradada en los proteasomas. En presencia de Wnt, β-catenina se estabiliza y se transloca al núcleo. Allí, se cree que se asocia con el factor de transcripción TCF para activar la expresión de genes diana particulares (p. ej., *wg, cyclin D1, myc* y genes metaloproteasa), de acuerdo con el tipo celular. La evidencia reciente sugiere que β-catenina actúa por un mecanismo diferente en el que controla la salida de TCF desde el núcleo y quizá su activación en el citosol.



▶ Fig. 15-32. Modelo de funcionamiento de la vía de señalización Wnt. (a) En ausencia de Wnt, la cinasa GSK3 fosforila de manera constitutiva la β-catenina. Una vez fosforilada, es degradada y en consecuencia no se acumula en las células. La axina es una proteína plataforma *(scaffold)* que forma un complejo con GSK3, β-catenina y APC, lo cual facilita la fosforilación de β-catenina por GSK3 con un factor estimado >20,000. El factor de transcripción TCF en el núcleo actúa como un represor de genes diana a menos que esté alterado por la transducción de la señal Wnt. (b) La fijación de Wnt a su receptor Frizzled (Fz) recluta Dishevelled (Dsh) en la membrana. La activación de Dsh por Fz inhibe GSK3, lo cual permite que la β-catenina no fosforilada se acumule en el citosol. Después de la translocación al núcleo, la β-catenina puede actuar con TCF para activar los genes diana o, de manera alternativa, causar la salida de TCF desde el núcleo y quizá su activación en el citosol. (De R. T. Moon et al., 2002, *Science* 296:644; véase también The Wnt Gene Homepage, www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html.)

Los hallazgos de los estudios genéticos mostraron que la estabilización inducida por Wnt de la β-catenina depende de la proteína Dishevelled (Dsh). En presencia de Wnt, Dsh y la proteína de membrana Lrp parecen interactuar con los componentes del complejo de fosforilación, que en consecuencia inhibe la fosforilación y la degradación ulterior de la β-catenina (véase fig. 15-32b). La importancia de la estabilidad y localización de la β-catenina significa que las señales Wnt afectan un equilibrio crítico entre las tres fuentes de β-catenina en el citoesqueleto, el citosol y el núcleo.

Las señales Wnt ayudan a controlar numerosos acontecimientos críticos del desarrollo, como la gastrulación, el desarrollo del cerebro, el modelado de las extremidades y la organogénesis. El movimiento regulado de Wnt a través del tejido es crítico para establecer los límites colocados de manera adecuada entre los diferentes tipos celulares. Como se verá en el capítulo 23, las alteraciones en la transducción de la señal por la vía Wnt y muchas otras vías de señalización del desarrollo se asocian con diversos cánceres de los seres humanos.

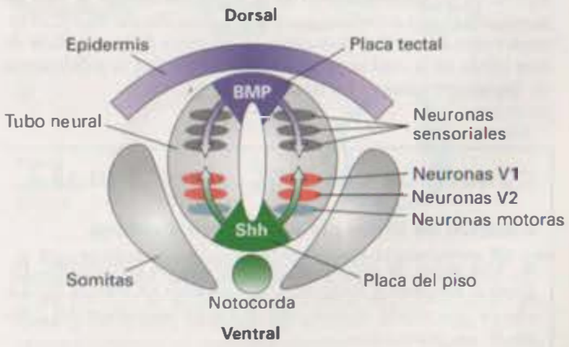
Los gradientes de Hedgehog y el factor de crecimiento transformador β especifican los tipos celulares en el tubo neural

Como hemos visto en *Drosophila*, muchas señales del desarrollo actúan de modo gradual e inducen destinos celulares diferentes de acuerdo con su concentración. El mismo fenómeno existe en los vertebrados; por ejemplo, en el desarrollo del sistema nervioso central de los mamíferos a partir del tubo neural, que se forma temprano en la embriogénesis. El tubo neural es una hoja de células, simple y enrollada, en un comienzo del espesor de una célula. Las células en la parte ventral formarán las neuronas motoras; las células laterales formarán una variedad de interneuronas. Los tipos celulares diferentes pueden distinguirse antes de la diferenciación morfológica por las proteínas que producen.

Las concentraciones graduadas de Sonic hedgehog (Shh), un equivalente de los vertebrados de Hedgehog de *Drosophila*, determinan los destinos de, por lo menos, cuatro tipos celulares en el tubo neural ventral del polluelo. Estas células se encuentran en posiciones diferentes a lo largo del eje dorsoventral en el siguiente orden desde la parte ventral a la dorsal: células de la placa del piso, neuronas motoras, interneuronas V2 e interneuronas V1. Durante el desarrollo, en un inicio Shh se expresa en niveles elevados en la notocorda, una estructura mesodérmica en contacto directo con la región más ventral del tubo neural (fig. 15-33). Con la inducción, las células de la placa del piso también producen Shh y forman un centro de señalización Shh en la región más ventral del tubo neural. Los anticuerpos contra la proteína Shh bloquean la formación de diferentes células ventrales del tubo neural en el polluelo y estos tipos celulares no se forman en ratones homocigotos para las mutaciones en el gen *Sonic hedgehog (Shh)*.

Para determinar si la inducción desencadenada por Shh de las células ventrales del tubo neural es mediante un mecanismo graduado o de retransmisión, los científicos agregaron concentraciones diferentes de Shh a explantes del tubo neural del polluelo. En ausencia de Shh, no se formaron células ventrales. En presencia de concentraciones muy elevadas de Shh, se formaron células de la placa del piso; mientras que a una concentración ligeramente más baja se formaron neuronas motoras. Cuando el nivel de Shh disminuyó a la mitad, sólo se formaron neuronas V2. Por último, sólo se desarrollaron neuronas V1 cuando la concentración de Shh disminuyó otra vez a la mitad. Estos datos sugieren con firmeza que en el tubo neural en desarrollo se forman tipos celulares diferentes en respuesta a un gradiente de Shh ventral → dorsal. Las evidencias crecientes de la existencia de gradientes no descartan señales de retransmisión adicionales que aún pueden descubrirse.

Los destinos celulares en la región dorsal del tubo neural están determinados por las proteínas de BMP (p. ej., BMP4 y BMP7), que pertenecen a la familia TGFβ. Cabe recordar que la proteína Dpp, una señal TGFβ de *Drosophila*, es crítica en la determinación de los destinos celulares dorsales en los estadios tempranos de embriones de la mosca. De hecho, la señalización de TGFβ parece ser un regulador de antigua evolución del modelado dorsoventral. En los embriones vertebrados, las proteínas BMP secretadas a partir de las células ectodérmicas que recubren el lado dorsal del tubo neural promueven la formación de células dorsales como las neuronas sensoriales (véase fig. 15-33). Así, las células en el tubo neural detectan múltiples señales que se originan en sitios opuestos sobre el eje dorsoventral y miden las señales provenientes de ambos orígenes para decidirse por un curso de diferenciación.



▲ Fig. 15-33. Inducción graduada de diferentes tipos celulares en el tubo neural por Sonic Hedgehog (Shh) y señalización BMP. Shh producido en la notocorda induce el desarrollo de la placa del piso. Ésta, a su vez, produce Shh, el cual forma un gradiente ventral → dorsal que induce destinos celulares adicionales En la región dorsal, las proteínas BMP secretadas a partir de las células del ectodermo que la recubren actúan de un modo similar para crear los destinos celulares dorsales. (Véase T. M. Jessell, 2000, *Nature Rev. Genet.* 1:20.)

Los proteoglucanos de la superficie celular influyen en la señalización por algunas vías

¿Cómo se mueven las señales a través o alrededor de las células incluidas en los tejidos? La respuesta completa no se conoce, pero la distancia a la cual puede moverse una señal tiene implicaciones importantes para el tamaño y la forma de los órganos. Por ejemplo, una señal que causa la formación de neuronas creará más neuronas si su espectro de movimiento aumenta. La fijación de las proteínas de señalización a los proteoglucanos de la superficie celular no sólo afecta el espectro del efecto señalado sino que en algunos casos también facilita la señalización. Un proteoglucano consiste en un centro proteico al cual se le unen cadenas de glucosaminoglucano como heparansulfato y condroitinsulfato (véase fig. 6-22). Los proteoglucanos son componentes importantes de la matriz extracelular. Algunos están incluidos en la membrana plasmática mediante un dominio transmembrana hidrófobo o fijado a la membrana por un anclaje lipídico.

La evidencia de la participación de los proteoglucanos en la señalización proviene de los mutantes *sugarless (sgl)* de *Drosophila* que carecen de una enzima importante necesaria para sintetizar heparansulfato (y condroitinsulfato). Estos mutantes exhiben los fenotipos asociados con los defectos en la señalización Wingless y tienen niveles muy deprimidos de la proteína Wingless extracelular, una señal Wnt. Las mutaciones en *dally* y *dally-like*, que codifican el proteico centro de los proteoglucanos de la superficie celular, también se asocian con señalización defectuosa de Wingless.

La vía Wnt no es la única vía de señalización afectada en las mutantes *sugarless* y otras de *Drosophila* con síntesis de proteoglucano deficiente. Por ejemplo, estas mutantes tienen fenotipos (p. ej., ausencia de corazón o de tráquea) que se asocian con pérdida de la función de Heartless y Breathless, que son receptores tirosincinasas que se fijan a proteínas de señalización similares a FGF. Estas mutantes también parecen tener una señalización del TGFβ defectuosa en la metamorfosis, aunque no en los embriones, lo cual sugiere acciones específicas de proteoglucanos. En el capítulo 14 vimos que el receptor para TGFβ tipo III es un proteoglucano de la superficie celular. Si bien no es requerido por completo para la señalización del TGFβ, el receptor tipo III se fija y concentra TGFβ cerca de la superficie de una célula en la cual se produce, por eso facilita la señalización de los receptores tipo I y tipo II (véase fig. 14-2).

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 15.5

Creación de límites por señales extracelulares

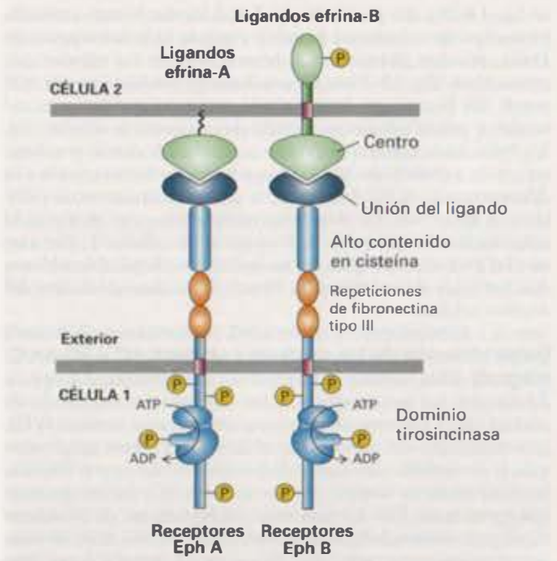
- Tres genes de polaridad segmentaria de *Drosophila*, *engrailed*, *wingless* y *hedgehog*, se expresan en franjas del ancho de una célula en cada uno de los 14 segmentos del cuerpo de los primordios.
- Engrailed, un factor de transcripción, activa la transcripción de Hedgehog que codifica una proteína de señalización secretada.
- Wingless, una proteína de señalización secretada de la familia Wnt, se produce en las franjas adyacentes a las de Engrailed/Hedgehog. Wingless y Hedgehog mantienen la expresión de cada uno de los otros genes en un circuito de retroalimentación positiva (véase fig. 15-29).
- Tanto Hedgehog como Wingless/Wnt contienen anclajes lipídicos que pueden fijarlos a las membranas celulares, en consecuencia, reducen su espectro de señalización.
- La señal Hedgehog actúa a través de dos proteínas de la superficie celular, Smoothened y Patched y un complejo intracelular que contienen el factor de transcripción Cubitis interruptus (Ci) (véase fig. 15-31). En presencia de Hedgehog se genera una forma activadora de Ci; en ausencia de Hedgehog se genera una forma represora. Ambas, Patched y Smoothened, cambian su ubicación subcelular en respuesta a la fijación de Hedgehog a Patched.
- Wingless y otras señales Wnt actúan a través de dos proteínas de la superficie celular, el receptor Frizzled y el correceptor Lrp y un complejo intracelular que contiene β-catenina (véase fig. 15-32). La señalización Wnt promueve la estabilidad y la localización nuclear de β-catenina que, en forma directa o indirecta, estimula la activación del factor de transcripción TCF.
- Los gradientes de dos señales externas, una señal Sonic hedgehog de ventralización y una señal TGFβ de dorsalización, inducen tipos celulares diferentes en el tubo neural de los vertebrados (véase fig. 15-33).
- Los proteoglucanos de la superficie celular fijan algunas proteínas de señalización extracelular, restringen su espectro de acción y las presentan a las proteínas del receptor cercano.
- El cáncer y los defectos del nacimiento suceden cuando los sistemas de señalización Hh, TGFβ o Wnt no actúan de manera adecuada.

15.6 Inducción recíproca e inhibición lateral

En el desarrollo de un organismo, las células deben "hablar" entre sí a fin de asegurarse una división adecuada de las tareas. El resultado de estas comunicaciones intercelulares puede ser un acuerdo sobre qué vía de diferenciación debe seguir cada célula. Por ejemplo, la negociación entre dos células en un inicio equivalentes puede enviar a cada una para continuar vías de desarrollo separadas. El mecanismo por el cual una célula evita que la otra siga una vía particular se denomina *inhibición lateral*, un proceso que impide la duplicación de estructuras a expensas de la falta de formación de algo. De manera alternativa, dos células con destinos distintos pueden enviar y recibir señales entre ellas, lo cual induce a una diferenciación adicional. Esta *inducción recíproca* es común en la formación de órganos internos. En esta sección, consideramos dos sistemas de señalización que median estos diálogos entre las células.

Los ligandos y los receptores para efrina de la superficie celular median la inducción recíproca durante la angiogénesis

Es probable que el tipo más simple de inducción recíproca sea entre células que interactúan a través de dos proteínas de la superficie celular, cada una de las cuales puede actuar como receptor y ligando. Para ilustrar este fenómeno, consi-

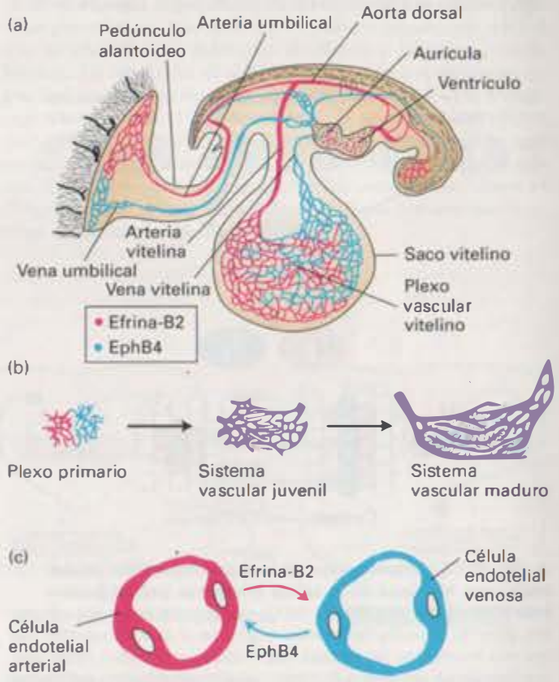


▲ Fig. 15-34. Estructura general de los receptores Eph y sus ligandos. El dominio citosólico de los receptores Eph tiene actividad de tirosincinasa. Dentro de la familia de receptores Eph, los receptores exhiben una homología del 30-70% en sus dominios extracelulares y del 65-90% en sus dominios cinasa. Sus ligandos, las efrinas *(ephrins)*, se unen a la membrana a través de un ancla hidrófoba de GPI (clase A) o son proteínas transmembrana de un solo paso (clase B). Los dominios del centro de varios ligandos efrina muestran una homología del 30-70%. Los ligandos efrina B y sus receptores pueden mediar la señalización recíproca. (Adaptado de V. Dodelet y E. Pasquale, 2000, *Oncogene* 19:5614, véase J. G. Flanagan and P. Vanderhaegen, 1998, *Ann. Rev. Neurosci.* 21:309.)

deramos el papel de las efrinas, una familia de ligandos de la superficie celular, y los receptores Eph en el desarrollo de los vasos sanguíneos de los mamíferos.

Los receptores Eph, un tipo nuevo de receptor tirosincinasa, tienen dos clases de ligandos (fig. 15-34). Los ligandos efrina A están fijados a la membrana plasmática por un ancla de glucosilfosfatidilinositol (GPI). Estos ligandos efrina desempeñan un papel crucial en la formación de conexiones entre las neuronas en el sistema nervioso en desarrollo. Los ligandos efrina B son proteínas transmembrana de un solo paso. Los resultados de los experimentos bioquímicos mostraron que los ligandos efrina B estimulan la fosforilación de tirosina de los receptores EphB y de su propio dominio citosólico. Estas observaciones condujeron al concepto curioso de que los complejos ligando efrina B/receptor EphB estimulan las interacciones recíprocas bidireccionales. Apoyos firmes para esta hipótesis provienen del estudio de la formación de los vasos sanguíneos.

Los vasos sanguíneos, las arterias y las venas forman una red compleja de estructuras ramificadas en el adulto. Una red temprana de vasos se remodela durante la angiogénesis cuando las ramas más grandes se congregan a partir de los vasos de menor tamaño y los vasos se rodean por células de sostén. Los ratones con desactivación génica (*knockout*) que carecen de efrina-B2 exhiben defectos llamativos de la angiogénesis. Este hallazgo condujo a los científicos a explorar el patrón de expresión de la efrina-B2 y su receptor, EphB4, en el embrión en desarrollo (fig. 15-35). En los embriones normales, la efrina-B2 sólo se expresa en las arterias; EphB4, sólo en las venas. Aunque efrina-B2 sólo se expresa en los capilares arteriales, los capilares venosos tampoco sufren angiogénesis en los ratones con desactivación génica para *efrina-b2*. Estos datos sugieren que la interacción entre una célula arterial productora de efrina-B2 y una célula venosa productora de EphB4 causa la inducción de *ambas* células (véase fig. 15-35c). En otros términos, efrina-B2 y EphB4 actúan como un ligando y un receptor para controlar el desarrollo de venas y arterias.

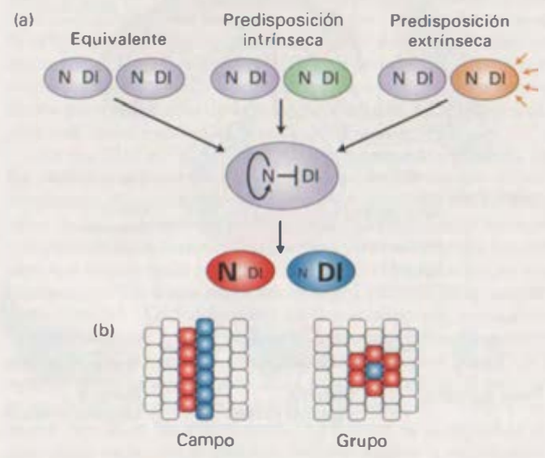


▲ Fig. 15-35. Inducción recíproca mediada por efrina B2 y su receptor, EphB4, en la angiogénesis en el saco vitelino. (a) Efrina B2 (rojo) se expresa en las arterias y EphB4 (azul) en las venas en el estadio temprano del embrión de ratón. (b) La red vascular temprana se remodela durante la angiogénesis. En los ratones con desactivación génica (knockout) para *efrina B2*, la angiogénesis se bloquea en el paso de plexo primario. En consecuencia, la ausencia de efrina B2 interrumpe el desarrollo de arterias y venas. (c) La formación de arterias y venas intercalares es el resultado de interacciones entre las células endoteliales arteriales y venosas en desarrollo mediadas por efrina B2 (arterial) y EphB4 (venoso). Estas interacciones recíprocas inducen el desarrollo de ambos tipos celulares. (Adaptado de H. U. Wang et al., 1998, *Cell* 93:741.)

La vía de señalización Notch conservada media la inhibición lateral

Ahora cambiamos nuestra atención a la inhibición lateral, que causa el desarrollo adyacente de células equivalentes o casi equivalentes para asumir destinos diferentes. Los análisis genéticos en *Drosophila* y *C. elegans* revelaron el papel de la vía Notch/Delta muy conservada en la inhibición lateral. Las proteínas Notch y Delta de *Drosophila* son el receptor y ligando prototipo, respectivamente, en esta vía de señalización. Ambas son proteínas transmembrana grandes cuyos dominios extracelulares contienen repeticiones similares a EGF y sitios de fijación para otra proteína. Aunque Delta es cortada para formar una versión en apariencia soluble de su dominio extracelular, los hallazgos de los estudios con mosaicos genéticos de *Drosophila* mostraron que la señal Delta alcanza sólo las células adyacentes.

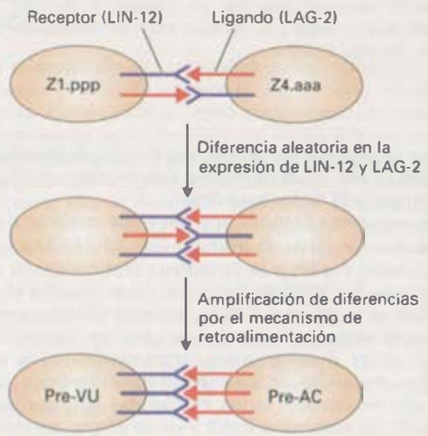
La interacción entre Delta y Notch activa el corte proteolítico de Notch, libera su segmento citosólico, transloca al núcleo y regula la transcripción de genes diana específicos (véase fig. 14-29). En particular, la señalización Notch activa la transcripción del mismo *Notch* y reprime la transcripción de *Delta*, por eso intensifica la diferencia entre las células que interactúan (fig. 15-36a). La señalización mediada por Notch puede dar lugar a un límite nítido entre dos poblaciones celulares o puede señalar una célula de un grupo de células (fig. 15-36b). La señalización Notch controla los destinos celulares en la mayoría de los tejidos y tiene consecuencias en la diferenciación, la proliferación, la creación de asimetría celular y la apoptosis. En el sistema inmunitario, por ejemplo, la señalización Notch evita la formación de células T que atacan las proteínas propias de un individuo. Aquí, describimos dos ejemplos de señalización Notch en la determinación del destino celular.



▲ **Fig. 15-36. Amplificación de una predisposición inicial para crear los tipos de la célula diferentes por inhibición lateral mediada por Notch.** (a) Una diferencia entre dos células inicialmente equivalentes puede originarse al azar *(izquierda)*. De manera alternativa, las células que interactúan pueden tener una predisposición intrínseca *(centro)* o una predisposición extrínseca *(derecha)*. Por ejemplo, las células que han recibido proteínas diferentes en una división celular asimétrica tendrían una predisposición intrínseca; las que han recibido señales diferentes (anaranjado) tendrían una predisposición extrínseca. Sin tener en cuenta el modo en que se origina esa predisposición inicial pequeña, Notch se torna predominante en una de las dos células, lo cual estimula su propia expresión y la producción y reprime la producción de su ligando Delta en esa célula. En la otra célula, predomina Delta. El resultado es el refuerzo de la diferencia inicial pequeña. (b) La inhibición lateral mediada por Notch puede crear un límite marcado en un campo inicial de células, como a lo largo del borde del ala en desarrollo de *Drosophila*, o distingue una célula central de un grupo de células circundantes, como en el establecimiento del precursor neural. (Adaptado de S. Artavanis-Tsakonas et al., 1999, *Science* 284:770.)

Determinación de los destinos celulares AC y VU en *C. elegans* Dos células equivalentes, designadas Z1.ppp y Z4.aaa, en los nematodos pueden dar lugar a una célula de anclaje (AC) o a una célula precursora uterina ventral (VU). Los resultados de estudios de ablación con láser mostraron que, si se elimina cualquiera de las células, Z1.ppp o Z4.aaa, la célula restante siempre se convierte en AC. En los gusanos que carecen de LIN-12 funcional, el homólogo de Notch en *C. elegans*, ambas células se transforman en AC. A la inversa, la activación constitutiva de LIN-12 en Z1.ppp y Z4.aaa produce que ambas células se conviertan en VU. En consecuencia, los niveles de actividad de LIN-12 especifican los destinos celulares a AC y VU.

Z1.ppp y Z4.aaa producen el receptor, LIN-12 y su ligando, el homólogo de Delta LAG-2, en niveles similares (fig. 15-37). A medida que el desarrollo prosigue, una célula comienza a expresar más receptor a través de fluctuaciones aleatorias en los niveles de proteínas o diferencias en el nivel de



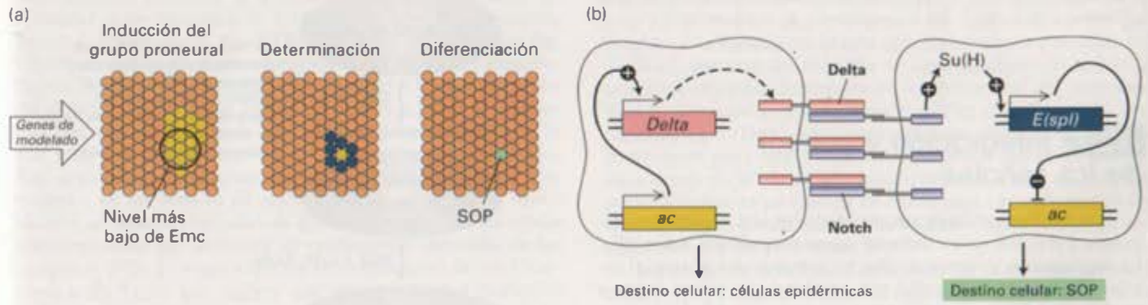
▲ **Fig. 15-37. Determinación de los destinos celulares diferentes por inhibición lateral en el desarrollo de *C. elegans*.** LIN 12, un homólogo de Notch, y LAG-2, un homólogo de Delta, regulan las interacciones entre dos células equivalentes, designadas Z1.ppp y Z4.aaa. Cada célula puede asumir un destino uterino ventral (VU) o de anclaje (CA). Para más detalles véase el texto. (Adaptado de I. Greenwald, 1998, *Genes & Dev* 12:1751.)

señalización ambiental a lo largo de la vía. La célula que recibe una señal algo mayor comienza a aumentar su expresión del receptor y a disminuir su expresión del ligando. En la célula vecina, ahora expuesta a un nivel reducido de ligando, la expresión del receptor disminuye y aumenta la del ligando. De esta manera, se amplifica la asimetría inicial producida como consecuencia de un acontecimiento aleatorio, que por último conduce a la asignación de una célula como pre-VU y su contraparte como célula pre-AC. Una vez formada, la célula AC comienza a enviar una señal LIN-3 que participa en el desarrollo de la vulva. La inhibición lateral mediada por Notch también opera en ese proceso cuando la célula de P6.p inhibe las células P5.p y P7.p vecinas (véase fig. 15-12b).

Desarrollo neuronal en *Drosophila* y vertebrados. Las mutaciones con pérdida de función en los genes *Notch* o *Delta* producen un espectro amplio de fenotipos en *Drosophila*. Una consecuencia de estas mutaciones en cualquier gen es un aumento del número de neuroblastos en el sistema nervioso central. En la embriogénesis de *Drosophila*, una hoja de células del ectodermo se comienza a dividir en dos poblaciones de células: las que se mueven dentro del embrión que por último se desarrollan en neuroblastos; las que permanecen externas y forman la epidermis y la cutícula. A medida que algunas células aumentan de tamaño y se liberan de la hoja ectodérmica para convertirse en neuroblastos, señalan a las células circundantes para evitar que sus vecinos se conviertan en neuroblastos; un caso de inhibición lateral. La señalización Notch se utiliza para esta inhibición; en embriones que carecen del receptor Notch o su ligando, todas las células precursoras del ectodermo se convierten en neurales.

El papel de señalización Notch en la especificación de los destinos celulares neurales fue estudiado con profundidad en el desarrollo del sistema nervioso periférico en *Drosophila*. En las moscas, los diversos órganos sensoriales se originan a partir de grupos de células proneurales, los que producen factores de transcripción bHLH, como Achaete y Scute, que estimulan los destinos celulares neurales. En el desarrollo normal, una célula dentro de un grupo proneural es algo ungida para convertirse en un *precursor de órgano sensorial (SOP)*. En las otras células de un grupo, la señalización Notch lleva a la represión de genes proneurales y, de este modo, se inhibe el destino neural; estas células no seleccionadas dan lugar a la epidermis (fig. 15-38). Las mutaciones termosensibles que causan pérdida funcional ya sea de Notch o de Delta conducen al desarrollo de SOP adicionales a partir de un grupo proneural. Por el contrario, en las moscas en desarrollo que producen una forma activa constitutivamente de Notch (es decir, activa en ausencia de un ligando), todas las células de un grupo proneural se desarrollan en células epidérmicas.

Para evaluar el papel de la vía Notch durante la neurogénesis primaria en *Xenopus*, los científicos inyectaron mRNA que codifica formas diferentes de Notch y Delta en los embriones. La inyección de mRNA que codifica el segmento citosólico activo constitutivamente de Notch inhibió la formación de neuronas. Por el contrario, la inyección de mRNA que codifica una forma alterada de Delta que impide la activación de Notch condujo a la formación excesiva de neuronas. Estos hallazgos indican que en los vertebrados, como en *Drosophila*, la señalización Notch controla los destinos neurales de células precursoras.



▲ **Fig. 15-38. Papel de la inhibición lateral mediada por Notch en la formación de precursores del órgano sensorial (SOP) en *Drosophila*.** (a) Las moléculas de la señalización extracelular y los factores de transcripción codificados por los genes del modelado temprano controlan el patrón espaciotemporal preciso de las proteínas bHLH proneurales como Achaete y Scute (amarillo). La mayoría de las células dentro del campo expresan Emc (anaranjado), una proteína relacionada que antagoniza a Achaete y Scute. Un pequeño conjunto de células, un grupo proneural, produce las proteínas bHLH proneurales. La región de un grupo proneural del cual se formará un SOP, expresa niveles bajos de Emc, lo que confiere a estas células una predisposición hacia la formación de SOP. Las interacciones entre estas células, que conducen a la acumulación de proteínas represoras E(spl) en las células vecinas (azul), entonces restringe la formación de SOP a una sola célula (verde). (b) En un comienzo, los genes *achaete* (*ac*) y otros proneurales se transcriben en todas las células dentro de un grupo proneural, como *Notch* y *Delta*. Achaete y otras proteínas de bHLH de proneural promueven la expresión de Delta. Cuando una célula comienza a producir al azar algo más Achaete (*izquierda*), su producción de Delta aumenta, lo que produce una señalización de Notch más fuerte en todas sus células vecinas (*derecha*). En las células receptoras, la vía de señalización Notch activa un factor de transcripción designado Su(H), que a su vez estimula la expresión de genes *E(spl)*. Las proteínas E(spl) reprimen de manera específica la transcripción de *ac* y otros genes proneurales. La disminución resultante en Achaete implica una disminución en Delta y por lo tanto la amplificación de la diferencia aleatoria inicial entre las células. Como consecuencia de estas interacciones y otras, una célula de un grupo proneural es seleccionada como un SOP; todas las otras pierden su potencial neural y se desarrollan en células epidérmicas.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 15.6

Inducción recíproca e inhibición lateral

- Las efrinas son los ligandos de señalización de la superficie celular cuyos receptores (Ephs) son receptores tirosincinasas.
- Las efrinas clase-B y sus receptores (EphB), actuando como un ligando y un receptor, pueden mediar la inducción recíproca en las células adyacentes (véase fig. 15-35).
- Las interacciones entre el receptor Notch y su ligando Delta transmembrana se utilizan en la inhibición lateral, que pueden controlar la opción entre dos destinos celulares alternativos.
- Una fluctuación inicial aleatoria o en sesgo en la señalización entre dos células equivalentes adyacentes puede activar un circuito regulador que amplifica la diferencia inicial, que conduce por último a que una célula exprese sólo el ligando Delta y la otra exprese sólo el receptor Notch (véase fig. 15-36).
- En *C. elegans*, la inhibición lateral mediada por Notch hace que dos células en un inicio iguales sigan vías de desarrollo diferentes.
- En *Drosophila*, las células precursoras neurales recién formadas (neuroblastos y precursores del órgano sensorial) expresan niveles elevados de señalización Delta y utilizan Notch para impedir que sus vecinas se conviertan en precursores neurales (véase fig. 15-38). La inhibición lateral similar mediada por Notch controla el equilibrio entre células neurales y no neurales en el desarrollo de *Xenopus laevis*.

15.7 Integración y control de las señales

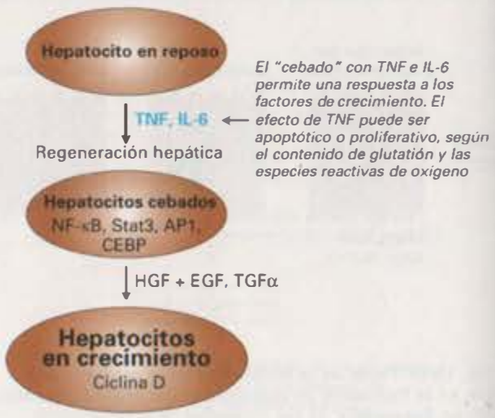
Las células cambian sus propiedades con rapidez en respuesta a señales, tanto durante como después del desarrollo. La segregación y la restricción progresivas del potencial celular durante el desarrollo son cambios que tienen lugar a medida que un organismo crece y genera cantidades inmensas de células nuevas que deben organizarse en nuevos tejidos y formas. Las células en algunos tejidos adultos (p. ej., sangre, epitelio intestinal y piel) también continúan su proliferación y diferenciación. Estas células se construyen sobre un armazón sustancial preexistente y tienen una construcción menos "original" para hacer. Tanto las células con capacidad de dividirse como las que carecen de esta propiedad en los tejidos adultos permanecen muy sensibles a las hormonas y otras moléculas de señalización y a los cambios ambientales.

La discusión en este capítulo y en los capítulos 13 y 14 hace hincapié en el enorme esfuerzo científico que se realizó para identificar los componentes de las vías de señalización, el modo por el que transducen las señales y las respuestas celulares resultantes. Muchos proyectos actuales están dirigidos al aprendizaje de cómo se reúnen las múltiples vías de señalización para controlar el crecimiento y la función tisular normal y en tejidos embrionarios y adultos. En muchas circunstancias, la respuesta adecuada depende de la capacidad de recibir células para integrar señales múltiples y controlar la disponibilidad de señales activas. Los ejemplos de integración y modulación de señales descritas en esta sección ilustran algunos mecanismos generales utilizados en una variedad amplia de situaciones.

La competencia depende de las propiedades de las células que les permiten responder a señales inductivas

Al comienzo, los embriólogos notaron que las células difieren en su capacidad para responder a diversas señales inductivas. La capacidad para responder a una molécula de señalización particular, denominada *competencia*, depende de varias propiedades de la célula receptora: la presencia de receptores específicos para la señal, la capacidad de estos receptores de activar vías intracelulares específicas, la presencia de factores de transcripción que estimulan la expresión de los genes requeridos para implementar la respuesta adecuada y una estructura de cromatina que torna a estos genes accesibles para la transcripción.

En algunos casos, la recepción de una señal puede convertir a una célula en competente para recibir otra. Después del daño de una parte del hígado o de la extirpación quirúrgica, se producen cantidades aumentadas de dos señales, el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleucina-6 (IL-6), como parte de respuesta frente a la lesión hepática. Estas señales hacen que los hepatocitos entren en un estado "cebado" en el cual las células aumentan su producción de ciertos factores de transcripción (p. ej., NF-κB, Stat3, AP1 y CEBP), pero no se dividen. Las células cebadas son competentes para responder a una combinación de tres señales que juntas inducen la síntesis de ciclina D y la mitosis (fig. 15-39).



▲ Fig. 15-39. Cebado de los hepatocitos en reposo para las respuestas tardías a moléculas de señalización que inducen el crecimiento. La lesión en el hígado o la eliminación de parte del hígado conduce al cebado de células en respuesta a las señales de la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral (TNF). Las células así cebadas aumentan su producción de factores de transcripción indicados, pero no se dividen. El aumento ulterior en el nivel sanguíneo del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) induce a las células ya cebadas para producir ciclina D que se requiere para la división celular (cap. 21). HGF actúa junto con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformador α (TGFα).

La regeneración hepática es una táctica de supervivencia importante después de que una parte del hígado sufre daño o intoxicación, pero el crecimiento hepático no regulado conduciría a una hepatomegalia excesiva o tal vez al cáncer. En el estado cebado, los hepatocitos pueden medir su propio estado fisiológico, su localización dentro de un tejido, su proximidad a otras células, la necesidad de curación y la organización espacial de las células dentro de una estructura. Sobre la base de esta valoración, las células pueden responder de la manera más adecuada a señales posteriores.

Algunas señales pueden inducir respuestas celulares diversas

Varias clases de receptores de la superficie celular descritos en los capítulos 13 y 14 se relacionan con más de una vía de transducción de señales intracelulares (véase cuadro 14-1). Las múltiples posibilidades de señalización celular son muy evidentes con los receptores acoplados a la proteína G, los receptores para citocina y el receptor tirosincinasa. Este fenómeno plantea un interrogante general: ¿qué gobierna a una célula para responder a una señal que puede ser transducida por vías múltiples? A la inversa, si la vía de señalización es la misma en muchos tipos celulares, ¿por qué una célula responde mediante la división, otras por diferenciación e incluso otras mediante la muerte? Por ejemplo, la señalización a través de la vía RTK-Ras-MAP cinasa (véase fig. 14-16) se utiliza en forma repetida en el curso del desarrollo, sin embargo, el resultado con respecto a la especificación del destino celular varía en los diferentes tejidos. Si no hay ninguna especificidad más allá del ligando y del receptor, la Ras activada podría sustituir a cualquier señal. De hecho, Ras activada puede actuar en muchos tipos celulares. Por ejemplo, en un estudio de micromatrices de DNA de fibroblastos, el mismo conjunto de genes fue inducido de modo transcripcional por el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y por el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF), lo que sugiere que la exposición a cualquier molécula de señalización tuvo efectos similares. El receptor para el PDGF y el receptor para FGF son ambos receptores tirosincinasas y la fijación del ligando a cualquier receptor puede activar Ras.

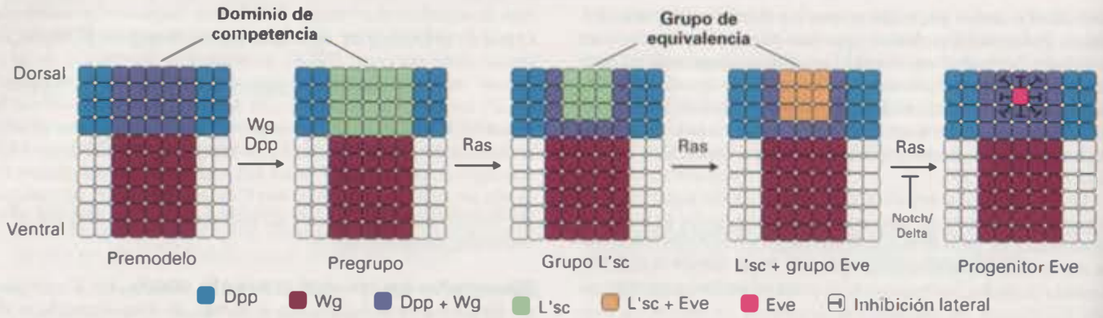
En principio, parece posible que existan varios mecanismos para la producción de respuestas celulares diversas ante una molécula de señalización particular: 1) la potencia o la duración de la señal gobierna la naturaleza de la respuesta; 2) la vía corriente abajo desde el receptor realmente no es la misma en los tipos celulares diferentes, por ejemplo, debido a que en las células receptoras están presentes complementos diferentes de los factores de transcripción y 3) las entradas convergentes provenientes de otras vías modifican la respuesta a la señal.

Diferencias en la potencia o duración de la señal. Las evidencias que apoyan el uso del primer mecanismo provienen de estudios con células PC12, una línea celular cultivada capaz de diferenciarse en adipocitos o neuronas. El factor de crecimiento nervioso (NGF) promueve la formación de neuronas, mientras que el factor de crecimiento epidérmico (EGF) estimula la formación de adipocitos. Si se fortalece la señal EGF mediante la prolongación de la exposición produce la diferenciación neuronal. Si bien tanto NGF como EGF son ligandos RTK, NGF es un activador mucho más fuerte de la vía de transducción Ras-MAP cinasa que EGF. Al parecer, el receptor para EGF puede activar esta vía sólo después de la estimulación prolongada.

Diferencias en las vías corriente abajo. En *C. elegans* se demostró la señalización a través de vías específicas de un tipo celular corriente abajo de un RTK. En los gusanos, las señales EGF inducen al menos cinco respuestas separadas, cada una en un tipo de célula diferente. Cuatro de las cinco respuestas están mediadas por la vía común Ras-MAP cinasa; la quinta, la ovulación hermafrodita, emplea una vía corriente abajo diferente en la cual se genera el segundo mensajero trifosfato de inositol. La unión de IP_3 a su receptor (IP3R) en la membrana del retículo endoplasmático (RE) conduce a la liberación del Ca^{2+} almacenado en el RE (véase fig. 13-29). Luego, la elevación del Ca^{2+} citosólico induce la ovulación. Esta vía alternativa fue descubierta en un estudio genético que implicó IP3R, un canal del Ca^{2+}, en la señalización de EGF; un buen ejemplo de cómo una mutación en un gen inesperado puede originar un descubrimiento.

Integración de señales. La tercera manera por la cual el mismo par ligando/receptor de señalización puede producir efectos diversos en las células es integrar más de una señal, como ocurre en el desarrollo de músculo de *Drosophila*. La figura 15-40 muestra la convergencia del ingreso de señales que conduce a la formación de una célula precursora muscular individual, que está definida por su capacidad de transcribir el gen *even-skipped*. Temprano en el desarrollo del músculo, Wnt de *Drosophila* señala Wingless (Wg) y TGFβ señala Decapentaplegic (Dpp) para preparar una célula para hacerla competente para recibir una señal posterior que es transducida a través de la vía MAP cinasa corriente abajo de Ras. La señal Wingless es producida en cinturones circunferenciales y la señal Dpp es producida en dos bandas longitudinales en ángulos rectos a los cinturones Wnt.

Un grupo de células en cada lado de cada segmento del cuerpo recibe ambas señales Wingless y Dpp y así se torna competente para responder a una señal de RTK no identificada que activa Ras. En estas células, la integración de la señal tiene lugar durante la transcripción del gen *eve*. La transcripción de *eve* es activada cuando un potenciador *eve* corto, de 312 bp (*no* el mismo descrito en la fig. 15-32) está fijado mediante dos factores de transcripción específicos del músculo y mediante tres factores de transcripción inducidos por la señal: factor TCF por Wingless, Mad por Dpp y Pnt por un RTK que actúa a través de Ras. Así, se integra la información específica del tejido y sensible a la señal a través de la acción de cinco reguladores sobre una pieza corta de DNA en la especificación de un tipo celular. Como resultado de la inhibición lateral, por último sólo queda una célula que expresa *eve* en cada grupo inicial de células competentes (véase fig. 15-40). Esta célula individual evolucionará en una fibra muscular particular por reclutamiento de otras células y la fusión con ellas.

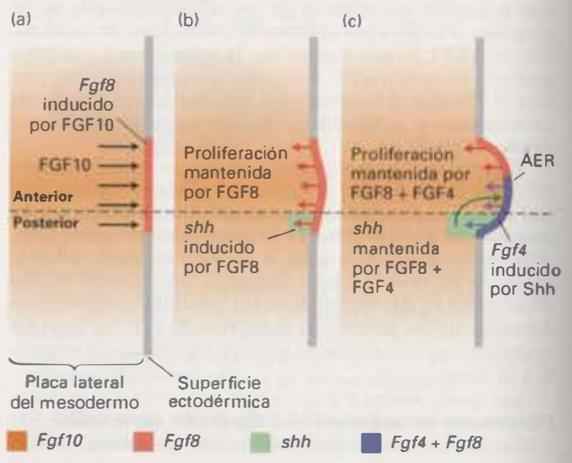


▲ Fig. 15-40. Acción secuencial de señales críticas en el desarrollo del músculo en *Drosophila*. La transducción de la señal a través de la vía de RTK está gobernada por las señales Wnt y TGFβ. Wingless (Wg) se produce en una franja de células que corren en un cinturón alrededor de parte de cada segmento del cuerpo del embrión (violeta). Decapentaplegic (Dpp) se produce en una banda de células dorsales que corren desde la cabeza hacia la cola en cada lado del embrión (azul), una banda que es creada por el sistema de señalización dorsal/ventral descrito en la sección 15.3. Una placa de células en cada segmento corporal recibirá ambas señales; sólo estas células (verde) son competentes para responder a la señal RTK (no identificada) que activa la señalización intracelular proveniente de Ras. Todas las células en la placa activan un gen denominado *L'sc*, aunque la señalización adicional restringe *L'sc* y entonces la transcripción eve a un conjunto más restringido de células denominado pre-grupo (anaranjado). Dentro del pre-grupo, una célula central comienza a utilizar la señalización Notch para las células circundantes a fin de reprimir la transcripción *L'sc* y *eve* allí hasta que sólo una célula elabora los productos de *eve* (rojo). Esa célula individual se desarrollará en un músculo particular mediante el reclutamiento de otras células y la fusión con ellas; en cada segmento del cuerpo se crean dos de estas células mediante este proceso detallado. Ambas requieren señalización mediada por RTK; una célula utiliza el receptor para EGF de *Drosophila* (DER) y el receptor tipo EGF denominado Heartless (Htl) y la segunda célula utiliza sólo Htl. (Véase Halfon et al., 2000, *Cell* 103:63-74.)

El desarrollo de los miembros depende de la integración de gradientes de señales extracelulares múltiples

Los miembros de los vertebrados crecen a partir de "brotes" pequeños compuestos de una masa interna de células mesodérmicas rodeada por una vaina de ectodermo. Las señales secretadas de ambas capas de células coordinan el desarrollo del miembro e instruyen a las células acerca de sus destinos adecuados dentro de los miembros. La primera señal, el factor de crecimiento de fibroblastos 10 (FGF10), es segregada desde el mesodermo de la región lateral del tronco e inicia el brote de un miembro a partir de regiones específicas del flanco del embrión. La implantación de una cuenta embebida de FGF10 en lugares donde no se forma el miembro en condiciones normales causa el crecimiento de un miembro extra; así, FGF tiene capacidades inductivas notables.

Un miembro tiene tres dimensiones: anteroposterior (dedo pulgar a dedo meñique), dorsoventral (palma de la mano con respecto al dorso de la mano) y proximodistal (hombro a dedos). Una célula embrionaria que conoce su posición en cada una de estas dimensiones está bien orientada hacia qué



▶ Fig. 15-41. Integración de tres señales en el desarrollo de los miembros en los vertebrados a lo largo de los ejes proximal/distal y anterior/posterior. Cada brote del miembro crece fuera del flanco del embrión. (a) Una señal factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), tal vez FGF10, proviene del mesodermo en las regiones específicas del flanco del embrión, una región para cada miembro. FGF10 actúa sobre una región local del ectodermo de la superficie denominada cresta ectodérmica apical (AER) debido a que formará una cresta prominente. (b) El ectodermo que recibe una señal FGF10 es inducido a producir FGF8, otra señal secretada. En el extremo posterior del brote del miembro, FGF8 induce la transcripción del gen *Sonic hedgehog (Shh)*. (c) La señalización de Shh induce la transcripción del gen que codifica FGF4 en el AER. FGF8 y FGF4 promueven la proliferación continua de las células del mesodermo, lo que causa el crecimiento del brote del miembro. Shh también estimula este crecimiento y confiere las características en la parte posterior del miembro. El desarrollo a lo largo del eje del dorsal/ventral depende de una señal Wnt que no se muestra aquí.

hacer. Un sistema de señalización diferente opera en cada una de las tres dimensiones; así, mediante la lectura de las tres señales, una célula parece aprender dónde está dentro del brote del miembro y actuar en consecuencia.

En respuesta a FGF10, una región local de la superficie ectodérmica se convierte en un centro de señalización, el *reborde ectodérmico apical (AER)*, en la punta del brote del miembro emergente (fig. 15-41). Esta región secreta FGF8 y más tarde FGF4, los cuales dirigen la división persistente de las células mesodérmicas y, por consiguiente, el crecimiento continuo del miembro. La señal FGF8 también induce la producción de Sonic hedgehog en el brote del miembro posterior. Las señales FGF les indican a las células sus distancias desde el brote del miembro distal y Shh les indica a las células que son posteriores. Si se agrega Shh a la parte anterior del brote, el miembro que en el futuro se forme tendrá dos patrones posteriores de huesos y ninguno anterior. A lo largo del eje dorsoventral, una señal Wnt instruye a las células para formar tipos de células ventrales. Las señales Wnt, FGF4 y FGF8 estimulan la transcripción de *Shh* y la señalización Shh promueve la transcripción de los genes *Fgf4* y *Fgf8*. Por esto, las señales se refuerzan mutuamente en células que están bastante próximas; las células ubicadas demasiado lejos de las señales de refuerzo cesarán de formar su propia señal. De esta manera, la potencia y el movimiento de las señales depende del tamaño y de la forma final del miembro.

Una célula en la parte media del brote del miembro, mientras decide qué hacer, es asaltada por esta mezcla de señales. Mediante la integración de la información proveniente de la totalidad de ellas, cada célula comienza a aprender cómo proceder. La principal tarea del desarrollo en la formación de miembros y de los órganos es organizar unos pocos tipos celulares (p. ej., mesénquima, vascular, epitelial) en estructuras multicelulares complejas. Las señales descritas aquí proporcionan las pautas iniciales para este proceso de construcción, instruyendo a las células acerca de sus localizaciones con respecto a las coordenadas del miembro y produciendo factores de transcripción específicos que se convertirán en las formas activas en las partes adecuadas del miembro.

Las señales están amortiguadas por antagonistas intracelulares y extracelulares

En la vida real, los organismos experimentan variaciones amplias en sus ambientes y deben adaptarse o mueren. La mayor parte de los organismos multicelulares tienen cantidades muy variables de células, experimentan una gama amplia de temperaturas y deben soportar periodos de privaciones nutricionales, toxicidad ambiental, lesión y competición con miembros de su misma especie u otras. Los sistemas de señales con requerimientos estrictos de temperatura y condiciones fisiológicas se adaptarían mal al mundo real. Los científicos están comenzando a reconocer de qué manera las señales son reguladas para que el resultado, con respecto a los destinos celulares, sea correcto.

Antagonistas inducibles. Una manera por la cual las células pueden modular la actividad de la señal es mediante la producción de *antagonistas inducibles*. La idea es que una señal induce la transcripción de genes en las células receptoras. Entre los genes inducidos hay uno que codifica un antagonista que reduce el efecto de la señal. Si, por casualidad, pasa una cantidad demasiado pequeña de señal, la cantidad del antagonista también disminuye y la inducción neta del gen diana se conserva. De manera similar, si la señal o la transducción de la señal es excesiva, se corregirá por la producción mayor de antagonista. Se conocen ejemplos de antagonistas inducibles tanto intracelulares como extracelulares (secretados). Estos antagonistas inducibles se determinaron para las vías de señalización Hedgehog, Wnt, TGFβ, RTK y citocina.

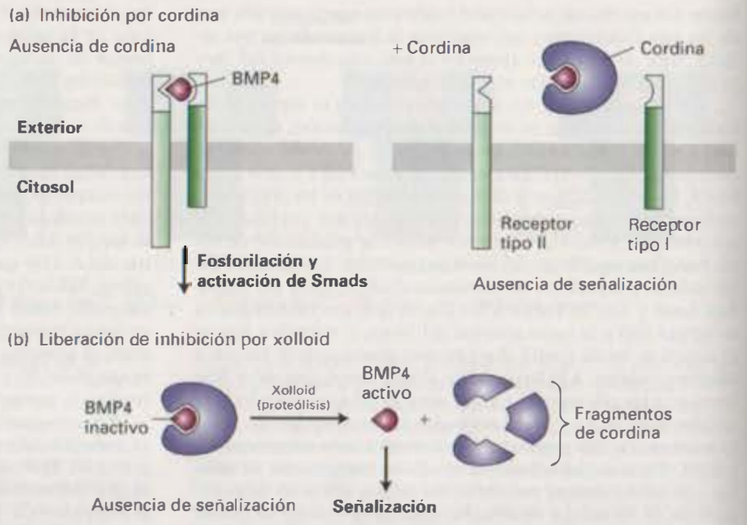
En el capítulo 14 describimos el modo por el cual los antagonistas inducibles intracelulares modulan la señalización de los receptores para TGFβ (véase fig. 14-3) y de los receptores para citocinas (véase fig. 14-14). La vía Hedgehog, descrita en la sección 15.5, también está regulada por un antagonista intracelular. Hay que recordar que, en ausencia de una señal Hedgehog, Patched inhibe Smoothened e impide la señalización intracelular (véase fig. 15-31). Uno de los genes diana activados en forma transcripcional por la señalización Hedgehog es *patched*; el aumento resultante en el nivel de Patched en la membrana plasmática reduce la señalización corriente abajo e interrumpe la transcripción de los genes diana Hedgehog.

En otros casos, una señal es controlada por un antagonista inducible secretado que se fija al receptor de la señal sin activarlo. Por ejemplo, la proteína secretada codificada por el gen *Drosophila argos* compite con las señales que activan el receptor EGF (EGFR), un receptor tirosincinasa. La transcripción de *argos* se estimula por ligandos EGFR, lo que convierte a Argos en un tipo de antagonista inducible. Cuando se une, Argos bloquea la dimerización del receptor EGF, necesario para la transducción de la señal ulterior.

El sistema de amortiguación Argos se utiliza para crear tipos celulares diferentes durante el modelado dorsoventral en los estadios tempranos de los embriones de la mosca. Ya dijimos que Gurken es un ligando para el receptor EGF en las células dorsales del folículo (véase fig. 15-17). Una consecuencia de la fijación de Gurken al receptor EGF es la activación transcripcional de los genes *spitz* y *vein*, los cuales codifican ligandos que también se fijan al receptor EGF y lo activan. De esta manera, el efecto de Gurken se amplifica. En células de la línea média dorsal donde la concentración de Gurken es máxima y la señalización EGFR es más intensa, también se induce la transcripción de *argos*. La proteína Argos *reduce* la transducción de la señal del receptor EGF en la línea media; sólo en las dos regiones de los flancos la actividad de EGFR continúa en niveles elevados. Este sistema crea dos poblaciones separadas de células: aquella en la cual el receptor EGF es activo y rodea una población central de células en la cual el receptor EGF está desactivado. El nivel más alto de la señal Gurken determina el nivel más bajo de transducción de la señal del receptor EGF.

Antagonistas no inducidos por la señal Las vías de señalización también están controladas por antagonistas secretados que no son inducidos por la señal en sí. Un efecto de este tipo de antagonista puede hacer más nítido o mover un límite entre los tipos celulares. Una señal que proviene de las células que le dieron origen es cada vez menos intensa a medida que aumenta la distancia; en algún momento, disminuye por debajo de una cantidad umbral y no tiene más efecto. Si un antagonista secretado viene de la dirección opuesta, bloqueará la acción de la señal incluso en células que reciben cantidades mayores que las del umbral.

Un ejemplo de este efecto se observa en la formación de células neurales en el desarrollo de los vertebrados. Por lo general, las proteínas TGFβ secretadas impiden la formación de células neurales en una parte de los embriones de rana denominada polo animal *(animal cap)* en los estadios tempranos



▶ Fig. 15-42. Modulación de la señalización BMP4 en *Xenopus* por Cordina y Xolloide. (a) La cordina se fija a BMP4, una clase de señal proteica TGFβ segregada y le impide fijarse a su receptor. (b) Xolloide escinde en forma específica la cordina en el complejo cordina-BMP4, libera BMP4 en una forma que puede fijarse a su receptor y activa la señalización. La regulación similar de la señalización Dpp (relacionado con BMP) en *Drosophila* es por Sog (relacionado con la cordina) y Tolloid (relacionado con Xolloid). (Véase S. Piccolo et al., 1997 *Cell* 91:407.)

En embriones de *Xenopus*, el polo animal produce BMP4, un miembro de la familia de señales TGFβ, y por consiguiente no producirá el tejido neural. El efecto de señales y otros reguladores en la inducción neural puede probarse mediante la exposición de partes del polo animal en el embrión *Xenopus* a proteínas individuales y la observación de la formación potencial de células neurales. Este tipo de experimento reveló la capacidad de la *proteína cordina* para antagonizar a BMP4 e inducir la identidad celular neural, una indicación de la presencia del mesodermo dorsal. El agregado de cordina a los polos animales de *Xenopus* induce la formación de células neurales; esta inducción neural por cordina se revierte por el agregado de un exceso de proteína BMP4. Sobre esta base, el destino celular neural es considerado el estado por defecto *(default)*. Sólo cuando la señalización BMP es exitosa pueden formarse otros tipos celulares. Juntos, estos datos condujeron a un modelo simple en el cual la cordina impide que BMP se una a su receptor. En principio, la inhibición podría ocurrir por unión directa de la cordina a los receptores BMP o a las moléculas BMP en sí. Los resultados de una serie de estudios bioquímicos demostraron que la cordina se une a homodímeros de BMP2 y BMP4 o a heterodímeros de BMP4/BMP7 con alta afinidad ($K_D = 3 \times 10^{-10}$ M) y les impide que se fijen a sus receptores (fig. 15-42). La inhibición de la señalización BMP mediada por cordina es liberada por la proteína Xolloid, una proteasa que corta de manera específica la cordina en el complejo cordina-BMP, por lo que se libera BMP activo.

La señalización Wnt también está modulada por antagonistas secretados, que incluyen un grupo especial de proteínas secretadas denominado Frizbees, que están relacionados con el receptor Frizzled en esta vía. Las señales Wnt se fijan a un dominio con alto contenido de cisteína en el dominio extracelular de los receptores Frizzled, que en consecuencia activa la señalización corriente abajo (véase fig. 15-32). Las proteínas Frizbee tienen el dominio extracelular de Frizzled pero carecen de sus dominios transmembrana y citosólico. Mediante la fijación muy firme de las señales Wnt, Frizbees absorbe la señal, de modo que queda menos disponible para activar los receptores Frizzled.

Concluimos mencionando a Cerberus, un antagonista paladín secretado en los embriones de rana. Esta proteína se denomina Cerberus por el perro guardián mitológico con tres cabezas, porque tiene sitios de fijación para tres tipos diferentes de señales fuertes: Wnt, Nodal y BMP. La unión de estas señales por Cerberus impide la activación de sus receptores respectivos. Al inactivar las señales Wnt, Nodal y BMP que participan en el desarrollo del tronco y la cola del cuerpo, Cerberus estimula el desarrollo de la cabeza.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 15.7

Integración y control de las señales

- En la regeneración hepática, las señales tempranas cambian las células a estado cebado en el cual son competentes para responder a señales posteriores que causan crecimiento y mitosis.
- La mayoría de los componentes de la vía de señalización RTK-Ras-MAP cinasa se utilizan en forma repetida en el curso del desarrollo y se conservan evolutivamente en un espectro amplio de animales.
- En el desarrollo del músculo embrionario en *Drosophila*, tres tipos de señales convergen para estimular la diferenciación (véase fig. 15-40). Estas señales inducen la producción de tres factores de transcripción que se combinan con dos factores de transcripción específicos de tejido para activar la transcripción del gen *even-skipped* que marca una célula precursora muscular.
- Al menos una proteína de señalización actúa a lo largo de cada eje del brote del miembro en desarrollo. Las células responden a la combinación de señales y las señales refuerzan la producción de otras señales para coordinar el crecimiento y el modelado en tres dimensiones (véase fig. 15-41).
- Los antagonistas inducibles incluyen proteínas intracelulares y secretadas cuya producción es inducida por una señal particular. Luego, la proteína antagonista ejerce un mecanismo de retroalimentación, que se opone a la acción continua de la señal. Los antagonistas inducibles proporcionan el amortiguamiento en la mayoría de las vías de señalización para las señales en exceso o inadecuadas.
- Las señales también pueden ser controladas por antagonistas que no son inducidos por la señal en sí. Mediante la unión a las señales, estos antagonistas impiden que las señales se fijen a sus receptores específicos y los activen (véase fig. 15-42).

PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO

La interacción notable de señales y controles génicos durante el desarrollo es un proceso de formación de un patrón. Las masas simples de células se convierten en estructuras funcionales, sorprendentemente bonitas como los ojos, los pulmones, los corazones y las alas. Para que esta transformación no suceda, las células deben responder a una mezcla con alto contenido de señales de corta y de larga duración y deben integrar la información para tomar las decisiones correctas. Sólo algunos sistemas de señalización se utilizan en forma repetida para organizar las células en los tejidos. En la mayoría de los casos, los sistemas de señalización son comunes a todos los animales, lo cual simplifica el problema de aprender los meeanismos moleculares subyacentes. Esta manifestación de nuestros orígenes evolutivos comunes reduce el problema de la comprensión de la regulación biológica; si bien los desafíos restantes aún son enormes.

Para comprender en forma más completa la manera por la cual las células adquieren sus destinos y participan en la morfogénesis se requiere una visión global de sus respuestas moleculares in vivo. El advenimiento de tecnología con micromatrices de DNA para monitorizar de modo simultáneo la transcripción de miles de genes –de hecho, todas las unidades de transcripción en un genoma– es un paso principal para "leer las mentes" de las células. Una señal puede evaluarse ahora por su capacidad para desviar las actividades de una célula mediante la medición de todos los cambios inducidos por la señal en la expresión génica. Estos conocimientos, tan excitantes como nuevos, tienen también limitaciones evidentes. Por ejemplo, en la actualidad se miden las transcripciones en extractos que representan un promedio de muchas células aisladas sin gran precisión temporal; desde los embriones que cambian en segundos o minutos. Por consiguiente, podemos esperar adelantos continuos como métodos mejores para observar las respuestas en las células vivas. Es más, el análisis con micromatrices de DNA mide sólo la transcripción, no los cortes y empalmes de RNA ni la traducción en proteína; por esta tecnología no se evalúa la localización de las proteínas, su modificación ni las asociaciones entre ellas. Estos otros niveles de control génico son aún medidos sobre una base de gen por gen. Los adelantos en la tecnología de micromatrices de proteína que posibilita la monitorización de todas las proteínas al mismo tiempo, así como de sus interacciones, contribuirán de manera espectacular a ampliar nuestra comprensión.

Los flujos rápidos en las respuestas celulares que se producen durante los sucesos de señalización, la integración de la información proveniente de señales múltiples y los circuitos dinámicos de control de retroalimentación son difíciles de comprender sin las mediciones precisas de las concentraciones de las señales, la velocidad de la reacción y los estados de equilibrio. Para entender de manera adecuada los circuitos de señalización serán necesarios métodos de cuantificación más precisos. Las afirmaciones groseras acerca de si los genes son activados o desactivados o si las proteínas están fosforiladas o no tendrán que ser reemplazadas por información más exacta, porque los cambios conllevan graduaciones más que órdenes de magnitud, no simplemente fenómenos de todo o nada.

Los sistemas de cambios elaborados en las células, que por lo general trabajan al mismo tiempo, tienen un grado de complejidad que requiere el modelado computarizado. Este campo, algunas veces denominado biología de los sistemas, apunta a producir modelos que describen con éxito las respuestas normales de las células a los estímulos y predicen cómo responderán frente a perturbaciones adicionales o diferentes. Un enfoque de diseño de ingeniería de esta clase sostiene la promesa excitante de que las células podrían estar dirigidas a realizar tareas útiles, como mejorar la inmunidad o la curación. El campo de la biología celular molecular está convirtiéndose cada vez más en una ciencia computacional, pero con la fascinación especial de que las señales construyen la vida.

PALABRAS CLAVE

angiogénesis *620*
antagonista inducible *651*
cascada de la transcripción *632*
desarrollo *612*
gen de identidad del órgano floral *637*
genes de regla par *(pair-rule) 634*
gen de polaridad de segmento *635*
genes gap (de hendidura) *630*
gen Hox *636*
grupo de equivalencia *624*
hibridación in situ *614*
homeosis *636*
inducción *621*
inducción recíproca *644*
inhibición lateral *644*
micromatrices de proteína *(proteoma chip) 615*
morfógeno *623*
mRNA materno *629*
precursor del órgano sensorial (SOP) *647*
proteína cordina *652*
sincitio *625*
vía Hedgehog *641*
vía Toll-Dorsal *628*
vía Wnt *642*

REVISIÓN DE CONCEPTOS

1. Describa tres vías diferentes en las cuales participan los receptores del tipo EGF.

2. ¿Qué enzima cataliza la degradación del glucógeno a glucosa-1-fosfato? Describa el modo por el cual la estructura de la subunidad de esta enzima permite la integración de múltiples señales.

3. Las personas con diabetes tipo 1 no producen insulina. Describa qué sucede con los transportadores de la glucosa GLUT4 en los diabéticos tipo 1 justo después de una comida. La mayoría de los pacientes con diabetes tipo 2 producen cantidades normales de insulina y tienen receptores de insulina presentes en las células sensibles a la insulina. Aún estos pacientes tienen deficiencias en la captación de la glucosa y por

eso sus niveles de glucemia son anormalmente elevados. Especule en la naturaleza del defecto en estos pacientes.

4. Compare el efecto de los morfógenos implicados en la especificación dorsal-ventral en *Xenopus laevis* y *Drosophila melanogaster*.

5. Mediante el empleo de la hibridación in situ con una sonda específica dorsal, ¿dónde se esperaría encontrar la expresión de *dorsal* en el embrión sincitial de *Drosophila*? Si se utilizan técnicas de inmunohistoquímica con un anticuerpo antidorsal, ¿dónde esperaría encontrar expresada la proteína Dorsal?

6. Con un análisis de micromatrices de embriones de tipo silvestre vs. mutante *dorsal* podría esperarse obtener información sobre todos los genes regulados por la proteína Dorsal. ¿Por que? Podría esperarse observar cambios en la regulación de los genes identificados con anterioridad, distintos de los genes nuevos regulados por Dorsal. ¿La expresión de qué genes aumentaría o disminuiría en las mutantes *dorsal*?

7. Si se produce la deleción de 3' UTR del gen *bicoid*, ¿qué fenotipo se obtendría en una mosca mutante? ¿Por qué?

8. ¿Cómo asegura la proteína motora cinesina que tengan lugar los controles postraduccionales adecuados en el extremo anterior del embrión de *Drosophila*? Si la cinesina funcionó sólo durante el desarrollo del embrión, ¿cuál sería el fenotipo de un embrión mutante *cinesina*?

9. ¿Cuál es la evidencia de que el sistema de la inmunidad innata basado en Toll pueda tener más de mil millones de años?

10. ¿Cómo puede el grupo de cinco genes gap especificar más de cinco tipos de células en los embriones de *Drosophila*?

11. ¿Qué es la homeosis? Dé un ejemplo de una mutación homeótica floral y describa el fenotipo de la mutante y la función normal del producto del gen de tipo silvestre.

12. Compare los sistemas receptores que determinan el reconocimiento de los ligandos Hedgehog y Wnt secretados.

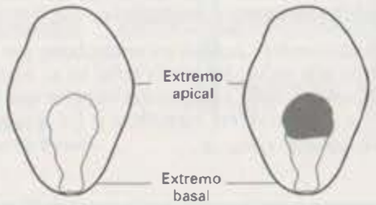
13. ¿Cuál es la evidencia de que un gradiente de Sonic hedgehog conduce al desarrollo de tipos celulares diferentes dentro del tubo neural de las aves?

14. El hallazgo de que la desactivación génica de *ephrin b2* contiene defectos llamativos en los capilares arteriales y venosos apoya la idea de que la efrina B2 y su receptor, EphB4, están implicados en una inducción recíproca. ¿Cómo?

15. Dé un ejemplo específico de un antagonista inducible de amortiguación de la señal y describa cómo sus efectos conducen a la amortiguación de la señal.

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Se determinó la secuencia completa del genoma del arroz (*Oryza sativa*); esto les permitió a los investigadores indagar al genoma del arroz para las secuencias génicas homólogas a los genes de *Drosophila* involucrados en los procesos de desarrollo. En el genoma del arroz se encontró un homólogo *bicoid* putativo que codifica un factor de transcripción del tipo homeodominio. Este gen del arroz fue utilizado como sonda contra los embriones del arroz en un experimento de hibridación in situ, mostrado abajo. Los embriones de la planta estaban contenidos dentro de las semillas. Los embriones del arroz utilizados en estos experimentos estaban en el estadio globular del desarrollo. En esta etapa, los extremos apical y basal de la planta futura están siendo especificados.



a. ¿Cuál es el patrón de expresión del gen *bicoid* putativo del arroz?

b. Especule acerca de la función del gen *bicoid* putativo del arroz.

c. De los resultados anteriores, ¿qué fenotipo podría desarrollar si se microinyectan moléculas de mRNA transcriptas a partir del gen *bicoid* del arroz putativo en el extremo basal del embrión?

d. De los resultados anteriores, ¿qué patrón de expresión en el arroz podría esperarse si uno pudiera identificar un homólogo *nanos* putativo del arroz?

BIBLIOGRAFÍA

Enfoques experimentales para formar una visión integral de las respuestas inducidas por señales

Arheitman, M. N., et al. 2002. Gene expression during the life cycle of *Drosophila melanogaster*. Science 297:2270-2275.

Cutler, P. 2003. Protein arrays: the current state-of-the-art. Proteomics 3:3-18.

Kamath, R. S., et al. 2003. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. Nature 421:231-237.

Kim, S. K., et al. 2001. A gene expression map for *Caenorhabditis elegans*. Science 293:2087-2092.

Stathopoulos, A., et al. 2002. Whole-genome analysis of dorsal-ventral patterning in the *Drosophila* embryo. Cell 111:687-701.

Tomancak, P., et al. 2002. Systematic determination of patterns of gene expression during *Drosophila* embryogenesis. Genome Biol. 3:RESEARCH0088-8.

Respuestas de las células frente a influencias ambientales

Downward, J. 1998. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. Curr. Opin. Cell Biol. 10:262-267.

Kaelin, W. G., Jr. 2002. How oxygen makes its presence felt. Genes et Dev. 16:1441-1445.

Control de los destinos celulares por cantidades graduadas de reguladores

Chang, A. J., and D. Morisato. 2002. Regulation of Easter activity is required for shaping the Dorsal gradient in the *Drosophila* embryo. Development 129:5635-5645.

Freeman, M., and J. B. Gurdon. 2002. Regulatory principles of developmental signaling. Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 18:515-539.

Johnstone, O., and P. Lasko. 2001. Translational regulation and RNA localization in *Drosophila* oocytes and embryos. Ann. Rev. Genet. 35:365—106.

Stathopoulos, A., and M. Levine. 2002. Dorsal gradient networks in the *Drosophila* embryo. Devel. Biol. 246:57-67.

Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. 2003. Toll-like receptors. Ann. Rev. Immunol. 21:335-376.

Wang, M., and P. W. Sternberg. 2001. Pattern formation during C. elegans vulval induction. Curr. Topics Devel. Bio. 51:189-220.

Creación de límites por combinaciones diferentes de los factores de transcripción

Akam, M. 1987. The molecular basis for metameric pattern in the *Drosophila* embryo. Development 101:1-22.

Andrioli, L. P., et al. 2002. Anterior repression of a *Drosophila* stripe enhancer requires three position-specific mechanisms. Development 129:4931-4940.

Fujioka, M., et al. 1999. Analysis of an even-skipped rescue transgene reveals both composite and discrete neuronal and early blastoderm enhancers, and multi-stripe positioning by gap gene repressor gradients. Development 126:2527-2538.

Houchmandzadeh, B., E. Wieschaus, and S. Leibler. 2002. Establishment of developmental precision and proportions in the early *Drosophila* embryo. Nature 415:798-802.

Creación de límites por señales extracelulares

Jessell, T. M. 2000. Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. Nature Rev. Genet. 1:20-29.

Moon, R. T., B. Bowerman, M. Boutros, and N. Perrimon. 2002. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. Science 296:1644-1646. Review.

Nybakken, K., and N. Perrimon. 2002. Hedgehog signal transduction: recent findings. Curr. Opin. Genet. Devel. 12:503-511.

Pandur, P., D. Maurus, and M. Kuhl. 2002. Increasingly complex: new players enter the Wnt signaling network. Bioessays 24:881-884.

Pires-daSilva, A., and R. J. Sommer. 2003. The evolution of signalling pathways in animal development. Nature Rev. Genet. 4:39-49.

Sanson, B. 2001. Generating patterns from fields of cells: examples from *Drosophila* segmentation. EMBO Rep. 2:1083-1088.

Wilkie, G. S., and I. Davis. 2001. *Drosophila wingless* and pairrule transcripts localize apically by dynein-mediated transport of RNA particles. Cell 105:209-219.

Inducción recíproca e inhibición lateral

Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand, and R. J. Lake. 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. Science 284:770-776.

Cooke, J. E., and C. B. Moens. 2002. Boundary formation in the hindbrain: Eph only it were simple. Trends Neurosci. 25:260-267.

Grandbarbe, L., et al. 2003. Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process. Development 130:1391-1402.

Ju, B. G., et al. 2000. Fringe forms a complex with Notch. Nature 405:191-195.

Miao, H., et al. 2001. Activation of EphA receptor tyrosine kinase inhibits the Ras/MAPK pathway. Nature Cell Biol. 3:527-530.

Santiago, A., and C. A. Erickson. 2002. Ephrin-B ligands play a dual role in the control of neural crest cell migration. Development 129:3621-3632.

Shaye, D. D., and I. Greenwald. 2002. Endocytosis-mediated downregulation of LIN-12/Notch upon Ras activation in *Caenorhabditis elegans*. Nature 420:686-690.

Integración y control de las señales

Brzozowski, A. M., et al. 1997. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. Natre 389:753-758.

Fambrough, D., K. McClure, A. Kazlauskas, and E. S. Lander. 1999. Diverse signaling pathways activated by growth factor receptors induce broadly overlapping, rather than independent, sets of genes. Cell 97:727-741.

Gerlitz, O., and K. Basler. 2002. Wingful, an extracellular feedback inhibitor of Wingless. Genes et Dev. 16:1055-1059.

Grimm, O. H., and J. B. Gurdon. 2002. Nuclear exclusion of Smad2 is a mechanism leading to loss of competence. Nature Cell BioL 4:519-522.

Halfon, M. S., et al. 2000. Ras pathway specificity is determined by the integration of multiple signal-activated and tissue-restricted transcription factors. Cell 103:63-74.

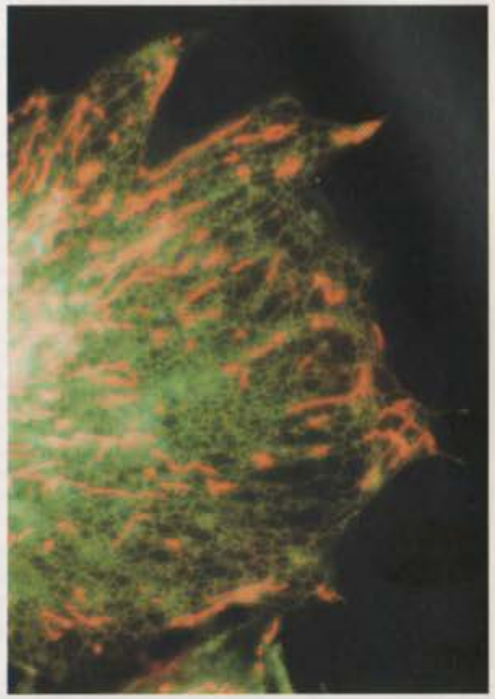
Martin, G. 2001. Making a vertebrate limb: new players enter from the wings. Bioessays 23:865-868.

Rubin, C., et al. 2003. Sprouty fine-tunes EGF signaling through interlinked positive and negative feedback loops. Curr. Biol. 13:297-307.

Tickle, C., and A. Munsterberg. 2001. Vertebrate limh development: the early stages in chick and mouse. Curr. Opin. Genet. Devel. 11:476-481.

16

MOVIMIENTO DE PROTEÍNAS EN LAS MEMBRANAS Y EN LOS ORGÁNULOS



Célula endotelial bovina viva teñida para diferenciar los compartimientos intracelulares. Las membranas del retículo endoplasmático, similares a encaje, se tiñeron con colorante fluorescente verde y las mitocondrias vermiformes, con un colorante fluorescente anaranjado. (Molecular Probes, Inc.)

Una célula típica de mamífero contiene hasta 10.000 tipos diferentes de proteínas; una célula de levadura, unos 5000. La inmensa mayoría de estas proteínas es sintetizada por los ribosomas del citosol y muchas permanecen dentro de él. Sin embargo, casi la mitad de los diferentes tipos de proteínas producidos en una célula típica son enviadas a una membrana celular en particular, a un compartimiento acuoso distinto del citosol o a la superficie celular para su secreción. Por ejemplo, muchas proteínas que funcionan como receptores hormonales y proteínas de transporte deben ser transportadas a la membrana plasmática; algunas enzimas hidrosolubles, como las polimerasas de RNA y DNA, deben ser enviadas al núcleo y los componentes de la matriz extracelular, así como las moléculas de polipéptidos de señalización deben dirigirse a la superficie celular para su secreción por la célula. Éstas y todas las demás proteínas producidas por una célula deben alcanzar sus localizaciones correctas para que la célula funcione adecuadamente.

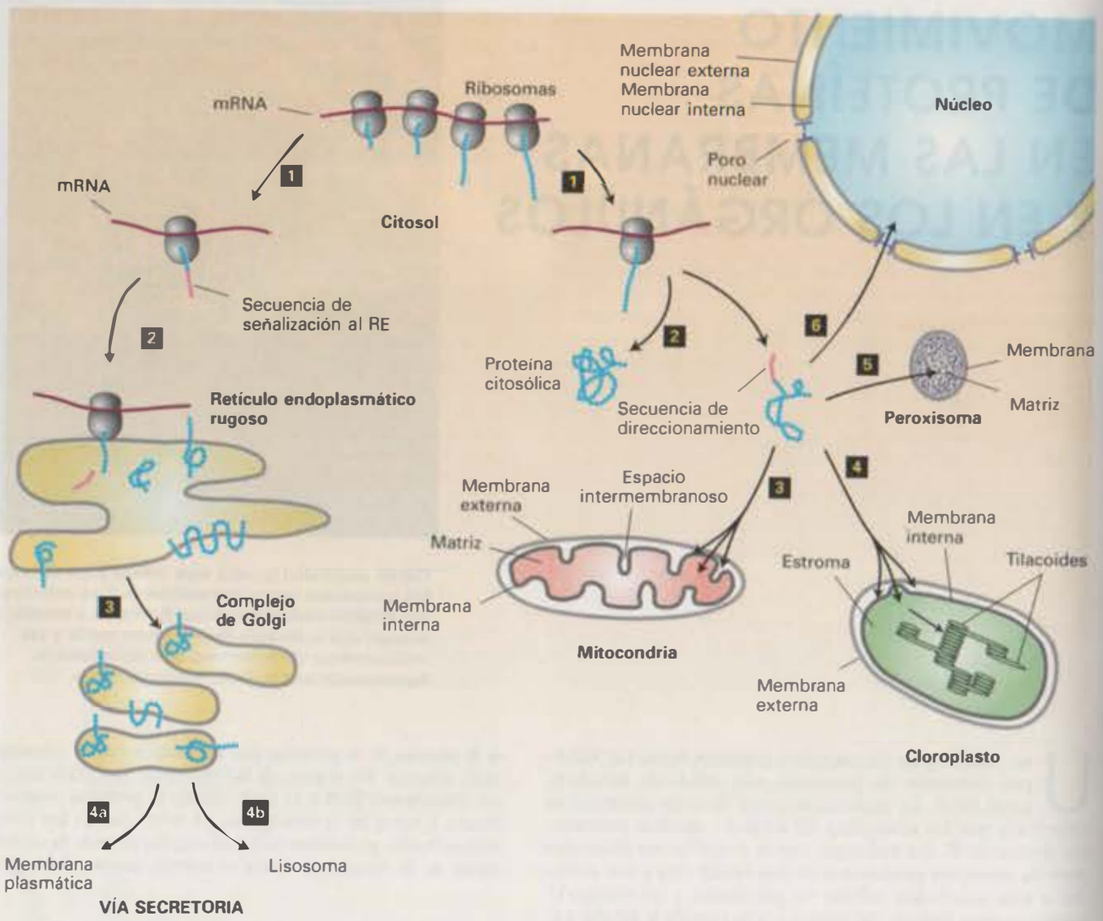
El envío de las proteínas recién sintetizadas a sus destinos celulares adecuados, denominado *direccionamiento* o *clasificación de proteínas*, abarca dos tipos muy diferentes de procesos generales. El primero comprende el envío de una proteína a la membrana de un orgánulo intracelular y puede ocurrir durante la síntesis de la proteína por traducción en los ribosomas o poco después. En el caso de las proteínas de membrana, el direccionamiento lleva a la inserción de la proteína dentro de la bicapa lipídica de la membrana, en tanto que en las proteínas hidrosolubles se produce la translocación de toda la proteína a través de la membrana hacia el interior acuoso del orgánulo.

CONTENIDO

16.1 Translocación de proteínas secretorias a través de la membrana del RE
16.2 Inserción de proteínas en la membrana del RE
16.3 Modificaciones, plegado y control de calidad de las proteínas en el RE
16.4 Salida de proteínas bacterianas
16.5 Direccionamiento de proteínas a mitocondrias y cloroplastos
16.6 Direccionamiento de las proteínas peroxisómicas

Mediante este proceso general se distribuyen proteínas al retículo endoplasmático (RE), a las mitocondrias, a los cloroplastos, a los peroxisomas y al núcleo (fig. 16-1).

Las proteínas que inicialmente están destinadas a la membrana del RE sufren un segundo proceso general de distribución, por el cual ingresan en la vía secretoria. Estas proteínas no sólo incluyen las proteínas solubles y de membrana que forman parte del propio RE, sino también las proteínas que se secretan de la célula, las enzimas y otras proteínas residentes en la luz del complejo de Golgi y los lisosomas, y las proteínas



▲ Fig. 16-1. Esquema general de las principales vías de direccionamiento de proteínas en las células eucariontes. Todos los mRNA codificados en el núcleo se traducen en los ribosomas citosólicos. *Izquierda (vía secretoria)*: los ribosomas que están sintetizando proteínas nacientes en la vía secretoria son dirigidos hacia el retículo endoplasmático (RE) rugoso por una secuencia de señalización al RE (color rosado; pasos 1, 2). Después que la traducción se completa sobre el RE, estas proteínas pueden desplazarse en vesículas de transporte al complejo de Golgi (paso 3). El direccionamiento adicional lleva proteínas a la membrana plasmática o a los lisosomas (pasos 4a, 4b). *Derecha (vía no secretoria)*: La síntesis de proteínas que carecen de una secuencia de señalización se completa en los ribosomas libres (paso 1). Las proteínas que no contienen ninguna secuencia de direccionamiento se liberan en el citosol y permanecen allí (paso 2). Las proteínas con una secuencia de direccionamiento específica de orgánulos (color rosado) primero se liberan en el citosol (paso 2), pero luego son dirigidas a las mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas o núcleo (pasos 3 - 6). Las proteínas mitocondriales y de los cloroplastos atraviesan las membranas externa e interna para entrar en la matriz o el espacio de la estroma, respectivamente. Otras proteínas son direccionadas a otros subcompartimientos de estos orgánulos por pasos adicionales. Las proteínas nucleares atraviesan los poros nucleares visibles por los procesos explicados en el capítulo 12.

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación general: Redireccionamiento de proteínas

que forman parte integral de las membranas de estos orgánulos y de la membrana plasmática. El direccionamiento al RE suele involucrar proteínas *nacientes*, todavía en proceso de síntesis. Las proteínas cuyo destino final es el complejo de Golgi, los lisosomas o la superficie celular, son transportadas a lo largo de la vía secretoria por vesículas pequeñas que brotan de la membrana de un orgánulo y luego se fusionan con la membrana del siguiente orgánulo de la vía (véase fig. 16-1, *izquierda*). Describimos la distribución de proteínas mediada por vesículas en el próximo capítulo porque, desde el punto de vista mecanicista, difiere significativamente del direccionamiento de proteínas a las membranas de los orgánulos intracelulares.

En este capítulo estudiamos cómo las proteínas son dirigidas a la membrana de los orgánulos intracelulares y se insertan en la membrana del orgánulo o se desplazan hacia su interior. Dos características de este proceso de direccionamiento de las proteínas produjeron inicialmente bastantes confusiones: cómo una proteína determinada podía ser dirigida sólo hacia una membrana específica y cómo moléculas relativamente grandes de proteínas podían ser translocadas a través de la membrana sin romper una bicapa que suelen ser una barrera para iones y moléculas pequeñas. Usando una combinación de métodos de purificación bioquímica y screening genético para identificar mutantes incapaces de ejecutar determinados pasos de la translocación, los biólogos celulares han identificado muchos de los componentes celulares necesarios para la translocación a través de cada una de las diferentes membranas intracelulares. Además, muchos de los principales procesos de translocación en la célula han sido reconstruidos con sistemas in vitro, que pueden manipularse libremente de manera experimental.

Estos estudios han demostrado que, a pesar de que existen algunas variaciones, los mecanismos básicos que gobiernan la distribución de proteínas a todos los orgánulos intracelulares son idénticos. Sabemos por ejemplo, que la información para dirigir una proteína a un destino u orgánulo en particular está codificada dentro de la secuencia de aminoácidos de la propia proteína, casi siempre en secuencias de 20 a 50 aminoácidos conocidas genéricamente como secuencias de señalización, o *secuencias de captación-direccionamiento* (véase fig. 16-1). Cada orgánulo posee un conjunto de proteínas receptoras que sólo se unen a tipos específicos de secuencias de señalización, lo que asegura así que la información codificada en una secuencia de señalización determina la especificidad del direccionamiento. Una vez que una proteína que contiene una secuencia de señalización ha interactuado con el receptor correspondiente, la cadena de proteína es transferida a algún tipo de *canal de translocación* que le permite a la proteína atravesar la bicapa de la membrana. La transferencia en una sola dirección de una proteína hacia el interior de un orgánulo, sin reflujo hacia el citoplasma, se logra acoplando la translocación a un proceso energéticamente favorable, como la hidrólisis del ATP. Algunas proteínas son luego dirigidas para alcanzar un subcompartimiento dentro del orgánulo diana; este direccionamiento depende de otras secuencias de señalización y de otras proteínas receptoras. Por último, las secuencias de señalización a menudo son eliminadas de la proteína madura por proteasas específicas una vez que se completa la translocación a través de la membrana.

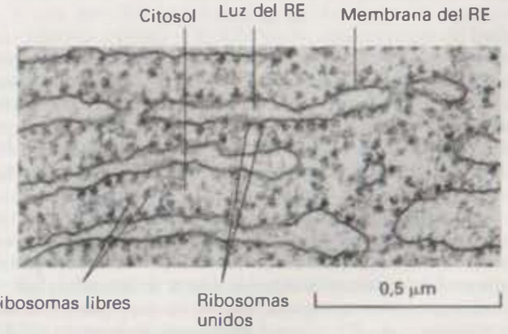
Para cada uno de los procesos de direccionamiento de proteínas descritos en este capítulo trataremos de contestar cuatro preguntas fundamentales:

1. ¿Cuál es la naturaleza de la *secuencia de señalización* y qué la diferencia de otros tipos de secuencias de señalización?
2. ¿Cuál es el *receptor* para la secuencia de señalización?
3. ¿Cuál es la estructura del *canal de translocación* que permite la transferencia de proteínas a través de la bicapa de la membrana? En particular, ¿el canal es tan estrecho que las proteínas sólo pueden atravesarlo en un estado desplegado o permite el paso de dominios plegados de la proteína?
4. ¿Cuál es la fuente de *energía* que permite la transferencia unidireccional a través de la membrana?

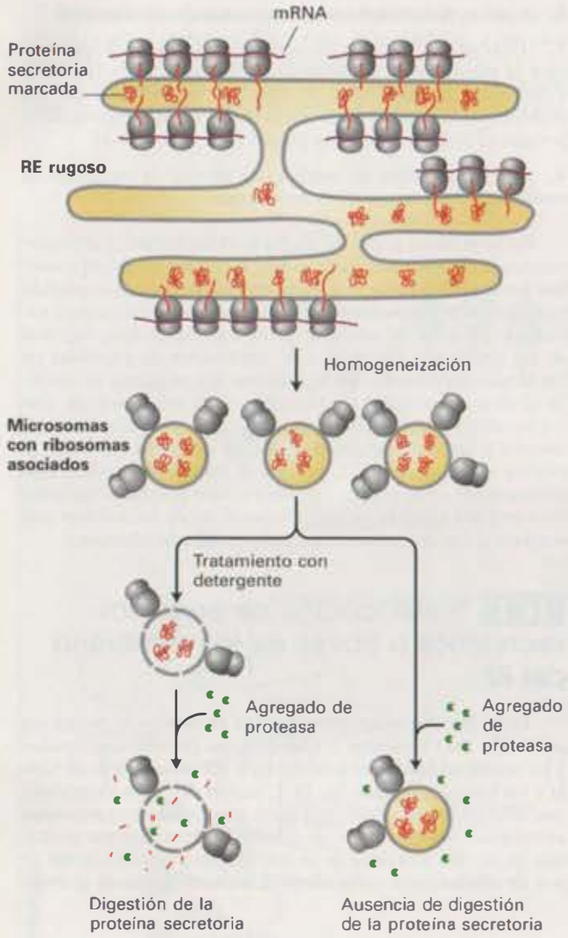
En la primera parte del capítulo describimos el direccionamiento de proteínas hacia el RE, incluidas las modificaciones postraduccionales que ocurren en las proteínas cuando ingresan en la vía secretoria. A continuación examinamos varios mecanismos de salida de proteínas bacterianas, algunos de los cuales son similares a la clasificación de proteínas en las células eucariontes. En las últimas dos secciones se describe el direccionamiento de proteínas a las mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas. El transporte de proteínas hacia el interior y fuera del núcleo a través de los poros nucleares se explica en el capítulo 12, porque el transporte nuclear está íntimamente relacionado con los eventos postranscripcionales e implica algunas variantes específicas de los núcleos con respecto a los mecanismos explicados en este capítulo.

16.1 Translocación de proteínas secretorias a través de la membrana del RE

Todas las células eucariontes usan en esencia la misma vía secretoria para sintetizar y distribuir las proteínas secretadas y las proteínas luminales solubles en el RE, el complejo de Golgi y los lisosomas (véase fig. 16-1, *izquierda*). Para simplificar, nos referiremos en conjunto a estas proteínas como *proteínas secretorias*. Aunque todas las células secretan diversas proteínas (p. ej., las proteínas de la matriz extracelular), ciertos tipos de células están especializadas en la secreción de grandes



▲ Fig. 16-2. Microfotografía electrónica de ribosomas adosados al RE rugoso en una célula acinar pancreática. La mayor parte de las proteínas sintetizadas por este tipo de célula serán secretadas y se forman en ribosomas adosados a la membrana. Se ven unos pocos ribosomas no adosdos con la membrana (libres), probablemente, éstos están sintetizando proteínas citosólicas u otras proteínas no secretorias. RE, retículo endoplasmático. (Cortesia de G. Palade.)



◀ FIGURA EXPERIMENTAL 16-3 Las células se incuban durante un corto tiempo con aminoácidos marcados radiactivamente, de tal forma que sólo se marcan las proteínas recién sintetizadas. Luego las células se homogeneizan, lo que fractura la membrana plasmática y fragmenta el RE rugoso en vesículas pequeñas llamadas microsomas. Como estas vesículas poseen ribosomas adosados, los *microsomas* tienen una densidad de flotación mucho mayor que otros orgánulos membranosos y pueden separarse de ellos por una combinación de centrifugación diferencial y en gradientes de densidad de sacarosa (cap. 5). Los microsomas purificados se tratan con una proteasa en presencia o ausencia de un detergente. Las proteínas secretorias marcadas asociadas con los microsomas sólo son digeridas por la proteasa agregada si la barrera de permeabilidad de la membrana del microsoma se destruye primero por el tratamiento con detergente. Este hallazgo indica que las proteínas recién sintetizadas se encuentran dentro de los microsomas, que equivalen a la luz del RE rugoso.

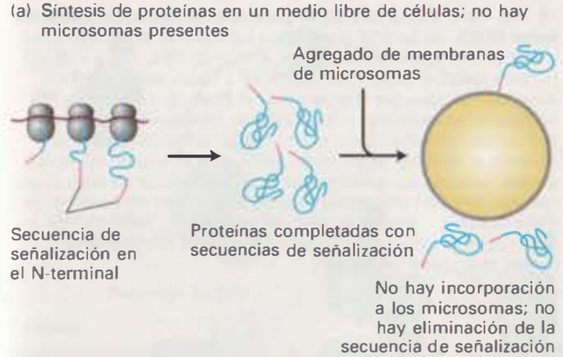
cantidades de proteínas específicas. Las células del ácino pancreático, por ejemplo, sintetizan cantidades grandes de varias enzimas digestivas que se secretan en conductillos que desembocan en el intestino. Debido a que este tipo de células secretorias contienen los orgánulos de la vía secretoria (p. ej., RE y Golgi) en gran abundancia, se han usado mucho para estudiar esta vía.

Los primeros experimentos de marcado con pulsos en las células acinares pancreáticas demostraron que los aminoácidos marcados radiactivamente se incorporan fundamentalmente en las proteínas secretorias recién sintetizadas. Los ribosomas que sintetizan estas proteínas están realmente unidos a la superficie del RE. Como consecuencia, la parte del RE que recibe las proteínas que ingresan en la vía secretoria se conoce como *RE rugoso* porque estas membranas están densamente tachonadas con ribosomas (fig. 16-2). Cuando las células se homogeneizan, el RE rugoso se fragmenta en pequeñas vesículas cerradas, denominadas *microsomas rugosos*, con la misma estructura (ribosomas por fuera) que se encuentra en la célula intacta. Los experimentos representados en la figura 16-3, en los que los microsomas aislados de las células marcadas con un pulso son tratadas con una proteasa, demuestran que aunque las proteínas secretorias se sintetizan en los ribosomas unidos a la superficie citosólica de la membrana del RE se encuentran en la luz de las vesículas del RE durante su síntesis.

Una secuencia de señalización N-terminal hidrófoba dirige las proteínas secretorias nacientes hacia el RE

Después de que la síntesis de una proteína secretoria empieza en los ribosomas libres en el citosol, una secuencia de señalización de 16 a 30 residuos de aminoácidos en la proteína naciente dirige el ribosoma hacia la membrana del RE y comienza la translocación del polipéptido en desarrollo a través de ella (véase fig. 16-1, *izquierda*). La secuencia de señalización para el RE se localiza en el N-terminal de la proteína, que es la primera parte de la proteína que se sintetiza. Las secuencias de señalización de diferentes proteínas secretorias contienen uno o más aminoácidos con carga positiva adyacentes a una tira continua de 6 a 12 residuos hidrófobos (núcleo), pero por lo demás tienen poco en común. En la mayor parte de las proteínas secretorias, la secuencia de señalización se separa de la proteína mientras todavía está creciendo en el ribosoma; por consiguiente, las secuencias de señalización no están casi nunca presentes en las proteínas "maduras" de las células.

El núcleo hidrófobo de las secuencias de señalización hacia el RE es esencial para su función. Por ejemplo, la deleción específica de varios aminoácidos hidrófobos de una secuencia de señalización, o la introducción por mutación de aminoácidos cargados en el núcleo hidrófobo pueden abolir la capacidad del N-terminal de una proteína para funcionar como secuencia de señalización. Como consecuencia, la proteína modificada permanece en el citosol, incapaz de atravesar la membrana del RE hacia su luz. Mediante técnicas de DNA recombinante, los investigadores han producido proteínas citosólicas con secuencias de aminoácidos agregadas al N-terminal. Si la secuencia agregada es suficientemente larga e hidrófoba, esta proteína citosólica modificada es translocada a la luz del RE. Por lo tanto, los residuos hidrófobos del núcleo de las secuencias de señalización hacia el RE representan un sitio de unión que es crítico para la interacción de las secuencias de señalización con las proteínas receptoras de la membrana del RE.



◀ FIGURA EXPERIMENTAL 16-4 Los experimentos en sistemas libres de células demuestran que la translocacion de las proteínas secretorias a los microsomas esta acoplada con la traducción. El tratamiento de los microsomas con EDTA, que quela los iones de Mg^{+2}, los despoja de los ribosomas asociados, lo que permite aislar microsomas libres de ribosoma, que son equivalentes a las membranas del RE (véase fig. 16-3). La síntesis se lleva a cabo en un sistema libre de células que contiene ribosomas funcionales, tRNA, ATP, GTP y enzimas citosólicas, al que se agrega un mRNA que codifica una proteína secretoria. La proteína secretoria se sintetiza en ausencia de microsomas (a), pero es translocada a través de la membrana de la vesícula y pierde su secuencia de señalización sólo si hay microsomas presentes durante la síntesis de la proteína (b).

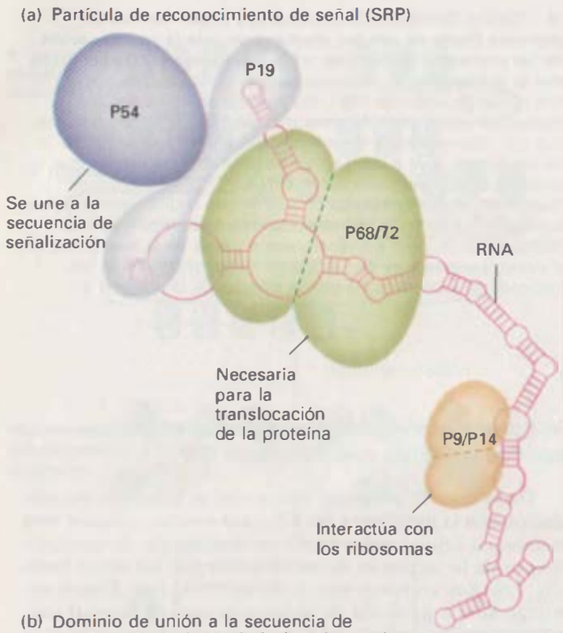
Algunos estudios bioquímicos realizados en un sistema de síntesis de proteínas libre de células, con mRNA que codifica una proteína secretoria y microsomas despojados de sus propios ribosomas unidos, han aclarado la función y el destino de las secuencias de señalización hacia el RE. Los experimentos iniciales con este sistema demostraron que una proteína secretoria típica es incorporada a los microsomas y su secuencia de señalización es eliminada sólo si hay microsomas presentes durante la síntesis de la proteína (fig. 16-4). Los experimentos siguientes se diseñaron para determinar el estadio preciso de la síntesis de la proteína en el que los microsomas deben estar presentes para que haya translocación. En estos experimentos, se agregó una droga que impide a las reacciones de síntesis de proteína iniciar la traducción a diferentes tiempos después de comenzada la síntesis de proteínas, y luego se agregaron los microsomas sin ribosomas a las mezclas de reacción. Estos experimentos demostraron que los microsomas deben agregarse antes de que se unan los primeros 70 aminoácidos aproximadamente, para que la proteína secretoria completa se localice en la luz del microsoma. En ese momento, han surgido del ribosoma aproximadamente los primeros 40 aminoácidos, incluida la secuencia de señalización que después será eliminada, y los siguientes 30 aminoácidos todavía se encuentran ocultos dentro del canal del ribosoma. Por consiguiente, el transporte de la mayoría de las proteínas secretorias hacia la luz del RE ocurre mientras la proteína naciente todavía está unida al ribosoma y está sufriendo su elongación, proceso denominado translocación cotraduccional.

La translocación cotraduccional es iniciada por dos proteínas que hidrolizan GTP

Dado que las proteínas secretorias se sintetizan en asociación con la membrana del RE, pero no con cualquier otra membrana celular, debe existir un mecanismo de reconocimiento de la secuencia de señalización que las dirige hacia allí. Los dos componentes principales de este direccionamiento son la **partícula de reconocimiento de la señal** (*signal-recognition particle*, SRP) y su receptor, localizado en la membrana del RE. La SRP es una partícula de ribonucleoproteína citosólica que se une de manera temporaria y simultánea a la secuencia de señalización hacia el RE de una proteína naciente, a la unidad grande del ribosoma y al receptor de SRP.

La SRP está formada por seis polipéptidos definidos y un RNA de 300 nucleótidos (fig. 16-5a). Una de las proteínas SRP (P54) que puede unirse químicamente en forma cruzada a las secuencias de señalización hacia el RE, pone en evidencia que esta proteína particular es la subunidad que se une a la secuencia de señalización en una proteína secretoria naciente. Una región de la P54, que contiene muchos residuos de aminoácidos con cadenas laterales hidrófobas, es homóloga a una proteína bacteriana conocida como Ffh que tiene una función análoga a la P54 en la translocación de proteínas a través de la membrana interna de las células bacterianas. La estructura de la Ffh contiene una hendidura cuya superficie interna está tapizada de cadenas laterales hidrófobas (fig. 16-5b). Se cree que la región hidrófoba de la P54 contiene una hendidura análoga que interactúa con el N-terminal hidrófobo de las proteínas secretorias nacientes y las conduce selectivamente a la membrana del RE. Dos de las proteínas SRP, la P9 y la P14, interactúan con el ribosoma, mientras la P68 y la P72 son necesarias para la translocación de la proteína.

En el sistema de traducción libre de células descrito previamente, la presencia de SRP retarda la elongación de una proteína secretoria cuando no hay microsomas presentes, inhibiendo así la síntesis de la proteína completa (véase fig. 16-4). Este hallazgo sugiere que la interacción del SRP con la cadena naciente de una proteína secretoria y con el ribosoma libre impide que la cadena naciente sea demasiado larga para la translocación en el RE. Sólo después de que el complejo SRP/cadena naciente/ribosoma se ha unido al receptor de SRP en la membrana del RE la SRP libera la cadena naciente y permite su elongación a la velocidad normal.



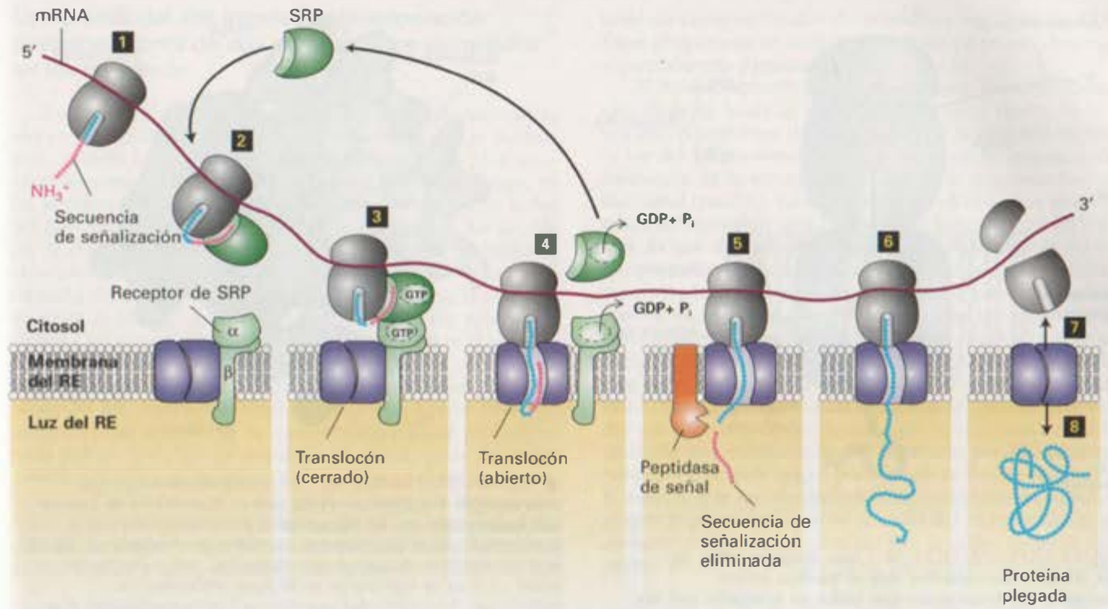
◀ Fig. 16-5. Estructura de la partícula de reconocimiento de señal (SRP). (a) La SRP comprende un RNA de 300 nucleótidos y seis proteínas denominadas P9, P14, P19, P54, P68 y P72. (El número indica el peso molecular × 10^3.) Todas las proteínas, excepto P54, se unen directamente al RNA. (b) La proteína Ffh bacteriana es homóloga a la porción de P54 que se une a las secuencias de señalización al RE. Este modelo de superficie muestra el dominio de unión en la Ffh, que contiene una ranura grande tapizada con aminoácidos hidrófobos (color violeta), cuyas cadenas laterales interactúan con las secuencias de señalización. [Parte (a) véase K. Strub et al., 1991, Mol Cell Biol 11:3949; y S. High y B. Dobberstein, 1991, J Cell Biol 113:229. Parte (b) adaptada de R. J. Keenan et al., 1998, Cell 94:181.]

La figura 16-6 resume nuestro conocimiento actual sobre la síntesis de proteínas secretorias y el papel del SRP y su receptor en este proceso. El receptor de SRP es una proteína integral de la membrana compuesto de dos subunidades: una subunidad α y una subunidad β de menor tamaño. El tratamiento de los microsomas con cantidades muy pequeñas de proteasas corta la subunidad α muy cerca de su sitio de unión a la membrana y libera una forma soluble del receptor SRP. Los microsomas tratados con proteasa son incapaces de ligar el complejo SRP/cadena naciente ribosoma o de soportar la translocación cotraduccional. Sin embargo, el fragmento soluble del receptor SRP conserva su capacidad para interactuar con el complejo SRP/cadena naciente/ribosoma, lo que produce la liberación de la SRP y permite la elongación de la cadena. Por lo tanto, la SRP y el receptor de SRP no sólo facilitan la interacción de una proteína secretoria naciente con la membrana del RE, sino que también actúan en conjunto para permitir la elongación y la síntesis de proteínas completas sólo cuando hay membranas de RE presentes.

En última instancia, la función de la SRP y del receptor de SRP es llevar los ribosomas que sintetizan proteínas secretorias hacia la membrana del RE. Se cree que la asociación de la hidrólisis de GTP con este proceso de direccionamiento contribuye a la fidelidad con la que se reconocen las secuencias de señalización. Probablemente la energía de la hidrólisis de GTP se usa para liberar proteínas que carecen de las secuencias de señalización apropiadas del complejo SRP y del receptor de SRP, lo que impide su direccionamiento erróneo hacia la membrana del RE. (Un acoplamiento similar de la hidrólisis de GTP con la unión de los factores de elongación de la traducción a los ribosomas aumenta la fidelidad de la traducción descartando moléculas de aminoacil-tRNA que no pueden formar los pares de bases correctos con los codones del mRNA.) La interacción del complejo SRP/cadena naciente/ribosoma con el receptor de SRP es estimulada cuando el GTP se une a la subunidad P54 de la SRP y a la subunidad α del receptor de SRP (véase fig. 16-6). La transferencia posterior de la cadena naciente y del ribosoma a un sitio en la membrana del RE en el que puede tener lugar la translocación permite la hidrólisis del GTP unido. Después de disociarse, la SRP y su receptor liberan el GDP unido y se reciclan hacia el citosol para comenzar otra ronda de interacción entre ribosomas que sintetizan proteínas secretorias nacientes con la membrana del RE.

El pasaje de los polipéptidos nacientes a través del translocón es impulsado por la energía liberada durante la traducción

Una vez que la SRP y su receptor han dirigido un ribosoma que está sintetizando una proteína secretoria a la membrana del RE, el ribosoma y la cadena naciente son rápidamente transferidos al **translocón**, un canal revestido de proteínas que se encuentra dentro de la membrana. A medida que continúa la traducción, la cadena naciente pasa directamente de la subunidad grande del ribosoma al poro central del translocón. La subunidad 60S del ribosoma se alinea con el poro del translocón de tal manera que la cadena naciente nunca queda expuesta al citoplasma y no se pliega hasta que alcanza la luz del RE (véase fig. 16-6).



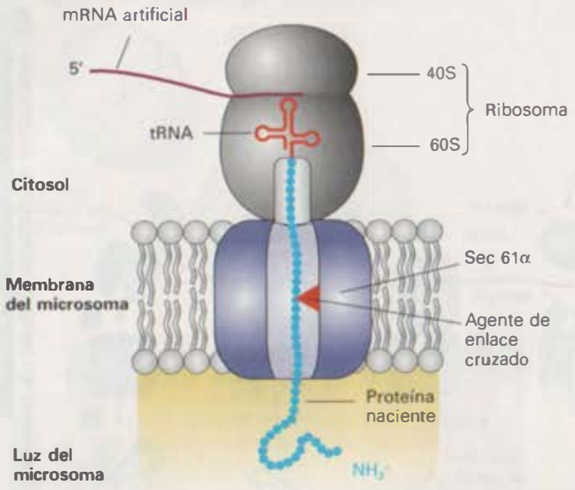
▲ Fig. 16-6. Síntesis de proteínas secretorias y su translocación simultánea con la traducción a través de la membrana del RE. Pasos **1**, **2**: Una vez que la secuencia de señalización al RE brota del ribosoma, se une a una partícula de reconocimiento de señal (SRP). Paso **3**: La SRP entrega el complejo ribosoma/polipéptido naciente al receptor de SRP en la membrana del RE. Esta interacción se fortalece por la unión de GTP a la SRP y su receptor. Paso **4**: La transferencia del ribosoma/polipéptido naciente al translocón produce la apertura de este canal de translocación y la inserción de la secuencia de señalización y del segmento adyacente del polipéptido creciente en el poro central. La SRP y el receptor de SRP, una vez disociados del translocón, hidrolizan el GTP unido a ellos y quedan listos para comenzar la inserción de otra cadena polipeptídica. Paso **5**: A medida que se alarga la cadena del polipéptido, atraviesa el canal del translocón hacia la luz del RE, donde la secuencia de señalización es eliminada por la peptidasa de señal y rápidamente degradada. Paso **6**: La cadena polipeptídica continúa alargándose a medida que el mRNA se traduce hacia el extremo 3′. Debido a que el ribosoma está adosado al translocón, la cadena creciente es introducida a través del translocón en la luz del RE. Pasos **7**, **8**: Una vez que la traducción se completa, el ribosoma se libera, el resto de la proteína es arrastrado hacia la luz del RE, el translocón se cierra y la proteína asume su estructura plegada natural.

El translocón se identificó por primera vez por mutaciones del gen de la levadura que codifica Sec61α que causan un bloqueo de la translocación de proteínas secretorias a la luz del RE. Posteriormente, se encontró que tres proteínas, denominadas *complejo Sec61*, formaban el translocón de los mamíferos: Sec61α, una proteína integral de la membrana con 10 hélices α transmembrana y dos proteínas menores, denominadas Sec61β y Sec61γ. Algunos experimentos químicos de unión cruzada demostraron que la cadena de polipéptidos que está siendo translocada entra en contacto con la proteína Sec61α tanto en las células de levadura como en las células de mamíferos, lo que confirma su identidad como un componente del translocón (fig. 16-7).

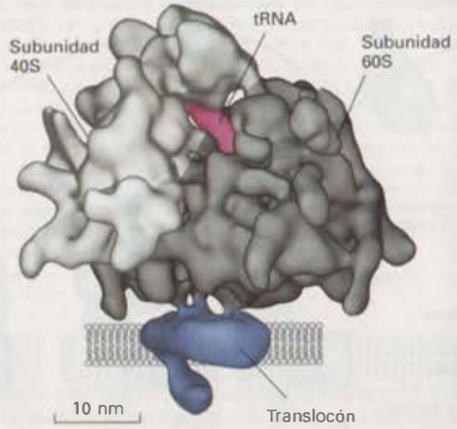
Cuando los microsomas presentes en el sistema de translocación libre de células se reemplazaron por vesículas de fosfolípidos reconstituidas que contenían sólo el receptor de SRP y el complejo Sec61, la proteína secretoria naciente fue translocada desde su complejo SRP/ribosoma hacia el interior de las vesículas. Este hallazgo indica que el receptor de SRP y el complejo Sec61 son las únicas proteínas de la membrana del RE absolutamente necesarias para la translocación. Por lo tanto, la energía producida por la elongación de la cadena en el ribosoma parece ser suficiente para empujar la cadena polipeptídica a través de la membrana en una sola dirección.

Múltiples copias del complejo Sec61 se agrupan para formar un canal translocón, lo que puede visualizarse por microscopia electrónica. Las imágenes del canal se han generado por computadora, promediando microfotografías electrónicas de canales Sec61 purificados unidos a ribosomas (fig. 16-8). Estas imágenes muestran el canal como un

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación localizada: Síntesis de proteínas secretorias y de unión de membrana



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 16-7 Los experimentos de enlace cruzado demuestran que el Sec61α es un componente del translocón que entra en contacto con las proteínas secretorias nacientes a medida que pasan hacia la luz del RE. Un mRNA que codifica los 70 aminoácidos del N-terminal de la proteína de secreción prolactina se traduce en un sistema libre de células que contiene microsomas (véase fig. 16-4b). El mRNA carece de un codón de terminación de la cadena y contiene un codón para lisina, cerca del medio de la secuencia. Los reactivos contienen un lisil-tRNA químicamente modificado en el que se agregó un reactivo de enlace cruzado, activable por la luz, a la cadena lateral de la lisina. Aunque se tradujo todo el mRNA, el polipéptido completado no pudo liberarse del ribosoma y, por lo tanto, quedó "pegado" al cruzar la membrana del RE. Las mezclas de reacción se expusieron entonces a una luz intensa, que hizo que la cadena naciente se uniera covalentemente a cualquier proteína adyacente del translocón. Cuando el experimento se hizo con microsomas de células de mamífero, la cadena naciente se unió covalentemente a Sec61α. Se usaron versiones diferentes del mRNA de prolactina para ubicar el residuo de lisina modificado a diferentes distancias del ribosoma; la unión cruzada a Sec61α sólo se observó cuando la lisina modificada se encontraba dentro del canal de translocación. (Adaptado de T. A. Rapoport, 1992, *Science* 258:931 y D. Görlich y T. A. Rapoport, 1993, *Cell* 75:615.)



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 16-8 La reconstrucción por microscopia electrónica revela que el translocón se asocia estrechamente con el ribosoma. Los complejos de Sec61 purificados fueron solubilizados mediante las membranas del RE con detergentes. Al agregar los ribosomas, los translocones (color azul) se reorganizaron en bicapas artificiales de fosfolípidos. Las partículas resultantes fueron congeladas y se obtuvieron microfotografías electrónicas de gran número de partículas, se almacenaron en una computadora y luego se promediaron para producir una sola imagen. Se agregó una representación del tamaño y posición aproximados de la bicapa lipídica del RE. Nótese que aunque el ribosoma está firmemente adherido al translocón, hay un espacio entre las dos estructuras. Se cree que el apéndice digitiforme debajo del canal del translocón está formado por un complejo de proteínas que se asocia con el transiocón. (Cortesía del Dr. Christopher Akey y Jean-François Menetret, Boston University School of Medicine.)

cilindro, de 5 a 6 nm de largo y 8,5 nm de diámetro, con un poro central, de aproximadamente 2 nm de diámetro, perpendicular al plano de la membrana.

Si los translocones siempre estuvieran abiertos en la membrana del RE, sobre todo en ausencia de ribosomas adheridos y de un polipéptido en translocación, las moléculas pequeñas como el ATP y los aminoácidos podrían difundirse libremente a través del poro central. Para mantener la barrera de permeabilidad de la membrana del RE, el translocón está regulado de tal forma que sólo está abierto cuando se le une un complejo cadena naciente/ribosoma. Por lo tanto, el translocón es un canal análogo a los canales de entrada de iones descritos en el capítulo 7. Cuando el translocón se abre por primera vez, un asa de la cadena naciente, que contiene la secuencia de señalización y aproximadamente 30 aminoácidos adyacentes, puede introducirse en el poro del translocón (véase fig. 16-6).

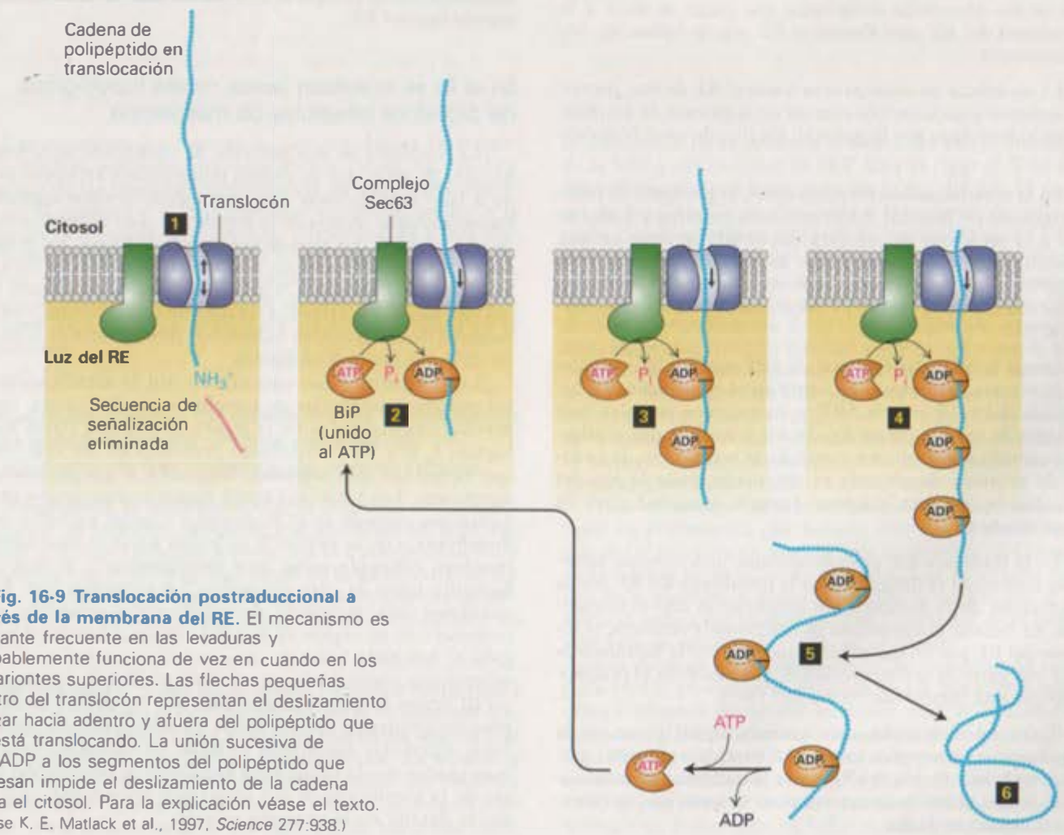
El mecanismo por el que el canal del translocón se abre y se cierra es motivo de discusión en este momento. Algunas pruebas experimentales sugieren que una proteína de la luz del RE bloquea el poro del translocón cuando no hay un ribosoma unido del lado citosólico del translocón. Sin embargo, otras observaciones indican que los complejos Sec61 pueden encontrarse normalmente en la membrana del RE en un estado no ensamblado y que el proceso de compuerta involucra la formación de un canal de translocón en el sitio de la membrana al que son transportados el ribosoma y la cadena naciente por la SRP y el receptor de SRP.

A medida que la cadena polipeptídica creciente entra en la luz del RE, la secuencia de señalización es eliminada por la *peptidasa de señal*, una proteína transmembrana del RE asociada con el translocón (véase fig. 16-6). Esta proteasa reconoce una secuencia en el C-terminal del núcleo hidrófobo del péptido señal y corta específicamente la cadena en esta secuencia una vez que emerge al espacio luminal del RE. Después de la separación de la secuencia de señalización, el polipéptido creciente pasa a través del translocón hacia la luz del RE. El translocón permanece abierto hasta que la traducción se completa y toda la cadena polipeptídica ha pasado a la luz del RE.

La hidrólisis del ATP impulsa la translocación postraduccional de algunas proteínas secretorias en las levaduras

En la mayoría de los eucariontes, las proteínas secretorias entran en el RE por translocación simultánea con la traducción, usando la energía derivada de la traducción para atravesar la membrana, como describimos recién. Sin embargo, en las levaduras, algunas proteínas secretorias ingresan en la luz del RE después de que se completa la traducción. En este tipo de *translocación postraduccional*, la proteína translocada atraviesa el mismo translocón de Sec61 que se usa en la translocación simultánea a la traducción. Sin embargo, la SRP y el receptor de SRP no participan en la translocación postraduccional y en estos casos la interacción directa entre el translocón y la secuencia de señalización de la proteína completada parece ser suficiente para el direccionamiento hacia la membrana del RE. Además, la fuerza rectora para la translocación unidireccional a través de la membrana del RE es proporcionada por un complejo de proteínas adicional, conocido como *complejo Sec63* y un miembro de la familia de chaperonas moleculares Hsc70 conocido como *BiP*. El complejo tetramérico Sec63 está incluido en la membrana del RE en la vecindad del translocón, mientras que BiP se encuentra en la luz del RE. En forma similar a otros miembros de la familia Hsc70, el BiP tiene un dominio ligador de péptidos y un dominio ATPasa. Estas chaperonas se unen y estabilizan proteínas desplegadas o parcialmente plegadas (véase fig. 3-11).

El modelo actual para la translocación postraduccional de una proteína hacia el RE se muestra en la figura 16-9. Una vez que el segmento del N-terminal de la proteína ingresa en la luz del RE, la peptidasa de señal corta la secuencia de señalización de la misma forma que en la translocación cotraduccional (paso 1). La interacción BiP-ATP con la porción luminal del complejo Sec63 produce la hidrólisis del ATP unido a él, lo que determina un cambio de conformación en el BiP que promueve su unión a la cadena polipeptídica expuesta (paso 2). Dado que el complejo Sec63 está localizado cerca del translocón, el BiP se activa en los sitios en los que los polipéptidos nacientes pueden entrar en el RE. Ciertos experimentos sugieren que en ausencia de unión al BiP, un polipéptido desplegado se desliza de un lado a otro dentro del canal del translocón. Estos movimientos de deslizamiento al azar rara vez hacen que todo el polipéptido atraviese la membrana del RE. La unión de una molécula de BiP-ADP a la porción luminal del polipéptido impide que el polipéptido se deslice fuera del RE. A medida que los movimientos de deslizamiento adicionales al azar exponen una mayor porción del polipéptido en el lado luminal de la membrana del RE, la unión sucesiva de moléculas de BiP-ADP a la cadena polipeptídica actúa como re-



▲ Fig. 16-9 Translocación postraduccional a través de la membrana del RE. El mecanismo es bastante frecuente en las levaduras y probablemente funciona de vez en cuando en los eucariontes superiores. Las flechas pequeñas dentro del translocón representan el deslizamiento al azar hacia adentro y afuera del polipéptido que se está translocando. La unión sucesiva de BiP-ADP a los segmentos del polipéptido que ingresan impide el deslizamiento de la cadena hacia el citosol. Para la explicación véase el texto. (Véase K. E. Matlack et al., 1997, *Science* 277:938.)

tén y tracciona finalmente todo el polipéptido dentro del RE en algunos segundos (pasos 3 y 4). En una escala de tiempo más lenta, las moléculas de BiP intercambian espontáneamente su ADP por ATP, lo que produce la liberación del polipéptido, que puede plegarse para adoptar su estructura nativa (pasos 5 y 6). El BiP-ATP reciclado está entonces disponible para otra interacción con Sec63.

La reacción general mediada por el BiP es un ejemplo importante de cómo la energía química liberada por la hidrólisis del ATP puede potenciar el movimiento mecánico de una proteína a través de una membrana. Algunas células bacterianas también usan un proceso potenciado por el ATP para translocar proteínas terminadas a través de la membrana plasmática. Sin embargo, el mecanismo de translocación postraduccional en las bacterias difiere en cierta medida del de las levaduras, como describiremos en la sección 16.4.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 16.1

Translocación de proteínas secretorias a través de la membrana del RE

- La síntesis de las proteínas secretadas, de las enzimas destinadas al RE, al complejo de Golgi o a los lisosomas y la síntesis de las proteínas de la membrana plasmática empiezan en los ribosomas citosólicos, que luego se unen a la membrana del RE para formar el RE rugoso (véase fig. 16-1, *izquierda*).
- La secuencia de señalización hacia el RE de una proteína secretoria naciente consiste en un segmento de aminoácidos hidrófobos, por lo general, localizado en el N-terminal.
- En la translocación cotraduccional, la partícula de reconocimiento de la señal (SRP) reconoce primero y luego se une a la secuencia de señalización al RE presente en una proteína secretoria naciente y a su vez es captada por un receptor de SRP presente en la membrana del RE, dirigiendo de esa forma el complejo ribosoma/cadena naciente hacia el RE.
- Luego la SRP y el receptor de SRP median la inserción de la proteína secretoria naciente en el translocón. La hidrólisis del GTP por la SRP y su receptor impulsa este proceso de amarre (véase fig. 16-6). A medida que el ribosoma unido al translocón continúa la traducción, la cadena de proteína desplegada es empujada hacia la luz del RE. No se necesita ninguna energía adicional para la translocación.
- En la translocación postraduccional, una proteína secretoria terminada es dirigida hacia la membrana del RE por la interacción de la secuencia de señalización con el translocón. La cadena polipeptídica es traccionada entonces al interior del RE por un mecanismo que requiere la hidrólisis de ATP por parte de la chaperona BiP, que estabiliza el polipéptido que está ingresando (véase fig. 16-9).
- Tanto en la translocación cotraduccional como en la translocación postraduccional, una peptidasa de señal presente en la membrana del RE corta la secuencia de señalización de una proteína secretoria poco después que el N-terminal ingresa en la luz.

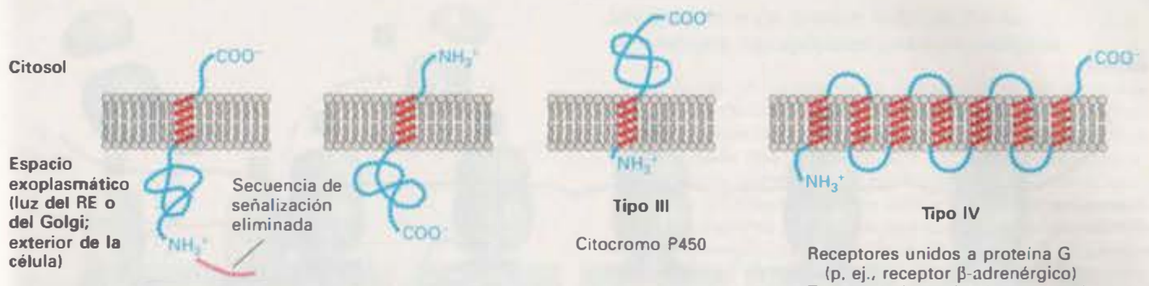
16.2 Inserción de proteínas en la membrana del RE

En los capítulos anteriores hemos visto muchas de la inmensa serie de proteínas integrales (transmembrana) presentes en la membrana plasmática y en otras membranas celulares. Cada una de estas proteínas tiene una orientación peculiar con respecto a la bicapa de fosfolípidos de la membrana. Las proteínas integrales localizadas en las membranas del RE, del Golgi y los lisosomas y en la membrana plasmática, que se sintetizan en el RE rugoso, permanecen incluidas en la membrana cuando se desplazan a sus destinos finales siguiendo la misma vía de las proteínas secretorias solubles (véase fig. 16-1). Durante este transporte, se conserva la orientación de las proteínas de membrana; es decir, los mismos segmentos de la proteína siempre enfrentan el citosol, mientras otros segmentos siempre están dirigidos en la dirección opuesta. Por lo tanto, la orientación final de estas proteínas de membrana se establece durante su biosíntesis en la membrana del RE. En esta sección, veremos en primer lugar cómo las proteínas integrales pueden interactuar con las membranas. Luego examinaremos cómo varios tipos de secuencias, conocidas en conjunto como secuencias topogénicas, dirigen la inserción y orientación de varias clases de proteínas integrales en las membranas. Estos procesos se desarrollan con adaptaciones del mecanismo básico de translocación de proteínas secretorias solubles a través de la membrana del RE.

En el RE se sintetizan varias clases topológicas de proteínas integrales de membrana

La *topología* de una proteína de membrana se refiere al número de veces que su cadena polipeptídica atraviesa de lado a lado la membrana y la orientación de estos segmentos transmembrana dentro de la membrana. Los elementos clave de una proteína que determinan su topología son los propios segmentos transmembrana, que suelen contener de 20 a 25 aminoácidos hidrófobos. Cada uno de estos segmentos forma una hélice que atraviesa totalmente la membrana, con sus residuos de aminoácidos hidrófobos fijos al interior hidrófobo de la bicapa de fosfolípidos.

Los científicos han encontrado útil la clasificación de las proteínas integrales de membrana en las cuatro clases topológicas ilustradas en la figura 16-10. Las clases topológicas I, II y III comprenden proteínas *de un solo paso*, que tienen un solo segmento helicoidal α que atraviesa la membrana. Las proteínas tipo I tienen una secuencia de señalización cortada en el N-terminal y están ancladas en la membrana, con su región N hidrófila hacia la cara luminal (también conocida como cara exoplásmica) y su región C hidrófila hacia la cara citosólica. La proteínas tipo II no contienen una secuencia de señalización separable y se orientan con su región N hidrófila hacia el citosol y su región C hidrófila hacia la cara exoplásmica (es decir, una orientación inversa a las proteínas tipo I). Las proteínas tipo III tienen la misma orientación que las proteínas tipo I, pero no contienen una secuencia de señalización separable. Estas diferentes topologías reflejan los distintos mecanismos usados por la célula para establecer la orientación dentro de la membrana de los segmentos transmembrana, como se detalla en la próxima sección.



▲ Fig. 16-10. Principales clases topológicas de proteínas integrales de membrana sintetizadas en el RE rugoso. Los segmentos hidrófobos de la cadena de proteína forman hélices α insertadas en la bicapa de la membrana; las regiones fuera de la membrana son hidrófilas y se pliegan en diversas conformaciones. Todas las proteínas tipo IV tienen múltiples hélices α transmembrana. La topología tipo IV representada aquí corresponde a la de los receptores ligados a la proteína G: siete hélices α, el N-terminal del lado exoplasmático de la membrana y el C-terminal del lado citosólico. Otras proteínas tipo IV pueden tener un número diferente de hélices y diversas orientaciones de los extremos N y C. (Véase E. Hartmann y col., 1989, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA.* 86:5786 y C. A. Brown y S. D. Black, 1989, *J. Biol. Chem.* 264:4442.)

Las proteínas que forman la clase topológica IV contienen muchos segmentos transmembrana (véase fig. 16-10). Muchas de las proteínas de transporte de membrana descritas en el capítulo 7 y los numerosos receptores unidos a la proteína G tratados en el capítulo 13 pertenecen a esta clase, llamadas a veces proteínas *de pasaje múltiple*. Un tipo final de proteína de membrana carece totalmente de un segmento hidrófobo transmembrana; en cambio, estas proteínas se unen a un ancla de fosfolípido anfipático incluida en la membrana.

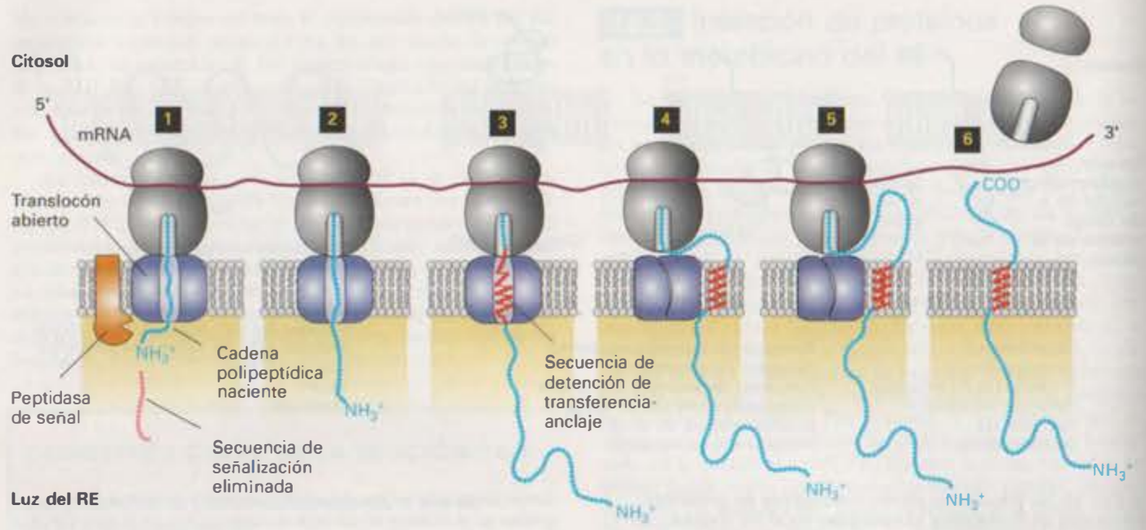
Secuencias internas de detención de transferencia y de señalización de anclaje determinan la topología de las proteínas de un solo pasaje

Empezamos la descripción con la inserción en la membrana de las proteínas integrales que contienen un solo segmento hidrófobo transmembrana. En el direccionamiento y la orientación de las proteínas tipo I en la membrana del RE están involucradas dos secuencias, en tanto que las proteínas tipos II y III contienen una sola secuencia topogénica interna.

Proteínas tipo I. Todas las proteínas transmembrana tipo I poseen una secuencia de señalización en el N-terminal que las dirige hacia el RE y una secuencia hidrófoba interna que se transforma en la hélice α transmembrana. La secuencia de señalización del N-terminal presente sobre una proteína naciente tipo I, como sucede con las secuencias de una proteína secretoria, comienza la translocación simultánea con la traducción de la proteína a través del efecto combinado de la SRP y del receptor de SRP. Una vez que el N-terminal del polipéptido creciente entra en la luz del RE, la secuencia de señalización es eliminada y la cadena creciente continúa siendo empujada a través de la membrana del RE. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede con las proteínas secretorias, una secuencia de aproximadamente 22 aminoácidos hidrófobos existente en el medio de la proteína tipo I detiene la transferencia de la cadena naciente a través del translocón (fig. 16-11). Debido a sus características hidrófobas, esta secuencia interna puede desplazarse lateralmente entre las subunidades de proteína que forman la pared del translocón y queda anclada en la bicapa de fosfolípidos de la membrana, donde permanece. Por su función dual, esta secuencia se denomina *secuencia de detención de transferencia y anclado*.

Una vez interrumpida la translocación, la traducción continúa en el ribosoma que todavía está fijo al ahora vacío y cerrado translocón. A medida que se sintetiza el C-terminal de la cadena de la proteína, forma un asa en el lado citosólico de la membrana. Cuando termina la traducción, el ribosoma se separa del translocón y el C-terminal de la proteína tipo I recién sintetizada queda en el citosol.

Los datos en apoyo de este modelo, representado en la figura 16-11, provienen de estudios en los que cDNA que codifican diversos receptores mutantes para la somatotrofina humana (HGH) se expresan en cultivos de células de mamífero. El receptor de HGH natural, una proteína tipo I típica, normalmente es transportada a la membrana plasmática. Sin embargo, un receptor mutante que tiene residuos cargados insertados en el segmento de hélice α transmembrana, o al que



▲ Fig. 16-11. Síntesis e inserción en la membrana del RE de las proteínas tipo I de un solo paso. Paso 1: Después de que el complejo ribosoma/cadena naciente se asocia con un translocón en la membrana del RE, la secuencia de señalización del N-terminal se elimina. Este proceso ocurre por el mismo mecanismo que utilizan las proteínas secretorias solubles (véase fig. 16-6). Pasos 2, 3: La cadena se alarga hasta que se sintetiza la secuencia hidrófoba de detención de transferencia-anclaje e ingresa en el translocón, donde impide a la cadena naciente seguir progresando hacia la luz del RE. Paso 4: La secuencia de detención de la transferencia-anclaje se desplaza lateralmente entre las subunidades del translocón y se fija en la bicapa de fosfolípidos. En este momento, el translocón probablemente se cierra. Paso 5: A medida que continúa la síntesis, la cadena en elongación puede formar un asa en el citosol a través del pequeño espacio existente entre el ribosoma y translocón (véase fig. 16-8). Paso 6: Cuando la síntesis se completa, las subunidades del ribosoma se liberan en el citosol y dejan la proteína libre para difundirse en la membrana. (Véase H. Do et al., 1996, *Cell* 85:369 y W. Mothes et al., 1997, *Cell* 89:523.)

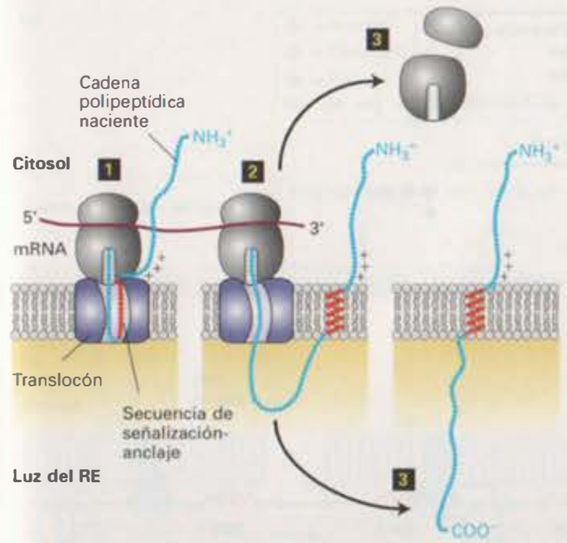
le falta la mayor parte de este segmento, es translocado completamente hacia la luz del RE y finalmente es secretado por la célula. Estos hallazgos establecen que la hélice α transmembrana hidrófoba del receptor de HGH y de otras proteínas tipo I funciona como secuencia de detención de la transferencia y como ancla a la membrana que impide que el C-terminal de la proteína atraviese la membrana del RE.

Proteínas tipo II y tipo III. A diferencia de las proteínas tipo I, las proteínas tipo II y tipo III carecen de una secuencia de señalización hacia el RE separable en el N-terminal. En cambio, ambas poseen una sola *secuencia de señalización-anclaje* interna hidrófoba que funciona al mismo tiempo como secuencia de señalización al RE y secuencia de anclaje a la membrana. Recordemos que las proteínas tipo II y tipo III tienen una orientación opuesta dentro de la membrana (véase fig. 16-10); esta diferencia depende de la orientación que sus respectivas secuencias de señalización-anclaje asumen dentro del translocón.

La secuencia de señalización-anclaje interna en las proteínas tipo II dirigen la inserción de la cadena naciente en la membrana del RE de tal forma que el N-terminal de la cadena enfrente al citosol (fig. 16-12). La secuencia de señalización-anclaje interna *no* es cortada y permanece dentro del translocón mientras la región del C-terminal de la cadena naciente es empujada hacia la luz del RE por translocación simultánea con la traducción. Durante la síntesis, la secuencia de señalización-anclaje se desplaza lateralmente entre las subunidades de proteína que forman la pared del translocón hacia la bicapa de fosfolípidos, donde funciona como un ancla de membrana. Por consiguiente esta función es similar a la función de fijación de la secuencia de detención de la transferencia-anclaje en las proteínas tipo I.

En el caso de las proteínas tipo III, la secuencia de señalización-anclaje que se localiza cerca del N-terminal inserta la cadena naciente en la membrana del RE con el N-terminal enfrentando la luz, exactamente al contrario que las proteínas tipo II. La secuencia de señalización-anclaje de las proteínas tipo III también previene la extrusión adicional de la cadena naciente hacia la luz del RE y funciona como una secuencia de detención de transferencia. La elongación continua del C-terminal de la cadena hasta la secuencia de señalización-anclaje/detención de la transferencia tiene lugar como en las proteínas tipo I; la secuencia hidrófoba se desplaza lateralmente entre las subunidades del translocón para fijar el polipéptido a la membrana del RE (véase fig. 16-11).

Una de las características de las secuencias de señalización-anclaje que parecen determinar su orientación de inserción es la alta concentración de aminoácidos cargados positivamente adyacente a un extremo del segmento hidrófobo. Por razones no bien conocidas estos residuos cargados positivamente tienden a permanecer del lado citosólico de la membrana, lo que determina la orientación de la secuencia de señalización-anclaje dentro del translocón. Por lo tanto, las proteínas tipo II tienden a tener residuos cargados positivamente en el lado del N-terminal de su secuencia de señalización-anclaje, en tanto que las proteínas tipo III tienden a tenerlos en el lado del C-terminal.



▲ Fig. 16-12. Síntesis e inserción en la membrana del RE de las proteínas tipo II de un solo paso. Paso 1: Después de que la secuencia de señalización-anclaje interna se sintetiza en un ribosoma citosólico, es captada por una SRP (no mostrado) que dirige el complejo ribosoma/cadena naciente a la membrana del RE. Esto es similar al direccionamiento de las proteínas secretorias solubles, excepto en que la secuencia de señalización hidrófoba no está localizada en el N-terminal y en consecuencia no es eliminada. La cadena naciente se orienta en el translocón con su porción N-terminal hacia el citosol. Se cree que esta orientación es mediada por los residuos cargados positivamente que se muestran hacia el lado N-terminal de la secuencia de señalización-anclaje. Paso 2: A medida que la cadena se alarga y surge en la luz, la secuencia de señalización-anclaje interna se desplaza lateralmente desde el translocón y ancla la cadena en la bicapa de fosfolípido. Paso 3: Una vez terminada la síntesis de la proteína, el C-terminal del polipéptido se libera en la luz y las subunidades del ribosoma se liberan al citosol. (Véase M. Spiess y H. F. Lodish, 1986, *Cell* 44:177, y H. Do et al., 1996, *Cell* 85:369.)

Una demostración experimental notable de la importancia de la carga lateral en la determinación de la orientación dentro de la membrana la proporciona la neuraminidasa, una proteína tipo II presente en la envoltura del virus de la gripe. Tres residuos de arginina se localizan inmediatamente hacia el N-terminal de la secuencia interna de señalización-anclaje de la neuraminidasa. La mutación de estos tres residuos cargados positivamente a residuos de glutamato cargados negativamente hace que la neuraminidasa adquiera una orientación inversa. Experimentos similares han demostrado que puede lograrse que otras proteínas, con orientación tipo II o tipo III, "salten" a la orientación inversa en la membrana del RE mutando los residuos cargados que flanquean el segmento interno de señalización-anclaje.

Las proteínas de pasaje múltiple tienen secuencias topogénicas internas múltiples

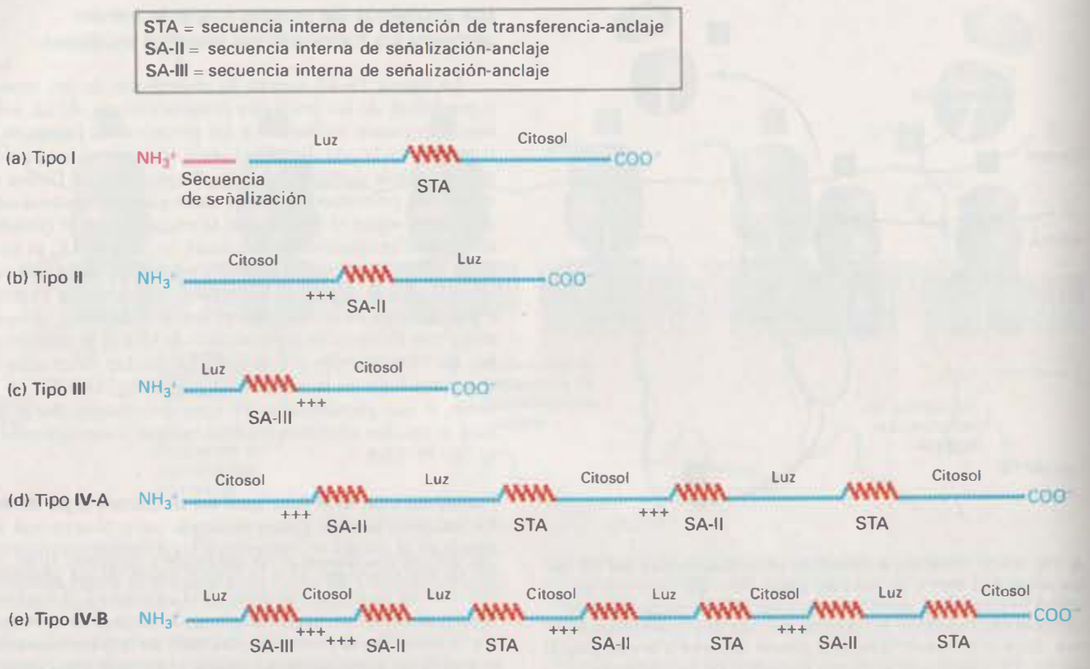
La figura 16-13 resume la disposición de las secuencias topogénicas de las proteínas transmembrana de un solo pasaje y de pasaje múltiple. En las proteínas de pasaje múltiple (tipo IV), cada una de las hélices α transmembrana actúa como secuencia topogénica de las formas que ya hemos analizado. Las proteínas de pasaje múltiple pertenecen a uno de dos tipos, según el N-terminal se encuentre en el citosol o en el espacio exoplasmático (es decir, la luz del RE, el exterior de la célula). Esta topología del N-terminal suele estar determinada por el segmento hidrófobo adyacente al N-terminal y por la carga de las secuencias que lo flanquean. Si una proteína tipo IV tiene un número *par* de hélices α transmembrana, sus N-terminales y C-terminales quedan orientados hacia el mismo lado de la membrana (véase fig. 16-13d). A la inversa, si una proteína tipo IV tiene un número *impar* de hélices α, sus dos extremos tendrán orientaciones opuestas (véase fig. 16-13e).

Proteínas con el N-terminal en el citosol (tipo IV-A) Entre las proteínas de pasaje múltiple cuyo N-terminal se extiende en el citosol se encuentran los diferentes transportadores de glucosa (GLUT) y la mayor parte de las proteínas de los canales de iones descritos en el capítulo 7. En estas proteínas, el segmento hidrófobo más cercano al N-terminal inicia la inserción de la cadena naciente en la membrana de RE, con el N-terminal orientado hacia el citosol; por consiguiente este segmento helicoidal α funciona como una secuencia de señalización-anclaje interna de una proteína tipo II (véase fig. 16-12). A medida que la cadena naciente posterior a la primera hélice α se alarga, se desplaza a través del translocón hasta que se forma la segunda hélice α hidrófoba. Esta hélice impide que la cadena naciente siga pasando a través del translocón; por lo tanto, su función es similar a la de la secuencia de detención de transferencia-anclaje de una proteína tipo I (véase fig. 16-11).

Después de la síntesis de las dos primeras hélices α transmembrana, ambos extremos de la cadena naciente están en el citosol y el asa entre ellas se extiende en la luz del RE. El C-terminal de la cadena naciente continúa creciendo luego en el citosol, como sucede en la síntesis de las proteínas tipos I y III. De acuerdo con este mecanismo, la tercera hélice α actúa como otra secuencia de señalización-anclaje tipo II y la cuarta como otra secuencia de detención de la transferencia-anclaje (véase fig. 16-13d). Al parecer, una vez que la primera secuencia topogénica de un polipéptido de pasaje múltiple comienza su asociación con el translocón, el ribosoma permanece unido a él y las secuencias topogénicas que surgen del ribosoma se enhebran en el translocón sin necesidad de una SRP ni del receptor de SRP.

Algunos experimentos realizados con técnicas de DNA recombinante para intercambiar hélices α hidrófobas han proporcionado un panorama del funcionamiento de las secuencias topogénicas en las proteínas tipo IV-A de pasaje múltiple. Estos experimentos indican que el orden que guardan entre sí las hélices α hidrófobas en la cadena creciente determina en gran medida si una hélice determinada funciona como una secuencia de señal-anclaje o una secuencia de detención de transferencia-anclaje.

Aparte de su hidrofobicidad, la secuencia de aminoácidos específica de una hélice tiene poca relación con su función.



▲ Fig. 16-13. Disposición de las secuencias topogénicas en las proteínas de membrana de un solo paso y de paso múltiple insertadas en la membrana del RE. Las secuencias topogénicas están en rojo; las porciones solubles, hidrófilas, en azul. Las secuencias topogénicas internas forman hélices α transmembrana que anclan las proteínas o segmentos de proteínas a la membrana. (a) Las proteínas tipo I contienen una secuencia de señalización escindida y una sola ancla interna de detención de la transferencia (STA). (b, c) Las proteínas tipo II y tipo III contienen una sola secuencia de señalización interna-anclaje (SA). La diferencia en la orientación de estas proteínas depende en gran medida de si existe una densidad alta de aminoácidos cargados positivamente (+++) hacia el lado N-terminal de la secuencia SA (tipo II) o hacia el lado C-terminal de la secuencia SA (tipo III). (d, e) Casi todas las proteínas de paso múltiple carecen de una secuencia de señalización escindible, como se ve en los ejemplos mostrados aquí. Las proteínas tipo IV-A, cuyo extremo N enfrenta el citosol, contienen secuencias SA-II y secuencias STA alternadas. Las proteínas tipo IV-B, cuyo N-terminal enfrenta la luz, empiezan con una secuencia SA-III seguida por secuencias SA-II y STA alternadas. Se conocen proteínas de cada tipo con número diferente de hélices α (impar o par).

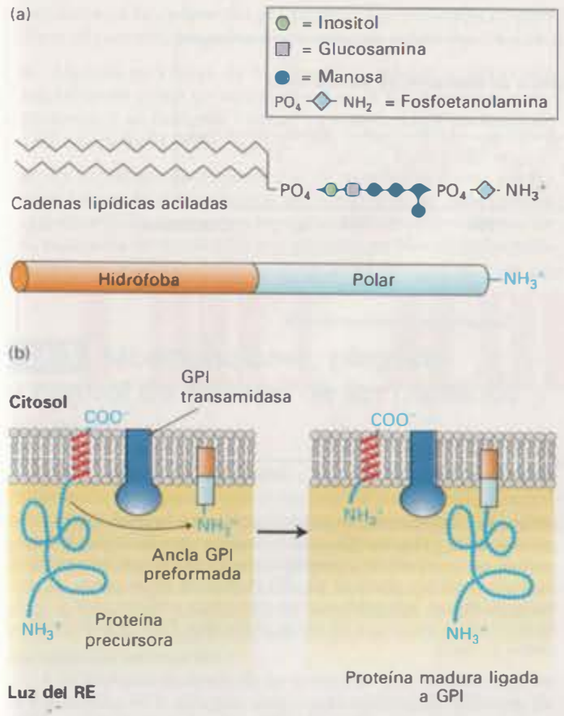
Por consiguiente la primera hélice α del N-terminal y las siguientes en ubicación impar funcionan como secuencias de señalización-anclaje, en tanto que las hélices en posición par que se encuentran entre ellas funcionan como secuencias de detención de transferencia-anclaje.

Proteínas con el N-terminal en el espacio exoplasmático (Tipo IV-B) La gran familia de receptores unidos a la proteína G, todos los cuales contienen siete hélices α transmembrana, constituyen el grupo más numeroso de proteínas tipo IV-B, cuyo N-terminal se encuentra en el espacio exoplasmático. En estas proteínas, la hélice α hidrófoba más cercana al N-terminal a menudo es seguida por un grupo de aminoácidos cargados positivamente, de manera similar a una secuencia de señalización-anclaje tipo III. Como resultado, la primera hélice α inserta la cadena naciente en el translocón con el extremo N hacia la luz (véase fig. 16-13c). A medida que la cadena se alarga, se inserta en la membrana del RE alternando secuencias de señalización-anclaje y secuencias de detención de transferencia tipo II, como se describió para las proteínas tipo IV-A.

Un ancla de fosfolípido mantiene algunas proteínas de la superficie celular unidas a la membrana

Algunas proteínas de la superficie celular no están ancladas a la bicapa de fosfolípidos por una secuencia de aminoácidos hidrófobos, sino por una molécula anfipática unida covalentemente, el *glucosilfosfatidilinositol (GPI)* (fig. 16-14a). Estas proteínas se sintetizan y se fijan en un principio a la membrana del RE exactamente como las proteínas transmembrana tipo I, proceso dirigido por una secuencia de señalización separada en el N-terminal y una secuencia de detención de transferencia-anclaje interna (véase fig. 16-11). Sin embargo, una secuencia corta de aminoácidos en el dominio luminal, adyacente al dominio transmembrana, es reconocida por una transamidasa localizada dentro de la membrana del RE. Esta enzima corta la secuencia de detención de transferencia-anclaje original y simultáneamente transfiere el resto de la proteína a un GPI preformado fijo en la membrana (fig. 16-14b).

¿Por qué cambiar un tipo de anclaje a la membrana por otro? La unión al ancla de GPI, cuyo resultado es la eliminación del dominio hidrófilo de la proteína que enfrenta al citosol, puede tener varias consecuencias. Por ejemplo, las proteínas con anclas de GPI pueden difundirse en el plano de la bicapa de fosfolípidos de la membrana. En cambio, muchas proteínas fijadas a la membrana por hélices α transmembrana están inmovilizadas en la membrana porque sus segmentos que enfrentan el citosol interactúan con el citoesqueleto.



▲ Fig. 16-14. Proteínas ancladas por GPI. (a) Estructura de un glucosilfosfatidilinositol (GPI) de levadura. La porción hidrófoba de la molécula se compone de cadenas de ácidos grasos, en tanto que la porción polar (hidrófila) está compuesta por residuos de hidratos de carbono y grupos fosfato. En otros microorganismos, tanto la longitud de la cadena acilada como la de las porciones de hidratos de carbono pueden diferir un poco de la estructura mostrada. (b) Formación de proteínas ancladas por GPI en la membrana del RE. La proteína se sintetiza e inicialmente se inserta en la membrana del RE como se muestra en la figura 16-11. Una transamidasa específica secciona simultáneamente la proteína precursora dentro del dominio exoplasmático, cerca de la secuencia de detención de transferencia-anclaje (en rojo) y transfiere el grupo carboxilo del nuevo C-terminal al grupo aminoterminal de un ancla de GPI preformada. (Véase C. Abeijon y C. B. Hirschberg, 1992. *Trends Biochem. Sci.* 17:32 y K. Kodukula et al., 1992. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA.* 89:4982.)

Además, las anclas de GPI dirigen a la proteína unida a la zona apical de la membrana plasmática en ciertas células epiteliales polarizadas, como se describe en el capítulo 17.

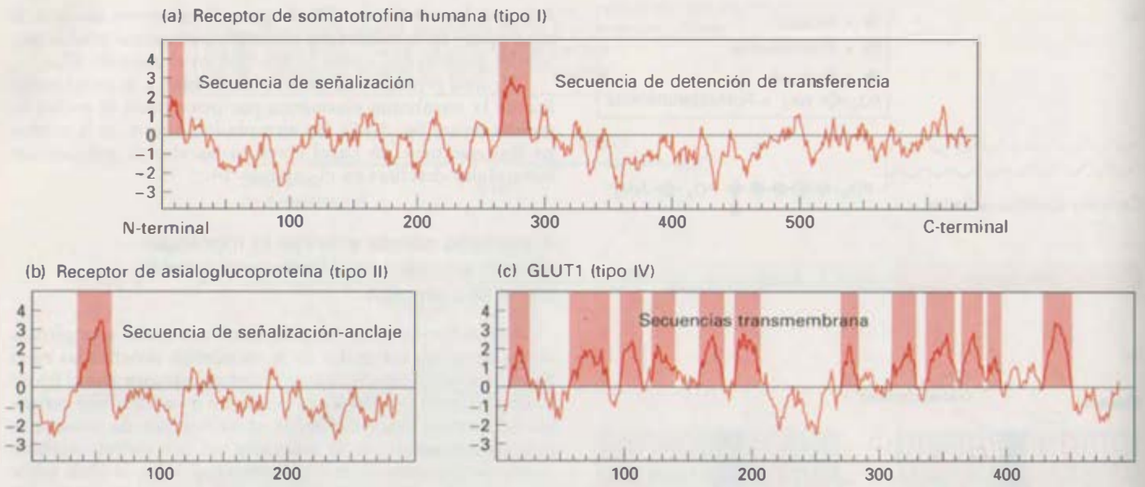
Algunas proteínas de membrana se fijan a la cara citosólica de la membrana plasmática por otros tipos de anclas lipídicas (véase fig. 5-15). Un ejemplo importante es la proteína Ras que tiene un papel clave en las vías de señalización intracelular descritas en el capítulo 14.

A menudo puede inferirse la topología de una proteína de membrana a partir de su secuencia

Como hemos visto, las diferentes secuencias topogénicas de las proteínas integrales de la membrana sintetizadas en el RE gobiernan la interacción de la cadena naciente con el translocón. Cuando los científicos empiezan a estudiar una proteína de función desconocida, la identificación de secuencias topogénicas dentro de la secuencia del gen correspondiente puede proporcionar indicios importantes sobre la clase topológica y la función de la proteína. Por ejemplo, supongamos que el gen para una proteína que se sabe es necesaria para una vía de señalización intercelular contiene secuencias de nucleótidos que codifican una aparente secuencia de señalización en el N-terminal y una secuencia hidrófoba interna. Estos datos sugerirían que se trata de una proteína integral de la membrana tipo I y, por consiguiente, puede ser un receptor de la superficie celular para un ligando extracelular.

La identificación de secuencias topogénicas requiere que exista alguna manera de examinar las bases de datos de secuencias en busca de segmentos que sean lo suficientemente hidrófobos como para ser una secuencia de señalización o una secuencia de anclaje transmembrana. A menudo pueden identificarse las secuencias topogénicas mediante programas de computadora que generan un *perfil de hidropatía* para la proteína en estudio. El primer paso es asignar un valor, conocido como *índice hidropático*, a cada aminoácido de la proteína. Por convención, a los aminoácidos hidrófobos se les asignan valores positivos y a los aminoácidos hidrófilos valores negativos. Aunque existen escalas diferentes para el índice hidropático, todas asignan los valores más positivos a los aminoácidos con cadenas laterales formadas principalmente por residuos de hidratos de carbono (p. ej., fenilalanina y metionina) y los valores más negativos a los aminoácidos cargados (p. ej., arginina y aspartato). El segundo paso es identificar segmentos largos con suficiente hidrofobicidad global como para ser secuencias de señalización del N-terminal o secuencias internas de detención de transferencia y secuencias de señalización-anclaje. Para lograrlo, se calculan los índices hidropáticos totales para cada "ventana" sucesiva de 20 aminoácidos consecutivos a lo largo de toda la longitud de la proteína. Las representaciones gráficas de estos valores calculados en relación con la posición en la secuencia de aminoácidos proporcionan un perfil de hidropatía.

La figura 16-15 muestra los perfiles de hidropatía para tres proteínas de membrana diferentes. Los picos prominentes en esos gráficos identifican las probables secuencias topogénicas, así como su posición y longitud aproximadas. Por ejemplo, el perfil de hidropatía del receptor de la somatotrofina revela la presencia de una secuencia de señalización hidrófoba en el N-terminal de la proteína y una secuencia interna hidrófoba de detención de la transferencia (véase fig. 16-15a). Sobre la base de este perfil se puede deducir, correc-



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 16-15 Los perfiles de hidropatía pueden identificar las probables secuencias topogénicas en las proteínas integrales de la membrana. Los perfiles de hidropatía se generan representando gráficamente la hidrofobicidad total de cada segmento de 20 aminoácidos contiguos a lo largo de la longitud de una proteína. Los valores positivos indican porciones relativamente hidrófobas; los valores negativos, porciones relativamente polares de la proteína. Se marcan las secuencias topogénicas probables. Los perfiles complejos de las proteínas de paso múltiple (tipo IV), como el GLUT1 mostrada en el panel (c), a menudo deben complementarse con otros análisis para determinar la topología de estas proteínas. Para la explicación véase el texto.

tamente, que el receptor de la somatotrofina humana es una proteína tipo I integral de membrana. El perfil de hidropatía del receptor de asialoglucoproteína revela una secuencia de señalización-anclaje hidrófoba interna prominente, pero no hay ninguna indicación de que exista una secuencia de señalización hidrófoba en el N-terminal (véase fig. 16-15b). Por consiguiente, se puede predecir que el receptor de asialoglucoproteína es una proteína de membrana tipo II o tipo III. La distribución de residuos cargados a ambos lados de la secuencia de señalización-anclaje a menudo puede distinguir entre estas dos posibilidades, ya que los aminoácidos cargados positivamente que flanquean un segmento transmembrana suelen orientarse hacia la cara citosólica de la membrana. Por ejemplo, en el caso del receptor asialoglucoproteína, una proteína tipo II, los residuos en el lado del N-terminal del pico hidrófobo tienen una carga positiva neta.

El perfil de hidropatía del transportador de glucosa GLUT1, una proteína de membrana de pasaje múltiple, revela la presencia de muchos segmentos suficientemente hidrófobos para ser hélices transmembrana (fig. 16-15c). La complejidad de este perfil ilustra la dificultad que existe para identificar todos los segmentos transmembrana inequívocamente en una proteína de pasajes múltiples y para predecir la topología de cada secuencia de señalización-anclaje y de detención de transferencia. Se han creado algoritmos computarizados más sofisticados que tienen en cuenta la presencia de aminoácidos cargados positivamente adyacentes a los segmentos hidrófobos, así como la longitud y el espaciado entre los segmentos. Con esa información, los mejores algoritmos pueden predecir la topología compleja de las proteínas de pasaje múltiple con una exactitud mayor del 75%.

Por último, la homología de secuencias con una proteína conocida puede permitir pronosticar exactamente la topología de una proteína de pasaje múltiple recién descubierta. Por ejemplo, los genomas de los organismos multicelulares codifican un número muy grande de proteínas de pasaje múltiple con siete hélices α transmembrana. La similitud entre las secuencias de estas proteínas sugiere que todas tienen la misma topología que los bien estudiados receptores unidos a proteína G, que tienen el N-terminal orientado hacia el lado exoplasmático y el C-terminal orientado al lado citosólico de la membrana.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 16.2

Inserción de proteínas en la membrana del RE

- Las proteínas integrales de membrana sintetizadas en el RE rugoso pertenecen a cuatro clases topológicas (véase fig. 16-10).
- Las secuencias topogénicas –secuencias de señalización del N-terminal, secuencias internas de detención de transferencia-anclaje y secuencias internas de señalización-anclaje– dirigen la inserción y la orientación de las proteínas nacientes dentro de la membrana del RE. Esta orientación se retiene durante el transporte de la proteína de membrana completada a su destino final.
- Las proteínas de membrana de un solo pasaje contienen una o dos secuencias topogénicas. En las proteínas de membrana de pasaje múltiple, cada segmento helicoidal α puede funcionar como una secuencia topogénica interna, según su situación en la cadena del polipéptido y la presencia de residuos adyacentes cargados positivamente (véase fig. 16-13).
- Algunas proteínas de la superficie celular se sintetizan inicialmente como proteínas tipo I en el RE y luego son degradadas y su dominio luminal es transferido a un ancla de GPI (véase fig. 16-14).
- La topología de las proteínas de membrana puede predecirse a menudo correctamente por programas de computación que identifican segmentos topogénicos hidrófobos dentro de la secuencia de aminoácidos y generan perfiles de hidropatía (véase fig. 16-15).

16.3 Modificaciones, plegado y control de calidad de las proteínas en el RE

Las proteínas de membrana y secretorias solubles sintetizadas en el RE rugoso son sometidas a cuatro modificaciones principales antes de alcanzar sus destinos finales: 1) agregado y procesado de hidratos de carbono (*glucosilación*) en el RE y el Golgi, 2) formación de puentes disulfuro en el RE, 3) plegado apropiado de las cadenas de polipéptidos y ensamblaje de proteínas compuestas de subunidades múltiples en el RE y 4) cortes proteolíticos específicos en el RE, el Golgi y las vesículas secretorias.

A la inmensa mayoría de las proteínas que se sintetizan en el RE rugoso se le agregan una o más cadenas de hidratos de carbono; de hecho, la glucosilación es la principal modificación química que sufre la mayor parte de estas proteínas. La cadena de hidrato de carbono de las glucoproteínas puede unirse al grupo hidroxilo de la serina y treonina o al nitrógeno de la amida de la asparagina. Estas cadenas son llamadas *oligosacáridos O-ligados y N-ligados*, respectivamente. Los oligosacáridos O-ligados, como los que se encuentran en el colágeno y la glucoforina, a menudo contienen sólo uno a cuatro residuos de azúcar. Los oligosacáridos *N*-ligados son más frecuentes, más grandes y más complejos, y contienen varias ramas en las células de mamífero. En esta sección nos centramos en los oligosacáridos *N*-ligados cuya síntesis inicial ocurre en el RE. Después de la glucosilación inicial de una proteína en el RE, la cadena del oligosacáridos es modificada en el RE y normalmente también en el Golgi.

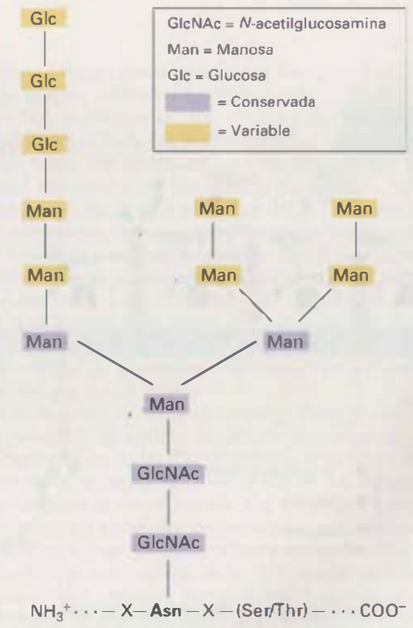
En esta sección describimos además la formación de puentes disulfuro, el plegado de proteínas y el ensamblaje de proteínas multiméricas, que tienen lugar exclusivamente en el RE rugoso. Sólo las proteínas plegadas y ensambladas adecuadamente son transportadas del RE rugoso al complejo de Golgi y por último a la superficie celular u otro destino final. Las proteínas desplegadas, mal plegadas o parcialmente plegadas y ensambladas son retenidas selectivamente en el RE rugoso. Se describen varias características de este "control de calidad" en la última parte de esta sección.

Como ya se dijo, las secuencias de señalización hacia el RE del N-terminal son escindidas de las proteínas secretorias y de las proteínas de membrana tipo I en el RE. Algunas proteínas también son sometidas a otros cortes proteolíticos específicos en el complejo de Golgi o en las vesículas secretorias en formación. Estos procesos, así como las modificaciones de los hidratos de carbono que ocurren principal o exclusivamente en el complejo de Golgi, se describen en el próximo capítulo.

Un oligosacárido *N*-ligado preformado se agrega a muchas proteínas en el RE rugoso

La biosíntesis de todos los oligosacáridos *N*-ligados empieza en el RE rugoso con el agregado de un precursor oligosacárido preformado que contiene 14 residuos (fig. 16-16). La estructura de este precursor es la misma en las plantas, los animales y los eucariontes unicelulares: un oligosacárido ramificado, que contiene tres moléculas de glucosa (Glc), nueve de manosa (Man) y dos de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), lo que puede escribirse como $Glc_3Man_9(GlcNAc)_2$. Esta estructura de hidrato de carbono ramificado es modificada en el RE y el complejo de Golgi, pero en las proteínas secretorias y de membrana se conservan 5 de los 14 residuos en las estructuras de todos los oligosacáridos *N*-ligados.

El oligosacárido precursor se une por un residuo pirofosforilo al *dolicol*, un lípido poliisoprenoide de cadena larga que está firmemente incluido en la membrana del RE y actúa como un portador para el oligosacárido. El oligosacárido pirofosforil-dolicol se forma sobre la membrana del RE mediante un complejo conjunto de reacciones catalizadas por enzimas unidas a la cara citosólica o luminal de la membrana del



▲ Fig. 16-16. Precursor común de 14 residuos de oligosacáridos *N*-ligados que se agrega a las proteínas nacientes en el RE rugoso. La eliminación y, en algunos casos, el agregado posterior de residuos de azúcar específicos tiene lugar en el RE y en el complejo de Golgi. La región central, compuesta de cinco residuos resaltados en violeta, se conserva en todos los oligosacáridos *N*-ligados. El precursor sólo puede unirse a residuos de asparagina (Asn) que estén separados por un aminoácido (X) de una serina (Ser) o treonina (Thr) hacia el lado carboxilo.

RE rugoso (fig. 16-17). El oligosacárido pirofosforil-dolicol final está orientado de tal forma que la porción oligosacárido enfrenta la luz del RE.

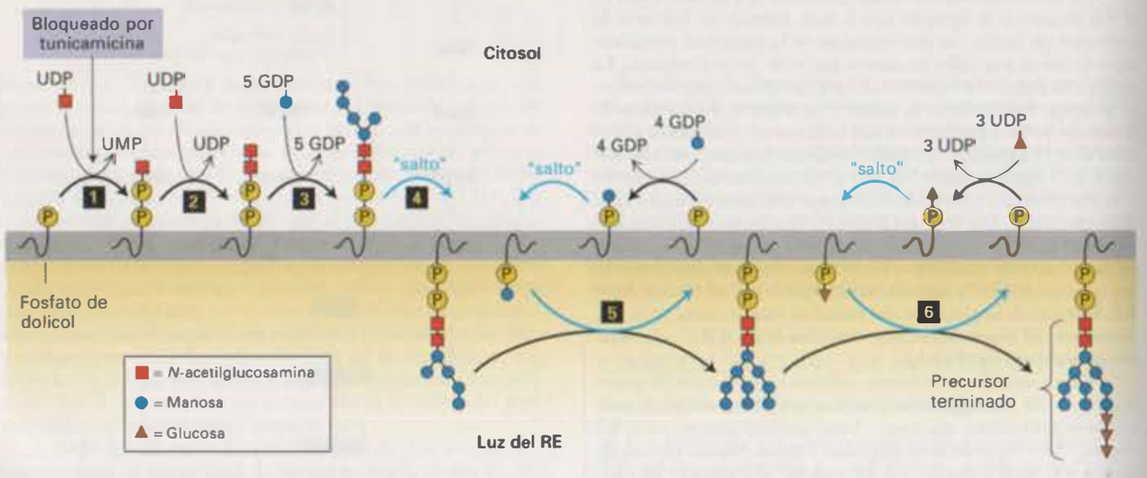
Todo el precursor de 14 residuos es transferido del portador dolicol a un residuo de asparagina de un polipéptido naciente tan pronto como surge en la luz del RE (fig. 16-18, paso 1). Sólo los residuos de asparagina en las secuencias tripeptídicas Asn-X-Ser y Asn-X-Thr (donde X es cualquier aminoácido excepto prolina) son sustratos para la *oligosacaril-transferasa*, la enzima que cataliza esta reacción. Dos de las tres subunidades de esta enzima son proteínas de membrana del RE, cuyos dominios enfrentados al citosol se unen al ribosoma, lo que ubica una tercera subunidad de la transferasa, la subunidad catalizadora, cerca de la cadena de polipéptido creciente en la luz del RE. No todas las secuencias Asn-X-Ser/Thr se glucosilan; por ejemplo, el plegado rápido de un segmento de una proteína que contiene una secuencia Asn-X-Ser/Thr puede impedir la transferencia del oligosacárido precursor a ese segmento.

Inmediatamente después que el precursor, $Glc_3Man_9(GlcNAc)_2$, se transfiere a un polipéptido naciente, tres enzimas diferentes eliminan los tres residuos de glucosa y un residuo de manosa en particular (fig. 16-18, pasos 2-4). Los tres residuos de glucosa, que son los últimos residuos agregados al portador de dolicol durante la síntesis del precursor, parecen actuar como una señal de que el oligosacárido está completo y listo para ser transferido a una proteína.

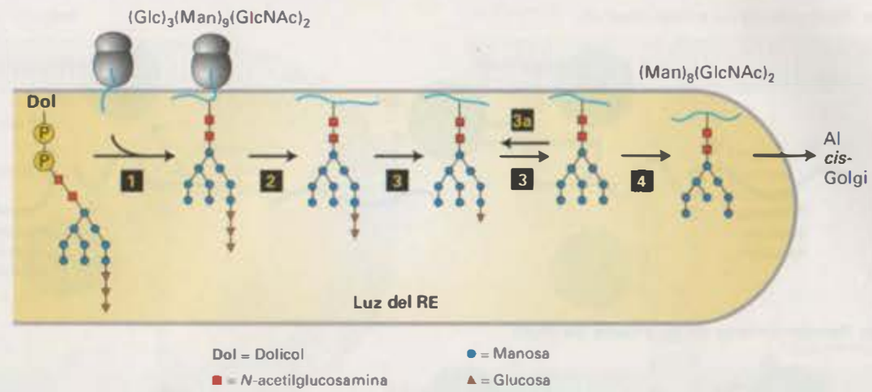
Las cadenas laterales del oligosacárido pueden estimular el plegado y la estabilidad de las glucoproteínas

Los oligosacáridos unidos a las glucoproteínas cumplen diversas funciones. Por ejemplo, algunas proteínas necesitan tener oligosacáridos *N*-ligados para plegarse adecuadamente en el RE. Esta función se ha demostrado en estudios realizados con el antibiótico tunicamicina, que bloquea el primer paso de la formación del precursor unido a dolicol de los oligosacáridos *N*-ligados (véase fig. 16-17). En presencia de tunicamicina, por ejemplo, el polipéptido precursor de la hemaglutinina (HA_0) se sintetiza, pero no puede plegarse adecuadamente y formar un trímero normal; en este caso, la proteína permanece en el RE rugoso, mal plegada. Además, la mutación en la secuencia de la HA de sólo una asparagina, que normalmente es glucosilada por un residuo de glutamina e impide así el agregado de un oligosacárido *N*-ligado en ese sitio, hace que la proteína se acumule en el RE en un estado desplegado.

Además de promover el plegado adecuado, los oligosacáridos *N*-ligados confieren también estabilidad a muchas



▲ Fig. 16-17. Biosíntesis del dolicol pirofosforil oligosacárido precursor de los oligosacáridos unidos al *N*. El dolicol fosfato es un lípido fuertemente hidrófobo, que contiene 75-95 átomos de carbono y que está incluido en la membrana del RE. Se agregan dos residuos de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y cinco residuos de manosa en un solo paso a un dolicol fosfato en la superficie citosólica de la membrana del RE (pasos 1-3). Los donantes de nucleótidos-azúcar en estas reacciones y las posteriores se sintetizan en el citosol. Nótese que el primer residuo de azúcar se une al dolicol por un enlace pirofosfato de alta energía. La tunicamicina, que bloquea la primera enzima de esta vía, inhibe la síntesis de todos los oligosacáridos *N*-ligados en las células. Después que el intermediario dolicol pirofosforil de siete residuos rota hacia la cara luminal (paso 4), los cuatro residuos de manosa y los tres de glucosa restantes se agregan en un solo paso (pasos 5, 6). En estas últimas reacciones, el azúcar que va a ser agregado es transferido en primer lugar de un nucleótido-azúcar a un fosfato de dolicol portador en la cara citosólica del RE; el portador rota luego hacia la cara luminal donde el azúcar se transfiere al oligosacárido creciente; después el portador "vacío" rota nuevamente hacia la cara citosólica. (Según C. Abeijon y C. B. Hirschberg, 1992, *Trends Biochem. Sci.* 17:32.)



▲ Fig. 16-18. Agregado y procesamiento inicial de oligosacáridos *N*-ligados en el RE rugoso de células de vertebrados. El precursor $Glc_3Man_9(GlcNAc)_2$ se transfiere del portador dolicol a un residuo de asparagina apropiado presente en una proteína naciente en cuanto la asparagina llega al lado luminal del RE (paso 1). En tres reacciones separadas, se eliminan primero un residuo de glucosa (paso 2), luego dos residuos de glucosa (paso 3) y por último un residuo de manosa (paso 4). El reagregado de un residuo de glucosa (paso 3a) tiene importancia para el plegado correcto de muchas proteínas en el RE, como se explica más adelante. (Véase R. Kornfeld y S. Kornfeld, 1985, *Ann. Rev. Biochem.* 45:631 y M. Sousa y A. J. Parodi, 1995. *EMBO J.* 14:4196.)

glucoproteínas secretadas. Muchas proteínas secretorias se pliegan adecuadamente y son transportadas a su destino final aun cuando se bloqueen todas las uniones de oligosacáridos al *N*, por ejemplo, por agregado de tunicamicina. Sin embargo, se ha demostrado que estas proteínas no glucosiladas son menos estables que sus formas glucosiladas. Por ejemplo, la fibronectina glucosilada, un componente normal de la matriz extracelular, es degradada mucho más lentamente por las proteasas tisulares que la fibronectina no glucosilada.

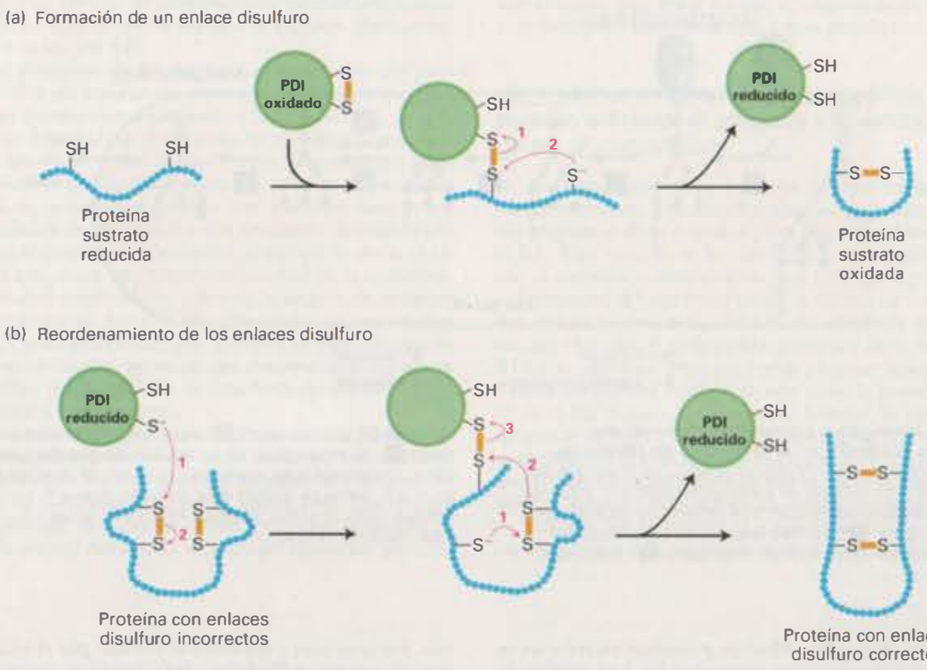
Los oligosacáridos presentes en ciertas glucoproteínas de la superficie celular también son importantes en la adhesión intercelular. Por ejemplo, la membrana plasmática de los glóbulos blancos (leucocitos) contiene moléculas de adhesión celular (CAM) extensamente glucosiladas. Los oligosacáridos presentes en estas moléculas interactúan con un dominio ligador de azúcares presente en ciertas CAM que se encuentran en las células endoteliales que tapizan los vasos sanguíneos. Esta interacción adhiere los leucocitos al endotelio y colabora en su desplazamiento hacia los tejidos durante la respuesta inflamatoria a una infección (véase fig. 6-30). Otras glucoproteínas de la superficie celular poseen cadenas laterales de oligosacáridos que pueden inducir una respuesta inmune. Un ejemplo común son los antígenos A, B, 0 de los grupos sanguíneos, que son oligosacáridos *O-ligados* unidos a las glucoproteínas y glucolípidos de la superficie de los eritrocitos y otros tipos celulares (véase fig. 5-16).

Los puentes disulfuro son formados y reordenados por proteínas de la luz del RE

En el capítulo 3 aprendimos que los enlaces disulfuro (-S-S-) intramoleculares e intermoleculares ayudan a estabilizar la estructura terciaria y cuaternaria de muchas proteínas. Estos enlaces covalentes se forman por el enlace oxidativo de grupos sulfhidrilo (-SH), también conocidos como grupos *tiol*, existentes en dos residuos de cisteína de la misma o diferentes cadenas polipeptídicas. Esta reacción puede tener lugar espontáneamente sólo cuando hay un agente oxidante adecuado. En las células eucariontes, los puentes disulfuro se forman sólo en la luz del RE rugoso; en las células bacterianas, se forman en el espacio periplasmático entre la membrana interna y externa. Por lo tanto, los enlaces disulfuro sólo se encuentran en las proteínas secretorias y en los dominios exoplasmáticos de las proteínas de membrana. Las proteínas citosólicas y las proteínas de los orgánulos sintetizados en los ribosomas libres carecen de enlaces disulfuro y dependen de otras interacciones para estabilizar sus estructuras.

La formación eficiente de enlaces disulfuro en la luz del RE depende de la enzima disulfuro isomerasa de proteínas (PDI) presente en todas las células eucariontes. Esta enzima es especialmente abundante en el RE de las células secretorias de órganos como el hígado y el páncreas, donde se producen grandes cantidades de proteínas que contienen puentes disulfuro. Como se muestra en la figura 16-19a, el puente disulfuro en el sitio activo de la PDI puede transferirse con facilidad a una proteína por dos reacciones secuenciales de transferencia de tiol-disulfuro. La PDI reducida generada por esta reacción vuelve a su forma oxidada por la acción de una proteína residente en el RE, denominada *Ero1*, que lleva un puente disulfuro que puede transferirse a la PDI. Todavía no se sabe cómo se oxida el Ero1. La figura 16-20 muestra la organización de la vía para la formación de puentes disulfuro en las proteínas en la luz del RE y la vía análoga de las bacterias.

En las proteínas que contienen más de un puente disulfuro, el apareamiento apropiado de los residuos de cisteína es esencial para asegurar una estructura y actividad normales. Por lo general, los puentes disulfuro se forman entre cis-

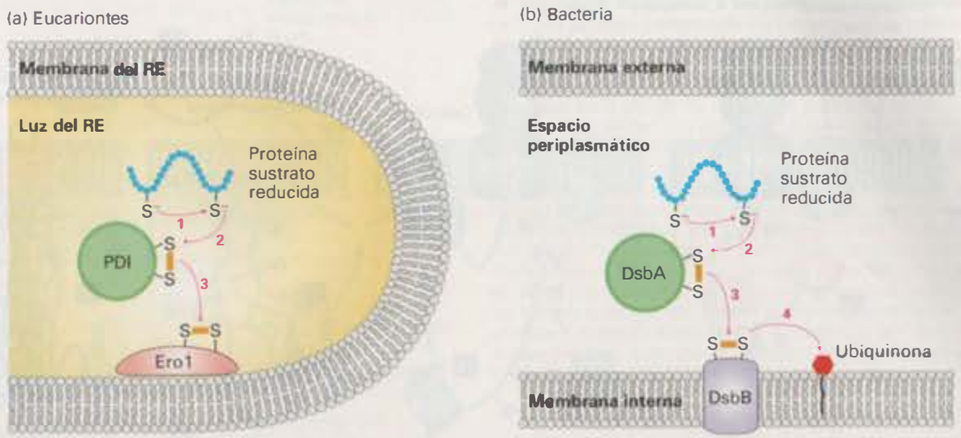


▲ Fig. 16-19. Formación y reordenamiento de los enlaces disulfuro por la disulfuro isomerasa de proteínas (PDI). La PDI contiene un sitio activo con dos residuos de cisteína muy cercanos, que son fácilmente interconvertidos entre la forma ditiol reducida y la forma disulfuro oxidada. Las flechas rojas numeradas indican la secuencia de transferencias de electrones. Las barras amarillas representan enlaces disulfuro. (a) En la formación de enlaces disulfuro, la forma ionizada ($-S^-$) tiol de la cisteína en la proteína sustrato reacciona con el enlace disulfuro (S-S) de la PDI oxidada para formar una proteína sustrato intermediaria unida a PDI por un puente disulfuro. Luego, un segundo tiol ionizado en el sustrato reacciona con este intermediario, forma un enlace disulfuro dentro de la proteína sustrato y libera la PDI reducida. (b) La PDI reducida puede catalizar el reordenamiento de enlaces disulfuro similares formados inadecuadamente por reacciones de transferencia tiol-disulfuro. En este caso, la PDI comienza reducida y es regenerada en la vía de la reacción. Estas reacciones se repiten hasta que se logra la estructura más estable de la proteína. (Véase M. M. Lyles y H. F. Gilbert, 1991, *Biochemistry* 30:619.)

teínas que se encuentran seguidas en la secuencia de aminoácidos mientras un polipéptido todavía está creciendo en el ribosoma. Sin embargo, esta formación secuencial algunas veces produce puentes disulfuro entre cisteínas que no corresponden. Por ejemplo, la proinsulina tiene tres puentes disulfuro que unen las cisteínas 1 y 4, 2 y 6 y 3 y 5. En este caso, los puentes disulfuro que se forman inicialmente de manera secuencial (p. ej., entre las cisteínas 1 y 2) tienen que ser reordenados para que la proteína logre su conformación plegada adecuada. En las células, la redisposición de los enlaces disulfuro también es acelerada por la PDI, que actúa sobre un amplio rango de sustratos proteicos, permitiéndoles alcanzar su estructura termodinámicamente más estable (fig. 16-19b). Los puentes disulfuro suelen formarse en un orden específico, estabilizando primero dominios pequeños de un polipéptido y luego las interacciones de segmentos más distantes; este fenómeno se ilustra por el plegado de la proteína de la HA de gripe que se describe en la próxima sección.



La mayoría de las proteínas usadas con fines terapéuticos en los seres humanos o en los animales son glucoproteínas segregadas estabilizadas por puentes disulfuro. Cuando los investigadores intentaron por primera vez sintetizar estas proteínas usando plásmidos como vectores de expresión en células bacterianas, los resultados fueron desalentadores. En la mayoría de los casos, las proteínas no se secretaron (incluso cuando se reemplazó la secuencia normal por una secuencia de señalización bacteriana); en cambio, se acumulaban en el citosol, a menudo en un estado desnaturalizado debido en parte a la falta de puentes disulfuro. Después de que se hizo evidente que la formación de puentes disulfuro ocurre espontáneamente sólo en la luz del RE, los biotecnólogos desarrollaron vectores de expresión que pueden usarse en células animales (cap. 9). En la actualidad, se prefieren estos vectores y las células animales cultivadas para la producción de proteínas terapéuticas en gran escala, como el activador tisular de plasminógeno (agente anticoagulante) y la eritropoyetina, una hormona que estimula la producción de eritrocitos. ▮



▲ Fig. 16-20. Vías de formación de enlaces disulfuro en eucariontes y bacterias. Las flechas rojas numeradas indican la secuencia del flujo de electrones. Un enlace disulfuro (barra amarilla) se forma por la pérdida de un par de electrones de los grupos tiol (-SH) de la cisteína. (a) En la luz del RE de las células eucariontes, se transfieren electrones de un tiol ionizado presente en una proteína sustrato recién sintetizada a un enlace disulfuro en el sitio activo de la PDI (véase fig. 16-19). La PDI, a su vez, transfiere los electrones a un enlace disulfuro presente en la proteína luminal Ero1 y regenera así la forma oxidada de la PDI. El mecanismo de reoxidación del Ero1 no se conoce. (b) En el espacio periplasmático de las células bacterianas, la proteína soluble DsbA funciona en forma similar a la PDI de los eucariontes. La DsbA reducida es reoxidada por la DsbB, una proteína de la membrana interna. Por último, la DsbB reducida es reoxidada por transferencia de electrones a la ubiquinona oxidada, un cofactor lipídico de la cadena de transporte de electrones presente en la membrana interna (véase cap. 8). (Véase A. R. Frand et al., 2000, *Trends Cell Biol.* 10:203.)

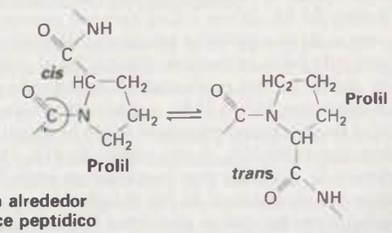
Las chaperonas y otras proteínas del RE facilitan el plegado y el ensamblaje de las proteínas

Aunque muchas proteínas reducidas desnaturalizadas pueden plegarse espontáneamente a su estado nativo in vitro, este plegado suele requerir horas para completarse. En cambio, las nuevas proteínas solubles y de membrana producidas en el RE se pliegan hasta alcanzar su estructura adecuada minutos después de su síntesis. El plegado rápido de estas proteínas recién sintetizadas en las células depende del efecto secuencial de varias proteínas presentes dentro de la luz del RE.

Ya hemos visto cómo la chaperona BiP puede manejar la translocación postraduccional en las levaduras, uniéndose a los polipéptidos totalmente sintetizados a medida que ingresan en el RE (véase fig. 16-9). La BiP también puede unirse temporariamente a las cadenas nacientes cuando ingresan en el RE durante la translocación cotraduccional. Se cree que la BiP unida impide que segmentos de una cadena naciente se plieguen mal o formen agregados, promoviendo así el plegado de todo el polipéptido en su estructura apropiada. La disulfuro isomerasa de proteínas (PDI) también contribuye al plegado apropiado, que en muchas proteínas se estabiliza por los puentes disulfuro.

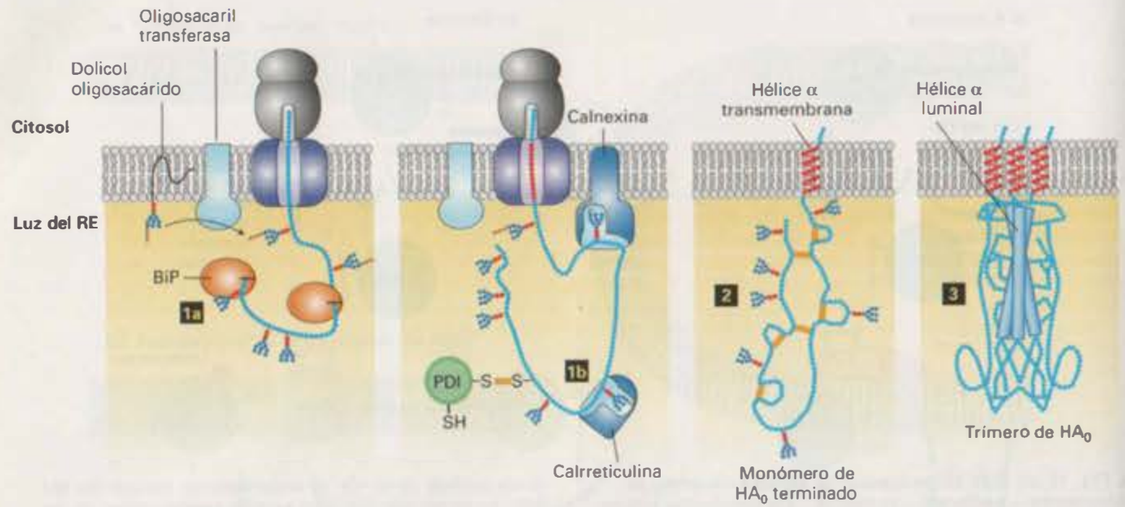
Como se ilustra en la figura 16-21, otras dos proteínas del RE, los homólogos de lectinas (proteínas ligadoras de hidratos de carbono) *calnexina* y *calrreticulina*, se unen selectivamente a ciertos oligosacáridos N-ligados en las cadenas nacientes en crecimiento. El ligando para estas dos lectinas, que contienen un solo residuo de glucosa, se genera por una glucosiltransferasa específica presente en la luz del RE (véase fig. 16-18, paso 3a). Esta enzima sólo actúa sobre cadenas polipeptídicas que están desplegadas o mal plegadas. La unión de la calnexina y la calrreticulina a las cadenas nacientes desplegadas impide la agregación de segmentos adyacentes de una proteína mientras se está sintetizando en el RE. Así, la calnexina y la calrreticulina, como el BiP, previenen el plegado prematuro incorrecto de segmentos de una proteína recién sintetizada.

Otros catalizadores importantes del plegado de las proteínas en la luz del RE son las *peptidil-prolil isomerasas*, una familia de enzimas que aceleran la rotación alrededor de los puentes peptidil-prolil en los segmentos desplegados de un polipéptido:



Rotación alrededor del enlace peptídico

Estas isomerizaciones a veces son el paso que limita la velocidad de plegado de los dominios de las proteínas. Muchas peptidil-prolil isomerasas pueden catalizar indiscriminadamente la rotación de los puentes peptidil-prolil expuestos en numerosas proteínas, pero algunas tienen sustratos proteicos muy específicos.



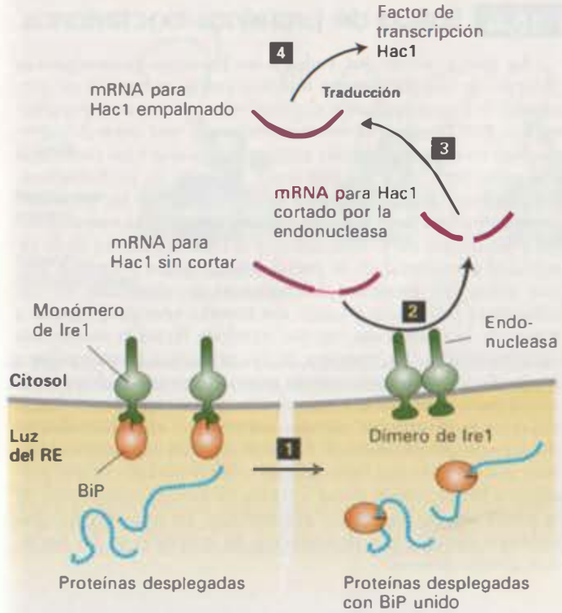
▲ Fig. 16-21. Plegado y ensamblaje del trímero de la hemaglutinina (HA_0) en el RE. La unión transitoria de la chaperona BiP (paso **1a**) a la cadena naciente y de dos lectinas, la calnexina y la calrreticulina, a ciertas cadenas de oligosacáridos (paso **1b**) promueve el plegado apropiado de segmentos adyacentes. Un total de siete cadenas de oligosacáridos *N*-ligados se agregan a la porción luminal de la cadena naciente durante la translocación cotraduccional y la PDI cataliza la formación de seis enlaces disulfuro por monómero. Los monómeros de HA_0 terminados están anclados a la membrana por una sola hélice α transmembrana con su N-terminal en la luz (paso **2**). La interacción de tres cadenas HA_0 entre sí, inicialmente a través de sus hélices α transmembrana, desencadena al parecer la formación de un tallo largo que contiene una hélice α de la parte luminal de cada polipéptido HA_0. Por último, hay interacciones entre las tres cabezas globulares que genera un trímero de HA_0 estable (paso **3**). (Véase U. Tatu et al., 1995, *EMBO J.* 14:1340 y D. Hebert et al, 1997, *J. Cell Biol.* 139:613.)

Numerosas proteínas secretorias y de membrana importantes que se sintetizan en el RE se construyen a partir de dos o más subunidades polipeptídicas. En todos los casos, el ensamblaje de las subunidades que constituyen estas proteínas con multisubunidades (multiméricas) tiene lugar en el RE. Una clase importante de proteínas multiméricas secretadas son las inmunoglobulinas, que contienen dos cadenas pesadas (H) y dos livianas (L) unidas por puentes disulfuro intracatenarios. La hemaglutinina (HA) es otra proteína multimérica que ilustra bien el plegado y ensamblaje de las subunidades (véase fig. 16-21). Esta proteína trimérica forma espículas que protruyen sobre la superficie de la partícula del virus de la gripe. La HA se forma dentro del RE de una célula huésped infectada a partir de tres copias de una proteína precursora denominada HA_0 que tiene una sola hélice α transmembrana. En el complejo de Golgi, cada una de las tres proteínas HA_0 se degrada para formar dos polipéptidos, HA_1 y HA_2; por lo tanto, cada molécula de HA que finalmente se encuentre sobre la superficie viral contiene tres copias de HA_1 y tres copias de HA_2 (véase fig. 3-7). El trímero se estabiliza por interacciones entre los grandes dominios exoplasmáticos de los polipéptidos que constituyen la hemaglutinina, que se proyectan hacia la luz del RE; después que la HA es transportada a la superficie celular, estos dominios se extienden sobre el espacio extracelular. Las interacciones entre las porciones citosólicas de menor tamaño y las porciones transmembrana de las subunidades de HA también ayudan a estabilizar la proteína trimérica.

La progresión del plegado y ensamblaje in vivo de la HA_0 puede determinarse por experimentos de marcación mediante pulsos. En un experimento típico, las células infectadas con el virus se marcan con pulsos de un aminoácido radiactivo; a distintos tiempos durante el período de seguimiento posterior, las membranas se solubilizan con detergente y se exponen a anticuerpos monoclonales específicos para los monómeros de HA_0 o para los trímeros. Inmediatamente después del pulso, el anticuerpo específico del monómero es capaz de inmunoprecipitar toda la proteína HA_0 radiactiva. Durante el período de seguimiento, cada vez mayores cantidades de la proteína radiactiva HA_0 total reaccionan con el anticuerpo monoclonal específico para el trímero. Estos experimentos han demostrado que cada polipéptido HA_0 nuevo necesita aproximadamente 10 minutos para plegarse e incorporarse a un trímero en las células vivas.

Las proteínas con plegado inadecuado presentes en el RE inducen la expresión de catalizadores del plegado de proteínas

Las proteínas tipo silvestre (*wild type*) que se sintetizan en el RE rugoso no pueden abandonar este compartimiento hasta que alcanzan su estructura completamente plegada. En forma similar, casi cualquier mutación que impide el plegado apropiado de una proteína en el RE también bloquea el desplazamiento del polipéptido de la luz del RE o de la membrana al complejo de Golgi. Es probable que los mecanismos para retener las proteínas desplegadas o plegadas incompletamente dentro del RE aumenten la eficacia global del plegado manteniendo las



◀ Fig. 16-22. Respuesta a las proteínas desplegadas. Ire1, una proteína transmembrana presente en la membrana del RE, tiene un sitio de unión para el BiP en su dominio luminal; el dominio citosólico contiene una endonucleasa especifica de RNA. Paso **1**: Las proteínas desplegadas que se acumulan en la luz del RE se unen a moléculas de BiP, liberándolas del Ire1 monomérico. La dimerización de Ire1 desencadena su actividad de endonucleasa. Pasos **2**, **3**: El mRNA precursor no cortado que codifica el factor de transcripción Hac1 es cortado por la Ire1 dimérica y los dos exones se unen para formar mRNA de Hac1 funcional. La evidencia actual indica que este proceso ocurre en el citosol, aunque el procesamiento del pre-mRNA suele ocurrir en el núcleo. Paso **4**: El Hac1 se traduce a la proteína Hac1 que se dirige nuevamente al núcleo y activa la transcripción de genes que codifican varios catalizadores del plegado de proteínas. (Véase U. Ruegsegger et al., 2001, *Cell* 107:103; A. Bertolotti et al., 2000, *Nature Cell Biol.* 2:326 y C. Sidrauski y P. Walter, 1997 *Cell* 90:1031)

formas intermedias en proximidad de los catalizadores de plegado, que son muy abundantes en el RE. Por lo general, las proteínas plegadas inadecuadamente retenidas dentro del RE se unen en forma permanente a las chaperonas del RE BiP y calnexina. Así, estos catalizadores luminales de plegado tienen dos funciones relacionadas: ayudan al plegado de las proteínas normales impidiendo su agregación y se unen a proteínas irreversiblemente mal plegadas.

Las células de mamíferos y las levaduras responden a la presencia de proteínas desplegadas dentro del RE rugoso aumentando la transcripción de varios genes que codifican chaperonas del RE y otros catalizadores de plegado. Un componente importante de esta *respuesta a las proteínas desplegadas* es la Ire1, una proteína de membrana del RE que se encuentra como monómero y dímero. La forma dimérica, pero no la forma monomérica, estimula la formación de Hac1, un factor de transcripción de las levaduras que activa la expresión de los genes inducidos por la respuesta a las proteínas desplegadas. Como se muestra en la figura 16-22, la unión del BiP al dominio luminal de la Ire1 monomérica impide la formación del dímero de Ire1. Por ende, la cantidad de BiP libre en la luz del RE probablemente determina la proporción relativa de Ire1 monomérico y dimérico. La acumulación de proteínas desplegadas dentro de la luz del RE secuestra las moléculas de BiP, haciendo que no estén disponibles para unirse a Ire1. Como resultado, el nivel de Ire1 dimérico aumenta, lo que a su vez produce un aumento del nivel de Hac1 y la producción de proteínas que ayudan al plegado de las proteínas.

Las células de mamíferos poseen una vía reguladora adicional, que opera en respuesta a las proteínas desplegadas en el RE. En esta vía, la acumulación de proteínas desplegadas en el RE activa la proteólisis de la ATF6, una proteína transmembrana presente en la membrana del RE. El dominio citosólico de la ATF6 liberado por la proteólisis se desplaza hacia el núcleo, donde estimula la transcripción de los genes que codifican chaperonas del RE. La activación de un factor de la transcripción por esta *proteólisis regulada intramembranosa* ocurre también en la vía de señalización de Notch (véase fig. 14-29). Veremos otro ejemplo de este fenómeno, el factor de transcripción SREBP sensible a colesterol, en el capítulo 18.

MEDICINA

La forma hereditaria de enfisema ilustra los efectos perjudiciales que puede tener el plegado inadecuado de proteínas en el RE. Esta enfermedad es causada por una mutación puntual de la α_1-antitripsina, que normalmente es secretada por los hepatocitos y macrófagos. La proteína natural se une e inhibe la tripsina y también la proteasa sanguínea elastasa. En ausencia de α_1-antitripsina, la elastasa degrada el fino tejido pulmonar que participa en la absorción de oxígeno y produce finalmente los síntomas del enfisema. Aunque la α_1-antitripsina mutante se sintetiza en el RE rugoso, no se pliega adecuadamente, formando un agregado prácticamente cristalino que no sale del RE. En los hepatocitos, también se deteriora la secreción de otras proteínas, ya que el RE rugoso está lleno de agregados de α_1-antitripsina.

A menudo las proteínas no ensambladas o mal plegadas presentes en el RE son transportadas al citosol para su degradación

Las proteínas secretorias y de membrana mal plegadas, así como las subunidades de proteínas multiméricas no ensambladas, a menudo se degradan una hora o dos después de su síntesis en el RE rugoso. Durante muchos años, los investigadores pensaron que enzimas proteolíticas existentes dentro del RE catalizaban la degradación de los polipéptidos mal plegados o no ensamblados, pero nunca se encontraron tales proteasas. Los estudios más recientes han demostrado que las proteínas secretorias y de membrana mal plegadas son transportadas fuera de la luz del RE, siguiendo un camino "al revés" a través del translocón, hacia el citosol, donde son degradadas por la vía proteolítica mediada por la ubicuitina (véase fig. 3-13).

La enzimas ubicuitinilantes localizadas en la superficie citosólica del RE agregan ubicuitina a las proteínas mal plega-

das del RE cuando salen de éste. Esta reacción, que se acompaña por hidrólisis de ATP, puede proporcionar parte de la energía necesaria para llevar estas proteínas nuevamente al citosol. Los polipéptidos poliubicuitinilados resultantes son rápidamente degradados en los proteasomas. No se sabe con certeza cómo se reconocen las proteínas solubles y de membrana mal plegadas en el RE ni cómo son dirigidas al translocón para su salida al citosol.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 16.3

Modificaciones, plegado y control de calidad de las proteínas en el RE

- Todos los oligosacáridos *N*-ligados que se unen a residuos de asparagina contienen un centro de tres residuos de manosa y dos de *N*-acetilglucosamina y suelen tener varias ramas (véase fig. 16-16).
- Los oligosacáridos *O*-ligados que se unen a un residuo de serina o de treonina son en general cortos y a menudo contienen un solo residuo de cuatro azúcares.
- La formación de todos los oligosacáridos *N*-ligados empieza con el ensamble de un precursor ubicuo de 14 residuos, con alto contenido de manosa, con el dolicol, un lípido presente en la membrana del RE rugoso (véase fig. 16-17). Después de que este oligosacárido preformado se transfiere a residuos de asparagina específicos de la cadena polipeptídica naciente en la luz de RE, se eliminan tres residuos de glucosa y un residuo de manosa (véase fig. 16-18).
- Las cadenas laterales de oligosacáridos pueden colaborar en el plegado apropiado de las glucoproteínas, ayudar a proteger a las proteínas maduras de la proteólisis, participar en la adhesión intercelular y funcionar como antígenos.
- A muchas proteínas secretorias y al dominio exoplasmático de las proteínas de membrana se le agregan puentes disulfuro en el RE. La disulfuro isomerasa de proteínas (PDI), presente en la luz del RE, cataliza la formación y la reestructuración de los puentes disulfuro (véase fig. 16-19).
- La chaperona BiP, las lectinas calnexina y calrreticulina y las peptidil-prolil isomerasas cooperan para asegurar el plegado apropiado de las proteínas secretorias y de membrana recién sintetizadas en el RE. Las subunidades de las proteínas multiméricas también se ensamblan en el RE.
- Sólo las proteínas plegadas adecuadamente y las subunidades ensambladas son transportadas del RE rugoso al complejo de Golgi en vesículas.
- La acumulación en el RE de proteínas anormalmente plegadas y de subunidades no ensambladas puede inducir el aumento de expresión de catalizadores de plegado de proteína a través de la respuesta a las proteínas desplegadas (véase fig. 16-22).
- Las proteínas no ensambladas o mal plegadas a menudo son transportadas nuevamente del RE al citosol a través del translocón, donde son degradadas en la vía de la ubicuitina/proteasoma.

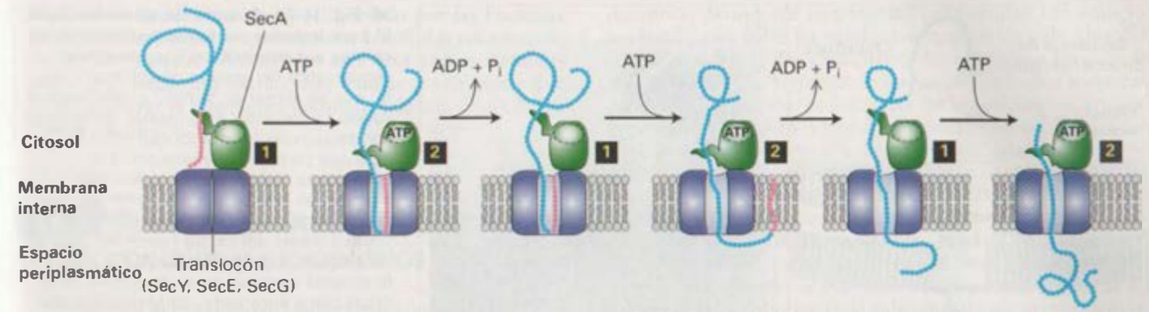
16.4 Salida de proteínas bacterianas

La pared celular que rodea a las bacterias gramnegativas comprende una membrana interna, que es la barrera de permeabilidad principal para el citoplasma, un espacio periplasmático que contiene diversas proteínas, y una capa de peptidoglucano y una membrana externa permeable a las moléculas pequeñas pero no a las proteínas. La capa de peptidoglucano confiere rigidez a la pared celular, mientras las proteínas periplasmáticas detectan e incorporan moléculas extracelulares y participan en el ensamblaje y el mantenimiento de la integridad estructural de la pared celular. Estas proteínas (como todas las proteínas bacterianas) se sintetizan en los ribosomas citosólicos y luego son translocadas desplegadas a través de la membrana interna (también llamada membrana citoplasmática). La mayoría de las proteínas translocadas a través de la membrana interna permanecen asociadas con la célula bacteriana, ya sea como proteínas de membrana insertadas en la membrana externa o interna o atrapadas dentro del espacio periplasmático. Algunas especies bacterianas también poseen sistemas especializados de translocación que permiten a las proteínas pasar a través de ambas membranas de la pared celular al espacio extracelular. En esta sección describimos ambos tipos de secreción de proteínas en las bacterias gramnegativas.

La ATPasa citosólica SecA empuja los polipéptidos bacterianos a través de los translocones hacia el espacio periplasmático

El mecanismo de translocación de las proteínas bacterianas a través de la membrana interna comparte varias características importantes con la translocación de proteínas en el RE de las células eucariontes. Primero, las proteínas translocadas poseen casi siempre una secuencia de señalización hidrófoba en el N-terminal que es eliminada por una peptidasa de señal. Segundo, las proteínas bacterianas atraviesan la membrana interna por un canal, o translocón, compuesto de proteínas estructuralmente similares al complejo Sec61 de los eucariontes. Tercero, las células bacterianas expresan dos proteínas, Ffh y su receptor (FtsY), que son las homólogas de la SRP y del receptor de SRP, respectivamente. Sin embargo, en las bacterias, estas últimas proteínas parecen funcionar principalmente en la inserción de proteínas de membrana hidrófobas en la membrana interna. De hecho, todas las proteínas bacterianas que son translocadas a través de la membrana interna sólo lo hacen después de terminada su síntesis en el citosol, pero antes de que se plieguen para adoptar su estructura final.

La translocación postraduccional de las proteínas bacterianas a través de la membrana interna no puede utilizar un mecanismo de tracción similar al mediado por BiP en la luz del RE (véase fig. 16-9), porque el ATP necesario para este tipo de mecanismo se perdería por difusión a través de la membrana externa. En su lugar, la energía que dirige la translocación de proteínas bacterianas es generada por *SecA*, que se une al lado citosólico del translocón e hidroliza el ATP citosólico. En el modelo representado en la figura 16-23, SecA se une al polipéptido desplegado que se está translocando y luego un cambio de conformación del SecA, impulsado por la energía liberada de la hidrólisis del ATP, empuja el segmento de polipéptido unido a través del poro del translocón hacia el lado periplasmático de la membrana. La repetición de este ciclo empuja finalmente toda la cadena polipeptídica a través del translocón hacia el espacio periplasmático, donde se forman los puentes disulfuro y el polipéptido se pliega para adoptar su estructura apropiada.



▲ Fig. 16-23. Translocación postraduccional a la traducción a través de la membrana interna de bacterias gramnegativas. La membrana interna bacteriana contiene un canal translocón compuesto de tres subunidades que son homólogas a los componentes del complejo Sec61 de los eucariontes. La translocación de polipéptidos desde el citosol al espacio periplasmático es impulsada por SecA, una ATPasa citosólica que se une al translocón y al polipéptido que está siendo translocado. En el modelo mostrado aquí, la unión e hidrólisis del ATP produce cambios de conformación del SecA, que empujan el segmento del polipéptido unido a través del canal (pasos 1, 2). La repetición de este ciclo produce el movimiento del polipéptido a través del canal en una sola dirección. La evidencia actual indica que la secuencia de señalización en el N-terminal se desplaza desde el canal hacia la bicapa, pero en algún momento es escindida por una peptidasa de señal, de tal forma que el polipéptido maduro ingresa en el espacio periplasmático. (Véase A. Economou y W. Wickner, 1994, *Cell* 78:835, y J. Eichler y W. Wickner, 1998, *J. Bacteriol* 180:5776.)

Varios mecanismos translocan las proteínas bacterianas hacia el espacio extracelular

Para translocar las proteínas bacterianas desde el citosol a través de las membranas bacterianas interna y externa al espacio extracelular se usan mecanismos bastante diferentes del ilustrado en la figura 16-23. Estos mecanismos de secreción son muy importantes en las bacterias patógenas, que suelen utilizar la secreción de proteínas extracelulares para colonizar tejidos específicos dentro del huésped y evadir los mecanismos de defensa. Ejemplos muy conocidos de proteínas extracelulares que facilitan el desarrollo y la diseminación de las bacterias patógenas son las toxinas proteicas (p. ej., la toxina del cólera y la toxina tetánica) y los pili, que son fibras de naturaleza proteica que se proyectan fuera de la membrana externa y ayudan a las bacterias entéricas a adherirse al epitelio del intestino.

Los numerosos sistemas especializados de secreción bacteriana identificados pueden clasificarse en cuatro tipos generales, de acuerdo con su mecanismo de acción. Los sistemas de secreción tipo I y tipo II constan de dos pasos. Primero, las proteínas sustrato son translocadas a través de la membrana interna hacia el espacio periplasmático, donde se pliegan y a menudo adquieren puentes disulfuro. Segundo, las proteínas plegadas son translocadas desde el espacio periplasmático a través de la membrana externa por complejos de proteínas periplasmáticas que atraviesan las membranas interna y externa. La energía necesaria para esta translocación proviene de la hidrólisis del ATP en el citosol, pero los mecanismos que acoplan la hidrólisis del ATP y la translocación a través de la membrana externa no se conocen bien.

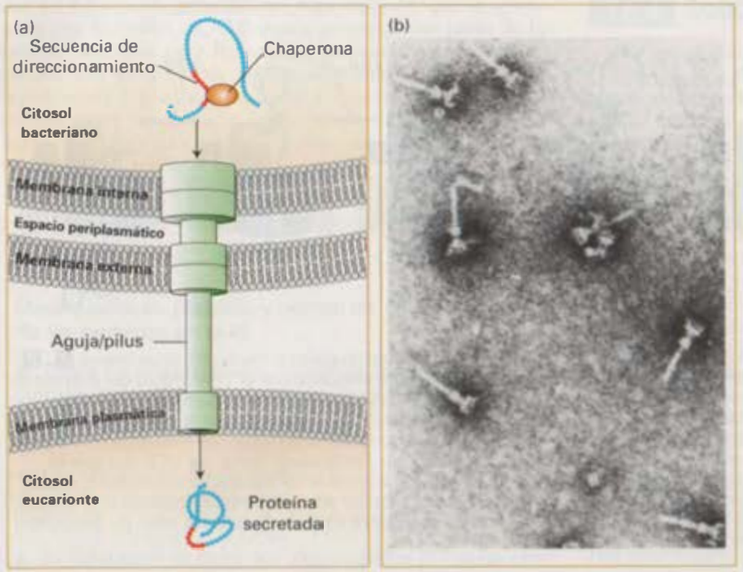
Por otro lado, la translocación por los sistemas de secreción tipos III y IV tiene lugar en un solo paso. Estos sistemas consisten en grandes complejos de proteína que atraviesan ambas membranas que permiten la translocación directa de las proteínas desde el citosol al ambiente extracelular. El sistema tipo III no sólo está adaptado para secretar proteínas, sino también para inyectarlas en las células diana, una propiedad muy útil para las bacterias patógenas.

Las bacterias patógenas pueden inyectar proteínas en las células animales por medio del aparato de secreción tipo III

MEDICINA

Yersinia pestis es la especie bacteriana productora de la peste bubónica, una de las enfermedades más letales en la historia del hombre. Una de las razones por las que *Yersinia* es un patógeno tan virulento es su capacidad de desactivar los macrófagos del huésped, que, de otra manera, podrían fagocitar y destruir las células bacterianas invasoras. El efecto incapacitante de *Yersinia* está mediado principalmente por un pequeño grupo de proteínas que las células bacterianas inyectan en las células macrofágicas.

Diversas bacterias patógenas inyectan proteínas en las células del huésped a través de una complicada maquinaria similar a una jeringa compuesta de más de 20 proteínas diferentes. Este aparato de secreción tipo III, que se muestra en la figura 16-24, tiene componentes similares a anillos empotrados en las membranas interna y externa de la pared celular bacteriana y una estructura hueca similar a una aguja (pilus) que se proyecta fuera de la membrana



◀ Fig. 16-24. Aparato de secreción tipo III para inyectar proteínas bacterianas en células eucariontes. (a) Representación esquemática del aparato de secreción tipo III, que es similar en tamaño y morfología al flagelo bacteriano. Las proteínas bacterianas con secuencias de direccionamiento (en rojo) que permiten la interacción con chaperonas especializadas (anaranjado) ingresan en la porción del aparato de secreción tipo III que enfrenta al citosol, viajan a través del centro hueco del pilus en un proceso dependiente del ATP y finalmente ingresan en el citoplasma de la célula diana eucarionte. (b) Microfotografía electrónica de aparatos de secreción tipo III aislados. Pueden verse los pili similares a agujas largas que se extienden a partir de las porciones basales ensanchadas que están incluidas en las membranas externa e interna. Para la explicación véase el texto. [Parte (a) adaptada de D. G. Thanassi y S. J. Hultgren, 2000, *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:420. Parte (b) de T. Kubori et al., 1998, *Science* 280:602.]

externa. Las proteínas que se encuentran en el extremo externo (distal) del pilus pueden atravesar la membrana plasmática de ciertas células de mamífero y crear un conducto que atraviesa tres membranas y, por lo tanto, una conexión entre el citoplasma de la bacteria y el de la célula diana huésped.

Una observación importante acerca de cómo puede operar el aparato de secreción tipo III fue que muchos de sus componentes son homólogos a las proteínas de la base del flagelo bacteriano. Esta base se localiza en la membrana interna y funciona como un motor que maneja la rotación del flagelo unido a ella, que se extiende hacia el exterior de la superficie celular. El flagelo, un tubo helicoidal hueco compuesto exclusivamente de un polímero repetido de la proteína flagelina, crece por el agregado de nuevas subunidades de flagelina en el extremo distal. Se cree que varias proteínas presentes en la base del flagelo usan la energía proveniente de la hidrólisis del ATP para empujar las nuevas subunidades de flagelina a través del canal central del flagelo hasta el extremo distal. Es muy posible que el aparato de secreción tipo III use un mecanismo similar impulsado por ATP para empujar las proteínas a través del canal central del pilus hacia las células diana.

Experimentos recientes han determinado las secuencias de señalización que identifican a las proteínas bacterianas para su transporte a través del aparato de secreción tipo III. Por ejemplo, se usaron métodos de DNA recombinante para expresar en células de *Yersinia* proteínas quiméricas que contienen adenilatociclasa unida a diferentes porciones del YopE, que normalmente se secreta por el aparato tipo III. Una secuencia anfipática en el N-terminal de YopE fue capaz de dirigir la adenilatociclasa, que suele residir en el citosol, al aparato de secreción tipo III para ser inyectada en células de mamífero. Otros experimentos demostraron que las proteínas YopE en las que esta secuencia de direccionamiento anfipática fue mutada todavía se secretaban normalmente. Este hallazgo sorprendente condujo al descubrimiento de una segunda señal de direccionamiento independiente, que le permite al YopE unirse a una molécula chaperona pequeña. El complejo chaperona-YopE puede secretarse con éxito, incluso en ausencia de una secuencia anfipática en el N-terminal. Se cree que cada una de las proteínas secretadas por el aparato tipo III interactúa con alguna proteína chaperona pequeña de entre un grupo de ellas (véase fig. 16-24). Estas chaperonas pueden actuar manteniendo las proteínas secretadas en un estado parcialmente desplegado mientras atraviesan el canal central del aparato tipo III. Una vez que las proteínas transportadas se han liberado en la célula diana, el plegado puede completarse por chaperonas citosólicas de esa célula. ■

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 16.4

Salida de proteínas bacterianas

- Las bacterias gramnegativas translocan proteínas terminadas a través de la membrana interna mediante un translocón parecido al del RE de las células eucariontes.
- La energía impulsora de la translocación postraduccional a través de la membrana interna de las bacterias proviene de la proteína SecA, que usa la energía derivada de la hidrólisis del ATP citosólico para empujar los polipéptidos a través del canal del translocón (véase fig. 16-23).
- Existen cuatro sistemas de secreción bacteriana para translocar proteínas desde el citosol a través de las membranas interna y externa. La hidrólisis del ATP citosólico impulsa la secreción en todos los sistemas.

- El aparato de secreción tipo III, usado por las bacterias patógenas para inyectar proteínas en las células eucariontes, consta de una porción basal que atraviesa ambas membranas y una estructura extracelular similar a una aguja que puede penetrar la membrana plasmática de una célula diana (véase fig. 16-24).

16.5 Direccionamiento de proteínas a mitocondrias y cloroplastos

En el resto del capítulo examinaremos cómo las proteínas sintetizadas en los ribosomas citosólicos son dirigidas a las mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas (véase fig. 16-1). Las mitocondrias y los cloroplastos están rodeados por una membrana doble y tienen subcompartimientos internos, en tanto que los peroxisomas están rodeados por una sola membrana y tienen un solo compartimiento luminal conocido como *matriz*. Debido a estas y otras diferencias, los peroxisomas se tratan por separado en la última sección.

Además de estar limitados por dos membranas, las mitocondrias y los cloroplastos contienen tipos similares de proteínas de transporte de electrones y usan una ATPasa clase F para sintetizar ATP (véase fig. 8-2). Es notable que las bacterias gramnegativas también posean estas características. A semejanza de las células bacterianas, las mitocondrias y los cloroplastos contienen su propio DNA, que codifica rRNA, tRNA y algunas proteínas de los orgánulos (cap. 10). Es más, el crecimiento y la división de las mitocondrias y los cloroplastos no se asocian con la división nuclear. Más bien estos orgánulos crecen por la incorporación de proteínas y lípidos celulares y los nuevos orgánulos se forman por la división de otros preexistentes; ambos procesos ocurren continuamente durante el período de interfase del ciclo celular. Las numerosas similitudes entre las células bacterianas de vida libre con las mitocondrias y los cloroplastos han llevado a los científicos a formular la hipótesis de que estos orgánulos surgieron por la incorporación de bacterias en las células eucariontes primitivas, formando orgánulos endosimbióticos. Pueden encontrarse pruebas firmes a favor de esta relación evolutiva ancestral en las numerosas proteínas de secuencia similar compartidas por las mitocondrias, los cloroplastos y las bacterias, incluidas algunas de las proteínas comprometidas en la translocación a través de las membranas descrita en esta sección.

Las proteínas codificadas por el DNA de las mitocondrias o de los cloroplastos se sintetizan en ribosomas dentro de los orgánulos y se direccionan al subcompartimiento correcto inmediatamente después de la síntesis. Sin embargo, la mayor parte de las proteínas localizadas en las mitocondrias y en los cloroplastos son codificadas por genes del núcleo y se incorporan en los orgánulos después de su síntesis en el citosol. Al parecer, en el curso de la evolución, gran parte de la información genética del DNA bacteriano ancestral de estos orgánulos endosimbióticos se desplazó por un mecanismo desconocido al núcleo. Las proteínas precursoras sintetizadas en el citosol que están destinadas a la matriz mitocondrial o al espacio equivalente de los cloroplastos, la estroma, suelen contener secuencias de captación-direccionamiento específicas en el N-terminal que determinan la unión a proteínas receptoras presentes en la superficie de los orgánulos. En general, esta secuencia es eliminada una vez que alcanza la matriz o la estroma. Es evidente que estas secuencias de captación-direccionamiento son similares en lo que respecta a su localización y función general a las secuencias de señalización que dirigen las proteínas nacientes a la luz del RE. Aunque los tres tipos de señal comparten algunas secuencias comunes, sus secuencias específicas difieren considerablemente, como se resume en el cuadro 16-1.

CUADRO 16-1 Secuencias de captación-direccionamiento que dirigen las proteínas del citosol a los orgánulos*

Orgánulos de destino	Ubicación de la secuencia dentro de la proteína	Eliminación de la secuencia	Naturaleza de la secuencia
Retículo endoplasmático (luz)	N- terminal	Sí	Núcleo de 6-12 aminoácidos hidrófobos, a menudo precedidos por uno o más aminoácidos básicos (Arg, Lys)
Mitocondria (matriz)	N-terminal	Sí	Hélice anfipática, de 20-50 residuos de longitud, con residuos de Arg y Lys en un lado y residuos hidrófobos en el otro
Cloroplasto (estroma)	N-terminal	Sí	No hay ningún motivo común; generalmente ricas en Ser, Thr y residuos hidrófobos pequeños y de bajo contenido de Glu y Asp
Peroxisoma (matriz)	C-terminal (la mayoría de las proteínas); N-terminal (pocas proteínas)	No	Señal PTS1 (Ser-Lys-Leu) en el C-terminal; señal PTS2 en el N-terminal

* Secuencias diferentes o adicionales dirigen las proteínas a las membranas y subcompartimientos de los orgánulos. Véase capítulo 12 para las secuencias de direccionamiento requeridas para la captación de proteínas por el núcleo.

Tanto en las mitocondrias como en los cloroplastos, la incorporación de proteínas requiere energía y tiene lugar en puntos en los que las membranas externa e interna de los orgánulos están en contacto íntimo. Debido a que las mitocondrias y los cloroplastos contienen varias membranas y espacios limitados por membranas, la redistribución de muchas proteínas a su localización correcta requiere la acción secuencial de dos secuencias de señalización y dos sistemas de translocación ligados a membranas: uno para dirigir la proteína hacia el orgánulo y el otro para direccionarla al compartimiento correcto o membrana de éste. Como veremos más adelante, los mecanismos para direccionar diversas proteínas a las mitocondrias y a los cloroplastos se relacionan con algunos de los mecanismos ya descritos.

El N-terminal anfipático de las secuencias de señalización dirige las proteínas hacia la matriz mitocondrial

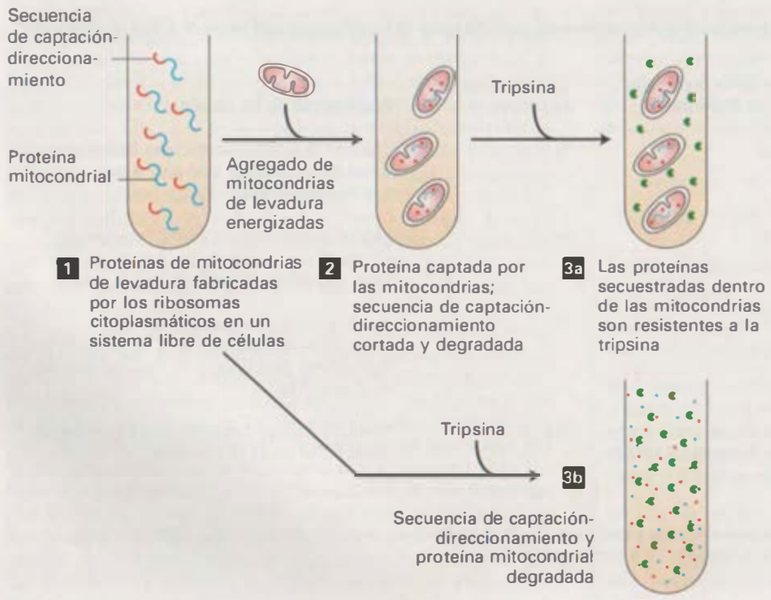
Todas las proteínas que viajan desde el citosol al mismo destino mitocondrial tienen señales de direccionamiento que comparten motivos comunes, aunque las secuencias de señalización casi nunca son idénticas. Así, los receptores que reconocen estas señales pueden unirse a varias secuencias diferentes, pero relacionadas. Las secuencias de direccionamiento de proteínas a las mitocondrias más extensamente estudiadas son las secuencias de *direccionamiento a la matriz*. Estas secuencias, localizadas en el N-terminal, suelen tener 20 a 50 aminoácidos de longitud. Son abundantes en los aminoácidos hidrófobos, aminoácidos básicos cargados positivamente (arginina y lisina) e hidroxilados (serina y treonina), pero tienden a carecer de residuos ácidos cargados negativamente (aspartato y glutamato).

Se cree que las secuencias de direccionamiento a la matriz mitocondrial asumen una estructura α-helicoidal en la que los aminoácidos cargados positivamente predominan en un lado de la hélice y los aminoácidos hidrófobos predominan en el otro lado; por lo tanto, estas secuencias son anfipáticas. Las mutaciones que eliminan esta característica anfipática suelen impedir el direccionamiento hacia la matriz, aunque muchas otras sustituciones de aminoácidos no lo hacen. Estos resultados indican que la anfipatía de las secuencias de direccionamiento a la matriz son fundamentales para su función.

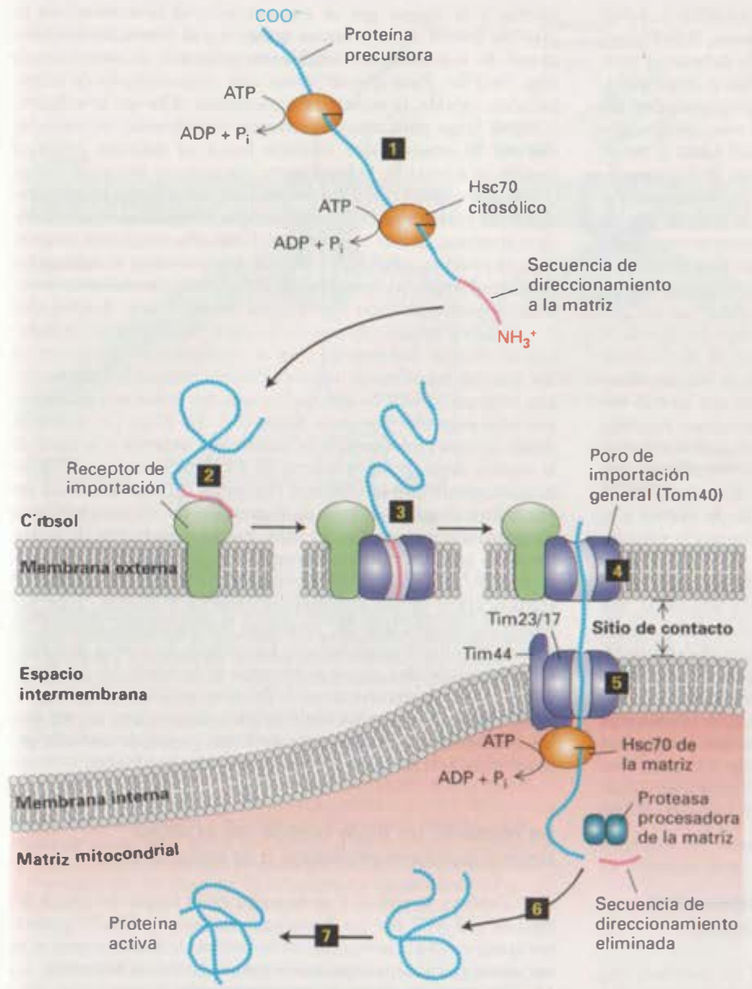
El ensayo libre de células descrito en la figura 16-25 se usó ampliamente en estudios de incorporación de proteínas precursoras mitocondriales. En este sistema, mitocondrias que respiran (energizadas) extraídas de células pueden incorporar proteínas precursoras mitocondriales que son portadoras de secuencias de captación-direccionamiento adecuadas que se han sintetizado separadamente en ausencia de mitocondrias. La incorporación exitosa del precursor en el orgánulo puede detectarse por la resistencia a la digestión por una proteasa exógena agregada o, en la mayor parte de los casos, por la separación de las secuencias de señalización del N-terminal por proteasas específicas. La captación de proteínas precursoras mitocondriales completamente sintetizadas por los orgánulos en este sistema contrasta con la translocación cotraduccional, en sistemas libres de células, de las proteínas secretorias, que sólo suele ocurrir cuando hay membranas microsómicas durante la síntesis (véase fig. 16-4).

La incorporación mitocondrial de proteínas requiere receptores en la membrana externa y translocones en ambas membranas

La figura 16-26 presenta un esquema general de cómo la matriz mitocondrial incorpora proteínas del citosol, la vía hacia el interior de la mitocondria seguida por la mayoría de las proteínas incorporadas. Se describirá en detalle cada paso del transporte de proteínas hacia la matriz y luego se considerará cómo algunas proteínas son direccionadas con posterioridad a otros compartimientos de la mitocondria.



◀ FIGURA EXPERIMENTAL 16-25 La captación postraduccional de proteínas precursoras por las mitocondrias puede estudiarse en un sistema libre de células. La proteína incorporada debe contener una secuencia apropiada de captación-direccionamiento. La captación también requiere ATP y un extracto citosólico que contenga proteínas chaperonas, que mantienen las proteínas precursoras en una estructura desplegada. La captación de la proteína sólo ocurre en mitocondrias energizadas (en respiración) que tienen un gradiente electroquímico de protones (fuerza protón motriz) a través de la membrana interna. Este ensayo se ha usado para estudiar las secuencias de direccionamiento y otras características del proceso de translocación.



◀ Fig. 16-26. Ingreso de proteínas en la matriz mitocondrial. Las proteínas precursoras sintetizadas en los ribosomas citosólicos se mantienen en un estado desplegado o parcialmente plegado por las chaperonas unidas a ellas, como la Hsc70 (paso 1). Después que una proteína precursora se une a un receptor cerca de un sitio de contacto con la membrana interna (paso 2), es transferida al poro de entrada general (paso 3). La proteína que se está translocando se desplaza luego a través de este canal y de un canal adyacente en la membrana interna (pasos 4, 5). Nótese que la translocación ocurre en "sitios de contacto" poco abundantes en los que las membranas interna y externa parecen tocarse. La unión de la proteína que se está translocando a la chaperona de la matriz Hsc70 y la hidrólisis de ATP siguiente por la Hsc70 impulsa la entrada hacia la matriz. Una vez que la secuencia de captación-direccionamiento es eliminada por una proteasa de la matriz y se libera la Hsc70 de la proteína recién incorporada (paso 6), ésta se pliega en su estructura madura, activa, dentro de la matriz (paso 7). El plegado de algunas proteínas depende de las chaperoninas de la matriz. Para la explicación véase el texto. (Véase G. Schatz, 1996, *J. Biol. Chem.* 271:31763, y N. Pfanner et al., 1997, *Ann. Rev. Cell Devel. Biol.* 13:25.)

Después de su síntesis en el citosol, los precursores solubles de las proteínas mitocondriales (incluidas las proteínas integrales hidrófobas de la membrana) interaccionan directamente con la membrana mitocondrial. En general, sólo las proteínas desplegadas pueden ser incorporadas a la mitocondria. Las proteínas chaperonas, como la Hsc70 citosólica, mantienen a las proteínas nacientes y recién sintetizadas en estado desplegado para que puedan ser captadas por la mitocondria. La entrada de un precursor mitocondrial desplegado se inicia con la unión de una secuencia de direccionamiento mitocondrial a un *receptor de ingreso* presente en la membrana externa de la mitocondria. Estos receptores se identificaron por primera vez en experimentos en los que se demostró que los anticuerpos dirigidos contra proteínas específicas de la membrana mitocondrial externa inhiben la entrada de proteínas en mitocondrias aisladas. Experimentos genéticos posteriores, en los que se mutaron los genes que codifican proteínas específicas de la membrana mitocondrial externa, demostraron que proteínas receptoras específicas eran las responsables de la incorporación de diferentes clases de proteínas mitocondriales. Por ejemplo, las secuencias de direccionamiento a la matriz en el N-terminal son reconocidas por Tom20 y Tom22. (Las proteínas presentes en la membrana mitocondrial externa comprometidas en el direccionamiento e importación se denominan proteínas *Tom* por las siglas *t*ranslocon of the *o*uter *m*embrane.)

Los receptores de ingreso transfieren luego las proteínas precursoras a un canal de entrada existente en la membrana externa. Este canal, compuesto fundamentalmente de la proteína Tom40, se conoce como *poro de entrada general* porque todas las proteínas precursoras mitocondriales conocidas lle-

gan a los compartimientos internos de la mitocondria a través de él. Cuando se purifica e incorpora a liposomas, Tom40 forma un canal transmembrana con un poro suficientemente amplio para que quepa en una cadena polipeptídica desplegada. El poro de entrada general forma un canal fundamentalmente pasivo a través de la membrana externa de la mitocondria y la energía motriz para el transporte unidireccional hacia la mitocondria proviene del interior de ésta. En el caso de los precursores destinados a la matriz mitocondrial, la transferencia a través de la membrana externa ocurre simultáneamente con la transferencia a través de un canal en la membrana interna compuesto de las proteínas Tim23 y Tim17. (*Tim* significa *t*ranslocon of the *i*nner *m*embrane.) Por lo tanto, la translocación hacia la matriz tiene lugar en "sitios de contacto" en los que las membranas externa e interna están en íntima proximidad.

Poco después que la secuencia N-terminal de direccionamiento a la matriz de una proteína entra en la matriz mitocondrial, la misma es eliminada por una proteasa que se encuentra dentro de la matriz. La proteína emergente también es captada por la Hsc70 de la matriz, una chaperona que se localiza en los canales de translocación de la membrana mitocondrial interna e interactúa con Tim44. Esta interacción estimula la hidrólisis del ATP por la Hsc70 de la matriz y se cree que estas dos proteínas impulsan en conjunto la translocación de proteínas hacia la matriz.

Algunas proteínas incorporadas pueden plegarse para constituir su estructura final activa sin ayuda adicional. Sin embargo, el plegado final de muchas proteínas de la matriz requiere una *chaperonina*. Como se explicó en el capítulo 3, las proteínas chaperoninas facilitan activamente el plegado de proteínas mediante un proceso que depende del ATP. Por ejemplo, las mutantes de levaduras defectuosas en Hsc60, una chaperonina de la matriz mitocondrial, pueden incorporar proteínas de la matriz y eliminar su secuencia de captación-direccionamiento normalmente, pero los polipéptidos incorporados no se pliegan y no se ensamblan en sus estructuras terciarias y cuaternarias.

Estudios con proteínas quiméricas demuestran características importantes de la entrada en las mitocondrias

Se han obtenido pruebas espectaculares de la capacidad de las secuencias de direccionamiento mitocondrial para dirigir la entrada mediante proteínas quiméricas producidas por técnicas de DNA recombinante. Por ejemplo, la secuencia de direccionamiento a la matriz de alcohol deshidrogenasa puede fusionarse al N-terminal de la dihidrofolato reductasa (DHFR), que suelen residir en el citosol. En presencia de chaperonas, que impiden que el C-terminal de la DHFR se pliegue en el citosol, ensayos de translocación en sistemas libres de células demuestran que la proteína quimérica es transportada a la matriz (fig. 16-27a). El inhibidor metotrexato, que se une firmemente al sitio activo de la DHFR y estabiliza en gran medida su estructura plegada, hace que la proteína quimérica sea resistente al desplegado por las chaperonas citosólicas. Cuando se realizan ensayos de translocación en presencia de metotrexato, la proteína quimérica no ingresa por completo en la matriz. Esta observación demuestra que el precursor debe estar desplegado para poder atravesar los poros de entrada de las membranas mitocondriales.

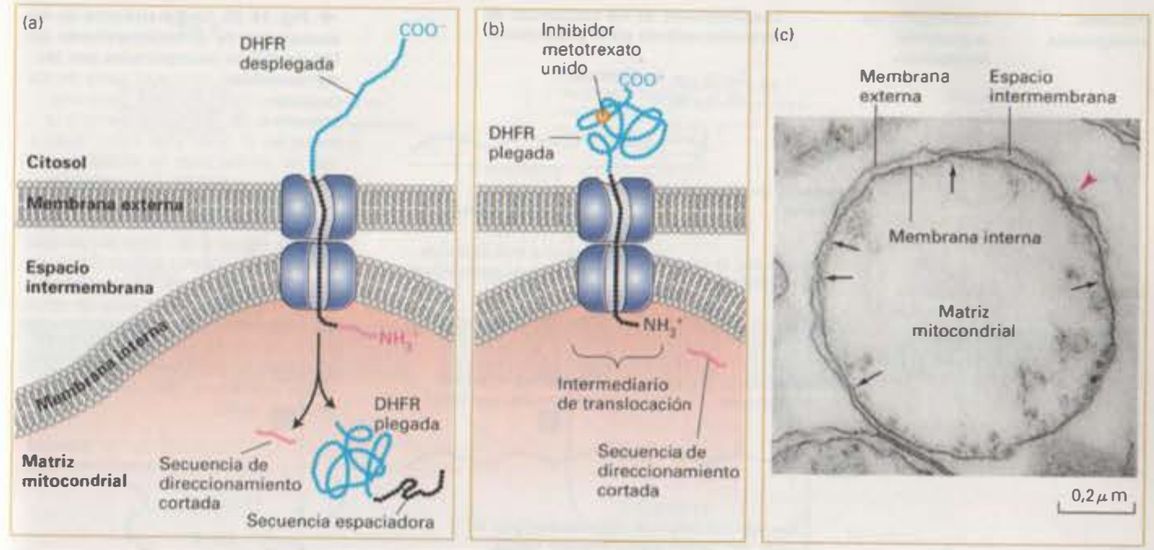
Otros estudios revelaron que si una secuencia espaciadora lo suficientemente larga separa la secuencia de direccionamiento a la matriz que se encuentra en el N-terminal de la porción DHFR de la proteína quimérica se forma un intermediario de translocación estable en presencia de metotrexato (fig. 16-27b). Para que se forme este intermediario de translocación estable, la secuencia espaciadora debe ser lo suficientemente larga para atravesar ambas membranas; un espaciador de 50 aminoácidos estirado hasta su máxima longitud posible es adecuado. Si la quimera contiene un espaciador más corto, por ejemplo de 35 aminoácidos, no se logra el intermediario de translocación estable porque el espaciador no alcanza a atravesar ambas membranas. Estas observaciones proporcionan pruebas adicionales de que las proteínas translocadas pueden abarcar las membranas mitocondriales interna y externa y atravesar estas membranas en su estado desplegado.

Estudios microscópicos de los intermediarios de translocación estable demuestran que se acumulan en los sitios en los que las membranas mitocondriales interna y externa están muy próximas, lo que indica que las proteínas precursoras sólo ingresan por esos sitios (fig. 16-27c). La distancia desde la cara citosólica de la membrana externa a la cara de la matriz de la membrana interna en estos *sitios de contacto* es coincidente con la longitud requerida de una secuencia espaciadora desplegada para la formación de un intermediario de translocación estable. Es más, los intermediarios de translocación estables pueden ligarse químicamente en forma cruzada a las subunidades de proteína que forman los canales de translocación de las membranas externa e interna. Este hallazgo demuestra que las proteínas incorporadas pueden interactuar simultáneamente con los canales de ambas membranas mitocondriales, como se muestra en la figura 16-26. Dado que pueden observarse unos 1000 intermediarios de translocación fijos en una mitocondria típica de levadura se cree que las mitocondrias tienen cerca de 1000 poros de entrada general para la captación de proteínas mitocondriales.

Se necesita un triple aporte de energía para incorporar proteínas a la mitocondria

Como ya se indicó y se muestra en la figura 16-26, la hidrólisis del ATP por las proteínas chaperonas Hsc70 presentes tanto en el citosol como en la matriz de la mitocondria es necesaria para la incorporación mitocondrial de proteínas. La Hsc70 citosólica proporciona energía para mantener las proteínas precursoras unidas en un estado desplegado que sea apto para la translocación hacia la matriz. La importancia del ATP para esta función se demostró en estudios en los que una proteína precursora mitocondrial fue purificada y luego desnaturalizada (desplegada) por medio de la urea. Cuando se probó en el sistema de translocación mitocondrial libre de células, la proteína desnaturalizada fue incorporada a la matriz en ausencia de ATP. En cambio, la incorporación del precursor natural no desnaturalizado requirió ATP para la función normal de desplegamiento de las chaperonas citosólicas.

La unión y la liberación secuenciales a una proteína en translocación, impulsadas por el ATP, de múltiples moléculas de Hsc70 de la matriz pueden atrapar a la proteína desplegada en la matriz. Alternativamente, la Hsc70 de la matriz, anclada a la membrana por la proteína Tim44, puede actuar como un motor molecular para introducir la proteína en la matriz (véase fig. 16-26). En este caso, las funciones de las proteínas Hsc70 y Tim44 de la matriz serían análogas a las de las chaperonas BiP y el complejo Sec63, respectivamente, en la translocación postraduccional hacia la luz del RE (véase fig. 16-9).



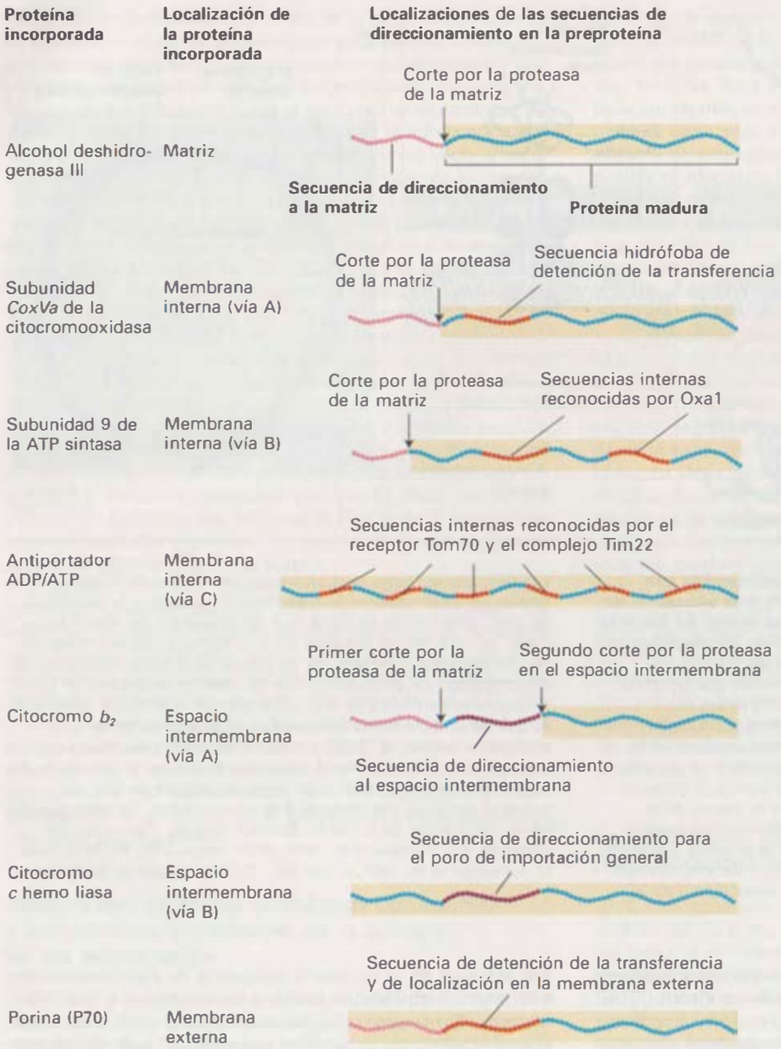
▲ FIGURA EXPERIMENTAL 16-27 Los experimentos con proteínas quiméricas demuestran que una sola secuencia de direccionamiento hacia la matriz dirige las proteínas hacia la matriz mitocondrial y que sólo las proteínas desplegadas son translocadas a través de ambas membranas. La proteína quimérica usada en estos experimentos contenía una señal de direccionamiento hacia la matriz en su N-terminal (en rojo), seguida por una secuencia espaciadora sin ninguna función particular (en negro) y luego la dihidrofolatorreductasa (DHFR), una enzima que normalmente sólo está presente en el citosol. (a) Cuando el segmento de DHFR está desplegado, la proteína quimérica atraviesa ambas membranas hacia la matriz de la mitocondria energizada y la señal de direccionamiento hacia la matriz se corta. (b) Cuando el C-terminal de la proteína quimérica se mantiene en su estado plegado por la unión del metotrexato, la translocación se bloquea. Si la secuencia espaciadora es lo suficientemente larga para atravesar los canales de transporte, se genera un intermediario de translocación estable y la secuencia de direccionamiento se corta, aun en presencia de metotrexato, como se muestra en la figura. (c) El C-terminal del intermediario de translocación mostrado en (b) puede detectarse incubando las mitocondrias con anticuerpos que se unen al segmento de DHFR y luego con partículas de oro cubiertas con la proteína bacteriana A, que se une de forma inespecífica a las moléculas de anticuerpo (véase fig. 5-51). La microfotografía electrónica del corte de una muestra revela las partículas de oro (punta de flecha roja) unidas al intermediario de translocación en un sitio de contacto entre las membranas interna y externa. También pueden verse otros sitios de contacto (flechas negras). [Partes (a) y (b) adaptadas de J. Rassow et al., 1990, *FEBS Letters* 275:190. Parte (c) de M. Schweiger et al., 1987, *J. Cell Biol.* 105:235, cortesía de W. Neupert.]

El tercer aporte de energía requerido para la incorporación mitocondrial de proteínas es un gradiente electroquímico de H^+, o fuerza protón motriz, a través de la membrana interna (cap. 8). En general, sólo las mitocondrias que están en respiración activa y, por consiguiente, han generado una fuerza protón motriz a través de la membrana interna son capaces de translocar proteínas precursoras desde el citosol a la matriz de la mitocondria. El tratamiento de las mitocondrias con inhibidores o desacopladores de la fosforilación oxidativa, como el cianuro o el dinitrofenol, disipa esta fuerza protón motriz. Aunque las proteínas precursoras todavía pueden unirse firmemente a los receptores de mitocondrias envenenadas de esta forma, las proteínas no pueden incorporarse ya sea en las células intactas o en sistemas libres de células, incluso en presencia de ATP y de proteínas chaperonas. Los científicos no saben con certeza cómo se usa la fuerza protón motriz para facilitar la entrada de una proteína precursora en la matriz. Una vez que una proteína se inserta parcialmente en la membrana interna, queda sometida a un potencial transmembrana de 200 mV (el espacio de la matriz es negativo) que es equivalente a un gradiente eléctrico aproximado de 400.000 V/cm. Una hipótesis es que las cargas positivas en la secuencia anfipática de direccionamiento a la matriz simplemente podrían ser sometidas a una "electroforesis" o traccionadas hacia el espacio de la matriz por el potencial eléctrico negativo existente del lado de adentro de la membrana.

Múltiples señales y vías dirigen las proteínas hacia los compartimientos submitocondriales

A diferencia del direccionamiento hacia la matriz, el direccionamiento de proteínas al espacio intermembrana, a la membrana interna y a la membrana externa de la mitocondria suele requerir más de una secuencia de direccionamiento y tiene lugar a través de una de varias vías posibles. La figura 16-28 resume la organización de las secuencias del direccionamiento en las proteínas dirigidas a diferentes sitios de la mitocondria.

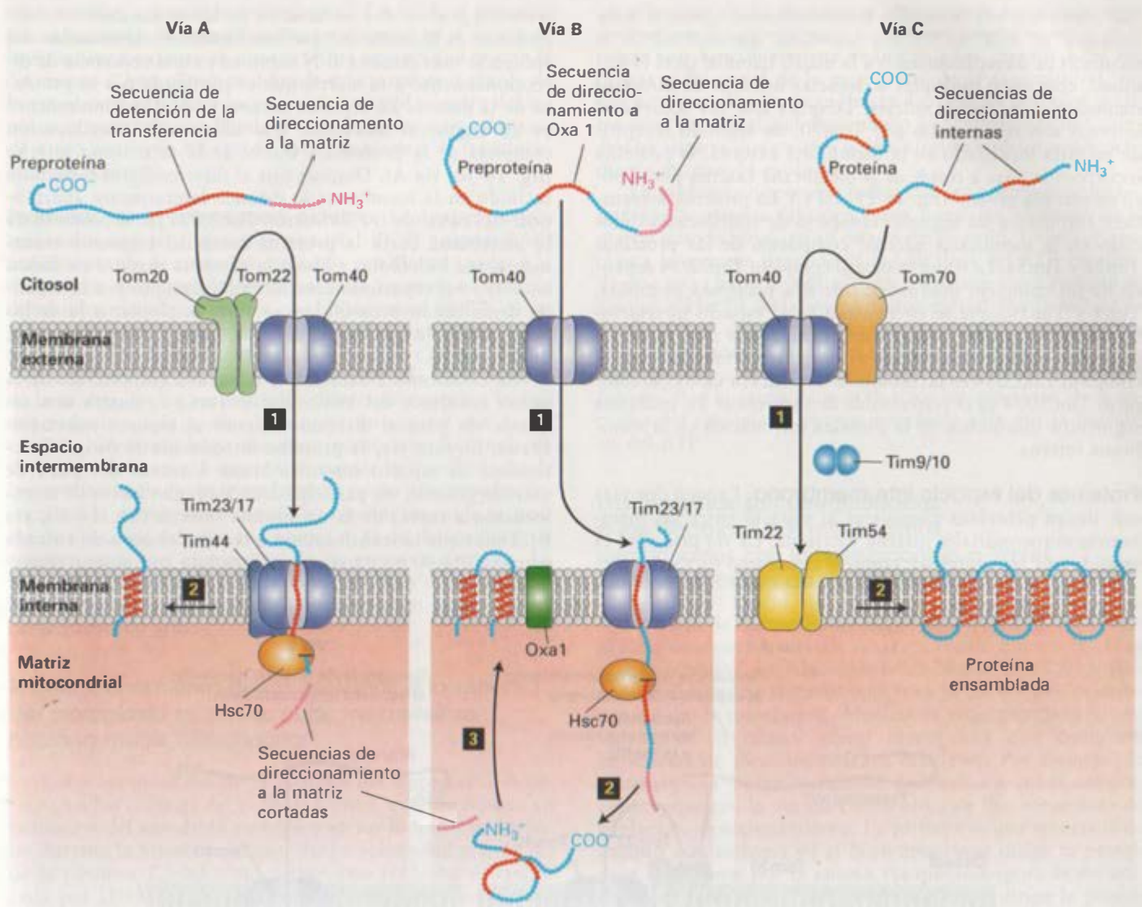
Proteínas de la membrana interna. Se conocen tres vías diferentes que direccionan a las proteínas destinadas a la membrana mitocondrial interna. Una vía usa las mismas



◀ Fig. 16-28. Ordenamiento de las secuencias de direccionamiento en las proteínas incorporadas por las mitocondrias. La mayor parte de las proteínas mitocondriales tiene una secuencia de direccionamiento a la matriz en el N-terminal (color rosado) que es similar, pero no idéntica, en diferentes proteínas. Las proteínas destinadas a la membrana interna, el espacio intermembrana o la membrana externa tienen una o más secuencias de direccionamiento adicionales que funcionan para dirigir las proteínas a estas localizaciones a través de varias vías diferentes. Las vías mencionadas entre paréntesis corresponden a las ilustradas en las figuras 16-29 y 16-30. (Véase W. Neupert, 1997, *Ann. Rev. Biochem.* 66:863.)

estructuras que se utilizan para el direccionamiento de las proteínas de la matriz (fig. 16-29, vía A). Una subunidad de citocromo oxidasa denominada CoxVa es una proteína típica transportada por esta vía. La forma precursora de CoxVa, que contiene una secuencia de direccionamiento a la matriz en el N-terminal es reconocida por el receptor de entrada Tom20/22, se transfiere a través del poro de entrada general de la membrana externa y del complejo de translocación de la membrana interna Tim23/17. Además de la secuencia de direccionamiento a la matriz, que es eliminada durante la entrada, CoxVa contiene una secuencia hidrófoba de detención de la transferencia. A medida que la proteína pasa a través del canal Tim23/17, la secuencia de detención de la transferencia bloquea la translocación del C-terminal a través de la membrana interna. El intermediario anclado a la membrana se transfiere luego en sentido lateral dentro de la bicapa de la membrana interna, en forma muy similar a la que las proteínas integrales de membrana tipo I son incorporadas a la membrana del RE (véase fig. 16-11).

Una segunda vía hacia la membrana interna es seguida por las proteínas (p. ej., la subunidad 9 de la ATP sintasa) cuyos precursores contienen una secuencia de direccionamiento a la matriz y dominios internos hidrófobos reconocidos por una proteína de la membrana interna denominada *Oxa1*. Se cree que esta vía involucra la translocación de por lo menos una porción del precursor en la matriz a través de los canales Tom20/22 y Tim23/17. Después de la eliminación de la secuencia de direccionamiento a la matriz,



▲ Fig. 16-29. Tres vías para el transporte de las proteínas del citosol hacia la membrana mitocondrial interna. Las proteínas con diferentes secuencias de direccionamiento se dirigen hacia la membrana interna a través de vías diferentes. En las tres vías, las proteínas atraviesan la membrana externa a través del poro de entrada general Tom40. Las proteínas que llegan por las vías A y B contienen una secuencia de direccionamiento a la matriz en el N-terminal que es reconocida por el receptor de entrada Tom20/22 presente en la membrana externa. Aunque estas dos vías usan el canal de membrana interna Tim23/17, se diferencian en que, en la vía B, toda la proteína precursora entra en la matriz y luego es enviada a la membrana interna. La Hsc70 de la matriz tiene un papel similar al que desempeña en la entrada de proteínas solubles en la matriz (véase fig. 16-26). Las proteínas que llegan por la vía C contienen secuencias internas que son reconocidas por el receptor de incorporación Tom70. En esta vía se usa un canal de translocación de la membrana interna diferente (Tim22/54). Dos proteínas intermembrana (Tim9 y Tim10) facilitan la transferencia entre los canales externo e interno. Para la explicación véase el texto. (Véase R. E. Dalbey y A. Kuhn, 2000. *Ann. Rev. Cell Devel. Biol.* 16:51, y N. Pfanner y A. Geissler, 2001. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2:339.)

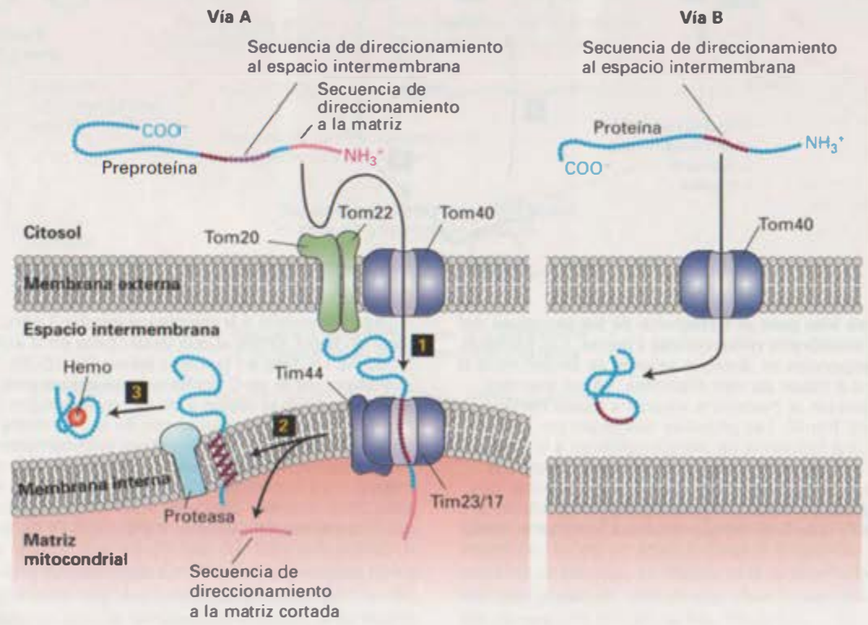
la proteína se inserta en la membrana interna por un proceso que requiere la interacción con Oxa1 y quizá con otras proteínas de la membrana interna (fig. 16-29, vía B). La Oxa1 está relacionada con una proteína bacteriana involucrada en la inserción de algunas proteínas en la membrana interna de las bacterias. Este parentesco sugiere que la Oxa1 puede haber descendido de la maquinaria de translocación de la bacteria endosimbiótica que finalmente se transformó en mitocondria. Sin embargo, las proteínas que forman los canales de la membrana interna de las mitocondrias no están relacionadas con la proteína SecY de los translocones bacterianos. La Oxa1 también participa en la inserción de ciertas proteínas en la membrana interna (p. ej., la subunidad II de la citocromo oxidasa) que son codificadas por el DNA mitocondrial y se sintetizan en la matriz por ribosomas mitocondriales.

La vía final para la inserción en la membrana mitocondrial interna es la que siguen las proteínas de pasaje múltiple

que contienen seis dominios transmembrana, como el antiportador de ADP/ATP. Estas proteínas, que carecen de la secuencia de direccionamiento a la matriz habitual en el N-terminal, contienen múltiples secuencias internas de direccionamiento a las mitocondrias. Después que las secuencias internas son reconocidas por Tom70, un segundo receptor de entrada localizado en la membrana externa, la proteína incorporada pasa a través de la membrana externa por el poro de entrada general (fig. 16-29, vía C). La proteína se transfiere entonces a un segundo complejo de translocación ubicado en la membrana interna, compuesto de las proteínas Tim22 y Tim54. La transferencia al complejo Tim22/54 depende de un complejo multimérico de dos proteínas pequeñas, Tim9 y Tim10, que se encuentran en el espacio intermembrana. Éstas pueden actuar como chaperonas para guiar las proteínas incorporadas desde el poro de entrada general al complejo Tim22/54 en la membrana interna. Por último, el complejo Tim22/54 es el responsable de incorporar los múltiples segmentos hidrófobos de la proteína introducida en la membrana interna.

Proteínas del espacio intermembrana. Existen dos vías que llevan proteínas citosólicas al espacio entre las membranas mitocondriales interna y externa. La vía principal es seguida por las proteínas, como el citocromo b_2, cuyos precursores poseen dos secuencias de direccionamiento diferentes en el N-terminal, que son finalmente eliminadas. La secuencia más cercana al N-terminal es una secuencia de direccionamiento a la matriz que es eliminada por la proteasa de la matriz. La segunda secuencia de direccionamiento es un segmento hidrófobo que bloquea la translocación completa de la proteína a través de la membrana interna (fig. 16-30, vía A). Después que el intermediario resultante incluido en la membrana se difunde lateralmente apartándose del canal de translocación Tim23/17, una proteasa de la membrana corta la proteína cerca del segmento transmembrana hidrófobo y libera la proteína madura en forma soluble en el espacio intermembrana. Excepto por la segunda degradación proteolítica, esta vía es similar a la de las proteínas de la membrana interna, como CoxVa (véase fig. 16-29, vía A).

La citocromo *c* hemoliasa, la enzima responsable de la unión covalente del hemo al citocromo *c*, ilustra una segunda vía para el direccionamiento al espacio intermembrana. En esta vía, la proteína introducida se dirige directamente al espacio intermembrana a través del poro de entrada general, sin participación de ningún factor de translocación a través de la membrana interna (fig. 16-30, vía B). Dado que la translocación a través del poro de entrada general Tom40 no parece estar asociado con ningún proceso energético como la hidrólisis de ATP o GTP, el mecanismo que maneja la translocación unidireccional a través de la membrana externa es incierto. Una posibilidad es que la citocromo *c* hemoliasa se difunda pasivamente a través de la membrana externa y luego quede atrapada dentro del espacio intermembrana ligada a otra proteína que es enviada a ese lugar por alguno de los mecanismos de translocación ya descritos.



▲ **Fig. 16-30. Dos vías para el transporte de las proteínas del citosol al espacio intermembrana de las mitocondrias.** La vía A, la principal para el transporte al espacio intermembrana, es similar a la vía A para el transporte a la membrana interna (véase fig. 16-29). La diferencia principal es que la secuencia de direccionamiento interna de proteínas tales como el citocromo b_2, destinadas al espacio intermembrana, es reconocida por una proteasa de la membrana interna que corta la proteína sobre el lado de la membrana que mira al espacio intermembrana. La proteína liberada se pliega luego y se une a su cofactor hemo dentro del espacio intermembrana. La vía B produce el transporte directo al espacio intermembrana a través del poro de entrada general Tom40 de la membrana externa. Para mayor explicación véase el texto. (Véase R. E. Dalbey y A. Kuhn, 2000, *Ann. Rev. Cell Devel. Biol.* 16:51; N. Pfanner y A. Geissler, 2001, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2:339; y K. Diekert et al., 1999, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA.* 96:11752.)

Proteínas de la membrana externa. Los experimentos realizados con la porina mitocondrial (P70) proporcionan indicios acerca de cómo las proteínas son direccionadas a la membrana mitocondrial externa. Una secuencia corta de direccionamiento a la matriz en el N-terminal de P70 es seguida por un tramo largo de aminoácidos hidrófobos (véase fig. 16-28). Si la secuencia hidrófoba se elimina experimentalmente de P70, la proteína se acumula en el espacio de la matriz con su secuencia de direccionamiento a la matriz todavía unida a ella. Este hallazgo sugiere que la secuencia hidrófoba larga funciona como una secuencia de detención de la transferencia que impide la transferencia de la proteína hacia la matriz y la ancla como una proteína integral en la membrana externa. Normalmente, ni la secuencia de direccionamiento a la matriz ni la de detención de la transferencia son eliminadas de la proteína anclada. La fuente de energía para impulsar las proteínas de la membrana externa a través del poro de importación general no se ha identificado aún.

El direccionamiento de las proteínas a la estroma del cloroplasto es similar al de las proteínas hacia la matriz mitocondrial

Entre las proteínas de la estroma del cloroplasto se encuentran las enzimas del ciclo de Calvin, que intervienen en la fijación del anhídrido carbónico en los hidratos de carbono durante la fotosíntesis (cap. 8). La subunidad grande (L) de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa (rubisco) es codificada por DNA del cloroplasto y se sintetiza en los ribosomas del cloroplasto en el espacio de la estroma. La subunidad pequeña (S) de rubisco y todas las demás enzimas del ciclo de Calvin son codificadas por genes nucleares y transportadas al cloroplasto después de su síntesis en el citosol. La forma precursora de estas proteínas de la estroma contiene una secuencia de *entrada en la estroma* en el N-terminal (véase cuadro 16-1).

Los experimentos con cloroplastos aislados, similares a los descritos con las mitocondrias e ilustrados en la figura 16-25, han demostrado que los cloroplastos pueden incorporar el precursor de la subunidad S después de su síntesis. Después que el precursor desplegado entra en el espacio de la estroma, se une temporariamente a una chaperona Hsc70 de la estroma y la secuencia del N-terminal es eliminada. Mediante reacciones facilitadas por las chaperoninas Hsc60, que residen dentro del espacio de la estroma, ocho subunidades S se combinan con ocho subunidades L para producir la enzima rubisco activa.

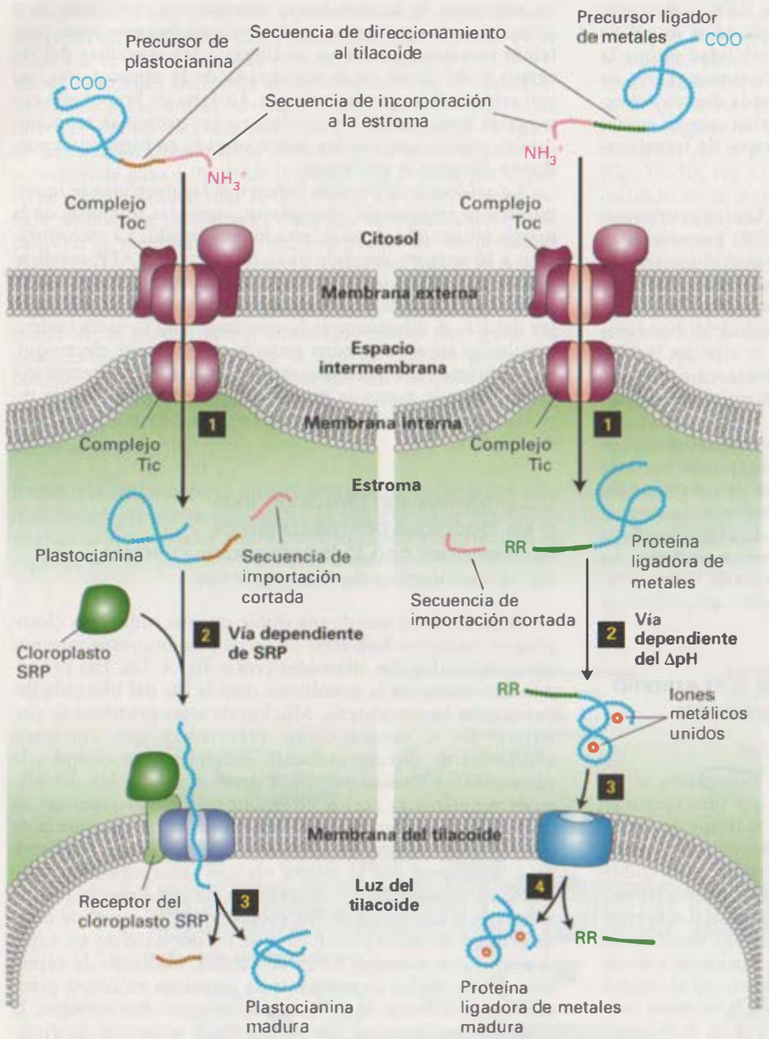
El proceso general de ingreso a la estroma parece ser muy similar al de introducción de proteínas en la matriz mitocondrial (véase fig. 16-26). Se sabe que por lo menos tres proteínas de la membrana externa del cloroplasto, incluido un receptor que se une a la secuencia de entrada a la estroma y una proteína de canal de translocación, y cinco proteínas de la membrana interna son esenciales para direccionar las proteínas a la estroma. Aunque estas proteínas son funcionalmente análogas a las proteínas del receptor y del canal de la membrana de la mitocondria, no son estructuralmente homólogas. La falta de homología entre estas proteínas del cloroplasto y las proteínas mitocondriales sugiere que pueden haber surgido en forma independiente durante la evolución.

La evidencia disponible indica que las proteínas se incorporan a la estroma del cloroplasto, como las proteínas de la matriz mitocondrial, en su estado desplegado. La incorporación a la estroma depende de la hidrólisis del ATP, catalizada por una chaperona Hsc70 de la estroma cuya función es similar a Hsc70 de la matriz mitocondrial y a la BiP de la luz del RE. A diferencia de lo que ocurre en la mitocondria, los cloroplastos no pueden generar un gradiente electroquímico (fuerza motriz de protones) a través de su membrana interna. Por lo tanto, la introducción de proteínas en la estroma del cloroplasto parece impulsada sólo por la hidrólisis del ATP.

Las proteínas son direccionadas a los tilacoides por mecanismos relacionados con la translocación a través de la membrana de las bacterias

Además de la membrana doble que los rodea, los cloroplastos contienen una serie de sacos membranosos internos interconectados, los tilacoides (véase fig. 8-30). Las proteínas localizadas en la membrana o en la luz del tilacoide llevan a cabo la fotosíntesis. Muchas de estas proteínas se sintetizan en el citosol como precursores que contienen secuencias de direccionamiento múltiples. Por ejemplo, la plastocianina y otras proteínas destinadas a la luz del tilacoide requieren la acción consecutiva de dos secuencias de captación-direccionamiento. La primera es una secuencia de ingreso a la estroma en el N-terminal que dirige la proteína a la estroma por la misma vía que incorpora la subunidad S de la rubisco. La segunda secuencia dirige la proteína desde la estroma a la luz del tilacoide. El papel de estas secuencias de direccionamiento se ha demostrado en experimentos con sistemas libres de células, midiendo la captación dentro de los cloroplastos de proteínas mutantes generadas por técnicas de DNA recombinante. Por ejemplo, la plastocianina mutante que carece de la secuencia de direccionamiento al tilacoide, pero contiene una secuencia intacta de entrada a la estroma, se acumula en ésta y no es transportada hacia la luz del tilacoide.

Se han identificado cuatro vías separadas de transporte de las proteínas de la estroma hacia el tilacoide que están estrechamente relacionadas con los mecanismos de transporte análogos de las bacterias, lo que ilustra la íntima relación evolutiva entre la membrana de la estroma y la membrana interna bacteriana. El transporte de plastocianina y de las proteínas relacionadas hacia la luz del tilacoide tiene lugar por una vía dependiente de SRP (fig. 16-31, vía A). Una segunda vía usada para transportar proteínas hacia la luz del tilacoide utiliza una proteína relacionada con la SecA bacteriana y se cree que utiliza un mecanismo similar al mostrado en la figura 16-23. Una tercera vía que direcciona proteínas a la membrana del tilacoide depende de una proteína relacionada con la proteína Oxa1 mitocondrial y con la proteína bacteriana homóloga (véase fig. 16-29, vía B).



◀ Fig. 16-31. Dos de las cuatro vías para el transporte de proteínas del citosol a la luz del tilacoide. En estas vías, los precursores desplegados se transportan hacia la luz del tilacoide a través de las mismas proteínas de la membrana externa que introducen las proteínas localizadas en la estroma. Luego, el corte de la secuencia de entrada en la estroma del N-terminal por una proteasa de la estroma revela la secuencia de direccionamiento al tilacoide. En este punto, las dos vías divergen. En la vía dependiente de SRP (*izquierda*), la plastocianina y las proteínas similares se mantienen desplegadas en el espacio de la estroma por un juego de chaperonas (no mostradas) y, dirigidas por la secuencia de direccionamiento al tilacoide, se unen a proteínas que están estrechamente relacionadas con el SRP bacteriano, al receptor de SRP y al translocón SecY, que median el desplazamiento hacia la luz. Después que la secuencia de direccionamiento al tilacoide es cortada en la luz del tilacoide por otra endoproteasa, la proteína se pliega en su estructura madura. En la vía dependiente del pH (*derecha*), las proteínas que se unen a metales se pliegan en la estroma y se le agregan cofactores redox complejos. Para el transporte de la proteína plegada hacia la luz del tilacoide se requieren dos residuos de arginina (RR) en el N-terminal de la secuencia de direccionamiento al tilacoide y un gradiente de pH a través de la membrana interna. El translocón de la membrana del tilacoide está compuesto por lo menos de cuatro proteínas relacionadas con las proteínas de la membrana interna bacteriana. (Véase R. Dalbey y C. Robinson, 1999, *Trends Biochem. Sci.* 24:17; R. E. Dalbey y A. Kuhn, 2000, *Ann. Rev. Cell Devel. Biol.* 16:51; y C. Robinson y A. Bolhuis, 2001, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2:350.)

Algunas proteínas codificadas por el DNA de los cloroplastos y sintetizadas en la estroma o transportadas hacia la estroma desde el citosol se insertan en la membrana del tilacoide mediante esta vía.

Por último, las proteínas del tilacoide que se unen a cofactores que contienen metales siguen otra vía hacia la luz del tilacoide (fig. 16-31, vía ΔpH). Los precursores desplegados de estas proteínas son primero redireccionados a la estroma, donde la secuencia de entrada del N-terminal es eliminada, y luego la proteína se pliega y se une a su cofactor. Un juego de proteínas de la membrana del tilacoide colabora en la translocación de la proteína plegada unida a su cofactor hacia la luz del tilacoide, proceso normalmente impulsado por el gradiente de pH que existe a través de la membrana del tilacoide. La secuencia de direccionamiento al tilacoide que dirige a una proteína hacia esta vía dependiente del pH incluye dos residuos de arginina en estrecha proximidad, que son cruciales para el reconocimiento. Las células bacterianas también tienen un mecanismo para translocar proteínas plegadas a través de la membrana interna con una secuencia similar que contiene arginina. El mecanismo molecular por el cual estas grandes proteínas globulares plegadas son transportadas a través de la membrana del tilacoide está actualmente en intenso estudio.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 16.5

Direccionamiento de proteínas a mitocondrias y cloroplastos

- La mayoría de las proteínas de las mitocondrias y de los cloroplastos son codificadas por genes nucleares, se sintetizan en los ribosomas citosólicos y después de la traducción se introducen en los orgánulos.
- Toda la información necesaria para direccionar una proteína precursora desde el citosol a la matriz mitocondrial o a la estroma del cloroplasto está contenida dentro de una secuencia de captación-direccionamiento en su N-terminal. Después de la entrada de la proteína, la secuencia de captación-direccionamiento es eliminada por proteasas existentes dentro de la matriz o estroma.
- Las chaperonas citosólicas mantienen los precursores de las proteínas de las mitocondrias y de los cloroplastos en un estado desplegado. Sólo las proteínas desplegadas pueden incorporarse en los orgánulos. La translocación tiene lugar en sitios en los que las membranas externa e interna de los orgánulos están muy cercanas.
- Las proteínas destinadas a la matriz mitocondrial se unen a receptores presentes en la membrana mitocondrial externa y luego son transferidas al poro de entrada general (Tom40) de la membrana externa. La translocación tiene lugar simultáneamente a través de las membranas externa e interna, impulsada por la fuerza motriz de protones a través de la membrana interna y por la hidrólisis del ATP por la ATPasa Hsc70 de la matriz (véase fig. 16-26).
- Las proteínas destinadas a sitios de la mitocondria que no sean la matriz suelen contener dos o más secuencias de direccionamiento, una de las cuales puede ser una secuencia N-terminal de direccionamiento hacia la matriz (véase fig. 16-28).
- Algunas proteínas mitocondriales destinadas al espacio intermembrana o a la membrana interna ingresan primero en la matriz y luego son direccionadas; otras nunca entran en la matriz sino que se dirigen directamente a su destino final.
- La entrada de proteínas a la estroma del cloroplasto ocurre a través de canales de translocación existentes en la membrana interna y en la membrana externa, que son análogos en su función a los canales mitocondriales, pero que están compuestos de proteínas no relacionadas en sus secuencias con las proteínas mitocondriales correspondientes.
- Las proteínas destinadas a los tilacoides tienen secuencias de direccionamiento secundario. Después de la entrada de estas proteínas a la estroma, la eliminación de las secuencias de direccionamiento a la estroma revela las secuencias de direccionamiento al tilacoide.
- Las tres vías conocidas para el desplazamiento de proteínas desde la estroma del cloroplasto al tilacoide se parecen mucho a la translocación a través de la membrana interna bacteriana (véase fig. 16-31). Uno de estos sistemas puede translocar proteínas plegadas.

16.6 Direccionamiento de las proteínas peroxisómicas

Los peroxisomas son orgánulos pequeños limitados por una sola membrana. A diferencia de las mitocondrias y los cloroplastos, los peroxisomas carecen de DNA y ribosomas. Por lo tanto, todas las proteínas peroxisómicas son codificadas por los genes nucleares, se sintetizan en los ribosomas libres del citosol y luego se incorporan a peroxisomas preexistentes o recién formados. A medida que los peroxisomas se agrandan por el agregado de proteínas (y lípidos) pueden finalmente dividirse y formar nuevos peroxisomas, como sucede con las mitocondrias y los cloroplastos.

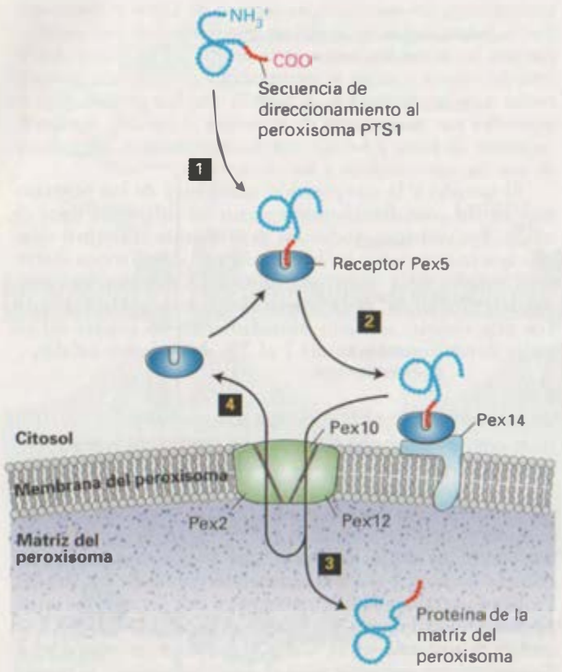
El tamaño y la composición enzimática de los peroxisomas varían considerablemente según los diferentes tipos de célula. Sin embargo, todos los peroxisomas contienen enzimas que usan oxígeno molecular para oxidar diversos sustratos y forman agua oxigenada (H_2O_2). La catalasa, una enzima del peroxisoma, descompone eficazmente el H_2O_2 a H_2O. Los peroxisomas son muy abundantes en las células del hígado, donde constituyen del 1 al 2% del volumen celular.

Un receptor citosólico dirige las proteínas con una secuencia SKL en el C-terminal hacia la matriz del peroxisoma

La incorporación de catalasa y otras proteínas a los peroxisomas de hígado de rata puede investigarse en un sistema libre de células similar al que se usa para estudiar la entrada de proteínas en las mitocondrias (véase fig. 16-25). Probando varias catalasas mutantes en este sistema, los investigadores descubrieron que la secuencia Ser-Lys-Leu (SKL en código de una sola letra), o una secuencia relacionada, en el C-terminal era necesaria para el direccionamiento al peroxisoma. Además, el agregado de la secuencia SKL al C-terminal de una proteína que normalmente es citosólica lleva a la captación de la proteína alterada por los peroxisomas de células en cultivo. Todas las proteínas de la matriz del peroxisoma, salvo algunas, poseen una secuencia de este tipo conocida como *secuencia de direccionamiento peroxisómico 1* o simplemente *PTS1*.

La vía para la incorporación de catalasa y otras proteínas portadoras de PTS1 a la matriz del peroxisoma se representa en la figura 16-32. La PTS1 se une a una proteína receptora soluble en el citosol (Pex5), que a su vez se une a un receptor de la membrana del peroxisoma (Pex14). Los receptores de ingreso peroxisómico solubles y asociados con membrana parecen tener una función análoga a la de la SRP y del receptor de SRP en el direccionamiento de proteínas hacia la luz del RE. Todavía unida a Pex5, la proteína luego se desplaza a través de un canal multimérico de translocación, característica que difiere de la incorporación de proteínas hacia la luz del RE. En algún momento durante o después de la entrada en la matriz, Pex5 se disocia de la proteína de la matriz peroxisómica y se recicla nuevamente al citoplasma. A diferencia de las secuencias de captación direccionamiento del N-terminal de las proteínas destinadas a la luz del RE, a la matriz mitocondrial y a la estroma del cloroplasto, la secuencia PTS1 no es eliminada de proteínas después de su entrada en un peroxisoma. La incorporación de proteínas en los peroxisomas requiere la hidrólisis del ATP, pero no se sabe cómo se usa la energía liberada del ATP para impulsar la translocación unidireccional a través de la membrana del peroxisoma.

Los mecanismos de ingreso en el peroxisoma, al contrario de la mayoría de los sistemas que median la incorporación de proteínas al RE, mitocondrias y cloroplastos, pueden translocar proteínas plegadas a través de la membrana. Por



◀ Fig. 16-32. Entrada de proteínas en la matriz del peroxisoma dirigida por la secuencia de direccionamiento PTS1. Paso 1: La catalasa y la mayoría de las demás proteínas de la matriz del peroxisoma contienen una secuencia de captación-direccionamiento PTS1 en el C-terminal (en rojo) que se une al receptor citosólico Pex5. Paso 2: El Pex5 con la proteína de matriz unida a él interactúa con el receptor Pex14, localizado en la membrana del peroxisoma. Paso 3: El complejo proteína de matriz-Pex5 es transferido luego a un grupo de proteínas de membrana (Pex10, Pex12 y Pex2) que son necesarias para la translocación hacia la matriz del peroxisoma por un mecanismo desconocido. Paso 4: En algún momento, durante la translocación o en la luz, el Pex5 se disocia de la proteína de la matriz y regresa al citosol, mediante un proceso que involucra el complejo Pex2/10/12 de la membrana y otras proteínas citosólicas no mostradas. Nótese que las proteínas plegadas pueden incorporarse a los peroxisomas y que la secuencia de direccionamiento no se corta en la matriz. (Véase R. E. Purdue y R. B. Lazarow, 2001, *Ann. Rev. Cell Devel. Biol.* 17:701; S. Subramani et al., 2000, *Ann. Rev. Biochem.* 69:399; y V. Dammai y S. Subramani, 2001, *Cell* 105:187.)

ejemplo, la catalasa asume una conformación plegada y se une al hemo en el citoplasma antes de atravesar la membrana del peroxisoma. Los estudios en sistemas libres de células han demostrado que los mecanismos de ingreso en los peroxisomas pueden transportar una amplia variedad de moléculas, incluidas las muy grandes. Para explicar esta poco frecuente capacidad, los científicos han especulado que, por un mecanismo desconocido, puede ensamblarse un canal de translocación de tamaño variable para adaptarse exactamente al diámetro de la molécula sustrato unida a PTS1 y luego desensamblarse una vez completada la translocación.

Algunas proteínas de la matriz del peroxisoma, como la tiolasa, se sintetizan como precursores con una secuencia de captación-direccionamiento en el N-terminal, conocida como *PTS2*. Estas proteínas se unen a una proteína receptora citosólica diferente, pero se cree que la incorporación tiene lugar por lo demás por el mismo mecanismo que las proteínas portadoras de PTS1.

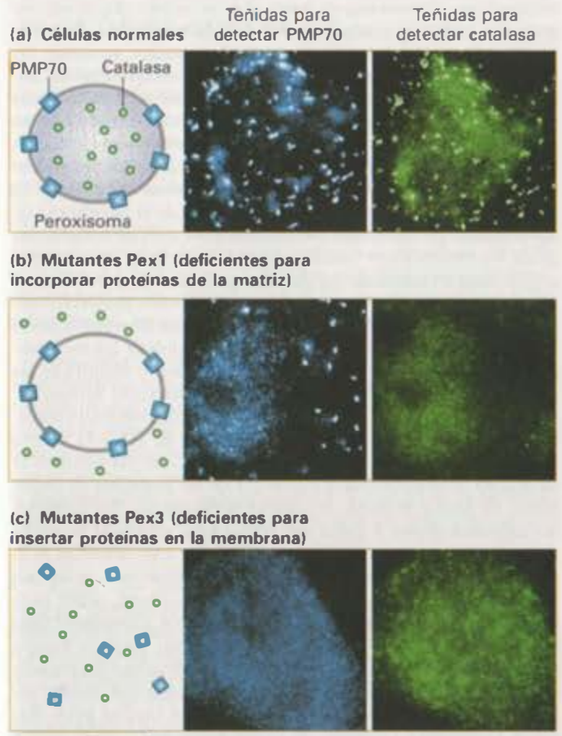
Las proteínas de la membrana y de la matriz del peroxisoma se incorporan por vías diferentes

MEDICINA

Las mutaciones recesivas autosómicas que causan un ensamblaje defectuoso del peroxisoma ocurren naturalmente en la población humana. Estos defectos pueden producir el deterioro grave de muchos órganos y hasta la muerte. En el *síndrome de Zellweger* y los trastornos relacionados con él, por ejemplo, el transporte de muchas o de todas las proteínas hacia la matriz del peroxisoma está deteriorado; las enzimas del peroxisoma recién sintetizadas permanecen en el citosol y son finalmente degradadas. Los análisis genéticos de células cultivadas de pacientes con síndrome de Zellweger y de células de levadura portadoras de mutaciones similares han identificado más de 20 genes que son necesarios para la biogénesis del peroxisoma.

Los estudios con mutantes de ensamblado de peroxisomas han demostrado que se usan vías diferentes para introducir proteínas en la matriz del peroxisoma y para insertar proteínas en la membrana del peroxisoma. Por ejemplo, el análisis de células de algunos pacientes con síndrome de Zellweger condujo a la identificación de los genes que codifican las proteínas presuntas del canal de translocación Pex10, Pex12 y Pex2. Las células mutantes defectuosas para cualquiera de estas proteínas no pueden incorporar proteínas de la matriz peroxisómica como la catalasa; no obstante, las células contienen peroxisomas vacíos que tienen una dotación normal de proteínas de membrana (fig. 16-33b). Se encontró que las mutaciones en cualquiera de otros tres genes bloquean la inserción de proteínas en la membrana del peroxisoma, así como la incorporación de proteínas de la matriz (fig. 16-33c). Estos hallazgos demuestran que un conjunto de proteínas transloca proteínas solubles hacia la matriz del peroxisoma, pero que es necesario un conjunto diferente para la inserción de proteínas en la membrana del peroxisoma. Esta situación difiere notablemente de lo que sucede en el RE, las mitocondrias y los cloroplastos en el sentido que, como hemos visto, las proteínas de la membrana y las proteínas solubles comparten muchos de los componentes para su inserción en esos orgánulos.

Aunque la mayor parte de los peroxisomas se generan por la división de orgánulos preexistentes, éstos también pueden surgir de novo por el proceso en dos etapas representado en la figura 16-34. En este caso, las proteínas de membrana del peroxisoma son dirigidas primero a membranas precursoras por secuencias diferentes de PTS1 y PTS2. El análisis de células mutantes reveló que la proteína Pex19 es el receptor responsable del direccionamiento de las proteínas de membrana del peroxisoma, mientras Pex3 y Pex16 son necesarias para su inserción apropiada en la membrana. La inserción de proteínas de membrana del peroxisoma genera membranas que tienen todos los componentes necesarios para la incorporación de proteínas de la matriz, lo que conduce a la formación de peroxisomas funcionales maduros. La división de los peroxisomas maduros, que es la que determina principalmente el número de peroxisomas



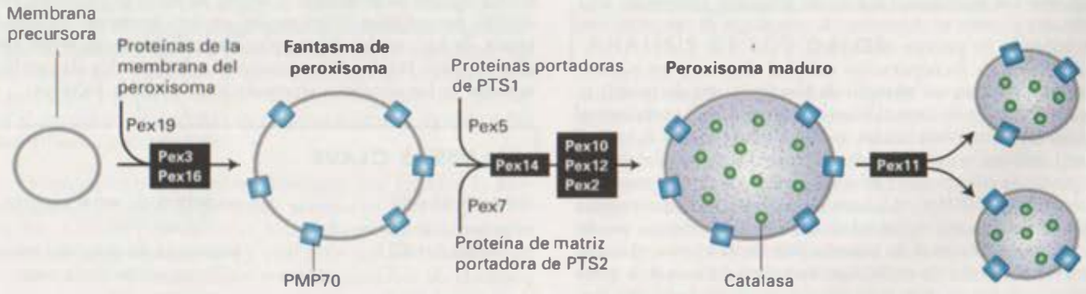
◀ FIGURA EXPERIMENTAL 16-33 La tinción por inmunofluorescencia de la biogénesis de los peroxisomas de mutantes revela las diferentes vías para la incorporación de proteínas de membrana y de la matriz. Las células se tiñeron con anticuerpos contra PMP70, una proteína de la membrana del peroxisoma, o con anticuerpos contra la catalasa, una proteína de la matriz del peroxisoma, y luego se observaron en un microscopio para fluorescencia. (a) En las células normales, las proteínas de la membrana y de la matriz de los peroxisomas son visibles como focos brillantes en numerosos cuerpos peroxisómicos. (b) En las células de un paciente con deficiencia de Pex12, la catalasa está distribuida de manera uniforme en todo el citosol, en tanto que la PMP70 se suele localizar en los cuerpos peroxisómicos. (c) En las células de un paciente con deficiencia de Pex3, las membranas de los peroxisomas no pueden ensamblarse y como consecuencia no se forman cuerpos peroxisómicos. Por lo tanto, la catalasa y la PMP70 se localizan erróneamente en el citosol. (Cortesia de Stephen Gould, Johns Hopkins University.)

dentro de una célula, depende de otra proteína, Pex11. La sobreexpresión de la proteína Pex11 causa un gran aumento en el número de peroxisomas, lo que sugiere que esta proteína controla la magnitud de la división de los peroxisomas. Los peroxisomas pequeños generados por la división pueden aumentar de tamaño por la incorporación de proteínas de la matriz y de la membrana a través de las vías ya descritas.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 16.6

Direccionamiento de las proteínas peroxisómicas

- Todas las proteínas peroxisómicas se sintetizan en los ribosomas citosólicos y son incorporadas en los orgánulos después de la traducción.
- La mayor parte de las proteínas de la matriz peroxisómica contiene una secuencia de direccionamiento PTS1 en el C-terminal; algunas tienen una secuencia de direccionamiento PTS2 en el N-terminal. Ninguna secuencia de direccionamiento es eliminada después de la incorporación.
- Todas las proteínas destinadas a la matriz peroxisómica se unen a un receptor citosólico que es diferente para las



▲ Fig. 16-34. Modelo de la biogénesis y división de los peroxisomas. El primer estadio en la formación de novo de los peroxisomas es la incorporación de proteínas de membrana peroxisómicas en las membranas precursoras. El Pex19 actúa como receptor para las secuencias de direccionamiento a la membrana. Se necesita la presencia de Pex3 y de Pex16 para la inserción apropiada de las proteínas en la membrana del peroxisoma en formación. La inserción de todas las proteínas de membrana del peroxisoma produce un fantasma de peroxisoma que es capaz de incorporar proteínas dirigidas a la matriz. Las vías para incorporar las proteínas de matriz portadoras de PTS1 y PTS2 sólo difieren en la identidad del receptor citosólico (Pex5 y Pex7, respectivamente) que se une a la secuencia de direccionamiento (véase fig. 16-32). La incorporación completa de las proteínas de la matriz produce un peroxisoma maduro. La proliferación de los peroxisomas requiere la división de los peroxisomas maduros, proceso que depende de la proteína Pex11.

proteínas portadoras de PTS1 y PTS2 y luego se dirigen al receptor de entrada y al aparato de translocación comunes de la membrana del peroxisoma (véase fig. 16-32).

- La translocación de las proteínas de la matriz a través de la membrana del peroxisoma depende de la hidrólisis del ATP. Muchas proteínas de la matriz del peroxisoma se pliegan en el citosol y atraviesan la membrana con una estructura plegada.
- Las proteínas destinadas a la membrana del peroxisoma contienen secuencias de direccionamiento diferentes de las proteínas destinadas a la matriz del peroxisoma y se introducen por una vía diferente.
- A diferencia de lo que sucede con las mitocondrias y los cloroplastos, los peroxisomas pueden surgir de novo a partir de precursores de membranas, así como por división de orgánulos preexistentes (véase fig. 16-34).

PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO

Como hemos visto en este capítulo, ahora comprendemos muchos de los aspectos de los procedimientos básicos responsables del transporte selectivo de las proteínas hacia el retículo endoplasmático (RE), mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas. Los estudios bioquímicos y genéticos, por ejemplo, han identificado secuencias de señalización de acción cis, responsables del direccionamiento de las proteínas a la membrana del orgánulo correcto y los receptores de membrana que reconocen estas secuencias de señalización. También hemos aprendido mucho sobre los mecanismos subyacentes que translocan las proteínas a través de las membranas de los orgánulos y se ha determinado la forma cómo se usa la energía para empujar o traccionar las proteínas a través de la membrana en una dirección, el tipo de canal a través del cual pasan las proteínas y si las proteínas son translocadas en un estado plegado o desplegado. No obstante, muchas preguntas fundamentales permanecen sin respuesta, incluida la forma en que las proteínas totalmente plegadas atraviesan una membrana y cómo se determina la topología de las proteínas de membrana de pasajes múltiples.

El sistema de incorporación del cual disponen los peroxisomas proporciona un ejemplo de translocación de proteínas plegadas. No sólo es capaz de translocar proteínas totalmente plegadas con cofactores unidos a ellas hacia la matriz del peroxisoma, sino que también puede dirigir la incorporación de una gran partícula de oro adosada a un péptido de direccionamiento peroxisómico (PTS1). Algunos investigadores han especulado que el mecanismo de introducción en el peroxisoma puede estar relacionado con el de introducción en el núcleo, el ejemplo mejor conocido de translocación postraduccional de proteínas plegadas (cap. 12). Las estructuras de introducción peroxisómicas y nucleares pueden transportar moléculas plegadas de tamaños muy diversos y ambos parecen comprometer un componente que cumple ciclos entre el citosol y el interior de los orgánulos: el receptor Pex5 de PTS1 en el caso de la introducción peroxisómica y el complejo Ran-importina en el caso de la nuclear. Sin embargo, también parecen existir diferencias cruciales entre los dos procesos de translocación. Por ejemplo, los poros nucleares representan organizaciones macromoleculares estables grandes que pueden observarse fácilmente con el microscopio electrónico, en tanto que no se han observado estructuras análogas similares a poros en la membrana del peroxisoma. Es más, las moléculas pequeñas pueden atravesar los poros nucleares fácilmente, en tanto que las membranas del peroxisoma mantienen una barrera permanente para la difusión de moléculas hidrófilas pequeñas. En conjunto, estas observaciones sugieren que la introducción peroxisómica puede requerir un tipo completamente nuevo de mecanismo de translocación. Los mecanismos evolutivamente conservados para la translocación de proteínas plegadas a través de la membrana citoplasmática de las células bacterianas y a través de la membrana de los tilacoides de los cloroplastos también se conocen poco. Un mejor conocimiento de estos procesos de translocación de proteínas plegadas a través de una membrana probablemente dependerá del futuro desarrollo de sistemas de translocación in vitro que permitan a los investigadores definir los mecanismos bioquímicos que dirigen la translocación e identificar las estructuras de los intermediarios de translocación atrapados.

Comparado con nuestro conocimiento de cómo son translocadas las proteínas solubles hacia la luz de RE y la matriz mitocondrial, lo que sabemos acerca de cómo las secuencias de acción cis especifican la topología de las proteínas de membrana de pasaje múltiple es realmente elemental. Por ejemplo, no sabemos cómo el canal del translocón acomoda polipéptidos que se orientan en forma diferente con respecto a la membrana ni entendemos cómo las secuencias locales del polipéptido interactúan con el canal del translocón, tanto para determinar la orientación de los segmentos transmembrana como para señalar el desplazamiento lateral hacia la bicapa de la membrana. Una mejor comprensión de cómo las secuencias de aminoácidos de las proteínas de membrana pueden especificar la topología de la membrana será crucial para descifrar la inmensa cantidad de información estructural acerca de las proteínas de membrana contenida dentro de las bases de datos de secuencias genómicas.

A partir de los estudios genéticos y bioquímicos seguirán surgiendo conocimientos más detallados de todos los procesos de translocación, tanto en las levaduras como en los mamíferos. Estos estudios revelarán indudablemente la existencia de proteínas adicionales importantes comprometidas en el reconocimiento de las secuencias de direccionamiento y en la translocación de proteínas a través de bicapas lipídicas. Por último, los estudios estructurales, en este momento rudimentarios, de los canales del translocón probablemente serán ampliados para revelar las estructuras y los estados de conformación de los canales con resolución en escala atómica.

PALABRAS CLAVE

chaperonas 665
oligosacáridos *N*-ligados y *O*-ligados 673
partícula de reconocimiento de señal (SRP) 661
perfil de hidropatía 671
poro de entrada general 685
respuesta a proteínas desplegadas 679
secuencia de detención de transferencia-anclaje 667
secuencia de señalización-anclaje 668
secuencia de señalización (captación-direccionamiento) 659
secuencias topogénicas 666
topología de las proteínas de membrana 666
translocación postraduccional 665
translocación cotraduccional 661
translocón 662

REVISIÓN DE CONCEPTOS

1. Describa la fuente o fuentes de energía necesarias para la translocación unidireccional a través de la membrana en a) la translocación cotraduccional en el retículo endoplasmático (RE); b) la translocación postraduccional en el RE; c) la translocación a través de la membrana citoplasmática bacteriana; y d) la translocación a la matriz mitocondrial.

2. En la mayoría de los orgánulos la translocación suele requerir la actividad de una o más proteínas citosólicas. Describa la función básica de tres factores citosólicos diferentes necesaria para la translocación en el RE, las mitocondrias y los peroxisomas, respectivamente.

3. Describa los principios típicos usados para identificar las secuencias topogénicas dentro de las proteínas y cómo pueden usarse para desarrollar algoritmos computarizados. ¿Cómo la identificación de las secuencias topogénicas conduce a la predicción de la disposición en la membrana de una proteína de pasaje múltiple? ¿Cuál es la importancia de la disposición de las cargas positivas respecto de la orientación en la membrana de una secuencia de señalización-anclaje?

4. El retículo endoplasmático (RE) es un sitio importante para el "control de calidad" de las proteínas recién sintetizadas. ¿Qué significa en este contexto el control de calidad? ¿Qué proteínas adicionales están típicamente involucradas en el procesamiento de las proteínas recién sintetizadas dentro del RE? Las células suelen degradar las proteínas incapaces de abandonar el RE. ¿En qué lugar dentro de la célula ocurre esa degradación y cuál es la relación de la proteína Sec61p del translocón con el proceso de degradación?

5. Se han aislado mutantes de levadura sensibles a la temperatura en las que son bloqueados cada uno de los pasos enzimáticos de la síntesis del dolicol-oligosacárido precursor para la glucosilación *N*-ligada (véase fig. 16-17). Proponga una explicación de por qué las mutaciones que bloquean la síntesis del intermediario con la estructura dolicol-PP-$(GlcNAc)_2Man_5$ impiden completamente el agregado de cadenas de oligosacáridos *N*-ligados a las proteínas secretorias, en tanto que las mutaciones que bloquean la conversión de este intermediario al precursor completo, dolicol-PP-$(GlcNAc)_2Man_9Glc_3$ permiten el agregado de cadenas de oligosacáridos *N*-ligados a las glucoproteínas secretorias.

6. Nombre cuatro proteínas diferentes que faciliten la modificación o plegado de proteínas secretorias dentro de la luz del RE. Indique cuál de estas proteínas modifica covalentemente las proteínas sustrato y cuál provoca sólo cambios de conformación en las proteínas sustrato.

7. Debido a que usted está interesado en estudiar cómo una proteína secretoria en particular se pliega dentro del RE, desea determinar si en extractos de RE la BiP se une a la proteína recién sintetizada. Usted encuentra que se pueden aislar algunas de las proteínas secretorias recién sintetizadas unidas a BiP cuando se agrega ADP al extracto celular, pero no cuando se agrega ATP. Explique este resultado tomando como base el mecanismo de unión de la BiP a las proteínas sustrato.

8. Describa cómo podría usar DNA recombinante para fabricar una cepa de *Yersinia* que sea capaz de insertar una proteína de interés en el citosol de células macrofágicas de mamífero.

9. Describa lo que le pasaría al precursor de una proteína de matriz mitocondrial en los siguientes tipos de mutaciones mitocondriales: a) una mutación en el receptor de señal Tom22; b) una mutación en el receptor de señal Tom70; c) una mutación en la Hsc70 de la matriz y d) una mutación en la peptidasa de señal de la matriz.

10. Describa las similitudes y diferencias entre el mecanismo de entrada a la matriz mitocondrial y a la estroma del cloroplasto.

11. Diseñe un grupo de experimentos usando una proteína quimérica compuesta por una proteína precursora mitocondrial fusionada con dihidrofolato reductasa (DHFR), que pueda usarse para determinar la longitud de la proteína precursora que debe protruir dentro de la matriz mitocondrial para que la secuencia de direccionamiento a la matriz sea eliminada por la proteasa de la matriz (véase fig. 16-27).

12. El direccionamiento de las proteínas a las mitocondrias y cloroplastos involucra el envío de proteínas a varios sitios dentro de los respectivos orgánulos. Enumere brevemente estos sitios. Tomando la mitocondria como ejemplo y las proteínas antiportadoras de ADP/ATP y el citocromo b_2 como casos específicos, compare hasta qué punto se utiliza un mecanismo común para el direccionamiento específico de estas dos proteínas.

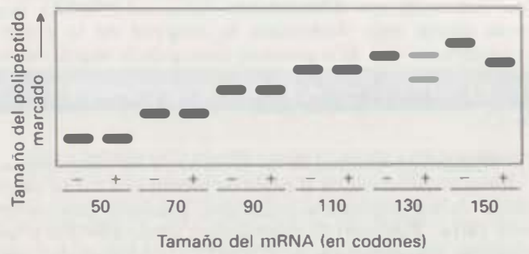
13. Suponga que ha identificado una nueva línea de células mutantes que carece de peroxisomas funcionales. Describa cómo podría determinar experimentalmente si la mutante es defectuosa fundamentalmente para la inserción/ensamblaje de proteínas de membrana o de proteínas de la matriz peroxisomal.

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Imagine que usted está evaluando los primeros pasos de la translocación y procesado de la proteína secretoria prolactina. Usando un enfoque experimental similar al de la figura 16-7, usted puede usar mRNA de prolactina truncados para controlar la longitud del polipéptido de prolactina naciente que se sintetiza. Cuando un mRNA para prolactina que carece de un codón de terminación de cadena *(stop)* se traduce in vitro, el polipéptido recién sintetizado que termina con el último codón incluido en el mRNA permanecerá unido al ribosoma, lo que permite que un polipéptido de una longitud definida se extienda desde el ribosoma. Usted ha generado un grupo de mRNA que codifican segmentos del N-terminal de la prolactina de longitud cada vez mayor y cada mRNA puede traducirse in vitro mediante un extracto citosólico de traducción que contiene ribosomas, tRNA, sintetasas de aminoacil-tRNA, GTP y factores de iniciación de la traducción y de elongación. Cuando se agregan aminoácidos marcados radiactivamente en la mezcla de traducción sólo se marcará el polipéptido codificado por el

mRNA agregado. Después de terminada la traducción, cada mezcla de reacción se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y los polipéptidos marcados se identificaron por autorradiografía.

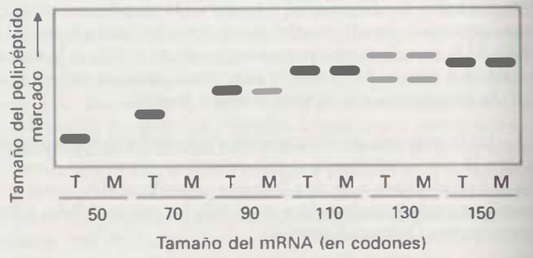
a. La autorradiografía representada más abajo muestra los resultados de un experimento en el que cada reacción de traducción se llevó a cabo en presencia (+) o ausencia (-) de membranas microsómicas. De acuerdo con la movilidad en el gel del péptido sintetizado en presencia o ausencia de microsomas deduzca cuán larga debe ser la cadena naciente de prolactina para que el péptido de señalización de la prolactina ingrese en la luz del RE y sea cortado por la peptidasa de señal. (Note que los microsomas tienen cantidades importantes de SRP unidas débilmente a las membranas.)



b. En vista de esta longitud, ¿qué puede concluir acerca del estado de conformación del polipéptido de prolactina naciente cuando es cortado por la peptidasa de señal? Las longitudes siguientes serán útiles para sus cálculos: la secuencia de señalización de la prolactina es cortada después del aminoácido 31; el canal dentro del ribosoma ocupado por un polipéptido naciente tiene aproximadamente 150 Å; una membrana bicapa tiene aproximadamente 50 Å de espesor; en los polipéptidos con una estructura de hélice α, un residuo se extiende 1,5 Å, en tanto que en los polipéptidos totalmente desplegados un residuo se extiende aproximadamente 3,5 Å.

c. El experimento descrito en la parte a) se lleva a cabo de una manera idéntica, sólo que no hay membranas microsómicas presentes durante la traducción sino que se agregan después que ésta termina. En este caso ninguna de las muestras exhibe una diferencia de movilidad en presencia o ausencia de microsomas. ¿Qué puede concluir acerca de si la prolactina puede o no ser translocada a los microsomas aislados después de la traducción?

d. En otro experimento, todas las reacciones de traducción se llevaron a cabo en presencia de microsomas y luego las membranas microsómicas y los ribosomas unidos a ellas se separaron de los ribosomas libres y de las proteínas solubles por centrifugación. Para cada reacción de traducción se analizaron la reacción total (T) y la fracción de membrana (M) en corridas vecinas en el gel. De acuerdo con las cantidades de polipéptido marcado en la fracción de membrana vistas en la autorradiografía siguiente deduzca cuán larga debe ser la cadena naciente de prolactina para que los ribosomas comprometidos en la traducción capten la SRP y puedan unirse así a las membranas de los microsomas.



BIBLIOGRAFÍA

Translocación de proteínas secretorias a través de la membrana del RE

Dalbey, R. E., and G. Von Heijne. 1992. Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes: a new protease family. Trends Biochem. Sci. 17:474-478.

Johnson, A. E., and M. A. van Waes. 1999. The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. Ann. Rev. Cell Devel. Biol. 15:799-842.

Keenan, R. J., D. M. Freymann, R. M. Stroud, and P. Walter. 2001. The signal recognition particle. Ann. Rev. Biochem. 70:755-775.

Menetret, J. F., A. Neuhof, D. G. Morgan, K. Plath, M. Radermacher, T. A. Rapoport, and C. W. Akey. 2000. The structure of ribosome-channel complexes engaged in protein translocation. Mol. Cell 6:1219-1232.

Rapoport, T. A., K. E. Matlack, K. Plath, B. Misselwitz, and O. Staeck. 1999. Post-translational protein translocation across membrane of the endoplasmic reticulum. Biol. Chem. 380:1143-1150.

Inserción de proteínas en la membrana del RE

Englund, P. T. 1993. The structure and biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol protein anchors. Ann. Rev. Biochem. 62:121-138.

Goder, V., and M. Spiess. 2001. Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics. FEBS Lett. 504:87-93.

Mothes, W., et al. 1997. Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. Cell 89:523-533.

von Heijne, G. 1999. Recent advances in the understanding of membrane protein assembly and structure. Q. Rev. Biophys. 32:285-307.

Modificaciones, plegado y control de calidad de las proteínas en el RE

Bertolotti, A., Y. Zhang, L. M. Hendershot, H. P. Harding, and D. Ron. 2000. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. Nature Cell Biol. 2:326-332.

Ellgaard, L., M. Molinari, and A. Helenius. 1999. Setting the standards: quality control in the secretory pathway. Science 286:1882-1888.

Helenius, A., and M. Aebi. 2001. Intracellular functions of N-linked glycans. Science 291:2364-2369.

Kornfeld, R., and S. Kornfeld. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Ann. Rev. Biochem. 45:631-664.

Parodi, A. J. 2000. Protein glucosylation and its role in protein folding. Ann. Rev. Biochem. 69:69-93.

Patil, C., and P. Walter. 2001. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. Curr. Opin. Cell Biol. 13:349-355.

Plemper, R. K., and D. H. Wolf. 1999. Retrograde protein translocation: eradication of secretory proteins in health and disease. Trends Biochem. Sci. 24:266-270.

Sevier, C. S., and C. A. Kaiser. 2002. Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 3:836-847.

Silberstein, S., and R. Gilmore. 1996. Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. FASEB J. 10:849-858.

Tsai, B., Y. Ye, and T. A. Rapoport. 2002. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 3:246-255.

Salida de proteínas bacterianas

Danese, P. N., and T. J. Silhavy. 1998. Targeting and assembly of periplasmic and outer-membrane proteins in *Escherichia coli*. Ann. Rev. Genet. 32:59-94.

Galan, J. E. 2001. Salmonella interactions with host cells: type III secretion at work. Ann. Rev. Cell Devel. Biol. 17:53-86.

Thanassi, D. G., and S. J. Hultgren. 2000. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. Curr. Opin. Cell Biol. 12:420-430.

Wickner, W., and M. R. Leonard. 1996. *Escherichia coli* preprotein translocase. J. Biol. Chem. 271:29514-29516.

Direccionamiento de proteínas a mitocondrias y cloroplastos

Chen, K., X. Chen, and D. J. Schnell. 2000. Mechanism of protein import across the chloroplast envelope. Biochem. Soc. Trans. 28:485-491.

Dalbey, R. E., and A. Kuhn. 2000. Evolutionarily related insertion pathways of bacterial, mitochondrial, and thylakoid membrane proteins. Ann. Rev. Cell Devel. Biol. 16:51-87.

Matouschek, A., N. Pfanner, and W. Voos. 2000. Protein unfolding by mitochondria: the Hsp70 import motor. EMBO Rept. 1:404-410.

Neupert, W., and M. Brunner. 2002. The protein import motor of mitochondria. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 3:555-565.

Pfanner, N., and A. Geissler. 2001. Versatility of rhe mitochondrial protein import machinery. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2:339-349.

Robinson, C., and A. Bolhuis. 2001. Protein targeting by the twin-arginine translocation pathway. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2:350-356.

Direccionamiento de las proteínas peroxisómicas

Dammai, V., and S. Subramani. 2001. The human peroxisomal targeting signal receptor, Pex5p, is translocated into the peroxisomal matrix and recycled to the cytosol. Cell 105:187-196.

Gould, S. J., and C. S. Collins. 2002. Opinion: peroxisomal-protein import: is it really that complex? Nature Rev. Mol. Cell Biol. 3:382-389.

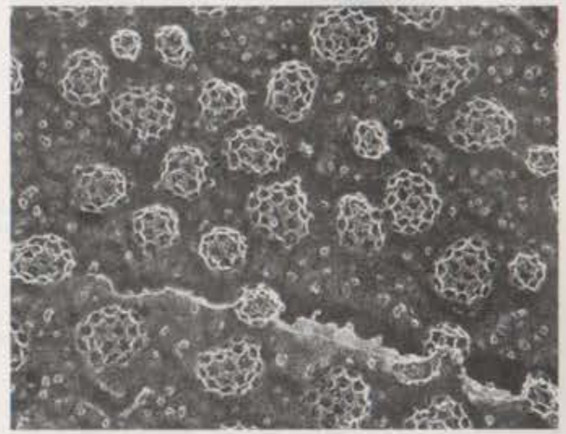
Gould, S. J., and D. Valle. 2000. Peroxisome biogenesis disorders: genetics and cell biology. Trends Genet. 16:340-345.

Purdue, P. E., and P. B. Lazarow. 2001. Peroxisome biogenesis. Ann. Rev Cell Devel. Biol. 17:701-752.

Subramani, S., A. Koller, and W. B. Snyder. 2000. Import of peroxisomal matrix and membrane proteins. Ann. Rev. Biochem. 69:399-418.

17

TRÁNSITO VESICULAR, SECRECIÓN Y ENDOCITOSIS



Microfotografía electrónica de "jaulas" de clatrina, como las que rodean las vesículas de transporte con cubierta de clatrina, formadas mediante la polimerización in vitro de cadenas livianas y pesadas. (John Heuser, Washington University School of Medicine.)

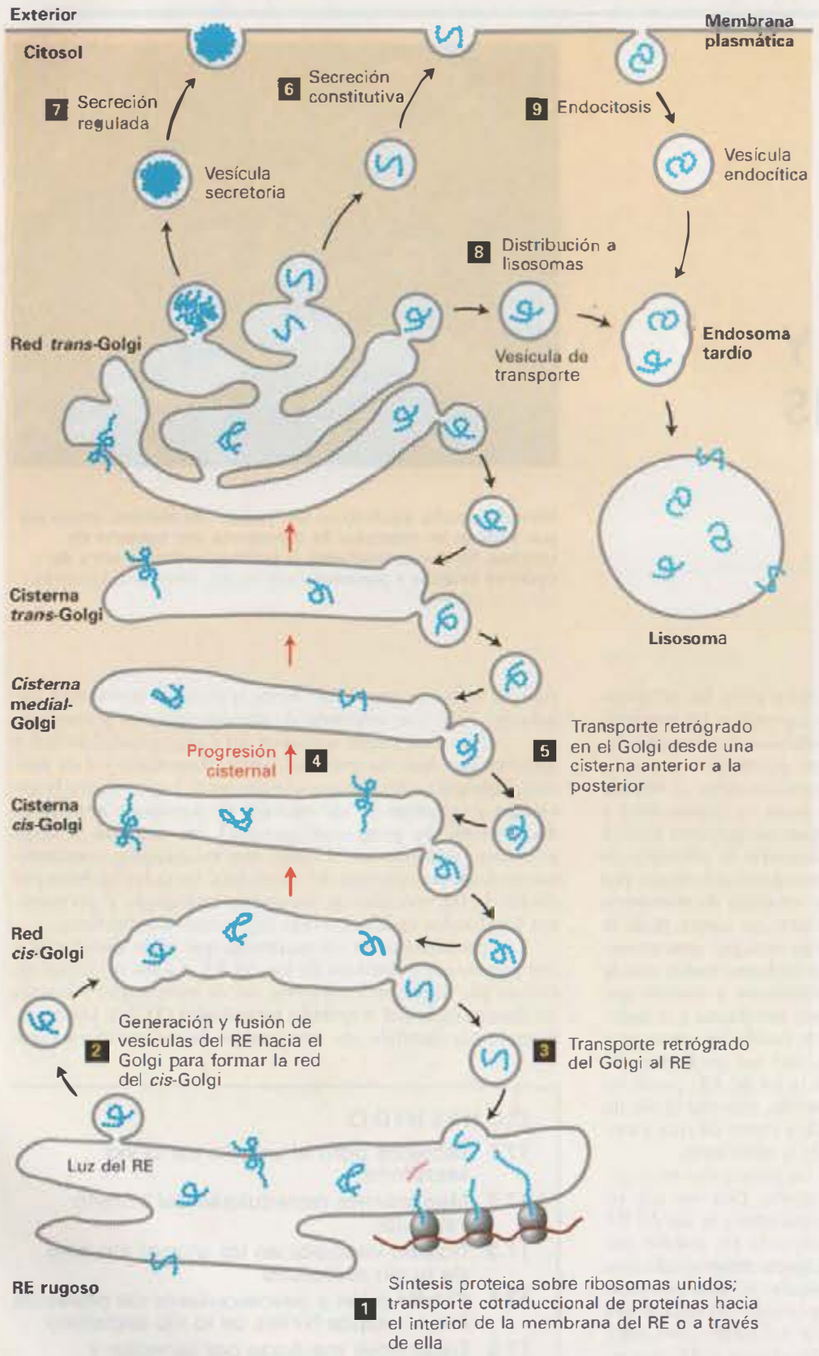
En los capítulos anteriores exploramos cómo las proteínas son seleccionadas y translocadas a través de las membranas de distintos orgánulos intracelulares. Aquí centramos nuestra atención en los mecanismos que permiten a las proteínas solubles y a las de membrana sintetizadas sobre el retículo endoplasmático (RE) rugoso moverse hacia su destino final a través de la vía secretoria. Un único principio gobierna todo el tránsito de proteínas en esa vía: el transporte de proteínas de membrana y solubles desde un compartimiento delimitado por membrana hasta otro es mediado por vesículas de transporte que recogen las *proteínas "carga"* en brotes que surgen desde la membrana de un compartimiento y luego entregan estas proteínas carga al próximo compartimiento mediante fusión con la membrana del compartimiento. Notablemente, a medida que las vesículas de transporte brotan de una membrana y se fusionan con la siguiente, la misma cara de la membrana permanece orientada hacia el citosol. Por lo tanto, una vez que la proteína ha sido insertada en la membrana o en la luz del RE, puede ser transportada a lo largo de la vía secretoria, moverse desde un orgánulo al siguiente sin ser translocada a través de otra membrana o alterar su orientación dentro de la membrana.

En la figura 17-1 se esquematizan las principales rutas para el tránsito proteico de la vía secretoria. Una vez que las proteínas recién sintetizadas son incorporadas a la luz del RE o a la membrana como se vio en el capítulo 16, pueden empaquetarse dentro de vesículas de transporte *anterógrado* (que se mueven hacia adelante). Estas vesículas se fusionan entre sí para formar un compartimiento aplanado delimitado por membrana conocido como cisterna *cis* del Golgi (*cis*-Golgi). Ciertas proteínas, sobre todo las localizadas en el RE, son recuperadas del *cis*-Golgi y enviadas al RE a través de un conjunto diferente de vesículas de transporte *retrógrado* (que se mueven hacia atrás). Una nueva cisterna *cis* del Golgi con su cargamento de proteínas se mueve físicamente desde la posición *cis* (más cercana al RE) hasta la posición *trans* (más alejada del RE), y se convierte de manera sucesiva primero en una cisterna *intermedia* o *medial* del Golgi (*medial*-Golgi) y luego en una cisterna *trans* del Golgi (*trans*-Golgi). Este proceso, conocido como progresión cisternal, no involucra la gemación y la fusión de las vesículas de transporte anterógrado. Durante la progresión cisternal, las enzimas y otras proteínas residentes en el Golgi son recuperadas constantemente desde las cisternas del Golgi final hacia las iniciales por medio de las vesículas de transporte retrógrado y permanecen localizadas en las cisternas *cis*, *medial* o *trans*-Golgi.

Las proteínas en la vía secretoria que están destinadas a compartimientos distintos de los del RE o a los del Golgi alcanzan por último una compleja red de membranas y vesículas denominada red o retículo *trans*-Golgi (TGN). Desde este punto de ramificación principal en la vía secretoria, una

CONTENIDO

17.1 Técnicas para el estudio de la vía secretoria
17.2 Mecanismos moleculares del tránsito vesicular
17.3 Tránsito vesicular en las etapas iniciales de la vía secretoria
17.4 Clasificación y procesamiento de proteínas en las etapas finales de la vía secretoria
17.5 Endocitosis mediada por receptor y clasificación de las proteínas internalizadas
17.6 Formación y función de las vesículas sinápticas



◀ Fig. 17-1. Visión general de las vías secretoria y endocítica de la distribución de proteínas. *Vía secretoria:* La síntesis de proteínas portadoras de una secuencia indicadora para el RE se completa sobre el RE rugoso (1) y las cadenas polipeptídicas recién sintetizadas se insertan en la membrana del RE o la atraviesan hacia la luz (cap. 16). Algunas proteínas (p. ej., las enzimas del RE o las proteínas estructurales) permanecen dentro del RE. Las restantes son envueltas dentro de vesículas de transporte (2) que brotan desde el RE y se fusionan juntas para formar nuevas cisternas *cis*-Golgi. Las proteínas mal distribuidas residentes en el RE y las proteínas de la membrana vesicular que necesitan ser reutilizadas son recuperadas hacia el RE mediante vesículas (3) que brotan desde la red *cis* del Golgi y se fusionan con el RE. Cada cisterna de la red *cis* del Golgi, con su contenido proteico, se mueve físicamente desde la cara *cis* a la cara *trans* del complejo de Golgi (4) mediante un proceso no vesicular denominado progresión cisternal. El transporte retrógrado de vesículas (5) mueve proteínas propias del Golgi hacia el compartimiento apropiado del Golgi. En todas las células, ciertas proteínas solubles se mueven hacia la superficie celular en vesículas de transporte (6) y son secretadas continuamente (secreción constitutiva). En ciertos tipos celulares, algunas proteínas solubles se almacenan en vesículas secretorias (7) y se liberan sólo después de que la célula recibe una señal nerviosa u hormonal apropiada (secreción regulada). Las proteínas solubles y de membrana destinadas a los lisosomas que son transportadas en vesículas que brotan desde la red *trans*-Golgi (8) primero se mueven hasta los endosomas tardíos y luego hacia los lisosomas.
Vía endocítica: Las proteínas extracelulares solubles y de membrana incorporadas en vesículas que brotan desde la membrana plasmática (9) también pueden moverse hacia los lisosomas a través de los endosomas.

proteína puede ser cargada a una de, al menos, tres clases diferentes de vesículas. Luego de brotar de la red *trans*-Golgi, el primer tipo de vesícula inmediatamente se mueve hacia la membrana plasmática, se fusiona con ella y libera sus contenidos por exocitosis. En todos los tipos celulares, al menos algunas proteínas son cargadas dentro de esas vesículas y secretadas continuamente de esta manera. Los ejemplos de proteínas liberadas por esa secreción constitutiva (o continua) incluyen el colágeno por los fibroblastos, las proteínas del suero por los hepatocitos y los anticuerpos por los linfocitos B activados. El segundo tipo de vesículas que brotan de la red *trans*-Golgi, conocidas como **vesículas secretorias**, se almacenan dentro de la célula hasta que una señal para la exocitosis provoca la liberación de su contenido al llegar a la membrana plasmática. Entre las proteínas liberadas por esa secreción regulada están las hormonas peptídicas (p. ej., insulina, glucagón, ACTH) de diversas células endocrinas, los precursores de enzimas digestivas de células acinares pancreáticas, las proteínas de la leche de la glándula mamaria y los neurotransmisores de las neuronas.

El tercer tipo de vesículas que brotan de la red *trans*-Golgi se dirige a los lisosomas, orgánulos responsables de la degradación intracelular de macromoléculas y a orgánulos de almacenamiento similares a lisosomas en ciertas células. Las proteínas secretorias destinadas para los lisosomas primero son transportadas por vesículas desde la red *trans*-Golgi a un compartimiento llamado **endosoma tardío**; las proteínas luego se transfieren al lisosoma mediante un mecanismo que no es bien comprendido, pero que puede involucrar la fusión directa del endosoma con la membrana lisosómica. Las proteínas solubles entregadas mediante esta vía incluyen las enzimas lisosómicas digestivas (p. ej., las proteasas, las glucosidasas y las fosfatasas) y las proteínas de membrana (p. ej., las bombas de protones de clase V) que bombean H^+ desde el citosol hacia la luz ácida del endosoma y el lisosoma. Como veremos, algunos de los eventos específicos del procesamiento y clasificación de las proteínas que tienen lugar dentro de estos orgánulos dependen de su bajo pH luminal.

El endosoma también participa en la *vía endocítica* en la cual las vesículas brotan desde la membrana plasmática trayendo proteínas de membrana y sus **ligandos** unidos hacia el interior de la célula (véase fig. 17-1). Luego de ser internalizadas por endocitosis, algunas proteínas son transportadas a los lisosomas, mientras que otras son recicladas y vuelven a la superficie celular. La endocitosis es un modo en que las células incorporan nutrientes que se encuentran en forma macromolecular; por ejemplo, el colesterol en forma de partículas lipoproteicas y el hierro en forma de complejos con la proteína sérica transferrina. La endocitosis también puede funcionar como un mecanismo regulador para disminuir la actividad señalizadora mediante la extracción, desde la superficie celular, de los receptores para una molécula señalizadora en particular.

17.1 Técnicas para el estudio de la vía secretoria

La clave para entender cómo se transportan las proteínas a través de los orgánulos de la vía secretoria ha sido desarrollar una descripción básica de la función de las vesículas de transporte. Muchos componentes necesarios para la formación y fusión de las vesículas de transporte fueron identificados en la década pasada por una convergencia notable de los enfoques bioquímicos y genéticos descritos en esta sección. Todos los estudios del tránsito intracelular emplean algún método para ensayar el transporte de una proteína dada desde un compartimiento a otro. Comenzamos describiendo cómo puede seguirse el transporte intracelular de proteínas en las células vivas y luego consideraremos los sistemas genéticos y los sistemas in vitro que probaron ser útiles para el esclarecimiento de la vía secretoria.

El transporte de proteínas a través de la vía secretoria puede estudiarse en las células vivas

Los estudios clásicos de G. Palade y sus colegas en la década de 1960 establecieron por primera vez el orden en el cual las proteínas se mueven de un orgánulo a otro en la vía secretoria. Estos estudios iniciales también mostraron que las proteínas secretorias nunca fueron liberadas al citosol, primer indicio de que las proteínas transportadas están asociadas con algún tipo de intermediario delimitado por membrana. En estos experimentos, que combinaron pulsos de marcación y seguimiento (fig. 3-36) y autorradiografía, los aminoácidos marcados radiactivamente se inyectaron en el páncreas de un hámster. En diferentes momentos posteriores a la inyección, se sacrificaron los animales y las células pancreáticas se fijaron químicamente, se seccionaron y se sometieron a autorradiografía, para visualizar la localización de las proteínas radiomarcadas. Debido a que los aminoácidos radiactivos se administraron en un pulso corto, sólo se marcaron las proteínas sintetizadas inmediatamente después de la inyección, que formaron un grupo distinguible, o "cohorte", de proteínas marcadas cuyo transporte pudo seguirse. Además, como las células pancreáticas son células dedicadas a la secreción, casi todos los aminoácidos marcados en estas células se incorporaron a proteínas secretorias, lo que facilitó la observación de las proteínas transportadas.

Aunque la autorradiografía se emplea hoy rara vez para localizar proteínas dentro de las células, estos experimentos ilustran los dos requerimientos básicos para cualquier análisis de transporte intercompartimental. Primero, es necesario marcar un conjunto de proteínas en un compartimiento preliminar de manera que su transferencia posterior a otros compartimientos pueda seguirse en el tiempo. Segundo, es necesario tener una forma de identificar el compartimiento en el cual reside una proteína marcada. Aquí describimos dos procedimientos experimentales modernos para observar el tránsito intracelular de una proteína secretoria en casi cualquier tipo de célula.

En ambos procedimientos, un gen que codifica una abundante glucoproteína de membrana (proteína G) del virus de la estomatitis vesicular (VSV) es introducido en las células de mamíferos cultivadas, ya sea mediante **transfección** o simplemente infectando las células con el virus. Las células tratadas, aun las que no están especializadas para la secreción, sintetizan rápidamente la proteína G del VSV sobre el RE como las proteínas secretorias celulares normales. El uso de un mutante que codifica una proteína G del VSV sensible a la temperatura permite a los investigadores activar y desactivar el transporte proteico ulterior. A la temperatura restrictiva de 40 °C, la proteína G del VSV recién sintetizada se pliega mal y, por ende, es retenida dentro del RE mediante los mecanismos de control de calidad tratados en el capítulo 16, mien-

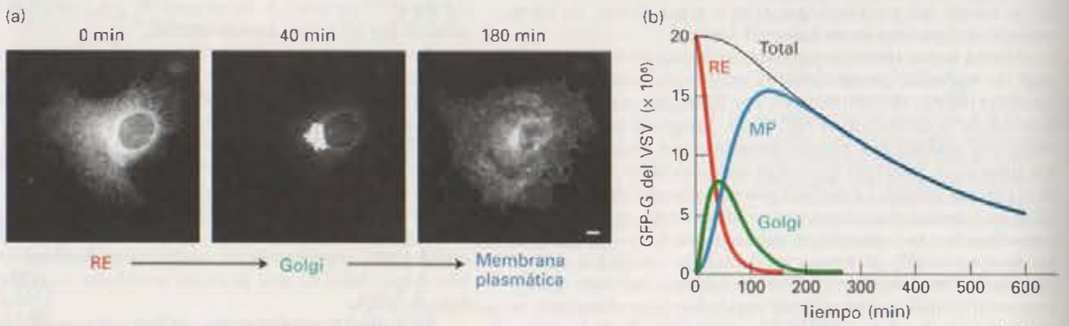
tras que a la temperatura permisiva de 32 °C, la proteína acumulada se pliega correctamente y se transporta a través de la vía secretoria hasta la superficie celular. Este astuto empleo de una mutación sensible a la temperatura define una "cohorte" de proteínas cuyo transporte posterior puede seguirse.

En dos variaciones de este procedimiento básico, el transporte de la proteína G del VSV es monitorizado mediante diferentes técnicas. Los estudios que emplean estos dos modernos análisis de tránsito y los experimentos iniciales de Palade llegaron a la misma conclusión: en las células de los mamíferos, el transporte mediado por vesículas de una molécula proteica desde su sitio de síntesis sobre el RE rugoso hasta su arribo a la membrana plasmática lleva de 30 a 60 minutos.

Microscopia de la proteína G del VSV marcada con GFP. Un método para observar el transporte de la proteína G del VSV emplea un gen híbrido en el cual el gen viral está fusionado al gen que codifica la *proteína fluorescente verde (GFP)*, una proteína naturalmente fluorescente (cap. 5). El gen híbrido es transfectado a células cultivadas mediante técnicas descritas en el capítulo 9. Cuando las células que expresan la forma sensible a la temperatura de la proteína híbrida (GFP-G del VSV) se cultivan a la temperatura restrictiva, la GFP-G del VSV se acumula en el RE, que aparece como una red de encaje de membranas cuando las células se observan con un microscopio fluorescente. Cuando las células luego se cambian a una temperatura permisiva, se puede ver la proteína híbrida GFP-G del VSV moverse primero a las membranas del aparato de Golgi, que están densamente concentradas en el borde del núcleo y luego a la superficie celular (fig. 17-2a). Analizando la distribución de la proteína GFP-G del VSV en momentos diferentes después de cambiar las células a la temperatura permisiva, los investigadores determinaron cuánto tiempo reside la proteína GFP-G del VSV en cada orgánulo de la vía secretoria (fig. 17-2b).

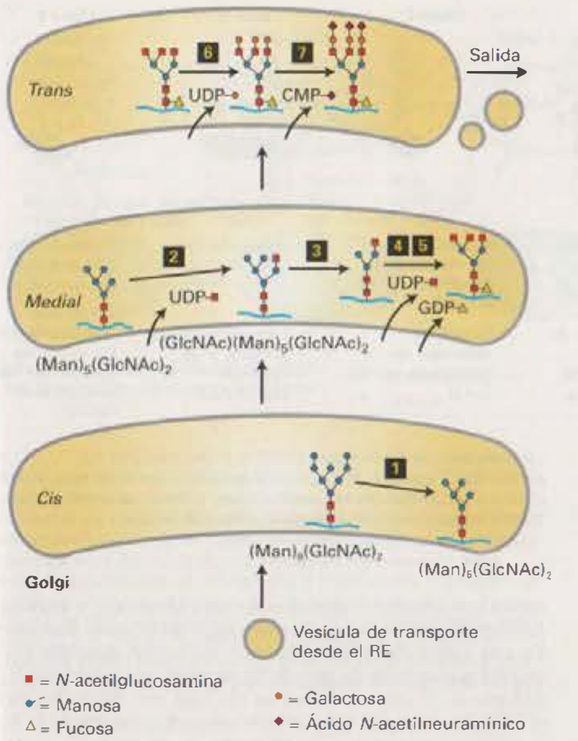
Detección de las modificaciones de oligosacáridos específicos de compartimiento. Una segunda forma de seguir el transporte de proteínas secretorias aprovecha las modificaciones de sus cadenas laterales de carbohidratos que tienen lugar en diferentes etapas de la vía secretoria. Para entender esta técnica, hay que recordar que muchas proteínas secretorias que abandonan el RE contienen una o más copias del **oligosacárido N-ligado** (o *N*-oligosacárido) $Man_8(GlcNAc)_2$, que se sintetizan y se unen a las proteínas secretorias en el RE (véase fig. 16-18). A medida que una proteína se mueve a través del complejo de Golgi, diferentes enzimas localizadas en las cisternas *cis-*, intermedia *o medial-*, y *trans*-Golgi catalizan una serie ordenada de reacciones sobre esas cadenas centrales de $Man_8(GlcNAc)_2$. Por ejemplo, las glucosidasas que residen específicamente en el compartimiento *cis*-Golgi recortan residuos de manosa que se encuentran fuera del núcleo de oligosacáridos para producir una forma "recortada" de $Man_5(GlcNAc)_2$ (fig. 17-3, reacción 1). Los científicos pueden emplear una enzima de corte de carbohidratos especializada conocida como endoglucosidasa D para distinguir las proteínas glucosiladas que permanecen en el RE de las que entraron en el *cis*-Golgi: los oligosacáridos recortados específicos del *cis*-Golgi son escindidos de las proteínas mediante la endoglucosidasa D, mientras que el núcleo de cadenas de oligosacáridos (no recortadas) sobre las proteínas secretorias dentro del RE son resistentes al corte por esta enzima. Una proteína desglucosilada producida mediante digestión con endoglucosidasa D puede distinguirse con rapidez debido a que se mueve más velozmente que la proteína glucosilada correspondiente, sobre un gel en SDS.

Este tipo de ensayo puede emplearse para rastrear el movimiento de la proteína G del VSV marcada con pulsos de aminoácidos radiactivos en las células infectadas por el virus. Inmediatamente después de su marcación, toda la proteína G del VSV marcada extraída aún está en el RE y es resistente a la digestión por la endoglucosidasa D, pero con el tiempo una fracción creciente de la glucoproteína se vuelve sensible a la digestión (fig. 17-4). Esta conversión de la proteína G del VSV de una forma resistente a una forma sensible a la endoglucosidasa D corresponde al transporte vesicular de la proteína desde el RE al *cis*-Golgi. Nótese que el transporte de la proteína G del VSV desde el RE al Golgi toma alrededor de 30 minutos, medido tanto mediante la técnica basada en el procesamiento de oligosacáridos, como mediante microscopia de fluorescencia de la proteína GFP-G del VSV.

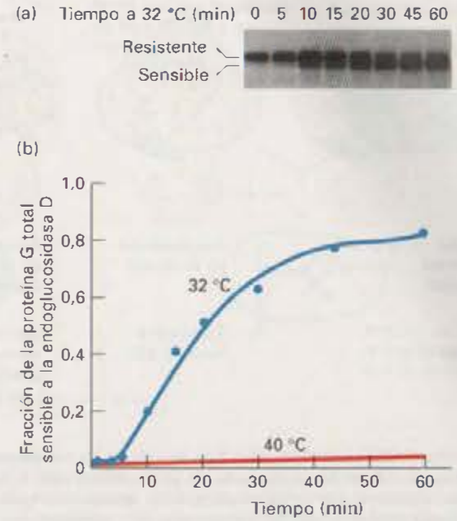


▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 17-2 El transporte de proteínas a través de la vía secretoria puede visualizarse mediante microscopia de fluorescencia en células que están produciendo una proteína de membrana marcada con GFP.** Las células cultivadas fueron transfectadas con un gen híbrido que codifica una glucoproteína viral de membrana, la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (G del VSV), unida al gen de la proteína verde fluorescente (GFP). Una versión mutante del gen viral se utilizó de manera tal que la proteína híbrida recién sintetizada (GFP-G del VSV) sea retenida en el retículo endoplasmático (RE) a 40 °C, pero se libere para el transporte a 32 °C. (a) Microfotografías fluorescentes de las células inmediatamente antes y en dos momentos después de ser llevadas a la temperatura inferior. El movimiento de la GFP-G del VSV desde el RE al Golgi y finalmente hacia la superficie celular tuvo lugar dentro de los 180 minutos. (b) Gráfico de los niveles de GFP-G del VSV en el RE, el Golgi y la membrana plasmática (MP) en diferentes momentos después del cambio a la temperatura menor. La cinética del transporte desde un orgánulo al siguiente puede reconstruirse a partir de los análisis por computadora de estos datos. El descenso en la fluorescencia total producido más adelante probablemente sea el resultado de la lenta inactivación de la fluorescencia de la GFP. (De Jennifer Lippincott-Schwarz y Koret Hirschberg, Metabolism Branch, National Institute of Child Health and Human Development.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Transporte de GFP-G del VSV a través de la vía secretoria



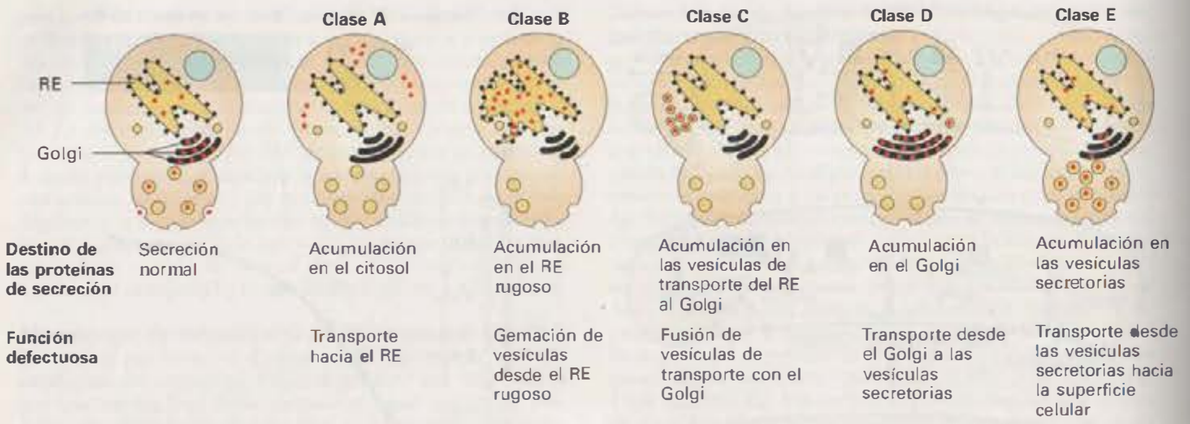
▲ **Fig. 17-3. Procesamiento de las cadenas de oligosacáridos *N*-ligados sobre glucoproteínas dentro de las cisternas *cis*, medial y *trans*-Golgi de células de vertebrados.** Las enzimas que catalizan cada paso están localizadas en los compartimientos indicados. Después de la eliminación de los tres residuos de manosa en el *cis*-Golgi (paso 1), la proteína se mueve mediante progresión cisternal al *medial*-Golgi. Aquí, se añaden tres residuos de GlcNAc (pasos 2 y 4), se eliminan otros dos residuos de manosa (paso 3) y se añade una única fucosa (paso 5). El procesamiento se completa en el *trans*-Golgi con la adición de tres residuos de galactosa (paso 6) y por último la unión de un residuo de *N*-acetilneuramínico a cada uno de los residuos de galactosa (paso 7). Enzimas transferasas específicas añaden azúcares a los oligosacáridos, uno a la vez, a partir de precursores de nucleótidos-azúcar transportados desde el citosol. Esta vía representa los eventos del procesamiento de una glucoproteína típica en el Golgi de mamífero. Las variaciones en la estructura de los oligosacáridos *N*-ligados pueden resultar de las diferencias en los pasos de procesamiento en el Golgi. (Véase R. Kornfeld y S. Kornfeld, 1985, *Ann. Rev. Biochem.* 45:631.)



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 17-4 El transporte de una glucoproteína de membrana desde el RE hacia el Golgi puede ser analizado sobre la base de su sensibilidad al corte por la endoglucosidasa D.** Células que expresan la proteína G del VSV sensible a la temperatura se marcaron con un pulso de aminoácidos radiactivos a la temperatura no permisiva de manera que la proteína marcada fue retenida en el RE. A tiempos periódicos después de un retorno a la temperatura permisiva de 32 °C, la G del VSV fue extraída de las células y digerida con endoglucosidasa D, que corta las cadenas de oligosacáridos de proteínas procesadas en el *cis*-Golgi, pero no de proteínas procesadas en el RE. (a) La electroforesis en gel SDS de las mezclas de digestión separa la forma resistente, no cortada (migración más lenta) de la sensible, cortada (migración más veloz) de la G del VSV marcada. Como muestra esta corrida electroforética, inicialmente toda la G del VSV era resistente a la digestión, pero con el tiempo una fracción creciente se hace sensible a la digestión, reflejando la proteína transportada desde el RE hacia el Golgi y procesada allí. En las células control mantenidas a 40° C, luego de 60 minutos sólo se detectó la proteína G del VSV resistente a la digestión, de baja movilidad (no mostrada). (b) El gráfico de la proporción de G del VSV sensible a la digestión, derivada a partir de datos electroforéticos, revela el curso temporal del transporte del RE →Golgi. (De C. J. Beckers et al., 1987, *Cell* 50:523.)

Los mutantes de las levaduras definen las etapas principales y muchos componentes del transporte vesicular

La organización general de la vía secretoria y muchos de los componentes moleculares necesarios para el tránsito de vesículas son similares en todas las células eucariontes. Debido a esta conservación, los estudios genéticos con levaduras han sido útiles para confirmar la secuencia de pasos en la vía secretoria e identificar muchas de las proteínas que participan en el tránsito vesicular. Aunque las levaduras secretan pocas proteínas al medio de crecimiento, continuamente secretan un número de enzimas que permanecen localizadas en el estrecho espacio entre la membrana plasmática y la pared ce-



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 17-5 Los fenotipos de levaduras mutantes *sec* identificaron etapas de la vía secretoria. Estos mutantes sensibles a la temperatura pueden agruparse en cinco clases según el sitio en donde se acumulan las proteínas de secreción recién sintetizadas (puntos rojos) cuando las células se cambian de la temperatura permisiva a una más alta no permisiva. El análisis de los mutantes dobles permitió determinar el orden secuencial de los pasos. (Véase P. Novick et al., 1981. *Cell* 25:461, y C. A. Kaiser y R. Schekman, 1990, *Cell* 61:723.)

lular. La mejor estudiada de éstas, la invertasa, hidroliza el disacárido sacarosa a glucosa y fructosa.

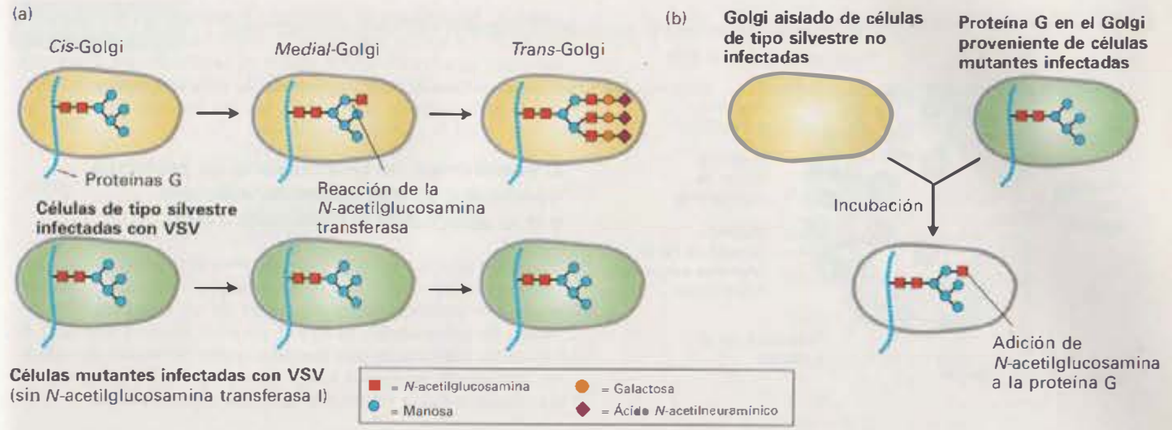
Inicialmente se identificó un gran número de mutantes de las levaduras sobre la base de su capacidad para secretar proteínas a una temperatura y la incapacidad para hacerlo a temperaturas no permisivas. Cuando estos *mutantes de secreción (sec)* sensibles a la temperatura se transfieren desde la temperatura más baja a la más alta, acumulan proteínas secretadas en el punto de la vía bloqueada por la mutación. Los análisis de esos mutantes permitieron identificar cinco clases (A-E) caracterizadas por la acumulación de proteínas en el citosol, en el RE rugoso, en vesículas pequeñas que transportan proteínas del RE al complejo de Golgi, en las cisternas del Golgi o en vesículas secretorias constitutivas (fig. 17-5). La caracterización ulterior de los mutantes *sec* en las diversas clases ayudó a dilucidar los componentes fundamentales y los mecanismos moleculares del tránsito de vesículas que analizaremos en secciones posteriores.

Para determinar el orden de los pasos en la vía, los investigadores analizaron mutantes *sec* dobles. Por ejemplo, cuando las células de las levaduras contienen mutaciones en ambas funciones de clase B y D, las proteínas se acumulan en el RE rugoso, no en las cisternas del Golgi. Puesto que las proteínas se acumulan en el primero de los pasos bloqueados que se presenta, este hallazgo muestra que las mutaciones de clase B deben actuar en un punto anterior en la vía secretoria al de las mutaciones de clase D. Estos estudios confirmaron que a medida que una proteína secretada se sintetiza y se procesa se mueve secuencialmente desde el citosol → RE rugoso → vesículas de transporte del RE al Golgi → cisternas del Golgi → vesículas secretorias, las que finalmente sufren exocitosis.

Los ensayos de transporte en sistemas libres de células permiten la disección de los pasos individuales del transporte vesicular

Los ensayos in vitro para el transporte intercompartimental son formas de abordaje complementarias usadas en los estudios con levaduras mutantes *sec* para identificar y analizar los componentes celulares responsables del tránsito vesicular. En una aplicación de este abordaje, las células mutantes cultivadas que carecen de una de las enzimas que modifican las cadenas de *N*-oligosacáridos en el Golgi son infectadas con el VSV. Por ejemplo, si las células infectadas carecen de la *N*-acetilglucosamina transferasa I producen abundantes cantidades de proteína G del VSV, pero no puede añadir residuos de *N*-acetilglucosamina a las cadenas de oligosacáridos en el *medial*-Golgi como lo hacen las células de tipo silvestre (fig. 17-6a). Cuando las membranas del Golgi aisladas de esas células mutantes se mezclan con las membranas del Golgi de células de tipo silvestre no infectadas, se restablece la adición de *N*-acetilglucosamina a la proteína G del VSV (fig. 17-6b). Esta modificación es consecuencia del transporte vesicular retrógrado de la *N*-acetilglucosamina transferasa I desde el *medial*-Golgi de tipo silvestre al compartimiento *cis*-Golgi de células mutantes infectadas con el virus. El transporte intercompartimental exitoso en este sistema libre de células depende de los requerimientos que son típicos de un proceso fisiológico normal incluidos un extracto citosólico, una fuente de energía química en forma de ATP y GTP, y la incubación a temperaturas fisiológicas.

Además, en condiciones apropiadas, una población uniforme de vesículas de transporte retrógrado que mueven la *N*-acetilglucosamina transferasa I desde el *medial* al *cis*-Golgi puede ser purificada de las membranas del Golgi de tipo silvestre donador mediante centrifugación. Al examinar las proteínas que están enriquecidas en estas vesículas, los científicos identificaron muchas de las proteínas integrales de membrana y de las proteínas de la cubierta de las vesículas que son los componentes estructurales de este tipo de vesículas. Más aún, el fraccionamiento del extracto citosólico requerido para el transporte en las mezclas de reacción libres de células permitió el aislamiento de diversas proteínas necesarias para la formación de vesículas de transporte y de proteínas requeridas para el direccionamiento y la fusión de vesículas con las membranas aceptoras apropiadas. Se emplearon técnicas in vitro similares en el diseño general a la que se muestra en la figura 17-6 para estudiar diversos pasos del transporte en la vía secretoria.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 17-6 El transporte de proteínas desde una cisterna del Golgi a otra puede ser analizado en un sistema libre de células. (a) Una línea mutante de fibroblastos cultivados es esencial en este tipo de análisis. En este ejemplo, las células carecen de la enzima *N*-acetilglucosamina transferasa I (paso 2 en la fig. 17-3). En las células de tipo silvestre, esta enzima se localiza en el *medial*-Golgi y modifica los oligosacáridos *N*-ligados mediante la adición de una *N*-acetilglucosamina. En las células de tipo silvestre infectadas con VSV, el oligosacárido sobre la proteína G viral es modificado para formar un oligosacárido complejo típico como se muestra en el panel del *trans*-Golgi. Sin embargo, en las células mutantes infectadas la proteína G alcanza la superficie celular con un oligosacárido rico en manosa más simple, que contiene sólo dos *N*-acetilglucosamina y cinco residuos de manosa. (b) Cuando las cisternas del Golgi aisladas de células mutantes infectadas se incuban con cisternas del Golgi de células normales no infectadas, la proteína G del VSV producida in vitro contiene la *N*-acetilglucosamina adicional. Esta modificación es llevada a cabo por la enzima transferasa que se mueve mediante vesículas de transporte retrógradas desde las cisternas intermedias del Golgi de tipo silvestre hacia las cisternas mutantes del *cis*-Golgi en la mezcla de reacción. (Véase W. E. Balch et al., 1984, *Cell* 39:405 y 525; W. A. Braell et al., 1984, *Cell* 39:511; y J. E. Rothman y T. Söllner, 1997, *Science* 276:1212.)

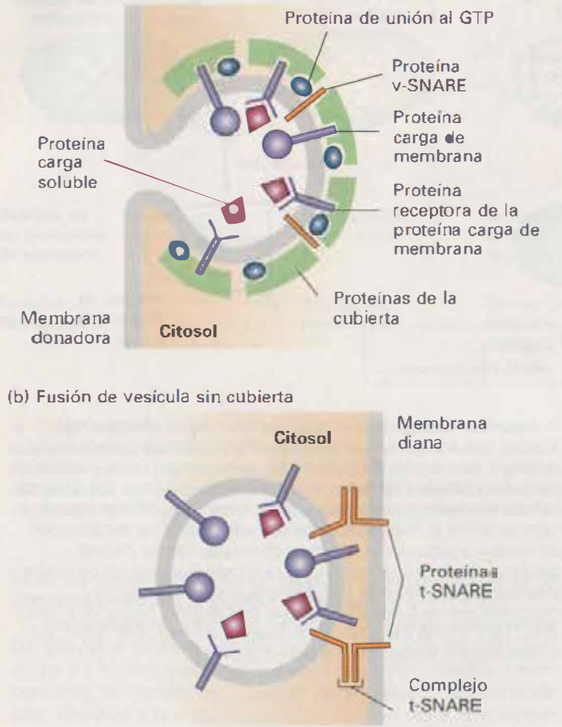
CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 17.1

Técnicas para el estudio de la vía secretoria

- Todos los ensayos para seguir el tránsito de proteínas a través de la vía secretoria en células vivas requieren una forma de marcar un conjunto de proteínas secretorias y una forma de identificar los compartimientos donde posteriormente se localizarán las proteínas marcadas.
- La marcación de aminoácidos con pulsos radiactivos puede marcar específicamente una "cohorte" de proteínas recién sintetizadas en el RE. De manera alternativa, una proteína mutante sensible a la temperatura que está retenida en el RE a una temperatura no permisiva será liberada como un conjunto para el transporte cuando las células se cambien a la temperatura permisiva.
- El transporte de una proteína marcada con fluorescencia a lo largo de la vía secretoria puede observarse por microscopia (véase fig. 17-2). El transporte de una proteína suele seguirse a través de las modificaciones covalentes específicas de compartimiento que sufre la proteína radiomarcada.
- Muchos de los componentes necesarios para el tránsito intracelular de proteínas fueron identificados en las levaduras mediante el análisis de los mutantes *sec* sensibles a la temperatura, defectuosos para la secreción de proteínas a la temperatura no permisiva (véase fig. 17-5).
- Los ensayos para el transporte intercompartimental de proteínas en sistemas libres de células permitieron la disección bioquímica de los pasos individuales de la vía secretoria. Tales reacciones in vitro pueden emplearse para producir vesículas de transporte puras y para analizar la función bioquímica de proteínas de transporte individuales.

17.2 Mecanismos moleculares del tránsito vesicular

Las pequeñas vesículas delimitadas por membrana que transportan proteínas de un orgánulo a otro son elementos comunes en las vías secretoria y endocítica (véase fig. 17-1). Estas vesículas brotan desde la membrana de un *orgánulo "progenitor" (donador)* y se fusionan con la membrana de un *orgánulo "diana" (destinatario)* particular. Aunque cada paso en las vías secretoria y endocítica emplea un tipo de vesícula diferente, los estudios que utilizan técnicas genéticas y bioquímicas descritas en la sección anterior revelaron que cada uno de los diferentes pasos del transporte vesicular es simplemente una variación de un tema en común. En esta sección examinamos ese tema, el mecanismo básico que subyace a la gemación y fusión de las vesículas.



▲ Fig. 17-7. Visión global de la gemación de una vesícula y de su fusión con una membrana diana. (a) El proceso de gemación se inicia por el reclutamiento de una proteína pequeña de unión a GTP hacia un sector de la membrana donadora. Complejos citosólicos de proteínas de cubierta se unen luego al dominio citosólico de las proteínas carga de membrana, algunas de las cuales también actúan como receptores que unen proteínas solubles en la luz, reclutando así proteínas carga luminales hacia la vesícula en proceso de gemación. (b) Una vez liberada y despojada de su cubierta, una vesícula se fusiona con su membrana diana en un proceso que involucra la interacción de proteínas SNARE relacionadas.

La gemación de vesículas desde su membrana progenitora es conducida por la polimerización de complejos de proteínas solubles sobre la membrana para formar un recubrimiento, o cubierta, proteica de la vesícula (fig. 17-7a). Las interacciones entre las porciones citosólicas de las proteínas integrales de membrana y el recubrimiento vesicular reúnen las proteínas carga apropiadas en el interior de la vesícula en formación. Por lo tanto, la cubierta no sólo adiciona curvatura a la membrana para formar una vesícula sino que también actúa como filtro para determinar cuáles proteínas son admitidas dentro de la vesícula.

Las proteínas integrales de membrana en una vesícula en gemación incluyen las **v-SNARE**, las cuales son cruciales para la fusión final de las vesículas con la membrana diana correcta. Poco después de que se completa la formación de una vesícula, la cubierta es despojada y expone sus proteínas v-SNARE. La unión específica de v-SNARE en la membrana vesicular con las t-SNARE afines en la membrana diana trae a las membranas a una aposición lo suficientemente cercana como para permitir la fusión de las dos bicapas (cap. 17-7b).

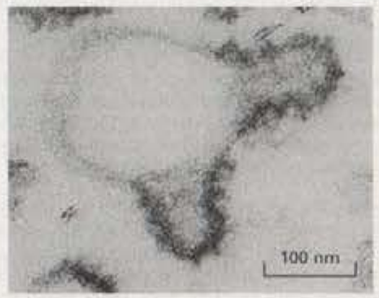
El ensamblaje de una cubierta de proteínas conduce a la formación de vesículas y a la selección de moléculas carga

Se caracterizaron tres tipos de vesículas recubiertas, cada una con un tipo diferente de cubierta proteica y cada una formada por polimerización reversible de un conjunto bien definido de subunidades proteicas (cuadro 17-1). Cada tipo de vesículas, designadas por sus principales proteínas de cubierta, transporta proteínas carga desde orgánulos progenitores particulares hacia orgánulos de destino particulares:

- Las vesículas **COPII** transportan proteínas desde el RE rugoso hacia el Golgi.
- Las vesículas **COPI** principalmente transportan proteínas en la dirección retrógrada entre las cisternas del Golgi y desde el *cis*-Golgi de regreso hacia el RE rugoso.
- Las vesículas de **clatrina** transportan proteínas desde la membrana plasmática (superficie celular) y la red *trans*-Golgi hacia los endosomas tardíos.

Los investigadores aún no han identificado las proteínas de la cubierta que rodean a las vesículas que mueven proteínas desde la red *trans*-Golgi a la membrana plasmática durante la secreción constitutiva o la regulada.

El esquema general del brote vesicular que se muestra en la figura 17-7a se aplica a los tres tipos de vesículas recubiertas conocidos. Los experimentos con membranas artificiales o aisladas y proteínas de cubierta purificadas han mostrado que la polimerización de las proteínas de cubierta sobre la cara citosólica de la membrana progenitora es necesaria para producir la gran curvatura de la membrana que es típica de una vesícula de transporte de alrededor de 50 nm de diámetro. Las microfotografías electrónicas de las reacciones de gemación in vitro a menudo revelan estructuras que exhiben regiones diferenciadas de la membrana progenitora que poseen una densa cubierta acompañada por la curvatura característica de una vesícula completa (fig. 17-8). Estas estructuras, a menudo denominadas *brotes vesiculares*, parecen ser intermediarios que son visibles después de que la cubierta comenzó a polimerizarse, pero antes de que la vesícula completa se estrangule y se desprenda de la membrana progenitora. Se cree que las proteínas polimerizadas de la cubierta forman algún tipo de entramado curvado que conduce a la formación de un brote vesicular al adherirse a la cara citosólica de la membrana.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 17-8 Los brotes de las vesículas pueden visualizarse durante las reacciones de gemación in vitro. Cuando los componentes de la cubierta de COPII se incuban con vesículas del RE aisladas o vesículas fosfolipídicas artificiales (liposomas), la polimerización de las proteínas de la cubierta sobre la superficie de la vesícula induce la salida de brotes altamente curvados. En esta microfotografía electrónica de una reacción de gemación in vitro, nótese la cubierta de membrana, visible como una capa proteica oscura, presente sobre los brotes vesiculares. [De K. Matsuoka et al., 1998, *Cell* 93(2):263.]

CUADRO 17-1 Vesículas recubiertas involucradas en el tránsito de proteínas

Tipo vesicular	Proteínas de la cubierta	GTPasa asociada	Etapa de transporte mediado
COPII	Complejos Sec23/Sec24 y Sec13/Sec31; Sec16	Sar1	RE al *cis*-Golgi
COPI	Coatómeros que contienen siete subunidades COP diferentes	ARF	Red *cis*-Golgi al RE. Cisternas del Golgi posteriores hacia anteriores (transporte retrógrado)
Clatrina y proteínas adaptadoras*	Clatrina + complejos AP1	ARF	Red *trans*-Golgi al endosoma
	Clatrina + GGA	ARF	*Trans*-Golgi al endosoma
	Clatrina + complejos AP2	ARF	Membrana plasmática al endosoma
	Complejos AP3	ARF	Golgi al lisosoma, melanosoma o vesículas plaquetarias

*Cada tipo de complejo AP consiste en cuatro subunidades diferentes. No se sabe si la cubierta de vesículas AP3 contiene clatrina.

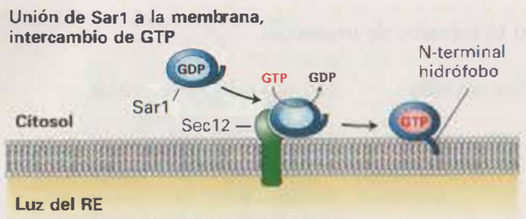
Un grupo conservado de proteínas GTPasa interruptoras controla el ensamblaje de diferentes cubiertas vesiculares

Basados en las reacciones de generación de vesículas in vitro realizadas con membranas aisladas y proteínas de cubierta purificadas, los científicos determinaron el grupo mínimo de componentes de la cubierta necesarios para formar cada uno de los tres tipos principales de vesículas. Aunque la mayoría de las proteínas de la cubierta difieren considerablemente de un tipo de vesículas a otro, las cubiertas de las tres vesículas contienen una pequeña proteína de unión al GTP que actúa como una subunidad reguladora para controlar el ensamblaje de la cubierta (véase fig. 17-7a). Tanto para las vesículas COPI como para las de clatrina, esta proteína de unión al GTP es conocida como *ARF*, una proteína diferente, que también se une a GTP, llamada *Sar1* está presente en las vesículas COPII. Tanto ARF como Sar1 son proteínas monoméricas con una estructura general similar a Ras, una proteína intracelular de transducción de señales clave (véase fig. 14-20). Las proteínas ARF y Sar1, al igual que Ras, pertenecen a la **superfamilia de las GTPasa**, proteínas interruptoras que fluctúan entre la forma inactiva unida al GDP y la forma activa unida al GTP (véase fig. 3-29).

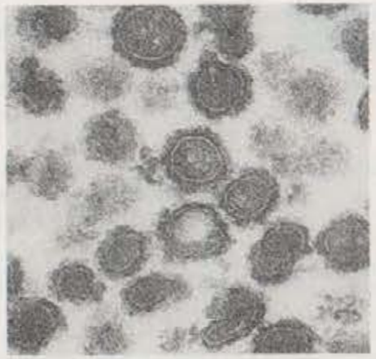
Se piensa que el ciclo de unión al GTP e hidrólisis por ARF y Sar1 controla la iniciación del ensamblaje de la cubierta como se esquematiza para el ensamblaje de las vesículas COPII en la figura 17-9. Primero, una proteína de membrana del RE conocida como Sec12 cataliza la liberación de GDP del Sar1 · GDP citosólico y la unión de GTP. El factor de intercambio de nucleótidos de guanina Sec12 aparentemente recibe e integra múltiples señales aún desconocidas, que probablemente incluyen la presencia de proteínas carga en la membrana del RE que están listas para ser transportadas. La unión de GTP provoca un cambio de conformación en Sar1 que expone su N-terminal hidrófobo, el cual luego queda embebido en la bicapa fosfolipídica y une Sar1 · GTP a la membrana del RE. Sar1 · GTP adherido a la membrana conduce la polimerización de los complejos citosólicos de las subunidades COPII sobre la membrana y lleva a la formación de brotes vesiculares. Una vez que las vesículas COPII se liberan desde la membrana donadora, la actividad GTPasa de Sar1 hidroliza Sar1 · GTP en la membrana vesicular a Sar1 · GDP con la asistencia de una de las subunidades de la cubierta. La hidrólisis desencadena el desensamblaje de la cubierta de COPII. Por lo tanto, Sar1 acopla el ciclo de unión a GTP y su hidrólisis a la formación y luego disociación de la cubierta COPII.

La proteína ARF experimenta un ciclo similar de intercambio de nucleótido e hidrólisis acoplado al ensamblaje de la cubierta vesicular compuesta de COPI o de clatrina y de otras proteínas de la cubierta (complejos AP) abordados más tarde. Un ancla de miristato adherido de manera covalente al N-terminal de la proteína ARF une débilmente ARF · GDP a la membrana del Golgi. Cuando el GTP es intercambiado por GDP por un factor intercambiador de nucleótido adherido a la membrana del Golgi, el cambio de conformación resultante en ARF permite que los residuos hidrófobos en su segmento N-terminal se inserten dentro de la bicapa de la membrana. La estrecha asociación resultante de ARF · GTP con la membrana sirve como cimiento para el ensamblaje posterior de la cubierta.

Como resultado de las similitudes estructurales de Sar1 y ARF con otras pequeñas proteínas GTPasa interruptoras, los in-



▲ **Fig. 17-9. Modelo para la función de Sar1 en el ensamblaje y el desensamblaje de cubiertas de COPII.** Paso 1: La interacción de Sar1 soluble unida a GDP con el factor de intercambio Sec12, una proteína integral de membrana del RE, cataliza el intercambio de GTP por GDP sobre Sar1. En la forma de Sar1 unida a GTP, su extremo N-terminal hidrófobo se extiende hacia afuera desde la superficie proteica y ancla Sar1 a la membrana del RE. Paso 2: Sar1 adherida a la membrana sirve como sitio de unión para el complejo de proteínas de la cubierta Sec23/Sec24. Las proteínas carga se reclutan hacia el brote de la vesícula en formación mediante la unión de secuencias cortas específicas (señales de clasificación) en su región citosólica, con sitios ubicados sobre el complejo Sec23/Sec24. La cubierta se completa por ensamblaje de un segundo tipo de complejo de cubierta compuesto por Sec13 y Sec31 (no se muestra). Paso 3: Después que se completa la cubierta vesicular la subunidad de la cubierta Sec23 promueve la hidrólisis del GTP por Sar1. Paso 4: La liberación de Sar1 · GDP desde la membrana vesicular provoca el desensamblaje de la cubierta. (Véase S. Springer et al., 1999, *Cell* 97:145.)



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 17-10 Las vesículas recubiertas se acumulan durante las reacciones de gemación in vitro en presencia de un análogo no hidrolizable de GTP.** Cuando se incuban membranas aisladas del Golgi con un extracto citosólico que contiene proteínas de cubierta COPI y ATP, se forman vesículas y brotan hacia afuera de las membranas. La inclusión de un análogo no hidrolizable de GTP en la reacción de gemación evita el desensamblaje de la cubierta luego de la liberación de la vesícula. Esta microfotografía muestra vesículas COPI generadas en tal reacción y separadas de las membranas mediante centrifugación. Las vesículas cubiertas preparadas de esta forma pueden ser analizadas para determinar sus componentes y propiedades. (Cortesía de L. Orci.)

vestigadores construyeron genes que codifican versiones mutantes de las dos proteínas que tuvieron efectos predecibles sobre el tránsito vesicular cuando fueron transfectadas a células cultivadas. Por ejemplo, en las células que expresan versiones mutantes de Sar1 o de ARF que no pueden hidrolizar GTP, se forman cubiertas vesiculares y los brotes vesiculares se estrangulan. Sin embargo, debido a que las proteínas mutantes no pueden disparar el desensamblaje de la cubierta, todas las subunidades de la cubierta disponibles quedan ensambladas permanentemente en vesículas recubiertas incapaces de fusionarse con las membranas diana. La adición de un análogo de GTP no hidrolizable a las reacciones de brote vesicular in vitro provoca un bloqueo similar al desensamblaje de la cubierta. Las vesículas que se forman en esas reacciones tienen cubiertas que nunca se disocian, lo que permite analizar su composición y estructura con mayor rapidez. Las vesículas COPI mostradas en la figura 17-10 fueron producidas en tal reacción de gemación.

Las secuencias de señalización sobre las proteínas carga hacen contactos moleculares específicos con las proteínas de la cubierta

Para que las vesículas de transporte muevan proteínas específicas de un compartimiento al siguiente, los brotes vesiculares deben poder discriminar entre las potenciales proteínas de membrana y las proteínas carga solubles, aceptando sólo las proteínas carga que deben avanzar al compartimiento siguiente y excluyendo las que deben permanecer como residentes en el compartimiento donador. Además de esculpir la curvatura de una membrana donadora, la cubierta vesicular también participa en la selección de proteínas carga específicas. El mecanismo primario mediante el cual la cubierta vesicular selecciona las moléculas carga es la unión directa a secuencias específicas, o **señales de clasificación**, en la porción citosólica de las proteínas carga de membrana (véase fig. 17-7a). La cubierta polimerizada, por lo tanto, actúa como una matriz de afinidad para agrupar las proteínas carga de membrana seleccionadas en el interior de brotes vesiculares en formación. Las proteínas solubles dentro de la luz de los orgánulos progenitores pueden a su vez ser seleccionadas mediante la unión a los dominios luminales de ciertas proteínas carga de membrana, que actúan como receptores para las proteínas carga luminales. Las propiedades de varias señales de clasificación conocidas, de proteínas de membrana y de proteínas solubles se resumen en el cuadro 17-2. Describimos el papel de estas señales con mayor detalle en las secciones posteriores.

CUADRO 17-2 Señales de clasificación/distribución conocidas que dirigen las proteínas hacia vesículas de transporte específicas

Secuencia de señal*	Proteínas con señal	Receptor de la señal	Vesículas que incorporan proteínas que portan señal
Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL)	Proteínas luminales residentes en el RE	Receptor de KDEL en las membranas de la red *cis*-Golgi	COPI
Lys-Lys-X-X (KKXX)	Proteínas de membrana residentes en el RE (dominio citosólico)	Subunidades α y β de COPI	COPI
Di-acídica (p. ej., Asp-X-Glu)	Proteínas carga de membrana en el RE (dominio citosólico)	Subunidad Sec24 de COPII	COPII
Manosa 6-fosfato (M6P)	Enzimas lisosómicas solubles después de ser procesadas en el *cis*-Golgi	Receptor de M6P en las membranas de la red *trans*-Golgi	Clatrina/AP1
	Enzimas lisosómicas secretadas	Receptor de M6P en la membrana plasmática	Clatrina/AP2
Asn-Pro-X-Tyr (NPXY)	Receptor LDL en la membrana plasmática (dominio citosólico)	Complejo AP2	Clatrina/AP2
Tyr-X-X-Φ (YXX Φ)	Proteínas de membrana en red *trans*-Golgi (dominio citosólico)	AP1 (subunidad μ1)	Clatrina/AP1
	Proteínas de la membrana plasmática (dominio citosólico)	AP2 (subunidad μ2)	Clatrina/AP2
Leu-Leu (LL)	Proteínas de la membrana plasmática (dominio citosólico)	Complejos AP2	Clatrina/AP2

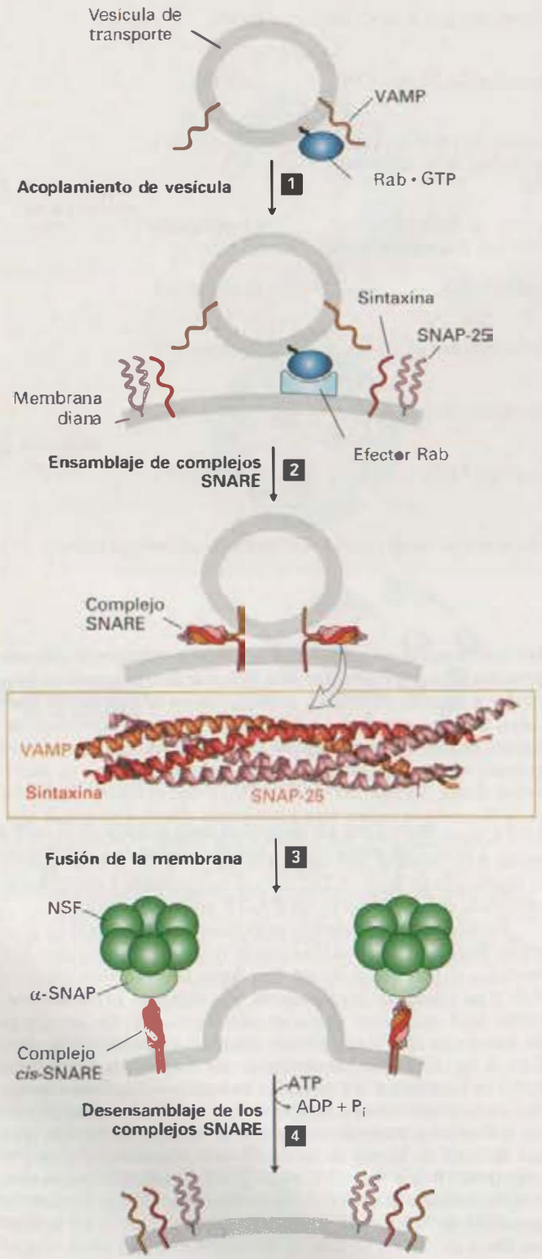
*X: cualquier aminoácido; Φ: aminoácido hidrófobo. Las abreviaturas de aminoácidos en códigos de una sola letra aparecen entre paréntesis.

Las GTPasas Rab controlan la ubicación de vesículas sobre las membranas diana

Un segundo grupo de proteínas pequeñas de unión a GTP, conocidas como *proteínas Rab*, participan en el direccionamiento de las vesículas a la membrana diana apropiada. Al igual que Sar1 y ARF, las proteínas Rab pertenecen a la superfamilia de proteínas interruptoras GTPasa. La conversión de Rab · GDP a Rab · GTP, catalizada por un factor intercambiador de nucleótidos de guanina específico, induce un cambio conformacional en Rab que le permite interactuar con una proteína de superficie sobre una vesícula de transporte en particular e insertar su anclaje isoprenoide en la membrana vesicular. Una vez que Rab · GTP queda unida a la superficie vesicular, se piensa que interactúa con una entre varias proteínas grandes conocidas como efectores Rab, adheridas a la membrana diana. La fijación de Rab · GTP con el efector Rab ubica a la vesícula sobre una membrana diana apropiada (fig. 17-11, paso 1). Una vez producida la fusión vesicular, el GTP unido a la proteína Rab es hidrolizado a GDP y desencadena la liberación de Rab · GDP, el cual luego puede experimentar otro ciclo de intercambio GDP-GTP, unión e hidrólisis.

Varias líneas de evidencia sustentan la intervención de proteínas Rab específicas en los eventos de fusión de vesículas. Por ejemplo, el gen *SEC4* de las levaduras codifica una proteína Rab y las células de las levaduras que expresan proteínas mutantes Sec4 acumulan vesículas secretorias que son incapaces de fusionarse con la membrana plasmática (mutantes de clase E en la fig. 17-5). En las células de los mamíferos, la proteína Rab5 se localiza en las vesículas endocíticas, también conocidas como endosomas tempranos. Estas vesículas no recubiertas se forman a partir de vesículas con cubierta de clatrina apenas después de brotar de la membrana plasmática durante la endocitosis (véase fig. 17-1, paso 2). La fusión de endosomas tempranos entre sí en los sistemas libres de células requiere la presencia de Rab5, y la adición de Rab5 y GTP a los extractos libres de células acelera la velocidad a la cual estas vesícu-

las se fusionan. Una proteína larga en espiral conocida como EEA1 (*early endosome antigen* 1, antígeno endosómico temprano 1), que reside sobre la membrana del endosoma temprano, actúa como efector para Rab5. En este caso, se piensa que Rab5 · GTP sobre una vesícula endocítica se une específicamente a EEA1 sobre la membrana de otra vesícula endocítica, y establece el paso para la fusión de las dos vesículas.



De modo similar, Rab1 es esencial para que se produzcan las reacciones de transporte del RE hacia el Golgi en los extractos libres de células. Rab1 · GTP se une a una proteína helicoidal larga conocida como p115, la cual une específicamente las vesículas COPII que transportan Rab1 · GTP a la membrana diana del Golgi. Un tipo diferente de efector Rab parece actuar para cada tipo de vesícula y en cada paso de la vía secretoria. Quedan muchas preguntas acerca de cómo las proteínas Rab son asignadas a la membrana correcta y cómo se forman los complejos específicos entre las distintas proteínas Rab y sus correspondientes proteínas efectoras.

Conjuntos apareados de proteínas SNARE median la fusión de vesículas con las membranas diana

Como ya se dijo, poco después de que una vesícula brota fuera de la membrana donadora, la cubierta de la vesícula se desensambla para descubrir una proteína de membrana específica de la vesícula, una v-SNARE (véase fig. 17-7b). De igual modo, cada tipo de membrana diana en una célula contiene proteínas de membrana t-SNARE. Después de la ubicación mediada por Rab de una vesícula sobre su membrana diana (destino), la interacción de las SNARE relacionadas acerca las dos membranas lo suficiente para que se fusionen.

Uno de los ejemplos mejor comprendidos de la fusión mediada por SNARE se produce durante la exocitosis de proteínas secretadas (fig. 17-11, pasos 2 y 3). En este caso, v-SNARE, conocida como *VAMP* (proteína de membrana asociada con la vesícula), se incorpora a las vesículas secretorias a medida que brotan de la red *trans*-Golgi. Las t-SNARE son *sintaxina*, una proteína integral de membrana de la membrana plasmática, y *SNAP-25*, la cual está unida a la membrana plasmática mediante un ancla lipídica hidrófoba en el medio de la proteína. La región citosólica en cada una de estas tres proteínas SNARE contiene una secuencia repetida de siete aminoácidos que permite que cuatro hélices α –una de la VAMP, una de la sintaxina y dos de la SNAP-25– se enrollen una alrededor de la otra para formar un haz de cuatro hélices. La estabilidad inusual de este complejo de haces de SNARE está dada por la disposición de residuos amino cargados e hidrófobos en las repeticiones de siete aminoácidos. Los aminoácidos hidrófobos están inmersos en el núcleo (*core*) central del haz y los aminoácidos de carga opuesta están alineados para formar interacciones electrostáticas favorables entre las hélices. A medida que se forman los haces de cuatro hélices, las membranas de la vesícula y de la diana están en estrecha aposición por los dominios embebidos transmembrana de la VAMP y la sintaxina.

◀ Fig. 17-11. Modelo de acoplamiento y fusión de las vesículas de transporte con sus membranas diana. Las proteínas mostradas en este ejemplo participan en la fusión de vesículas secretorias con la membrana plasmática, pero proteínas similares median todos los eventos de fusión vesicular. Paso 1: Una proteína Rab unida a través de un ancla lipídica a una vesícula secretoria se une a un complejo de proteínas efectoras sobre la membrana plasmática, ubicando de este modo la vesícula de transporte sobre la membrana diana apropiada. Paso 2: Una proteína v-SNARE (en este caso, VAMP) interactúa con los dominios citosólicos de las t-SNARE relacionadas (en este caso, sintaxina y SNAP-25). Los complejos SNARE superenrollados muy estables que se forman mantienen la vesícula cerca de la membrana diana. *Recuadro:* Numerosas interacciones no covalentes entre cuatro hélices α, dos de SNAP-25 y una para cada una de la sintaxina y la VAMP, estabilizan la estructura superenrollada. Paso 3: La fusión de las dos membranas sigue inmediatamente a la formación de complejos SNARE, pero no se conoce con exactitud el proceso. Paso 4: Tras la fusión de la membrana, NSF en conjunción con una proteína α-SNAP se une a los complejos SNARE. Luego la hidrólisis de ATP catalizada por NSF conduce la disociación de los complejos SNARE y libera las proteínas SNARE para otro ciclo de fusión vesicular. [Véase J. E. Rothman y T. Söllner, 1997, *Science* 276:1212, y W. Weis y R. Scheller, 1998, *Nature* 395:328. Recuadro de Y A. Chen y R. H. Scheller, 2001, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2(2):98.]

Los experimentos in vitro mostraron que cuando los liposomas que contienen VAMP purificadas se incuban con otros liposomas que contienen sintaxina y SNAP-25, las dos clases de membranas se fusionan, aunque lentamente. Este hallazgo es una fuerte evidencia de que la aposición cercana de las membranas resultante de la formación de complejos SNARE es suficiente para ocasionar la fusión de las membranas. La fusión de una vesícula y una membrana diana sucede mucho más rápida y eficientemente en la célula que en los experimentos con liposomas en los cuales la fusión está catalizada sólo por proteínas SNARE. La probable explicación para esta diferencia es que en la célula las interacciones entre proteínas Rab específicas y sus efectores promueven la formación de haces SNARE específicos al amarrar una vesícula a su membrana diana.

Las células de las levaduras, al igual que todas las células eucariontes, expresan más de 20 proteínas v-SNARE y t-SNARE emparentadas. Los análisis de mutantes *sec* de levaduras, defectuosos en cada uno de los genes SNARE, han identificado el evento específico de fusión de membrana en el cual participa cada proteína SNARE. Para todos los eventos de fusión examinados, las SNARE forman complejos de haces de cuatro hélices, similares a los complejos VAMP/sintaxina/SNAP-25 que median la fusión de vesículas secretorias con la membrana plasmática. Sin embargo, en otros eventos de fusión (p. ej., fusión de vesículas COPII con la red *cis*-Golgi), cada proteína SNARE participante contribuye con sólo una hélice α al haz (a diferencia de la SNAP-25, que contribuye con dos hélices); en estos casos los complejos SNARE comprenden una molécula de v-SNARE y tres de t-SNARE.

Empleando los análisis de fusión liposómica in vitro, los investigadores analizaron la capacidad de diversas combinaciones de proteínas v-SNARE y t-SNARE individuales para mediar la fusión de membranas diana y donadoras. Del enorme número de diferentes combinaciones probadas, sólo algunas median la fusión de membranas. Las combinaciones funcionales de v-SNARE y t-SNARE reveladas en estos experimentos in vitro corresponden en un grado notable a las interacciones reales de la proteína SNARE que median eventos de fusión de membrana conocidos en las células de las levaduras. Por lo tanto, la especificidad de las interacciones entre las proteínas SNARE puede dar cuenta de la especificidad de la fusión entre una vesícula en particular y sus membranas diana.

La disociación de los complejos SNARE después de la fusión de la membrana es conducida por la hidrólisis de ATP

Después que una vesícula y su membrana diana se fusionaron, los complejos SNARE deben disociarse para hacer que las proteínas SNARE individuales estén disponibles para eventos de fusión adicionales. Debido a la estabilidad de los complejos SNARE, que se mantienen juntos mediante numerosas interacciones intermoleculares no covalentes, su disociación depende de proteínas adicionales y del aporte de energía.

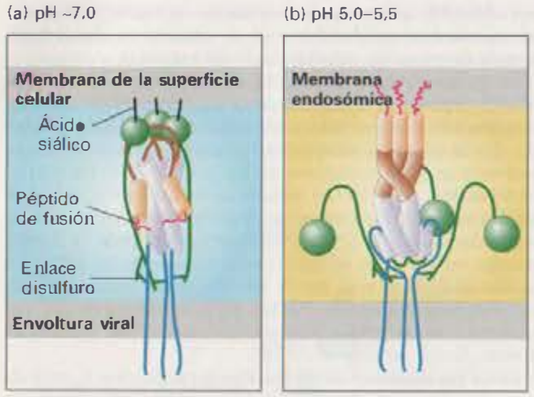
La primera clave de que la disociación de complejos SNARE requería la asistencia de otras proteínas provino de reacciones de transporte in vitro a las que se les habían agotado ciertas proteínas citosólicas. La acumulación de vesículas observada en estas reacciones indicó que las vesículas pudieron formarse, pero fueron incapaces de fusionarse con una membrana diana. Finalmente se descubrió que dos proteínas, designadas *NSF* y α-*SNAP*, eran necesarias para la fusión vesicular en curso en la reacción de transporte in vitro. La función de NSF in vivo puede ser bloqueada selectivamente mediante *N*-etilmaleimida (NEM), un compuesto químico que reacciona con un grupo –SH esencial sobre NSF (de ahí el nombre, *f*actor *s*ensible al *NEM*).

Entre los mutantes *sec* de las levaduras de clase C existen cepas que carecen de Sec18 o Sec17 funcional, las contrapartes de levaduras de las NSF y las α-SNAP de mamíferos, respectivamente. Cuando estos mutantes de clase C se colocan a la temperatura no permisiva, acumulan vesículas de transporte del RE al Golgi; cuando las células se cambian a la temperatura permisiva menor, las vesículas acumuladas son capaces de fusionarse con el *cis*-Golgi.

Posteriormente a los estudios genéticos y bioquímicos iniciales que identificaron la NSF y la α-SNAP, se desarrollaron técnicas de transporte in vitro más sofisticadas. Empleando estas nuevas técnicas, los investigadores han mostrado que las proteínas NSF y α-SNAP no son necesarias para la fusión real de la membrana, sino que lo son para la regeneración de proteínas SNARE libres. La NSF, un hexámero de subunidades idénticas, se asocia con un complejo SNARE con la ayuda de otra proteína, α-SNAP (soluble *N*SF *a*ttachment *p*rotein: proteína conectora de NSF soluble). La NSF unida hidroliza luego ATP y libera energía suficiente para disociar el complejo SNARE (fig. 17-11, paso 4). Sin duda, los defectos de la fusión vesicular observados en las anteriores técnicas de fusión in vitro y en los mutantes de las levaduras luego de la pérdida de Sec17 y Sec18 fueron una consecuencia de las proteínas SNARE libres que fueron rápidamente incorporadas a complejos SNARE no disociados y, por ende, no quedaron disponibles para mediar la fusión de la membrana.

Los cambios conformacionales en proteínas de cubierta viral desencadenan la fusión de la membrana

Algunos virus animales, incluidos el virus de la gripe, el virus de la rabia y el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), tienen una membrana externa de bicapa fosfolipídica, o cubierta que rodea el centro de la partícula viral compuesto de proteínas virales y de material genético. La cubierta viral deriva por gemación de la membrana plasmática de las células huésped, la cual contiene glucoproteínas codificadas por el virus. Los virus con cubierta penetran en una célula huésped mediante endocitosis tras la unión de una o más glucoproteínas de la cubierta viral con moléculas de la superficie celular del huésped. La posterior fusión de la cubierta viral con la membrana del endosoma libera el genoma viral hacia el citosol de la célula huésped y se inicia la replicación del virus (véase fig. 4-41, paso 3). Los eventos moleculares de este proceso de fusión han sido dilucidados con considerable detalle en el caso del virus de la gripe.

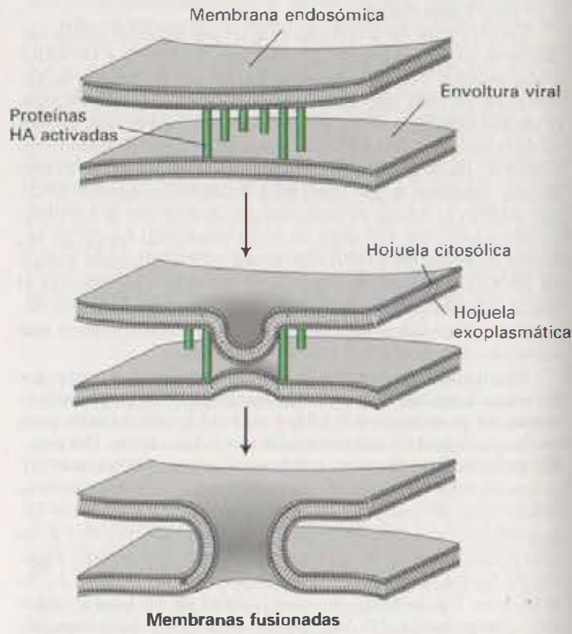


▲ Fig. 17-12. Modelo esquemático de la estructura de la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe a pH 7 y 5. Tres subunidades HA_1 y tres HA_2 componen una molécula de hemaglutinina, la cual protruye desde la cubierta viral como una espícula. (a) A pH ≈ 7, parte de cada subunidad HA_1 forma un dominio globular (verde) en la punta de la espícula nativa. Estos dominios se unen a los residuos de ácido siálico sobre la membrana plasmática de la célula huésped e inician la entrada del virus. Cada subunidad HA_1 está unida a una subunidad HA_2 por un enlace disulfuro en la base de la molécula cerca de la cubierta viral. Cada subunidad HA_2 contiene un péptido de fusión (rojo) en su N-terminal (sólo dos son visibles), seguido por una hélice α corta (cilindro anaranjado), un bucle no helicoidal (marrón) y una hélice α más larga (violeta claro). Las hélices α más largas de las tres subunidades HA_2 forman una estructura de espiral enrollada de tres hebras (véase fig. 3-7). En esta conformación, los péptidos de fusión están incluidos dentro de la molécula. (b) Al pH ácido que hay en el interior del endosoma tardío se interrumpe la unión del péptido de fusión a otros segmentos de HA_2 induciendo reordenamientos estructurales importantes en la proteína. Primero, los tres dominios globulares HA_1 se separan entre sí, pero permanecen unidos a las subunidades HA_2 mediante los enlaces disulfuro en la base de la molécula. Segundo, el segmento del bucle de cada HA_2 se reordena, forma una hélice α (marrón) y se combina con los segmentos α helicoidales cortos y largos para formar una hélice α continua de 88 residuos. Las tres hélices α largas, por lo tanto, forman una espiral enrollada de tres hebras de 13,5 nm de largo que protruye hacia afuera desde la cubierta viral. En esta conformación, los péptidos de fusión se encuentran en la punta de la espiral enrollada y pueden insertarse en la membrana endosómica. (Adaptado de C. M. Carr, et al., 1997, *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 94:14306; cortesía de Peter Kim.)

La glucoproteína predominante del virus de la gripe es la *hemaglutinina (HA)*, que forma las espículas más grandes sobre la superficie del virus. Existe evidencia considerable de que luego de la endocitosis de un virión de la gripe, el bajo pH dentro del endosoma tardío desencadena la fusión de su membrana con la cubierta viral. Por ejemplo, la infección viral es inhibida por la adición de bases liposolubles, como el amonio o la trimetilamina, que elevan el pH normalmente ácido de los endosomas tardíos. Además, un cambio conformacional en la proteína HA que es decisivo para la infectividad tiene lugar en un rango de pH muy estrecho (5,0-5,5).

Cada espícula sobre un virión de gripe consiste en tres HA_1 y tres subunidades HA_2. En el N-terminal del HA_2 se encuentra una secuencia de 11 residuos fuertemente hidrófoba, denominada péptido de fusión. Los estudios estructurales mostraron que a pH 7,0, el N-terminal de cada subunidad HA_2 está plegado en una hendidura de la espícula (fig 17-12a). Ésta es la conformación HA normal cuando una partícula viral encuentra la superficie de una célula huésped. En el pH característico de los endosomas tardíos, la HA experimenta varios cambios conformacionales que provocan un reordenamiento importante de las subunidades. Como resultado, las tres subunidades HA_2 se enroscan entre sí formando una varilla de espiral enrollada tricatenaria que protruye más de 13 nm hacia fuera de la cubierta viral con los péptidos de fusión en la punta de la varilla (fig. 17-12b). En esta conformación, los péptidos de fusión altamente hidrófobos están expuestos y pueden insertarse en la bicapa lipídica de la membrana endosómica, desencadenando la fusión de la cubierta viral y la membrana. Por lo tanto, puede decirse que a pH 7 la HA está atrapada en un estado metaestable "cargado", que es convertido al estado fusogénico de menor energía al llevar el pH a 5-5,5.

Múltiples espículas de HA activadas a pH bajo son esenciales para que se produzca la fusión de las membranas. En la figura 17-13 se sugiere una forma por la cual la estructura de proteínas formada por muchas espículas de HA, posiblemente con la asistencia de otras proteínas celulares, podría



▲ Fig. 17-13. Modelo de la fusión de membranas dirigida por la hemaglutinina (HA). Cierta cantidad de espículas de HA activadas a pH bajo, posiblemente en concierto con proteínas de la membrana de la célula huésped, forman un armazón que conecta una pequeña región de la cubierta viral y de la membrana endosómica. Mediante mecanismos desconocidos, las hojuelas exoplasmáticas de las dos membranas se fusionan y luego lo hacen las hojuelas citosólicas, formando un poro que se ensancha hasta que las dos membranas están completamente unidas. Una interacción similar entre las bicapas de la membrana pudo producirse durante la fusión vesicular mediada por SNARE (Adaptado de J. R. Monck y J. M. Fernandez, 1992, *J. Cell Biol.* 119:1395.)

vincular la cubierta viral y la membrana endosómica e inducir su fusión. Esta figura también ilustra cómo pueden fusionarse las membranas celulares colocadas en posición cercana mediante los complejos SNARE. Nótese que cada molécula de HA participa en sólo un evento de fusión, mientras que las proteínas de fusión celular, como las SNARE, son recicladas y catalizan múltiples ciclos de fusión de la membrana.

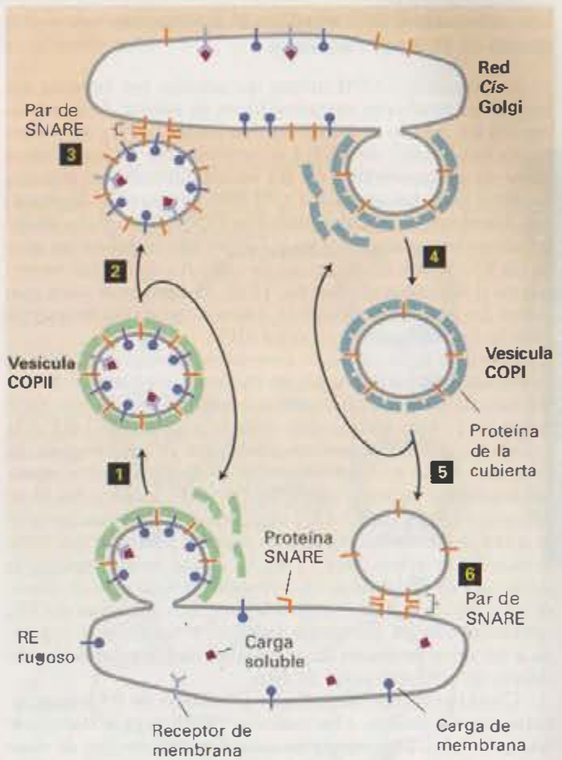
CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 17.2

Mecanismos moleculares del tránsito vesicular

- Las tres vesículas de transporte bien caracterizadas –COPI, COPII y las vesículas de clatrina– se distinguen por las proteínas que forman sus cubiertas y las rutas de transporte que median (véase cuadro 17-1).
- Todos los tipos de vesículas recubiertas se forman mediante polimerización de proteínas de cubierta citosólicas encima de una membrana donadora (progenitora) para formar brotes vesiculares que finalmente se desprenden de la membrana para liberar una vesícula completa. Poco después de la liberación vesicular, la cubierta es despojada exponiendo las proteínas necesarias para la fusión con la membrana diana (véase fig. 17-7).
- Pequeñas proteínas de unión a GTP (ARF o Sar1) pertenecientes a la superfamilia de las GTPasa controlan la polimerización de las proteínas de la cubierta, el paso inicial en la gemación vesicular (véase fig. 17-9). Después de la liberación de las vesículas de la membrana donadora, la hidrólisis de GTP unido a ARF o a Sar1 desencadena el desensamblaje de la cubierta de la vesícula.
- Señales de clasificación específicas en las proteínas de membrana y luminales de orgánulos donadores interactúan con proteínas de la cubierta durante la gemación vesicular, reclutando, por lo tanto, proteínas carga en las vesículas (véase cuadro 17-2).
- Un segundo conjunto de proteínas de unión a GTP, las proteínas Rab, regulan la ubicación correcta de vesículas con la membrana diana. Cada Rab parece unirse a un efector Rab específico, una proteína en espiral enrollada habitualmente larga, asociada con la membrana diana.
- Cada v-SNARE en una membrana vesicular se une de manera específica a un complejo de proteínas t-SNARE relacionadas en la membrana diana, induciendo la fusión de las dos membranas. Una vez completada la fusión, el complejo SNARE se desensambla en una reacción dependiente de ATP mediada por otras proteínas citosólicas (véase fig. 17-11).
- Después que un virus animal con cubierta es endocitado, la cubierta viral se fusiona con la membrana endosómica circundante. En el caso del virus de la gripe, el pH ácido dentro del endosoma tardío provoca un cambio de conformación en la proteína HA en la cubierta viral que permite la inserción de la HA dentro de la membrana endosómica.

17.3 Tránsito vesicular en las etapas iniciales de la vía secretoria

En esta sección dirigiremos nuestra atención hacia el tránsito vesicular a través de las etapas en el RE y el Golgi de la vía secretoria y algo de la evidencia que sustenta los mecanismos generales abordados en las secciones previas. Cabe recordar que en el *transporte anterógrado* desde el RE al Golgi, el primer paso en la vía secretoria está mediado por las vesículas COPII, mientras que en el *transporte retrógado* inverso desde el *cis*-Golgi al RE intervienen las vesículas COPI (fig. 17-14). Este transporte vesicular retrógrado sirve para que el RE recu-



▲ Fig. 17-14. Tránsito proteico mediado por vesículas entre el RE y el *cis*-Golgi. Pasos 1 a 3: El transporte (anterógrado) es mediado por las vesículas COPII, que se forman por polimerización de complejos proteicos con cubierta COPII (verde) sobre la membrana del RE. Las v-SNARE (amarillo) y otras proteínas carga (violeta) en la membrana del RE se incorporan a la vesícula mediante interacción con proteínas de la cubierta. Las proteínas carga solubles (rojas) se reclutan mediante la unión a receptores apropiados en la membrana de las vesículas en proceso de gemación. La disociación de la cubierta recicla los complejos de cubierta libres y expone las proteínas v-SNARE sobre la superficie vesicular. Después que las vesículas sin las cubiertas quedan ligadas a las membranas *cis*-Golgi en un proceso mediado por Rab, el apareamiento entre las v-SNARE expuestas y las t-SNARE relacionadas en la membrana del Golgi permite la fusión vesicular, liberando el contenido dentro del compartimiento *cis*-Golgi (véase fig. 17-11). Pasos 4-6: El transporte inverso (retrógrado), mediado por vesículas cubiertas con proteínas COPI (gris), recicla la bicapa de la membrana y ciertas proteínas, como la v-SNARE y las proteínas del RE mal distribuidas (no mostradas), desde el *cis*-Golgi hacia el RE. Todas las proteínas SNARE se muestran en rojo aunque cada v-SNARE y t-SNARE son proteínas distintas.

pere proteínas v-SNARE y la misma membrana para proveer el material necesario para ciclos adicionales de gemación vesicular del RE. El transporte retrógrado mediado por COPI también recupera proteínas residentes del RE desde el *cis*-Golgi para corregir errores de clasificación. Las proteínas que se entregaron correctamente al Golgi avanzan a través de sucesivos compartimientos del Golgi mediante progresión cisternal.

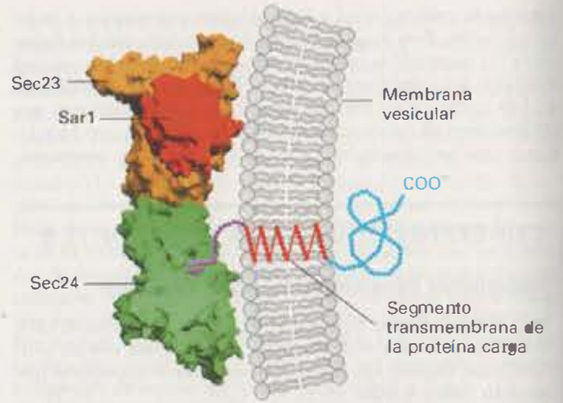
Las vesículas COPII median el transporte desde el RE hacia el Golgi

Las vesículas COPII fueron reconocidas por primera vez cuando se incubaron extractos libres de células de membranas del RE rugoso de levaduras con citosol, ATP y un análogo no hidrolizable de GTP. Las vesículas que se formaban a partir de las membranas del RE tenían una cubierta distinta, similar a la de las vesículas COPI pero compuestas de proteínas diferentes, designadas proteínas COPII. Las células de las levaduras con mutaciones en los genes que codifican las proteínas COPII son mutantes *sec* de clase B y acumulan proteínas en el RE rugoso (véase fig. 17-5). El análisis de estos mutantes ha permitido descubrir diversas proteínas necesarias para la formación de vesículas COPII.

Como ya se describió, la formación de vesículas COPII se desencadena cuando Sec 12, un factor de intercambio de nucleótido de guanina, cataliza el intercambio de GDP por GTP sobre Sar1. Este intercambio induce la unión de Sar1 a la membrana del RE seguida por la unión de un complejo de proteínas Sec23 y Sec24 (véase fig. 17-9). El complejo ternario resultante formado entre Sar1 · GTP, Sec23 y Sec24 se muestra en la figura 17-15. Luego que se forma este complejo sobre la membrana del RE, un segundo complejo que comprende las proteínas Sec13 y Sec31 se une para completar la estructura de la cubierta. Una proteína fibrosa grande, denominada Sec16, que está unida a la superficie citosólica del RE, interactúa con los complejos Sec13/31 y Sec23/24, y organiza a las otras proteínas de la cubierta incrementando la eficiencia de polimerización de ésta.

Ciertas proteínas integrales de membrana del RE son reclutadas específicamente a las vesículas COPII para el transporte hacia el Golgi. Los segmentos citosólicos de muchas de estas proteínas contienen una *señal de clasificación diacídica* (Asp-X-Glu, o DXE en el código de una letra). Esta señal de clasificación se une a la subunidad Sec24 de la cubierta de COPII y es esencial para la salida selectiva de ciertas proteínas de membrana desde el RE (véase fig. 17-15). Los estudios bioquímicos y genéticos están próximos a identificar señales adicionales que ayudan a dirigir las proteínas carga de membrana hacia el interior de las vesículas COPII. Otros estudios en curso buscan determinar cómo las proteínas carga solubles son incorporadas selectivamente dentro de las vesículas COPII. Aunque se descubrió que las vesículas COPII purificadas de las células de levaduras contienen una proteína de membrana que une el factor de aparcamiento α soluble, aún no se conocen los receptores para otras proteínas carga solubles como la invertasa.

Los experimentos previamente descritos en los cuales el tránsito de la proteína de fusión GFP-G del VSV en células cultivadas de mamíferos es seguido por microscopia fluorescente (véase fig. 17-2) proporcionaron una mayor comprensión acerca de los intermediarios en el transporte del RE al Golgi. En algunas células pudieron verse las pequeñas vesículas fluorescentes que contenían la GFP-G del VSV formándose en el RE, moverse menos de 1 μm y luego fusionarse directamente con el *cis*-Golgi. En otras células, en las cuales el RE se localizó a varios micrómetros respecto del complejo de Golgi, se vio que varias vesículas derivadas del RE se fusionaron entre sí poco después de su formación, conformando el denominado "compartimiento intermedio RE-Golgi". Estas estructuras más grandes eran luego transportadas a lo largo de microtúbulos hacia el *cis*-Golgi, de un modo semejante al de las vesículas de las células nerviosas que son transportadas desde el cuerpo celular, en donde se forman, a través de toda la longitud del axón hasta la terminal del axón (cap. 20). Los microtúbulos funcionan como las "vías del ferrocarril" que permiten a estos grandes agregados de vesículas de transporte moverse largas distancias hasta su destino en el *cis*-Golgi. En el momento en que se forma el compartimiento intermedio RE-Golgi, algunas vesículas COPI brotan fuera de él, reciclando algunas proteínas de regreso hacia el RE.



▲ Fig. 17-15. Estructura tridimensional del complejo ternario que comprende las proteínas de cubierta, Sec23 y Sec24 y Sar1 · GTP de vesículas COPII. Al comienzo de la formación de la cubierta de COPII, los complejos Sec23 (anaranjado)/Sec24 (verde) son reclutados hacia la membrana del RE por Sar1 (rojo) en su estado unido al GTP. Con el fin de formar un complejo ternario estable en solución para estudios estructurales, se utilizó GppNHp, análogo no hidrolizable del GTP. Una proteína carga de la membrana del RE puede reclutarse en la vesícula COPII mediante la interacción de una señal diacídica tripeptídica (violeta) en el dominio citosólico de la carga con Sec24. Se indica la posición probable de la membrana vesicular COPII y del segmento transmembrana de la proteína carga. El segmento N-terminal de Sar1 que la liga a la membrana no se muestra. (Véase X. Bi et al., 2002, *Nature* 419:271; la interacción con el péptido cortesía de J. Goldberg.)

Las vesículas COPI median el transporte retrógrado dentro del Golgi y desde el Golgi hacia el RE

Las vesículas COPI fueron descubiertas cuando se incubaron fracciones del Golgi aisladas en una solución que contenía ATP, citosol y un análogo no hidrolizable de GTP (véase fig. 17-10). Los análisis posteriores de estas vesículas mostraron que la cubierta se forma a partir de grandes complejos citosólicos denominados *coatómeros*, compuestos de siete subunidades polipeptídicas. Las células de las levaduras que contienen

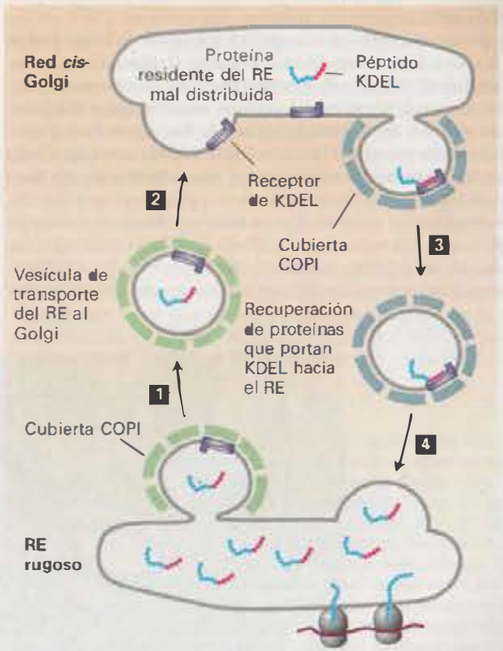
mutaciones sensibles a la temperatura en las proteínas COPI acumulan proteínas en el RE rugoso a la temperatura no permisiva y por ende se categorizan como mutantes *sec* de clase B (véase fig. 17-5). Aunque el descubrimiento de estos mutantes inicialmente sugirió que las vesículas COPI median el transporte del RE al Golgi, experimentos posteriores mostraron que su función principal es el transporte retrógrado, tanto entre las cisternas del Golgi como desde el *cis*-Golgi hacia el RE rugoso (véase fig. 17-14, *derecha*). Debido a que los mutantes COPI no pueden reciclar las proteínas de membrana clave de regreso hacia el RE rugoso, al RE se le agotan gradualmente las proteínas como las v-SNARE necesarias para el funcionamiento de las vesículas COPII. Finalmente la formación de vesículas a partir del RE se reduce hasta paralizarse; las proteínas secretorias continúan sintetizándose pero se acumulan en el RE, la característica definitoria de los mutantes *sec* de clase B.

Como se describió en el capítulo 16, el RE contiene varias proteínas solubles dedicadas al plegamiento y la modificación de proteínas secretorias recién sintetizadas. Éstas incluyen la chaperona BiP y la enzima proteína disulfuro isomerasa, necesarias para que el RE lleve a cabo sus funciones. Aunque esas proteínas luminales residentes en el RE no son específicamente seleccionadas por las vesículas COPII, su mera abundancia hace que sean continuamente cargadas de manera pasiva dentro de vesículas destinadas a la red *cis*-Golgi. El transporte de estas proteínas solubles de regreso al RE, mediado por vesículas COPI, evita su agotamiento.

La mayoría de las proteínas solubles residentes en el RE transportan una secuencia Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL en el código de una letra) en su C-terminal (véase cuadro 17-2). Varios experimentos demostraron que esta *señal de clasificación KDEL* es necesaria y suficiente para la retención en el RE. Por ejemplo, cuando en fibroblastos cultivados se sintetiza una proteína disulfuro isomerasa mutante que carece de estos cuatro residuos, la proteína es secretada. Más aún, si una proteína que normalmente se secreta es alterada de manera tal que contenga la señal KDEL en su C-terminal, la proteína es retenida en el RE. La señal de clasificación KDEL es reconocida y unida por el *receptor de KDEL*, una proteína transmembrana hallada principalmente sobre pequeñas vesículas de transporte que van y vienen entre el RE y la región *cis*-Golgi, y sobre la red del *cis*-Golgi. Además, las proteínas solubles residentes en el RE que portan la señal KDEL tienen cadenas de oligosacáridos con modificaciones catalizadas por enzimas que sólo se encuentran en el *cis*-Golgi o en el retículo *cis*-Golgi; por lo tanto, en algún momento estas proteínas deben de haber dejado el RE y haber sido transportadas al menos tan lejos como la red del *cis*-Golgi. Estos hallazgos indican que el receptor de KDEL actúa principalmente para recuperar proteínas solubles que contienen la señal de clasificación KDEL que escapó hacia la red *cis*-Golgi y las devuelve al RE (fig. 17-16).

El receptor de KDEL y otras proteínas de membrana que se transportan de regreso al RE desde el Golgi contienen una secuencia Lys-Lys-X-X en el extremo de su segmento C-terminal, orientado hacia el citosol (véase cuadro 17-2) Esta *señal de clasificación KKXX* que se une a un complejo de las subunidades α y β de COPI, es necesaria y suficiente para incorporar las proteínas de membrana a las vesículas COPI para el transporte retrógrado hacia el RE. Los mutantes de levaduras sensibles a la temperatura que carecen de COPIα y COPIβ no sólo son incapaces de unir la señal KKXX sino que también son incapaces de recuperar las proteínas que cargan esta señal de regreso al RE, lo que indica que las vesículas COPI median el transporte retrógrado del Golgi al RE.

Sin duda, el fraccionamiento de proteínas entre el RE y el complejo de Golgi es un proceso altamente selectivo y regulado controlado en última instancia por la especificidad de incorporación de la carga tanto en la vesícula COPII (anterógrada) como en la COPI (retrógrada). La entrada selectiva de proteínas en las vesículas de transporte delimitadas por membrana, el reciclaje de fosfolípidos y proteínas, y el reciclaje de proteínas luminales solubles entre los dos compartimientos son características fundamentales del tránsito proteico vesicular que también tiene lugar en las etapas tardías de la vía secretoria.



▲ Fig. 17-16. Papel del receptor de KDEL en la recuperación desde el Golgi de las proteínas luminales residentes en el RE. Las proteínas luminales del RE, sobre todo las presentes en altos niveles, pueden ser incorporadas en forma pasiva en las vesículas COPII y transportadas hacia el Golgi (pasos 1 y 2). Muchas de tales proteínas portan una secuencia KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) C-terminal (rojo) que les permite retornar. El receptor de KDEL, localizado principalmente en la red *cis*-Golgi y tanto en las vesículas COPII como en las COPI, une proteínas que portan la señal de clasificación KDEL y las regresa hacia el RE (pasos 3 y 4). Este sistema de devolución evita el agotamiento de las proteínas luminales del RE como las que se necesitan para el plegamiento apropiado de las proteínas secretorias recién sintetizadas. La afinidad de unión del receptor de KDEL es muy sensible al pH. La pequeña diferencia entre el pH del RE y el del Golgi favorece la fijación de las proteínas que portan KDEL al receptor en las vesículas derivadas del Golgi y su liberación en el RE. (Adaptado de J. Semenza et al., 1990, *Cell* 61:1349.)

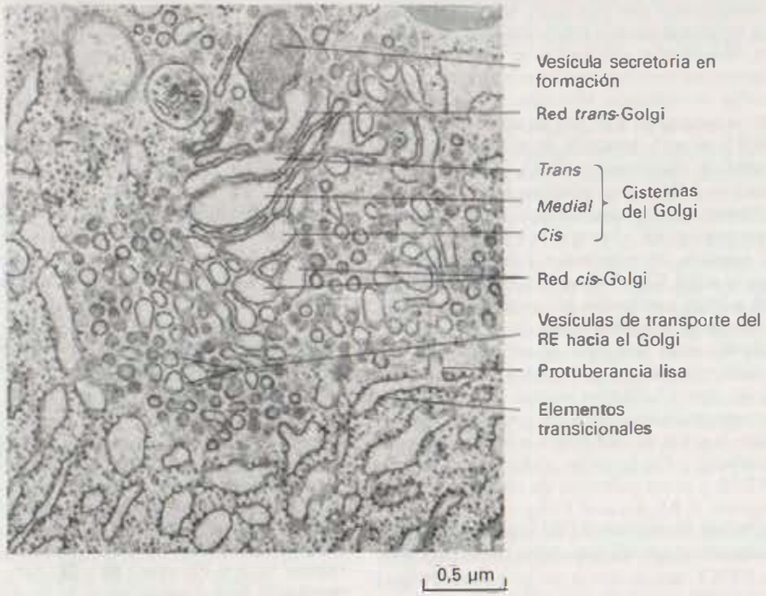
TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Tránsito del receptor KDEL

El transporte anterógrado a través del Golgi se produce mediante progresión cisternal

En un momento se pensó que las pequeñas vesículas de transporte transportaban proteínas de secreción desde la red *cis* hasta la red *medial* del Golgi y desde la red *medial* hasta la red *trans* del Golgi. En efecto, la microscopia electrónica revela muchas pequeñas vesículas asociadas con el complejo de Golgi que mueven proteínas desde un compartimiento del Golgi al otro (fig. 17-17). Sin embargo, estas vesículas muy probablemente median el transporte retrógrado, recuperando enzimas del RE o del Golgi desde un compartimiento posterior y transportándolas a un compartimiento anterior en la vía secretoria. De esta forma las enzimas que modifican las proteínas secretorias vuelven a ser localizadas en el compartimiento correcto.

La primera evidencia de que el transporte de proteínas carga hacia adelante desde el *cis*- hacia el *trans*-Golgi tiene lugar mediante un mecanismo no vesicular, denominado *progresión cisternal*, provino del análisis microscópico cuidadoso de la síntesis de la pared celular de las algas. Las glucoproteínas de la pared celular son ensambladas en el *cis*-Golgi en grandes complejos visibles con el microscopio electrónico llamados escamas. Al igual que otras proteínas secretorias, las escamas recién constituidas se mueven desde el *cis*- hacia el *trans*-Golgi, pero pueden ser 20 veces más grandes que las vesículas de transporte comunes que brotan de las cisternas del Golgi. De manera similar, en la síntesis del colágeno por los fibroblastos, a menudo se forman grandes agregados del precursor procolágeno en la luz del *cis*-Golgi (véase fig. 6-20). Los agregados de procolágeno son demasiado grandes para ser incorporados a pequeñas vesículas de transporte, y los investigadores nunca pudieron encontrar tales agregados en esas vesículas. Estas observaciones sugirieron que el movimiento hacia adelante de éstas y quizá de todas las proteínas secretorias de un compartimiento del Golgi a otro *no* sucede a través de pequeñas vesículas.

En un análisis del modelo de progresión cisternal, se bloqueó el plegamiento del colágeno con un inhibidor de la hidroxilación de prolina, y poco después se secretaron de la célula los agregados de todo el colágeno preelaborado ya plegado. Cuando se eliminó el inhibidor, los péptidos de procolágeno recién sintetizados se plegaron y formaron agregados en el *cis*-Golgi que pudieron verse luego moviéndose como una "onda" desde las cisternas *cis*- a través de las *intermedias* hacia el *trans*-Golgi, seguida por su secreción e incorporación a la matriz extracelular. En estos experimentos los agregados de procolágeno nunca fueron visibles en las pequeñas vesículas de transporte. Numerosas preguntas controversiales relacionadas con el flujo de la membrana dentro de los sáculos de Golgi permanecen sin resolver. Sin embargo, el movimiento observado de los grandes ensamblajes macromoleculares a través del apilamiento de sáculos del Golgi y la evidencia previamente descrita de que las vesículas COPI median el transporte retrógrado han llevado a la mayoría de los investigadores a privilegiar el modelo de progresión cisternal.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 17-17 La microfotografía electrónica del complejo de Golgi en una célula exocrina del páncreas revela las vesículas de transporte tanto anterógrado como retrógrado. Se puede ver la formación de una vesícula secretoria grande a partir de la red *trans*-Golgi. Los elementos del RE rugoso se encuentran sobre la izquierda. Adyacente al RE rugoso se observan elementos transicionales desde los cuales parecen brotar protuberancias lisas. Estos brotes forman las vesículas pequeñas que transportan proteínas secretorias desde el RE rugoso hasta el complejo de Golgi. Entre las cisternas del Golgi se encuentran diseminadas vesículas pequeñas que ahora se sabe participan en el transporte retrógrado, no en el anterógrado. (Cortesía de G. Palade.)

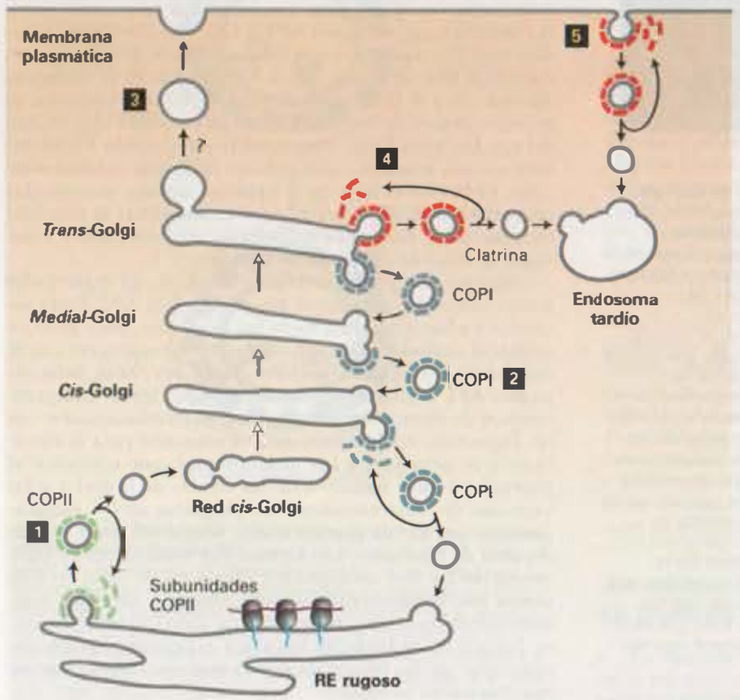
CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 17.3

Tránsito vesicular en las etapas iniciales de la vía secretoria

- Las vesículas COPII transportan proteínas desde el RE rugoso hacia el *cis*-Golgi; las vesículas COPI transportan proteínas en la dirección inversa (véase fig. 17-14).
- Las cubiertas COPII comprenden tres componentes: la proteína pequeña Sar1 de unión a GTP, un complejo Sec23/Sec24 y un complejo Sec13/Sec31.
- Los componentes de la cubierta COPII se unen a las proteínas carga de membrana que contienen una señal diacídica u otra señal de clasificación en sus regiones citosólicas (véase fig. 17-15). Las proteínas carga solubles probablemente son dirigidas a las vesículas COPII mediante unión a un receptor proteico de membrana.
- Las proteínas de membrana necesarias para formar las vesículas COPII pueden recuperarse desde el *cis*-Golgi mediante vesículas COPI. Una de las señales de clasificación que dirigen las proteínas de membrana a vesículas COPI es una secuencia KKXX, la cual se une a subunidades de la cubierta COPI.
- Muchas proteínas solubles residentes en el RE contienen una señal de clasificación KDEL. La unión de esta secuencia de recuperación a una proteína receptora específica en la membrana *cis*-Golgi recluta proteínas del RE mal clasificadas hacia el interior de las vesículas COPI retrógradas (véase fig. 17-16).
- Las vesículas COPI también transportan proteínas residentes en el Golgi desde compartimientos posteriores a los anteriores en el apilamiento sacular del Golgi.
- Las proteínas solubles y de membrana avanzan a través del complejo del Golgi mediante progresión cisternal, un proceso no vesicular de transporte anterógrado.

17.4 Clasificación y procesamiento de proteínas en las etapas finales de la vía secretoria

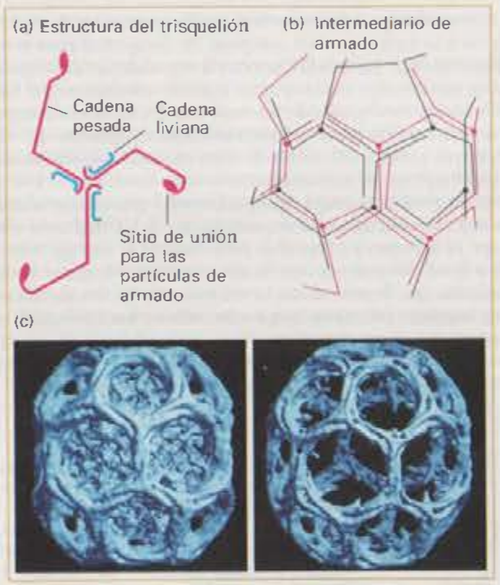
A medida que las proteínas carga se mueven desde la cara *cis* a la cara *trans* del complejo de Golgi mediante progresión cisternal, las modificaciones a sus cadenas de oligosacáridos son llevadas a cabo por las enzimas residentes en el Golgi. El tránsito retrógrado de las vesículas COPI desde compartimientos tardíos hacia compartimientos tempranos del Golgi mantiene niveles suficientes de estas enzimas modificadoras de carbohidraros en sus compartimientos funcionales. Por último, las proteínas carga apropiadamente procesadas alcanzan la red *trans*-Golgi, el compartimiento del Golgi más distal. Aquí se agrupan en vesículas para realizar la entrega a su destino final. En esta sección analizamos los diferentes tipos de vesículas que brotan desde la red *trans*-Golgi, los mecanismos que segregan proteínas carga entre ellas y los eventos de procesamiento clave que se producen más adelante en la vía secretoria. Los pasos de transporte mediados por los principales tipos de vesículas cubiertas se resumen en la figura 17-18.



◄ Fig. 17-18. Participación de los tres tipos principales de proteínas de cubierta en el tránsito vesicular de las vías secretoria y endocítica. Después de la formación de las vesículas por gemación de una membrana donadora, las cubiertas se despolimerizan en sus subunidades, que son reutilizadas para formar vesículas de transporte adicionales. Las vesículas COPII (**1**) median el transporte anterógrado desde el RE rugoso a la red *cis*-Golgi/*cis*-Golgi. Las vesículas COPI (**2**) median el transporte retrógrado dentro del Golgi y desde el *cis*-Golgi/*cis*-Golgi al RE rugoso. Las proteínas de la cubierta que rodean las vesículas secretorias (**3**) aún no están bien caracterizadas; estas vesículas transportan proteínas secretadas y proteínas de la membrana plasmática desde la red *trans*-Golgi hacia la superficie celular. Las vesículas cubiertas con clatrina (rojo) brotan desde la red *trans*-Golgi (**4**) y desde la membrana plasmática (**5**), después de quedar sin la cubierta, estas vesículas se fusionan con los endosomas tardíos. La cubierta sobre la mayoría de las vesículas de clatrina contiene proteínas adicionales que no se indican aquí. Nótese que las proteínas secretorias se mueven desde el *cis*-Golgi al *trans*-Golgi mediante progresión cisternal, que no está mediada por vesículas. (Véase H. Pelham, 1997, *Nature* 389:17, y J. F. Presley et al., 1997, *Nature* 389:81.)

Las vesículas recubiertas de clatrina, de proteínas adaptadoras o de ambas median varios pasos del transporte

Las vesículas mejor caracterizadas que brotan desde la red *trans*-Golgi (TGN) tienen una cubierta de dos capas: una exterior compuesta de la proteína fibrosa clatrina y una interna compuesta de *complejos de proteínas adaptadoras (AP)*. Las moléculas de clatrina purificadas, que tienen una forma de tres brazos, se llaman *trisqueliones*, que en griego significa con tres extremidades (fig. 17-19a). Cada extremidad contiene una cadena pesada (PM 180.000) y una cadena liviana de clatrina (PM ≈35.000-40.000). Los trisqueliones se polimerizan para formar un enrejado poligonal con una curvatura intrínseca (fig. 17-19b). Cuando la clatrina polimeriza sobre una membrana donadora, lo hace en asociación con los complejos AP. Cada complejo AP (PM 340.000) contiene una copia de cuatro subunidades diferentes de proteína adaptadora. Una asociación específica entre el dominio globular en el extremo de cada cadena pesada de clatrina en un trisquelión y una subunidad del complejo AP promueve el coensamblaje de los trisqueliones de clatrina con complejos AP y contribuye a la estabilidad de la cubierta vesicular completa (fig. 17-19c).



▲ **Fig. 17-19. Estructura de las cubiertas de clatrina.** (a) Una molécula de clatrina, denominada trisquelión, está compuesta de tres cadenas pesadas y tres cadenas livianas. Tiene una curvatura intrínseca debida a la curvatura de las cadenas pesadas. (b) La cubierta de clatrina fibrosa alrededor de las vesículas está constituida por 36 trisqueliones de clatrina. Aquí se representa un intermediario en el ensamblaje de la cubierta de clatrina, que contiene 10 de los 36 trisqueliones finales, que ilustran la curvatura intrínseca y el empaquetamiento de los trisqueliones de clatrina. (c) Las cubiertas de clatrina se formaron in vitro al mezclar las cadenas livianas y pesadas de clatrina purificada con complejos AP2 en ausencia de membranas. Mediante procesamiento digital de imágenes se analizaron las microfotografías electrónicas de más de mil partículas ensambladas para generar una representación estructural promedio. La imagen izquierda muestra la estructura reconstruida de una partícula completa con complejos AP2 envuelta por la jaula de clatrina. En la imagen derecha, los complejos AP2 fueron sustraídos para mostrar sólo las cadenas pesadas y livianas de clatrina ensambladas. [Véase B. Phishvaee y G. Payne, 1998, *Cell* 95 443. Parte (c) de Corinne J. Smith, Department of Biological Sciences, University of Warwick.]

Al unirse a la cara citosólica de las proteínas de membrana, las proteínas adaptadoras determinan cuáles proteínas carga se incluyen específicamente en una vesícula de transporte o se excluyen de ella. Cada tipo de complejos AP (p. ej., AP1, AP2, AP3) y las GGA recién identificadas están compuestos por proteínas diferentes aunque relacionadas. Se descubrió que las vesículas que contienen cada complejo median pasos de transporte específicos (véase cuadro 17-1). Todas las vesículas cuyas cubiertas contienen uno de estos complejos utilizan ARF para iniciar el ensamblaje de la cubierta sobre la membrana donadora. Como ya se dijo, la ARF también inicia el ensamblaje de la cubierta COPI. Todavía no se comprenden bien las características adicionales de la membrana o de los factores proteicos que determinan cuál tipo de cubierta se ensamblará después de la adhesión de AR .

Las vesículas que brotan desde la red *trans*-Golgi hacia el lisosoma por la vía del endosoma tardío tienen cubiertas de clatrina asociadas con AP1 o GGA. Tanto AP1 como GGA se unen al dominio citosólico de las proteínas carga en la membrana donadora, pero las diferencias funcionales entre las vesículas que contienen AP1 o GGA no son claras. Estudios recientes mostraron que las proteínas de membrana que contienen una secuencia Tyr-X-X-Φ, donde X es cualquier aminoácido y Φ es un aminoácido hidrófobo voluminoso, se reclutan dentro de las vesículas de clatrina/AP1 que brotan del retículo *trans*-Golgi. Esta *señal de clasificación YXXΦ* interactúa con una de las subunidades AP1 de la cubierta vesicular. Como trataremos en la siguiente sección, las vesículas con cubiertas de clatrina/AP2, que brotan desde la membrana plasmática durante la endocitosis, también pueden reconocer la señal de clasificación YXXΦ.

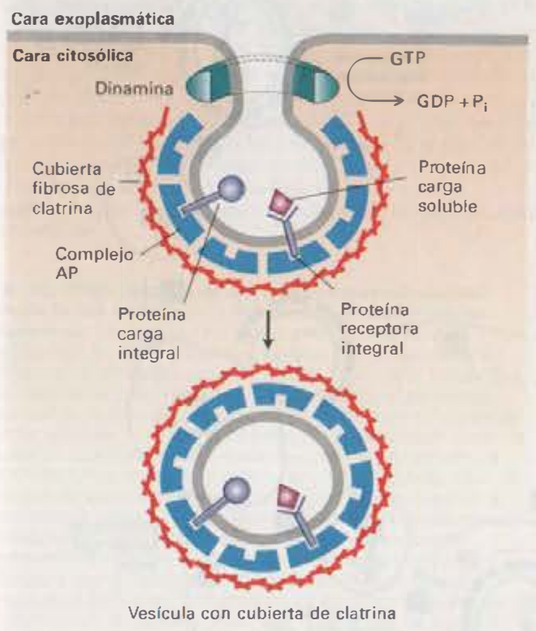
Algunas vesículas que brotan desde la red *trans*-Golgi tienen cubiertas compuestas por el complejo AP3. Estas vesículas median el tráfico hacia los lisosomas, pero parecen saltear el endosoma tardío y fusionarse directamente con la membrana lisosómica. En ciertos tipos de células, tales vesículas AP3 median el transporte de proteínas a compartimientos de almacenamiento especializado relacionados con los lisosomas. Por ejemplo, AP3 es necesaria para la distribución de proteínas a los melanosomas, que contienen el pigmento oscuro melanina de las células de la piel y a las vesículas de almacenamiento de plaquetas en los megacariocitos, una célula grande que se fragmenta para formar docenas de plaquetas. Los ratones con mutaciones en cualquiera de las dos subunidades diferentes de AP3 no sólo tienen una pigmentación cutánea anormal, sino que también sufren trastornos hemorrágicos. Esto último se produce porque las lesiones en los vasos sanguíneos no pueden repararse sin las plaquetas que contienen vesículas de almacenamiento normales.

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Nacimiento de una cubierta de clatrina

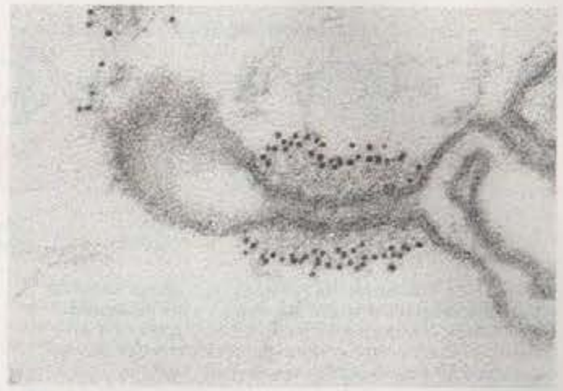
La dinamina es necesaria para el desprendimiento de las vesículas de clatrina

Un paso fundamental en la formación de una vesícula de transporte que aún no hemos considerado es cómo se desprende el brote vesicular de la membrana donadora. En el caso de las vesículas cubiertas de clatrina/AP, una proteína citosólica denominada *dinamina* es esencial para la liberación de las vesículas completas. En etapas posteriores a la formación del brote, la dinamina se polimeriza alrededor de la porción del cuello y luego hidroliza GTP. Se cree que la energía derivada de la hidrólisis de GTP regula la "contracción" de la dinamina alrededor del cuello de la vesícula hasta que ésta se separa (fig. 17-20). De manera interesante, las vesículas COPI y COPII parecen desprenderse de la membrana donadora sin la ayuda de una GTPasa como la dinamina. Hasta la fecha no se comprende esta diferencia fundamental en el proceso de desprendimiento de distintos tipos de vesículas.

La incubación de extractos celulares con un derivado no hidrolizable de GTP proporciona un indicio sensacional de la importancia que tiene la dinamina en la separación de las vesículas de clatrina/AP durante la endocitosis. Este tratamiento causa la acumulación de brotes vesiculares cubiertos de clatrina con cuellos excesivamente largos que están rodeados por dinamina polimérica, pero no se separan (fig. 17-21). Asimismo, las células que expresan formas mutantes de dinamina que no pueden unir GTP no forman vesículas cubiertas de clatrina y en cambio acumulan brotes vesiculares de cuellos largos encerrados con dinamina polimerizada.



▲ **Fig. 17-20. Modelo de "desprendimiento" de las vesículas recubiertas de clatrina/AP.** Después que se forma un brote vesicular, la dinamina se polimeriza sobre el cuello. Mediante un mecanismo que no es bien comprendido, la hidrólisis del GTP catalizada por la dinamina conduce a la liberación de la vesícula desde la membrana donadora. Nótese que las proteínas de la membrana donadora son incorporadas dentro de las vesículas al interactuar con complejos AP de la cubierta. (Adaptado de K. Takei et al., 1995, *Nature* 374:186.)

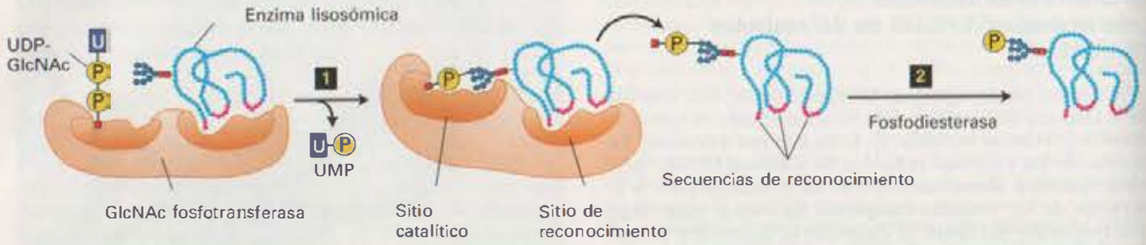


▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 17-21 La hidrólisis de GTP por la dinamina es necesaria para la separación de vesículas recubiertas de clatrina en los extractos libres de células.** Una preparación de terminaciones nerviosas, que realizan una marcada endocitosis, fue lisada mediante tratamiento con agua destilada y se incubó con GTP-γ-S, un derivado no hidrolizable de GTP. Después del seccionamiento la preparación se trató con anticuerpos antidinamina marcados con oro y se examinó con el microscopio electrónico. Esta imagen, que muestra un brote con cubierta de clatrina/AP de cuello largo con dinamina polimerizada que recubre el cuello, revela que los brotes pueden formarse en ausencia de la hidrólisis de GTP, pero las vesículas no pueden separarse. La polimerización extensa de la dinamina que ocurre en presencia de GTP-γ-S probablemente no se produce durante el proceso normal de gemación. (De K. Takei et al., 1995, *Nature* 374:186; cortesía de Pietro De Camilli.)

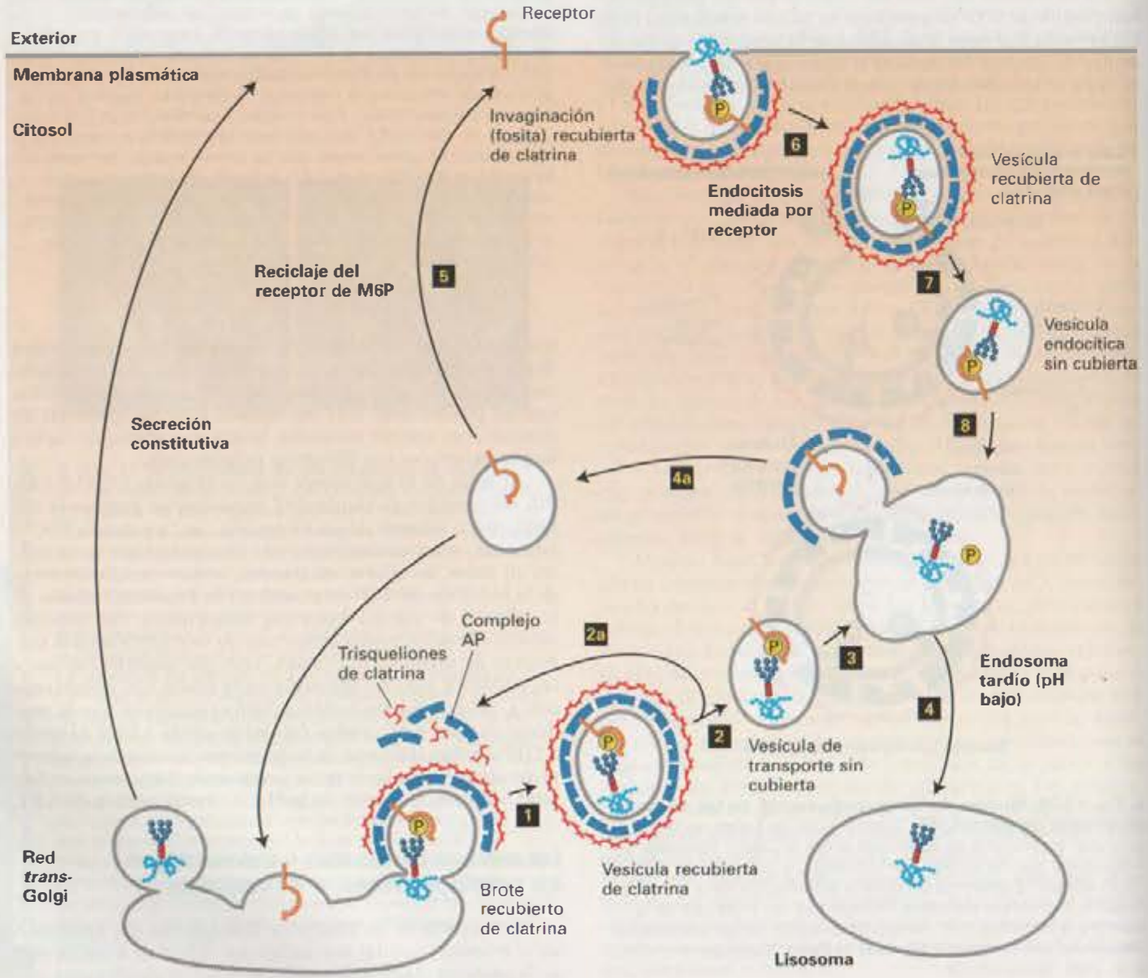
Al igual de lo que sucede con las vesículas COPI y COPII, las vesículas de clatrina/AP normalmente pierden la cubierta poco después de su formación. Se cree que la Hsc70 citosólica, una proteína chaperona constitutiva que se encuentra en todas las células eucariontes, utiliza energía derivada de la hidrólisis de ATP para conducir la despolimerización de la cubierta de clatrina hasta sus trisqueliones. Este proceso no sólo libera los trisqueliones para su reutilización en la formación de vesículas adicionales, sino que también expone a las v-SNARE para ser utilizadas en la fusión con membranas diana. Se cree que los cambios conformacionales que se producen cuando ARF cambia del estado unido a GTP al unido a GTP regulan el tiempo de la despolimerización de la cubierta de clatrina. Todavía no se comprende bien cómo podría estar acoplada la acción de la Hsc70 con el cambio de ARF.

Los residuos de manosa 6-fosfato dirigen las proteínas solubles a los lisosomas

La mayoría de las señales de clasificación que funcionan en el tránsito vesicular son secuencias cortas de aminoácidos en la proteína diana. En cambio, la señal de clasificación que



▲ Fig. 17-22. Formación de residuos de manosa 6-fosfato (M6P) que dirigen las enzimas solubles a los lisosomas. Los residuos M6P que dirigen las proteínas a los lisosomas se generan en el *cis*-Golgi mediante dos enzimas residentes del Golgi. Paso 1: Una *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) fosfotransferasa transfiere un grupo GlcNAc fosforilado al átomo de carbono 6 de uno o más residuos de manosa. Debido a que sólo las enzimas lisosómicas contienen secuencias (rojo) que son reconocidas y unidas por esta enzima, los grupos GlcNAc fosforilados se añaden específicamente a las enzimas lisosómicas. Paso 2: Luego de la liberación de la proteína modificada por la fosfotransferasa, una fosfodiesterasa elimina el grupo GlcNAc y deja un residuo de manosa fosforilado sobre la enzima lisosómica. (Véase A. B. Cantor et al., 1992, *J. Biol. Chem.* 267:23349, y S. Kornfeld, 1987, *FASEB J.* 1:462.)



◀ Fig. 17-23. Tránsito de enzimas lisosómicas solubles desde la red *trans*-Golgi y la superficie celular hacia los lisosomas. Las enzimas lisosómicas recién sintetizadas, producidas en el RE adquieren residuos de manosa 6-fosfato (M6P) en el *cis*-Golgi (véase fig. 17-22). Para mayor simplicidad, se representa sólo una cadena de oligosacáridos fosforilada, aunque las enzimas lisosómicas típicamente tienen muchas de estas cadenas. En la red *trans*-Golgi, las proteínas que portan la señal de clasificación M6P interactúan con los receptores de M6P de la membrana y en consecuencia son dirigidas hacia el interior de vesículas de clatrina/AP2 (paso 1). La cubierta de clatrina que rodea a estas vesículas liberadas se despolimeriza rápidamente (paso 2), y las vesículas de transporte sin cubiertas se fusionan con los endosomas tardíos (paso 3). Después que las enzimas fosforiladas se disocian de los receptores M6P y se desfosforilan, los endosomas tardíos se fusionan con un lisosoma (paso 4). Nótese que las proteínas de la cubierta y los receptores de M6P se reciclan (pasos 2a y 4a) y algunos receptores se envían a la superficie celular (paso 5). Las enzimas lisosómicas fosforiladas ocasionalmente se distribuyen desde el *trans*-Golgi hacia la superficie celular y se secretan. Estas enzimas secretadas pueden ser recuperadas por endocitosis mediada por receptor (pasos 6-8), un proceso que guarda estrecha semejanza con el tránsito de enzimas lisosómicas desde el reticulo *trans*-Golgi hacia los lisosomas. (Véase G. Griffiths et al., 1988, *Cell* 52:329; S. Kornfeld, 1992, *Ann. Rev. Biochem.* 61:307 y G. Griffiths y J. Gruenberg, 1991, *Trends Cell Biol.* 1:5.)

dirige las enzimas lisosómicas solubles desde la red *trasn*-Golgi al endosoma tardío es un residuo de carbohidratos, *manosa 6-fosfato (M6P)*, que se forma en el *cis*-Golgi. La adición y el procesamiento inicial de uno o más precursores de oligosacáridos *N*–ligados en el RE rugoso son los mismos para las enzimas lisosómicas que para las proteínas de membrana y las secretadas y produce cadenas con un núcleo de $Man_9(GlcNAc)_2$ (véase fig. 16-18). En la red *cis*-Golgi, los oligosacáridos *N*-ligados presentes en la mayoría de las enzimas lisosómicas experimentan una reacción de dos pasos secuenciales que genera residuos M6P (fig. 17-22). La adición de residuos M6P a las cadenas de oligosacáridos de enzimas lisosómicas solubles evita que estas proteínas experimenten las reacciones de procesamiento posteriores características de las proteínas de membrana y secretorias (véase fig. 17-3).

Como se muestra en la figura 17-23, la separación de enzimas lisosómicas que transportan M6P de las proteínas secretadas y de membrana se produce en la red *trasn*-Golgi. Aquí los *receptores de manosa 6-fosfato* unen los residuos M6P sobre las proteínas destinadas a los lisosomas en forma más fuerte y específica. Las vesículas de clatrina/AP1 que contienen el receptor M6P y las enzimas lisosómicas unidas brotan luego desde la red *trans*-Golgi, pierden sus cubiertas y se fusionan con el endosoma tardío mediante los mecanismos ya descritos. Debido a que los receptores de M6P pueden fijar M6P en el pH levemente ácido (≈6,5) de la red *trans*-Golgi, pero no en un pH menor de 6, las enzimas lisosómicas unidas se liberan dentro de los endosomas tardíos, que tienen un pH interno de 5,0-5,5. Más aún, una fosfatasa dentro de los endosomas tardíos suele eliminar el fosfato de los residuos M6P sobre las enzimas lisosómicas, con lo que evita cualquier refijación al receptor M6P que podría tener lugar a pesar del bajo pH en los endosomas. La gemación vesicular desde los endosomas tardíos recicla el receptor de M6P de regreso a la red *trans*-Golgi o, en ocasiones, a la superficie celular. Por último, los endosomas tardíos maduros se fusionan con los lisosomas y entregan las enzimas lisosómicas a su destino final.

La clasificación de enzimas lisosómicas solubles en la red *trans*-Golgi (veáse fig. 17-23, pasos 1-4) comparte muchas de las características del tráfico entre los compartimientos del RE y del *cis*-Golgi mediados por las vesículas COPII y COPI. Primero, la manosa 6-fosfato actúa como una señal de clasificación al interactuar con el dominio luminal de una proteína receptora en la membrana donadora. Segundo, los receptores incluidos en la membrana con sus ligandos unidos son incorporados en las vesículas apropiadas -en este caso, las vesículas de clatrina que contienen AP1– al interactuar con la cubierta vesicular. Tercero, estas vesículas de transporte se fusionan sólo con un orgánulo específico, aquí el endosoma tardío, como resultado de las interacciones entre v-SNARE y t-SNARE. Por último, los receptores de transporte intracelular se reciclan después de disociarse de los ligandos a los que están unidos.

El estudio de las enfermedades de almacenamiento lisosómico reveló componentes clave de la vía de clasificación lisosómica

MEDICINA

Un grupo de trastornos genéticos, denominados *enfermedades por almacenamiento lisosómico*, es causado por la ausencia de una o más enzimas lisosómicas. Como resultado, glucolípidos no digeridos y componentes extracelulares que normalmente serían degradados por enzimas lisosómicas se acumulan en los lisosomas en forma de grandes inclusiones. La enfermedad de *células I* (antes llamada mucolipidosis II) es un tipo muy grave de enfermedad por almacenamiento lisosómico en la cual faltan múltiples enzimas de los lisosomas. Las células de individuos afectados carecen de la *N*-acetilglucosamina fosfotransferasa necesaria para la formación de residuos M6P sobre las enzimas lisosómicas en el *cis*-Golgi (véase fig. 17-22). La comparación bioquímica de las enzimas lisosómicas de los individuos normales con las de los pacientes con la enfermedad de células I condujo al descubrimiento inicial de la manosa 6-fosfato como la señal de clasificación lisosómica. Al carecer de la señal de clasificación M6P, las enzimas lisosómicas de los pacientes con enfermedad de células I son secretadas en lugar de ser clasificadas y retenidas en los lisosomas.

Cuando se cultivan fibroblastos de pacientes con la enfermedad de células I en un medio que contiene enzimas lisosómicas portadoras de residuos de M6P, las células enfermas adquieren un contenido intracelular de enzimas lisosómicas casi normal. Esta observación indica que la membrana plasmática de esas células contiene receptores de M6P que pueden internalizar enzimas lisosómicas fosforiladas extracelulares mediante endocitosis mediada por receptor. Este proceso, utilizado por muchos receptores de la superficie celular para introducir proteínas o partículas unidas en la célula, se aborda en detalle en la siguiente sección. Actualmente se conoce que incluso en las células normales, algunos receptores de M6P se transportan a la membrana plasmática y algunas enzimas lisosómicas fosforiladas se secretan (véase fig. 17-23). Las enzimas secretadas pueden recuperarse mediante endocitosis mediada por receptor y dirigirse hacia los lisosomas. Por lo tanto, esta vía rescata cualquier enzima lisosómica que escapa a la vía de clasificación de la M6P habitual.

Los hepatocitos de los pacientes con la enfermedad de células I contienen un complemento normal de enzimas lisosómicas y ninguna inclusión, aun cuando estas células son defectuosas en la fosforilación de manosa. Este hallazgo implica que los hepatocitos (el tipo más abundante de célula del hígado) emplean una vía independiente de la M6P para clasificar las enzimas lisosómicas. Aún se desconoce la naturaleza de esta vía, que también puede funcionar en otros tipos celulares. ▮

La agregación de proteínas en el *trans*-Golgi puede funcionar para clasificar proteínas en las vesículas de secreción regulada

Como se explicó en la introducción del capítulo, todas las células eucariontes secretan continuamente ciertas proteínas, un proceso denominado *secreción constitutiva*. Las células secretorias especializadas almacenan otras proteínas también en vesículas y las secretan sólo cuando son activadas por un estímulo específico. Un ejemplo de esta *secreción regulada* tiene lugar en las células β pancreáticas, que almacenan insulina recién elaborada en vesículas secretorias especiales y secretan insulina en respuesta a una elevación de la glucosa en la sangre (véase fig. 15-7). Éstas y otras células secretorias utilizan simultáneamente dos clases diferentes de vesículas para mover proteínas desde la red *trans*-Golgi hacia la superficie celular: las vesículas de transporte regulado, a menudo denominadas simplemente vesículas secretorias, y las vesículas de transporte no regulado, también llamadas vesículas secretorias constitutivas.

Un mecanismo común parece clasificar proteínas reguladas tan diversas como la ACTH (hormona adrenocorticotrófica), la insulina y el tripsinógeno dentro de vesículas secretorias reguladas. La evidencia de un mecanismo común proviene de experimentos en los cuales se emplean técnicas de DNA recombinante para inducir la síntesis de insulina y tripsinógeno en células tumorales hipofisarias que ya están sintetizando ACTH. En estas células las tres proteínas se distribuyen en las mismas vesículas de secreción regulada y son segregadas juntas cuando una hormona se une a un receptor sobre las células hipofisarias y provocan un aumento del Ca^{2+} citosólico. Aunque estas tres proteínas no comparten una secuencia de aminoácidos idéntica que podría servir como una secuencia clasificatoria, obviamente tienen algún rasgo en común que señala su incorporación a las vesículas secretorias reguladas.

La evidencia morfológica sugiere que la clasificación en la vía regulada está controlada por la agregación selectiva de proteínas. Por ejemplo, las vesículas inmaduras de esta vía –las que recién brotaron desde la red *trans*-Golgi– contienen agregados difusos de proteínas secretadas que son visibles con el microscopio electrónico. Estos agregados también se encuentran en las vesículas que están en proceso de gemación, lo que indica que las proteínas destinadas a las vesículas secretorias se agregan juntas selectivamente antes de su incorporación a las vesículas.

Otros estudios han mostrado que las vesículas de secreción regulada de células secretorias de mamíferos contienen tres proteínas, *cromogranina A, cromogranina B* y *secretogranina II*, las cuales forman agregados al ser incubadas en las condiciones iónicas que, según se supone, ocurren en la red *trans*-Golgi (pH ≈6,5 y 1 mM Ca^{2+}). Estos agregados no se forman en el pH neutro del RE. La agregación selectiva de las proteínas de secreción regulada junto con la cromogranina A, la cromogranina B o la secretogranina II podría ser la base para la clasificación de estas proteínas dentro de las vesículas de secreción regulada. Las proteínas secretadas que no se asocian con estas proteínas y, por lo tanto, no forman agregados, serían clasificadas por defecto dentro de vesículas de transporte no regulado.

Algunas proteínas experimentan un procesamiento proteolítico después de dejar la red *trans*-Golgi

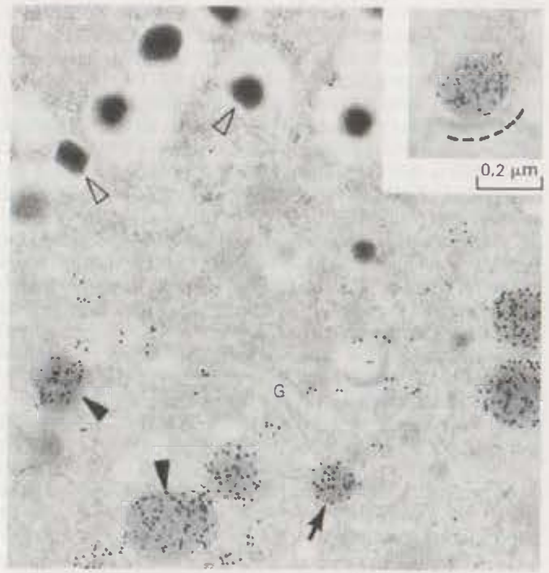
Para algunas proteínas secretorias (p. ej., hormona del crecimiento) y ciertas proteínas de membrana viral (p. ej., la glucoproteína VSV), el único corte proteolítico conocido necesario para convertir el polipéptido en la especie madura activa (véase fig. 16-6) es la eliminación de la secuencia señal N-terminal del RE de la cadena naciente. Sin embargo, algunas proteínas de membrana y muchas proteínas secretorias solubles inicialmente se sintetizan como precursores inactivos de vida relativamente larga, denominados *proproteínas*, que requieren procesamiento proteolítico adicional para generar las proteínas maduras activas. Ejemplos de proteínas que sufren este procesamiento son las enzimas lisosómicas solubles, muchas proteínas de membrana como la hemaglutinina del virus de la gripe (HA), y proteínas secretadas como la albúmina sérica, la insulina, el glucagón y el factor de apareamiento α de las levaduras. En general, la conversión proteolítica de una proproteína a la correspondiente proteína madura tiene lugar después que la proproteína ha sido clasificada y distribuida en la red *trans*-Golgi a las vesículas apropiadas.

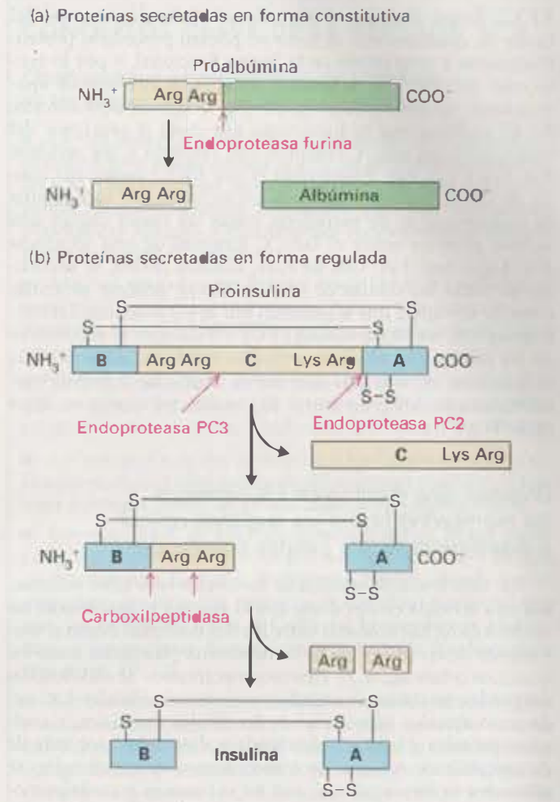
En el caso de enzimas lisosómicas solubles, las proproteínas se denominan *proenzimas*, que se clasifican por el receptor M6P como enzimas catalíticamente inactivas. En el endosoma tardío o en el lisosoma una proenzima sufre un corte proteolítico que genera un polipéptido menor, pero enzimáticamente activo. El retraso en la activación de las proenzimas lisosómicas hasta que alcanzan a los lisosomas evita que digieran macromoléculas en compartimientos tempranos de la vía secretoria.

Normalmente, las vesículas maduras que transportan proteínas secretadas a la superficie celular se forman por fusión de varias vesículas inmaduras que contienen proproteí-

▶ **FIGURA EXPERIMENTAL 17-24 La escisión proteolítica de la proinsulina tiene lugar en vesículas secretorias después de brotar del retículo *trans*-Golgi.** Secciones seriadas de la región del Golgi de una célula secretoria de insulina se tiñeron con (a) un anticuerpo monoclonal que reconoce la proinsulina, pero no la insulina o (b) un anticuerpo diferente que reconoce la insulina pero no la proinsulina. Los anticuerpos, que se unieron a partículas de oro opacas a los electrones, aparecen como puntos oscuros en estas microfotografías electrónicas (véase fig. 5-51). Las vesículas secretorias inmaduras (puntas de flechas llenas) y las vesículas que brotan desde el *trans*-Golgi (flechas) se tiñen con el anticuerpo antiproinsulina, pero no con el anticuerpo antiinsulina. Estas vesículas contienen agregados proteicos difusos que incluyen proinsulina y otras proteínas secretadas en forma regulada. Las vesículas maduras (puntas de flecha vacías) se tiñen con el anticuerpo antiinsulina, pero no con el anticuerpo antiproinsulina y tienen un centro (core) denso de insulina casi cristalina. Como las vesículas de secreción inmaduras contienen proinsulina (no insulina), la conversión proteolítica de proinsulina a insulina debe producirse en estas vesículas después de que éstas brotan desde la red *trans*-Golgi. El recuadro en (a) muestra una vesícula secretoria rica en proinsulina rodeada por una cubierta proteica (línea punteada). (De L. Orci et al. 1987, *Cell* 49:865; cortesía de L. Orci.)

nas. El corte proteolítico de las proteínas, como la proinsulina, se produce en las vesículas después de haberse movido lejos de la red *trans*-Golgi (fig. 17-24). Las proproteínas de la mayoría de las proteínas secretadas constitutivamente (p. ej., la albúmina) son cortadas sólo una vez en un sitio C-terminal con respecto a una secuencia dibásica de reconocimien-





▲ **Fig. 17-25. Procesamiento proteolítico de proproteínas en las vías de secreción regulada y constitutiva.** Los procesamientos de proalbúmina y de proinsulina son típicos de las vías constitutiva y regulada, respectivamente. Las endoproteasas que participan en estos procesamientos cortan el C-terminal en secuencias de dos aminoácidos básicos consecutivos. (a) La endoproteasa furina actúa sobre los precursores de proteínas secretadas en forma constitutiva. (b) Dos endoproteasas, la PC2 y la PC3, actúan sobre los precursores de proteínas secretadas en forma regulada. El procesamiento final de muchas de estas proteínas es catalizado por una carboxipeptidasa que elimina secuencialmente dos residuos de aminoácidos básicos en el C-terminal de un polipéptido. (Véase D. Steiner et al., 1992, *J. Biol. Chem.* 267:23435.)

to como Arg-Arg o Lys-Arg (fig. 17-25a). El procesamiento proteolítico de proteínas cuya secreción suele estar regulada involucra cortes adicionales. En el caso de la proinsulina, múltiples cortes de la cadena polipeptídica individual producen la cadena B N-terminal y la cadena A C-terminal de la insulina madura, que están conectadas por enlaces disulfuro, y el péptido central C, que se pierde y luego se degrada (fig. 17-25b).

El gran adelanto en la identificación de las proteasas responsables del procesamiento de proteínas secretadas provino de los análisis de las levaduras con una mutación en el gen

KEX2. Estas células mutantes sintetizaban el precursor del factor de apareamiento α, pero no podían procesarlo proteolíticamente y convertirlo en la forma funcional, y por lo tanto eran incapaces de aparearse con células del tipo de apareamiento opuesto (véase fig. 22-13). El gen de tipo silvestre *KEX2* codifica una endoproteasa que corta el precursor del factor α en un sitio C-terminal con respecto a los residuos Arg-Arg y Lys-Arg. Empleando el gen *KEX2* como una sonda de DNA, los investigadores pudieron clonar una familia de endoproteasas de mamífero, todas las cuales cortan una cadena proteica sobre el lado C-terminal de una secuencia Arg-Arg o Arg- Lys. Una de ellas, llamada *furina*, se encuentra en todas las células de los mamíferos; procesa proteínas como la albúmina que se secretan por la vía continua. En contraposición, las *endoproteasas PC2* y *PC3* sólo se encuentran en las células que exhiben secreción regulada; estas enzimas se localizan en vesículas secretorias reguladas y cortan proteolíticamente los precursores de muchas hormonas en sitios específicos.

Diversas vías distribuyen las proteínas de membrana hacia las regiones apical o basolateral de las células polarizadas

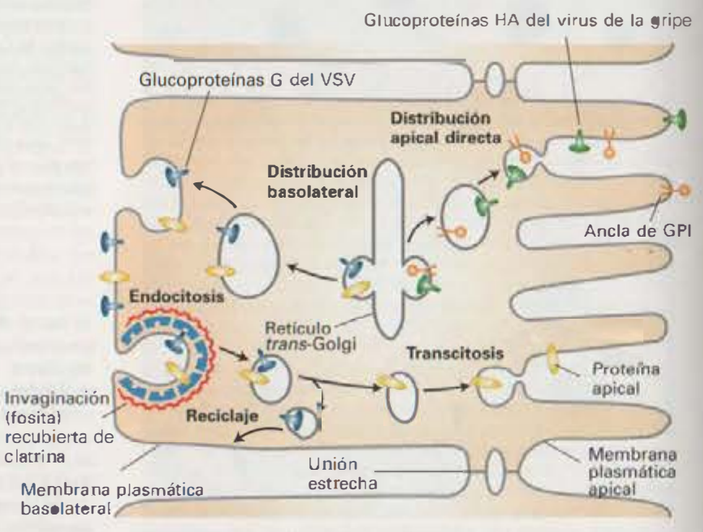
La membrana plasmática de las células epiteliales polarizadas está dividida en dos dominios: el apical y el basolateral; las uniones estrechas ubicadas entre los dos dominios evitan el movimiento de las proteínas de la membrana plasmática entre los dominios (véase fig. 6-5). Diversos mecanismos de clasificación dirigen las proteínas de membrana recién sintetizadas hacia el dominio apical o basolateral de las células epiteliales, y cualquier proteína puede ser clasificada y distribuida por más de un mecanismo. Aunque estos mecanismos de clasificación se entienden en forma general, aún no se conocen las señales moleculares que subyacen al transporte mediado por vesículas de proteínas de membrana en células polarizadas. Como resultado de esta clasificación y de la restricción del movimiento de proteínas dentro de las membranas plasmáticas debido a las uniones estrechas, diferentes conjuntos de proteínas se encuentran en el dominio apical o basolateral. Esta ubicación preferencial de ciertas proteínas de transporte es crítica para diversas funciones fisiológicas importantes, como la absorción de nutrientes desde la luz intestinal y la acidificación de la luz estomacal (véanse figs. 7-27 y 7-28).

Estudios microscópicos y de fraccionamiento celular indican que las proteínas destinadas ya sea a las membranas basolaterales o a las apicales inicialmente se ubican juntas dentro de las membranas de la red *trans*-Golgi. En ciertos casos, las proteínas destinadas a la membrana apical se clasifican y distribuyen dentro de sus propias vesículas de transporte que brotan de la red *trans*-Golgi y luego se mueven a la región apical, mientras que las proteínas destinadas a la membrana basolateral se clasifican y distribuyen en otras vesículas que se mueven a la región basolateral. Los diferentes tipos vesiculares pueden distinguirse mediante sus constituyentes proteicos, incluidas diferentes proteínas v-SNARE y Rab, que aparentemente las dirigían hacia el dominio de la membrana plasmática apropiado. En este mecanismo, la separación de proteínas destinadas a las membranas apicales o basolaterales tiene lugar a medida que las proteínas carga se incorporan a tipos particulares de brotes vesiculares desde la red *trans*-Golgi.

Esta clasificación apical-basolateral directa ha sido investigada en cultivos de células MDCK (*Madin-Darby canine kidney*), una línea de células epiteliales polarizadas cultivadas (véase fig. 6-6). En las células MDCK infectadas con el virus de la gripe, la progenie viral brota sólo desde la membrana apical, mientras que en las células infectadas con el virus de la estomatitis vesicular (VSV), la progenie viral brota sólo desde la membrana basolateral. Esta diferencia se debe a que la glucoproteína HA del virus de la gripe es trasladada desde el complejo de Golgi exclusivamente hacia la membrana apical mientras que la proteína G del VSV es transportada sólo hacia la membrana basolateral (fig. 17-26). Más aún, cuando el gen que codifica la proteína HA es introducido en células no infectadas mediante técnicas de DNA recombinante, todas las HA expresadas se acumulan en la membrana apical, lo que indica que la señal de clasificación y orientación reside en la misma glucoproteína HA y no en otras proteínas virales producidas durante la infección viral.

Entre las proteínas celulares que sufren una clasificación apical-basolateral similar en el Golgi se encuentran aquellas con un *anclaje de membrana de glucosilfosfatidilinositol (GPI)*. En las células MDCK y en la mayoría de los otros tipos de células epiteliales, las proteínas ancladas por GPI son dirigidas hacia la membrana apical. En las membranas las proteínas ancladas por GPI se agrupan formando rafts lipídicos ("balsas lipídicas"), ricos en esfingolípidos (véase fig 5-10). Este hallazgo sugiere que los rafts lipídicos se ubican en la membrana apical junto con proteínas que en muchas células se distribuyen preferentemente dentro de ellos. Sin embargo, el ancla GPI no es una señal de clasificación apical en todas las células polarizadas; en las células tiroideas, por ejemplo, las proteínas ancladas por GPI son dirigidas hacia la membrana basolateral. Aparte de las anclas GPI no se ha identificado ninguna secuencia que sea necesaria y suficiente para dirigir proteínas a los dominios apical o basolateral. En cambio, cada proteína de membrana puede contener múltiples señales de clasificación, cualquiera de las cuales puede orientarla y dirigirla hacia el dominio de membrana plasmática adecuado. Se está tratando de encontrar la identificación de esas señales complejas y de las proteínas de la cubierta vesicular para numerosas proteínas diferentes que son encasilladas en dominios específicos de la membrana plasmática de células epiteliales polarizadas.

Otro mecanismo para clasificar proteínas apicales y basolaterales, ilustrado en la figura 17-26, también funciona en los hepatocitos. Las membranas basolaterales de los hepatocitos están orientadas hacia la sangre (como en las células epiteliales intestinales), y las membranas apicales revisten los pequeños canales intercelulares por los cuales se secreta la bilis. En los hepatocitos, las proteínas apicales recién sintetizadas primero se transportan en vesículas desde la red *trans*-Golgi hacia la región basolateral y son incorporadas a la membrana plasmática mediante exocitosis (es decir, fusión de la membrana vesicular con la membrana plasmática). Desde allí, tanto las proteínas basolaterales como las apicales son endocitadas en las mismas vesículas, pero luego sus caminos divergen. Las proteínas basolaterales endocitadas se distribuyen a vesículas de transporte que las reciclan hacia la membrana basolateral. Por el contrario, las proteínas endocitadas destinadas a la apical son distribuidas a vesículas de transporte que se mueven a través de la célula y se fusionan con la membrana apical, un proceso denominado transcitosis. Como se comentará en la siguiente sección, la transcitosis también se emplea para mover materiales extracelulares de un lado de un epitelio a otro. Aun en las células epiteliales, como las células MDCK, en las cuales la clasificación de proteínas apicales-basolaterales tiene lugar en el Golgi, la transcitosis puede proporcionar un mecanismo "infalible". Es decir, una proteína apical distribuida de manera incorrecta hacia la membrana basolateral sería sometida a endocitosis y luego sería enviada correctamente a la membrana apical.



▶ Fig. 17-26. Distribución de proteínas destinadas a las membranas plasmáticas apical y basolateral de células polarizadas. Cuando células MDCK cultivadas son infectadas simultáneamente con el VSV y con el virus de la gripe, la glucoproteína G del VSV (violeta) se encuentra sólo sobre la membrana basolateral, mientras que la glucoproteína HA del virus de la gripe (verde) se encuentra sólo sobre la membrana apical. Lo mismo que estas proteínas, algunas proteínas celulares (círculos anaranjados), en especial aquellas con un ancla de GPI, son distribuidas directamente hacia la membrana apical y otras hacia la membrana basolateral (no mostrada) a través de vesículas de transporte específicas que brotan de la red *trans*-Golgi. En ciertas células polarizadas, algunas proteínas apicales y basolaterales se transportan juntas hacia la superficie basolateral; las proteínas apicales (óvalos anaranjados) se mueven luego selectivamente, por endocitosis y transcitosis, hacia la membrana apical. (Según K. Simons y A. Wandinger-Ness, 1990, *Cell* 62:207 y K. Mostov et al., 1992, *J. Cell Biol.* 116:577.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Separación de las cargas apical y basolateral en el Golgi de células vivas

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 17.4

Clasificación y procesamiento de proteínas en las etapas finales de la vía secretoria

- La red *trans*-Golgi (TGN) es un punto de ramificación principal en la vía secretoria donde las proteínas solubles secretadas, las proteínas lisosómicas, y en algunas células las proteínas de membrana destinadas para las membranas plasmáticas apicales o basolaterales son segregadas en diferentes vesículas de transporte.
- Muchas vesículas que brotan desde la red *trans*-Golgi, al igual que las vesículas endocíticas, portan una cubierta compuesta de complejos de AP (proteínas adaptadoras) y clatrina (véase fig. 17-19).
- El desprendimiento de las vesículas con cubierta de clatrina requiere dinamina, que forma un collar alrededor del cuello del brote vesicular e hidroliza GTP (véase fig. 17-20).
- Las enzimas solubles destinadas a los lisosomas son modificadas en el *cis*-Golgi produciendo múltiples residuos de manosa 6-fosfato (M6P) sobre sus cadenas de oligosacáridos.
- Los receptores de M6P en la membrana de la red *trans*-Golgi unen proteínas que portan residuos de M6P y dirigen su transferencia hacia los endosomas tardíos, donde los receptores y sus ligandos proteicos se disocian. Luego se reciclan los receptores hacia el Golgi o a la membrana plasmática, y las enzimas lisosómicas se envían a los lisosomas (véase fig. 17-23).
- Las proteínas secretadas en forma regulada se concentran y almacenan en vesículas secretorias para aguardar una señal hormonal o nerviosa que desencadene la exocitosis. La agregación de proteínas dentro de la red *trans*-Golgi puede cumplir un papel en la clasificación de proteínas secretadas hacia la vía regulada.
- Muchas proteínas transportadas a través de la vía secretoria sufren cortes proteolíticos posGolgi que generan las proteínas maduras activas. Por lo general, la maduración proteolítica puede producirse en las vesículas que transportan proteínas desde la red *trans*-Golgi hacia la superficie celular, en endosomas tardíos o en lisosomas.
- En las células epiteliales polarizadas, las proteínas de membrana destinadas a los dominios apical o basolateral de la membrana plasmática son distribuidas en la red *trans*-Golgi por diferentes vesículas de transporte (véase fig. 17-26). El ancla GPI es la única señal clasificadora apical-basolateral identificada hasta ahora.
- En los hepatocitos y en algunas otras células polarizadas, todas las proteínas de la membrana plasmática se dirigen primero a la membrana basolateral. Las proteínas destinadas a la región apical son posteriormente endocitadas y trasladadas a través de la célula hacia la membrana apical (transcitosis).

17.5 Endocitosis mediada por receptor y clasificación de las proteínas internalizadas

En secciones previas hemos visto las principales vías por las cuales las proteínas secretorias y de membrana sintetiza-

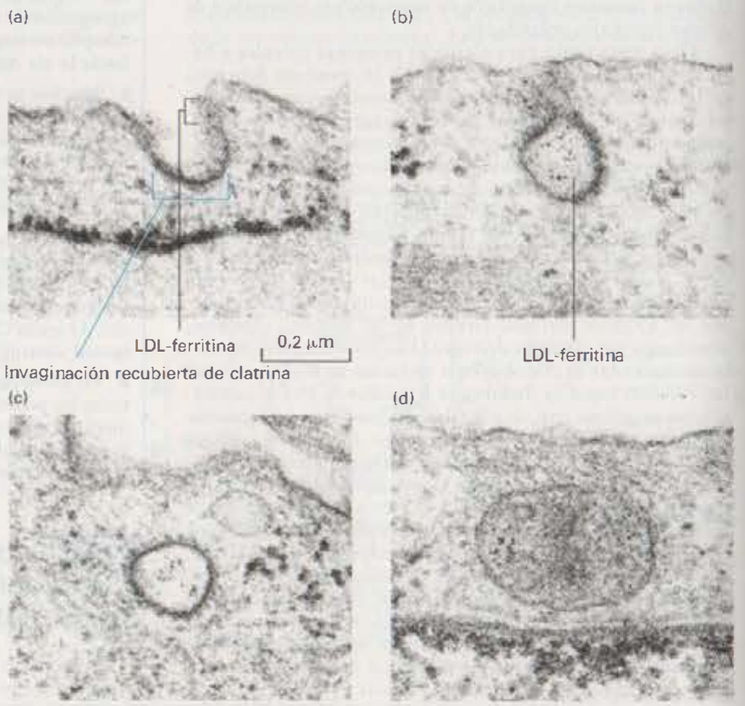
das sobre el RE rugoso son enviadas a la superficie celular o a otros destinos. Las células también pueden internalizar materiales de su entorno y distribuirlos hacia destinos particulares. Unos pocos tipos celulares (p. ej., los macrófagos) pueden incorporar una bacteria completa y otras partículas grandes mediante fagocitosis, un proceso no selectivo mediado por actina en el cual extensiones de la membrana plasmática envuelven el material ingerido, formando grandes vesículas denominadas fagosomas (véase fig. 5-20). En cambio, todas las células eucariontes se involucran continuamente en la endocitosis, un proceso en el cual una pequeña región de la membrana plasmática se invagina para formar una vesícula limitada por membrana de unos 0,05-0,1 μm de diámetro. En una forma de endocitosis, denominada *pinocitosis*, pequeñas gotas de líquido extracelular y cualquier material disuelto en él son incorporadas de manera no específica. Sin embargo, nuestra atención aquí se centra en la endocitosis mediada por receptor en la cual un receptor específico sobre la superficie celular se une fuertemente a un ligando macromolecular extracelular que reconoce; la región de la membrana plasmática que contiene el complejo receptor-ligando luego brota hacia adentro, se separa y se convierte en una vesícula de transporte.

Entre las macromoléculas comunes que las células de los vertebrados internalizan por endocitosis mediada por receptor están las partículas que contienen colesterol denominadas lipoproteínas de baja densidad (LDL); la transferrina, una proteína fijadora de hierro; muchas hormonas proteicas (p. ej., la insulina) y ciertas glucoproteínas. La endocitosis mediada por receptor de esos ligandos suele producirse a través de invaginaciones de membrana y vesículas recubiertas de clatrina/AP2 por un proceso similar al del empaquetamiento de enzimas lisosómicas por manosa 6-fosfato (M6P) en el retículo *trans*-Golgi (véase fig. 17-23). Como ya se dijo, algunos receptores de M6P se hallan sobre la superficie celular y participan en la endocitosis mediada por receptor de las enzimas lisosómicas que son secretadas. En general, las proteínas receptoras transmembrana que participan en la incorporación de ligandos extracelulares son internalizadas desde la superficie celular durante la endocitosis y luego se distribuyen y reciclan de regreso a la superficie celular, de manera similar al reciclaje de los receptores de M6P a la membrana plasmática y a la red *trans*-Golgi. La velocidad a la cual se internaliza el ligando está limitada por la cantidad de su receptor correspondiente sobre la superficie celular.

Las invaginaciones (fositas) de clatrina/AP2 constituyen alrededor del 2% de la superficie de células tales como los hepatocitos y los fibroblastos. Se han observado muchos ligandos internalizados en estas invaginaciones y vesículas, los cuales se cree que participan como intermediarios en la endocitosis de la mayoría (pero no de todos) los ligandos unidos a los receptores de la superficie celular (fig. 17-27). Algunos receptores se aglomeran por encima de las fositas cubiertas de clatrina aun en ausencia de ligando. Otros receptores se difunden libremente en el plano de la membrana plasmática, pero sufren un cambio conformacional cuando se unen al ligando, de manera tal que cuando el complejo receptor-ligando se difunde hacia el interior de una invaginación recubierta de clatrina queda allí retenido. En la misma fosita o vesícula cubierta pueden verse dos o más tipos de ligandos unidos a receptores, como el LDL y la transferrina.

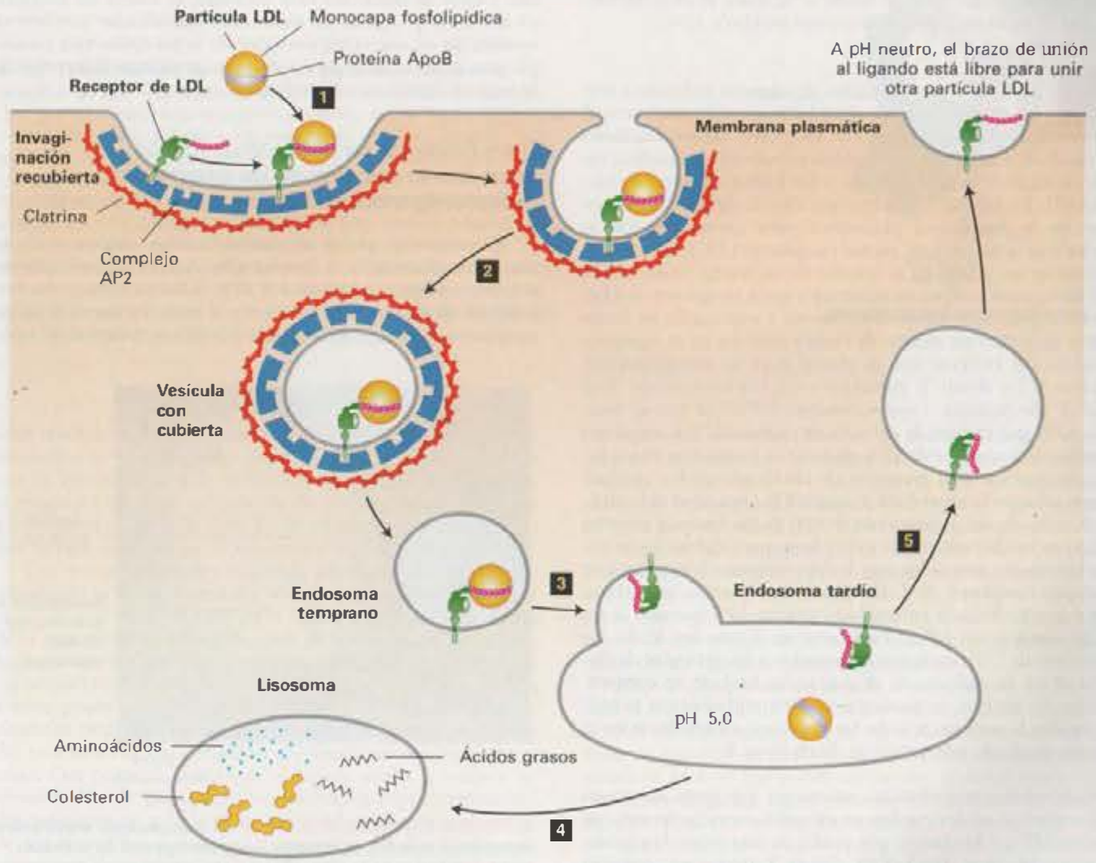
▶ FIGURA EXPERIMENTAL 17-27

Las etapas iniciales de la endocitosis mediada por receptores de partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL) son reveladas mediante microscopia electrónica. Se incubaron fibroblastos humanos cultivados en un medio que contenía partículas de LDL unidas en forma covalente a la ferritina, proteína electrodensa provista de hierro; cada partícula pequeña de hierro de la ferritina aparece como un pequeño punto si se observa con el microscopio electrónico. Las células inicialmente se incubaron a 4 °C; a esta temperatura las LDL pueden unirse a su receptor pero no se produce la internalización. Después de extraer el exceso de LDL no unido a las células mediante lavado, las células se calentaron a 37 °C y se prepararon para su observación con el microscopio a intervalos periódicos. (a) Invaginación recubierta que muestra la cubierta de clatrina sobre la superficie interior (citosólica) de la fosita, poco después de elevar la temperatura. (b) Invaginación que contiene LDL aparentemente cerrándose sobre sí misma para formar una vesícula cubierta. (c) Vesícula cubierta que contiene partículas LDL etiquetadas con ferritina. (d) Partículas de LDL etiquetadas con ferritina en un endosoma temprano de superficie lisa 6 minutos después de comenzada la internalización. (Fotografías cortesía de R. Anderson. Reimpresas con autorización de J. Goldstein et al. *Nature* 279:679. Copyright 1979, Macmillan Journals Limited. Véase también M. S. Brown y J. Goldstein, 1986, *Science* 232:34.)



Los receptores de lipoproteínas de baja densidad y otros ligandos contienen señales de clasificación que los marcan para la endocitosis

Como trataremos en detalle en el capítulo siguiente, la **lipoproteína de baja densidad (LDL)** es uno de varios complejos que transportan colesterol a través de la circulación sanguínea (véase fig. 17-28). Una partícula de LDL, una esfera de 20-25 nm de diámetro, tiene una capa fosfolipídica que contiene una única molécula de una proteína grande conocida como *apoB-100*; el centro de la partícula se empaqueta con ésteres de colesterol (véase fig. 18-12). La mayoría de las células de los mamíferos producen receptores de superficie celular que unen de manera específica la apoB-100 e internalizan partículas de LDL por endocitosis mediada por receptor. Después de la endocitosis, las partículas de LDL son transportadas a los lisosomas a través de la vía endocítica y luego son degradadas mediante hidrolasas lisosómicas. Los receptores de LDL, que se disocian de sus ligandos en los endosomas tardíos, se reciclan hacia la superficie celular.



▲ Fig. 17-28. Vía endocítica para la internalización de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Paso **1**: Los receptores LDL de la superficie celular se unen a una proteína apoB incluida en la capa fosfolipídica externa de partículas LDL. Las interacciones entre la señal de clasificación NPXY, en la cola citosólica del receptor de LDL y el complejo AP2 incorporan el complejo receptor-ligando dentro de vesículas endocíticas en formación. Paso **2**: Invaginaciones recubiertas de clatrina (o brotes) que contienen complejos receptor-LDL se desarrollan mediante el mismo mecanismo mediado por dinamina utilizado para formar vesículas de clatrina/AP1 sobre el retículo *trans*-Golgi (véase fig. 17-20). Paso **3**: Después que la cubierta de la vesícula se despolimeriza, la vesícula endocítica sin cubierta (endosoma temprano) se fusiona con el endosoma tardío. El pH ácido en este compartimiento provoca un cambio conformacional en el receptor de LDL que conduce a la liberación de la partícula LDL unida. Paso **4**: El endosoma tardío se fusiona con el lisosoma, y en el lisosoma las proteínas y lípidos de la partícula LDL libre se desintegran en sus partes constituyentes por medio de enzimas. Paso **5**: El receptor de LDL se recicla hacia la superficie celular donde al pH neutro del medio exterior el receptor sufre un cambio conformacional de manera tal que pueda unir otra partícula LDL. (Véase M. S. Brown y J. L. Goldstein, 1986, *Science* 232:34 y G. Rudenko et al., 2002, *Science* 298:2353.)

Los estudios del trastorno hereditario *hipercolesterolemia familiar* llevaron al descubrimiento de los receptores de LDL y a la comprensión inicial de la vía endocítica. Un individuo con este trastorno produce una de varias formas mutantes del receptor de LDL, provocando la endocitosis defectuosa de la LDL y altos niveles de colesterol en el suero (cap. 18). En la figura 17-28 se representan las principales características de la vía endocítica del LDL como se comprende actualmente. El receptor LDL es una glucoproteína de 839 residuos con un único segmento transmembrana; tiene un segmento citosólico C-terminal corto y un segmento exoplasmático N-terminal largo que contiene un dominio "superbarril" *(β-propeller)* y un dominio de unión al ligando. Siete repeticiones imperfectas ricas en cisteína forman el dominio de unión al ligando, el cual interactúa con la molécula apoB-100 en una partícula LDL.

MEDICINA

Los receptores mutantes de algunos individuos con hipercolesterolemia unen LDL normalmente, pero el complejo receptor-LDL no puede ser internalizado por la célula y se distribuye equitativamente en la superficie celular en lugar de estar confinado a las fositas cubiertas de clatrina/AP2. En los individuos con este tipo de defecto, los receptores de la membrana plasmática para otros ligandos se internalizan normalmente, pero el receptor de LDL mutante aparentemente no se recluta al interior de las fositas cubiertas. El análisis de estos receptores mutantes y otros receptores de LDL mutantes generados experimentalmente y expresados en fibroblastos identificó un motivo de cuatro residuos en el segmento citosólico del receptor que es crucial para su internalización: Asn-Pro-X-Tyr donde X puede ser cualquier aminoácido. Esta *señal de clasificación o reconocimiento NPXY* se une al complejo AP2, que conecta la cubierta de clatrina/AP2 al segmento citosólico del receptor de LDL durante la formación de las fositas de clatrina. Una mutación de cualquiera de los residuos conservados de la señal NPXY anulará la capacidad del receptor de LDL de ser incorporado dentro de las fositas cubiertas.

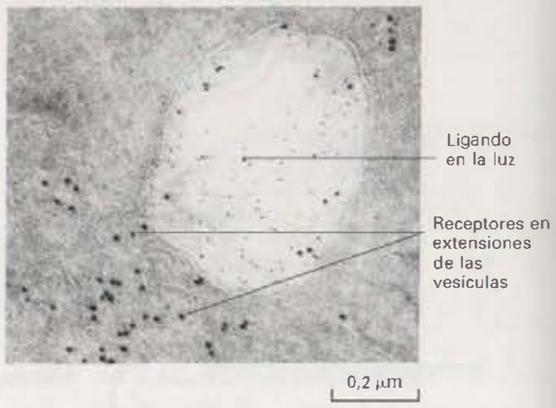
Un reducido número de individuos que exhiben los síntomas habituales asociados con la hipercolesterolemia familiar producen receptores de LDL normales. En estos individuos, el gen que codifica la subunidad proteica AP2 que une la señal de clasificación NPXY es defectuoso. Como resultado, los receptores de LDL no son incorporados a las vesículas de clatrina/AP2 y la endocitosis de partículas LDL se ve comprometida. El análisis de pacientes con estos trastornos genéticos resalta la importancia de las proteínas adaptadoras en el tránsito mediado por vesículas de clatrina. ▮

Los estudios mutacionales mostraron que otros receptores de la superficie celular pueden ser dirigidos a invaginaciones con clatrina/AP2 en formación por medio de una señal de reconocimiento diferente: Tyr-X-X-Φ, donde X puede ser cualquier aminoácido y Φ es un aminoácido hidrófobo voluminoso. Esta señal de clasificación YXXΦ en el segmento citosólico de una proteína receptora se une a una grieta específica en la subunidad μ2 del complejo AP2. Debido a que la tirosina y los residuos Φ median esta unión, una mutación en cualquiera de ellos reduce o anula la capacidad del receptor para ser incorporado a las invaginaciones recubiertas de clatrina/AP2. Más aún, si la proteína HA del virus de la gripe, que normalmente no es endocitada, se manipula genéticamente para que contenga esta secuencia de cuatro residuos en su dominio citosólico, la HA mutante es internalizada. Cabe recordar de nuestra presentación anterior que esa misma señal de clasificación recluta proteínas de membrana en las vesículas de clatrina/AP1 que brotan desde la red *trans*-Golgi mediante la unión a la subunidad μ1 de AP1 (véase cuadro 17-2). Todas estas observaciones indican que YXXΦ es una señal muy utilizada para distribuir y clasificar proteínas de membrana hacia las vesículas cubiertas de clatrina.

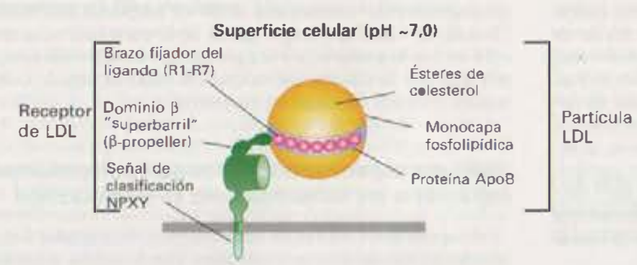
Sin embargo, en algunas proteínas de la superficie celular otras secuencias (p. ej., Leu-Leu) o moléculas de ubicuitina unidas de forma covalente señalizan la endocitosis. Entre las proteínas asociadas con las vesículas de clatrina/AP2, varias contienen dominios que específicamente se unen a la ubicuitina, y se ha planteado la hipótesis de que estas proteínas asociadas con las vesículas median la incorporación selectiva de proteínas de membrana ubicuitinizadas en vesículas endocíticas. Como se describirá más adelante, la marca de ubicuitina sobre las proteínas de membrana endocitadas también es reconocida en una etapa posterior de la vía endocítica y cumple una función en el envío de estas proteínas al interior de lisosomas donde son degradadas.

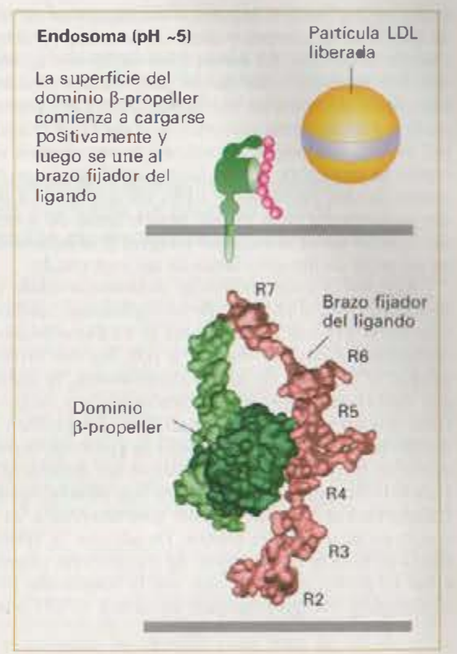
El pH ácido de los endosomas tardíos hace que la mayoría de los complejos receptor-ligando se disocien

La velocidad global de internalización endocítica de la membrana plasmática es bastante alta; los fibroblastos cultivados internalizan regularmente el 50% de las proteínas y los fosfolípidos de su superficie celular cada hora. La mayoría de los receptores de la superficie celular que sufren endocitosis deposi-



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 17-29 El microscopio electrónico demuestra que los complejos receptor-ligando se disocian en los endosomas tardíos. Células del hígado se perfundieron con un ligando de asialoglucoproteína y luego se fijaron y se seccionaron para su observación con el microscopio electrónico. Las secciones se tiñeron con anticuerpos específicos contra el receptor, marcados con partículas de oro de 8 nm de diámetro, para localizar el receptor y con anticuerpos específicos contra la asialoglucoproteína, unidos a partículas de oro de 5 nm de diámetro, para localizar el ligando (véase fig. 5-51). Como se ve en esta microfotografía electrónica de un endosoma tardío, el ligando (granos oscuros más pequeños) se localiza en la luz vesicular y el receptor de asialoglucoproteína (granos oscuros mayores) se localiza en las extensiones tubulares que brotan de la vesícula. (Cortesía de H. J. Geuze. Copyright 1983, M.I.T. Véase H. J. Geuze et al., 1983, *Cell* 32:277.)





▲ Fig. 17-30. Modelo de la unión de partículas LDL con el receptor de LDL dependiente del pH. Esquema del receptor de LDL que a pH neutro se encuentra en la superficie celular (*izquierda*) y a pH ácido se encuentra en el interior del endosoma tardío (*derecha*). En la superficie celular, el apoB-100 sobre la superficie de una partícula LDL se une fuertemente al receptor. De las siete repeticiones (R1-R7) del brazo fijador del ligando, la R4 y la R5 parecen las más críticas para la unión de LDL. Dentro del endosoma, se protonan residuos de histidina en el dominio *β-propeller* del receptor de LDL. El *β propeller* cargado positivamente puede unirse con alta afinidad al brazo fijador del ligando, que contiene residuos cargados negativamente, lo que provoca la liberación de la partícula LDL. (De Rudenko et al., 2002, *Science* 298:2353.)

sitan repetidamente sus ligandos dentro de la célula y luego son reciclados en la membrana plasmática, para mediar una vez más la internalización de moléculas del ligando. Por ejemplo, el receptor LDL hace un viaje de ida y vuelta hacia adentro y hacia afuera de la célula cada 10-20 minutos, para totalizar varios cientos de viajes en su tiempo de vida de 20 horas.

Los complejos receptor-ligando internalizados siguen comúnmente la vía representada por el receptor M6P en la figura 17-23 y el receptor LDL en la figura 17-28. Los receptores de la superficie celular se disocian de sus ligandos típicamente dentro de los endosomas tardíos, los cuales parecen vesículas esféricas con membranas tubulares ramificadas localizadas a unos pocos micrómetros de la superficie celular. Los experimentos originales que definieron la vesícula de distribución del endosoma tardío utilizaron el receptor de asialoglucoproteína. Esta proteína específica del hígado media la unión e internalización de glucoproteínas anormales cuyos oligosacáridos terminan en galactosa en lugar del ácido siálico normal, de ahí el nombre de asialoglucoproteína. Mediante observaciones con el microscopio electrónico de células hepáticas perfundidas con asialoglucoproteína se determinó que 5-10 minutos después de la internalización, las moléculas de ligando se encuentran en la luz de los endosomas tardíos, mientras que las extensiones de membrana tubular son ricas en receptores y rara vez contienen ligandos (fig. 17-29). Estas observaciones indican que el endosoma tardío es el orgánulo en el cual los receptores y los ligandos se desacoplan.

La disociación de los complejos receptor-ligando en los endosomas tardíos tiene lugar no sólo en la vía endocítica sino también en la distribución de enzimas lisosómicas solubles a través de la vía secretoria (véase fig. 17-23). Como se explicó en el capítulo 7, las membranas de los endosomas tardíos y los lisosomas contienen bombas de protones clase V que actúan en concierto con los canales del Cl^- para acidificar la luz vesicular (véase fig. 7-10). La mayoría de los receptores, incluidos el receptor M6P y los receptores de la superficie celular para las partículas LDL y para la asialoglucoproteína, unen sus ligandos fuertemente a pH neutro, pero liberan sus ligandos si el pH disminuye a 6,0 o menos. El endosoma tardío es la primera vesícula encontrada por los complejos receptor-ligando cuyo pH luminal es lo suficientemente ácido para promover la disociación de la mayoría de los receptores endocitados de sus ligandos fuertemente unidos.

Hoy se comprende en detalle el mecanismo mediante el cual el receptor LDL libera las partículas de LDL unidas (fig. 17-30). Al pH endosómico de 5,0-5,5, se protonan los residuos de histidina en el dominio *β-propeller* del receptor, formándose un sitio que puede unirse con afinidad alta a las repeticiones cargadas negativamente del dominio de unión al ligando. Esta interacción intramolecular secuestra las repeticiones en una conformación que no puede unirse simultáneamente a la apoB-100, lo que provoca así la liberación de la partícula LDL unida.

La vía endocítica distribuye el hierro a las células sin disociar el complejo receptor-transferrina en los endosomas

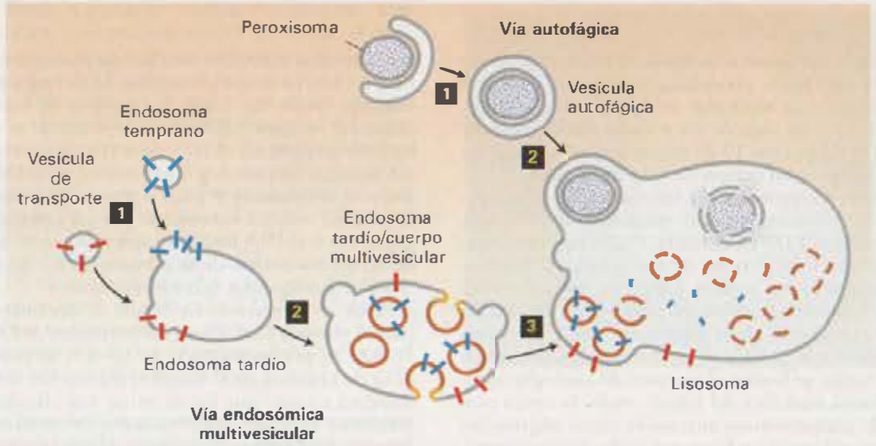
Una excepción al tema general de la disociación receptor-ligando dependiente del pH en los endosomas tardíos se produce en la vía endocítica que distribuye el hierro unido a la transferrina a las células. La transferrina, una importante glucoproteína de la sangre, transporta hierro a todas las células

de los tejidos desde el hígado (el principal sitio de acumulación de hierro en el cuerpo) y desde el intestino (el sitio donde se absorbe el hierro). La forma libre de hierro, *apotransferrina*, une dos iones Fe^{3+} con fuerza para formar *ferrotransferrina*. Las células de todos los mamíferos contienen receptores de superficie a transferrina que unen ávidamente ferrotransferrina a pH neutro, después de lo cual la ferrotransferrina unida al receptor se incorpora por endocitosis. Al igual que los componentes de una partícula de LDL, los dos átomos de Fe^{3+} unidos permanecen en la célula, pero la parte de apotransferrina del ligando no se disocia del receptor y se secreta de la célula en cuestión de minutos luego de ser endocitada.

Aunque la apotransferrina permanece unida al receptor de transferrina al pH bajo de los endosomas tardíos, los cambios en el pH son críticos para el funcionamiento de la vía endocítica. A un pH inferior a 6,0, los dos átomos de Fe^{3+} unidos se disocian de la ferrotransferrina, se reducen a Fe^{2+} por medio de un mecanismo desconocido y luego salen al citosol por un transportador endosómico específico para iones divalentes metálicos. El complejo receptor-apotransferrina remanente luego de la disociación de los átomos de hierro es reciclado de regreso hacia la superficie celular. Aunque la apotransferrina se une fuertemente a su receptor a un pH de 5,0 o 6,0, no se une a pH neutro. De ahí que la apotransferrina unida se disocie del receptor de transferrina cuando las vesículas en reciclaje se fusionan con la membrana plasmática y el complejo receptor-ligando encuentra el pH neutro del líquido intersticial extracelular o de un medio de crecimiento. El receptor reciclado luego queda libre para unir otra molécula de ferrotransferrina y la apotransferrina liberada es transportada por la circulación sanguínea hasta el hígado o el intestino para ser recargada con hierro.

Vesículas especializadas entregan componentes celulares a los lisosomas para su degradación

La principal función de los lisosomas es degradar los materiales extracelulares incorporados por la célula y los componentes intracelulares en ciertas condiciones. Los materiales por ser degradados deben ser enviados a la luz del lisosoma donde residen las diversas enzimas degradantes. Como se acaba de explicar, los ligandos endocitados (p. ej., las partículas LDL) que se disocian de sus receptores en el endosoma tardío ingresan posteriormente en la luz lisosómica cuando la membrana del endosoma tardío se fusiona con la membrana del lisosoma (véase fig. 17-28). De igual manera, los fagosomas que transportan las bacterias u otros materiales en forma de partículas pueden fusionarse con los lisosomas y liberar sus contenidos hacia la luz para la degradación. Sin embargo, el envío de las proteínas de membrana endocitadas y de los materiales citoplasmáticos a los lisosomas para la degradación presenta problemas especiales e involucra dos tipos inusuales de vesículas.



▲ Fig. 17-31. Envío de proteínas de la membrana plasmática y componentes citoplasmáticos al interior lisosómico para la degradación. *Izquierda:* Los endosomas tempranos que transportan proteínas de la membrana plasmática endocitadas (azul) y vesículas que transportan proteínas de la membrana lisosómica (rojo) desde el retículo *trans*-Golgi se fusionan con el endosoma tardío, transfiriendo sus proteínas de membrana a la membrana endosómica (paso 1). Las proteínas por ser degradadas son incorporadas a vesículas que brotan hacia *adentro* del endosoma tardío y forman finalmente un endosoma multivesicular que contiene muchas de tales vesículas internas (paso 2). La fusión de un endosoma multivesicular directamente con un lisosoma libera las vesículas internas hacia la luz del lisosoma donde pueden ser degradadas (paso 3). Debido a que las bombas de protones y otras proteínas de membrana lisosómicas normalmente no son incorporadas dentro de vesículas endosómicas internas, permanecen en las membranas lisosómicas y se mantienen protegidas de la degradación. *Derecha:* En la vía autofágica, una estructura con forma de copa se forma alrededor de porciones de citosol o de un orgánulo como un peroxisoma, como se muestra aquí. La adición continua de membranas conduce a la formación de una vesícula autofágica que envuelve su contenido con dos membranas completas (paso 1). La fusión de la membrana externa con la membrana de un lisosoma libera una vesícula de una sola capa y su contenido dentro del lisosoma (paso 2). (Véase F. Reggiori y D. J. Klionsky, 2002, *Eukaryot. Cell* 1:11 y D. J. Katzmann et al., 2002, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3:893.)

Endosomas multivesiculares. Las proteínas lisosómicas residentes, como las bombas de protones clase V y otras proteínas lisosómicas de membrana, pueden desempeñar sus funciones y permanecer en la membrana lisosómica donde están protegidas de la degradación por parte de las enzimas hidrolíticas solubles de la luz. Estas proteínas se envían a la membrana lisosómica mediante vesículas de transporte que brotan de la red *trans*-Golgi por el mismo mecanismo básico descrito en las secciones anteriores. En contraposición, las proteínas de membrana endocitadas que serán degradadas se transfieren en su totalidad al interior del lisosoma mediante un mecanismo de envío especializado. La degradación lisosómica de los receptores de la superficie celular que se unen a las moléculas de señalización extracelular, es un mecanismo común para regular la sensibilidad de las células a esas señales (cap. 13). Los receptores que se dañan también son marcados para la degradación lisosómica.

La evidencia inicial de que las membranas pueden ser enviadas a la luz de los compartimientos provino de microfotografías electrónicas que muestran las membranas vesiculares y fragmentos de membranas dentro de endosomas y lisosomas (véase fig. 5-20c). Experimentos paralelos en levaduras revelaron que las proteínas receptoras endocitadas enviadas a la vacuola (orgánulo equivalente al lisosoma en las levaduras) se asociaron principalmente con fragmentos de membrana y con pequeñas vesículas dentro de la vacuola más que con la membrana superficial de ésta.

Estas observaciones sugirieron que las proteínas de membrana endocitadas pueden ser incorporadas a vesículas especializadas que se forman en la membrana endosómica (fig. 17-31, *izquierda*). Aunque estas vesículas son similares en tamaño y aspecto a las vesículas de transporte, difieren topológicamente. Las vesículas de transporte brotan *hacia afuera* desde la superficie de un orgánulo donador hacia el citosol, mientras que las vesículas dentro del endosoma brotan *hacia adentro* desde la superficie hacia el interior de la luz (lejos del citosol). Los endosomas maduros que contienen numerosas vesículas en su interior se denominan *endosomas multivesiculares* (o cuerpos). Finalmente la membrana superficial de un endosoma multivesicular se fusiona con la membrana de un lisosoma y envían así sus vesículas internas y las proteínas de membrana que contiene hacia el interior del lisosoma para la degradación. Por lo tanto, la clasificación de proteínas en la membrana endosómica determina cuáles permanecerán sobre la superficie del lisosoma (p. ej., las bombas y los transportadores) y cuáles serán incorporadas a las vesículas internas y rara vez degradadas en los lisosomas.

Vesículas autofágicas. El envío de grandes cantidades de citosol o de orgánulos enteros a los lisosomas y su degradación posterior se conoce como *autofagia* ("comerse a sí mismo"). La autofagia es a menudo un proceso regulado suele ser inducido en células que se encuentran en condiciones de inanición u otros tipos de estrés y le permite a la célula reciclar macromoléculas para utilizarlas como nutrientes.

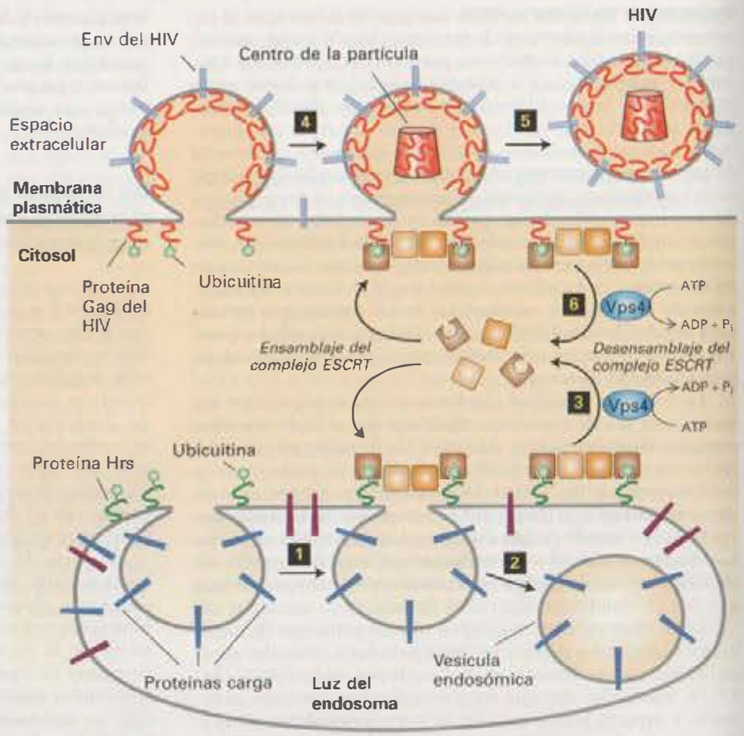
La vía autofágica comienza con la formación de una estructura con forma de copa de doble membrana plana (fig. 17-31, *derecha*). Esta estructura puede crecer por medio de fusión vesicular y luego sellarse para formar una vesícula autofágica que envuelve una región del citosol o un orgánulo entero (p. ej., un peroxisoma, una mitocondria). Si bien se desconoce el origen de las membranas que forman el orgánulo inicial con forma de copa y las vesículas que se le añaden, el endosoma en sí mismo es un candidato probable. La membrana externa de una vesícula autofágica puede fusionarse con el lisosoma enviando una vesícula grande, delimitada por una única bicapa de membrana, al interior del lisosoma. Las lipasas y las proteasas dentro del lisosoma degradarán finalmente esta vesícula y su contenido en sus componentes moleculares.

Los retrovirus brotan desde la membrana plasmática mediante un proceso similar a la formación de endosomas multivesiculares

Las vesículas que surgen por gemación hacia el interior de los endosomas tienen una tipología similar a la de las partículas virales con cubierta que brotan desde la membrana plasmática de las células infectadas con virus. Más aún, experimentos recientes demostraron que se necesita un conjunto común de proteínas para ambos tipos de eventos de gemación de la membrana. De hecho, los dos procesos se asemejan tanto entre sí en los detalles de sus mecanismos que sugieren que los virus con cubierta han desarrollado mecanismos para reclutar las proteínas celulares utilizadas en el brote endosómico hacia adentro para sus propios propósitos.

Muchas de las proteínas necesarias para la gemación hacia adentro de la membrana endosómica fueron identificadas por primera vez por mutaciones en las levaduras que bloqueaban el envío de proteínas de membrana hacia el interior de la vacuola. Se identificaron más de 10 de tales proteínas de "gemación" en las levaduras, la mayoría con similitudes significativas a las de las proteínas de los mamíferos que evidentemente realizan la misma función en estas células. El modelo actual de gemación endosómica para formar endosomas multivesiculares en las células de mamíferos se basa principalmente en estudios hechos en levaduras (fig. 17-32). Una proteína de membrana periférica del endosoma marcada con ubicuitina, conocida como Hrs, facilita la incorporación de proteínas carga de membrana ubicuitinizadas específicas dentro de brotes de vesículas dirigidos hacia el interior del endosoma. Luego la proteína Hrs ubicuitinizada recluta en la membrana un conjunto de tres complejos proteicos diferentes. Estos *complejos ESCRT* (*endosomal sorting complexes required for transport*: complejos clasificadores endosómicos necesarios para el transporte) incluyen la proteína de unión a ubicuitina Tsg101. Los complejos ESCRT asociados con la membrana completan la gemación vesicular y conducen a la liberación de una vesícula que transporta una carga de membrana específica hacia el interior del endosoma. Finalmente, una ATPasa, conocida como Vps4, utiliza la energía de la hidrólisis del ATP para desensamblar los complejos ESCRT, liberándolos hacia el citosol para otro ciclo de gemación. En el evento de fusión que "desprende" una vesícula endosómica completa, las proteínas ESCRT y Vps4 pueden funcionar como las SNARE y NSF, respectivamente, en los típicos procesos de fusión de membrana ya tratados (véase fig. 17-11).

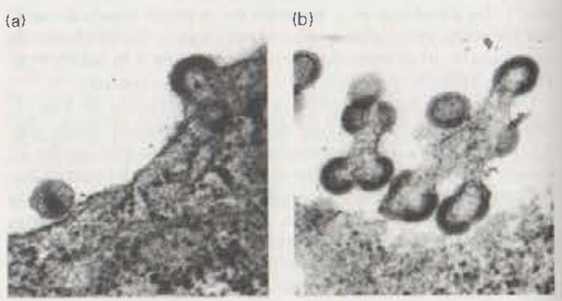
El virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) es un retrovirus con cubierta que brota de la membrana plasmática de células infectadas en un proceso conducido por la proteína Gag viral, el principal componente estructural de las partículas virales completas. La proteína Gag se une a la membrana plasmática de una célula infectada y unas ≈4000 moléculas Gag se polimerizan formando una cubierta esférica que pro-



▶ Fig. 17-32. Modelo del mecanismo común para la formación de endosomas multivesiculares y gemación del HIV desde la membrana plasmática. *Abajo:* En la gemación endosómica, las Hrs ubicuitinadas sobre la membrana endosómica dirigen la incorporación de proteínas "carga" de membrana especificas (azul) hacia el interior de los brotes vesiculares y luego reclutan los complejos ESCRT citosólicos hacia la membrana (paso 1). Nótese que tanto las Hrs como las proteínas carga reclutadas se marcan con ubicuitina. Después que el grupo de complejos ESCRT unidos median la fusión de la membrana y la separación de la vesícula completa (paso 2), son desensamblados por la ATPasa Vps4 y regresan al citosol (paso 3). *Arriba:* La gemación de partículas de HIV a partir de células infectadas con HIV se produce mediante un mecanismo similar que utiliza la proteína Gag codificada por el virus y los complejos celulares ESCRT y Vps4 (pasos 4-6). Las Gag ubicuitinadas cerca de una partícula de gemación funcionan como la Hrs. Para más detalles véase el texto. (Adaptado de O. Pornillos et al., 2002, *Trends Cell Biol.* 12:569.)

duce una estructura que se asemeja a un brote vesicular que protruye hacia afuera de la membrana plasmática. Los estudios mutacionales con HIV han revelado que se necesita el segmento N-terminal de la proteína Gag para la asociación con la membrana plasmática, mientras que el segmento C-terminal es necesario para "desprender" partículas de HIV completas. Por ejemplo, si la porción del genoma viral que codifica el C-terminal de la Gag es eliminado, se formarán brotes de HIV en células infectadas, pero no se produce la separación y por lo tanto no se liberan partículas virales.

El primer indicio de que la gemación del HIV emplea la misma maquinaria molecular que la gemación vesicular hacia el interior de los endosomas provino de la observación de que la Tsg101, un componente del complejo ESCRT, se une al C-terminal de la proteína Gag. Hallazgos posteriores establecieron claramente el paralelismo mecanicista entre los dos procesos (fig. 17-32). Por ejemplo, Gag es ubicuitinizada como parte del proceso de gemación viral y en las células con mutaciones en Tsg101 o Vps4, los brotes del virus de HIV se acumulan, pero no pueden separarse de la membrana (fig. 17-33). Más aún, cuando un segmento de la proteína Hrs celular se añade a una proteína Gag truncada, se restablece la gemación apropiada y la liberación de las partículas virales. Tomados en conjunto, estos resultados indican que la proteína Gag imita la función de Hrs, dirigiendo los complejos ESCRT hacia la membrana plasmática donde puede participar en la gemación de partículas virales.



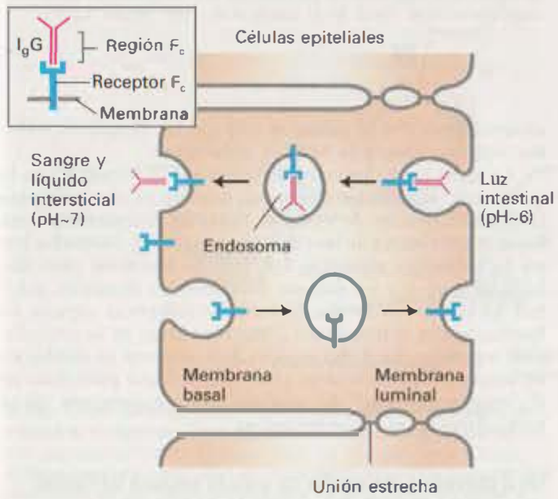
▶ Fig. 17-33. Microfotografías electrónicas de los virus que brotan de células de tipo silvestre y de células deficientes en ESCRT infectadas con HIV. (a) En las células de tipo silvestre infectadas con HIV, las partículas virales brotan de la membrana plasmática y son liberadas rápidamente hacia el espacio extracelular. (b) En las células que carecen de la proteína ESCRT funcional Tsg 101, la proteína Gag viral forma estructuras densas similares a virus, pero la gemación de estas estructuras desde la membrana plasmática no puede completarse y se acumulan cadenas de brotes virales incompletos aún adheridos a la membrana plasmática. (Wes Sundquist, University of Utah.)

Se demostró que otros retrovirus con cubierta, como el virus de la leucemia murina y el virus del sarcoma de Rous, también requieren complejos ESCRT para su gemación, aunque cada virus parece haber desarrollado un mecanismo de alguna manera diferente para reclutar complejos ESCRT en los sitios de gemación viral.

La transcitosis moviliza algunos ligandos endocitados a través de una capa de células epiteliales

Como ya se mencionó, algunas células utilizan la transcitosis en el proceso de distribución apical-basolateral de ciertas proteínas de membrana (véase fig. 17-26). Este proceso de transporte transcelular, que combina endocitosis y exocitosis, también puede utilizarse para transportar un ligando extracelular desde un lado de una célula, llevarlo a través del citoplasma y secretarlo desde la membrana plasmática en el lado opuesto. La transcitosis se produce principalmente en láminas de células epiteliales polarizadas.

Las inmunoglobulinas maternas (anticuerpos) contenidas en la leche materna ingerida se transportan a través de las células epiteliales intestinales de los neonatos de ratón y del ser humano mediante transcitosis (fig. 17-34). El receptor de F_c que media este movimiento une los anticuerpos ante el pH 6 (ácido) que se encuentra en la luz intestinal, pero no ante el pH neutro del líquido extracelular sobre el lado basal del epitelio intestinal. Esta diferencia en el pH del medio extracelular sobre los dos lados de las células epiteliales intestinales permite que las inmunoglobulinas maternas se muevan en una dirección: desde la luz hacia la sangre. El mismo proceso también mueve inmunoglobulinas maternas circulantes a través de las células del saco vitelino de los mamíferos hacia el feto.



▲ Fig. 17-34. Transcitosis de inmunoglobulinas IgG maternas a través de las células epiteliales intestinales de ratones recién nacidos. Este movimiento transcelular de un ligando involucra tanto la endocitosis como la exocitosis. El movimiento del ligando en un solo sentido desde la luz intestinal hacia la sangre depende de la afinidad diferencial del receptor F_c para el anticuerpo a pH 6 (unión fuerte) y a pH 7 (unión débil). La transcitosis en la dirección opuesta regresa el receptor F_c vacío hacia la membrana luminal. Para más detalles véase el texto.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 17.5

Endocitosis mediada por receptor y clasificación de las proteínas internalizadas

- Algunos ligandos extracelulares que se unen a receptores específicos de la superficie celular son internalizados, junto con sus receptores, en vesículas cubiertas de clatrina cuyas cubiertas también contienen complejos AP2.
- Las señales de clasificación en el dominio citosólico de los receptores de superficie celular los dirigen hacia las fositas cubiertas de clatrina/AP2 para la internalización. Las señales conocidas incluyen las secuencias Asn-Pro-X-Tyr, Tyr-X-X-Φ y Leu-Leu (véase cuadro 17-2).
- La vía endocítica envía algunos ligandos (p. ej., partículas LDL) a los lisosomas donde son degradados. La mayoría de los complejos receptor-ligando se disocian en el entorno ácido del endosoma tardío; los receptores se reciclan hacia la membrana plasmática, mientras que los ligandos se distribuyen hacia los lisosomas (véase fig. 17-28).
- El hierro se transporta hacia el interior celular mediante una vía endocítica en la cual los iones Fe^{3+} se liberan de la ferrotransferrina en el endosoma tardío. El complejo receptor-apotransferrina se recicla hacia la superficie celular donde se disocia, liberándose tanto el receptor como la apotransferrina para su reutilización.
- Las proteínas de membrana endocitadas destinadas para la degradación en los lisosomas son incorporadas a las vesículas que brotan hacia el interior del endosoma. Los endosomas multivesiculares, que contienen muchas de estas vesículas internas, pueden fusionarse con lisosmas para liberar las vesículas en el interior de los lisosomas (véase fig. 17-31).
- Una porción del citoplasma o un orgánulo entero (p. ej., el peroxisoma) puede ser envuelta por una membrana plana y finalmente quedar incorporada en una vesícula autofágica de doble membrana. La fusión de la membrana vesicular externa con el lisosoma entrega el contenido envuelto al interior del lisosoma para su degradación.
- Algunos de los componentes celulares (p. ej., los complejos ESCRT) que median la gemación hacia el interior de las membranas endosómicas se utilizan en la gemación y para "desprender" los virus con cubierta, como el HIV desde la membrana plasmática de las células infectadas con el virus (véase fig. 17-32).

17.6 Formación y función de las vesículas sinápticas

En esta sección final consideramos la secreción regulada de los neurotransmisores que es la base para la señalización por parte de muchas células nerviosas. Estas pequeñas moléculas

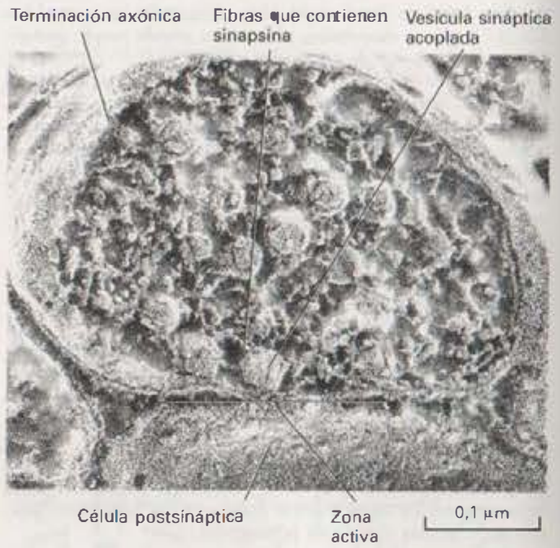
solubles en agua (p. ej., acetilcolina, dopamina) se liberan en las sinapsis químicas, sitios especializados de contacto entre una neurona señalizadora y una célula receptora. En general, las señales sólo se transmiten en una dirección: una terminación axónica de una *célula presináptica* libera moléculas neurotransmisoras que se difunden a través de un estrecho espacio extracelular (la hendidura sináptica) y se une a receptores sobre una *célula postsináptica* (véase fig. 7-31). La membrana de la célula postsináptica, que puede ser otra neurona, una célula muscular o una célula glandular, está localizada dentro de los 50 nm de la membrana presináptica aproximadamente.

Los neurotransmisores se almacenan en vesículas de secreción regulada especializadas, conocidas como *vesículas sinápticas*, que tienen 40-50 nm de diámetro. La exocitosis de estas vesículas y la liberación de neurotransmisores se inician cuando un impulso eléctrico estimulador (potencial de acción) viaja a lo largo del axón de una célula hasta la terminación axónica donde desencadena la apertura de los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje. El consiguiente aumento localizado de la concentración del Ca^{2+} citosólico induce a algunas vesículas sinápticas a fusionarse con la membrana plasmática, liberando su contenido hacia la hendidura sináptica. En el capítulo 7 describimos los principales eventos en la transmisión de señales a las sinapsis químicas y el efecto de la unión de neurotransmisores sobre las células postsinápticas. Aquí nos concentramos en la secreción regulada de neurotransmisores y la formación de vesículas sinápticas en el contexto de los principios básicos del tránsito vesicular ya desarrollado en este capítulo.

Las vesículas sinápticas cargadas con neurotransmisores se localizan cerca de la membrana plasmática

La exocitosis de los neurotransmisores de las vesículas sinápticas involucra eventos de selección y de fusión similares a los que conducen a la liberación de proteínas secretadas por la vía secretoria. Sin embargo, varios rasgos únicos permiten la liberación muy rápida de neurotransmisores en respuesta al arribo de un potencial de acción a la terminación axónica presináptica. Por ejemplo, en las neuronas en reposo algunas vesículas sinápticas cargadas de neurotransmisores están "estacionadas" sobre la membrana plasmática; otras se encuentran en reserva en la *zona activa* cerca de la membrana plasmática en la hendidura sináptica. Además, la membrana de las vesículas sinápticas contiene una proteína de unión al Ca^{2+} especializada que sensa el aumento del Ca^{2+} citosólico luego del arribo de un potencial de acción y desencadena la rápida fusión de vesículas estacionadas sobre la membrana presináptica.

En la terminación axónica una disposición de fibras citoesqueléticas altamente organizada ayuda a ubicar las vesículas sinápticas en la zona activa (fig. 17-35). Las mismas vesículas se conectan entre sí mediante *sinapsina*, una fosfoproteína fibrosa asociada con la superficie citosólica de las membranas de todas las vesículas sinápticas. Los filamentos de sinapsina también se irradian desde la membrana plasmática y se unen a la sinapsina asociada con la vesícula. Estas interacciones probablemente mantienen las vesículas sinápticas cercanas a la parte de la membrana plasmática orientada hacia la sinapsis. En efecto, los ratones *knockout* (inactivados) para sinapsina, aunque viables, son propensos a las convulsiones; durante la estimulación repetitiva de muchas neuronas de estos ratones, el número de vesículas sinápticas que se fusionan con la membrana plasmática se reduce



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 17-35 Algunas proteínas fibrosas ayudan a localizar las vesículas sinápticas en la zona activa de las terminaciones axónicas. En esta microfotografía de una terminación axónica obtenida mediante la técnica de congelación rápida y grabado profundo, se puede ver que las fibras de sinapsina interconectan las vesículas y conectan algunas a la zona activa de la membrana plasmática. Las vesículas acopladas están listas para ser exocitadas. Las ubicadas en el centro de la terminal se encuentran en proceso de ser llenadas con el neurotransmisor. (De D. M. D. Landis et al., 1988, *Neuron* 1:201.)

enormemente. Por lo tanto, se cree que las sinapsinas reclutan vesículas sinápticas hacia la zona activa.

La Rab3A, una proteína de unión a GTP localizada en la membrana de vesículas sinápticas, también es necesaria para el direccionamiento de vesículas llenas de neurotransmisores hacia la zona activa de las células presinápticas orientadas hacia la hendidura sináptica. Los ratones *knockout* para Rab3A, al igual que los ratones deficientes en sinapsina, exhiben un número reducido de vesículas sinápticas capaces de fusionarse con la membrana plasmática luego de la estimulación repetitiva. La Rab3 específica de neurona es similar en secuencia y función a otras proteínas Rab que participan en el "estacionamiento" de vesículas sobre membranas diana particulares en la vía secretoria.

Una proteína de unión al calcio regula la fusión de vesículas sinápticas con la membrana plasmática

La fusión de vesículas sinápticas con la membrana plasmática de las terminaciones axónicas depende de las mismas proteínas que median la fusión de las membranas de otras vesículas secretorias reguladas. Las principales v-SNARE de las vesículas sinápticas (VAMP) se unen fuertemente a la sintaxina y a la SNAP-25, las principales t-SNARE de la membrana

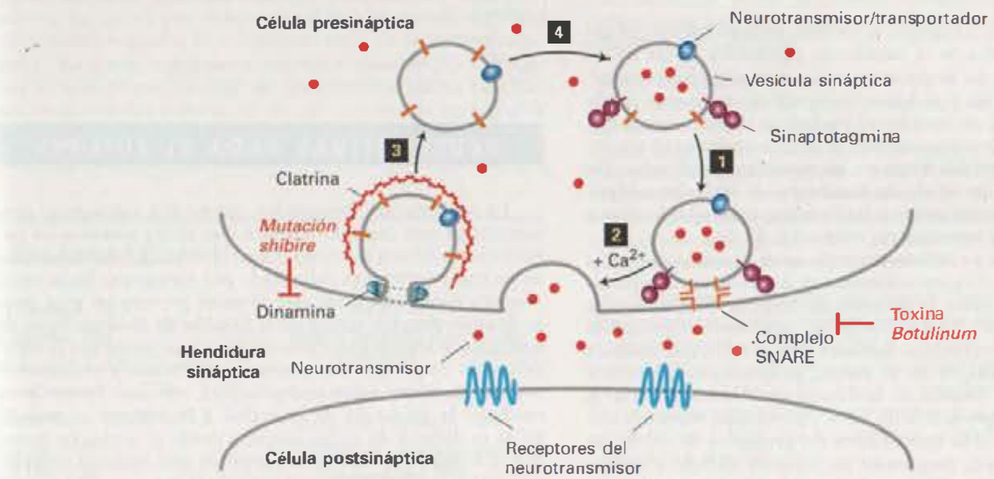
plasmática de las terminaciones axónicas, para formar complejos SNARE de cuatro hélices. Después de la fusión, las proteínas SNAP y NSF dentro de la terminación axónica promueven la disociación de la VAMP de las t-SNARE, como en la fusión de las vesículas secretorias ya representadas (véase fig. 17-11).

MEDICINA

A través del mecanismo de acción de la toxina botulínica, una proteína bacteriana capaz de producir parálisis y muerte, características del *botulismo*, un tipo de intoxicación alimenticia, se han obtenido firmes evidencias de la función de las VAMP en la exocitosis de los neurotransmisores. La toxina está compuesta de dos polipéptidos: uno se une a neuronas motoras que liberan acetilcolina en las sinapsis con células musculares, facilitando el ingreso del otro polipéptido, una proteasa, al citosol de la terminación axónica. La única proteína que corta esta proteasa es la VAMP. Después de que la proteasa botulínica ingresa en una terminción axónica, las vesículas sinápticas que no están realmente estacionadas pierden rápidamente su capacidad para fusionarse con la membrana plasmática debido a que el corte de VAMP evita el ensamblaje de complejos SNARE. El bloqueo resultante de la liberación de la acetilcolina en las sinapsis neuromusculares produce parálisis. Sin embargo, las vesículas que ya están estacionadas exhiben una notable resistencia a la toxina, lo que indica que los complejos SNARE pueden estar en un estado parcialmente ensamblado, resistente a la proteasa cuando las vesículas están estacionadas sobre la membrana presináptica. ■

La señal que desencadena la exocitosis de las vesículas sinápticas estacionadas es un aumento de la concentración de Ca^{2+} en el citosol cerca de las vesículas desde < 0,1 µM, característica de las células en reposo, a 1-100 µM tras el arribo de un potencial de acción en las células estimuladas. La velocidad con la cual las vesículas sinápticas se fusionan con la membrana presináptica después de un aumento del Ca^{2+} citosólico (menos de 1 mseg) indica que la maquinaria de fusión se ensambla por completo en el estado de reposo y puede sufrir rápidamente un cambio conformacional que conduce a la exocitosis del neurotransmisor. Se piensa que una proteína de unión al Ca^{2+}, denominada *sinaptotagmina*, localizada en la membrana de las vesículas sinápticas, es un componente clave de la maquinaria de fusión vesicular que desencadena la exocitosis en respuesta al Ca^{2+} (fig. 17-36).

Diversas líneas de evidencia avalan el papel de la sinaptotagmina como sensor del Ca^{2+} para la exocitosis de los neurotransmisores. Por ejemplo, los embriones mutantes de *Drosophila* y *C. elegans* que carecen completamente de sinaptotagmina no salen de sus huevos y exhiben contracciones musculares no coordinadas y muy reducidas. Las larvas con mutaciones que ocasionan la pérdida parcial de la función de sinaptotagmina sobreviven, pero sus neuronas son defectuosas en la exocitosis vesicular estimulada por Ca^{2+}. Más aún, en los ratones las mutaciones en la sinaptotagmina que disminuyen su afinidad por el Ca^{2+} causan



▲ Fig. 17-36. Liberación de neurotransmisores y reciclado de vesículas sinápticas. Paso 1: Las vesículas sinápticas cargadas con neurotransmisores (círculos rojos) se mueven hacia la zona activa y luego se estacionan en sitios definidos sobre la membrana plasmática de una célula presináptica. La sinaptotagmina evita la fusión de la membrana y la liberación de neurotransmisores. La toxina botulínica evita la exocitosis cortando proteolíticamente la VAMP, la v-SNARE sobre las vesículas. Paso 2: En respuesta a los impulsos nerviosos (potencial de acción), los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje en la membrana plasmática se abren permitiendo la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular. El cambio conformacional resultante en la sinaptotagmina inducido por Ca^{2+} conduce a la fusión de vesículas acopladas con la membrana plasmática y a la liberación de neurotransmisores en la hendidura sináptica. Paso 3: Después que las vesículas de clatrina/AP que contienen v-SNARE y proteínas transportadoras de neurotransmisores brotan hacia el interior y se desprenden en un proceso mediado por dinamina, pierden su cubierta de proteínas. Mutaciones de la dinamina como la *shibire* en *Drosophila* bloquean la reformación de vesículas sinápticas, lo que conduce a la parálisis. Paso 4: Las vesículas sin cubierta transportan neurotransmisores desde el citosol y generan vesículas sinápticas totalmente reconstituidas, lo que completa el ciclo. La mayoría de las vesículas sinápticas se forman por reciclamiento endocítico como se representa aquí. Sin embargo, las vesículas endocíticas que contienen membranas de la terminación axónica pueden fusionarse con el endosoma; luego la gemación desde este compartimiento puede formar "nuevas" vesículas sinápticas (Véase K. Takei et al., 1996, *J. Cell Biol.* 133:1237; V. Murthy y C. Stevens, 1998, *Nature* 392:497; y R. Jahn et al., 2003, *Cell* 112:519.)

un incremento correspondiente en la cantidad de Ca^{2+} citosólico necesario para desencadenar la exocitosis rápida.

Se han propuesto diversas hipótesis concernientes a cómo la sinaptotagmina promueve la exocitosis de neurotransmisores, pero el mecanismo preciso de su función aún permanece sin resolver. Se sabe que la sinaptotagmina se une a fosfolípidos y luego de atravesar un cambio conformacional inducido por Ca^{2+}, puede promover la asociación de los fosfolípidos en la vesícula y en las membranas plasmáticas. La sinaptotagmina también se fija a las proteínas SNARE y puede catalizar una etapa posterior en el ensamblaje de complejos SNARE cuando está unida al Ca^{2+}. Finalmente, también puede actuar inhibiendo la exocitosis inapropiada en las células en reposo. Con los niveles bajos de Ca^{2+} citosólico hallados en las células nerviosas en reposo, la sinaptotagmina aparentemente se une a un complejo de las proteínas de membrana plasmática neurexina y sintaxina. Su presencia bloquea la unión de otras proteínas esenciales de fusión al complejo neurexina-sintaxina, y evita por lo tanto la fusión vesicular. Cuando la sinaptotagmina une Ca^{2+} es desplazada del complejo, lo que le permite que otras proteínas se unan y se inicie la fusión o el estacionamiento en la membrana. Por consiguiente, la sinaptotagmina puede funcionar como una "abrazadera" para evitar el avance de la fusión en ausencia de una señal de Ca^{2+}.

Las moscas mutantes que carecen de dinamina no pueden reciclar las vesículas sinápticas

Las vesículas sinápticas se forman principalmente por gemación endocítica de la membrana plasmática de las terminales axónicas. La endocitosis suele involucrar fositas recubiertas de clatrina y es bastante específica, en cuanto a que varias proteínas de membrana exclusivas de las vesículas sinápticas (p. ej., transportadoras de neurotransmisores) son incorporadas específicamente en las vesículas endocitadas. De esta forma, las proteínas de membrana de vesículas sinápticas pueden ser reutilizadas y las vesículas recicladas vueltas a llenar con neurotransmisores (véase fig. 17-36).

Al igual que en la formación de otras vesículas cubiertas de clatrina/AP, el desprendimiento de las vesículas sinápticas endocitadas requiere la proteína de unión a GTP, dinamina (véase fig. 17-20). El análisis de un mutante de *Drosophila* sensible a la temperatura llamado *shibire (shi)*, que codifica la proteína dinamina de la mosca, proporcionó la primera evidencia de la función de la dinamina en la endocitosis. A la temperatura permisiva de 20 °C, las moscas mutantes son normales, pero a la temperatura no permisiva de 30 °C, se paralizan (*shibire*, paralizado en japonés) debido a que se bloquea el desprendimiento de las invaginaciones cubiertas de clatrina en las neuronas y en otras células. Cuando se observan con el microscopio electrónico, las neuronas *shi* a 30 °C exhiben abundantes fositas cubiertas de clatrina con cuellos largos, pero pocas vesículas cubiertas de clatrina. La apariencia de las terminales nerviosas en mutantes *shi* a la temperatura no permisiva es similar a las de la terminales de neuronas normales incubadas en presencia de un análogo de GTP no hidrolizable (véase fig. 17-21). Debido a su incapacidad para desprender nuevas vesículas sinápticas cuando las moscas son cambiadas a la temperatura no permisiva, las neuronas de los mutantes *shi* agotan finalmente las vesículas sinápticas, lo que conduce a una cesación de la señalización sináptica y a la parálisis.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 17.6

Formación y función de las vesículas sinápticas

- La transmisión de impulsos nerviosos en las sinapsis químicas depende de la exocitosis de vesículas sinápticas llenas de neurotransmisores y de la regeneración de vesículas vacías mediante endocitosis.
- El reclutamiento eficiente de vesículas hacia la membrana presináptica adyacente a la hendidura sináptica requiere proteínas citosólicas, como la sinapsina, y la Rab3a, una proteína de unión al GTP que se une a la membrana vesicular.
- En las neuronas en reposo, la sinaptotagmina de la membrana vesicular sináptica evita la fusión de las vesículas estacionadas sobre la membrana. La entrada de Ca^{2+} que sigue a la llegada de un potencial de acción en la terminación axónica conduce a la unión de Ca^{2+} por parte de la sinaptotagmina y ocasiona un cambio en su conformación que permite la fusión de la vesícula (véase fig. 17-36).
- Las vesículas sinápticas se regeneran rápidamente mediante gemación endocítica de vesículas cubiertas de clatrina desde la membrana plasmática, un proceso que requiere dinamina. Después que se elimina la cubierta de clatrina, las vesículas se rellenan con neurotransmisores y se mueven hacia la zona activa para otra ronda de estacionamiento y fusión.

PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO

La información bioquímica, genética y estructural presentada en este capítulo muestra que ahora tenemos un conocimiento básico de cómo fluye el tráfico de proteínas desde un compartimiento delimitado por membrana hacia otro. Nuestra comprensión de este proceso provino en gran parte de experimentos acerca de la función de diversos tipos de vesículas de transporte. Estos estudios han permitido la identificación de muchos componentes vesiculares y el descubrimiento de cómo estos componentes trabajan juntos para conducir la gemación de vesículas, e incorporar el conjunto de moléculas de carga correcto desde el orgánulo donador, y luego para mediar la fusión de una vesícula completa con la membrana de un orgánulo diana.

A pesar de estos avances, quedan sin conocer etapas importantes de las vías secretoria y endocítica. Por ejemplo, todavía ignoramos qué tipos de proteínas forman las cubiertas de las vesículas reguladas y de las vesículas secretorias constitutivas que brotan desde la red *trans*-Golgi. No está claro si el ensamblaje de una cubierta citosólica conduce a su gemación por completo. Más aún, todavía no se definió el tipo de señales sobre las proteínas carga que podrían dirigirlas para su empaquetamiento dentro de las vesículas secretorias. Otro proceso desconcertante es la formación de vesículas que brotan alejándose del citosol, como las vesículas que ingresan en los endosomas multivesiculares. Aunque se conocen algunas de las proteínas que participan en la formación de estas vesículas endosómicas "internas", no sabemos qué determina su forma o qué tipo de proceso hace que se desprenda la membrana donadora. En el futuro, deberá ser posible dilucidar estos y otros pasos del tránsito vesicular apenas comprendidos a través del uso de las mismas poderosas combinaciones de métodos bioquímicos y genéticos que delinearon las partes funcionales de las vesículas COPI y COPII y de clatrina/AP.

Todavía quedan preguntas acerca del tránsito vesicular entre el RE y el *cis*-Golgi, entre las cisternas del Golgi, entre el *trans*-Golgi y el endosoma, el paso de transporte mejor caracterizado. En particular, es incompleto nuestro entendimiento de cómo las proteínas se distribuyen realmente en los orgánulos, sobre todo por la naturaleza tan dinámica de éstos a lo largo de la vía secretoria. Aunque conocemos muchos detalles de cómo funcionan determinados componentes vesiculares, no podemos explicar por qué sus funciones están restringidas a etapas específicas dentro del flujo global de los pasos del transporte anterógrado y retrógrado. Por ejemplo, no podemos explicar por qué las vesículas COPII se fusionan entre sí para formar una nueva cisterna *cis*-Golgi, mientras que la vesícula COPI se fusiona con la membrana del RE, puesto que ambos tipos de vesículas parecen contener conjuntos similares de proteínas v-SNARE. En el mismo sentido, no sabemos qué rasgo de la membrana del Golgi realmente distingue un brote vesicular cubierto de COPI de un brote cubierto de clatrina/AP. En ambos casos, la unión de la proteína ARF a la membrana del Golgi parece iniciar la gemación vesicular. La solución a estos problemas requerirá una comprensión más integrada del flujo del tránsito vesicular en el contexto de la vía secretoria completa. Recientes mejoras en nuestra capacidad para imaginar el transporte vesicular de las proteínas carga en células vivas nos dan esperanzas de que algunos de los aspectos más sutiles de la función vesicular puedan clarificarse en un futuro cercano.

PALABRAS CLAVE

Autofagia *733*
Clatrina *708*
Complejos AP (proteína adaptadora) *720*
Complejos ESCRT *733*
COPI *708*
COPII *708*
Dinamina *721*
Endocitosis mediada por receptor *728*
Endosoma tardío *702*
Endosomas multivesiculares *733*
Manosa 6-fosfato (M6P) *723*
Mutantes *sec* *706*
Progresión cisternal *715*
Proteína ARF *709*
Proteínas Rab *711*
Red o retículo *trans*-Golgi (TGN) *701*
Secreción constitutiva *724*
Secreción regulada *724*
Señales de clasificación y distribución *711*
Sinaptotagmina *737*
Transcitosis *727*
Transporte anterógrado *715*
Transporte retrógrado *715*
t-SNARE *708*
Vesículas de transporte *701*
Vía secretoria *701*
v-SNARE *708*

REVISIÓN DE CONCEPTOS

1. Los estudios de Palade y col. que emplearon pulsos de marcación y seguimiento con aminoácidos marcados radiactivamente y autorradiografía para visualizar la ubicación de las proteínas radiomarcadas es un caso clásico del experimentador que se da cuenta de qué es lo que trabaja bien en su sistema biológico. Estos experimentos se hicieron con células acinares pancreáticas. Como alternativa, pueden usarse las células HeLa. Estas células son una línea celular humana clásica originada de un carcinoma cervical. Los mismos protocolos experimentales aplicados a células HeLa fracasan completamente con respecto al rastreo de la secreción. ¿Qué aspecto cree que tendrá la autorradiografía de la célula HeLa después de la marcación con pulsos de aminoácidos radiactivos?

2. *Sec 18* es un gen de las levaduras que codifica NSF. Es un mutante clase C en la vía secretoria de las levaduras. ¿Cuál es el papel mecanicista de NSF en el tráfico de membrana? ¿Cómo lo indica su fenotipo clase C, por qué una mutación NSF produce una acumulación de vesículas que parecen estar en sólo una etapa de la vía secretoria?

3. El brote vesicular está asociado con proteínas de la cubierta. ¿Cuál es la función de las proteínas de la cubierta en la gemación vesicular? ¿Cómo se reclutan las proteínas de la cubierta en la membrana? ¿Qué clase de moléculas tienen más probabilidad de ser incluidas o excluidas de las vesículas recién formadas? ¿Cuál es el mejor ejemplo conocido de una proteína que probablemente esté involucrada en el desprendimiento de las vesículas?

4. El tratamiento de las células con la droga brefeldin A (BFA) tiene el efecto de quitar la cubierta de las membranas del aparato de Golgi, lo que da como resultado una célula en la cual la gran mayoría de las proteínas del Golgi se encuentran en el RE. ¿Qué inferencias pueden hacerse de esta observación en relación con las funciones de las proteínas de la cubierta además de promover la formación vesicular? Proponga qué tipo de mutación en Arf1 podría tener el mismo efecto que el tratamiento de las células con BFA.

5. Un anticuerpo contra una región "bisagra" de βCOPI conocido como EAGE bloquea la función de βCOPI cuando se microinyecta en células HeLa. ¿Cuáles podrían ser las consecuencias de este bloqueo funcional para el transporte anterógrado desde el RE hasta la membrana plasmática? Proponga un experimento para probar si el efecto de la microinyección EAGE está inicialmente sobre el transporte anterógrado o retrógrado.

6. La especificidad de la fusión entre vesículas involucra dos procesos diferentes y secuenciales. Describa el primero de los dos procesos y su regulación por proteínas interruptoras GTPasa. ¿Qué efectos sobre el tamaño de los endosomas tempranos podrían resultar de la sobreexpresión de una forma mutante de Rab5 que permanece en el estado unido a GTP?

7. En este capítulo se describen dos procesos diferentes de fusión de membrana mediados por proteínas: la fusión mediada por SNARE y la fusión mediada por HA viral. Compare y contraste ambas. En cada ejemplo preste atención particular a cuáles son los efectos directos de la secuencia polipeptídica sobre la fusión de las membranas y a qué controla la especificidad de la fusión de la membrana en cada uno.

8. Las señales de clasificación que causan el transporte retrógrado de una proteína en la vía secretoria son a veces conocidas como secuencias de recuperación. Nombre los dos ejemplos conocidos de secuencias de recuperación para proteínas solubles y de membrana del RE. ¿Cómo es que la presencia de una secuencia de recuperación en una proteína soluble del RE conduzca a su recuperación desde el complejo *cis*-Golgi? Describa cómo el concepto de secuencia de recuperación es esencial para el modelo de progresión cisternal.

9. Los complejos de proteínas adaptadoras (AP) clatrina se unen directamente a la cara citosólica de la membrana proteica y también interactúan con la clatrina. ¿Cuáles son los cuatro complejos de proteínas adaptadoras conocidos? ¿Por qué la clatrina podría considerarse una proteína accesoria del núcleo de una cubierta compuesta de proteínas adaptadoras?

10. La enfermedad de células I es un ejemplo clásico de un defecto hereditario humano en la señalización de proteínas que afecta a toda una clase de proteínas, las enzimas solubles de los lisosomas. ¿Cuál es el defecto molecular en la enfermedad de las células I? ¿Por qué este defecto afecta a la señalización de toda una clase de proteínas? ¿Qué otro tipo de mutación podría producir el mismo fenotipo?

11. La TGN, la red *trans*-Golgi, es el sitio de múltiples procesos de clasificación a medida que las proteínas y los lípidos salen del complejo de Golgi. Compare y contraste la clasificación de las proteínas hacia los lisosomas con el empaquetamiento de proteínas dentro de gránulos secretorios regulados como los que contienen insulina. Compare y contraste la clasificación de proteínas hacia la superficie basolateral y hacia la superficie apical en células MDCK y en hepatocitos.

12. La eficiencia de la fagocitosis bacteriana por los macrófagos se incrementa en gran medida uniendo moléculas de anticuerpo a la superficie bacteriana. Sobre la base de descripciones previas de la estructura de anticuerpos, ¿a qué porción de la molécula de inmunoglobulina usted cree que puede estar dirigido un receptor de macrófago para el anticuerpo unido a la bacteria? Diseñe un experimento para probar esta propuesta.

13. Describa cómo el pH cumple un papel clave en la regulación de las interacciones entre la manosa 6-fosfato y el receptor de manosa 6-fosfato. ¿Por qué la elevación del pH endosómico conduce a la secreción de enzimas lisosómicas recién sintetizadas hacia el medio extracelular?

14. ¿Qué características mecanicistas son compartidas por a) la formación de endosomas multivesiculares por gemación hacia el interior del endosoma y b) la gemación hacia el exterior del HIV en la superficie celular? Usted desea diseñar un péptido inhibidor/competidor de la gemación del HIV y decide imitar en un péptido sintético una porción de la proteína Gag del HIV. ¿Qué porción de la proteína Gag del HIV sería una elección lógica? ¿Qué proceso celular normal podría bloquear este inhibidor?

15. La exocitosis de vesículas sinápticas llenas de neurotransmisores es un ejemplo de exocitosis regulada. ¿Cómo es sensada la entrada del Ca^{2+} tras la llegada de un potencial de acción a la terminación axónica y cómo se asocia con la exocitosis de vesículas sinápticas? ¿Por qué las neuronas de *Drosophila* normales incubadas en presencia de un análogo no hidrolizable de GTP tienen el mismo aspecto que las terminaciones nerviosas de los mutantes *shi*?

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Diversas toxinas proteicas, como las toxinas bacterianas de *Pseudomonas*, de *Shigella* (toxina *Shiga*) y la toxina vegetal ricina, son proteínas heteroméricas que consisten en subunidades A y B. La subunidad A es catalítica. En la toxina *Shiga*, la causa más común de intoxicación alimentaria debida a hamburguesas contaminadas por bacterias, la subunidad A es una *N*-glucosidasa y escinde específicamente el RNA ribosómico 28S, de manera que inhibe la síntesis de proteínas en las células afectadas por esta toxina. Sorprendentemente, sólo una molécula de la subunidad A introducida en el citosol es suficiente para matar una célula. Es interesante notar que la subunidad A de la toxina *Shiga* es transferida al citosol desde la luz del RE por el translocón proteico Sec61. La subunidad B dirige la toxina *Shiga* hacia el RE uniéndola al glucolípido GM3 sobre la superficie celular, el cual actúa como receptor de internalización de la toxina *Shiga*. La toxina *Shiga* es internalizada en endosomas, desde donde es transferida al complejo de Golgi, y desde el complejo de Golgi va al RE donde se desasocian las subunidades A y B permitiendo a la subunidad A translocarse al citosol.

En una serie de experimentos diseñados para caracterizar en forma comparada el mecanismo de transferencia de la toxina de *Pseudomonas* y de toxina *Shiga* desde el complejo de Golgi hacia el RE, los investigadores primero secuenciaron las respectivas subunidades diana. Los 24 aminoácidos C-terminales de la subunidad B de la toxina de *Pseudomonas* y de la toxina *Shiga* se muestran abajo:

24 aminoácidos C-terminales de la subunidad B de la toxina de *Pseudomonas*

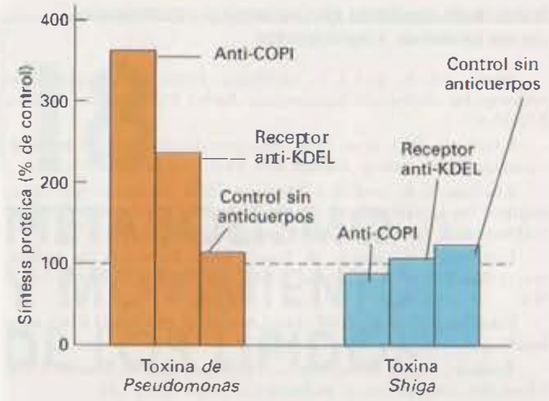
KEQAISALPD YASQPGKPPR KDEL

24 aminoácidos C-terminales de la subunidad B de la toxina *Shiga*

TGMTVTIKTN ACHNGGGFSE VIFR

A partir de la inspección de estas secuencias, ¿cuál es el receptor diana probable para la transferencia de toxinas de *Pseudomonas* desde el aparato de Golgi hacia el RE?

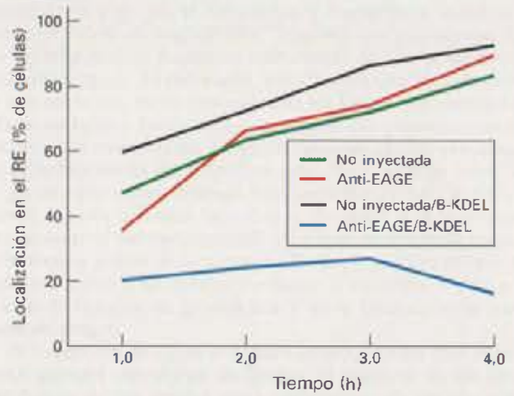
Para probar esta hipótesis, los investigadores caracterizaron experimentalmente el papel en la intoxicación de las proteínas de cubierta COPI y los receptores KDEL. Se microinyectaron células de mono con anticuerpos dirigidos contra proteínas de la cubierta COPI o el dominio citosólico de receptores KDEL. Luego las células se incubaron con toxinas de *Pseudomonas* o toxina *Shiga* durante 4 horas. La síntesis de proteínas se determinó luego de la marcación con un pulso de metionina [^{35}S] durante 30 minutos. Los resultados se ilustran en la figura adjunta, con controles que muestran el bajo nivel de síntesis proteica causado por la incubación tanto con toxina de *Pseudomonas* como con toxina *Shiga* sin inyección de anticuerpos.



Efecto de la microinyección de anticuerpos en la intoxicación celular por las toxinas de *Pseudomonas* y *Shiga*.

¿Cómo sustentan estos resultados su predicción hecha sobre la base de la secuencia y la función conocida de la proteína de cubierta COPI en el transporte retrógrado? ¿Puede formular una hipótesis de cómo se transporta la toxina *Shiga* desde el Golgi al RE?

Para explorar aún más si la transferencia de la toxina *Shiga* desde el aparato de Golgi al RE depende o no de las proteínas de cubierta, los investigadores prepararon dos subunidades B de la toxina *Shiga* conjugadas con diferentes colorantes fluorescentes y luego evaluaron mediante microscopia fluorescente el transporte de las subunidades B desde el complejo de Golgi al RE. La primera preparación fue la subunidad B de tipo silvestre conjugada con Cy3. La segunda preparación fue la subunidad B de tipo silvestre conjugada con Cy3 en la cual el C terminal fue extendido cuatro aminoácidos KDEL (B-KDEL). Las células fueron microinyectadas con un anticuerpo dirigido contra las proteínas de la cubierta COPI. Tras la microinyección, las células se incubaron con una subunidad B fluorescente durante varios períodos y se determinó la distribución de la subunidad B. Los resultados se muestran en la figura que sigue.



Efecto de anticuerpos microinyectados dirigidos contra las proteínas COPI sobre el transporte de la subunidad B de la toxina *Shiga* de tipo silvestre o de la B-KDEL de la toxina *Shiga* desde el complejo de Golgi hacia el RE.

¿Qué evidencia proporcionan estos resultados a favor o en contra del transporte de la subunidad B de la toxina *Shiga* desde el complejo de Golgi al RE en las vesículas cubiertas de COPI? ¿Cuál es la importancia de los resultados con B-KDEL en la interpretación de los resultados generales de estos experimentos?

BIBLIOGRAFÍA

Técnicas para el estudio de la vía secretoria

Beckers C. J., et al. 1987. Semi-intact cells permeable to macromolecules: use in reconstitution of protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. Cell 50:523-534.

Kaiser, C. A., and R. Schekman. 1990. Distinct sets of SEC genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. Cell 61:723-733.

Novick, P., et al. 1981. Order of events in the yeast secretory pathway. Cell 25:461-469.

Lippincott-Schwartz J., et al. 2001. Studying protein dynamics in living cells. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2:444-456.

Orci, L., et al. 1989. Dissection of a single round of vesicular transport: sequential intermediates for intercisternal movement in the Golgi stack. Cell 56:357-368.

Palade, G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. Science 189:347-358.

Mecanismos moleculares del tránsito vesicular

Jahn, R., et al. 2003. Membrane fusion. Cell 112:519-533.

Kirchhausen, T. 2000. Three ways to make a vesicle. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 1:187-198.

McNew, J. A., et al. 2000. Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. Nature 407:153-159.

Ostermann, J., et al. 1993. Stepwise assembly of functionally active transport vesicles. Cell 75:1015-1025.

Schimmöller, F., I. Simon, and S. Pfeffer. 1998. Rab GTPases, directors of vesicle docking. J. Biol. Chem. 273:22161-22164.

Skehel, J. J., and D. C. Wiley. 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. Ann. Rev. Biochem. 69:531-569.

Söllner, T., et al. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. Nature 362:318-324.

Springer, S., et al. 1999. A primer on vesicle budding. Cell 97:145-148.

Zerial M., and H. McBride, 2001. Rab proteins as membrane organizers. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2:107-117.

Tránsito vesicular en las etapas iniciales de la vía secretoria

Barlowe, C. 2002. COPII-dependent transport from plasmic reticulum. Curr. Opin. Cell Biol. 14:417-422.

Bi, X., et al. 2002. Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. Nature 419:271-277.

Glick, B. S., and V. Malhotra. 1998. The curious status of the Golgi apparatus. Cell 95:883-889.

Kuehn, M. J., and R. Schekman. 1997. COPII and secretory cargo capture into transport vesicles. Curr. Opin. Cell Biol. 9:477-483.

Letourneur, F., et al. 1994. Coatomer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. Cell 79:1199-1207.

Pelham, H. R. 1995. Sorting and retrieval between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. Curr. ●pin. Cell Biol. 7:530-535.

Schekman, R., and l. Mellman. 1997. Does C●PI go both ways? Cell 90:197-200.

Clasificación y procesamiento de proteínas en las etapas finales de la vía secretoria

Bonifacino, J. S., and E. C. Dell'Angelica. 1999. Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. J. Cell Biol. 145:923-926.

Ghosh, P., et al. 2003. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. Nature Rev. Mol. Cell Bio. 4:202-213.

Hinshaw, J. E. 2000. Dynamin and its role in membrane fission. Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 16:483-519.

Kirchhausen, T. 2000. Clathrin. Ann. Rev. Biochem. 69:699-727.

Mostov, K. E., et al. 1995. Regulation of protein traffic in polarized epithelial cells: the polymeric immunoglobulin receptor model. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 60:775-781.

Robinson, M. S., and J. S. Bonifacino. 2001. Adaptor-related proteins. Curr. ●pin. Cell Biol. 13:444-453.

Schmid, S. 1997. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. Ann. Rev Biochem. 66:511-548.

Simons, K., and E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. Nature 387:569-572.

Steiner, D. F., et al. 1996. The role of prohormone convertases in insulin biosynthesis: evidence for inherited defects in their action in man and experimental animals. Diabetes Metab. 22:94-104.

Tooze, S. A., et al. 2001. Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE. Trends Cell Biol. 11:116-122.

Endocitosis mediada por receptor y clasificación de las proteínas internalizadas

Brown, M. S., and J. L. Goldstein. 1986. Receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Nobel Prize Lecture. Science 232:34-47.

Katzmann, D. J., et al. 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 3:893-905.

Khalfan, W. A., and D. J. Klionsky. 2002. Molecular machinery required for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting (Cvt) pathway in *S. cerevisiae*. Curr. Opin. Cell Biol. 14:468-475.

Lemmon, S. K., and L. M. Traub. 2000. Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. Curr. ●pin. Cell Biol. 12:457-466.

Pornillos, O., et al. 2002. Mechanisms of enveloped RNA virus budding. Trends Cell Biol. 12:569-579.

Riezman, H., P. Woodman, G. van Meer, and M. Marsh. 1997. Molecular mechanisms of endocytosis. Cell 91:731-738.

Robinson, M. S., C. Watts, and M. Zerial. 1996. Membrane dynamics in endocytosis. Cell 84:13-21.

Rudenko, G., et al. 2002. Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. Science 298:2353-2358.

Formación y función de las vesículas sinápticas

Betz, W., and J. Angleson. 1998. The synaptic vesicle cycle. Ann. Rev. Physiol. 60:347-364.

Chapman, E. R. 2002. Synaptotagmin: a Ca^{2+} sensor that triggers exocytosis? Nature Rev. Mol. Cell Biol. 3:498-508.

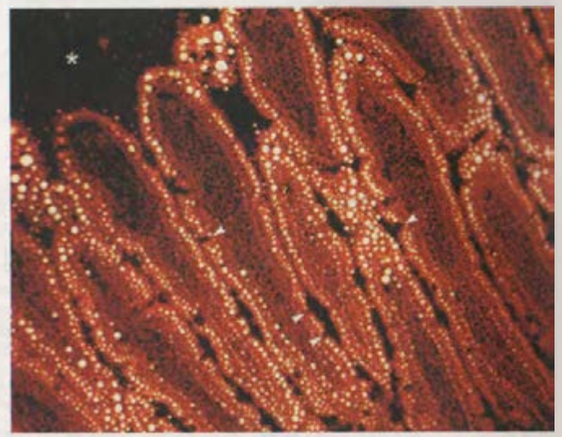
De Camilli, P., et al. 1995. The function of dynamin in endocytosis. Curr. Opin. Neurobiol. 5:559-565.

Geppert, M., and T. Sudhof. 1998. Rab3 and synaptotagmin: the yin and yang of synaptic membrane fusion. Ann. Rev. Neurosci. 21:75-96.

Neimann, H., J. Blasi, and R. Jahn. 1994. Clostridial neurotoxins: new tools for dissecting exocytosis. Trends Cell Biol. 4:179-185.

18

METABOLISMO Y MOVIMIENTO DE LOS LÍPIDOS



Microfotografía de fluorescencia del epitelio intestinal de un hámster luego de la absorción celular, desde la luz intestinal (arriba a la izquierda, sin tinción), de gotas lipídicas de un análogo fluorescente del colesterol (fluorosterol) administrado por vía oral, disuelto en aceite de maíz. (C. P. Sparrow et al., 1999, *J. Lipid Res.* 40:1747-1757.)

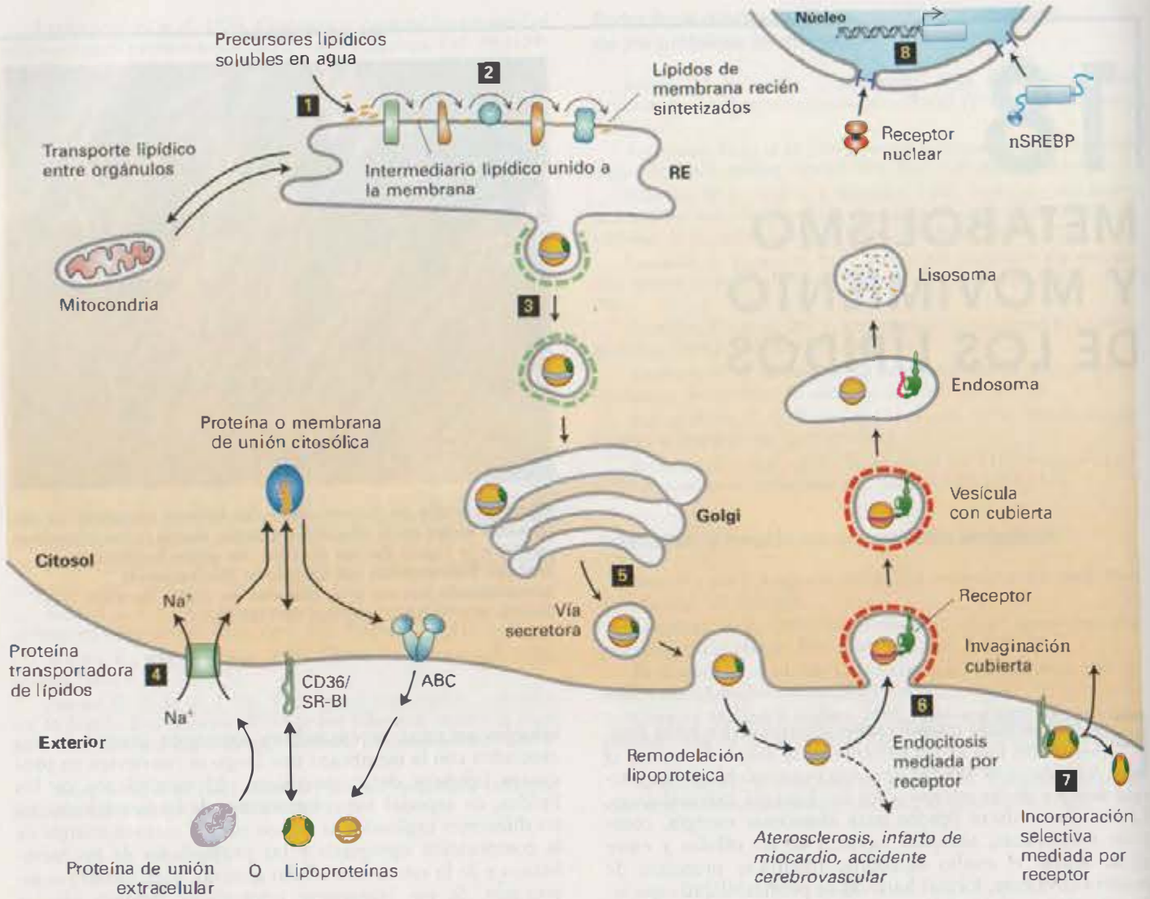
En este capítulo consideramos algunos de los retos especiales que una célula enfrenta en la metabolización y el transporte de **lípidos**, que son poco solubles en el interior acuoso de las células y en los líquidos extracelulares. Las células utilizan lípidos para almacenar energía, construir membranas, señalizar adentro de las células y entre ellas, sensar el medio ambiente, modificar proteínas de manera covalente, formar barreras de permeabilidad especializadas (p. ej., en la piel) y proteger las células de compuestos químicos muy reactivos. Los **ácidos grasos**, que son oxidados en la mitocondria para liberar energía para las funciones celulares (cap. 8), se almacenan y transportan principalmente en forma de **triglicéridos**. También son precursores de los **fosfolípidos**, el esqueleto estructural de las membranas celulares (cap. 5). El **colesterol**, otro importante componente de la membrana, es un precursor de las hormonas esteroides y de otros lípidos biológicamente activos que participan en la señalización intercelular. También derivada de los precursores de la biosíntesis del colesterol están las vitaminas solubles en grasas, que tienen diversas funciones incluyendo la detección de luz por la forma retinal de la vitamina A en la rodopsina, el control del metabolismo del calcio mediante la forma de hormona activa de la vitamina D, la protección contra el daño oxidativo a las células mediante la vitamina E y la actividad de cofactor de la vitamina K en la formación de coágulos de sangre.

A excepción de algunas células especializadas que almacenan grandes cantidades de lípidos, la mayoría de los lípidos dentro de las células son componentes de membranas celulares. Por lo tanto, centramos nuestro análisis en la biosíntesis de los lípidos y en el movimiento de los lípidos principales hallados en las membranas celulares y en sus precursores (fig. 18-1). En la biosíntesis de los lípidos, los precursores solubles en agua se ensamblan formando intermediarios asociados con la membrana que luego se convierten en productos lipídicos de la membrana. El movimiento de los lípidos, en especial los componentes de la membrana, entre diferentes orgánulos es crítico para el mantenimiento de la composición apropiada y las propiedades de las membranas y de la estructura celular general, pero nuestra comprensión de ese transporte intracelular lipídico aún es rudimentario. En cambio, el análisis del transporte de lípidos hacia el interior de las células, afuera de las células y entre ellas está mucho más avanzado; describiremos con cierto detalle estos movimientos lipídicos mediados por diversas proteínas de transporte y receptores de la superficie celular.

Concluimos el capítulo examinando la conexión entre el metabolismo del colesterol celular y la aterosclerosis, que puede conducir a enfermedades cardiovasculares (p. ej., infarto de

CONTENIDO

18.1 Fosfolípidos y esfingolípidos: síntesis y movimiento intracelular
18.2 Colesterol: un lípido de membrana multifuncional
18.3 Movimiento lipídico hacia adentro y hacia afuera de las células
18.4 Regulación por retroalimentación del metabolismo lipídico celular
18.5 Biología celular de la aterosclerosis, el infarto de miocardio y el accidente cerebrovascular



▲ Fig. 18-1. Generalidades de la síntesis de los principales lípidos de la membrana y sus movimientos hacia adentro y afuera de las células. Los lípidos de membrana (p. ej., fosfolípidos, colesterol) se sintetizan a través de vías multienzimáticas complejas que comienzan en el citosol con conjuntos de enzimas e intermediarios solubles en agua (1) que luego son convertidos, mediante enzimas asociadas con la membrana, en productos insolubles en agua embebidos en la membrana (2), por lo general en la interfaz entre la hojuela citosólica del retículo endoplasmático (RE) y el citosol. Los lípidos de membrana pueden moverse desde el RE hacia otros orgánulos (3), como el aparato de Golgi o las mitocondrias, ya sea por mecanismos mediados por vesículas como por otros mecanismos mal definidos. Los lípidos pueden moverse hacia adentro o hacia afuera de las células mediante proteínas de transporte de la membrana plasmática o mediante lipoproteínas. Entre las proteínas de transporte, similares a las descritas en el capítulo 7 que mueven lípidos (4) se encuentran simportadores acoplados al sodio que median la entrada; proteínas de la superfamilia CD36 y SR-BI que pueden mediar el transporte unidireccional o bidireccional; y proteínas de la superfamilia ABC que median la salida celular, la alternación de posición (*flipping*) de lípidos desde la hojuela citosólica hacia la exoplasmática de la membrana, o ambas. Dado que los lípidos son insolubles en agua, las proteínas de transporte movilizan lípidos desde y hacia proteínas transportadoras, lipoproteínas, membranas u otros complejos de unión a lípidos en el espacio extracelular y en el citosol. Las lipoproteínas ensambladas en el RE transportan grandes cantidades de lípidos en sus centros hidrófobos. Se secretan por la vía secretoria clásica mediada por el Golgi (5) y sus lípidos entran ya sea a través de (6) endocitosis mediada por receptor o a través de (7) la captación selectiva de lípidos mediada por receptor. El metabolismo lipídico celular está regulado (8) por factores de transcripción que actúan como receptores nucleares que unen lípidos directamente y por proteínas de unión al elemento regulador de esterol nuclear (nSREBP) generadas en el Golgi por proteólisis del precursor de una proteína integral de membrana.

miocardio, accidente cerebrovascular), la principal causa de muerte en las sociedades occidentales industrializadas. Describimos las teorías actuales acerca de por qué las arterias grandes pueden obstruirse con depósitos que contienen colesterol y cómo las células reconocen las diferencias entre el colesterol "bueno" y el "malo". Como veremos, el conocimiento detallado de la biología celular fundamental del metabolismo lipídico condujo al descubrimiento de fármacos antiateroscleróticos.

18.1 Fosfolípidos y esfingolípidos: síntesis y movimiento intracelular

Una célula no puede dividirse o agrandarse a menos que elabore suficiente cantidad de membranas adicionales para acomodar el área expandida de su superficie externa y sus orgánulos internos. Por lo tanto, la generación de nuevas membranas celulares es fundamental para la vida de una célula, como lo es la síntesis de proteínas o la replicación del DNA. Aunque los componentes proteicos de las biomembranas son críticos para sus funciones celulares, las propiedades estructurales y físicas básicas de las membranas están determinadas por sus componentes lipídicos; principalmente fosfolípidos, esfingolípidos y esteroles, como el colesterol (cuadro 18-1). Las células deben ser capaces de sintetizar o incorporar de otros sitios estas moléculas para formar membranas.

Un principio fundamental de la biosíntesis de la membrana es que las células sintetizan nuevas membranas sólo mediante la expansión de membranas existentes. Aunque algunos pasos iniciales en la síntesis de lípidos de la membrana tienen lugar en el citoplasma, los pasos finales son catalizados por enzimas unidas a membranas celulares preexistentes y los productos se incorporan a las membranas a medida que se generan. La evidencia de este fenómeno se observa cuando se exponen las células brevemente a precursores radiactivos (p. ej., fosfato o ácidos grasos): todos los fosfolípidos y esfingolípidos que incorporan estas sustancias precursoras se asocian con membranas intracelulares; ninguna se encuentra libre en el citosol. Después de su formación, los lípidos de la membrana deben distribuirse apropiadamente tanto en las hojuelas de una membrana dada como entre las membranas independientes de diferentes orgánulos en las células eucariontes. Aquí, nos centramos en la síntesis y la distribución de fosfolípidos y esfingolípidos; comentamos la síntesis del colesterol en la sección 18.2.

Los ácidos grasos son precursores de los fosfolípidos y otros componentes de la membrana

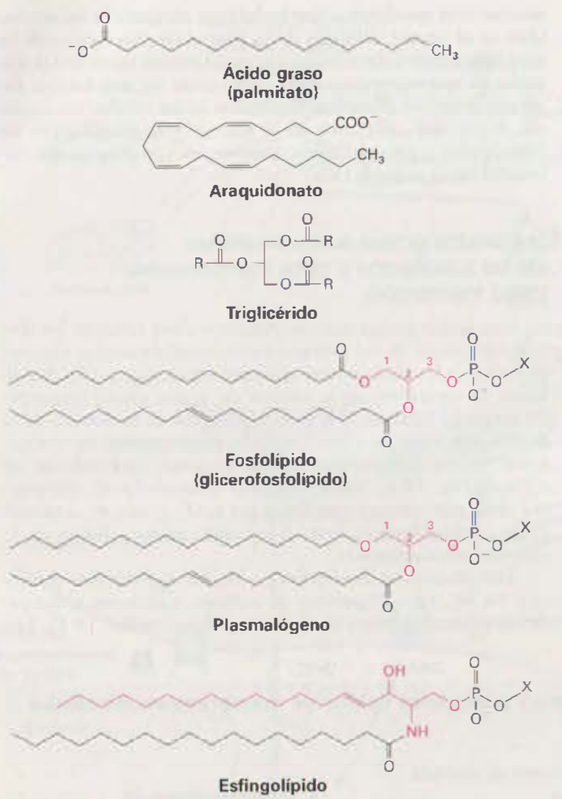
Los ácidos grasos son componentes clave tanto de los fosfolípidos como de los esfingolípidos; también anclan algunas proteínas a las membranas celulares (véase fig. 5-15). Por lo tanto, la regulación de la síntesis de ácidos grasos desempeña un papel fundamental en la regulación de la síntesis de la membrana como un todo. Un ácido graso consiste en una extensa cadena hidrocarbonada con un grupo carboxilo en un extremo (fig. 18-2). Un ácido graso *saturado* (p. ej., palmitato) tiene sólo enlaces simples, y un ácido graso *no saturado* (p. ej., araquidonato) tiene uno o más enlaces dobles en la cadena hidrocarbonada.

Los principales ácidos grasos de los fosfolípidos contienen 14, 16, 18 o 20 átomos de carbono e incluyen tanto cadenas saturadas como insaturadas (véase cuadro 18-1). Los

CUADRO 18-1 Síntesis y transporte de ácidos grasos y principales lípidos de membrana en las células animales

Clase de lípido	Principales sitios de síntesis	Mecanismos de entrada o salida	Transporte intracelular
Ácidos grasos (AG):* Miristato (C14:0) Palmitato (C16:0) Estearato (C18:0) Oleato (C18:1) Linoleato (C18:2) Araquidonato (C20:4)	AG saturados hasta 16 carbonos de largo en el citosol; alargamiento en el RE y la mitocondria; desaturación en el RE	Difusión y transporte mediado por proteínas de ácidos grasos libres (FATP, CD36); secretados en lipoproteínas como parte de los fosfolípidos, triglicéridos y ésteres de colesterol	Unido a la albúmina y otras proteínas del plasma (ácidos grasos libres); como parte de fosfolípidos, triglicéridos y ésteres de colesterol en las lipoproteínas circulantes
Fosfolípidos (p. ej., fosfatidilcolina)†	Principalmente en el RE; algo en las mitocondrias	Salida por medio de proteínas ABC; endocitosis/exocitosis como parte de las lipoproteínas	Incluido en las lipoproteínas
Plasmalógenos	Peroxisomas	–	–
Esfingolípidos	RE y complejo de Golgi	–	Empaquetados dentro de las lipoproteínas
Colesterol	Parcialmente en el citosol y parcialmente en el RE	Salida por medio de proteínas ABC; endocitosis/exocitosis como parte de las lipoproteínas; incorporación selectiva de lípidos a partir de las lipoproteínas	Empaquetados dentro de las lipoproteínas (tanto no esterificados como esterificados)

*En la abreviatura Cx:y, x es el número de carbonos de la cadena e "y" es el número de dobles enlaces.
Otras abreviaturas son: CD36, una proteína multifuncional de la superficie celular;
RE, retículo endoplasmático; FATP, proteína transportadora de ácido graso.
† Los diacilglicerofosfolípidos comunes también incluyen fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol.



▲ Fig. 18-2. Estructuras químicas de los ácidos grasos y algunos de sus derivados. El palmitato, un ácido graso saturado, contiene 16 átomos de carbono, araquidonato, un ácido saturado poliinsaturado, contiene 20 átomos de carbono. Tanto los ácidos grasos saturados como los insaturados se almacenan como triglicéridos en los cuales tres cadenas de acilos grasos (R: porción hidrocarbonada de los ácidos grasos) están esterificadas con una molécula de glicerol. Los ácidos grasos también son componentes de los fosfolípidos (glicerofosfolípido, plasmalógenos y esfingolípidos) que, junto con el colesterol, son los principales lípidos presentes en las membranas. Los fosfolípidos comunes (p. ej., fosfatidilcolina) tienen dos cadenas acilo esterificadas con el glicerol; en los plasmalógenos, una cadena hidrocarbonada está unida al glicerol por un enlace éter y la otra por un enlace éster. Los esfingolípidos se forman a partir de esfingosina, un aminoalcohol que contiene una larga cadena hidrocarbonada insaturada. En las tres clases de lípidos de membranas se encuentran varios tipos de grupos polares X (véase fig. 5-5).

ácidos grasos saturados que contienen 14 o 16 átomos de carbono se forman a partir de acetil CoA por dos enzimas: la *acetil-CoA carboxilasa* y la *ácido graso sintasa*. En las células animales, estas enzimas se encuentran en el citosol; en las plantas, se encuentran en los cloroplastos. El palmitoil CoA (16 carbonos) puede ser elongado hasta 18-24 carbonos mediante la adición secuencial de dos unidades de carbono en el retículo endoplasmático (RE) o a veces en la mitocondria.

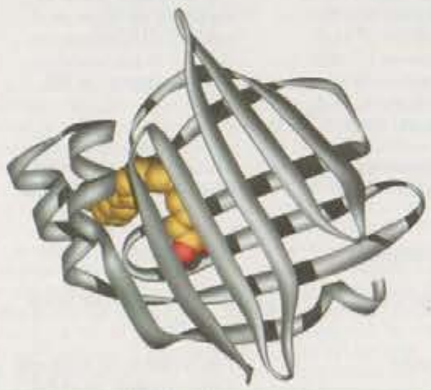
Las enzimas desaturasas, también localizadas en el RE, introducen dobles enlaces en posiciones específicas en algunos ácidos grasos. La presencia de un doble enlace crea una angulación en la cadena hidrocarbonada que impide el empaquetamiento intramolecular (véase fig. 2-18). Como resultado, las membranas o las gotas del triglicérido en cuya composición los ácidos grasos insaturados están elevados (p. ej., los aceites de maíz y de oliva líquidos) tienden a ser más fluidas a temperatura ambiente que aquellas con una alta proporción de ácidos grasos saturados (p. ej., grasas animales sólidas). Dado que los seres humanos no pueden sintetizar ciertos ácidos grasos poliinsaturados, como el ácido linoleico y el ácido linolénico, deben obtenerlos de la dieta.

Además de la síntesis *de novo* a partir del acetil CoA, los ácidos grasos pueden derivarse de la hidrólisis enzimática de triglicéridos. Los triglicéridos, la forma principal en la cual se almacenan los ácidos grasos y se transportan entre células, consisten en tres cadenas de acilos grasos esterificadas con glicerol; por lo tanto, también se denominan triacilgliceroles (véase fig. 18-2). La hidrólisis completa de una molécula de triglicérido produce tres moléculas de ácidos grasos no esterificados, o ácidos grasos libres (FFA), y una molécula de glicerol.

Los ácidos grasos no esterificados se mueven dentro de las células unidos a proteínas citosólicas pequeñas

Los ácidos grasos no esterificados dentro de las células suelen estar unidos a las *proteínas de unión a los ácidos grasos* (FABP), que pertenecen a un grupo de proteínas citosólicas pequeñas que facilitan el movimiento intracelular de muchos lípidos. Estas proteínas contienen un bolsillo hidrófobo recubierto por láminas β (fig. 18-3). Una extensa cadena de ácidos grasos puede introducirse en este bolsillo e interactuar en forma no covalente con la proteína circundante.

La expresión de las FABP celulares está regulada coordinadamente con los requerimientos celulares para la incorporación y liberación de ácidos grasos. Por lo tanto, los niveles de FABP se elevan en los músculos activos que están utilizando ácidos grasos para energía y en los adipocitos (células almacenadoras de grasa) cuando se encuentran ya sea incorporando ácidos grasos para ser almacenados como triglicéridos o liberando ácidos grasos para ser utilizados por otras células. La importancia de las FABP en el metabolismo de los ácidos grasos se destaca al observar que pueden constituir tanto como el 5% de todas las proteínas citosólicas en el hígado y que la inactivación genética de las FABP del músculo cardíaco convierte al corazón de un músculo que, para obtener energía quema principalmente ácidos grasos, en uno que principalmente quema glucosa.



▲ Fig. 18-3. Unión de un ácido graso al bolsillo hidrófobo de una proteína de unión a ácidos grasos (*fatty acid-binding protein*, FABP). La estructura cristalina de una FABP de adipocito (diagrama de cintas) revela que el bolsillo de unión hidrófobo se genera a partir de dos láminas β que se encuentran casi en ángulo recto entre sí, formando una estructura similar a la valva de una almeja. Un ácido graso (amarillo, oxígenos en rojo) interactúa en forma no covalente con residuos de aminoácidos hidrófobos dentro de este bolsillo (Véase A. Reese-Wagoner et al., 1999, *Biochim. Biophis. Acta* 23:1441(2-3):106-116.)

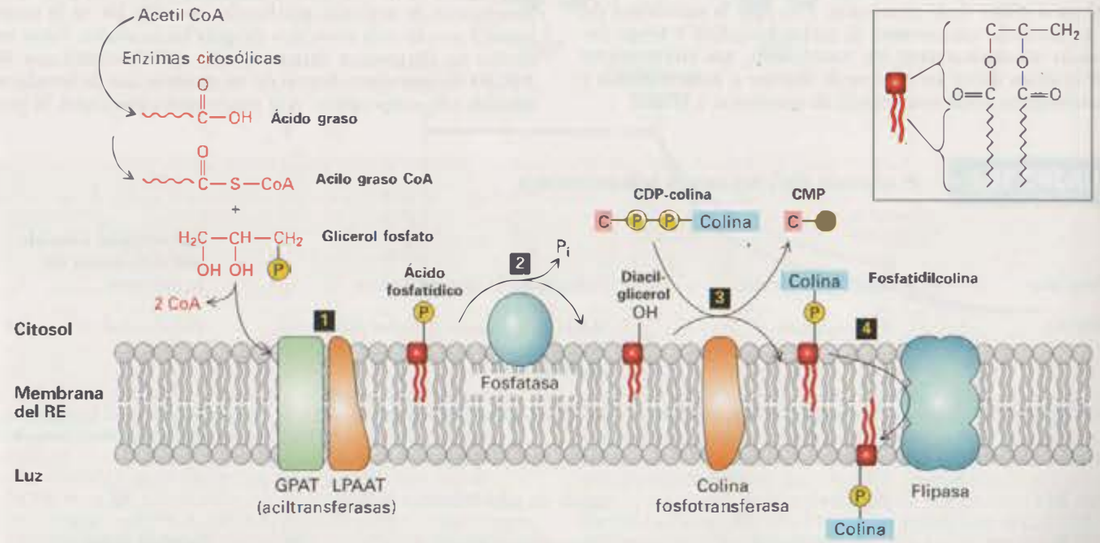
Se conocen otras numerosas proteínas pequeñas solubles en agua con bolsillos hidrófobos de unión a los lípidos. Aunque cierta evidencia sugiere que estas proteínas participan en el transporte lipídico intracelular, falta establecer con certeza su función en este movimiento lipídico.

La incorporación de ácidos grasos a los lípidos de membrana tiene lugar sobre las membranas de los orgánulos

Los ácidos grasos no se incorporan directamente a los fosfolípidos; en las células eucariontes primero son convertidos en ésteres CoA. En las células animales, la síntesis posterior de muchos *diacilglicerofosfolípidos* a partir de los acilos grasos CoA, el glicerol 3-fosfato y los precursores de cabezas polares se lleva a cabo por enzimas asociadas con la cara citosólica de la membrana del RE, casi siempre el RE liso (fig. 18-4). La mitocondria sintetiza algunos de sus propios lípidos de membrana e incorpora otros. En los tejidos fotosintéticos, el cloroplasto es el sitio para la síntesis de todos sus propios lípidos. Las enzimas que esterifican el grupo hidroxilo medio del glicerol tienen preferencia para la adición de ácidos grasos no saturados.

Además de los diacilglicerofosfolípidos, las células animales y algunos microorganismos anaerobios, sorprendentemente, contienen grandes cantidades de *plasmalógenos*, un tipo diferente de fosfolípido derivado del glicerol. En estas moléculas, la cadena hidrocarbonada sobre el carbono 1 del glicerol se adhiere por un enlace éter, en vez del enlace éster hallado en los diacilfosfolípidos (véase fig. 18-2). En las células animales, la síntesis de plasmalógenos está catalizada por enzimas unidas a las membranas de los peroxisomas. Se sabe que los plasmalógenos son un reservorio importante de araquidonato, un ácido graso de cadena larga poliinsaturado que es un precursor para un gran grupo de moléculas de señalización denominadas eicosanoides (p. ej., las prostaglandinas, los tromboxanos y los leucotrienos). La liberación regulada de araquidonato desde los glicerofosfolípidos de membrana por la fosfolipasa A_2 cumple un papel determinante de la velocidad en muchas vías de señalización. También derivado de un plasmalógeno, el factor activador de plaquetas (PAF) es una molécula señalizadora que cumple una función clave en la respuesta inflamatoria por el daño o la lesión tisular (véase fig. 6-32). Además, los plasmalógenos pueden influir en el movimiento del colesterol dentro de las células de los mamíferos.

Los **esfingolípidos**, otro grupo importante de lípidos de membrana, son derivados de la esfingosina, un aminoalcohol que tiene una extensa cadena hidrocarbonada no saturada.



▲ Fig. 18-4. Síntesis de fosfolípidos. Debido a que los fosfolípidos son moléculas anfipáticas, las últimas etapas de los múltiples pasos de su síntesis tienen lugar en la interfaz entre una membrana y el citosol, y son catalizadas por enzimas asociadas con la membrana. Paso **1**: Los ácidos grasos del acilo graso CoA son esterificados con un esqueleto de glicerol fosforilado y forman ácido fosfatídico, cuyas dos largas cadenas hidrocarbonadas anclan la molécula a la membrana. Paso **2**: Una fosfatasa convierte el ácido fosfatídico en diacilglicerol. Paso **3**: Se transfiere una cabeza polar (p. ej., fosforilcolina) desde la CDP-colina al grupo hidroxilo expuesto. Paso **4**: Las proteínas flipasas catalizan el movimiento de fosfolípidos desde la hojuela citosólica, en la cual se forman inicialmente, hacia la hojuela exoplasmática.

La esfingosina se produce en el RE, comenzando con el acoplamiento de palmitoil CoA y serina; la adición de un grupo acilo graso para formar *N*-acilesfingosina (ceramida) también tiene lugar en el RE. La adición posterior de una cabeza polar a la ceramida en el Golgi produce *esfingomielina*, cuya cabeza está constituida por fosforilcolina y diversos *glucoesfingolípidos*, en los cuales la cabeza puede ser un monosacárido o un oligosacárido más complejo (véase fig. 18-2). La síntesis de algunos esfingolípidos también puede tener lugar en la mitocondria. Además de servir como esqueleto para los esfingolípidos, la ceramida y sus productos metabólicos son moléculas señalizadoras importantes que pueden influir en el crecimiento celular, la proliferación, la endocitosis, la resistencia al estrés y la apoptosis.

Después que se completa la síntesis en el Golgi, los esfingolípidos son transportados hacia otros compartimientos celulares a través de mecanismos mediados por vesículas, similares a los tratados en el capítulo 17. Por el contrario, los fosfolípidos, al igual que el colesterol, pueden moverse entre los orgánulos mediante mecanismos diferentes, descritos en la sección 18.2.

Las flipasas mueven fosfolípidos desde una hojuela de la membrana a la hojuela opuesta

Aun cuando los fosfolípidos se incorporan inicialmente a la hojucla citosólica de la membrana del RE, diversos fosfolípidos están distribuidos en forma asimétrica en las dos hojuelas de la membrana del RE y otras membranas celulares (véase cuadro 5-1). Los fosfolípidos alternan de posición (*flip-flop*) espontáneamente desde una hojuela a la otra aunque de modo muy lento; no obstante pueden difundirse con rapidez de manera lateral en el plano de la membrana. Para que la membrana del RE se expanda (crecimiento de ambas hojuelas) y tenga distribuido asimétricamente los fosfolipidos, sus componentes fosfolipídicos deben ser capaces de alternar o pasarse rápida y selectivamente desde una hojuela de membrana a la otra.

La distribución asimétrica clásica de los fosfolípidos en las hojuclas de la membrana se rompe a medida que las células (p. ej., los glóbulos blancos) comienzan a envejecer o sufren apoptosis. Por ejemplo, la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina se ubican de preferencia en la hojuela citosólica de las membranas celulares. La exposición acrecentada de estos fosfolípidos aniónicos sobre la cara exoplasmática de la membrana parece servir como señal para que los fagocitos eliminen y destruyan las células viejas o moribundas. La anexina V, una proteína que se une específicamente a los fosfolípidos aniónicos, puede marcarse fluorescentemente y utilizarse para detectar células apoptóticas en células cultivadas y en tejidos.

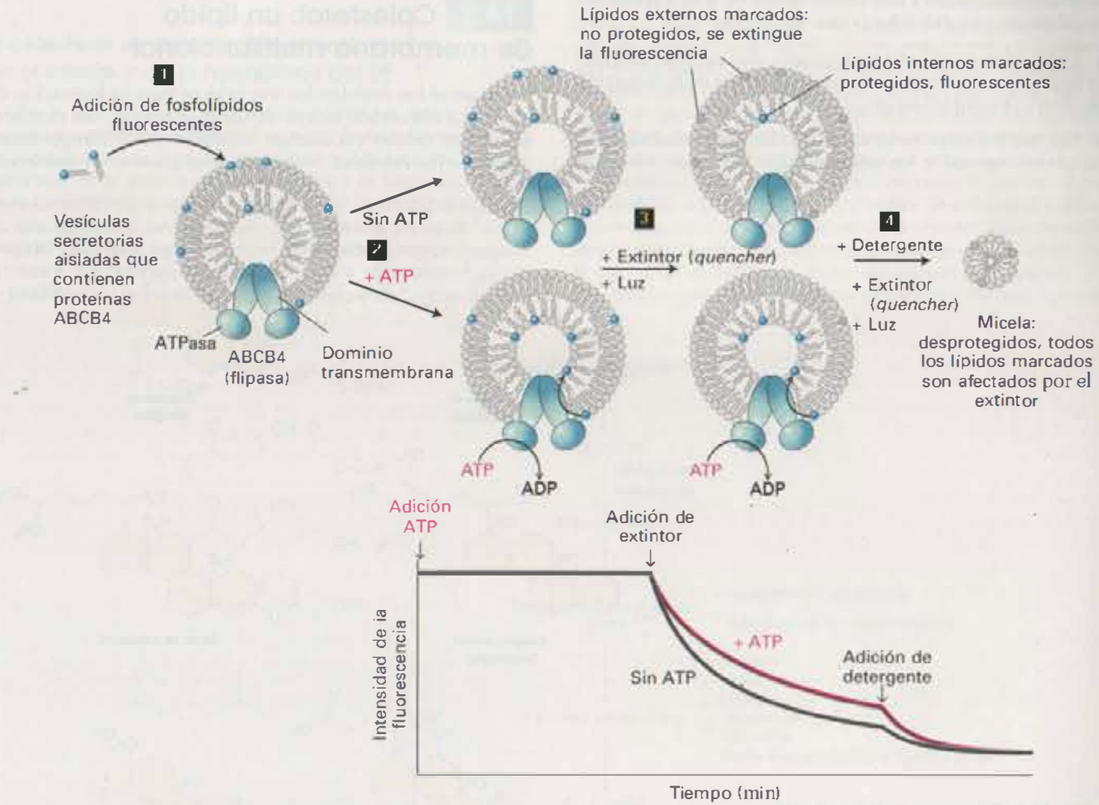
Aunque el mecanismo empleado para generar y mantener la asimetría fosfolipídica de la membrana no se comprende bien, está claro que las **flipasas** cumplen una función clave. Estas proteínas integrales de membrana facilitan el movimiento de moléculas fosfolipídicas desde una hojucla a la otra (véase fig. 18-4, paso 4). Una de las flipasas mejor estudiadas es la proteína de los mamíferos ABCB4, un miembro de la superfamilia ABC de bombas moleculares pequeñas. Como se trató en la sección 18.3, la ABCB4 se expresa en ciertas células del hígado (hepatocitos) y mueve fosfatidilcolina desde la hojuela citoplasmática hacia la exoplasmática de la membrana plasmática para su liberación posterior dentro de la bilis en combinación con el colesterol y los ácidos biliares. Muchos otros miembros de la superfamilia ABC participan en el transporte celular de diversos lípidos (cuadro 18-2).

Al principio se sospechó que la ABCB4 tenía actividad flipasa fosfolipídica debido a que los ratones con mutaciones homocigóticas con pérdida de función en el gen *ABCB4* exhibían deficiencia de secreción de fosfatidilcolina hacia la bilis. Para determinar si la ABCB4 era de hecho una flipasa, los investigadores realizaron experimentos sobre una población homogénea de vesículas purificadas con ABCB4 en la membrana y con la cara citosólica dirigida hacia afuera. Estas vesículas se obtuvieron introduciendo cDNA codificante de ABCB4 de mamífero dentro de un mutante *sec* de levaduras sensible a la temperatura. A la temperatura permisiva, la proteína ABCB4 era expresada por las células transfectadas y se movía a través de la vía secretoria a la superficie celular (cap. 17). Sin embargo, a la temperatura no permisiva, las vesículas secretorias no pueden fusionarse con la membrana plasmática, como sí lo hacen en las células de tipo silvestre, por lo que las vesículas que contienen ABCB4 y otras proteínas de las levaduras se acumulan en las células. Después de purificar estas vesículas secretorias los investigadores las marcaron in vitro con un derivado fluorescente de la fosfatidilcolina. El análisis de extinción (*quenching*) de la fluorescencia en la figura 18-5 se utilizó para demostrar que las vesículas que contenían ABCB4 exhibían cierta actividad flipasa dependiente de ATP, mientras que aquellas sin ABCB4 no lo hicieron. Las estructuras y el mecanismo de acción de algunas flipasas se tratan en el capítulo 7.

La alternancia de posición entre las hojuelas, la difusión lateral, y la fusión y fisión de la membrana no son los únicos procesos dinámicos de los fosfolípidos en las membranas. Sus cadenas de acilo graso y, en algunos casos, sus cabezas están sujetas a remodelación covalente (p. ej., hidrólisis de ésteres grasos mediante fosfolipasas y resíntesis por aciltransferasas). Otro proceso dinámico clave es el movimiento intra-

CUADRO 18-2 Proteínas ABC humanas seleccionadas

Proteína	Expresión tisular	Función en la que interviene	Enfermedad causada por deficiencia de la proteína
ABCA1	Generalizada	Salida de colesterol y fosfolípidos para incorporarlos a lipoproteínas de alta densidad (HDL)	Enfermedad de Tangier
ABCB1 (MDR1)	Suprarrenal, riñón, cerebro	Salida de drogas lipofílicas	
ABCB4 (MDR2)	Hígado	Salida de fosfatidilcolina a la bilis	
ABCB11	Hígado	Salida de sales biliares a la bilis	
CFTR	Tejido exocrino	Transporta iones Cl-	Fibrosis quística
ABCD1	En todas las membranas peroxisómicas	Influye en la actividad de la enzima peroxisómica que oxida ácidos grasos de cadena muy larga	Adrenoleucodistrofia (ADL)
ABCG5/8	Hígado, intestino	Salida de colesterol y otros esteroles	β-Sitosterolemia



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 18-5 Los ensayos de extinción (*quenching*) de la fluorescencia in vitro pueden detectar la actividad fosfolípido flipasa de la ABCB4.** Se purificó una población homogénea de vesículas secretorias que contenían proteína ABCB4 de mutantes *sec* transfectados con el gen *ABCB4*. Paso 1: Los fosfolípidos sintéticos que contenían un grupo cabeza modificado con fluorescencia (azul) se incorporaron principalmente a las hojuelas citosólicas externas de las vesículas purificadas. Paso 2: Si la ABCB4 actuaba como una flipasa, luego de la adición de ATP al exterior de las vesículas una pequeña fracción de los fosfolípidos marcados orientados hacia afuera podría desplazarse hacia la hojuela interna. Paso 3: La inversión de posición en las hojuelas (*flipping*) se detectó al agregar al medio que rodea las vesículas un compuesto inactivador impermeable a la membrana llamado ditionita. La ditionita reacciona con la cabeza fluorescente y destruye su capacidad para emitir fluorescencia (gris). En presencia del inactivador o extintor de la fluorescencia, sólo los fosfolípidos marcados que se encuentran en el ambiente protegido sobre la hojuela interna emitirán fluorescencia. Después de la adición del agente inactivador, la fluorescencia total disminuye con el tiempo hasta alcanzar una meseta en el punto en el cual toda la fluorescencia externa se extingue y sólo puede detectarse la fluorescencia fosfolipídica interna. La observación de una mayor fluorescencia (menos extinción) en presencia de ATP indica que la ABCB4 ha transferido algunos de los fosfolípidos hacia el interior. Paso 4: La adición de detergente a las vesículas genera micelas, lo cual hace a todos los lípidos fluorescentes accesibles al agente inactivador y disminuye la fluorescencia hasta los valores basales. (Adaptado de S. Ruetz y P. Gros, 1994, *Cell* 77:1071.)

celular de fosfolípidos de una membrana a otra diferente. Sin duda, las membranas son componentes dinámicos de la célula que interactúan con los cambios en el medio ambiente intracelular y extracelular, y reaccionan con ellos.

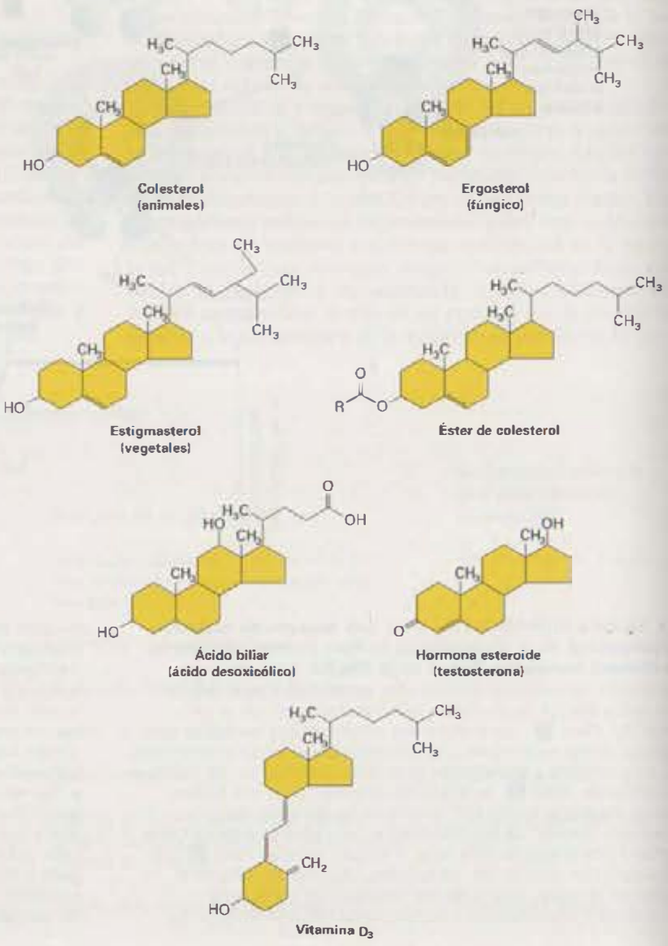
CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 18.1

Fosfolípidos y esfingolípidos: síntesis y movimiento intracelular

- Los ácidos grasos saturados y no saturados con cadenas de diversas longitudes son componentes de fosfolípidos, esfingolípidos y triglicéridos (véase fig. 18-2).
- Los ácidos grasos son sintetizados por enzimas solubles en agua y modificados mediante elongación y desaturación en el retículo endoplasmático (RE).
- Los pasos finales en la síntesis de los glicerofosfolípidos, los plasmalógenos y los esfingolípidos son catalizados por enzimas asociadas con la membrana principalmente en el RE, pero también en el Golgi, las mitocondrias y los peroxisomas (véase fig. 18-4).
- Cada clase de lípidos se incorpora inicialmente a las membranas preexistentes sobre las cuales se produce.
- La mayoría de los fosfolípidos de membrana se distribuye preferentemente ya sea en la hojuela exoplasmática o en la citosólica. Esta asimetría es resultado en parte de la acción de flipasas como la ABCB4, una flipasa de fosfatidilcolina que contribuye a la generación de bilis en el hígado.

18.2 Colesterol: un lípido de membrana multifuncional

Aunque los fosfolípidos son críticos para la formación de la clásica estructura bicapa de las membranas, las membranas de las células eucariontes requieren otros componentes, incluidos los esteroles. Aquí nos centramos en el colesterol,



▶ Fig. 18-6. Estructura química de los principales esteroles y derivados del colesterol. Los principales esteroles de los animales (colesterol), los hongos (ergosterol) y las plantas (estigmasterol) difieren levemente en estructura, pero todos sirven como componentes clave de las membranas celulares. El colesterol se almacena como ésteres de colesterol en los cuales una cadena de acilo graso (porción hidrocarbonada del ácido graso) está esterificada al grupo hidroxilo. El exceso de colesterol es convertido por las células del hígado en ácidos biliares (p. ej., ácido desoxicólico), que se secretan con la bilis. Células endocrinas especializadas sintetizan hormonas esteroides (p. ej., testosterona) a partir del colesterol y reacciones fotoquímicas y enzimáticas en la piel y en los riñones producen vitamina D.

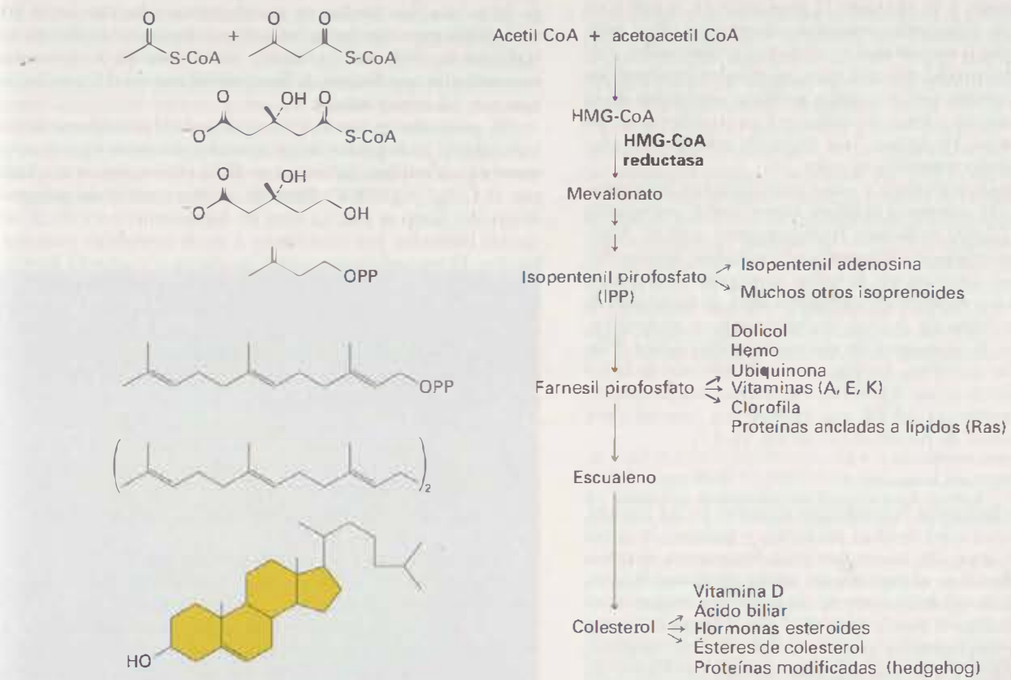
el principal esterol en las células animales y el lípido más abundante en la membrana plasmática (casi equimolar con todos los fosfolípidos). Entre el 50 y el 90% del colesterol en la mayoría de las células de los mamíferos está presente en la membrana plasmática y en las membranas de vesículas endocíticas emparentadas. El colesterol es también crítico para la señalización intracelular y tiene otras funciones que se describirán enseguida. Las estructuras del principal esterol de las levaduras (ergosterol) y del fitoesterol vegetal (p. ej., estigmasterol) difieren levemente de las del colesterol (fig. 18-6). Las pequeñas diferencias en las vías biosintéticas de los esteroles de hongos y animales y en sus estructuras son la base de la mayoría de los fármacos antifúngicos utilizados hoy.

El colesterol es sintetizado por enzimas en el citosol y en la membrana del RE

En la figura 18-7 se resumen las complejas series de reacciones que producen colesterol y otras diversas biomoléculas emparentadas. Las características básicas de esta vía son importantes en la síntesis de otros lípidos y la familiaridad con estas características ayuda a comprender la regulación lipídica, que se tratará más adelante. Los primeros pasos de la síntesis del colesterol (acetil CoA → HMG CoA) tienen lugar en el citosol. La conversión de HMG CoA a mevalonato, el paso limitante de la velocidad en la biosíntesis del colesterol, está catalizada por la *HMG-CoA reductasa*, una proteína integral de membrana del RE, aunque tanto su sustrato como sus productos son solubles en agua. El dominio catalítico soluble en agua de la HMG-CoA reductasa se extiende al citosol, pero sus ocho segmentos transmembrana embeben la enzima con firmeza en la membrana del RE y actúan como un dominio regulador. Cinco de los segmentos transmembrana componen el denominado *dominio sensor de esteroles*. Como se describirá luego, dominios homólogos se hallan en otras proteínas que intervienen en el transporte y la regulación del colesterol.

El mevalonato, el producto de seis carbonos formado por la HMG-CoA reductasa se convierte, mediante varios pasos, en el compuesto isoprenoide de cinco carbonos isopentenil pirofosfato (IPP) y su estereoisómero dimetilalilpirofosfato (DMPP). Estas reacciones son catalizadas por enzimas citosólicas, como lo son las reacciones posteriores en las cuales seis unidades IPP se condensan para producir escualeno, un intermediario de 30 carbonos de cadena ramificada. Las enzimas unidas a la membrana del RE catalizan las múltiples reacciones que convierten el escualeno en colesterol en los mamíferos o en esteroles relacionados en otras especies.

Debido a que una acumulación excesiva de colesterol puede conducir a la formación de cristales de colesterol dañinos, la producción y la acumulación de colesterol están estrechamente controladas. Por ejemplo, los ésteres de colesterol (véase fig. 18-6) se forman a partir del exceso de colesterol y se almacenan como gotas lipídicas citosólicas. La *acil:colesterol*



▲ Fig. 18-7. Vía biosintética del colesterol. El paso regulado que controla la velocidad de biosíntesis del colesterol es la conversión de β-hidroxi-β-metilglutaril CoA (HMG-CoA) en ácido mevalónico por la HMG-CoA reductasa, una proteína de la membrana del RE. El mevalonato luego es convertido a isopentenilpirofosfato (IPP), que tiene la estructura isoprenoide de cinco carbonos básica. El IPP puede ser convertido en colesterol y en muchos otros lípidos, a menudo a través de los intermediarios poliisoprenoides aquí mostrados. Se indican algunos de los numerosos componentes derivados de los intermediarios isoprenoides y del propio colesterol. Para mayores detalles véase el texto.

acil transferasa (ACAT), la enzima que esterifica los acilos grasos CoA con el grupo hidroxilo del colesterol, se localiza en la membrana del RE. Cantidades considerables de gotitas de éster de colesterol suelen encontrarse sólo en las células que producen hormonas esteroides y en las células espumosas, que contribuyen a la enfermedad arterosclerótica en las paredes arteriales. Las gotitas lipídicas intracelulares, ya sea compuestos de ésteres de colesterol o triglicéridos, tienen una cubierta proteica que sirve como interfaz entre el medio ambiente acuoso del citosol y el lípido. Las proteínas de la cubierta sobre las gotitas lipídicas en las células de los mamíferos se denominan perilipinas o proteínas emparentadas con las perilipinas, mientras que las oleosinas y sus proteínas relacionadas cubren las superficies de las gotitas lipídicas denominadas cuerpos de aceite en los vegetales.

Numerosas moléculas bioactivas se producen a partir del colesterol y de sus precursores biosintéticos

Además de su papel estructural en las membranas, tratado en el capítulo 5, el colesterol es el precursor de varias moléculas bioactivas importantes. Éstas incluyen los ácidos biliares (véase fig. 18-6), que se producen en el hígado y ayudan a emulsionar las grasas dietarias para la digestión y la absorción en los intestinos, las hormonas esteroides producidas por células endocrinas (p. ej., las glándulas suprarrenales, los ovarios, los testículos) y la vitamina D producida en la piel y en los riñones. Los artrópodos necesitan colesterol u otros esteroles para producir membranas y hormonas ecdisteroides, que controlan el desarrollo; sin embargo, no pueden producir los esteroles precursores por sí mismos y deben obtenerlos de la dieta. Otra función crítica del colesterol es su adición covalente a la proteína Hedgehog, una molécula señalizadora clave en el desarrollo embrionario (cap. 15).

El isopentenilpirofosfato y otros intermediarios isoprenoides de la vía del colesterol también sirven como precursores para más de 23.000 moléculas biológicamente activas. Algunas de estas moléculas se tratan en otros capítulos: diversos hemos, incluido el componente de unión al oxígeno de la hemoglobina y de los componentes transportadores de electrones de los citocromos (véase fig. 8-15a); la ubiquinona, un componente de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (véase fig. 8-16); las clorofilas, los pigmentos absorbentes de la luz de los cloroplastos (véase fig. 8-31); y el dolicol, un poliisoprenoide en la membrana del RE que cumple una función clave en la glucosilación de proteínas (véase fig. 16-17).

PLANTAS

Los derivados isoprenoides abundan en las plantas, en las cuales forman perfumes y sabores, la goma y el látex, las hormonas y las feromonas, diversas moléculas defensivas, el ingrediente activo de la marihuana, la droga natural cardioprotectora digitalis, las drogas anticancerígenas, como el taxol, y muchas otras. Dada la importancia de los isoprenoides como precursores biosintéticos, no es sorprendente que una segunda vía independiente del mevalonato para la síntesis de IPP haya evolucionado en las eubacterias (p. ej., *E. coli*), las algas verdes y las plantas superiores. En las plantas, esta vía se localiza en los orgánulos denominados plástidos y funciona sintetizando carotenoides, fitol (la cadena lateral isoprenoide de la clorofila) y otros isoprenoides. ∎

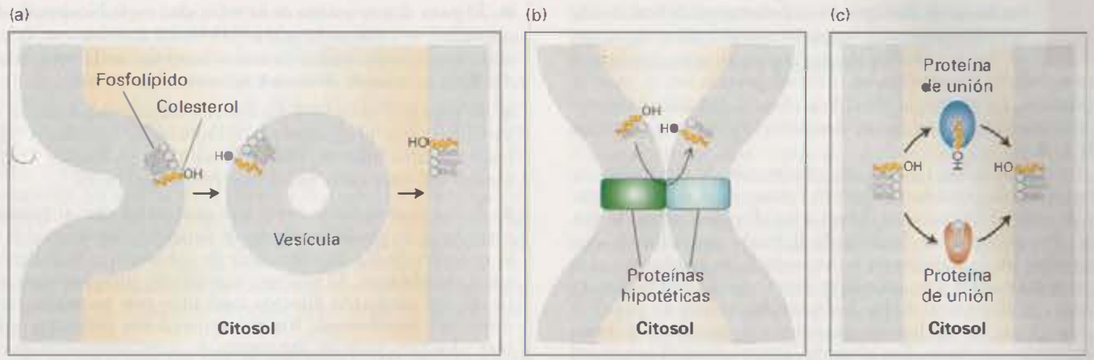
El colesterol y los fosfolípidos son transportados entre los orgánulos mediante mecanismos independientes del Golgi

Como ya se mencionó, los pasos finales de la síntesis del colesterol y de los fosfolípidos tienen lugar principalmente en el RE, aunque algunos de estos lípidos de membrana se producen en las mitocondrias y los peroxisomas (plasmalógenos). Por lo tanto, la membrana plasmática y las que limitan otros orgánulos (p. ej., el Golgi, los lisosomas) deben obtener estos lípidos por medio de uno o más procesos intracelulares de transporte. Por ejemplo, en una vía importante, la fosfatidilserina producida en el RE se transporta a la membrana mitocondrial interna donde es descarboxilada a fosfatidiletanolamina, algo de la cual regresa al RE para la conversión a fosfatidilcolina o bien se mueve hacia otros orgánulos.

Los lípidos de membrana acompañan a las proteínas solubles (luminales) y de membrana durante el tránsito vesicular a través de la vía secretoria mediada por el Golgi (véase fig 17-1). Sin embargo, diversas líneas de evidencia sugieren que existe un movimiento sustancial de colesterol y fosfolípidos entre orgánulos a través de otros mecanismos independientes del Golgi. Por ejemplo, los inhibidores químicos de la vía secretoria clásica y las mutaciones que impiden el tránsito vesicular en esta vía no evitan el transporte de colesterol o de fosfolípidos entre las membranas, aunque alteran el transporte de proteínas y de esfingolípidos derivados del Golgi. Más aún, los lípidos de membrana producidos en el RE no pueden moverse hacia las mitocondrias por medio de las vesículas de transporte clásicas, puesto que no se encontraron vesículas que broten de las membranas del RE y se fusionen con las mitocondrias.

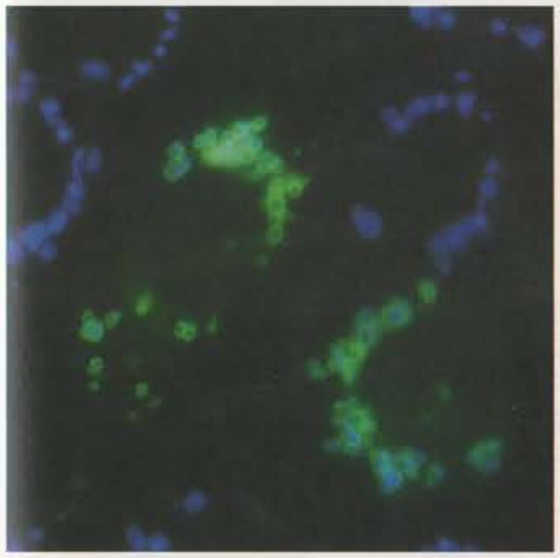
Se propusieron tres mecanismos para el transporte de colesterol y de fosfolípidos desde sus sitios de síntesis hacia otras membranas independientemente de la vía secretoria mediada por el Golgi (fig. 18-8). Primero, cierto transporte independiente del Golgi se efectúa muy probablemente a través de vesículas limitadas por membrana u otros complejos proteína-lípidos. El segundo mecanismo involucra el contacto directo, mediado por proteínas, del RE o de membranas derivadas del RE con membranas de otros orgánulos. En el tercer mecanismo, pequeñas proteínas de transferencia lipídica facilitan el intercambio de fosfolípidos o colesterol entre diferentes membranas. Aunque se identificaron dichas proteínas de transferencia en estudios in vitro, su función en los movimientos intracelulares de la mayoría de los fosfolípidos no está bien definida. Por ejemplo, los ratones con una mutación *knockout* en el gen que codifica la proteína de transferencia de fosfatidilcolina parecen normales en la mayoría de los aspectos, lo que indica que esta proteína no es esencial para el metabolismo fosfolipídico celular.

Un componente bien establecido del sistema de transporte de colesterol intracelular es la *proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR)*. Esta proteína, codificada en el DNA nuclear, controla la transferencia de colesterol desde la membrana mitocondrial externa rica en colesterol hacia la membrana interna pobre en colesterol, donde atraviesa los primeros pasos en su conversión enzimática a hormonas esteroides. El transporte de colesterol mediado por StAR es un paso regulado clave determinante de la velocidad de síntesis de las hormonas esteroides. La StAR contiene una secuencia señal N-terminal que dirige la proteína hacia la membrana mitocondrial externa (cap. 16) y un dominio START (transferencia emparentada a la StAR) C-terminal que tiene un bolsillo hidrófobo de unión al colesterol. Similares dominios START se encuentran en varias proteínas implicadas en el transporte de colesterol intracelular, y estos dominios promueven la transferencia de colesterol en células cultivadas. Mutaciones en el gen StAR pueden causar hiperplasia suprarrenal congénita, una enfermedad mortal marcada por una reducción drástica de la síntesis de hormonas esteroides. Algunas otras proteínas implicadas en el transporte lipídico, incluida la proteína de transferencia de fosfatidilcolina ya mencionada, también contienen dominios START.



▲ Fig. 18-8. Mecanismos propuestos para el transporte, independiente del Golgi, de colesterol y fosfolípidos entre las membranas. En el mecanismo (a), las vesículas transfieren lípidos entre las membranas sin pasar a través del aparato de Golgi. En el mecanismo (b), la transferencia lipídica es una consecuencia del contacto directo entre membranas que está mediado por proteínas inmersas en la membrana. En el mecanismo (c), la transferencia está mediada por pequeñas proteínas solubles de transferencia lipídica. Algunas evidencias sugieren que este mecanismo no constituye una parte significativa del flujo de fosfolípidos entre las membranas independiente del Golgi. (Adaptado de F. R. Maxfield y D. Wustner, 2002, *J. Clin. Invest.* 110:891.)

Un segundo contribuyente a los movimientos intracelulares de colesterol es la *proteína Niemann-Pick C1 (NPC1)*, una proteína integral de membrana localizada en el compartimiento lisosómico/endosómico tardío de movimiento rápido. Algunos de los múltiples segmentos del NPC1 que atraviesan la membrana forman un dominio sensor del esterol similar al de la HMG-CoA reductasa. Mutaciones en la NPC1 causan defectos en el colesterol intracelular y en el transporte glucoesfingolipídico y, en consecuencia, en la regulación del metabolismo del colesterol celular. Las células sin NPC1 funcional o las tratadas con una droga que imita la pérdida de la función de NPC1 acumulan un exceso de colesterol en el compartimiento lisosómico/endosómico tardío (fig. 18-9). El transporte de colesterol en las células deficientes en NPC1 se restablece mediante la sobreexpresión de Rab9, una GTPasa pequeña que participa en el transporte vesicular endosómico tardío (cap. 17). Este hallazgo sugiere que el tránsito vesicular cumple al menos un papel en el movimiento del colesterol dependiente de NPC1.



◀ FIGURA EXPERIMENTAL 18-9 Las células con la proteína de Niemann-Pick C1 (NPC1) no funcional acumulan colesterol en vesículas endosómicas/lisosómicas tardías. En tres células que expresan un transgén que codifica una proteína híbrida NPC1 ligada a la proteína fluorescente verde (GFP), la proteína híbrida se revela en el compartimiento endosómico/lisosómico tardío a través de su fluorescencia verde. Las células que se encuentran en esta microfotografía fluorescente de dos colores fueron tratadas con una droga que inhibe la función NPC1. Las células también se tiñeron con una droga fluorescente azul que se une al colesterol llamada filipina. Nótese la colocalización del colesterol (azul) con la proteína híbrida NPC1-GFP (verde) sobre las superficies de vesículas adyacentes al núcleo. También se ven las células que no expresan la NPC1 híbrida (sólo azul). La acumulación de colesterol en estas vesículas en ausencia de NPC1 funcional sugiere que las vesículas endosómicas/lisosómicas tardías desempeñan un papel clave en el tránsito intracelular de colesterol. (De D. C. Ko et al., 2001, *Mol. Biol. Cell* 12:601; cortesía de D. Ko y M. Scott.)

MEDICINA

En los seres humanos, los defectos en la función de NPC1 causan un almacenamiento lipídico anormal en los orgánulos intracelulares, lo que conduce a anormalidades neurológicas, neurodegeneración y muerte prematura. En efecto, la identificación del gen defectuoso en dichos pacientes condujo al descubrimiento de la proteína NPC1.

La composición lipídica de membranas de diferentes orgánulos varía considerablemente (véase cuadro 5-1). Algunas de estas diferencias se deben a los distintos sitios de síntesis. Por ejemplo, un fosfolípido llamado cardiolipina, que se localiza en la membrana mitocondrial, es producido sólo en la mitocondria y se transfiere poco a otros orgánulos. El transporte diferencial de lípidos también cumple un papel en la determinación de las composiciones lipídicas de diversas membranas celulares. Por ejemplo, aun cuando el colesterol es producido en el RE, su concentración (relación molar colesterol-fosfolípido) es de ~1,5–13 veces mayor en la membrana plasmática que en otros orgánulos (RE, Golgi, mitocondria, lisosoma). Aunque los mecanismos responsables de establecer y mantener estas diferencias no se comprenden bien, la composición lipídica distintiva de cada membrana tiene una influencia fundamental en sus propiedades físicas (cap. 5).

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 18.2

Colesterol: un lípido de membrana multifuncional

- Los pasos iniciales en la biosíntesis del colesterol tienen lugar en el citosol, mientras que los pasos finales son catalizados por enzimas asociadas con la membrana del RE.
- El paso determinante de la velocidad en la biosíntesis del colesterol es catalizado por la HMG-CoA reductasa, cuyos segmentos transmembrana están inmersos en la membrana del RE y contienen dominios sensores de esteroles.
- El mismo colesterol y los intermediarios isoprenoides de su síntesis son precursores biosintéticos de hormonas esteroides, ácidos biliares, vitaminas solubles en lípidos y otras numerosas moléculas bioactivas (véase fig. 18-7).
- Existe considerable evidencia que indica que el tránsito vesicular a través del complejo de Golgi no es responsable de la mayoría de los movimientos de colesterol y fosfolípidos entre membranas. El transporte vesicular independiente del Golgi, los contactos directos mediados por proteínas entre diferentes membranas, los transportadores proteicos solubles o los tres, podrían dar cuenta de cierto transporte de colesterol y fosfolípidos entre los orgánulos (véase fig. 18-8).
- La proteína StAR, que tiene un bolsillo hidrófobo de unión al colesterol, cumple una función clave en el movimiento del colesterol hacia el interior de la mitocondria para la síntesis de hormonas esteroides.
- La proteína NPC1, una proteína transmembrana multipaso grande, contiene un dominio sensor de esteroles similar al de la HMG-CoA reductasa. La NPC 1 es necesaria para el movimiento normal de colesterol entre ciertos compartimientos intracelulares.

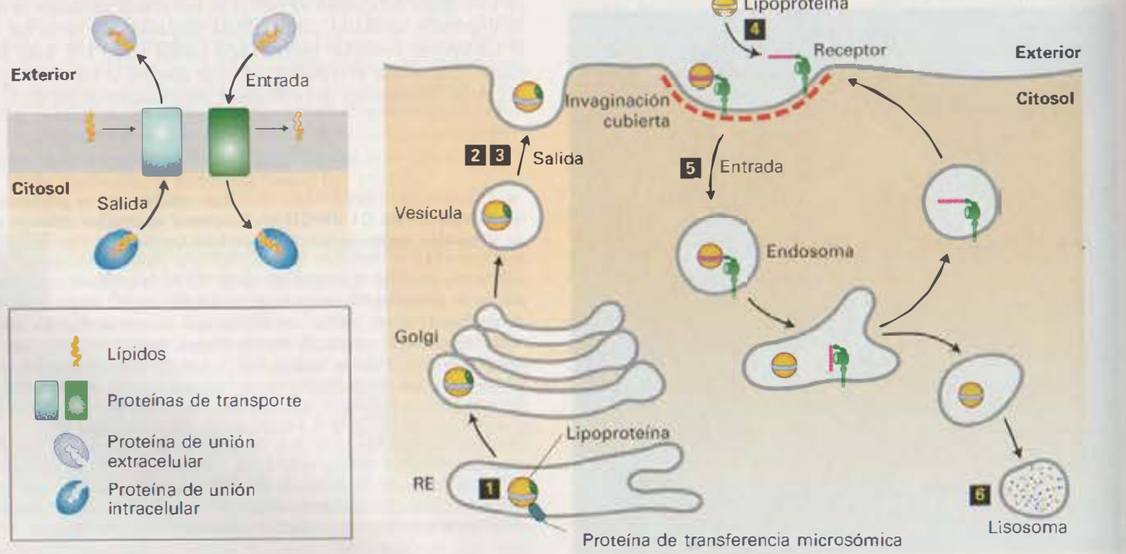
18.3 Movimiento lipídico hacia adentro y hacia afuera de las células

En los organismos multicelulares, sobre todo en los mamíferos, los lípidos a menudo entran y salen de las células y son transportados entre diferentes tejidos por la circulación. Dicho movimiento lipídico ayuda a mantener los niveles lipídicos corporales apropiados y tiene otras ventajas para un organismo. Por ejemplo, los lípidos de la dieta absorbidos en los intestinos o almacenados en el tejido adiposo pueden distribuirse a las células de todo el cuerpo. De esta forma, las células pueden obtener lípidos dietarios esenciales (p. ej., linoleato) y pueden evitar gastar energía para su síntesis (p. ej., colesterol), ya que la dieta permite disponer de ellos. La capacidad de algunas células para transportar lípidos permite la excreción del exceso de lípidos del cuerpo o su secreción en ciertos líquidos (p. ej., la leche en las glándulas mamarias). Además, la coordinación del metabolismo lipídico y energético de todo el organismo depende del transporte lipídico intracelular.

No es sorprendente que el transporte y el metabolismo lipídico intracelular e intercelular estén regulados coordinadamente, como se trata en la sección 18.4. Aquí, revisamos las primeras formas en las cuales las células transportan lípidos. Los dos mecanismos principales de salida y entrada de lípidos en la célula se resumen en la figura 18-10. En el primer mecanismo, la entrada o salida de moléculas lipídicas individuales está mediado por proteínas de transporte de la superficie celular. Los principios que subyacen a este mecanismo son similares a aquellos para las moléculas pequeñas solubles en agua, como la glucosa tratada en el capítulo 7. Una diferencia notable es que los lípidos hidrófobos, que son poco solubles en soluciones acuosas, suelen asociarse con proteínas de unión a lípidos en el espacio extracelular o en el citosol, en lugar de permanecer libres en solución. En el segundo mecanismo de salida y entrada de lípidos, los grupos lipídicos se empaquetan con proteínas dentro de partículas de transporte denominadas lipoproteínas. Estas lipoproteínas salen de las células por la vía secretoria clásica (cap. 17). Los lípidos transportados por lipoproteínas extracelulares son incorporados por las células a través de receptores de superficie.

(a) Salida mediada por proteína de transporte y entrada de lípido

(b) Salida y entrada mediada por receptor y por lipoproteína



◀ Fig. 18-10. Las dos vías principales para la entrada y salida de lípidos celulares. (a) Moléculas lipídicas individuales atraviesan la membrana plasmática con la asistencia de proteínas de transporte transmembrana. Proteínas de unión a lípidos intracelulares y extracelulares (mostradas aquí), micelas lipídicas o membranas, participan normalmente como dadoras y aceptoras de lípidos. En algunos casos, los gradientes de concentración de las sustancias transportadas son suficientes para conducir el transporte (p. ej., la entrada de ácidos biliares en el hígado y en el intestino mediante los simportadores ligados al Na^+). En otros, la hidrólisis de ATP acoplada ayuda a conducir el transporte lipídico (p. ej., la secreción de lípidos biliares de los hepatocitos mediante proteínas ABC). (b) Los lípidos también se transportan como componentes de lipoproteínas. Estos grandes ensamblajes de proteínas y lípidos se colocan juntos en el retículo endoplasmático (RE) con la asistencia de proteínas microsómicas de transferencia (1), salen (2) a través de la vía secretoria (3) como partículas solubles en agua y luego circulan en la sangre. Después que las lipoproteínas circulantes se unen a ciertos receptores de la superficie celular (4), las partículas intactas pueden ser internalizadas por endocitosis (5) y posteriormente los lípidos se hidrolizan en los lisosomas (6), como se representó aquí. Otros receptores median la incorporación de componentes lipídicos de las lipoproteínas, liberando hacia el espacio extracelular una partícula depletada de lípidos.

Los transportadores de la superficie celular ayudan a movilizar ácidos grasos a través de la membrana plasmática

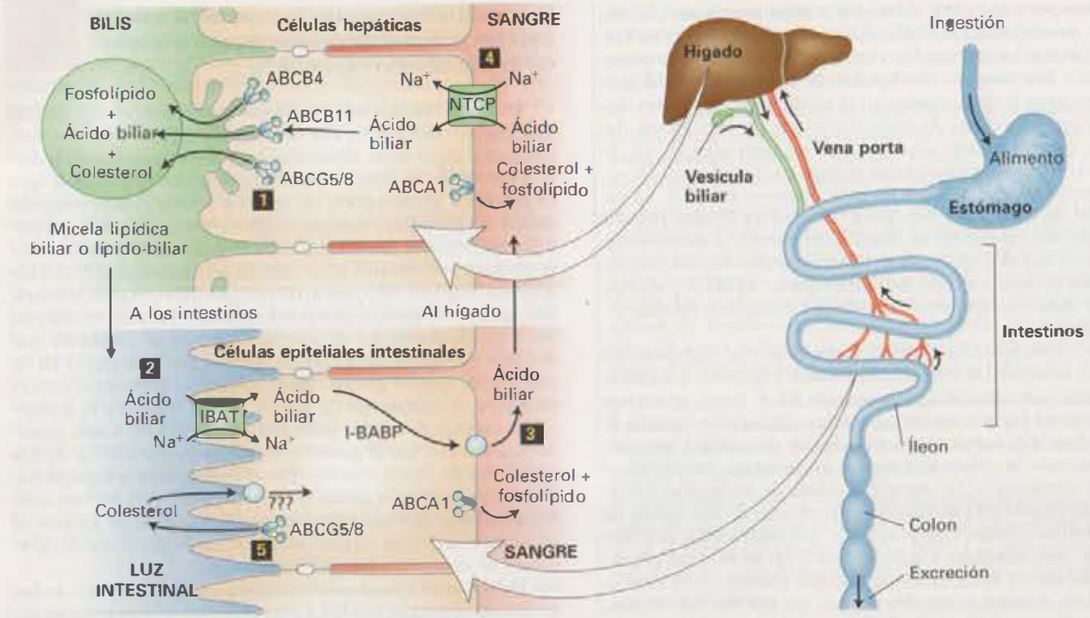
Durante muchos años se pensó que el transporte de ácidos grasos transmembrana no necesitaba una proteína mediadora porque estas moléculas hidrófobas pueden difundirse a través de las bicapas lipídicas. Aunque es probable que se produzca el transporte de algunos ácidos grasos independiente de proteínas, algunas células (p. ej., las células epiteliales intestinales, las células del músculo cardíaco y los adipocitos) deben entrar o sacar cantidades sustanciales de ácidos grasos a una tasa tal, o de manera específica y regulada o ambas, que no es posible por mera difusión. En cultivos celulares y en experimentos de animales enteros se demostró que diversas proteínas integrales de membrana participan en la entrada de ácidos grasos. Estas proteínas incluyen diversas *proteínas de transporte de ácidos grasos (FATP)* y la proteína de superficie celular multifuncional, *CD36*. Estos transportadores median el movimiento de sustratos a favor de sus gradientes de concentración. Por el contrario, los transportadores que median la salida de ácidos grasos aún no han sido identificados, aunque algunos, al menos, pueden mediar el transporte en forma bidireccional, según la dirección del gradiente de concentración del ácido graso.

Debido a su escasa solubilidad en agua, la mayoría de los ácidos grasos están unidos a una proteína transportadora en el citosol y el espacio extracelular acuosos (véase fig. 18-10a). En los mamíferos, la principal proteína extracelular de unión que entrega o acepta ácidos grasos es la *albúmina* del suero. La proteína más abundante en el plasma (parte líquida de la sangre) de los mamíferos, la albúmina, tiene sobre su superficie al menos un surco o hendidura de unión a lípido revestida con hélices α hidrófobas. Además de mediar el transporte de ácidos grasos, la albúmina media el transporte de muchos ácidos orgánicos aniónicos (p. ej., bilirrubina) y otras moléculas a través del torrente sanguíneo. Los principales transportadores intracelulares de ácidos grasos son las proteínas de unión a los ácidos grasos ya descritas.

Las proteínas ABC median la salida celular de fosfolípidos y colesterol

La salida de fosfolípidos y colesterol puede deberse a la actividad simultánea de diversos miembros de la superfamilia ABC (véase cuadro 18-2). El ejemplo mejor comprendido de este fenómeno está en la formación de la *bilis*, un líquido acuoso que contiene fosfolípidos, colesterol y ácidos biliares, que derivan del colesterol. Después de que salen de los hepatocitos, los fosfolípidos, el colesterol y los ácidos biliares forman en la bilis micelas solubles en agua, las cuales se distribuyen a través de conductos hasta la vesícula biliar, donde se almacenan y se concentran. En respuesta a una comida que contiene grasas, la bilis se libera al intestino delgado para ayudar a emulsionar los lípidos dietarios y, por lo tanto, a la digestión y absorción por el cuerpo. Como veremos más adelante, la alteración del metabolismo biliar con fármacos puede utilizarse para prevenir ataques cardíacos.

En la figura 18-11 se resaltan las principales proteínas de transporte que median la secreción y el movimiento de los componentes biliares. Tres proteínas ABC mueven fosfolípidos, colesterol y ácidos biliares a través de la superficie apical de las células del hígado hacia pequeños conductos (paso 1).



▲ Fig. 18-11. Las principales proteínas de transporte del hígado y de los intestinos participan en la circulación enterohepática de los lípidos biliares. En las células del hígado (hepatocitos) y en las células epiteliales intestinales la secreción de componentes biliares y el reciclaje de ácidos biliares están mediados por distintos ordenamientos de proteínas transportadoras. Estos dos tipos de células polarizadas incorporan lípidos a través de una superficie y los sacan a través de la superficie opuesta. Paso 1: Los hepatocitos sacan lípidos a través de sus membranas apicales hacia la bilis empleando tres proteínas ABC dependientes de ATP: ABCB4 (fosfolípidos), ABCB11 (ácidos biliares) y ABCG5/8 (esteroles). Paso 2: Las células epiteliales intestinales ingresan componentes biliares y lípidos dietarios desde la luz intestinal empleando el transportador ileal de ácido biliar (IBAT), un simportador ligado al Na^+ y otros transportadores no tan bien definidos ubicados en la membrana apical. Paso 3: Los ácidos biliares incorporados se transportan a la superficie basolateral unidos a la proteína de unión al ácido biliar intestinal (I-BABP) y salen hacia la sangre con la ayuda de transportadores desconocidos. Paso 4: Los ácidos biliares que retornaron al hígado con la sangre son incorporados mediante NTCP, otro simportador ligado al Na^+. Paso 5: La absorción de esteroles por parte de las células intestinales está disminuida por acción de ABCG5/8, que bombearía esteroles vegetales y colesterol fuera de las células retornándolos hacia a la luz.

Una de estas proteínas, la flipasa ABCB4, transfiere la fosfatidilcolina desde la hojuela citosólica hacia la exoplasmática de la membrana apical de los hepatocitos, como se describió antes. El mecanismo preciso mediante el cual el exceso de fosfolípidos se desplaza de la hojuela exoplasmática hacia el espacio extracelular no es bien comprendido. Una proteína relacionada, la ABCB11, transporta ácidos biliares, mientras que las "hemi" proteínas ABCG5 y ABCG8 se combinan para formar una única proteína ABC (ABCG5/8) que transporta esteroles hacia la bilis.

En el intestino, el *transportador ileal de ácido biliar (IBAT)* introduce ácidos biliares desde la luz hacia las células epiteliales intestinales (paso 2). IBAT es un simportador ligado al Na^+ (véase fig. 7-21) que usa la energía liberada por el movimiento del Na^+ a favor de su gradiente de concentración para impulsar la incorporación de alrededor del 95% de los ácidos biliares. Estos ácidos biliares introducidos en el lado apical de las células epiteliales intestinales se mueven intracelularmente con la ayuda de la *proteína de unión de ácidos biliares intestinales (I-BABP)* hacia el lado basolateral. Allí, son sacados hacia la sangre por proteínas de transporte mal caracterizadas (paso 3) y regresan a las células del hígado mediante otro simportador ligado al Na^+ denominado NTCP (paso 4). Este ciclo de los ácidos biliares desde el hígado al intestino y de regreso, denominado **circulación enterohepática**, está estrechamente regulado y cumple un papel primordial en la homeostasis lipídica.

Dado que la cantidad de colesterol dietario suele ser baja, una fracción sustancial del colesterol en la luz intestinal proviene del colesterol biliar secretado por el hígado. La ABCG5/8 también se expresa en la membrana apical de las células epiteliales intestinales, donde ayuda a controlar las cantidades de colesterol y de esteroles derivados de las plantas absorbidos aparentemente mediante el bombeo hacia afuera de las células epiteliales de regreso a la luz de los esteroles absorbidos en exceso o no deseados (véase fig. 18-11, paso 5). Como resultado parcial de esta actividad, sólo alrededor del 1% de los esteroles vegetales dietarios, que no son metabólicamente útiles para los mamíferos, ingresan en el torrente sanguíneo. Los ácidos biliares no absorbidos (normalmente < 5% de los ácidos biliares luminales) y el colesterol y los esteroles vegetales no absorbidos se excretan por último con las heces.

MEDICINA

Las mutaciones que inactivan los genes que codifican ABCG5 o ABCG8 causan *β-sitoesterolemia*. Los pacientes con esta rara enfermedad genética absorben cantidades anormalmente altas de esteroles tanto vegetales como animales y su hígado secreta cantidades anormalmente bajas hacia la bilis. En realidad, los hallazgos de los estudios en pacientes con *β-sitoesterolemia* fueron los primeros que implicaron estas proteínas ABC en la salida de esteroles de las células. ▮

Otras dos proteínas de transporte de la superficie celular median la salida de colesterol, fosfolípidos o ambos de la célula: la ABCA1 miembro de la superfamilia ABC y un homólogo del transportador de ácidos grasos CD36 denominado SR-BI. Estas proteínas se describirán en detalle en breve, dadas sus importantes funciones en el metabolismo lipoproteico.

Los lípidos pueden salir o ingresar en grandes complejos lipoproteicos bien definidos

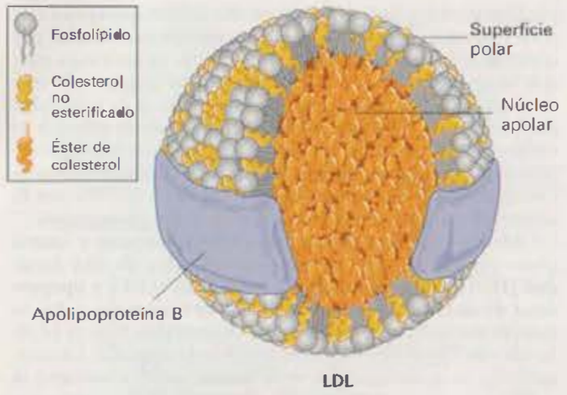
Para facilitar la transferencia masiva de lípidos entre las células, los animales han desarrollado una eficiente alternativa a la entrada y salida de cada molécula mediadas por proteínas transportadoras de la superficie celular, como las representadas en la figura 18-11. Esta alternativa incorpora cientos a miles de moléculas lipídicas dentro de transportadores macromoleculares solubles en agua, denominados lipoproteínas, que las células pueden secretar hacia la circulación o tomar de la circulación en forma conjunta.

Una partícula lipoproteica tiene una cubierta compuesta de proteínas (*apolipoproteínas*) y una monocapa fosfolipídica que contiene colesterol (fig. 18-12). La cubierta es anfipática porque su superficie externa es hidrófila, lo que hace a estas partículas solubles en agua, y su superficie interna es hidrófoba. Adyacente a la superficie interna hidrófoba de la cubierta se encuentra un centro de lípidos neutros que contienen principalmente ésteres de colesterol, triglicéridos, o ambos. Pequeñas cantidades de otros compuestos hidrófobos (p. ej., vitamina E, caroteno) también se transportan en el centro lipoproteico.

Las lipoproteínas de los mamíferos pertenecen a cuatro clases principales. Tres de ellas –**lipoproteína de alta densidad (HDL)**, **lipoproteína de baja densidad (LDL)** y **lipoproteína de muy baja densidad (VLDL)**– se denominan sobre la base de sus diferentes densidades. Cuanto más baja es la relación entre proteínas y lípidos, menor es la densidad. La cuarta clase, los **quilomicrones**, es la menos densa y contiene la mayor proporción de lípidos. Cada clase de lipoproteínas tiene composiciones lipídicas y de apolipoproteínas, tamaños y funciones distintivas (cuadro 18-3). Las VLDL y los quilomicrones transportan principalmente triglicéridos en sus centros, mientras que los centros de LDL y HDL consisten principalmente en ésteres de colesterol. Las apolipoproteínas ayudan a organizar la estructura de una partícula lipoproteica y a determinar sus interacciones con enzimas, proteínas extracelulares de transferencia lipídica y receptores de superficie celular. Cada partícula LDL contiene una única copia de una gran (537-kDa) apolipoproteína denominada apoB-100 incluida en su capa externa (véase fig. 18-12). En cambio, varias copias de diferentes apolipoproteínas se encuentran en cada una de las otras clases de lipoproteínas.

CUADRO 18-3 Principales clases de lipoproteínas plasmáticas humanas

Propiedad	Quilomicrón	VLDL	LDL	HDL
Masa aprox. (kDa)	50-1000 × 10^3	10-80 × 10^3	2,3 × 10^3	0,175-0,360 × 10^3
Diámetro (nm)	75-1200	30-80	18-25	5-12
Triglicéridos (% de lípidos centrales)	97	75	12	11
Ésteres de colesterol (% de lípidos centrales)	3	25	88	89
Relación masa proteína:lípido	1:100	9:100	25:100	90:100
Principales apolipoproteínas	A, B-48, C, E	B-100, C, E	B-100	A, C
Principal función fisiológica	Transporte de triglicéridos dietarios (Tg) desde los intestinos hacia los tejidos extrahepáticos (p. ej., músculo, tejido adiposo); los remanentes, depleccionados de Tg, distribuyen el colesterol dietario y algunos Tg al hígado	Transporte de Tg hepáticos hacia los tejidos extrahepáticos; convertidos en LDL	Transporte de colesterol plasmático al hígado y a los tejidos extrahepáticos	Incorpora el colesterol de los tejidos extrahepáticos y lo transporta hacia el hígado, a los tejidos productores de esteroides y a otras lipoproteínas



▲ Fig. 18-12. Modelo de lipoproteína de baja densidad (LDL). Esta clase y las otras clases de lipoproteínas tienen la misma estructura general; una cubierta anfipática, compuesta de una monocapa fosfolipídica (no bicapa), colesterol y proteínas, y un núcleo hidrófobo, compuesto mayormente de ésteres de colesterol o triglicéridos o ambos pero con menores cantidades de otros lípidos neutros (p. ej., algunas vitaminas). Este modelo de LDL se basa en la microscopia electrónica y otros métodos biofísicos de baja resolución. El LDL es único en cuanto contiene una única molécula de un tipo de apolipoproteína (apoB), la cual parece envolverse alrededor del exterior de la partícula como una banda de proteínas. Las otras lipoproteínas contienen múltiples moléculas de apolipoproteínas, a menudo de diferentes tipos. (Adaptado de M. Krieger, 1995, en E. Haber, ed., *Cardiovascular Molecular Medicine*, Scientific American Medicine, pp. 31-47.)

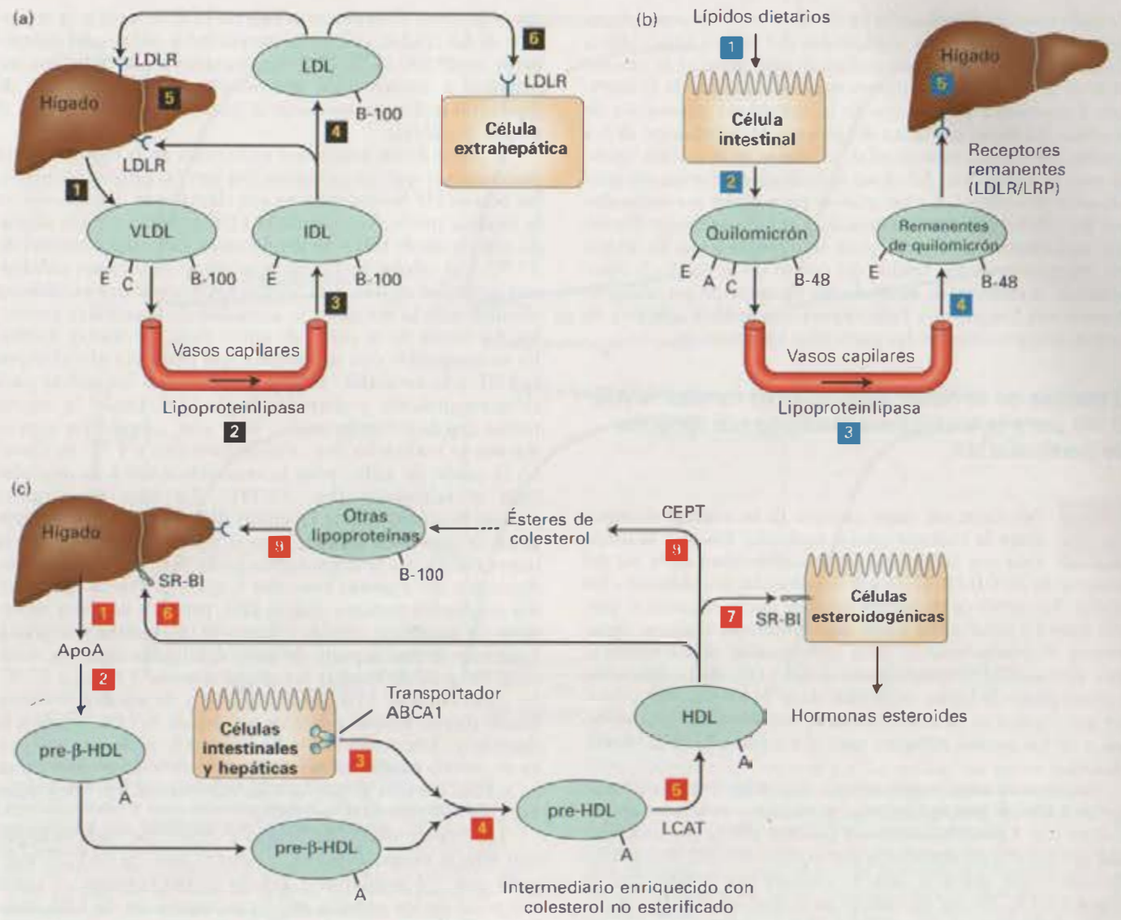
▶ Fig. 18-13. Remodelación de lipoproteínas e interconversiones en el sistema circulatorio. Las apolipoproteínas se indican mediante letras capitales (p. ej., A, B-100) proyectándose desde las partículas. (a) Después de su secreción desde el hígado (1), los triglicéridos VLDL son hidrolizados por la lipoproteinlipasa, una enzima extracelular adherida a la superficie de los vasos orientada hacia la sangre (2). La pérdida de triglicéridos y de algunas apolipoproteínas de la VLDL produce IDL (3), que es convertido en LDL (4). Tanto IDL como LDL pueden ser eliminadas de la circulación mediante endocitosis por medio de los receptores de LDL (LDLR) ubicados sobre células del hígado (hepáticas) (5) y sobre células no pertenecientes al hígado (extrahepáticas) (6). (b) Los lípidos dietarios son absorbidos (1) y empaquetados como quilomicrones por las células epiteliales intestinales, secretados hacia la linfa y luego transportados al torrente sanguíneo (2). En la circulación, son remodelados de manera similar a la remodelación de VLDL (3), formando pequeños restos de quilomicrones enriquecidos con colesterol (4), que son incorporados por hepatocitos a través de endocitosis mediada por receptores (6). (c) Se piensa que las HDL se forman después de la secreción de la apolipoproteína A a partir de las células 1 mediante la formación de partículas de preβ-HDL, que contienen apoA, pero muy pocos lípidos (2). Estas pequeñas partículas actúan como receptores para los fosfolípidos y el colesterol transportado desde las células (principalmente del hígado y del intestino) por el transportador ABCA1 (3), formando un intermediario rico en colesterol (4). La lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT), una enzima en el plasma, esterifica el colesterol luego de su incorporación a la HDL (5). Los ésteres de colesterol en el centro de una partícula de HDL grande pueden ser transferidos a las células (especialmente las hepáticas (6) y las esteroidogénicas (7)) por el receptor SR-BI o a otras lipoproteínas por medio de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP) (8) y posteriormente llevados hacia tejidos como el hígado (9). (Adaptado de M. S. Brown y J. L. Goldstein, 1984, *Sci. Am.* 251(5):58, y M. Krieger, 1999, *Ann. Rev. Biochem.* 523.)

Las lipoproteínas se producen en el RE, salen por la vía secretoria y se remodelan en la circulación

Sólo dos tipos de lipoproteínas, la VLDL y los quilomicrones, se forman completamente dentro de las células mediante ensamblaje en el RE, un proceso que necesita la actividad de *proteínas microsómicas de transferencia*. Las partículas ensambladas se mueven a través de la vía secretoria hasta la superficie celular y se liberan por exocitosis: las VLDL desde las células del hígado y los quilomicrones desde las células epiteliales intestinales (véase fig. 18-10b). Las LDL, IDL (proteínas de densidad intermedia) y algunas HDL se generan extracelularmente en el torrente sanguíneo y sobre las superficies de células mediante la remodelación de VLDL y quilomicrones secretados. Existen cuatro tipos de modificaciones:

- Hidrólisis de triglicéridos y fosfolípidos mediante lipasas y esterificación de colesterol mediante una aciltransferasa.
- Transferencia de ésteres de colesterol, triglicéridos y fosfolípidos entre las lipoproteínas mediante proteínas de transferencia de lípidos.
- Captación, por parte de algunas partículas, del colesterol y los fosfolípidos salidos de las células.
- Asociación y disociación de algunas apolipoproteínas de la superficie de las partículas.

Por ejemplo, la VLDL secretada por los hepatocitos se convierte en IDL y finalmente en LDL, la cual puede distribuir luego su colesterol a las células a través de receptores de LDL (fig. 18-13a). De manera similar, los quilomicrones que transportan lípidos dietarios desde los intestinos son convertidos por la actividad hidrolítica de la lipasa en *remanentes de quilomicrón*, que son incorporados por el hígado por endocitosis (fig. 18-13b). Pequeñas partículas de preβ-HDL se generan extracelularmente a partir de las apoliproteínas apoA, secretadas sobre todo por las células del hígado y del intestino, y de pequeñas cantidades de colesterol y fosfolípidos. Luego se convierten en grandes partículas de HDL esféricas, que constituyen el grueso del HDL hallado en la sangre (fig. 18-13c). La forma principal de crecimiento de las partículas preβ-HDL es a través de la incorporación de fosfolípidos y colesterol que salen de las células, con la ayuda de otra proteína ABC denominada *ABCA1* (véase cuadro 18-2). A esta proteína se la asoció con la formación de HDL cuando se demostró que los defectos en el gen de *ABCA1* causan la enfermedad de Tangier's, un trastorno genético muy raro en el cual las personas afectadas casi no poseen HDL en la sangre. Luego de su incorporación a la HDL, el colesterol es esterificado mediante la *lecitina: γ-colesterol aciltransferasa (LCAT)*, una enzima presente en el plasma. Grandes partículas de HDL pueden transferir sus ésteres de colesterol a otras lipoproteínas a través de la *proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP)* o a células (en especial las células hepáticas y esteroidogénicas) a través del receptor SR-B1, tratado más adelante.



En la sección 18.5 veremos en detalle que la concentración de colesterol LDL plasmático (incluidos tanto el colesterol esterificado como el no esterificado) está directamente correlacionada con el riesgo de enfermedad arteriocoronaria, mientras que la concentración de colesterol HDL plasmático está inversamente correlacionada con ese riesgo. Por esta razón, a la LDL se la denomina popularmente "colesterol malo" y a la HDL, "colesterol bueno".

Las células utilizan diversos mecanismos mediados por proteínas para incorporar lípidos asociados a lipoproteínas

Para lograr una eficiencia máxima, los lípidos dentro de las lipoproteínas en circulación deben ser incorporados sólo por las células que los requieren para la formación de la membrana (p. ej., células en división), para la síntesis de hormonas esteroides (p. ej., células endocrinas), para producir energía (p. ej., células musculares) o para almacenamiento (células adiposas, células endocrinas). El direccionamiento de lípidos asociados a lipoproteínas hacia las células apropiadas se logra mediante una de estas dos formas: 1) hidrólisis extracelular parcial, local del núcleo de triglicéridos seguida por la captación de los ácidos grasos liberados mediante proteínas de transporte o 2) expresión regulada de receptores lipoproteicos de superficie celular que median la incorporación directa de lípidos asociados con lipoproteínas.

El primer mecanismo de direccionamiento, por ejemplo, abastece las células con ácidos grasos para su utilización como fuente de energía en los músculos y su almacenamiento en el tejido adiposo. La enzima extracelular lipoproteinlipasa se adhiere mediante cadenas de glucosaminoglucano (GAG) a la superficie de las células endoteliales de estos tejidos orientada hacia la sangre. Luego los ácidos grasos liberados por la hidrólisis de triglicéridos en el centro de la VLDL y de los quilomicrones cruzan la pared de los vasos sanguíneos e ingresan en las células subyacentes a través de transportadores de ácidos grasos como FATP y CD36 (véase fig. 18-10a). Este proceso lleva a la entrega de ácidos grasos a las células concomitantemente con la remodelación de las partículas lipoproteicas.

La expresión de distintos receptores lipoproteicos por diversos tejidos también asegura que los lípidos se distribuyan en las células que los necesitan y puedan ser usados por ellas.

En cada caso de distribución facilitada por receptores, los ésteres de colesterol y los triglicéridos del centro lipoproteico deben cruzar dos barreras topológicas para ingresar en el citoplasma: la cubierta, una monocapa fosfolipídica, de la partícula lipoproteica y la bicapa de la membrana plasmática de la célula. En algún momento del proceso de distribución de los lípidos, las formas esterificadas, ubicadas en el núcleo lipídico para su transporte, deben ser hidrolizadas a formas no esterificadas (colesterol, ácidos grasos) para poder ser utilizadas por las células que las incorporan. Las células desarrollaron dos mecanismos diferentes para la incorporación facilitada por receptores de los lípidos del centro de la partícula lipoproteica: la **endocitosis mediada por receptor** de partículas lipoproteicas completas y la **incorporación lipídica selectiva** de ciertos componentes de las partículas lipoproteicas.

El análisis de la hipercolesterolemia familiar reveló la vía para la endocitosis mediada por receptor de partículas LDL

MEDICINA

No existe un mejor ejemplo de la relación sinérgica entre la biología celular molecular básica y la medicina que la historia del descubrimiento de la vía del receptor de LDL (LDLR) para la distribución de colesterol a las células. Las series de excelentes estudios que merecieron el premio Nobel y condujeron a este descubrimiento sirvieron como fuentes de profundización de la comprensión de los mecanismos subyacentes al metabolismo de las LDL, de las funciones y propiedades de varios orgánulos clave de los sistemas celulares que regulan en forma coordinada vías metabólicas complejas, y de los nuevos enfoques para el tratamiento de la aterosclerosis.

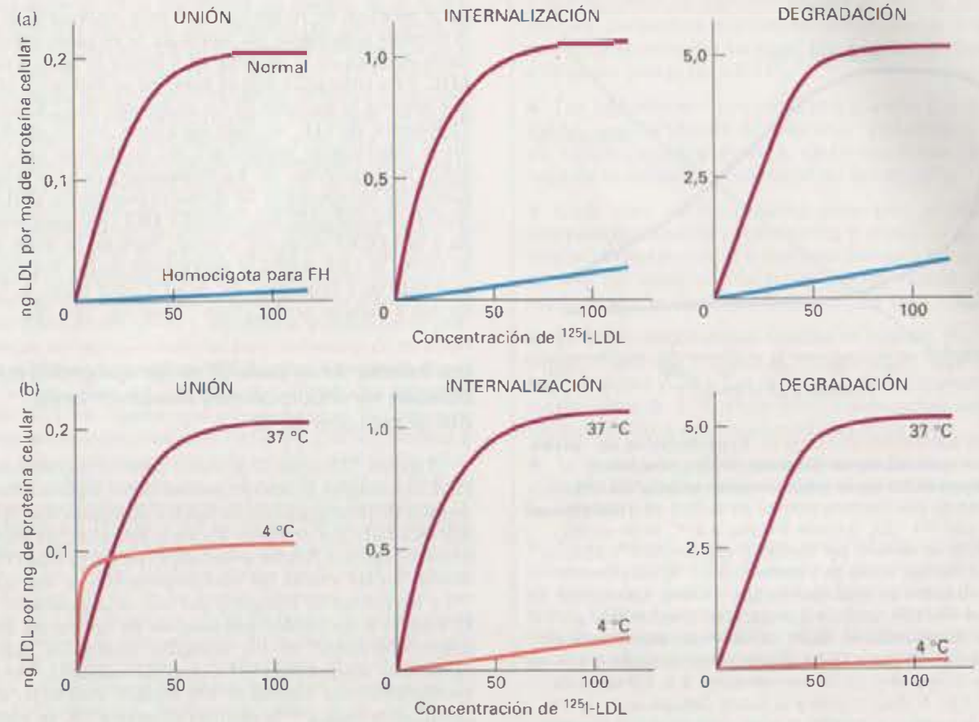
Algunos de estos experimentos compararon el metabolismo de LDL en células humanas normales y en células de pacientes con *hipercolesterolemia familiar (HF)*, una enfermedad hereditaria caracterizada por colesterol LDL plasmático elevado y que ahora se sabe es causada por mutaciones en el gen *LDLR*. En los pacientes que tienen una copia normal y una defectuosa del gen *LDLR* (heterocigotos), el colesterol LDL está incrementado alrededor de dos veces. Aquellos con dos genes *LDLR* defectuosos (homocigotos) tienen niveles de colesterol LDL cuatro a seis veces mayor que el normal. Las personas con HF heterocigóticas suelen sufrir enfermedad cardiovascular alrededor de 10 años antes que las personas sanas, y los individuos con HF homocigótica mueren casi siempre por infarto de miocardio antes de los 30 años de edad. ▮

Aquí, ilustramos cómo los análisis de los defectos celulares subyacentes a la hipercolesterolemia familiar pueden aclarar procesos celulares normales. Primero consideremos experimentos típicos de cultivo celular en los cuales las interacciones de LDL con células nomales y homocigóticas HF se examinaron como una función de la concentración de LDL, que definía al receptor LDL de alta afinidad, y de la temperatura de incubación, que establecía la dependencia entre la incorporación de LDL y la temperatura. En estos experimentos se marcaron partículas LDL purificadas con ^{125}I, unido en forma covalente a las cadenas laterales de residuos de tirosina de la apoB-100 ubicada sobre la superficie de las partículas LDL. Se incubaron cultivos celulares de personas sanas y de pacientes con HF con el LDL marcado durante varias horas. Luego los investigadores determinaron cuánto LDL se unió a la superficie de las células, cuánto se internalizó y cuánto del componente apoB-100 de la LDL fue degradado por hidrólisis enzimática a aminoácidos individuales. La degradación de apoB-100 se detectó mediante la liberación de ^{125}I-tirosina al medio de cultivo.

A partir de los resultados mostrados en la figura 18-14a podemos ver que, en comparación con las células normales, las células HF homocigóticas son claramente defectuosas en la unión e internalización de la LDL añadida y en la degradación de apoB-100 a la temperatura fisiológica normal de 37 °C. Las células homocigóticas esencialmente no exhibieron actividad alguna. Las células heterocigóticas exhibieron alrededor de la mitad de la actividad de las células normales. La forma de la curva de unión para las células normales es compatible con un receptor que tiene alta afinidad por la LDL y es saturable. Nótese también que las curvas para la internalización y degradación de LDL tienen la misma forma que la curva de unión. Más aún, cuando los experimentos se realizaron con células normales a 4 °C, se observó la unión de LDL, pero la internalización y la degradación se inhibieron (fig. 18-14b). La baja temperatura normalmente no inhibe la unión de moléculas a los receptores de superficie celular, pero sí inhibe procesos como la internalización y la degradación posterior de moléculas, que dependen del tránsito vesicular (cap. 17). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la LDL primero se une a receptores de superficie celular y luego se internaliza y degrada. Existe un último aspecto de estos resultados digno de mención. Después de incubar las células durante 5 horas a 37 °C, las cantidades de LDL internalizadas y de apoB-100 hidrolizada fueron mucho mayores que las de la LDL unida a la superficie. Este resultado indica que cada molécula receptora se unió y medió la internalización de más de una partícula LDL durante el período de incubación. En otras palabras, el receptor LDL se recicla.

Los experimentos de "pulso y caza" con radioisótopos con células normales y una concentración fija de LDL marcada con ^{125}I ayudaron a definir posteriormente el curso temporal de los eventos en el procesamiento de LDL celular mediado por receptor. Estos experimentos demuestran con claridad el orden de los eventos: unión de LDL a la superficie → internalización → degradación (fig. 18-15). Los resultados de estudios con el microscopio electrónico de partículas LDL con una marca electrodensa, revelaron que la LDL primero se une a las fositas endocíticas cubiertas de clatrina que se invaginan y brotan para formar vesículas cubiertas y luego endosomas (véase fig. 17-27). Descubrimientos a partir de experimentos posteriores mostraron que el receptor de LDL reconoce la apoB-100 y una o dos apolipoproteínas estrechamente relacionadas; por lo tanto, la unión mediante este receptor es altamente específica para la LDL. La unión también es dependiente del pH: la unión fuerte de LDL se produce al pH del líquido extracelular (7,4); una unión débil o ninguna unión se produce al pH menor (≈4,5–6) hallado en algunos orgánulos intracelulares (p. ej., los endosomas y los lisosomas). Debido a esta propiedad, el receptor de LDL libera la LDL que tiene unida dentro de vesículas intracelulares y puede ser reciclado hacia la superficie celular.

Diversas mutaciones en el gen que codifica el receptor de LDL pueden causar hipercolesterolemia familiar. Algunas evitan la síntesis de la proteína LDLR; otras evitan el plegamiento apropiado de la proteína receptora en el RE y conducen a

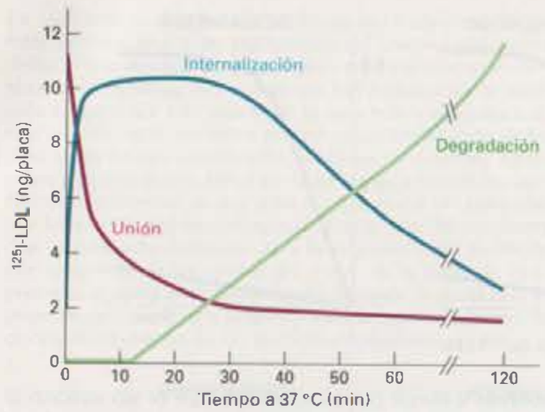


▲ FIGURA EXPERIMENTAL 18-14 En las células de los pacientes con hipercolesterolemia familiar (HF) la unión, internalización y degradación de las LDL se encuentran reducidas y son influidas por la temperatura. Se incubaron fibroblastos en cultivo durante 5 horas en un medio con LDL cuyo componente de apolipoproteína B (apoB) fue marcado con ^{125}I en las cadenas laterales de tirosina. Se determinaron las cantidades de LDL unidas a la superficie celular (unión) y presentes dentro de las células (internalización), al igual que la cantidad de ^{125}I-tirosina liberada al medio debido a la degradación a apoB (hidrólisis) como una función de la concentración de LDL. (a) Las curvas representan resultados típicos de experimentos a 37 °C con células de una persona normal y de una persona homocigota para HF. Nótese que las escalas del eje de las ordenadas son diferentes y que los valores máximos relativos para la unión, internalización e hidrólisis son aproximadamente 0,2:1:5. (b) Estos resultados para células normales a 37 °C y 4 °C muestran que la unión de LDL no se reduce en forma notable a baja temperatura, mientras que se bloquean la internalización y la hidrólisis posteriores. Estos hallazgos sugieren que la internalización y la hidrólisis involucran movimientos de membrana, que siempre se inhiben a bajas temperaturas. Para mayores detalles véase el texto. (Adaptado de M. S. Brown y J. L. Goldstein, 1979, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 76:3330, y J. L. Goldstein y M. S. Brown, 1989, en C. R. Scriber et al., eds., *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 6th ed. McGraw-Hill, p. 1215.)

su degradación prematura (cap. 16); no obstante, otras mutaciones reducen la capacidad del receptor de LDL para unir fuertemente LDL. Un grupo de receptores mutantes particularmente informativo se expresa sobre la superficie celular y une LDL normalmente, pero no puede mediar la internalización del LDL fijado. Los análisis de dichos receptores de LDL defectuosos llevaron al concepto de secuencias de internalización en las proteínas de la superficie celular destinadas a la endocitosis por medio de fositas cubiertas de clatrina. Como se trató en el capítulo 17, las señales de clasificación, ubicadas en los dominios citosólicos de ciertas proteínas de membrana, cumplen un papel clave en dirigir estas proteínas hacia vesículas particulares.

Los resultados de estos estudios pioneros y otras investigaciones condujeron al modelo vigente para la endocitosis de LDL mediada por receptor y otras combinaciones receptor-ligando detalladas en el capítulo 17 (véase en particular fig. 17-28) y resumidas en la figura 18-10b. Después que las partículas LDL internalizadas alcanzan los lisosomas, las proteasas lisosómicas hidrolizan su apolipoproteínas de la superficie y las esterasas de colesterol lisosómicas hidrolizan su centro de ésteres de colesterol. El colesterol no esterificado está entonces libre para abandonar el lisosoma y ser utilizado por la célula, cuando sea necesario, en la síntesis de membranas o diversos derivados del colesterol. La salida de colesterol de los lisosomas depende de la proteína NPC1 ya mencionada.

Si la endocitosis mediada por LDLR no estuviera regulada, las células incorporarían LDL continuamente y acumularían cantidades masivas de colesterol derivado de LDL debi-

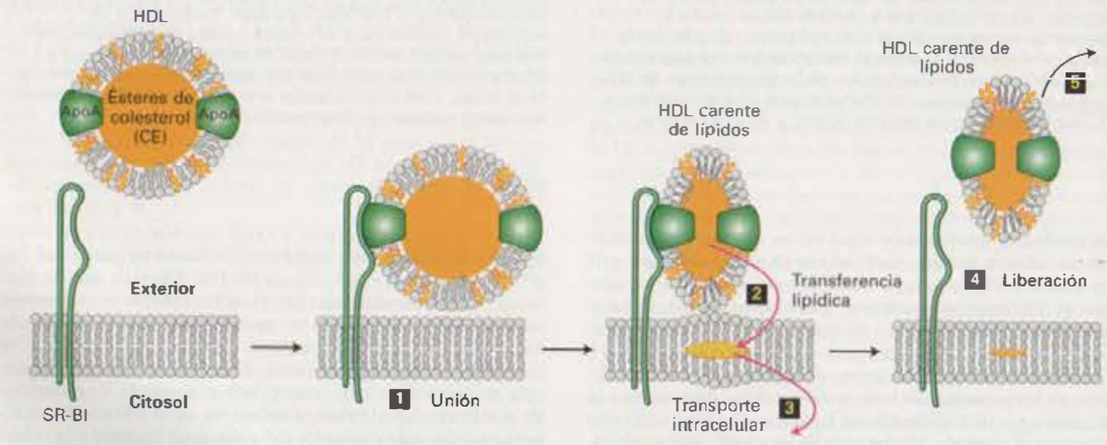


▲ FIGURA EXPERIMENTAL 18-15 Experimentos de "pulso y caza" con radioisótopos demuestran las relaciones precursor-producto en la incorporación celular de LDL. Fibroblastos de piel humana normal en cultivo se incubaron en un medio con ^{125}I- LDL durante 2 horas a 4 °C (marcación). Después que se eliminó por lavado el exceso de ^{125}I- LDL no unido a las células, éstas se incubaron a 37 °C durante los períodos indicados en ausencia de LDL externa (detección). La cantidad de ^{125}I- LDL unido a la superficie, internalizado y degradado (hidrolizado) se midió como en los experimentos presentados en la figura 18-14. Durante la marcación a 4 °C se produce la unión, pero no la internalización o la hidrólisis de LDL apoB-100. El dato muestra la rápida desaparición de ^{125}I-LDL de la superficie a medida que es internalizado luego de calentar las células para permitir los movimientos de membrana. Tras un lapso de 15-20 minutos comienza la degradación lisosómica del ^{125}I- LDL internalizado. (Véase M. S. Brown y J. L. Goldstein, 1976, *Cell* 9:663).

do al reciclaje de receptores y el gran reservorio de LDL en el torrente sanguíneo. Sin embargo, el elegante sistema regulador descrito en la sección 18.4 limita la incorporación de LDL. Ésta entrega la mayor parte de su colesterol al hígado, que expresa la mayoría de los receptores de LDL del cuerpo. El receptor de LDL no sólo interactúa con la apoB-100 sobre la superficie de partículas LDL; también se une a la apoE sobre las superficies de los remanentes de quilomicrón y a partículas lipoproteicas de densidad intermedia (IDL). Un receptor emparentado denominado LRP (proteína emparentada a la LDLR) reconoce la apoE, pero no la apoB-100; por lo tanto, la LRP media la endocitosis de los remantentes de quilomicrón e IDL, pero no de LDL, por parte de los hepatocitos y algunas otras células (véase fig. 18-13b).

Los ésteres de colesterol en las lipoproteínas pueden ser incorporados selectivamente por el receptor SR-BI

Algunos hallazgos de estudios sobre el metabolismo de la HDL condujeron al descubrimiento de un segundo mecanismo distinto de incorporación de lípidos asociados con lipoproteínas facilitada por receptor. En estos estudios, los animales de experimentación fueron inyectados con partículas HDL. purificadas en las cuales las apolipoproteínas se marcaron con ^{125}I y los ésteres de colesterol del centro se marcaron con ^{3}H. El hígado y los tejidos productores de hormonas esteroides (esteroidogénicos) de los animales inyectados acumularon cantidades sustanciales del colesterol marcado, pero no las apolipoproteínas asociadas. De manera contraria, una gran cantidad de marca ^{125}I, pero no de marca ^{3}H, se halló en los riñones, donde se degradan las apolipoproteínas. Estos hallazgos son incompatibles con la endocitosis mediada por receptor de la partícula completa. Preferentemente, las células esteroidogénicas y las del hígado incorporan selectivamente ésteres de colesterol desde los centros de partículas HDL sin acumular los componentes de las cubiertas externas.



▲ Fig. 18-16. Modelo de la incorporación selectiva de ésteres de colesterol a partir de HDL mediada por el receptor SR-BI. Después de la unión de HDL al SR-BI (1), los ésteres de colesterol en el centro (core) se transfieren selectivamente hacia una membrana celular (2) y luego hacia el citosol (3) mediante un mecanismo aún desconocido. La partícula de HDL ya sin los lípidos se disocia rápidamente del receptor (4) y regresa a la circulación (5). (Véase C. Glass et al., 1983, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 80:5435, Y. Stein et al., 1983, *Biochim. Biophys. Acta* 752:98, y M. Krieger, 1999, *Ann. Rev. Biochem.* 68:523.)

En la figura 18-16 se representa un modelo de la incorporación selectiva de ésteres de colesterol por un receptor de superficie celular llamado *SR-BI (receptor de eliminación [scavenger]), clase B, tipo I)*. El SR-BI une HDL, LDL y VDL y puede mediar la incorporación selectiva de todas estas lipoproteínas. El mecanismo detallado de la incorporación lipídica selectiva aún no ha sido dilucidado, pero debe comprender la hemifusión de la monocapa fosfolipídica externa de la lipoproteína con la hojuela exoplasmática de la membrana plasmática. Los ésteres de colesterol inicialmente ingresan en el centro hidrófobo de la membrana plasmática, luego se transfieren a través de la hojuela interna y son hidrolizados por esterasas de colesterol citosólicas, no lisosómicas. Las partículas remanentes sin los lípidos después de la transferencia lipídica se disocian del SR-B1 y regresan a la circulación; pueden entonces extraer más fosfolípidos y colesterol de otras células por medio de la proteína ABCA1 u otra proteína de superficie celular (véase fig. 18-13c). Por último, las pequeñas partículas HDL sin lípidos, que circulan por el torrente sanguíneo son eliminadas mediante filtración por los riñones y se unen a diferentes receptores sobre células epiteliales renales. Una vez internalizadas por endocitosis mediada por receptor, esas partículas son degradadas por los lisosomas.

El receptor SR-BI difiere del receptor LDL en dos aspectos importantes. Primero, el SR-BI se agrupa sobre las microvellosidades y en los "rafts" lipídicos (balsas lipídicas) de la superficie celular (cap. 5), no en las fositas cubiertas, como sí lo hace el receptor LDL. Segundo, el SR-BI media la transferencia de lípidos a través de la membrana, no la endocitosis de partículas de LDL enteras, como la mediada por el receptor LDL. El receptor multifuncional SR-BI puede mediar la incorporación selectiva de lipoproteínas de diversos lípidos (p. ej., los ésteres de colesterol, la vitamina E); también participa en la dirección opuesta para facilitar la salida de colesterol no esterificado de células para unirse a lipoproteínas. El SR-BI tiene una estructura similar a la del transportador CD36 de ácidos grasos, y ambos pertenecen a la superfamilia de *receptores de eliminación*; como se tratará después, algunos de estos receptores cumplirían un papel en la aparición de la aterosclerosis.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 18.3

Movimiento de lípidos hacia adentro y hacia afuera de las células

- El movimiento de lípidos hacia adentro y afuera de las células suele requerir proteínas de transporte de superficie celular y proteínas de unión solubles en agua (o micelas), o secreción de lipoproteínas y captación de lipoproteínas facilitada por receptor (véase fig. 18-10).
- Los transportadores de ácidos grasos (FATP, CD36) de la membrana plasmática facilitan el movimiento de ácidos grasos entre las proteínas de unión intracelulares (p. ej., FABP) y los transportadores extracelulares (p. ej., albúmina).
- La superfamilia ABC comprende pequeñas bombas moleculares que hidrolizan ATP. Muchas proteínas ABC median la salida de diversos lípidos de las células (véase cuadro 18-2).
- Diversas proteínas ABC transportan componentes de la bilis desde los hepatocitos: ABCB4 (fosfolípidos), ABCB11 (sales biliares) y ABCG5/8 (colesterol y esteroles vegetales). Los simportadores lipídicos ligados al Na^+ (p. ej., IBAT y NTCP), que median la incorporación celular de ácidos biliares, también cumplen un papel clave en la circulación enterohepática (véase fig. 18-11).
- Las lipoproteínas son partículas grandes con centros de lípidos neutros (ésteres de colesterol, triglicéridos) y cubiertas anfipáticas compuestas de apolipoproteínas, una monocapa de fosfolípidos y colesterol no esterificado.
- Cada clase de lipoproteína tiene una proteína y una composición lipídica característica y participa en la salida celular de moléculas, el transporte extracelular a través del sistema circulatorio y la incorporación celular de lípidos mediada por receptores (véanse cuadro 18-3 y fig. 18-3).
- La hipercolesterolemia familiar es causada por mutaciones en el gen que codifica el receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDL). Las personas con este trastorno tienen niveles altos de LDL plasmático y desarrollan enfermedad cardiovascular a edades anormalmente jóvenes.
- La endocitosis de lipoproteínas mediada por receptor, como la LDL, es un mecanismo para distribuir colesterol a las células.
- En un segundo mecanismo para distribuir colesterol a las células, el receptor SR-BI media la incorporación selectiva de ésteres de colesterol a partir de lipoproteínas de alta densidad, LDL y lipoproteínas de muy baja densidad. La partícula lipoproteica resultante, ya sin los lípidos, se libera luego de la célula y puede reutilizarse (véase fig. 18-16).

18.4 Regulación por retroalimentación del metabolismo lipídico celular

Parece evidente que una célula sufriría una crisis rápidamente si no tuviera suficientes lípidos para constituir cantidades adecuadas de membranas o si tuviera tanto colesterol que se formasen grandes cristales y se dañaran las estructuras celulares. Para evitar estos sucesos desastrosos, las células mantienen niveles lipídicos apropiados a través de la regulación de su abastecimiento y la utilización de lípidos. Vimos cómo las células adquieren lípidos mediante biosíntesis o incorporación y cómo transportan lípidos al exterior. En esta sección consideramos la regulación del metabolismo lipídico celular, centrándonos en el colesterol. Sin embargo, las vías reguladoras que controlan los niveles de colesterol celular también participan en el control de los ácidos grasos y el metabolismo fosfolipídico. La regulación coordinada del metabolismo de estos componentes es necesaria para mantener la composición adecuada de las membranas.

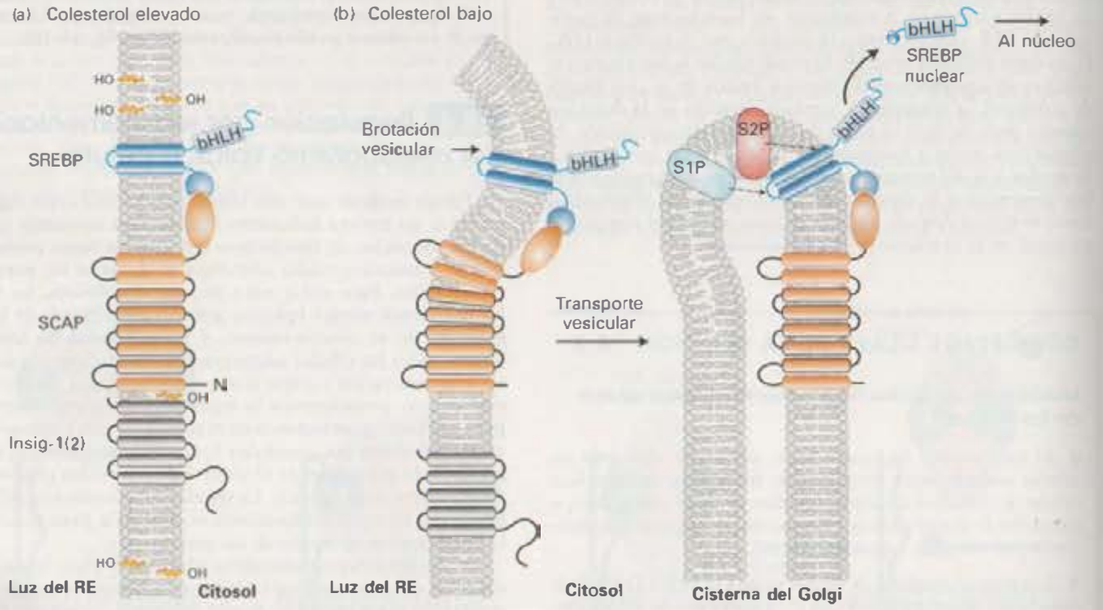
Desde hace más de cincuenta años, se sabe que la vía biosintética del colesterol está sujeta a regulación por retroalimentación negativa por el propio colesterol. En efecto, fue la primera vía biosintética que mostró exhibir este tipo de regulación por producto final. A medida que aumentan los niveles de colesterol celular, disminuye la necesidad de incorporar colesterol a través del receptor LDL o de sintetizar el colesterol adicional. Como consecuencia, la transcripción de genes que codifican el receptor LDL y las enzimas biosintéticas del colesterol disminuye. Por ejemplo, cuando células normales en cultivos se incuban con concentraciones crecientes de LDL, se suprime la expresión y la actividad de la HMG-

CoA reductasa, la enzima que controla la velocidad de la biosíntesis del colesterol, mientras que se incrementa la actividad de la acilo:colesterol aciltransferasa (ACAT), que convierte el colesterol a la forma esterificada de almacenamiento. De manera inversa, cuando el nivel de colesterol celular comienza a caer a medida que las células utilizan más colesterol, la expresión del receptor de LDL y la HMG-CoA reductasa se incrementa y la actividad de la ACAT disminuye. Dicha regulación coordinada es una forma eficiente de mantener la homeostasis celular del colesterol.

El transporte del RE al Golgi y la activación proteolítica controlan la actividad de los factores de transcripción SREBP

La regulación transcripcional dependiente del colesterol a menudo depende de elementos reguladores de esterol de 10 pares de bases (SRE), o de hemisitios SER, en los promotores de los genes diana regulados. Como podría preverse del análisis sobre el control transcripcional en el capítulo 11, la interacción de las proteínas de unión al SRE (SREBP) con estos elementos de respuesta modula la expresión de los genes diana. Lo que no podría preverse es que la vía mediada por SREBP, donde el colesterol controla la expresión de proteínas involucradas en el metabolismo del colesterol, comienza en el RE e incluye al menos otras dos proteínas además de la SREBP.

Cuando las células tienen concentraciones adecuadas de colesterol, SREBP se halla en la membrana del RE y forma un complejo con la *SCAP* (la proteína activadora del corte de SREBP), la *insig-1* (o su homólogo más cercano, insig-2) y quizás otras proteínas (fig. 18-17, *izquierda*). SREBP tiene tres dominios distintos: un dominio citosólico N-terminal que incluye un motivo básico de unión al DNA hélice-bucle-hélice (bHLH) (véase fig. 11-22b) y funciona como un factor de transcripción, un dominio central anclado a la membrana que contiene dos hélices α transmembrana y un dominio regulador citosólico C-terminal. SCAP tiene ocho hélices α transmembrana y un gran dominio citosólico C-terminal que interactúa con el dominio regulador de SREBP. Cinco de las hélices transmembranas en la SCAP forman un dominio sensor de esterol, similar al de la HMG-CoA reductasa. El dominio sensor de esterol en SCAP se une fuertemente a insig-1(2), pero sólo con niveles elevados de colesterol celular. Cuando insig-1(2) está fuertemente unida a SCAP, bloquea la unión de ésta a las proteínas de la cubierta vesicular COPII, y por lo tanto, evita la incorporación del complejo SCAP/SREBP a las vesículas de transporte del RE al Golgi (véase cap. 17).



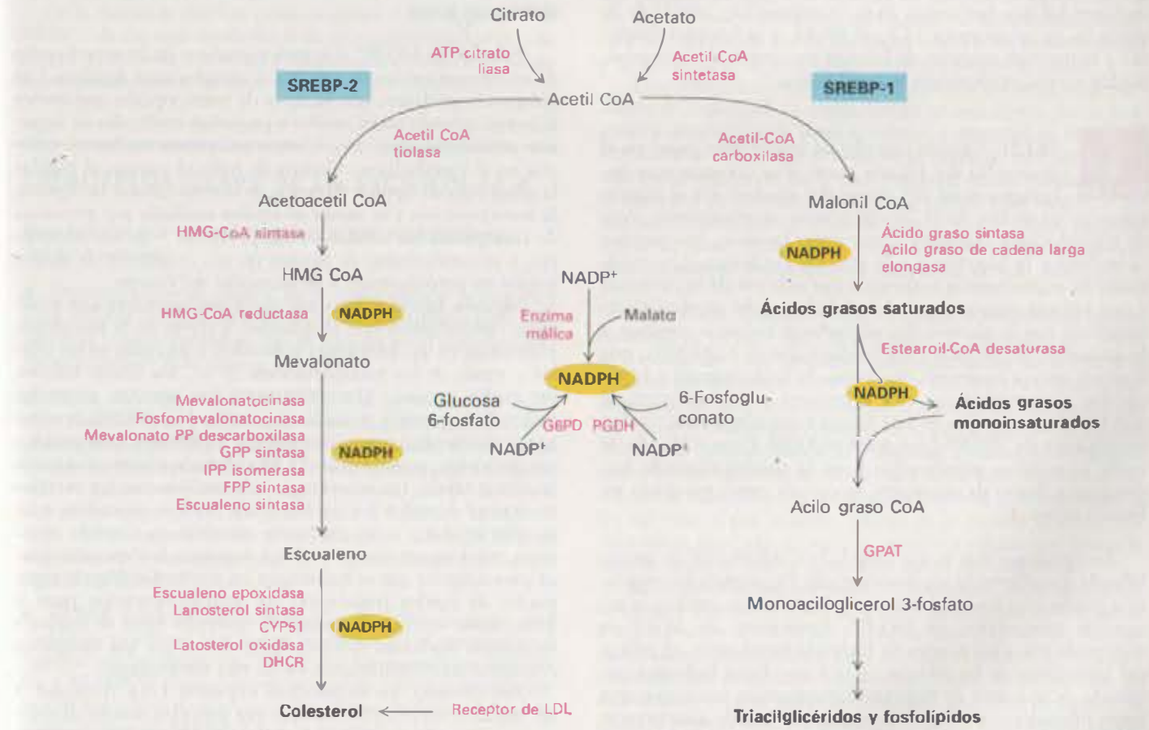
▲ Fig. 18-17. Modelo del control de la activación SREBP mediada por insig-1(2) y SCAP sensible al colesterol. La reserva celular de colesterol se controla mediante la acción combinada de insig-1(2) y SCAP, ambas proteínas transmembrana ubicadas en la membrana del RE. (a) Cuando los niveles de colesterol son altos, la insig-1(2) se une al dominio sensible al esterol de SCAP anclando el complejo SCAP/SREBP a la membrana del RE. (b) La disociación de insig-1(2) de SCAP cuando hay bajos niveles de colesterol le permite al complejo SCAP/SREBP moverse hacia el complejo de Golgi mediante transporte vesicular. (*Derecha*) El corte secuencial de SREBP por las proteasas sitio 1 y sitio 2 (S1P, S2P) asociadas con la membrana del Golgi libera el dominio N-terminal bHLH, denominado SREBP nuclear (nSREBP). Después de la translocación al núcleo, nSREBP controla la transcripción de genes que contienen elementos reguladores de esterol (SRE) en sus promotores. (Adaptado de T. F. Osborne, 2001, *Genes Devel.* 15:1873; véase T. Yang et al., 2002, *Cell* 110:489.)

Cuando los niveles de colesterol celular caen, insig-1(2) no se une más a SCAP y el complejo SCAP/SREBP puede moverse desde el RE al aparato de Golgi (fig. 18-17, *derecha*). En el Golgi, SREBP es cortada secuencialmente en dos sitios por dos proteasas unidas a la membrana, S1P y S2P. El segundo corte intramembrana en el sitio 2 libera el dominio N-terminal que contiene bHLH hacia el citosol. Este fragmento, denominado nSREBP (SREBP nuclear), se une directamente al receptor de incorporación nuclear y es translocado enseguida al núcleo (véase fig. 12-21). Allí, nSREBP activa la transcripción de genes que contienen SRE en sus promotores, como los que codifican el receptor de LDL y la HMG-CoA reductasa. Después del corte de SREBP en el Golgi, SCAP aparentemente se recicla de regreso hacia el RE donde puede interactuar con insig-1(2) y otra molécula SREBP. Altos niveles de transcripción de los genes controlados por SRE requieren la generación de nuevas nSREBP debido a que es degradada con bastante rapidez por la vía proteosómica mediada por ubicuitina (cap. 3). La generación y degradación rápidas de nSREBP ayuda a las células a responder de inmediato a los cambios en los niveles de colesterol intracelular.

En la *vía SREBP/SCAP insig-1(2)* que controla el metabolismo celular del colesterol, la célula explota los movimientos intercompartimentales (RE → Golgi → citosol → núcleo), regulados por interacciones proteína-proteína dependientes del esterol y cortes proteolíticos postraduccionales para activar un factor de transcripción unido a la membrana. El corte de SREBP en esta vía es uno de los varios ejemplos conocidos de *proteólisis intramembrana regulada (RIP)*. Por ejemplo, RIP activa factores de transcripción en la vía de señalización Notch (cap. 14) y en la respuesta de proteína no plegada (cap. 16). RIP también es responsable de la generación de amiloide β, péptido tóxico que contribuye a la aparición de la enfermedad de Alzheimer (véase fig. 14-30).

Múltiples SREBP regulan la expresión de numerosas proteínas metabolizadoras de lípidos

En ciertas circunstancias (p. ej., durante el crecimiento celular), las células necesitan un abastecimiento mayor de todos los lípidos de membrana esenciales y de sus ácidos



▲ Fig. 18-18. Regulación global del metabolismo lipídico celular por SREBP. SREBP controla la transcripción de los genes aquí indicados que codifican proteínas clave directamente requeridas para la síntesis e incorporación de colesterol y para la síntesis de ácidos grasos, fosfolípidos y triglicéridos. Las SREBP también regulan la actividad de genes para producir NADPH, una fuente de energía para muchos de los pasos de esta vía biosintética. Abreviaturas: GGP: geranilgeranilpirofosfato; IPP: isopentenilpirofosfato; FPP: farnesilpirofosfato; CYP51: lanosterol 14α-demetilasa; DHCR: 7-dehidrocolesterol reductasa; G6PD: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; PDGH: 6-fosfogluconato deshidrogenasa; GPAT: glicerol 3-fosfato aciltransferasa. (Adaptado de J. D. Horton, J. L. Goldstein y M. S. Brown, 2002, *J. Clin. Invest.* 109:1128.)

grasos precursores (regulación coordinada). Pero a veces requieren mayores cantidades de algunos lípidos que otros (regulación diferenciada). Por ejemplo, las células que producen ácidos biliares u hormonas esteroides necesitan un abastecimiento incrementado de colesterol, pero no de ácidos grasos o de fosfolípidos. La regulación compleja del metabolismo lipídico característico de los eucariontes superiores se debe en gran parte a una plétora de factores de transcripción, incluidos múltiples SREBP, que controlan la expresión de proteínas que participan en la síntesis, degradación, transporte y almacenamiento de lípidos.

Existen tres isoformas conocidas de SREBP en los mamíferos: SREBP-1a y SREBP-1c, que se generan a partir del empalme alternativo de RNA producido por el mismo gen y SREBP-2, que es codificado por un gen diferente. Juntos, estos factores de transcripción regulados por proteasa controlan la disponibilidad no sólo del colesterol sino también de los ácidos grasos y de sus productos triglicéridos y fosfolípidos. En las células de los mamíferos, SREBP-1a y SREBP-1c ejercen mayor influencia sobre el metabolismo de los ácidos grasos que sobre el metabolismo del colesterol, mientras que el caso es inverso para SREBP-2. Como se indica en la figura 18-18 los SREBP pueden regular las actividades de genes que codifican muchas proteínas diferentes. Dichas proteínas incluyen las que participan en la incorporación celular de lípidos (p. ej., el receptor LDL, el SR-BI, y la lipoproteinlipasa) y numerosas enzimas de las vías de síntesis de colesterol, ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos.

MEDICINA

SREBP-1 puede cumplir un importante papel en el desarrollo del *hígado graso*, una consecuencia patológica seria del abuso del alcohol. En el hígado graso se acumulan en el citosol niveles anormalmente altos de triglicéridos y colesterol como gotas lipídicas, que pueden contribuir a la hepatitis y a la cirrosis alcohólica. Los resultados de experimentos realizados con cultivos de hepatocitos y con ratones sugieren que el metabolismo del alcohol a acetaldehído por la alcohol deshidrogenasa hepática conduce a la activación de SREBP-1 y a la liberación de nSREBP-1, que a su vez induce la síntesis de exceso de ácidos grasos y triglicéridos. Compatible con esta sugerencia está el hallazgo de que la sobreexpresión de una forma truncada, con actividad constitutiva de SREBP-1 (es decir, nSREBP-1) en el hígado de ratón incrementa significativamente la síntesis tanto de ácidos grasos como de colesterol, lo que da como resultado un hígado graso. ▮

En oposición con la vía insig-1(2)/SCAP/SREBP de las células de mamíferos, la vía homóloga de *Drosophila* no responde a cambios en los niveles de esterol celular. En cambio, la activación proteolítica de SREBP dependiente de SCAP es suprimida por altos niveles de fosfatidiletanolamina, el principal fosfolípido de las moscas de la fruta. Estos hallazgos, resultado de una serie de elegantes experimentos que emplearon tanto inhibidores enzimáticos como de RNA de interferencia (RNAi), indican que el dominio sensor de esterol de la SCAP de *Drosophila* responde al nivel celular de fosfatidiletanolamina, no de colesterol. Por lo tanto, los denominados dominios sensores de esterol podrían llamarse con mayor propiedad dominios *sensores de lípidos*. Aún no se sabe si estos dominios se unen directamente a sus lípidos controladores o median la interacción con otras proteínas que unen directamente los lípidos (es decir, sensan los niveles de lípidos reguladores).

Como ya se mencionó, la HMG-CoA reductasa también contiene un dominio sensor de esterol. Este dominio percibe los altos niveles de colesterol, de algunos algunos derivados del colesterol y de ciertos precursores no esteroides del colesterol, y desencadena la rápida degradación proteosómica de la enzima dependiente de ubicuitina. Como consecuencia, la actividad de la HMG-CoA reductasa decae y disminuye la síntesis de colesterol. Al igual que SCAP, la HMG-CoA reductasa se localiza en la membrana del RE y insig-1(2) se une a su dominio sensor de esterol. Esta unión también es dependiente del colesterol y es necesaria para la degradación proteosómica de la HMG-CoA reductasa dependiente de colesterol. Por lo tanto, la insig-1(2) de los mamíferos y el dominio de la SCAP sensor de esterol o la HMG-CoA reductasa parecen combinarse para formar un sensor de colesterol. Es probable que en el transcurso de la evolución, el dominio sensor de esterol y sus proteínas asociadas hayan sido eficaces para el reconocimiento de diversas moléculas lipídicas y se hayan incorporado a diversos sistemas reguladores con este propósito.

Los miembros de la superfamilia de receptores nucleares contribuyen a la regulación de los lípidos en las células y en el cuerpo como un todo

Además de SREBP, diversos miembros de la superfamilia de receptores nucleares regulan el metabolismo lipídico. Los receptores nucleares son factores de transcripción que suelen activarse cuando están unidos a pequeñas moléculas de ligandos específicos (cap. 11). Ciertos receptores nucleares influyen en el metabolismo lipídico de todo el cuerpo al regular la absorción de lípidos dietarios, la síntesis celular de lípidos, la incorporación y la salida de lípidos mediada por proteínas de transporte, los niveles de lipoproteínas y de sus receptores, y el catabolismo de lípidos (p. ej., oxidación de ácidos grasos en peroxisomas) y su secreción del cuerpo.

Algunos ligandos para los receptores nucleares son moléculas extracelulares que se difunden a través de la membrana plasmática (p. ej., hormonas esteroides) o ingresan en las células a través de los transportadores (p. ej., los ácidos biliares, los ácidos grasos). Alternativamente los ligandos generados dentro de una célula, incluidos el colesterol modificado por oxígeno (*oxisteroles*), los ácidos biliares, y ciertos ácidos grasos y sus derivados, pueden unirse a receptores nucleares dentro de la misma célula. Los receptores nucleares detectan los cambios en el nivel de todos los lípidos celulares clave uniéndose a los propios lípidos o a sus productos metabólicos. Cuando se activan, estos receptores estimulan o suprimen la expresión génica para asegurar que se mantengan los niveles fisiológicos apropiados de lípidos (regulación por retroalimentación para la homeostasis celular). La unión de múltiples tipos de lípidos a receptores nucleares individuales permite que los receptores controlen coordinadamente varias vías metabólicas.

Por ejemplo, los hepatocitos expresan *LXR (receptor X del hígado)*, un receptor nuclear que sensa los niveles de oxisteroles. Cuando el colesterol celular en el hígado se incrementa, se generan oxisteroles y activan el LXR. El LXR activado estimula la expresión de colesterol 7α-hidroxilasa, la enzima clave que limita la velocidad de la conversión hepática del colesterol en ácidos biliares, la vía principal para la deposición del exceso de colesterol del cuerpo. LXR también estimula la expresión de proteínas ABC que transportan colesterol hacia la bilis (ABCG5/8) o hacia lipoproteínas que circulan en la sangre (ABCA1). Además, promueve la producción de lipoproteínas y la modificación y expresión de SREBP-1c, que luego activa la transcripción de genes necesarios para la síntesis de ácidos grasos. El incremento de ácidos grasos resultante puede contribuir a la esterificación y a la síntesis de fosfolípidos para mantener la relación adecuada de colesterol a fosfolípidos. Por lo tanto, la detección de colesterol celular incrementado por LXR trae aparejadas diversas respuestas que evitan la acumulación del exceso de colesterol.

Otro receptor nuclear, denominado *FXR*, se activa por la unión de ácidos biliares. Expresado en los hepatocitos y en las células epiteliales intestinales, FXR cumple un papel fundamental en la regulación de la circulación enterohepática de los ácidos biliares. FXR activado por los ácidos biliares estimula la expresión de la proteína intracelular de unión a ácidos biliares (I-BABP) y de proteínas de transporte (p. ej., ABCB11, NTCP) que median la entrada y salida celular de ácidos biliares (véase fig. 18-11). Por el contrario, el FXR activo reprime la expresión de la colesterol 7α-hidroxilasa, disminuyendo por lo tanto la síntesis de ácidos biliares en el hígado a partir del colesterol, otro ejemplo de inhibición por producto final de una vía metabólica. Tanto FXR como LXR funcionan como heterodímeros con el receptor nuclear RXR.

En la siguiente sección veremos cómo el conocimiento de SREBP y de las vías reguladoras de receptores nucleares contribuyó a elaborar estrategias eficaces para reducir el riesgo de arteriosclerosis y de enfermedad cardiovascular.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 18.4

Regulación por retroalimentación del metabolismo lipídico celular

- Dos vías clave de control de la transcripción se emplean para regular la expresión de enzimas, transportadores, receptores y otras proteínas que participan en el metabolismo lipídico celular y de todo el cuerpo.
- En la vía insig-1(2)/SCAP/SREBP, el factor de transcripción nSREBP activo es liberado desde la membrana del Golgi mediante proteólisis intramembrana cuando el colesterol celular es bajo (véase fig. 18-17). Luego estimula la expresión de genes con elementos reguladores de esterol (SRE) en sus promotores (p. ej., los genes para la LDLR y la HMG-CoA reductasa). Cuando el colesterol es alto, SREBP se mantiene en la membrana del RE y forma complejos con insig-1(2) y SCAP.
- SREBP controla la transcripción de diversos genes que codifican proteínas que tienen funciones en el metabolismo lipídico celular (véase fig. 18-18). En los mamíferos SREBP-1a y SREBP-1c tienen mayor influencia sobre el metabolismo de los ácidos grasos que sobre el metabolismo del colesterol; el caso de SREBP-2 es a la inversa.
- En la vía de los receptores nucleares, los factores de transcripción del citosol son activados mediante lípidos intracelulares (p. ej., altos niveles de oxisteroles o ácidos biliares). Luego el complejo factor de transcripción-ligando ingresa en el núcleo y regula la expresión de genes diana específicos que participan en la regulación por retroalimentación de la síntesis, transporte y catabolismo de lípidos.
- Los dominios homólogos transmembrana que sensan el esterol están presentes en diversas proteínas integrales de membrana que participan en el metabolismo lipídico (p. ej., SCAP, HMG-CoA reductasa, NPC1). Estos dominios parecen ayudar a detectar y responder a cambios en los niveles de diversos lípidos, no sólo esteroles. La unión a insig-1(2) es esencial para que, al menos, algunos de estos dominios sensen esteroles.

18.5 Biología celular de la aterosclerosis, el infarto de miocardio y el accidente cerebrovascular

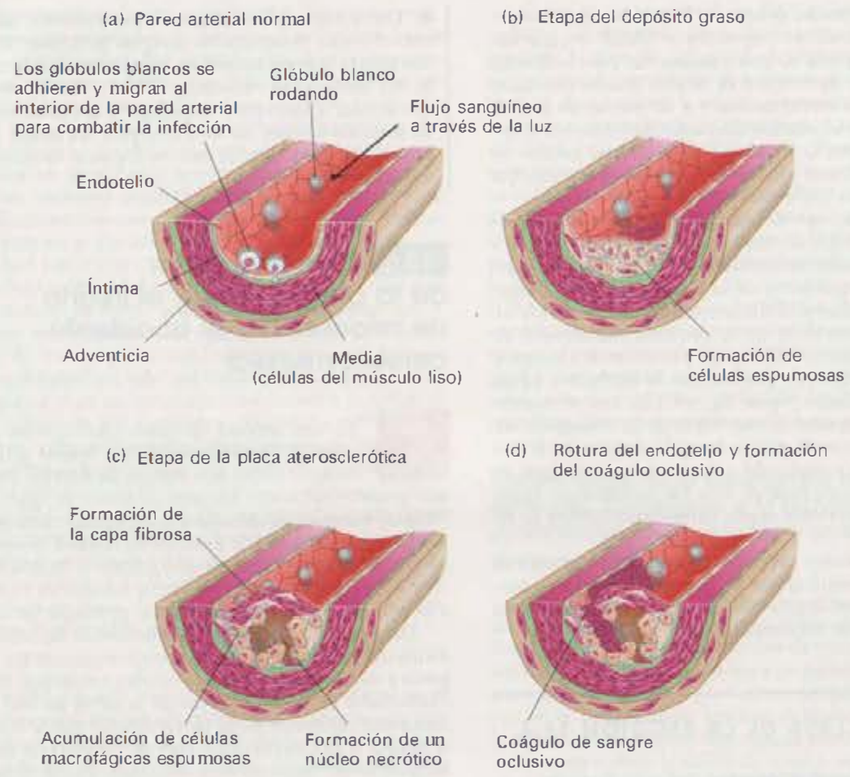
MEDICINA

En esta sección de cierre examinamos la relación entre el metabolismo de los lípidos y la *aterosclerosis*, la causa más común de infartos y de accidentes cerebrovasculares. La aterosclerosis es responsable del 75% de las muertes debidas a enfermedad cardiovascular en los Estados Unidos. Los avances en nuestra comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes al metabolismo lipídico y su regulación tienen un efecto notable en el tratamiento y la prevención de este importante problema de salud.

Denominada a menudo obstrucción de las arterias dependiente del colesterol, la aterosclerosis se caracteriza por la progresiva deposición de lípidos, células y material de la matriz extracelular en la capa interna de la pared de una arteria. La distorsión resultante de la pared arterial puede conducir, por sí misma o en combinación con un coágulo de sangre, a un bloqueo importante del flujo de sangre. Por lo tanto, para entender la base celular de la aterosclerosis, primero necesitamos considerar brevemente la estructura de una arteria. ▮

Las células epiteliales especializadas denominadas células endoteliales forman una capa delgada, el endotelio, que reviste la pared del vaso sanguíneo inmediatamente adyacente a la luz a través de la cual fluye la sangre (fig. 18-19a). Bajo el endotelio se encuentran diversas capas concéntricas de matriz extracelular y células que constituyen la pared arterial: la *íntima*, compuesta principalmente de colágenos amorfos, proteoglucanos y fibras elásticas; la *media*, una capa bien organizada de células de músculo cuya contracción controla el diámetro de la luz del vaso y, por lo tanto, influye en la presión arterial; y la *adventicia*, una capa de tejido conectivo y células que forma la interfaz entre el vaso y el tejido a través del cual corre.

En circunstancias normales, el plasma (la parte líquida de la sangre) y muchos tipos de células sanguíneas fluyen suave y rápidamente a través de la luz de una arteria, un tipo de movimiento denominado flujo laminar. Cuando se produce una infección o un daño traumático dentro de las paredes de una arteria o en el tejido subyacente, una serie compleja de eventos permite que los glóbulos blancos (leucocitos) se adhieran levemente a la superficie luminal de la pared arterial y rueden, propulsados por el flujo laminar del plasma circundante (véase fig. 6-30). Posteriormente, moléculas de adhesión median la adhesión de los glóbulos blancos al endotelio y su movimiento a través del endotelio hacia el interior de la pared. Dentro de la pared arterial, los glóbulos blancos denominados monocitos se diferencian a *macrófagos*, que luchan contra la infección de numerosas formas. Por ejemplo,



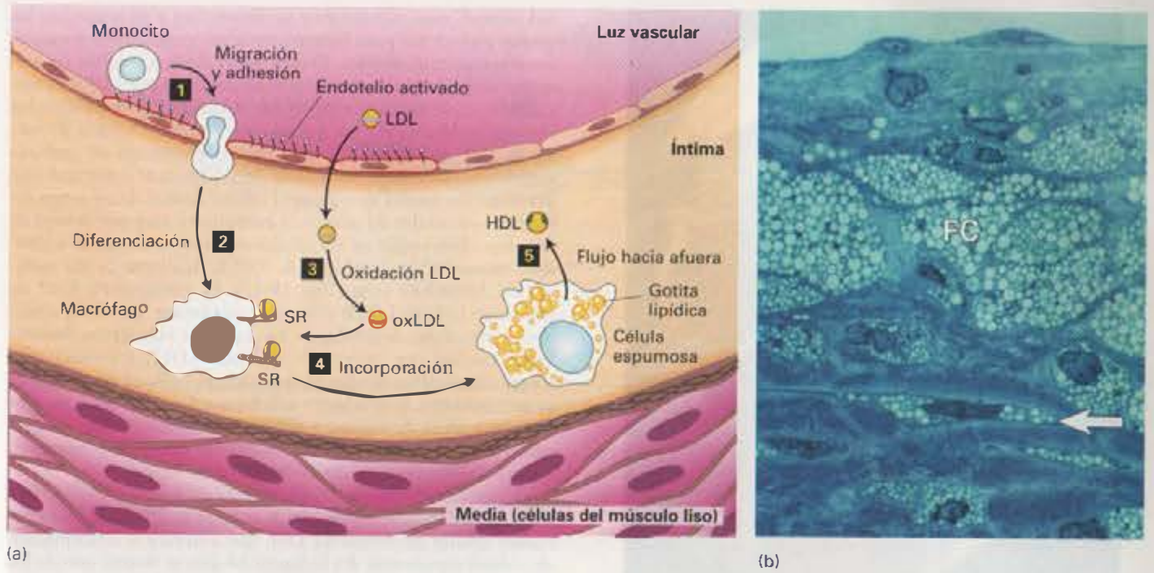
▲ Fig. 18-19. Etapas principales del comienzo y progresión de la aterosclerosis en la pared arterial. (a) Anatomía de una pared arterial normal compuesta de capas concéntricas de células y matriz extracelular. Los glóbulos blancos se adhieren al endotelio, ruedan a lo largo de él y luego migran hacia el interior de la pared arterial para combatir la infección (véase fig. 6-30). (b) Cuando la LDL plasmática está elevada o la HDL plasmática está baja, o ambas, los macrófagos en la íntima pueden acumular la lipoproteína que lleva el colesterol y generar células espumosas llenas de gotitas con ésteres de colesterol (véase fig. 18-20). La acumulación de células espumosas produce un depósito graso en la pared del vaso sólo visible microscópicamente. (c) A la generación continuada de células espumosas y la migración de células musculares lisas desde la media hacia la íntima sigue la muerte celular, produciendo una placa aterosclerótica avanzada. Esta placa consiste en un centro necrótico de lípidos (incluidos cristales de colesterol ahusados) y una matriz extracelular recubierta por una capa fibrosa de células musculares lisas y matriz. (d) A medida que la placa aterosclerótica crece hacia la luz de la arteria, altera y reduce el flujo de sangre. En algunos casos, la placa sola puede ocluir por completo la arteria. En la mayoría de los casos, la capa fibrosa se rompe e induce la formación de un coágulo sanguíneo que ocluye la arteria. (Adaptado de R. Russell, 1999, *N. Engl. J. Med.* 340(2):115.)

los macrófagos y otros leucocitos liberan proteínas y pequeñas moléculas que atacan directamente a las bacterias y otros patógenos. Las células también secretan proteínas que ayudan a reclutar monocitos adicionales y otras células inmunes (p. ej., los linfocitos T) para unirse a la lucha. Los macrófagos también fagocitan y destruyen patógenos, macromoléculas dañadas, y células infectadas o muertas. Cuando la infección se cura, se repara el tejido dañado y los macrófagos restantes y otros leucocitos se mueven hacia afuera de la pared arterial y reingresan en la circulación.

Como veremos, la aterosclerosis es una consecuencia "involuntaria" de esta *respuesta inflamatoria* fisiológica normal, la cual está diseñada para protegernos contra la infección y el daño tisular. Por esta razón, y dado que la aterosclerosis a menudo ataca tardíamente en la vida luego de los años reproductivos, parece que la presión de selección contra la enfermedad ha sido escasa a lo largo de la evolución. Por lo tanto, aunque la aterosclerosis tiene una influencia negativa enorme en las poblaciones humanas modernas, no es sorprendente su alta incidencia en personas longevas bien alimentadas.

La inflamación arterial y la incorporación celular de colesterol marcan las etapas iniciales de la aterosclerosis

Durante la respuesta inflamatoria, los macrófagos de la pared arterial inflamada pueden endocitar cantidades sustanciales de colesterol de las lipoproteínas que se acumulan dentro de la pared arterial en ciertas circunstancias (fig. 18-20a). A medida



▲ Fig. 18-20. Generación de células macrofágicas espumosas en la pared arterial. (a) En un sitio de infección o daño (1), los monocitos se adhieren y migran a través de la capa celular endotelial hacia el interior de la íntima (2), donde se diferencian en macrófagos. Cuando los niveles de LDL plasmático son altos, la concentración de LDL en la íntima también lo es y algo del LDL es oxidado a oxLDL o se modifica de otra forma (3). Se propuso que los receptores de eliminación *(scavenger)* expresados por los macrófagos se unen a oxsLDL, la endocitan y luego la degradan. Su colesterol se acumula como ésteres de colesterol en gotitas lipídicas citosólicas, lo que conduce a la acumulación de colesterol y a la formación de células espumosas (4). Los macrófagos también expresan ABCA1 y SR-B1, que median la salida del exceso de colesterol celular hacia la HDL de la íntima. (5). Por lo tanto, la acumulación de colesterol está determinada por la relación entre la incorporación de colesterol derivado de LDL y su salida hacia HDL. (b) Microfotografía de una arteria coronaria con una placa aterosclerótica que contiene en la íntima muchas células macrofágicas espumosas (*foam cells, FC*) llenas con gotitas esféricas de lípidos con ésteres de colesterol (círculos claros). Algunas células musculares lisas también están presentes y contienen gotitas lipídicas (flecha). [Parte (a) adaptada de C. K. Glass y J. L. Witztum, 2001, *Cell* 104:503. Parte (b) de H. C. Stary, 2003, *Atlas of Atherosclerosis Progression and Regression*, 2ª. ed., Parthenon, Publishing, p. 61]

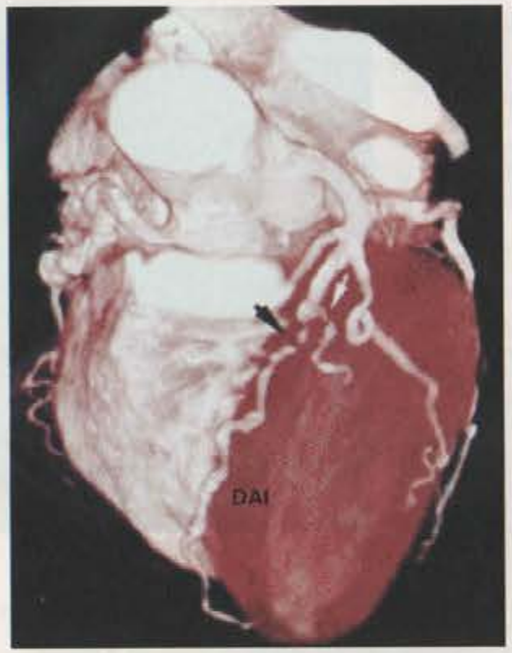
que los macrófagos convierten el colesterol incorporado en ésteres, se llenan con gotitas lipídicas de ésteres de colesterol. Los macrófagos resultantes llenos de lípidos se denominan *células espumosas* debido al aspecto de las gotitas lipídicas (fig. 18-20b). A medida que las células espumosas macrofágicas se acumulan en la pared arterial, forman un *depósito graso*, el primer paso en el desarrollo de la aterosclerosis (fig. 18-19b).

El próximo paso está marcado por la acumulación continuada de células espumosas macrofágicas, la proliferación de células de músculo liso y su migración desde la capa media a la íntima. Las células de músculo liso secretan una matriz extracelular adicional, y algunas internalizan suficientes cantidades de colesterol lipoproteico para volverse también células espumosas. El depósito inicial temprano microscópicamente invisible crece a medida que la enfermedad progresa y forma una placa aterosclerótica temprana o placa ateromatosa. Las células del interior de la placa mueren, produciendo un centro necrótico que contiene grandes cantidades de ésteres de colesterol y colesterol no esterificado (fig. 18-19c). Los cristales de colesterol, fácilmente detectados con el microscopio, suelen formarse dentro de una placa más avanzada, la cual es cubierta finalmente por una capa fibrosa compuesta de células de músculo liso y colágeno.

Las placas ateroscleróticas pueden impedir el flujo sanguíneo y conducir a infarto de miocardio y accidente cerebrovascular

A medida que una placa aterosclerótica se expande, se proyecta más y más hacia la luz de su vaso, estrechándola y distorsionando la forma normal del endotelio que reviste el vaso. Puesto que el flujo de sangre a través de la arteria afectada está reducido y alterado, disminuye la proporción de sangre oxigenada rica en nutrientes entregada a los tejidos nutridos por esa arteria, una condición conocida como *isquemia*. Si es lo suficientemente grave, esta deficiencia parcial en la circulación cardíaca puede causar dolor (angina).

Si la capa endotelial que cubre una placa se resquebraja, puede formarse rápidamente un gran coágulo sanguíneo de plaquetas y fibrina (trombo) y bloquear u ocluir la arteria (fig. 18-19d y fig. 18-21). El tejido que se encuentra por debajo de una oclusión queda pronto sin oxígeno (hipoxia isquémica) y sin fuentes de energía (p. ej., ácidos grasos en el corazón adulto, glucosa en el cerebro). La extensión del daño, incluida la muerte de los tejidos, provocada por una oclusión importante depende del tiempo que la arteria permanezca ocluida y del tamaño del área afectada. La oclusión grave



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 18-21 La aterosclerosis dificulta e impide la circulación sanguínea en las arterias coronarias.** Reconstrucción de tomografía computarizada de múltiples cortes (*multislice*) de un corazón humano que revela importante oclusión (flecha negra) de la arteria descendente anterior izquierda (flecha, DAI) y estrechamiento de un vaso cercano (flecha blanca) como una obstrucción en el torrente sanguíneo (visto en las arterias como tubos blancos). (De K. Nieman et al., 2001, *Lancet* 357:599.)

de una arteria coronaria (corazón) puede provocar un infarto de miocardio; la de una arteria que nutre el cerebro puede causar un accidente cerebrovascular.

La aterosclerosis puede comenzar en la pubertad o antes pero suele tomar décadas para desarrollarse en una enfermedad ostensible. En algunos casos, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos permite suficiente flujo de sangre hacia los tejidos que se encuentran corriente abajo de una placa, de manera tal que no se produce un daño tisular importante. La dilatación con balón, la eliminación de placas, la inserción de endoprótesis metálicas (*stents*) y el injerto de un vaso sanguíneo de derivación (bypass) son algunos tratamientos quirúrgicos para el bloqueo avanzado de las arterias coronarias.

La captación de LDL (colesterol malo) independiente de LDLR lleva a la formación de células espumosas

Como ya se dijo, el primer paso exclusivo de la aterosclerosis es la acumulación de células espumosas en la pared arterial, es decir macrófagos, llenos de gotitas lipídicas que contienen ésteres de colesterol. Cuanto mayor es la concentración de LDL plasmático y mayor es la concentración de LDL en la pared arterial, más rápidamente se desarrollan y se acumulan las células espumosas para formar depósitos grasos tempranos microscópicamente visibles. Dados estos hechos, podría inicialmente sospecharse que la endocitosis mediada por LDLR es responsable de la formación de células espumosas, pero existen dos razones poderosas por las que esto no puede ser verdad. Primero, la actividad del LDLR está bajo la regulación de retroalimentación controlada por SREBP dependiente de colesterol, que mantiene los niveles de colesterol celular dentro de un rango estrecho. Los niveles de colesterol intracelular muy por debajo de aquellos observados en las células espumosas evitan la activación transcripcional del gen de LDLR mediante la vía insig-1(2)/SCAP/SREBP (véase fig. 18-17). El consiguiente nivel de expresión bajo de LDLR evita la acumulación masiva de colesterol intracelular. Segundo, en los pacientes con hipercolesterolemia familiar que carecen de actividad LDLR y consecuentemente tienen altos niveles plasmáticos de LDL, el comienzo de la aterosclerosis se produce a edades mucho menores y su progreso se acelera de manera notable en comparación con las personas sanas. Claramente, la formación de células espumosas en estos pacientes no necesita la actividad de LDLR.

La conclusión obvia basada en esta evidencia es que un mecanismo independiente de LDLR es responsable de la incorporación celular de colesterol LDL que conduce a la formación de células espumosas. En la figura 18-20a se ilustra uno de los mecanismos propuestos. En este modelo, el LDL presente en el sitio de la infección o del daño celular de la pared arterial está sujeto a la oxidación por parte de los productos de diversas reacciones oxidativas o a otras modificaciones generadas por los células inflamatorias. Por ejemplo, la oxidación de cadenas de acilos grasos insaturados en las partículas de LDL genera aldehído y otras especies reactivas que pueden modificar en forma covalente la proteína y los componentes fosfolipídicos de las capas externas de las partículas lipoproteicas. La endocitosis de dichas partículas de LDL modificadas a través de receptores ubicados sobre los macrófagos, no sujeta a supresión por retroalimentación dependiente de colesterol, conduciría a la formación de células espumosas.

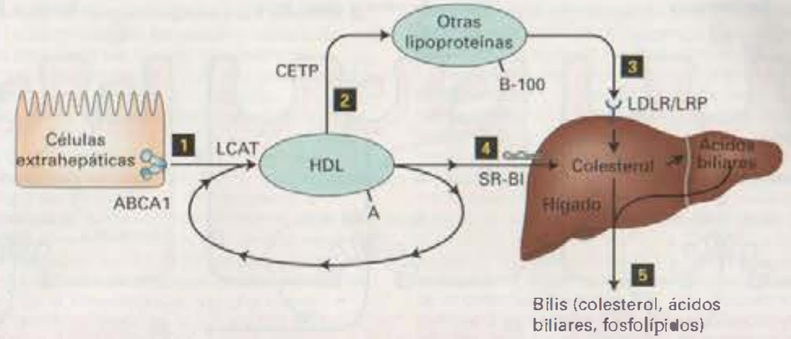
El aval para este modelo proviene del hallazgo de que los macrófagos expresan un abanico de receptores multiligando pertenecientes a la superfamilia de los receptores *de eliminación* (*scavenger*). Algunos de estos receptores pueden unir fuertemente las LDL modificadas y, en experimentos que utilizan ratones transgénicos, estuvieron implicados en la formación de células espumosas macrofágicas. La función normal de algunos receptores *de eliminación* (p. ej., el SR-AI/II) es reconocer y promover la destrucción endocítica de las macromoléculas dañadas, patógenos, y células dañadas, envejecidas o apoptóticas por medio de los macrófagos. Debido a que estos receptores normalmente no participan en el metabolismo del colesterol celular, sus actividades no están sujetas a regulación por el colesterol. Por lo tanto, pueden mediar la acumulación masiva de colesterol intracelular por parte de los macrófagos, la cual casi siempre está limitada sólo por la cantidad de LDL extracelular modificado.

El transporte inverso del colesterol mediante la HDL (colesterol bueno) protege contra la aterosclerosis

La evidencia epidemiológica indica que la concentración de colesterol HDL en el plasma está inversamente correlacionada con el riesgo de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular. Más aún, la sobreexpresión transgénica de la apolipoproteína A-I, la principal apolipoproteína de la HDL, suprime la aterosclerosis en los modelos animales de la enfermedad. Diversas propiedades de la HDL podrían contribuir a su aparente capacidad para proteger contra la aterosclerosis.

Como se trató antes, la HDL puede eliminar el colesterol de las células en los tejidos extrahepáticos, incluidas las paredes arteriales y distribuir el colesterol al hígado ya sea por incorporación lipídica selectiva mediada por el receptor SR-BI o indirectamente transfiriendo su colesterol a otras lipoproteínas que son ligandos de receptores endocíticos hepáticos (véase fig. 18-13c). El exceso de colesterol puede luego secretarse a la bilis y excretarse por último del cuerpo (véase fig. 18-11). En la figura 18-22 se resume este proceso, denominado *transporte inverso de colesterol*, que disminuye tanto el colesterol intracelular en los macrófagos como la cantidad total de colesterol transportado por el cuerpo, reduciendo así directa e indirectamente la formación de células espumosas. En cierto sentido, hay una competencia entre la distribución de colesterol, mediada por HDL, hacia las células de la pared arterial y la eliminación, mediada por HDL, del exceso de colesterol de esas células. De hecho, la proporción de colesterol LDL plasmático a la de colesterol HDL se considera un indicador mucho mejor del riesgo de enfermedad cardiovascular que la concentración total de colesterol plasmático.

Además de su papel en el transporte inverso de colesterol ateroprotector, la misma HDL y algunas enzimas plasmáticas asociadas con la HDL pueden suprimir la oxidación de LDL. La menor oxidación de LDL presumiblemente reduce los sustratos para los receptores *de eliminación (scavenger)* sobre los macrófagos, impidiendo que éstos acumulan colesterol LDL y, por lo tanto, la formación de células espumosas. La HDL también parece tener propiedades antiinflamatorias, que pueden contribuir a su efecto ateroprotector. Por último, la interacción de HDL con el receptor SR-BI puede estimular la actividad de la óxido nítrico (NO) sintasa endotelial y conducir a la mayor producción de óxido nítrico. Esta molécula de señalización con potente actividad ateroprotectora puede difundirse dentro del músculo liso vascular adyacente e inducir su relajación (véase fig. 13-30). La relajación del músculo liso alrededor de una arteria trae aparejada la dilatación (ensanchamiento) de la luz arterial y, en consecuencia, un aumento del flujo de sangre, lo que ayuda a prevenir la isquemia y el daño tisular.



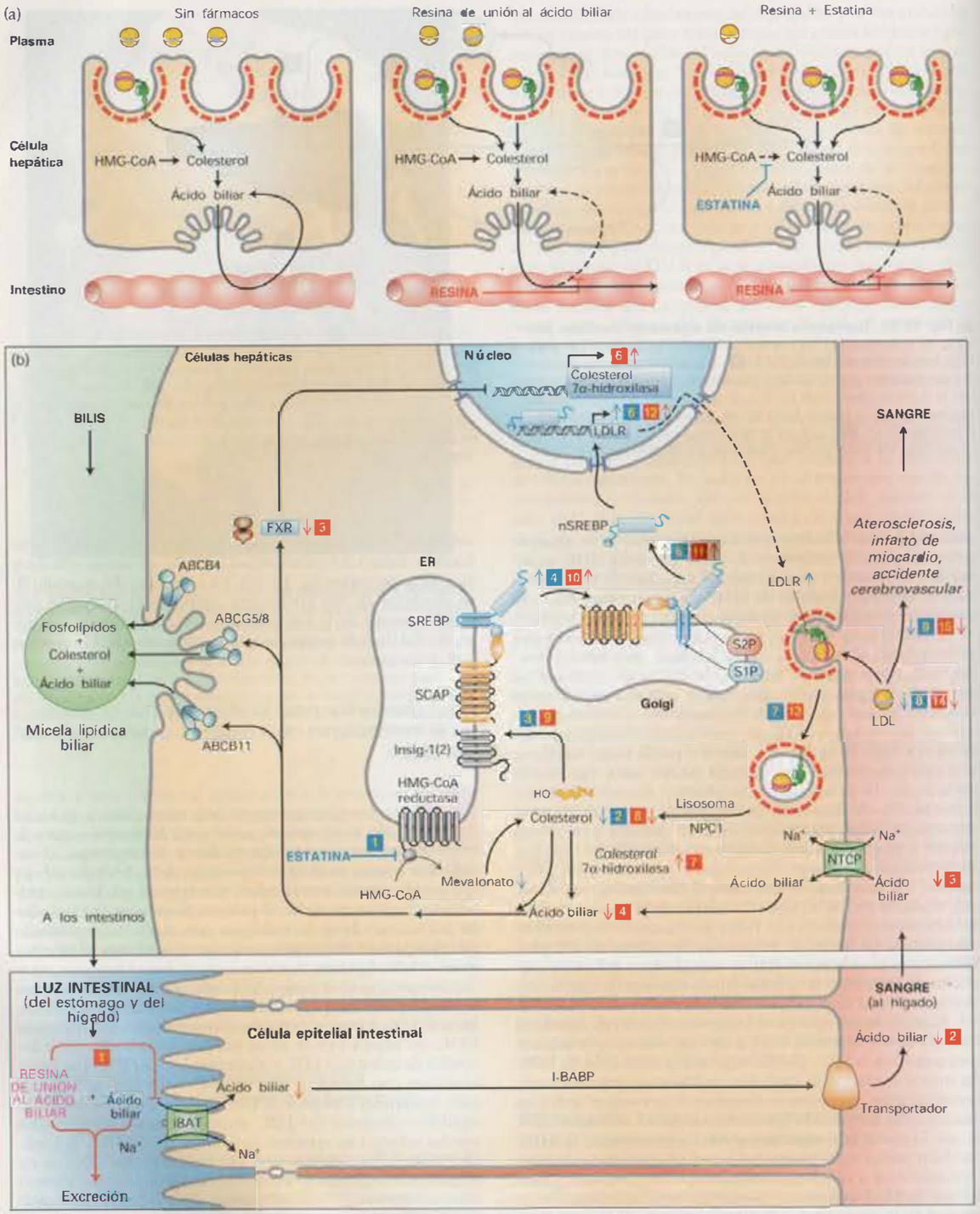
▲ **Fig. 18-22. Transporte inverso de colesterol mediado por HDL.** El colesterol de los tejidos periféricos es transferido a las HDL circulantes por las ABCA1 (1) y posiblemente por otros transportadores como SR-BI y convertido a ésteres de colesterol por la enzima plasmática LCAT. Los ésteres de colesterol en el centro de la HDL puede transferirse a otras lipoproteínas mediante CETP (2) para su endocitosis posterior mediada por receptores de lipoproteínas expresados principalmente en las células hepáticas (3). Alternativamente, el receptor SR-BI, presente sobre todo en el hígado y en los tejidos esteroidogénicos, puede mediar la incorporación selectiva de ésteres de colesterol provenientes de HDL (4). El colesterol entregado al hígado y a los ácidos biliares producidos en él se secretan con la bilis (5). (Adaptado de A. Rigotti y M. Krieger, 1999, *N. Engl. J. Med.* 341:2011; véase también M. Krieger, 1999, *Ann. Rev. Biochem.* 68:523.)

Dos tratamientos para la aterosclerosis se basan en el metabolismo del colesterol celular regulado por SREBP

MEDICINA

La compleja patogenia de la aterosclerosis, que aquí sólo bosquejamos, es un reto desalentador para la medicina molecular moderna. Sin embargo, a medida que avanza nuestra comprensión de la biología celular que subyace a esta complejidad, han surgido muchas oportunidades para intervenir en el proceso de enfermedad y modular las vías celulares. Concluimos este capítulo describiendo dos ejemplos de dichas intervenciones que afectan al metabolismo celular lipídico.

Debido a que el riesgo de la enfermedad aterosclerótica es directamente proporcional a los niveles plasmáticos de colesterol LDL e inversamente proporcional a los del colesterol HDL, un objetivo de la salud pública ha sido disminuir los niveles de colesterol LDL y aumentar los de HDL. Las intervenciones con fármacos más exitosas hasta la fecha han estado orientadas a reducir el LDL plasmático. Los niveles de equilibrio dinámico del LDL plasmático están determinados por las velocidades relativas de formación de LDL y la eliminación de LDL o depuración. Los receptores de LDL, en especial los expresados en el hígado, cumplen un papel primordial en depurar el LDL del plasma. El hígado es clave en la regulación del colesterol no sólo porque es el sitio de alrededor del 70% de los receptores de LDL del cuerpo, sino por-



◀ Fig. 18-23. Dos enfoques farmacológicos para prevenir la aterosclerosis. (a) El tratamiento con estatinas o resinas de unión a ácido biliares disminuye los niveles de colesterol hepático. Esto estimula la expresión de LDLR, lo cual aumenta la eliminación de LDL del plasma y reduce el riesgo de aterosclerosis. El tratamiento combinado con ambos tipos de fármacos suele ser más eficaz que el tratamiento con uno solo de ellos. (b) *Terapéutica con estatina.* Paso 1: Luego de la administración oral, la estatina inhibe la HMG-CoA reductasa del hígado (*parte superior*) y de otras células, disminuyendo la producción de mevalonato, un precursor del colesterol. Paso 2: Los niveles de colesterol caen, reduciendo (3) las interacciones de la insig-1(2) con el complejo SCAP/SREBP, el cual puede moverse luego (4) al Golgi para su procesamiento mediante las proteasas S1P y S2P. Como consecuencia, hay una mayor producción del factor de transcripción nSREBP soluble (5), que se mueve hacia el núcleo, se une a las SRE e incrementa la expresión de genes, como el receptor de LDL (LDLR) (6). El incremento de la actividad de LDLR mediada por nSREBP tiene como resultado el aumento de la endocitosis de LDL (7); la reducción de la concentración de LDL plasmático (8) y, por ende, la reducción de la incidencia de aterosclerosis, infarto de miocardio y accidente cerebrovascular (9). *Terapéutica con resina de unión a ácidos biliares:* La administración oral de una resina de unión a ácidos biliares, o secuestrante (1), incrementa la pérdida de ácidos biliares, evita su absorción por las células del epitelio intestinal a través de la proteína de transporte IBAT y reduce los ácidos biliares entregados a la sangre (2) y luego al hígado (3) por el transportador NTCP. Paso 4: Los menores niveles de ácidos biliares en el citoplasma reducen la cantidad de ácido biliar unido al receptor nuclear de hormona FXR (5) y por ende su efecto supresor (6) sobre la expresión de la colesterol 7α-hidroxilasa. El consiguiente incremento de los niveles de expresión y actividad de la colesterol 7α-hidroxilasa (7) reducen los niveles de colesterol intracelular (8). Al igual que con el tratamiento con estatina, los niveles reducidos de colesterol celular (9-15) incrementan la actividad de los LDLR, disminuyen los niveles de LDL plasmáticos y protegen contra la aterosclerosis. [Parte (a) adaptada de M. S. Brown y J. L. Goldstein, 1986, *Science* **232**:34.]

que también es donde el colesterol no esterificado y sus derivados de los ácidos biliares se secretan a la bilis, algo de lo cual se excreta finalmente del cuerpo (véase fig. 18-11).

Un incremento de la actividad de LDLR, sobre todo en el hígado, puede disminuir los niveles de LDL y protegerlo contra la aterosclerosis. Sabemos que la vía insig-1(2)/SCAP/SREBP normalmente regula la expresión del receptor de LDL en respuesta al colesterol intracelular (véase fig. 18-17). Por lo tanto, los tratamientos que disminuyen los niveles de colesterol celular en el hígado incrementarán la expresión del receptor de LDL y posteriormente disminuirán los niveles de LDL plasmático. Se utilizan dos enfoques para disminuir los niveles hepáticos de colesterol en estado estacionario: 1) reducir la síntesis del colesterol y 2) incrementar la conversión de colesterol a ácidos biliares en el hígado (fig. 18-23). Ambos enfoques aprovechan los mecanismos reguladores para controlar el colesterol celular recién descritos.

Quizá los medicamentos antiateroscleróticos más exitosos sean las *estatinas*. Estos fármacos se unen a la HMG-CoA reductasa e inhiben directamente su actividad, bajando por lo tanto la biosíntesis del colesterol y la acumulación de colesterol hepático. La activación de SREBP en respuesta a esta disminución del colesterol promueve la síntesis incrementada de HMG-CoA reductasa y del receptor de LDL. Más importante aquí es el mayor número resultante de receptores hepáticos que pueden mediar la mayor entrada de colesterol LDL desde el plasma. Las estatinas también parecen inhibir la aterosclerosis suprimiendo la inflamación que desencadena el proceso. Aunque el mecanismo de esta inhibición no se comprende bien, aparentemente contribuye al efecto ateroprotector de las estatinas.

Los fármacos más comunes utilizados para disminuir el colesterol hepático al incrementar la formación de ácidos biliares lo hacen interrumpiendo la circulación enterohepática. Estos *secuestrantes de ácidos biliares* (p. ej., la colestiramina) son resinas insolubles que se unen fuertemente a los ácidos biliares en la luz de los intestinos, formando complejos que evitan la absorción mediada por IBAT por parte de las células epiteliales intestinales. Los complejos se excretan en las heces. El descenso resultante del retorno de ácidos biliares al hígado provoca una caída en la reserva de ácidos biliares hepáticos. Como ya se dijo, cuando los niveles de ácidos biliares son altos, el receptor nuclear FXR reprime la expresión de la actividad de colesterol 7α-hidroxilasa, la enzima clave en la síntesis de ácidos biliares. Esta represión se termina a medida que la acumulación de ácidos biliares se reduce gracias al efecto del fármaco, lo que conduce a un incremento de la conversión de colesterol en ácidos biliares. La caída resultante en la reserva de colesterol celular en los hepatocitos interconecta la vía SREBP y lleva a una mayor síntesis hepática de LDLR y a la entrada de colesterol LDL (véase fig. 18-23).

Por consiguiente, las estatinas y los secuestrantes de ácidos biliares reducen finalmente el colesterol LDL plasmático incrementando la expresión mediada por SREBP del receptor de LDL en el hígado. Cuando una estatina y un secuestrante de ácido biliar se administran en forma simultánea, actúan juntos para disminuir sustancialmente el colesterol hepático, estimulan niveles altos de actividad LDLR hepática, y, por lo tanto, disminuyen las concentraciones de LDL (véase fig. 18-23). Lamentablemente, las estatinas y los secuestrantes de ácidos biliares no son muy eficaces en los pacientes deficientes en LDLR que son homocigóticos para la hipercolesterolemia familiar, debido a que ambas terapias dependen de la estimulación de la actividad de LDLR endógena. No obstante, la mayoría de las personas con riesgo de aterosclerosis no tienen HF homocigótica y en muchos estudios clínicos se ha demostrado que estas drogas salvan vidas. ■

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 18.5

Biología celular de la aterosclerosis, el infarto de miocardio y el accidente cerebrovascular

- La aterosclerosis es la acumulación progresiva de colesterol, células inflamatorias y de otros tipos, y matriz extracelular en el espacio subendotelial (íntima) de una pared arterial, que en última instancia conduce a la formación de una placa que puede ocluir la luz (véase fig. 18-19).
- El bloqueo parcial o completo de arterias coronarias por placas ateroscleróticas y coágulos de sangre asociados puede llevar al músculo cardíaco a la falta de oxígeno y de otros

nutrientes y provocar la muerte tisular (infarto). Bloqueos similares en arterias que abastecen el cerebro pueden causar accidente cerebrovascular.

- Las respuestas inflamatorias normales en una pared arterial, desencadenadas por la infección o el daño, pueden conducir a la formación y acumulación de células espumosas (macrófagos llenos de colesterol) el primer indicio de la aterosclerosis.

- El LDL plasmático (colesterol malo) promueve la formación de células espumosas y, por lo tanto, de aterosclerosis mediante un mecanismo independiente de LDLR que aparentemente necesita a los receptores *de eliminación* (véase fig. 18-20).

- El HDL plasmático (colesterol bueno) reduce el riesgo de aterosclerosis en parte al mediar el transporte inverso de colesterol desde las células periféricas al hígado (véase fig. 18-22).

- Dos clases de fármacos se utilizan ampliamente para tratar o evitar la aterosclerosis: las estatinas, que reducen la biosíntesis del colesterol inhibiendo la HMG-CoA reductasa, y los secuestrantes de ácidos biliares, que evitan el reciclaje enterohepático de los ácidos biliares desde el intestino al hígado. Ambos tratamientos disminuyen los niveles de colesterol hepático y conducen a un incremento mediado por SREBP en la expresión hepática de receptores LDL, que actúan para disminuir los niveles plasmáticos de LDL (véase fig. 18-23).

PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO

A pesar del progreso considerable en nuestra comprensión del metabolismo celular y el movimiento de los lípidos, los mecanismos para transportar colesterol y fosfolípidos entre las membranas de los orgánulos siguen poco dilucidados. Varios avances recientes quizá contribuyan al progreso en esta área. Primero, los investigadores purificaron parcialmente dos compartimientos de membranas especializados del RE, denominados MAM (membrana asociada con la mitocondria) y PAM (membrana asociada con la membrana plasmática), que pueden cumplir funciones en la síntesis de lípidos de membrana y en el transporte lipídico intracelular independiente del Golgi. Tanto MAM como PAM tienen una capacidad muy alta para la síntesis de fosfolípidos o esteroles o ambos, y contactan directamente las membranas mitocondriales y la membrana plasmática, respectivamente. Segundo, la selección de células con mutaciones que interfieren en el transporte lipídico entre orgánulos abre la puerta a la disección genética de este sistema. Los resultados de dichos estudios genéticos en las levaduras sugirieron que el transporte fosfolipídico entre el RE y la mitocondria está regulado mediante ubicuitinación. Tercero, la demostración de que algunas proteínas RAB pueden influir en el transporte de colesterol dependiente de NPC1 volverá a centrar los esfuerzos sobre los mecanismos vesiculares para el tránsito lipídico. Finalmente, los rafts lipídicos ricos en esfingolípidos colesterol y las cavéolas relacionadas con ellos están bajo un escrutinio experimental cada vez mayor que muy probablemente sirva como fuente de comprensión de los mecanismos de transporte lipídico intracelular y del control de las vías de señalización intracelulares.

Otra pregunta fundamental concierne a la generación, mantenimiento y funcionamiento de la distribución asimétrica de lípidos dentro de las hojuelas de una membrana y la variación en la composición lipídica entre las membranas de diferentes orgánulos. ¿Cuáles son los mecanismos que subyacen a esta complejidad y por qué se necesita tal complejidad? Ya sabemos que ciertos lípidos pueden interactuar específicamente con ciertas proteínas e influir en la actividad de éstas. Por ejemplo, las grandes proteínas multiméricas que participan en la fosforilación oxidativa en la membrana mitocondrial interna parecen ensamblarse en supercomplejos cuya estabilidad puede depender de las propiedades físicas y la unión de fosfolípidos especializados como la cardiolipina.

Aún no está disponible la comprensión molecular detallada de cómo diversas proteínas de transporte movilizan lípidos desde una hojuela de la membrana a la otra (actividad flipasa) y hacia adentro y hacia afuera de las células. Dicho entendimiento requerirá sin duda determinar con muy alta resolución la estructura de estas moléculas, su captura en diversas etapas del proceso de transporte y otros cuidadosos análisis biofísicos y cinéticos de su funcionamiento, similares a las técnicas tratadas en el capítulo 7 para dilucidar el funcionamiento de los canales iónicos impulsados por bombas.

La transferencia fructífera de la información entre la biología celular y la medicina puede trabajar en ambas direcciones. Por ejemplo, la penetración en las vías insig1-(2)/SCAP/SREBP y de receptores nucleares proporcionaron la base para el tratamiento de la aterosclerosis con estatinas y secuestrantes de ácidos biliares. Los esfuerzos continuados están camino a desarrollar fármacos aún más eficaces basados en estas vías. Por otra parte, los análisis de la hipercolesterolemia familiar fueron una fuente de importantes avances en el conocimiento de la endocitosis mediada por receptores y una nueva clase de fármacos antihipercolesterolémicos (como ezetimibe), que inhiben la absorción intestinal del colesterol, pueden ser útiles para identificar las proteínas que median la absorción del colesterol y los mecanismos por los cuales funcionan.

PALABRAS CLAVE

ácido biliar *752*
apolipoproteínas *757*
células espumosas *769*
circulación enterohepática *756*
colesterol bueno *759*
colesterol malo *759*
dominio sensor de esterol *751*
endocitosis mediada por receptor *760*
estatina *773*
flipasa *748*
hipercolesterolemia familiar (HF) *760*
incorporación lipídica selectiva *760*
lipoproteína de alta densidad *757*
lipoproteína de baja densidad *757*
placas ateroscleróticas *769*
proteína de unión al SRE (SREBP) *764*
proteína Neimann-Pick C1 (NPC1) *753*
proteínas de transporte de ácidos grasos (FATP) *755*
proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) *746*
quilomicrón *757*
receptor SR-BI *763*
respuesta inflamatoria *768*
superfamilia ABC *748*
transporte inverso de colesterol *771*
vía insig1(2)/SCAP/SREBP *765*

REVISIÓN DE CONCEPTOS

1. La biosíntesis de fosfolípidos en la interfaz entre el retículo endoplasmático (RE) y el citosol presenta numerosos desafíos que deben ser resueltos por la célula. Explique cómo se maneja cada uno de los siguientes.

a. Los sustratos para la biosíntesis de fosfolípidos son todos solubles en agua, pero los productos finales no.

b. El sitio inmediato de incorporación de todos los fosfolípidos recientemente sintetizados es la hojuela citosólica de la membrana del RE, aún así los fosfolípidos deben ser incorporados por ambas hojuelas.

c. Muchos sistemas de membrana de las células; por ejemplo, la membrana plasmática, son incapaces de sintetizar sus propios fosfolípidos, sin embargo estas membranas también deben expandirse si la célula se expande y se divide.

2. ¿Cuáles son las cadenas de ácidos grasos comunes en los glucofosfolípidos y por qué estas cadenas de ácidos grasos difieren en el número de átomos de carbono en múltiplos de 2?

3. Las plantas, los hongos y los animales contienen esteroles en sus membranas. En lugar de ser absorbidos por el intestino, la mayoría de los esteroles vegetales son excretados por los seres humanos. ¿Por qué este elemento de la dieta humana no se absorbe eficientemente?

4. La biosíntesis de colesterol es un proceso altamente regulado. ¿Cuál es la enzima clave en la regulación de la biosíntesis del colesterol? Esta enzima está sujeta a la inhibición por retroalimentación. ¿Qué es la inhibición por retroalimentación? ¿Cómo esta enzima sensa los niveles de colesterol en una célula? Cite otro ejemplo de una proteína cuya actividad es sensible a los niveles de lípidos.

5. Una fuente de colesterol para los seres humanos es la carne. Los vegetarianos eliminan esta contribución del colesterol. Sin embargo, los vegetarianos pueden desarrollar aterosclerosis ¿Cómo es posible?

6. Es evidente que una función del colesterol es estructural porque es la molécula lipídica más común en la membrana plasmática de los mamíferos. Aún así, el colesterol puede llegar a tener otras funciones. ¿Qué aspectos del colesterol y su metabolismo conducen a la conclusión de que el colesterol es un lípido de membrana multifuncional?

7. Los fosfolípidos y el colesterol deben ser transportados desde su sitio de síntesis hacia diversos sistemas de membrana dentro de las células. Una forma de hacerlo es a través del transporte vesicular, como sucede con muchas proteínas de la vía secretoria. Sin embargo, en las células la mayor parte del transporte membrana a membrana de fosfolípidos y colesterol no se produce por transporte vesicular mediado por el Golgi. ¿Cuál es la evidencia de esta declaración? ¿Cuál parece ser el mecanismo principal de transporte fosfolipídico y de colesterol?

8. El movimiento intracelular de fosfolípidos y colesterol está mediado por diversas proteínas. ¿Cuáles son los dos mecanismos principales por los cuales los lípidos salen de las células? ¿Cuáles son los tres métodos más importantes por los cuales los lípidos entran en las células?

9. La circulación enterohepática involucra el ciclado de ácidos biliares desde el hígado al intestino y de regreso. Explique el papel del ciclado de ácidos biliares en el mantenimiento de la homeostasis lipídica.

10. ¿Cuáles son las cuatro clases principales de lipoproteínas del sistema circulatorio de los mamíferos? ¿Cuáles de estas transportan principalmente colesterol y cuáles transportan principalmente triglicéridos? Se considera "bueno" un nivel alto de algunos de los transportadores de colesterol, mientras que se considera "malo" un nivel elevado de otros. ¿Cuáles son los transportadores "buenos" y "malos", y por qué se los considera "buenos" o "malos"?

11. Gran parte de la preocupación del área de salud está focalizada sobre los efectos negativos de los altos (o bajos) niveles de lípidos en el sistema circulatorio de la sangre. No obstante, los lípidos en circulación son en realidad esenciales para la salud y el bienestar de los seres humanos. ¿Cuáles son los efectos benéficos de los lípidos en circulación, incluidos el colesterol y los triglicéridos?

12. La aterosclerosis debería considerarse una enfermedad del organismo más que de una célula individual. ¿Está de acuerdo o en desacuerdo y por qué? Explique cómo el trasplante hepático podría ser una de las estrategias para el tratamiento de la hipercolesterolemia familiar. ¿Cómo afecta el hecho de que la aterosclerosis se manifieste generalmente tarde en la vida la posibilidad de que la evolución haya realizado o no una selección a favor o en contra de la enfermedad?

13. Las concentraciones crecientes de LDL en el líquido extracelular suprimen la actividad de la HMG-CoA reductasa y la transcripción de genes que codifican el receptor LDL y la HMG-CoA reductasa. De modo contrario, cuando los niveles extracelulares de LDL son bajos, se induce la transcripción de estos genes. Los factores de transcripción responsables son las proteínas de unión a SRE (SREBP). Cuando las células tienen niveles adecuados de colesterol, la SREBP es una proteína transmembrana del RE ¿Con cuáles proteínas la SREBP forma un complejo? ¿Cómo sensa el nivel de esterol este complejo? ¿Dónde dentro de la célula se libera la SREBP como una proteína soluble al citosol? ¿Cuál es el mecanismo por el que se libera SREBP? Con relación a este proceso, ¿cuál es el significado de RIP?

14. Diversos miembros de la superfamilia de receptores nucleares regulan el metabolismo lipídico. Pequeñas moléculas específicas son activadores típicos. Dichas moléculas pueden ser sintetizadas dentro de la célula diana, difundirse dentro de ella o ser transportadas hacia el interior de la célula. Un ejemplo es FXR, que se activa por unión de ácidos biliares. FXR se expresa en los hepatocitos y en las células epiteliales intestinales. ¿Es la fuente de ácidos biliares lo que activa a la célula para que sintetice FXR, lo incorpore o haga ambas cosas a la vez? En lugar de dar nombres específicos de proteínas cuya síntesis esté regulada por FXR, prediga las clases de proteínas cuya síntesis debería estar regulada por un receptor nuclear activado por ácido biliar.

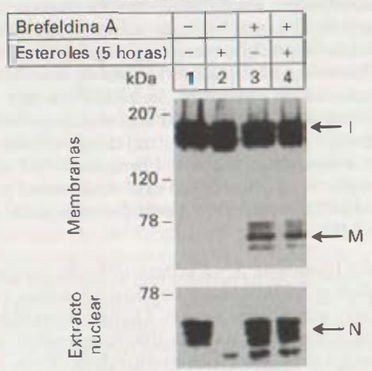
15. La aterosclerosis puede pensarse como una consecuencia no intencional de respuestas fisiológicas normales diseñadas

para proteger al cuerpo contra la infección y el daño tisular. Explique cómo la inflamación, el colesterol y las células espumosas participan en la aterosclerosis.

16. Dos clases diferentes de fármacos que se utilizan actualmente para reducir los niveles de colesterol en la sangre se detallaron en este capítulo. ¿Cuáles son los nombres de estas dos clases de fármacos? ¿Cómo actúa cada clase para disminuir los niveles sanguíneos de colesterol?

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Usted está revisando los resultados de una serie de experimentos recientes para determinar la regulación de la proteólisis de la proteína de unión al elemento regulador del esterol (SREBP) mediante las proteasas Sitio-1/2. En el primer experimento, toma un camino indirecto para averiguar si las proteasas del Sitio-1/2 son componentes del aparato de Golgi. Usted trata las células CHO con la droga brefeldina A (BFA). La brefeldina A induce la redistribución de las proteínas del Golgi al RE. En el experimento, las células CHO se incuban durante 16 horas en ausencia de esteroles, luego se incuban por 5 horas adicionales en ausencia o presencia de esteroles, en presencia o ausencia de BFA (véase la primera fig.). Al final de las 5 horas de incubación, las células CHO se homogeneizan y se separa una fracción citoplasmática (proteína de 50 µg por calle del gel) y una nuclear (100 µg proteína por calle del gel). Luego las proteínas se separan en geles de SDS-poliacrilamida y se agregan sondas para buscar la presencia de las diversas formas moleculares de SREBP (I: intacto, M: forma escindida intermedia, N: forma nuclear).



De los resultados observados, ¿cuál es el tamaño de M SREBP y N SREBP comparado con el tamaño de I SREBP? Cómo puede haber un producto evidente en este experimento sin una pérdida aparente en el SREBP intacto? ¿Cuál es el efecto normal del añadido de esteroles sobre la producción de la SREBP nuclear? ¿Cuál es la vida media normal de la SREBP nuclear?¿Por qué la inestabilidad de la SREBP nuclear es importante para la función de la vía reguladora de esteroles? ¿Cuál es el efecto de la BFA sobre el nivel de N SREBP y M SREBP? ¿Cómo indica este efecto un papel del aparato de Golgi en la formación de N SREBP?

BIBLIOGRAFÍA

Fosfolípidos y esfingolípidos: síntesis y movimiento intracelular

Daleke, D. L. 2003. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. J. Lipid Res. 44:233-242.

Daleke, D. L., and J. V. Lyles. 2000. Identification and purification of aminophospholipid flippases. Biochim. Biophys. Acta 1486:108-127.

Dowhan, W. 1997. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? Ann. Rev. Biochem. 66:199-232.

Henneberry, A. L., M. M. Wright, and C. R. McMaster. 2002. The major sites of cellular phospholipid synthesis and molecular determinants of fatty acid and lipid head group specificity. Mol. Biol. Cell 13:3148-3161.

Kent, C. 1995. Eukaryotic phospholipid biosynthesis. Ann. Rev Biochem. 64:315-343.

Ostrander, D. B., et al. 2001. Lack of mitochondrial anionic phospholipids causes an inhibition of translation of protein components of the electron transport chain: a yeast genetic model system for the study of anionic phospholipid function in mitochondria. J. Biol. Chem. 276:25262-25272.

Ruetz, S., and P. Gros. 1994. Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the mdr2 gene. Cell 77:1071-1081.

Smit, J. J. M., et al. 1993. Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glyeoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. Cell 75:451-462.

Storch, J., and A. E. A. Thumser. 2000. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. Biochim. Biophys. Acta 1486:28-44.

Thompson, J., A. Reese-Wagoner, and L. Banaszak. 1999. Liver fatty acid binding protein: species variation and the accommodation of different ligands. Biochim. Biophys. Acta 1441(2-3): 117-130.

Colesterol: un lípido de membrana multifuncional

Bloch, K. 1965. The biological synthesis of cholesterol. Science 150(692):19-28.

Edwards, P. A., and J. Ericsson. 1999. Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. Ann. Rev. Biochem. 68:157-185.

Ioannou, Y. A. 2001. Multidrug permeases and subcellular cholesterol transport. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2:657-668.

Maxfield, F. R., and D. Wustner. 2002. Intracellular cholesterol transport. J. Clin. Invest. 110:891-898.

Munn, N. J., et al. 2003. Deficiency in ethanolamine plasmalogen leads to altered cholesterol transport. J. Lipid Res. 44:182-192.

Sacchettini, J. C., and C. D. Poulter. 1997. Creating isoprenoid diversity. Science 277(5333):1788-1789.

Strauss, J. F., P. Liu, L. K. Christenson, and H. Watari. 2002. Sterols and intracellular vesicular trafficking: lessons from the study of NPC1. Steroids 67:947-951.

Vance, D. E., and J. E. Vance. 1996. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes, 3rd ed. Elsevier.

Vance, D. E., and H. Van den Bosch. 2000. Cholesterol in the year 2000. Biochim. Biophys. Acta 1529(1-3):1-8.

Voelker, D. R. 2003. New perspectives on the regulation of inter-membrane glycerophospholipid traffic. J. Lipid Res. 44:441-449.

Movimiento lipídico hacia adentro y hacia afuera de las células

Abumrad, N. A., et al. 1993. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation: homology with human CD36. J. Biol. Chem. 268:17665-17668.

Acton, S., et al. 1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. Science 271(5248):518-520.

Borst, P., and R. O. Elferink. 2002. Mammalian ABC transporters in health and disease. Ann. Rev. Biochem. 71:537-592.

Brown, M. S., and J. L. Goldstein. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science 232(4746):34-47.

Glass, C., R. C. Pittman, D. B. Weinstein, and D. Steinberg. 1983. Dissociation of tissue uptake of cholesterol ester from that of apoprotein A-I of rat plasma high density lipoprotein: selective delivery of cholesterol ester to liver, adrenal, and gonad. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 80:5435-5439.

Goldstein, J. L., and M. S. Brown. 1974. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts: comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. J. Biol. Chem. 249: 5153-5162.

Hajri, T., and N. A. Abumrad. 2002. Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology. Ann. Rev. Nutr. 22:383-415.

Havel, R. J., and J. P. Kane. 2001. Introduction: Structure and Metabolism of Plasma Lipoproteins. In C. R. Scriver et al., eds., The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. McGraw-Hill, 8th ed., pp. 2705-2716.

Meier, P. J., and Stieger, B. 2002. Bile salt transporters. Ann. Rev. Physiol. 64:635-661.

Oram, J. F. 2002. ATP-binding cassette transporter A1 and cholesterol trafficking. Curr. Opin. Lipidol. 13:373-381.

Schaffer, J. E., and H. F. Lodish. 1994. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. Cell 79:427-436.

Sharp, D., et al. 1993. Cloning and gene defects in microsomal triglyceride transfer protein associated with a beta lipoproteinaemia. Nature 365(6441):65-69.

Shelness, G. S.i, and J. A. Sellers. 2001. Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. Curr. Opin. Lipidol. 12(2):151-157.

Stahl, A., R. E. Gimeno, L. A. Tartaglia, and H. F. Lodish. 2001. Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family. Trends Endocrinol. Metab. 12(6):266-273.

Stein, Y., et al. 1983. Metabolism of HDL-cholesteryl ester in the rat, studied with a nonhydrolyzable analog, cholesteryl linoleyl ether. Biochim. Biophys. Acta 752:98-105.

Wong, H., and M. C. Schotz. 2002. The lipase gene family. J. Lipid Res. 43:993-999.

Regulación por retroalimentación del metabolismo lipídico celular

Chawla, A., J. J. Repa, R. M. Evans, and D. J. Mangelsdorf. 2001. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. Science 294(5548):1866-7180.

Dobrosorskaya, Y., et al. 2002. Regulation of SREBP processing and membrane lipid production by phospholipids in *Drosophila*. Science 296(5569):879-883.

Francis, G. A., E. Fayard, F. Picard, and J. Auwerx. 2003. Nuclear receptors and the control of metabolism. Ann. Rev. Physiol. 65:261-311.

Horton, J. D., J. L. Goldstein, and M. S. Brown. SREBPs: activarors of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in rhe liver. J. Clin. Invest. 109:1125-1131.

Moore, K. J., M. L. Fitzgerald, and M. W. Freeman. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptors in macrophage biology: friend or foe? Curr. Opin. Lipidol. 12:519-527.

Repa, J. J., and D. J. Mangelsdorf. 2002. The liver X receptor gene team: potential new players in atherosclerosis. Nature Med. 8:1243-1248.

Sever, N., et al. 2003. Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 ro its sterol-sensing domain. Mol. Cell 11:25-33.

Trauner, M., and J. L. Boyer. 2003. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. Physiol. Rev. 83: 633-671.

Yang, T., et al. 2002. Crucial srep in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP ro INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. Cell 110:489-500.

Biología celular de la aterosclerosis, el infarto de miocardio y el accidente cerebrovascular

Brown, M. S., and J. L. Goldstein. 1983. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. Ann. Rev. Biochem. 52:223-261.

Endo, A., Y. Tsujita, M. Kuroda, and K. Tanzawa. 1977. Inhibition of cholesterol synthesis in vitro and in vivo by ML-236A and ML-236B, competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. Eur. J. Biochem. 77:31-36.

Febbraio, M., D. P. Hajjar, and R. L. Silverstein. 2001. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, athero sclerosis, inflammation, and lipid metabolism. J. Clin. Invest. 108:785-791.

Glomset, J. A. 1968. The plasma lecithin:cholesterol acyltransferase reaction. J. Lipid Res. 9:155-167.

Gotto, A. M., Jr. 2003. Treating hypercholesterolemia: looking forward. Clin. Cardiol. 26(suppl. 1):I21-I28.

Krieger, M., and J. Herz. 1994. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). Ann. Rev. Biochem. 63:601-637.

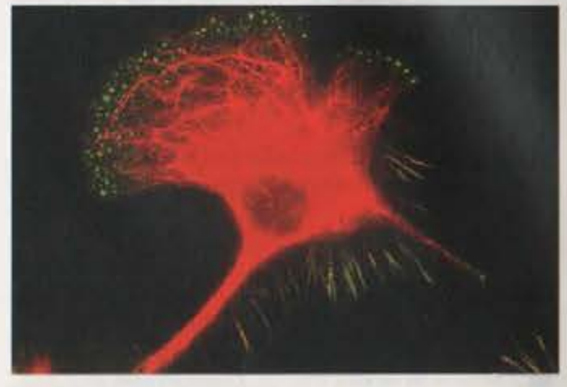
Ross, R. 1999. Atherosclerosis: an inflammatory disease. N. Engl. J. Med. 340(2):115-126.

Van Heek, M., et al. 1997. In vivo metabolism-based discovery of a potent cholesterol absorption inhibitor, SCH58235, in the rat and rhesus monkey through the identification of the active metabolites of SCH48461. J. Pharmacol. Exp. Ther. 283:157-163.

Willner, E. L., et al. 2003. Deficiency of acyl CoA:cholesterol acyltransferase 2 prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 100(3):1262-1267.

19

MICROFILAMENTOS Y FILAMENTOS INTERMEDIOS



Citoesqueleto de un macrófago. Las estructuras prominentes incluyen un retículo de filamentos intermedios (rojo) y una disposición en forma de puntos de las adhesiones celulares (amarillo); ambos contienen actina y vimentina. (Cortesía de J. Evans.)

La movilidad celular es uno de los máximos logros de la evolución. Es muy probable que las células primitivas fueran inmóviles y se dejaran llevar por las corrientes del medio primordial. Por el contrario, en los organismos multicelulares la migración de células aisladas y de grupos celulares desde una parte del embrión hacia otra es crítica para el desarrollo del organismo. En los animales adultos, células aisladas buscan organismos extraños como parte de la defensa contra una infección; por otro lado, la migración celular descontrolada es un signo ominoso de las células cancerosas. Algunas células bacterianas pueden moverse mediante el batido de flagelos impulsados por un mecanismo rotatorio que se encuentra en la membrana celular (véase fig. 3-22b). Sin embargo, las células eucariontes móviles utilizan diferentes mecanismos para generar movimiento.

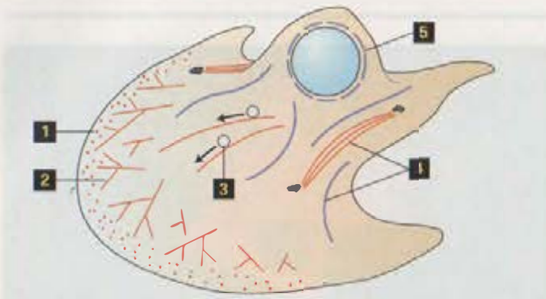
La mayoría de las células del cuerpo son estacionarias, pero muchas exhiben modificaciones drásticas de su morfología, como la contracción de las células musculares, la elongación de los axones nerviosos, la formación de prolongaciones en la superficie celular y la constricción de una célula en proceso de división por mitosis. Los movimientos más sutiles quizá sean los que tienen lugar en el interior de la célula; la separación activa de los cromosomas, las corrientes del citosol y el transporte de vesículas de membrana. Estos movimientos internos son elementos esenciales del crecimiento y la diferenciación celular, y están controlados cuidadosamente por la célula para que se produzcan en momentos específicos y en ubicaciones determinadas.

El citoesquelo, un sistema de fibras citoplasmáticas, es crítico para la motilidad celular. En el capítulo 5 nos referimos a los tres tipos de fibras citoesqueléticas –**microfilamentos, filamentos intermedios, microtúbulos**– y consideramos sus funciones como soporte de la membrana celular y en la organización de los contenidos celulares (véase fig. 5-29). Todas estas fibras son polímeros construidos por pequeñas subunidades de proteína que se mantienen unidas por uniones no covalentes. En lugar de presentar una disposición desordenada, el citoesqueleto está organizado en estructuras separadas, sobre todo haces, retículos con forma de cúpulas geodésicas y entramados similares a geles. En este capítulo ampliamos las consideraciones anteriores sobre los microfilamentos de actina y los filamentos intermedios (fig. 19-1). Ambos componentes citoesqueléticos están unidos a proteínas de la membrana celular. A pesar de ello, los filamentos de actina participan en varios tipos de movilidad celular, mientras que los filamentos intermedios no están directamente comprometidos con los movimientos celulares.

Todos los movimientos celulares son la manifestación de un trabajo mecánico; requieren combustible (ATP) y proteínas que conviertan la energía almacenada en el ATP en movimiento. Las células desarrollaron dos mecanismos básicos para generar movimiento. Un mecanismo involucra el ensamblaje y desensamblaje de microfilamentos y microtúbulos y es el responsable de muchos cambios en la forma celular. El otro mecanismo requiere una clase especial de enzimas denominadas **proteínas motoras**, ya explicadas en el capítulo 3. Estas proteínas utilizan energía proveniente del ATP para caminar o deslizarse a lo largo de un microfilamento o de un microtú-

CONTENIDO

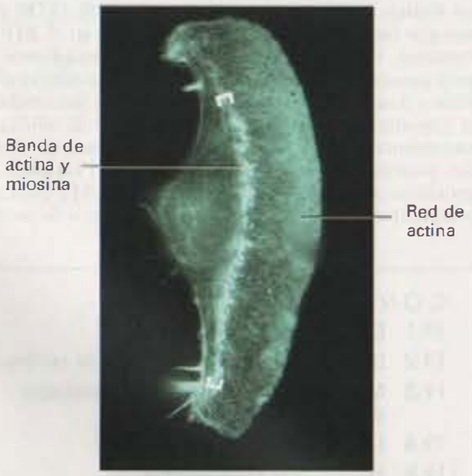
19.1 Estructuras de actina
19.2 Dinámica del ensamblaje de actina
19.3 Movimientos celulares impulsados por miosina
19.4 Locomoción celular
19.5 Filamentos intermedios



	COMPONENTES DEL CITOESQUELETO	FUNCIÓN CELULAR
1	Dinámica de la actina	Extensión de la membrana
3	Red de filamentos: haces	Estructura celular
2	Motores de miosina	Contractibilidad y transporte de vesículas
4	Haces de actina y filamentos intermedios	Adhesión celular
5	Red de lamina	Estructura nuclear

▲ Fig. 19-1. Representación de los citoesqueletos de actina y filamentos intermedios y sus funciones. La maquinaria del citoesqueleto de actina (rojo) es responsable de mantener la forma celular y de generar la fuerza de movimiento. La polimerización y despolimerización de los filamentos de actina (1) dirige la membrana hacia adelante, mientras que las proteínas de enlaces cruzados organizan los haces y retículos de filamentos (2) que sostienen la forma celular en general. Los movimientos adentro de la célula y las contracciones de la membrana celular (3) son producidos por proteínas motoras de miosina. Los citoesqueletos de actina (rojo) y de filamentos intermedios (violeta) integran la célula y sus contenidos con otras células en tejidos (4) mediante uniones a adhesiones celulares. Otro tipo de filamentos intermedios, las laminas nucleares (5) son responsables de mantener la estructura del núcleo.

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Filamentos de actina en un lamelipodio de un queratinocito de pescado



bulo y transportar orgánulos o vesículas sobre ellos. Pocos movimientos requieren tanto la acción de las proteínas motoras como de reordenamientos en el citoesqueleto. En este capítulo, analizamos también la miosina, la proteína motora que interacciona con la actina, sumado a nuestra descripción anterior de la estructura de la miosina II y su papel en la contracción muscular. La miosina II pertenece a una gran familia de proteínas encontradas en los animales y en las plantas. La función de tres miosinas (I, II y V) está bien establecida, pero las actividades de las otras todavía se ignoran. La descripción de los microtúbulos, el tercer tipo de fibras citoesqueléticas y sus proteínas motoras se difiere al capítulo 20.

19.1 Estructuras de actina

Como vimos en el capítulo 5, el citoesqueleto de actina está organizado en varias estructuras grandes que se extienden a lo largo de la célula. Debido a su gran tamaño, este citoesqueleto puede cambiar con facilidad la morfología celular mediante su ensamblaje y desensamblaje. En capítulos anteriores vimos ejemplos de grandes complejos de proteína en los cuales el número y la posición de las subunidades estaba fijo. Por ejemplo, todos los ribosomas tienen el mismo número de proteínas y componentes de RNA y su geometría tridimensional es invariable. Por el contrario, el citoesqueleto de actina es diferente; el largo de los filamentos puede variar enormemente, los filamentos se entrecruzan para formar haces y retículos imperfectos y la relación de proteínas del citoesqueleto no se mantiene de manera rígida. Esta organización flexible les permite a las células asumir muchas formas y variarlas con facilidad. En las células móviles, el citoesqueleto debe ensamblarse con rapidez y no siempre tiene la posibilidad de formar estructuras bien ordenadas y organizadas.

En esta sección consideramos las propiedades de los monómeros y los polímeros de actina, así como de las diversas proteínas que ensamblan los filamentos en largas estructuras. Una vez establecidos los conocimientos básicos sobre el citoesqueleto de actina, en la sección 19.2 examinaremos cómo la célula confecciona ese marco para llevar a cabo diversas tareas que comprenden movimientos de toda la célula o de sus partes.

La actina es antigua, abundante y está muy conservada

La actina es la proteína más abundante de las células eucariontes. Por ejemplo, en las células musculares representa el 10% en peso de la proteína celular total; incluso en las células no musculares representa 1-5% de la proteína celular. La concentración citosólica de actina en las células no musculares varía desde 0,1 mM a 0,5 mM, no obstante en estructuras especiales como las microvellosidades, la concentración

◀ Fig. 19-2. Citoesqueleto de actina en una célula motora. Los queratinocitos de pescado se encuentran entre las células que reptan más rápido. Dos estructuras que contienen actina trabajan juntas para generar la fuerza necesaria para el movimiento. Una red de filamentos de actina en el frente celular empuja la membrana hacia adelante. Mientras tanto, una banda de miosina y actina (entre corchetes) empuja el cuerpo celular. Este ordenamiento de actina y miosina es típico de las células motoras. (De T. M. Svitkina et al., 1997, J. Cell Biol. 139:397.)

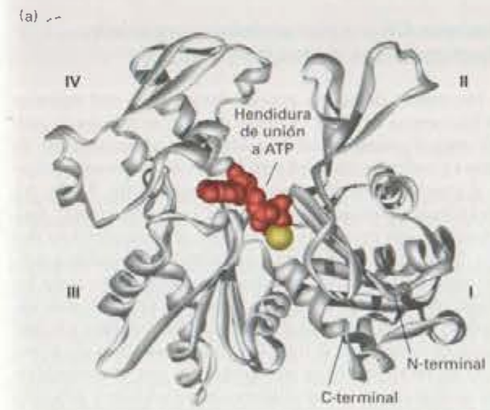
total puede llegar hasta 5 mM. Para apreciar la cantidad de actina que contiene una célula se toma como ejemplo una célula hepática típica, que contiene 2×10^4 moléculas receptoras de insulina pero alrededor de 5×10^8, o 500 millones de moléculas de actina. Este predominio de la actina respecto de otras proteínas celulares es una característica común de todas las proteínas del citoesqueleto. Debido a que forman estructuras que deben cubrir grandes espacios estas proteínas se encuentran entre las más abundantes de la célula.

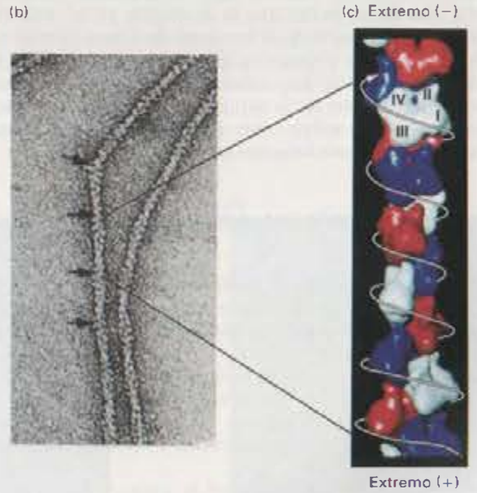
La actina, una proteína de tamaño intermedio con un peso molecular de 42.000, es codificada por una gran familia de genes altamente conservada. Apareció en alguna bacteria ancestral y luego evolucionó cuando las células eucariontes se especializaron. Algunos organismos unicelulares, como las bacterias en forma de bastón, las levaduras y las amebas, tienen uno o dos genes de actina, mientras que muchos organismos multicelulares contienen múltiples genes de ella. Por ejemplo, el ser humano tiene seis genes de actina, que codifican isoformas de la proteína y algunas plantas tienen más de 60 genes de actina, pero muchos de éstos son seudogenes. En los vertebrados, las cuatro isoformas de α-actina presentes en varias células musculares y la β-actina y γ-actina presentes en células no musculares difieren solo en cuatro o cinco posiciones. A pesar de que estas diferencias parecen menores, las isoformas cumplen distintas funciones: la α-actina se asocia con estructuras contráctiles, la γ-actina forma parte de los filamentos de las fibras de estrés y la β-actina está en la frente, o borde director, de células en movimiento donde los filamentos de actina se polimerizan (fig. 19-2). El secuenciamiento de actina de diferentes fuentes reveló que se encuentra entre las proteínas más conservadas de una célula, comparables con las histonas, las proteínas estructurales de la cromatina (cap. 10). La secuencia de la actina de las amebas y de los animales son idénticas en un 80% de las posiciones.

Los monómeros de actina G se ensamblan para formar largos polímeros helicoidales de actina F

La actina existe como monómeros globulares llamados *actina G* y como polímeros filamentosos llamados *actina F*, que es una cadena lineal de subunidades de actina G. (Los microfilamentos visualizados en las células mediante el microscopio electrónico son filamentos de actina F más otras proteínas unidas.) Cada molécula de actina contiene un ion Mg^{2+} asociado con una molécula de ATP o ADP. Hay cuatro estados de actina: actina G-ATP, actina G-ADP, actina F-ATP y actina F-ADP. Dos de estas formas, la actina G-ATP y la actina F-ADP, predominan en la célula. La importancia de la interconversión entre las formas de actina ATP y ADP en el ensamblaje del citoesqueleto se verá más adelante.

Aunque en la observación con el microscopio electrónico la actina G tiene apariencia globular, el análisis de cristalografía de rayos X revela que está constituida por dos lóbulos separados por una profunda hendidura. Los lóbulos y la hen-





▲ Fig. 19-3. Estructuras de actina G monomérica y de filamentos de actina F. (a) Modelo de un monómero de actina β proveniente de una célula muscular, que muestra la molécula laminar (mide 5,5 × 5,5 × 3,5 nm) dividida por una hendidura central con dos lóbulos de tamaño similar y cuatro subdominios, numerados I-IV. El ATP (rojo) se fija al fondo de la hendidura y establece contacto con ambos lóbulos (la esfera amarilla representa Mg^{2+}). Los N y C terminales se encuentran en el subdominio I. (b) Mediante el microscopio electrónico se distinguen los filamentos de actina, con tinción negativa, como largas hebras flexibles y retorcidas de subunidades semejantes a perlas. Debido al enrollamiento, el filamento aparece con porciones alternadas más angostas (7 nm de diámetro) y más anchas (9 nm de diámetro) (flechas). (c) En un modelo de la disposición de subunidades en un filamento de actina, las subunidades se ubican en una hélice apretada a lo largo del filamento, según se indica con la flecha. Una unidad repetida consta de 28 subunidades (13 vueltas de hélice), que abarca una longitud de 72 nm. En la figura sólo se muestran 14 subunidades. La hendidura fijadora de ATP se orienta en la misma dirección (parte superior) en todas las subunidades de actina del filamento. Como se verá más adelante, este extremo de un filamento se denomina extremo (-); el extremo opuesto es el (+). (Parte (a) adaptada de C. E. Schutt et al., 1993, *Nature* 1993; 365:810, cortesía de M. Rozycki. Parte (b) cortesía de R. Craig; parte (c) véase M. F. Schmid et al., 1994 *J. Cell Biol.* 124:341, cortesía de M. Schmid.)

didura componen el *pliegue ATPasa*, el lugar donde el ATP y el Mg^{2+} se unen. En la actina, el piso de la hendidura actúa como una bisagra que les permite a los lóbulos flexionarse en forma relativa entre sí. Cuando el ATP o el ADP están unidos a la actina G, el nucleótido afecta la conformación de la molécula. De hecho, sin un nucleótido unido, la actina G se desnaturaliza con gran rapidez.

La adición de iones Mg^{2+}, K^+ o Na^+– a una solución de actina G produce la polimerización de la actina G en filamentos de actina F. El proceso es también reversible: la actina F se despolimeriza a actina G cuando la fuerza iónica de la solución disminuye. Los filamentos de actina F que se forman in vitro son indistinguibles de los microfilamentos aislados de células, lo que indica que otros factores, como las proteínas reguladoras, no son necesarios para la polimerización in vivo. El ensamblaje de la actina G en actina F se acompaña por la hidrólisis de ATP a ADP y P_i; a pesar de esto y como se analizará luego, la hidrólisis de ATP afecta la cinética de polimerización, pero no es necesaria para que ésta se realice.

Cuando se tiñe en forma negativa con acetato de uranilo para su observación con el microscopio electrónico, la actina F aparece como un collar de perlas retorcido cuyo diámetro varía entre 7 y 9 nm (fig. 19-3b). A partir de los resultados de los estudios de difracción con rayos X de la estructura de los filamentos y de los monómeros de actina ilustrados en la figura 19-3a, los científicos han creado un modelo de filamento en el cual las subunidades se organizan como una hélice arrollada muy apretada (fig. 19-3c). En esta disposición cada subunidad está rodeada por otras cuatro: una por encima, otra por debajo y dos a un lado. Cada subunidad corresponde a una de las perlas que se distinguen en las microfotografías electrónicas de los filamentos de actina.

La capacidad de polimerización de la actina G en actina F y de esta última de despolimerizarse en actina G, es una propiedad importante de la actina. En este capítulo se estudia cómo este ensamblaje reversible subyace al mecanismo central de muchos movimientos celulares.

La actina F presenta polaridad estructural y funcional

Todas las subunidades de un filamento de actina apuntan hacia el mismo extremo del filamento. En consecuencia un filamento exhibe **polaridad**; eso significa que un extremo es diferente del otro. Por convención, el extremo de la subunidad terminal de actina que tiene la hendidura de unión al ATP expuesta a la solución que la rodea es designado extremo (-). En el extremo opuesto, el extremo (+), la hendidura hace contacto con la subunidad de actina vecina y no se encuentra expuesto (véase fig. 19-3c).

La hendidura de una subunidad de actina y, por lo tanto, la polaridad de un filamento, no son detectables sin la resolución atómica que permite la cristalografía de rayos X. Sin embargo, la polaridad de los filamentos de actina se puede demostrar con el microscopio electrónico mediante los experimentos denominados de "decoración", que aprovechan la capacidad de la miosina para fijarse en forma específica a los filamentos de actina. En este tipo de experimentos se mezcla un exceso de miosina S1, el dominio globular que forma la cabeza de la miosina, con filamentos de actina y se permite la unión. La miosina se adosa a los lados de un filamento con una ligera pendiente. Cuando todas las subunidades se unen a la miosina, el filamento aparece recubierto ("decorado") por puntas de flecha, todas orientadas hacia un extremo del filamento (fig. 19-4). Dado que la miosina se fija a los filamentos de actina y no a los microtúbulos o a los filamentos intermedios, en las microfotografías electrónicas de cortes celulares delgados la decoración con puntas de flecha es un criterio de diferenciación entre los filamentos de actina y otras fibras del citoesqueleto.



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 19-4 La "decoración" demuestra la polaridad del filamento de actina.** Los dominios cabeza S1 de la miosina se unen a la actina en una orientación particular. Cuando se encuentra unida a todas las subunidades de un filamento, S1 aparece como una espiral alrededor de éste. Esta cubierta de cabezas de miosina produce una serie de decoraciones semejantes a puntas de flecha, que se pueden visualizar fácilmente a lo largo del filamento. La polaridad de la decoración define el extremo (-) y el extremo barbado (+); lo anterior corresponde a la parte superior en el modelo de la figura 19-3c. (Cortesía de R. Craig.)

Los dominios CH y otras proteínas organizan los microfilamentos en haces y retículos

Los filamentos de actina pueden formar una red enmarañada de filamentos in vitro. A pesar de ello, se requieren *proteínas de enlace cruzado con la actina* para el ensamblaje de filamentos en retículos estables y en haces que provean un marco para el soporte de la membrana plasmática (fig. 19-5). Algunas proteínas de enlace cruzado con la actina (p. ej., fimbrina y fascina) son proteínas monoméricas que contienen dos dominios de unión a la actina en una cadena polipeptídica simple. Pero muchas proteínas de enlace cruzado, sobre todo las que forman retículos de filamentos, consisten en dos o más cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales contiene un único dominio de unión a la actina. Los múltiples sitios de unión a la actina de estas proteínas son generados por el ensamblaje en forma de dímeros u otros oligómeros. Los haces y retículos de actina son estabilizados frecuentemente por varias diferentes proteínas de enlace cruzado con la actina.

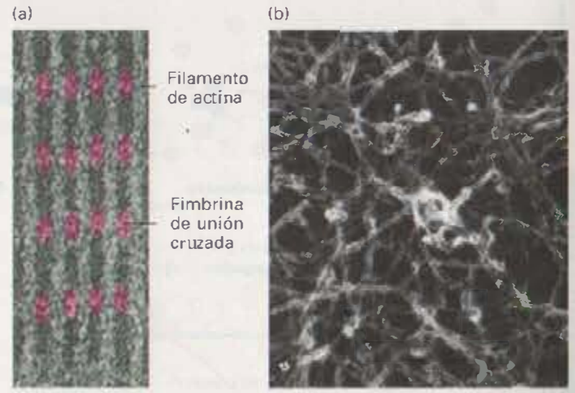
Muchas proteínas de enlace cruzado con la actina pertenecen a la superfamilia de *homología con el dominio calponina* (cuadro 19-1). Cada una de estas proteínas con dominios CH tiene un par de dominios de unión a la actina cuya secuencia es homóloga a la calponina, una proteína muscular. Los dominios de unión a la actina están separados por repeticiones de motivos de hélices en espiral enrollada o de láminas beta de inmunoglobulinas. El ordenamiento de los sitios de unión a la actina en estas proteínas determina que los filamentos se organicen en haces o retículos. Cuando los sitios de unión se ordenan en tándem, como en la fimbrina o la α-actinina, el filamento de actina fijado se empaqueta fuertemente y se alinea en forma de haces (véase fig. 19-5a) en las adhesiones y extensiones celulares. Sin embargo, si los sitios de unión se encuentran separados, en los extremos de brazos flexibles, como en el caso de la filamina, la espectrina y la distrofina, la unión cruzada puede formarse entre filamentos organizados ortogonalmente y empaquetados en forma laxa (véase fig. 19-5b). La gran red así formada ocupa el citoplasma y le da un aspecto de gel. Como estas proteínas también se unen a proteínas de membrana, la red suele hallarse en la zona cortical adyacente a la membrana plasmática. En las proteínas que forman redes de filamentos, la repetición de los diferentes motivos determina el largo de los brazos y el espaciamiento y la orientación entre los filamentos.

A pesar de que las proteínas que tienen dominios CH constituyen la mayoría de las proteínas de enlace cruzado de actina, otras proteínas que se unen en diferentes sitios sobre la actina desempeñan funciones igualmente importantes en la organización de los filamentos de actina. Una de esas proteínas, la fascina, se observa en muchos haces de actina, incluidos las fibras de estrés, las microvellosidades de la superficie celular y los pelos sensores que cubren el cuerpo de la mosca de la fruta *Drosophila*. El importante papel estructural de la fascina se ilustra mediante los efectos producidos por las mutaciones en el gen *singed*, que codifica la fascina en *Drosophila*. En las mutantes *singed*, los pelos sensores están doblados y deformados, lo que evidencia que la fascina mantiene la rigidez de los haces de actina en el centro de cada pelo.

CUADRO 19-1 Proteínas de unión a actina seleccionadas

Proteína	PM	Organización de dominios*	Ubicación
SUPERFAMILIA DE DOMINIOS CH			
Fimbrina	68.000		Microvellosidades, estereocilios, placas de adhesión, cables de actina en levaduras
α-actinina	102.000		Filopodios, lamelipodios, fibras de estrés, placas de adhesión
Espectrina	α: 280.000 β: 246.000-275.000	β α α β	Retículos corticales
Distrofina	427.000		Retículos corticales musculares
Filamina	280.000		Filopodios, seudópodos, fibras de estrés
OTROS			
Fascina	55.000		Filopodios, lamelipodios, fibras de estrés, microvellosidades, prolongaciones acrosómicas
Villina	92.000		Microvellosidades del borde en cepillo del intestino y del riñón

* Azul: dominios de unión a actina; rojo: dominios de unión al Ca^{2+} semejantes a calmodulina; violeta: repeticiones α-helicoidales; verde: repeticiones en hoja β-plegada; naranja: otros dominios.



▲ **Fig. 19-5. Las proteínas de enlace cruzado con actina aparean filamentos de actina.** (a) Cuando la fimbrina (rojo), una proteína corta, crea uniones cruzadas, los filamentos de actina se empaquetan unos junto a otros para formar un haz. (b) Las proteínas largas de unión cruzada como la filamina son flexibles y pueden crear una red de filamentos de actina mediante enlaces cruzados. [Parte (a) cortesía de D. Hanein. Parte (b) cortesía de J. Hartwig.]

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 19.1

Estructuras de actina

- La actina es la proteína intracelular más abundante de las células eucariontes, se encuentra altamente conservada y es un componente mayoritario del citoesqueleto.
- Las diversas isoformas de actina exhiben diferencias menores en la secuencia, pero suelen realizar distintas funciones.
- La actina F es un polímetro filamentoso helicoidal de subunidades de actina G globular orientadas en la misma dirección (véase fig. 19-3).
- Los filamentos de actina se encuentran polarizados con un extremo, el extremo (-), que tiene expuesto el sitio de unión al ATP.
- Los filamentos de actina se organizan en haces y retículos mediante diversas proteínas con enlaces cruzados bivalentes (véase fig. 19-5).
- Muchas proteínas de enlace cruzado pertenecen a la superfamilia de dominios CH (véase cuadro 19-1). Éstas incluyen la proteína formadora de haces fimbrina, la α-actinina y las proteínas largas formadoras de retículos espectrina, distrofina y filamina.

19.2 Dinámica del ensamblaje de actina

Como ya se mencionó, el citoesqueleto de actina no es una estructura estática e invariable compuesta de haces y retículos de filamentos. En realidad, los microfilamentos de una célula se acortan y alargan constantemente, y los haces y retículos de filamentos están continuamente en formación y disolución. Estos cambios en la organización de los filamentos de actina generan fuerzas que producen cambios de igual magnitud en la forma de una célula. En esta sección se analiza el mecanismo de polimerización y la regulación de este proceso, que es en gran parte responsable de la naturaleza dinámica del citoesqueleto.

La polimerización de actina in vitro se efectúa en tres pasos

La polimerización de actina G in vitro para formar filamentos de actina F puede monitorizarse por viscosimetría, sedimentación, espectroscopia de fluorescencia y microscopia de fluorescencia. Cuando los filamentos alcanzan una longitud suficiente para entremezclarse aumenta la viscosidad de la solución, que se mide como disminución de la velocidad de flujo en un viscosímetro. La prueba de sedimentación se basa en la capacidad de la ultracentrifugación (100.000 g durante 30 minutos) para obtener un sedimento de actina F, pero no de actina G. El tercer ensayo utiliza actina G unido por enlaces covalentes con un colorante fluorescente; el espectro fluorescente de actina G varía cuando se polimeriza a actina F. Por último, el crecimiento de un filamento marcado puede observarse con un microscopio de fluorescencia. Estos ensayos son útiles para los estudios cinéticos de polimerización de la actina y durante la purificación de proteínas fijadoras, que establecen enlaces cruzados o despolimerizan los filamentos de actina.

La polimerización in vitro de los filamentos de actina se efectúa en una secuencia de tres fases (fig. 19-6a). La primera *fase de nucleación* se caracteriza por un *período de latencia* en el que la actina G se agrega para formar oligómeros cortos inestables. Una vez que el oligómero alcanza cierta longitud (tres o cuatro subunidades), puede actuar como una semilla estable, o *núcleo*, que en la segunda fase, *fase de elongación*, se alarga con rapidez para formar un filamento por el agregado de monómeros de actina en ambos extremos. A medida que los filamentos de actina F crecen disminuye la concentración de monómeros de actina G, hasta alcanzar el equilibrio con los filamentos. En esta tercera fase, denominada estado estacionario, los monómeros de actina G se intercambian con las subunidades de los extremos del filamento, pero no hay un cambio neto de la masa total de filamentos. Las curvas cinéticas de la figura 19-6b muestran que se puede eliminar el período de latencia mediante el agregado de una cantidad pequeña de núcleos de actina F a la solución de actina G.

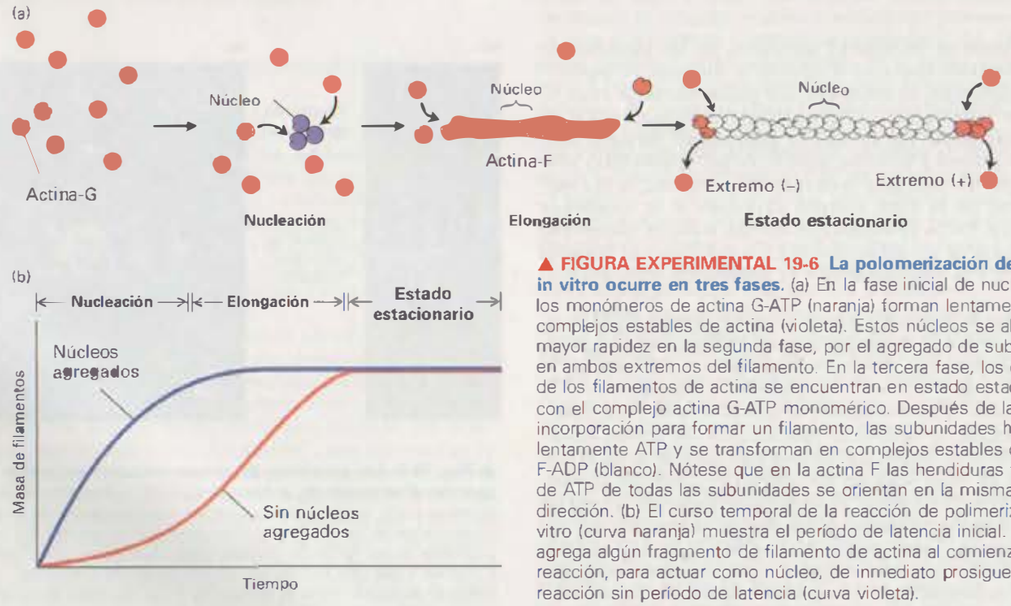
Una vez alcanzado el estado estacionario, la concentración de las subunidades no ensambladas se denomina *concentración crítica* C_c. Este parámetro es la constante de disociación, el cociente entre las constantes de ensamblaje y desensamblaje, y disociación, y mide la concentración de actina G donde la adición de subunidades se balancea con la disociación de subunidades; esto es, cuando los valores de ensamblaje y desensamblaje son iguales. En condiciones típicas in vitro, la C_c de actina G es 0,1 μM. Por encima de este valor, la solución de actina G se polimeriza; y por debajo de ese valor la solución de actina F se despolimeriza (fig. 19-7).

Una vez incorporados los monómeros de actina G-ATP en un filamento, el ATP fijado se hidroliza lentamente a ADP. Como resultado de esta hidrólisis, la mayor parte del filamento consta de actina F-ADP, pero en los extremos hay actina F-ATP (véase la subsección siguiente). Sin embargo, la hidrólisis de ATP no es esencial para que tenga lugar la polimerización, según las evidencias obtenidas se demuestra que la actina G unida a ADP o un análogo no hidrolizable de ATP se puede polimerizar en filamentos.

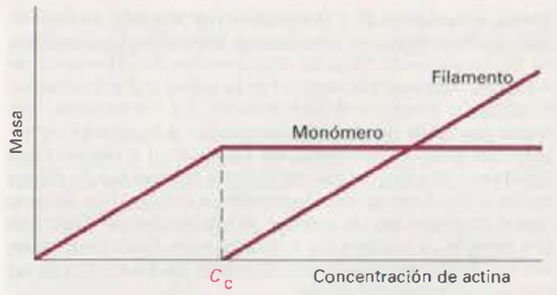
Los filamentos de actina crecen con mayor rapidez en el extremo (+) que en el extremo (-)

Ya se vio que los experimentos de decoración con miosina demuestran una polaridad estructural inherente de la actina F (véase fig. 19-4). Esta polaridad también se refleja en las distintas velocidades de agregado de monómeros en ambos extremos. Un extremo del filamento, el extremo (+), se alarga entre cinco y diez veces más rápidamente que el extremo opuesto, o (-). Se demuestran las velocidades de crecimiento desiguales mediante un experimento simple, que utiliza filamentos de actina decorados con miosina como núcleos de polimerización de actina G. Observados con el microscopio electrónico los filamentos elongados presentan secciones desnudas en ambos extremos, correspondientes a la actina G agregada, no decorada. La actina recién polimerizada (no decorada) es 5-10 veces más larga en el extremo (+) del filamento que en el (-) (fig. 19-8a).

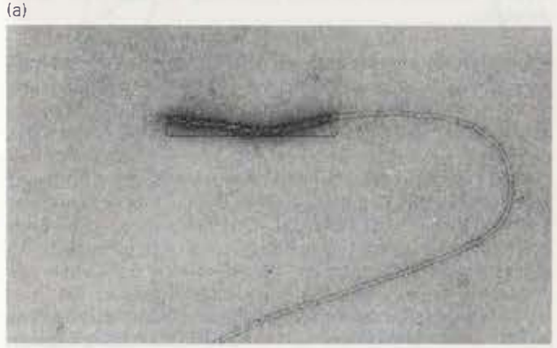
TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación focalizada: Polimerización de la actina



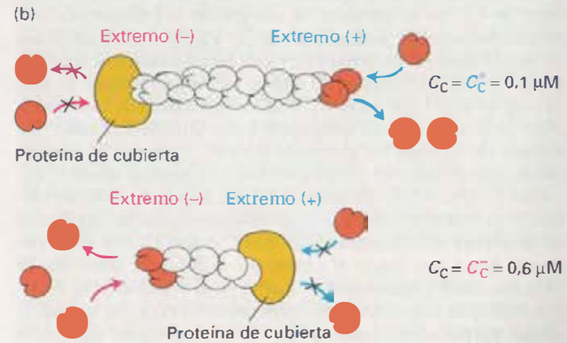
▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 19-6 La polomerización de actina G in vitro ocurre en tres fases.** (a) En la fase inicial de nucleación, los monómeros de actina G-ATP (naranja) forman lentamente los complejos estables de actina (violeta). Estos núcleos se alargan con mayor rapidez en la segunda fase, por el agregado de subunidades en ambos extremos del filamento. En la tercera fase, los extremos de los filamentos de actina se encuentran en estado estacionario con el complejo actina G-ATP monomérico. Después de la incorporación para formar un filamento, las subunidades hidrolizan lentamente ATP y se transforman en complejos estables de actina F-ADP (blanco). Nótese que en la actina F las hendiduras fijadoras de ATP de todas las subunidades se orientan en la misma dirección. (b) El curso temporal de la reacción de polimerización in vitro (curva naranja) muestra el período de latencia inicial. Si se agrega algún fragmento de filamento de actina al comienzo de la reacción, para actuar como núcleo, de inmediato prosigue la reacción sin período de latencia (curva violeta).



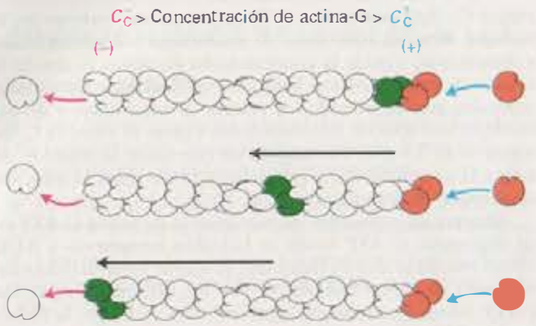
▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 19-7 La concentración de actina G determina la formación del filamento.** La concentración crítica (C_c) es la concentración de monómeros de actina G en equilibrio con filamentos de actina. Con concentraciones de monómero inferiores a la C_c, no se produce polimerización. Con concentraciones de monómero superiores a la C_c los filamentos se ensamblan hasta que la concentración de monómeros alcanza el valor C_c.



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 19-8 La "decoración" de miosina y las proteínas que bloquean los extremos de actina muestran velocidades de crecimiento diferencial en ambos extremos del filamento de actina.** (a) Cuando se usan filamentos cortos decorados con miosina como núcleos de polimerización de actina, los filamentos elongados obtenidos presentan un extremo (+) sin decoración mucho más largo que el extremo (-). Este resultado indica que los monómeros de



ATP-actina G se agregan con velocidad mucho mayor en el extremo (+) que en el extremo (-). (b) El bloqueo de los extremos (+) o (-) de un filamento con proteínas que recubren la actina sólo permite el crecimiento en el extremo opuesto. En los ensayos de polimerización con filamentos recubiertos, la concentración crítica C_c es determinada por el extremo en crecimiento no bloqueado. Estos ensayos demuestran que la C_c en el extremo (+) es mucho menor que la C_c en el extremo (-). [Parte (a) cortesía de T. Pollard.]



▲ **Fig. 19-9. Mecanismo de cinta rodante de los filamentos de actina.** Con concentraciones intermedias de actina G, entre los valores de C_c para los extremos (-) y (+), las subunidades de actina pueden fluir a través de los filamentos debido a la fijación preferente en el extremo (+) y la disociación preferente desde el extremo (-) del filamento. Este fenómeno de "cinta rodante" ocurre en algunas células motoras. Las subunidades más antiguas de un filamento en ese proceso se encuentran en el extremo (-).

La diferencia entre las velocidades de elongación en los extremos opuestos de un filamento de actina es causada por la diferencia de los valores de C_c en ambos extremos. Esta diferencia se puede medir mediante el bloqueo de uno u otro extremo con proteínas que cubren los extremos de los filamentos de actina con un "casquete". Si se bloquea el extremo (+) de un filamento de actina, sólo se puede elongar por el extremo (-); por otra parte, cuando se bloquea el extremo (-) de un filamento, sólo crece el extremo (+) (fig. 19-8b). Los ensayos de polimerización de estos filamentos con casquete demostraron que la C_c es seis veces menor para el agregado de actina G en el extremo (+) que para el extremo (-).

Como consecuencia de la diferencia de los valores de C_c para los extremos (+) y (-) de un filamento, es posible predecir lo siguiente: con concentraciones de actina G-ATP por debajo de C_c^+ no se produce la elongación del filamento; con concentraciones de actina G entre C_c^+ y C_c^-, la elongación sólo ocurre desde el extremo (+); y con concentraciones superiores a C_c^- hay crecimiento en ambos extremos, aunque es más rápido en el (+) que en el (-). Una vez alcanzada la fase de estado estacionario, con concentraciones intermedias entre los valores de C_c para los extremos (+) y (-), continúa el agregado de subunidades en el extremo (+), con pérdida desde el extremo (-) (fig. 19-9). En esta situación, la longitud de un filamento permanece constante y las subunidades recién agregadas se desplazan a lo largo del filamento, como en una cinta rodante, hasta que llegan al extremo (-), donde se disocian. El recambio de los filamentos de actina en el borde directo de algunas células migratorias probablemente ocurra por un mecanismo similar a una cinta rodante con subunidades agregadas cerca del borde director de la célula y eliminadas desde el otro extremo cercano a la parte posterior de ella.

Toxinas que alteran el equilibrio entre los monómeros de actina

Varias toxinas cambian el equilibrio habitual entre los monómeros y los filamentos de actina. Dos toxinas no relacionadas, citocalasina D y latrunculina, promueven la disociación de filamentos por mecanismos diferentes. La citocalasina D, un alcaloide fúngico, despolimeriza los filamentos de actina por unión al extremo (+) de la actina F, donde bloquea el agregado posterior de subunidades. La latrunculina, una toxina secretada por las esponjas, se fija a la actina G e impide que se una al extremo del filamento. La exposición a cualquiera de estas toxinas incrementa la cantidad de monómeros. Cuando se agrega citocalasina a células vivas desaparece el citoesqueleto de actina y se inhiben los movimientos; por ejemplo, la locomoción y la citocinesis. Estas observaciones son de las primeras que relacionaron los filamentos de actina con la movilidad celular.

Por el contrario, el equilibrio monómeros-polímeros aumenta en la dirección de los filamentos por la jasplacolinoda, otra toxina secretada por las esponjas, y por la faloidina, que se aísla de *Amanita phalloides* (el hongo llamado "ángel de la muerte"). La faloidina envenena a la célula uniéndose a la interfaz entre las subunidades de actina F, donde bloquea subunidades adyacentes entre sí y previene la despolarización de los filamentos de actina. Incluso cuando la actina está diluida en niveles inferiores a su concentración crítica, los filamentos estabilizados por faloidina no se despolimerizan. Es frecuente teñir los filamentos de actina con faloidina marcada con fluorescencia para observarlos con el microscopio óptico.

La polimerización de actina está regulada por proteínas que se unen a la actina G

En el mundo artificial de un tubo de ensayo, los investigadores pueden iniciar el proceso de la polimerización mediante el agregado de sales a la actina G o despolimerizar la actina F con la simple dilución de los filamentos. Sin embargo, las células deben mantener la concentración iónica del citosol casi constante, por eso emplean un mecanismo diferente para controlar la polimerización de actina. En el mecanismo regulador celular intervienen varias proteínas fijadoras de actina que favorecen o inhiben su polimerización. Aquí se analizan dos de estas proteínas, ya aisladas y caracterizadas.

Inhibición de ensamblaje de actina por acción de timosina β_4. Los cálculos realizados sobre la base de la C_c de actina G (0,1 μM), la concentración total de actina citosólica típica (0,5 mM) y las condiciones iónicas de la célula, indican que casi la totalidad de la actina celular debería existir como filamentos, con muy escasa actina G. Sin embargo, las mediciones reales demuestran que hasta el 40% de la actina de las células animales está despolimerizada. ¿Qué mantiene la concentración celular de actina G por encima de su C_c? La explicación más aceptable es que proteínas del citosol secuestran actina y la mantienen en una forma en que no se puede polimerizar.

Debido a la abundancia en el citosol y a la capacidad para fijar actina G-ATP (pero no actina F), se considera que la *timosina β4* es la principal proteína secuestradora de actina de la célula. La timosina es una molécula pequeña (PM 5.000) que se une a actina G-ATP en un complejo 1:1. La unión de timosina β_4 bloquea el sitio de unión al ATP de la actina G y previene así la polimerización. En las plaquetas, la concentración de timosina β_4 es de 0,55 mM, alrededor del doble de la concentración de actina no polimerizada (0,22 mM). Con estas concentraciones, casi el 70% de la actina monomérica de una plaqueta debería estar secuestrada por la timosina β_4.

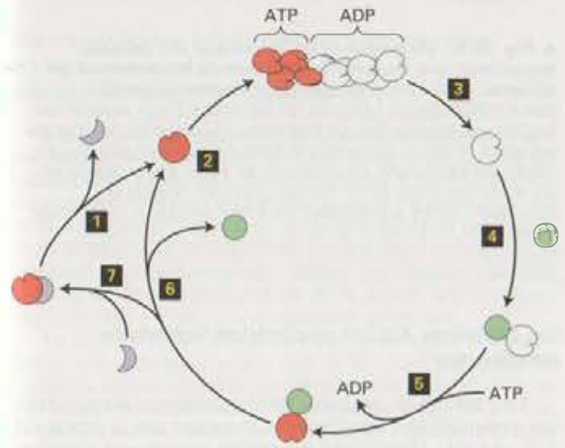
La timosina β_4 (Tβ4) actúa como un amortiguador para la actina monomérica según se representa en la siguiente reacción:

$$\text{Actina F} \rightleftharpoons \text{Actina G} + \text{T}\beta_4 \rightleftharpoons \text{Actina G/T}\beta_4$$

En un equilibrio simple, un incremento de la concentración citosólica de timosina β_4 implicaría un aumento de la concentración de subunidades de actina secuestradas y el consecuente descenso de actina F, dado que los filamentos de actina están en equilibrio con los monómeros de actina. Este efecto de la timosina β_4 sobre el nivel de actina F celular se ha demostrado experimentalmente en células vivas.

Estimulación del ensamblaje de actina por profilina. Otra proteína citosólica, la *profilina* (PM 15.000), también se fija a los monómeros de ATP-actina en un complejo 1:1 estable. Como máximo, la profilina puede amortiguar 20% de la actina no polimerizada de las células, un nivel demasiado bajo para que actúe como una proteína secuestradora eficaz. Es probable que, en lugar de secuestrar monómeros de actina, la principal función de la profilina sea estimular el ensamblaje de los filamentos de actina en las células. Esto parece llevarse a cabo mediante diversos mecanismos.

Primero, la profilina promueve el ensamblaje de filamentos de actina actuando como un intercambiador de nucleótidos. La profilina es la única proteína fijadora de actina que permite el intercambio de ATP por ADP. Cuando la actina G forma complejos con otras proteínas, el ATP o ADP es atrapado en la hendidura de fijación de ATP de la actina. Sin embargo, dado que la profilina se fija a la actina G en un sitio opuesto a la hendidura fijadora de ATP, puede volver a cargar monómeros de actina-ADP liberados por el filamento, por lo que repone el *pool* de ATP-actina (véase fig. 19-10).



▲ **Fig. 19-10. Modelo del papel complementario de la profilina y la timosina β_4 en la regulación de la polimerización de actina G.** Las subunidades de actina G (naranja) complejadas con timosina β_4 (violeta) se disocian (1) y se unen al extremo de un filamento (2). En el filamento, el ATP es hidrolizado a ADP, el ADP asociado con cada subunidad se disocia desde el extremo opuesto del filamento (3), la actina G-ADP forma un complejo con la profilina (verde) (4) y el ATP se intercambia por ADP para formar actina G-ATP (5). La profilina lleva los monómeros de actina al extremo (+) del filamento de actina (6) o la timosina β_4 secuestra la actina G-ATP en un *pool* de subunidades listas para la polimerización (7).

Segundo, se propuso que la profilina forma un complejo con la actina G que contribuye al agregado de monómeros en el extremo (+) de un filamento de actina. Esta hipótesis concuerda con la estructura tridimensional del complejo de profilina-actina, en el cual la profilina se une al monómero de actina por la parte opuesta al extremo fijador de ATP, dejándolo así libre para asociarse con el extremo (+) de un filamento (fig. 19-3). Una vez que el complejo se fija en forma transitoria al filamento, la profilina se disocia de la actina.

Por último, la profilina también interactúa con los componentes de la membrana que intervienen en las señales intercelulares, lo cual sugiere que puede tener particular importancia en el control del ensamblaje de actina en la membrana plasmática. Por ejemplo, la profilina se fija al fosfolípido de la membrana fosfoinositol 4,5-bifosfato (PIP_2); esta interacción impide la fijación de la profilina a la actina G. (Como se vio en el cap. 13, PIP_2 es hidrolizado en respuesta a las señales extracelulares.) Además, la profilina se une a secuencias ricas en prolina que se suelen encontrar en proteínas señal asociadas con la membrana; por ejemplo, Vasp y Mena. Esta interacción, que no inhibe la fijación de profilina a la actina G, ubica los complejos de profilina y actina en la membrana.

Las proteínas seccionadoras se unen a los filamentos y crean nuevos extremos de actina

Un segundo grupo de proteínas, que se fijan a los filamentos de actina, controlan su longitud mediante cortes, con lo que se forman fragmentos más cortos y producen nuevos extremos filamentosos para su polimerización (cuadro 19-2). Una valiosa clave para el descubrimiento de estas proteínas seccionadoras proviene de estudios en amebas. Las determinaciones de viscosidad y las observaciones mediante el microscopio óptico demostraron que, durante el desplazamiento ameboide, el citosol fluye hacia el centro de la célula y luego se transforma en gel, cuando llega hasta la parte anterior de la célula. Como se verá más adelante, esta transformación "sol a gel" depende del ensamblaje de nuevos filamentos de actina en la parte anterior de una ameba en movimiento y de la separación de los filamentos de actina más viejos en la parte posterior. Dado que la concentración de actina en la célula favorece la formación de los filamentos, la degradación de éstos y de los retículos existentes requiere la contribución de proteínas seccionadoras; por ejemplo, *gelsolina* y *cofilina*.

Se cree que las proteínas seccionadoras rompen los filamentos de actina estabilizando un cambio de conformación en la subunidad a la que se unen; por lo que producen tensiones sobre ella y luego rompen los enlaces de la subunidad. Esta hipótesis es avalada por microfotografías electrónicas que muestran que el filamento de actina unido a cofilina está muy retorcido. Cuando una proteína seccionadora rompe un filamento en un sitio permanece unida al extremo (+) de uno de los fragmentos obtenidos, lo que impide el agregado o el intercambio de subunidades de actina, en una actividad denominada recubrimiento *(capping)*. Los extremos (-) de los fragmentos permanecen sin recubrimiento y se acortan con

CUADRO 19-2 Algunas proteínas citosólicas que controlan la polimerización

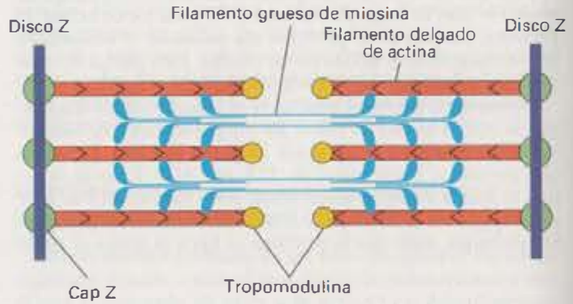
Proteína	PM	Actividad
Cofilina	15.000	Disociación a partir del extremo (-)
Severina	40.000	Corte, cubierta [extremo (+)]
Gelsolina	87.000	Corte, cubierta [extremo (+)]
Proteína de cubierta CapZ	36.000 (α) 32.000 (β)	Cubierta [extremo (+)]
Tropomodulina	40.000	Cubierta [extremo (-)]
Complejo Arp2/3	200.000	Cubierta [extremo (-)], unión oblicua y nucleación

rapidez. En consecuencia, el corte favorece el recambio de los filamentos de actina a través de la creación de nuevos extremos (-) y produce la desintegración de un retículo de actina, si bien muchos filamentos permanecen unidos mediante enlaces cruzados. El recambio de filamentos de actina estimulado por las proteínas seccionadoras es necesario no sólo para la locomoción de la célula sino también para la citocinesis.

Las proteínas de recubrimiento y las seccionadoras son reguladas por varias vías de señales. Por ejemplo, la cofilina y la gelsolina fijan PIP_2 de manera que se inhibe su fijación a los filamentos de actina y, en consecuencia, su actividad seccionadora. La hidrólisis de PIP_2 libera estas proteínas e induce el corte rápido de los filamentos. La fosforilación y la desfosforilación reversibles de cofilina también regulan su actividad, y la función seccionadora de la gelsolina es estimulada por un incremento del Ca^{2+} citosólico hasta unos 10^{-6} M. La influencia contraria de distintas moléculas señal, Ca^{2+} y PIP_2, permite la regulación recíproca de estas proteínas. En la sección 19-4 se analiza cómo las señales extracelulares coordinan las actividades de distintas proteínas fijadoras de actina, entre ellas las proteínas seccionadoras, durante la migración celular.

Las proteínas que recubren la actina estabilizan la actina F

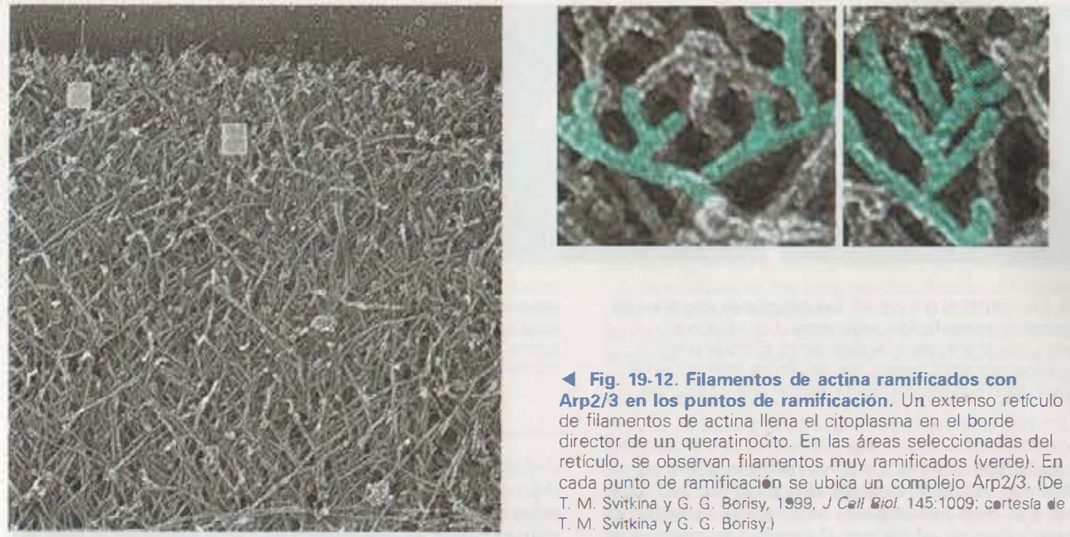
Otro grupo de proteínas pueden recubrir los extremos de los filamentos de actina pero, a diferencia de las proteínas seccionadoras, son incapaces de romper los filamentos para crear nuevos extremos. Una de estas proteínas, *CapZ*, se fija a los extremos (+) de los filamentos independientemente del Ca^{2+} e impide el agregado o la pérdida de subunidades de actina desde el extremo (+). El recubrimiento por esta proteína es inhibido por PIP_2, lo que sugiere que su actividad es regulada por las mismas vías de señales que controlan la cofilina y la profilina. La *tropomodulina*, no relacionada en secuencia con CapZ, cubre los extremos (-) de los filamentos de actina. Su capacidad de recubrimiento es estimulada por la presencia de tropomiosina, lo cual sugiere que las dos proteínas actúan como un complejo para estabilizar un filamento. Un filamento de actina recubierto en ambos extremos es efectivamente estable, por lo que no presenta agregado ni pérdida de subunidades. Estos filamentos de actina recubiertos son necesarios en sitios donde la organización del citoesqueleto es invariable; por ejemplo, el sarcómero del músculo (fig. 19-11) o la membrana del eritrocito.



▲ Fig. 19-11. Diagrama de un sarcómero del músculo esquelético que muestra la ubicación de las proteínas de cubierta. CapZ (verde) recubre los extremos (+) de los filamentos delgados, ubicados en los discos Z que separan los sarcómeros adyacentes. La tropomodulina (amarillo) recubre los extremos (-) de los filamentos delgados y se ubica próxima al centro del sarcómero. La presencia de estas dos proteínas en extremos opuestos de un filamento delgado impide la disociación de las subunidades de actina durante la contracción muscular.

Las proteínas Arp2/3 ensamblan filamentos ramificados

Una familia de *proteínas relacionadas con actina* (Arp), que presentan una semejanza de secuencia con la actina del 50%, ha sido identificada en muchos organismos eucariontes. Un grupo de Arp, un complejo de siete proteínas llamado Arp2/3, estimula in vivo el ensamblaje de actina. (Otro grupo de Arp asociado con microtúbulos y proteínas motoras de microtúbulos se analizará en el próximo capítulo.) El complejo Arp2/3 fue aislado de extractos celulares sobre la base de su capacidad para unir profilina; el complejo Arp2/3, se une a 70° de un lado del filamento de actina para nuclear un filamento hijo. La combinación de los filamentos madre e hijo crea un retículo ramificado en el cual Arp2/3 se ubica en el punto de ramificación (fig. 19-12). Como resultado, los nuevos extremos de filamentos se elongan y proveen la fuerza para empujar la membrana hacia adelante.



◀ Fig. 19-12. Filamentos de actina ramificados con Arp2/3 en los puntos de ramificación. Un extenso retículo de filamentos de actina llena el citoplasma en el borde director de un queratinocito. En las áreas seleccionadas del retículo, se observan filamentos muy ramificados (verde). En cada punto de ramificación se ubica un complejo Arp2/3. (De T. M. Svitkina y G. G. Borisy, 1999, *J Cell Biol.* 145:1009; cortesía de T. M. Svitkina y G. G. Borisy.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Observación directa de los filamentos de actina ramificados mediante complejos Arp2/3

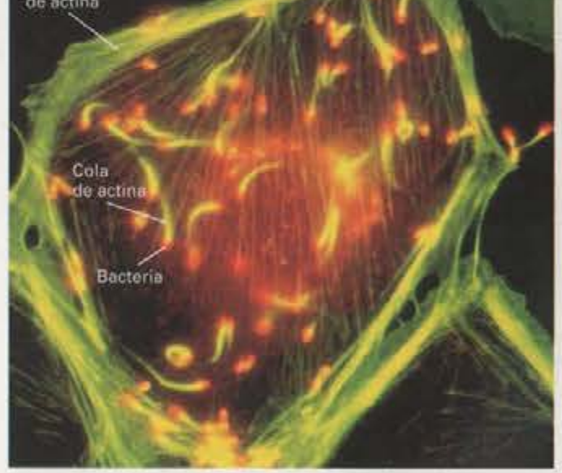
La ramificación está estimulada por la familia de proteínas WASp bajo el control de GTPasas Rho. Las proteínas de enlace cruzado de actina estabilizan el retículo ramificado, mientras que las proteínas seccionadoras, como la cofilina, desensamblan las estructuras ramificadas.

Los movimientos intracelulares y los cambios en la forma celular son dirigidos por la polimerización de la actina

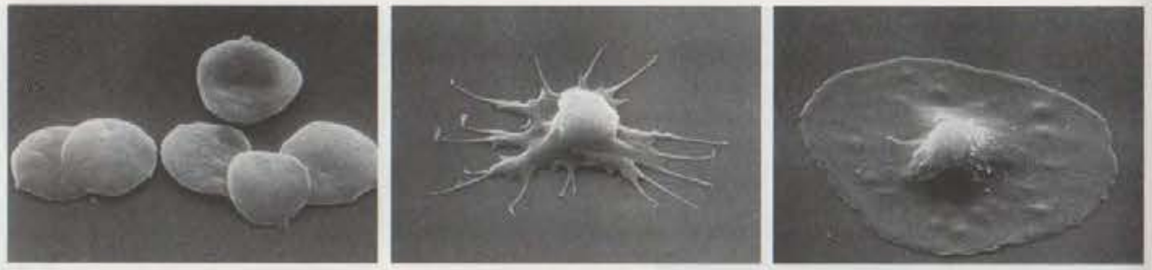
Mediante la manipulación de la polimerización y la despolimerización de la actina la célula puede crear fuerzas generadoras de varios tipos de movimientos. Como ya se mostró y se verá en mayor detalle más adelante, la polimerización de la actina en el borde director de una célula en movimiento es crítica para la migración celular. Aquí consideramos otros ejemplos de movimiento celular que resultan mas probablemente de la polimerización de la actina: uno involucra una infección y el otro, la coagulación sanguínea.

La mayoría de las infecciones son diseminadas por bacterias y virus, liberados tras la lisis de la célula infectada. Sin embargo, algunos de estos microorganismos escapan de la célula sobre un extremo de un filamento de actina en proceso de polimerización. Entre los ejemplos se encuentra *Listeria monocytogenes*, una bacteria que puede ser transmitida por la mujer embarazada al feto, y vaccinia, un virus relacionado con el de la viruela. Cuando estos microorganismos infectan las células de mamíferos se desplazan a través del citosol a velocidades cercanas a 11 μm/min. Los experimentos con microscopio de fluorescencia demostraron que un reticulado de filamentos cortos de actina sigue a una bacteria o a un virus en movimiento como la aureola de los gases de escape de un cohete (fig. 19-13). Estas observaciones sugirieron que la actina genera la fuerza necesaria para el movimiento.

Los primeros indicios sobre la forma en que la actina media el movimiento bacteriano provienen de un experimento con microinyección de actina G con marca fluorescente en cé-



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 19-13 El microscopio de fluorescencia muestra que la actina está implicada en el movimiento de *Listeria* en fibroblastos infectados. Las bacterias (rojo anaranjado) se tiñen mediante un anticuerpo específico para la proteína de membrana bacteriana que fija la profilina celular y es esencial para la infectividad y la movilidad. Detrás de cada bacteria se encuentra una "cola" de actina (verde) teñida con faloidina fluorescente. Numerosas células bacterianas se desplazan en forma independiente dentro del citosol de una célula de mamífero infectada. La infección se transmite a otras células cuando una espícula de membrana celular, generada por una bacteria, sobresale hacia el interior de una célula vecina y es incorporada por fagocitosis. (Cortesía de J. Theriot y T. Mitchison.)

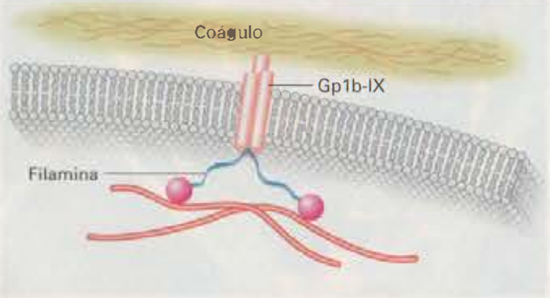


▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 19-14 Las plaquetas cambian de forma durante la coagulación sanguínea.** Las células en reposo tienen una forma discoide (*izquierda*). Cuando son expuestas a agentes coagulantes, las células se asientan en el sustrato, extienden numerosos filopodios (*centro*) y luego se expanden (*derecha*). Los cambios en la morfología son el resultado de reordenamientos complejos en el citoesqueleto de actina, el cual se encuentra unido a la membrana plasmática mediante enlaces cruzados. (Cortesía de J. White.)

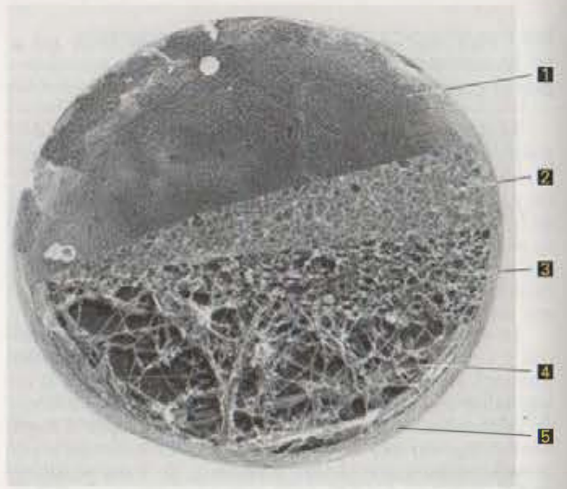
lulas infectadas con *Listeria*. En el microscopio se detectaban los monómeros marcados incorporados en el retículo semejante a una cola en el extremo más cercano a la bacteria, con pérdida simultánea de actina por el extremo posterior. Este resultado demostró que la actina se polimeriza formando filamentos en la base de la bacteria y sugirió que, a medida que se ensambla el reticulado similar a una cola, empuja la bacteria hacia adelante. Estudios con bacterias mutantes señalan que la interacción entre la Arp2/3 celular con la membrana bacteriana estimula la polimerización de actina en el extremo de la cola más cercano a la bacteria. Estudios recientes han detectado colas de cohetes que arrastran vesículas citoplasmáticas comunes como los endosomas. Estas observaciones indican que la polimerización de actina puede ser la base del movimiento de los endosomas en el citoplasma.

Durante la coagulación sanguínea, se producen complicados reordenamientos del citoesqueleto en las plaquetas activadas, las cuales cambian espectacularmente la forma celular y promueven la formación del coágulo (fig. 19-14). El citoesqueleto de una plaqueta no activada consiste en un círculo de microtúbulos (*la banda marginal*), un esqueleto de membrana y un retículo citosólico de actina. El esqueleto de membrana en las plaquetas es similar al esqueleto cortical en los eritrocitos (véase fig. 5-31). Una diferencia crítica entre los citoesqueletos de las plaquetas y los eritrocitos es la presencia de un segundo retículo de actina en las plaquetas, el cual está organizado en un gel tridimensional por uniones cruzadas de filamina (fig. 19-15). El gel llena el citosol de una plaqueta y está anclado por filamina a un complejo de glucoproteínas (Gp1b-IX) de la membrana de la plaqueta. Gp1b-IX no sólo se une a la filamina; también es el receptor de membrana para dos proteínas implicadas en la coagulación. A través de Gp1b-IX y los receptores de integrinas, las fuerzas generadas durante el reordenamiento del citoesqueleto de actina en las plaquetas puede transmitirse al coágulo en desarrollo. Varios ejemplos de conexiones similares entre el citoesqueleto y los componentes de la matriz extracelular se describieron en el capítulo 6.

(a)



(b)



▲ **Fig. 19-15. Enlaces cruzados entre los retículos de filamentos de actina y la membrana plasmática de las plaquetas.** (a) En las plaquetas, un retículo tridimensional de filamentos de actina se adosa al complejo glucoproteico integral de membrana Gp1b-IX a través de filamina. Además, Gp1b-IX se fija a las proteínas del coágulo sanguíneo en el exterior de la plaqueta. Las plaquetas también poseen un retículo cortical bidimensional de actina y espectrina, similar al subyacente a la membrana eritrocitaria (véase fig. 5-31). (b) Esta fotografía compuesta por el citoesqueleto de actina de una plaqueta en reposo muestra diferentes ordenamientos de microfilamentos. Debajo de la membrana plasmática (**1**) yace un retículo bidimensional de filamentos (**2**) unidos por enlaces cruzados de espectrina. La filamina organiza los filamentos en un gel tridimensional (**3**) y forma la corteza de la célula. Un enrejado de haces de filamentos (**4**) forma adhesiones con el sustrato subyacente. La forma discoide de la célula se mantiene por un anillo de microtúbulos (**5**) en la periferia celular. [Parte (b) cortesía de John Hartwig.]

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 19.2

Dinámica del ensamblaje de actina

- Dentro de las células, el citoesqueleto de actina es dinámico, con filamentos capaces de aumentar y disminuir de tamaño con rapidez.
- La polimerización de actina G in vitro muestra un período de latencia, durante el cual tiene lugar la nucleación. Por último, la reacción de polimerización alcanza un estado estacionario en el que se igualan las velocidades de agregado y pérdida de subunidades (véase fig. 19-10).
- La concentración de monómeros de actina en equilibrio con los filamentos de actina es la concentración crítica (C_c). Con concentraciones de actina G superiores a C_c hay un crecimiento neto de los filamentos; con concentraciones inferiores a C_c hay una despolimerización neta de los filamentos.
- Los filamentos de actina crecen a una velocidad bastante mayor en el extremo (+) que en el extremo (-), y la C_c para el agregado de monómeros en el extremo (+) es inferior a la del agregado en el extremo (-).
- El ensamblaje, la longitud y la estabilidad de los filamentos de actina son controlados por proteínas fijadoras de actina especializadas. A su vez, estas proteínas son reguladas por diversos mecanismos.
- Las acciones complementarias de timosina β_4 y profilina son esenciales en la regulación del citoesqueleto de actina cercano a la membrana celular (véase fig. 19-10).
- La polimerización regulada de actina puede generar fuerzas capaces de mover determinadas bacterias y virus o cambiar la forma celular.

19.3 Movimientos celulares impulsados por miosina

Se examinará la función de diferentes proteínas motoras de la familia de las miosinas en células no musculares y musculares. Como se explicó en el capítulo 3, las interacciones entre la miosina II y los filamentos de actina son responsables de la contracción muscular. En un principio, los científicos pensaron que la mayoría de los movimientos celulares eran causados por un mecanismo contráctil similar al deslizamiento de la actina y los filamentos de miosina en las células musculares. Esta idea se basaba en varias propiedades de, al menos, un grupo de células no musculares: la capacidad de los extractos citosólicos para realizar movimientos similares a la contracción, la presencia de actina y miosina II, y la existencia de estructuras similares a los sarcómeros musculares. Sin embargo, estudios bioquímicos posteriores permitieron la extracción de formas "atípicas" de miosina que se diferenciaban de la miosina II en estructura, ubicación y propiedades enzimáticas.

A medida que los biólogos estudiaban diferentes tipos de movimientos celulares resultó claro que la miosina II interviene en sólo algunos de ellos, como la citocinesis y la contracción muscular. Otros tipos de movimientos, incluidos el transporte de vesículas, las extensiones de membrana y el movimiento de los cromosomas, requieren otras isoformas de miosina y otras proteínas motoras, como cinesina o dineína, o la polimerización de actina. En esta sección consideramos primero las propiedades de varias miosinas y algunas de sus funciones en células no musculares. La *contracción*, la forma especial de movimiento resultante de la interacción entre actina y miosina II, está más evolucionada en las células musculares esqueléticas. No obstante, algunos episodios de contracción que involucran sistemas menos organizados pueden encontrarse en células no musculares. Después de revisar la estructura altamente ordenada de la actina y los filamentos de miosina en el sarcómero de los músculos esqueléticos se describirá el mecanismo primario para la regulación de la contracción.

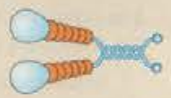
Las miosinas son una gran superfamilia de proteínas motoras mecanoquímicas

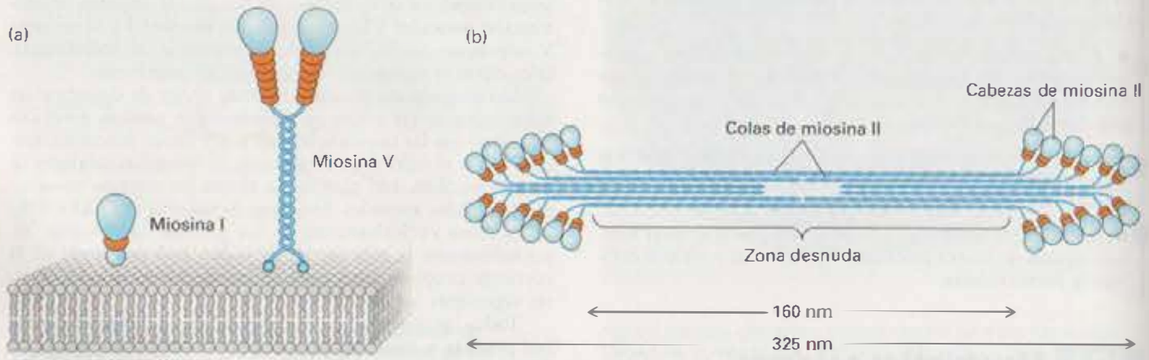
Se han identificado ocho miembros de la familia de genes de miosina mediante análisis genómico (cap. 9). Tres miembros de la familia –miosina I, miosina II y miosina V– están presentes en casi todas las células eucariontes y son los mejor entendidos. A pesar de que las actividades especiales de estas miosinas difieren, todas funcionan como proteínas motoras. Como ya se mencionó, la miosina II impulsa la contracción muscular y la citocinesis. La miosina I y la miosina V intervienen en las interacciones citoesqueleto-membranas, tales como el transporte de vesículas de membrana.

Los investigadores están tratando ahora de descubrir las actividades de las miosinas restantes. Los análisis genéticos revelaron que las miosinas VI, VII y XV tienen funciones asociadas con el oído y las estructuras de los pelos celulares de las estereocilias. Las plantas no tienen las mismas miosinas que las células animales. Tres tipos de miosina (VII, XI y XIII) se expresan exclusivamente en las plantas. La miosina XI, probablemente la más rápida de todas, está implicada en la corriente citoplasmática vista en las algas verdes y las plantas superiores (cuadro 19-3).

Todas las miosinas están compuestas de una o dos cadenas pesadas y varias cadenas livianas, que suelen tener una función reguladora. Todas las cadenas pesadas de miosina presentan una organización característica de dominios cabeza, cuello y cola. La miosina II y la miosina V son dímeros en los cuales las secuencias hélice-α de la cola de cada cadena pesada se asocian para formar una estructura de espiral enrollada con forma de bastón. En cambio, algunas miosinas, incluida la miosina I, son monómeros porque sus cadenas

CUADRO 19-3 Miosinas

Tipo	Cadena pesada (PM)	Estructura	Tamaño de paso (nm)	Actividad
I	110.000-150.000		10-14	Fijación a membranas, vesículas endocíticas
II	220.000		5-10	Deslizamiento de filamento
V	170.000-220.000		36	Transporte de vesículas
VI	140.000		30	Endocitosis
XI	170.000-260.000		35	Corriente citoplasmática



▲ **Fig. 19-16. Funciones del dominio cola de miosina.** (a) Las miosinas I y V se ubican en las membranas celulares a través de sitios no determinados de los dominios cola. En consecuencia, estas miosinas se asocian con vesículas de membrana intracelulares o con la cara citoplasmática de la membrana plasmática. (b) En contraste, los dominios cola en espiral de las moléculas de miosina II se empaquetan lado a lado para formar un filamento grueso a partir del cual se proyectan las cabezas. En un músculo esquelético, el filamento grueso es bipolar. Las cabezas se encuentran en los extremos del filamento grueso y están separadas por una zona desnuda, compuesta por las colas unidas lateralmente.

pesadas carecen de estas secuencias hélice-α. Todos los *dominios cabeza* de miosina tienen actividad ATPasa y en conjunto con los *dominios cuello* acoplan la hidrólisis de ATP al movimiento de las moléculas de miosina a lo largo del filamento de actina mediante un mecanismo común que involucra la unión y la hidrólisis cíclica de ATP junto con la adhesión/desadhesión de miosina y actina (veánse figs. 3-24 y 3-25).

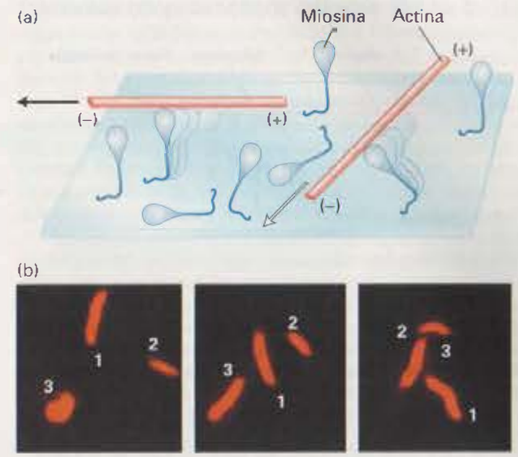
El papel de una miosina en particular in vivo se relaciona con el dominio cola. Por ejemplo, los dominios cola de las miosinas I, V, VI y XI se unen a la membrana plasmática o a las membranas intracelulares de los orgánulos; como resultado, esas moléculas tienen funciones vinculadas con la membrana (fig. 19-16a). En cambio, los dominios cola de espiral enrollada de los dímeros de miosina II se asocian para formar filamentos gruesos en los que las cabezas se encuentran en ambos extremos del filamento y separadas por una zona central desnuda desprovista de cabeza (fig. 19-16b). El empaquetamiento cerrado de las moléculas de miosina en filamentos gruesos, que son una parte crítica del aparato contráctil del músculo esquelético, permite la interacción simultánea de muchos dominios cabeza de miosina con los filamentos de actina.

El número y el tipo de cadenas livianas unidas a la región del cuello varían entre las miosinas (véase cuadro 19-3). Las cadenas livianas de la miosina I y la miosina V son **calmodulina,** una subunidad reguladora fijadora de Ca^{2+} de muchas enzimas intracelulares (véase fig. 3-28). La miosina II contiene dos cadenas livianas diferentes denominadas cadenas livianas esencial y reguladora (véase fig. 3-24); ambas son proteínas fijadotas de Ca^{2+}, pero difieren de la calmodulina en sus propiedades fijadoras de Ca^{2+}. Todas las miosinas están de algún modo reguladas por el Ca^{2+}; sin embargo, debido a las diferencias en las cadenas livianas, las distintas miosinas exhiben diversas respuestas en la célula frente a las señales de Ca^{2+}.

Las cabezas de miosina caminan sobre los filamentos de actina con pasos discretos

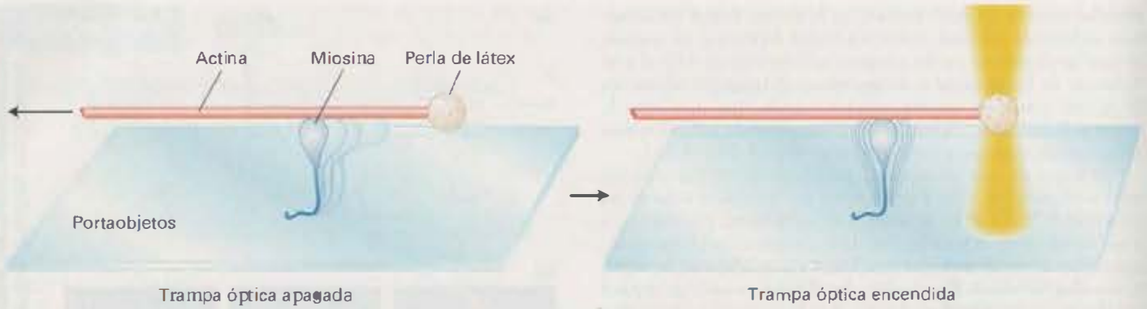
El desarrollo de pruebas de movilidad in vitro fue de gran ayuda para descifrar el mecanismo de los movimientos impulsados por miosina. En una de estas pruebas, la *prueba del filamento deslizante,* se observó mediante un microscopio de fluorescencia el desplazamiento de filamentos de actina con marca fluorescente a lo largo de un lecho de moléculas de miosina. Dado que las moléculas de miosina se pegan sobre un cubreobjetos, están inmóviles; en consecuencia, cualquier fuerza generada por la interacción entre las cabezas de miosina y los filamentos de actina obliga a los filamentos a desplazarse a lo largo de la miosina (fig. 19-17a). En presencia de ATP se observa que los filamentos de actina se deslizan a lo largo de la superficie del cubreobjetos; en ausencia de ATP no se observa movimiento alguno. Este movimiento es producido por la cabeza de miosina (unida al cubreobjetos) que "marcha" hacia el extremo (+) del filamento; entonces el filamento se mueve con el extremo (-) hacia adelante. [Una excepción es la miosina VI, que se mueve en dirección opuesta, hacia el extremo (-); entonces el extremo (+) de un filamento en movimiento se encuentra hacia adelante.] La velocidad a la cual la miosina mueve un filamento de actina puede determinarse con registros en video de las pruebas de deslizamiento de filamentos (fig. 19-17b). Estas velocidades pueden variar mucho, según la miosina estudiada y las condiciones de la prueba (p. ej., fuerza iónica, concentraciones de ATP y Ca^{2+}, temperatura).

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación técnica: Ensayo de motilidad in vitro



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 19-17 El ensayo de deslizamiento del filamento se utiliza para detectar los movimientos impulsados por miosina.** (a) Una vez que las moléculas de miosina se adsorben sobre la superficie de un cubreobjetos de vidrio se elimina el exceso de miosina; luego el cubreobjetos se coloca con la cara que tiene adosada la miosina hacia abajo, sobre un portaobjetos de vidrio, para formar una cámara a través de la cual puede fluir la solución. Se permite que fluya al interior de la cámara una solución de filamentos de actina, visibles por tinción con faloidina marcada con rodamina. (El cubreobjetos del diagrama se muestra invertido respecto de la orientación en la cámara de flujo para facilitar la observación de las posiciones de las moléculas.) En presencia de ATP, las cabezas de miosina caminan hacia los extremos (+) de los filamentos utilizando el mecanismo ilustrado en la figura 3-25. Como las colas de miosina se encuentran inmovilizadas, los pasos de las cabezas causan el deslizamiento de los filamentos. El movimiento de los filamentos individuales puede observarse con un microscopio de luz fluorescente. (b) Estas fotografías muestran las posiciones de tres filamentos de actina (numerados 1, 2 y 3) con intervalos de 30 segundos registrados por video microscopia. La velocidad de movimiento de los filamentos puede determinarse a partir de esos registros. [Parte (b) cortesía de M. Foster y S. Kron.]

La característica más importante de la miosina es su capacidad para generar una fuerza capaz de impulsar el movimiento. Los investigadores han utilizado un aparato denominado *trampa óptica* para medir las fuerzas generadas por una sola molécula de miosina (fig. 19-18). Los resultados de los estudios con la trampa óptica mostraron que la miosina II se mueve con pasos discretos, de un largo aproximado de 5-10 nm, y genera una fuerza de 3-5 picoNewtons (pN) aproximadamente la misma fuerza ejercida por la gravedad sobre una sola bacteria. Esta fuerza es suficiente para que los filamentos gruesos de miosina deslicen los filamentos delgados de actina durante la contracción muscular o durante el transporte de vesículas rodeadas de membrana a lo largo del citoplasma. Con un paso de 5 nm, la miosina puede unirse a cada subunidad de actina de una hebra del filamento. Algunas evidencias sugieren que la hidrólisis de ATP y los pasos de la miosina están estrechamente acoplados y que la miosina da un paso por cada molécula de ATP hidrolizada.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 19-18 Uso de la trampa óptica para determinar la fuerza generada por una sola molécula de miosina. En una trampa óptica, el haz de luz de un láser infrarrojo enfocado por un microscopio de luz sobre una perla de látex (o cualquier otro objeto que no absorba la luz infrarroja) captura y mantiene la perla en el centro del haz. La intensidad de la fuerza que mantiene a la perla se ajusta aumentando o disminuyendo la intensidad del rayo láser. En este experimento la perla se adosa al extremo de un filamento de actina. Con la trampa óptica apagada, el filamento de actina y la perla adosada se desplazan en respuesta a la fuerza generada por la miosina adsorbida sobre el portaobjetos, como en la figura 19-17. Cuando se enciende la trampa óptica, captura el filamento a través de la perla y mantiene el filamento contra la superficie de un cubreobjetos revestido con miosina. La fuerza ejercida por una sola molécula de miosina en un filamento de actina se mide como la fuerza necesaria para mantener la perla en la trampa óptica. Un sistema de retroalimentación electrónico controlado por computadora mantiene la perla centrada en la trampa y el movimiento generado por la miosina de la perla es contrapuesto por la fuerza opositora de la trampa. La distancia recorrida por el filamento de actina se mide como el desplazamiento de la perla en la trampa.

Los dominios cuello de diferentes miosinas varían en el largo y en el número de asociaciones con cadenas livianas. Cuanto más largo es el cuello de una miosina más largo será el *tamaño del paso* (es decir, la distancia recorrida sobre un filamento de actina con un solo paso). Como la región del cuello es el brazo de palanca de la miosina, un cuello más largo podría llevar a un paso más largo. Por ejemplo, la miosina II, con un cuello corto, tiene pasos de 5 a 10 nm, mientras que la miosina V, con un cuello largo, tiene pasos mucho más largos de 36 nm. La correlación entre el tamaño de paso y la longitud del cuello fue apoyada luego por experimentos en los cuales el dominio cuello era alargado por métodos recombinantes. Sin embargo, la correlación entre el largo del cuello y el tamaño del paso no es absoluta, como lo evidencia la miosina VI, que se mueve a pasos de 30 nm a pesar de que el largo de su dominio cuello es más corto que en la miosina II.

Las vesículas unidas a miosina son transportadas sobre filamentos de actina

Entre los muchos movimientos presentados por una célula, la translocación de vesículas ha sido uno de los que causaron mayor fascinación a los biólogos. En los primeros estudios del citoplasma, los investigadores encontraron que ciertas partículas, ahora conocidas como vesículas rodeadas de membrana, se movían en línea recta a través del citosol, a veces deteniéndose y luego retomando su movimiento después de cambiar de dirección. Este tipo de movimiento no podía ser causado por difusión porque claramente no era al azar. A partir de aquí los científicos pensaron que debían existir carriles, muy probablemente filamentos de actina o microtúbulos, sobre los cuales las partículas viajaban, así como deberían existir proteínas motoras que impulsaran este movimiento.

En los ensayos de filamento deslizante, los pasos de las cabezas de miosina sobre los filamentos de actina provocan el movimiento del filamento de actina debido a que las colas de miosina se encuentran inmovilizadas. Sin embargo, en las células la situación es algunas veces inversa: como parte de un retículo extenso, los filamentos de actina se encuentran muy inmovilizados, mientras que la miosina está libre para moverse. En este caso, si las colas de las moléculas de miosina se unen a la membrana de las vesículas y la cabeza puede desplazarse a lo largo de un filamento, la vesícula puede ser transportada como una "carga". En lo que sigue se presentan evidencias de que algunas miosinas, incluidas las miosinas I, V y VI, hacen justamente eso. También se toma en cuenta el proceso de corriente citoplasmática, impulsado, muy probablemente, por la miosina XI.

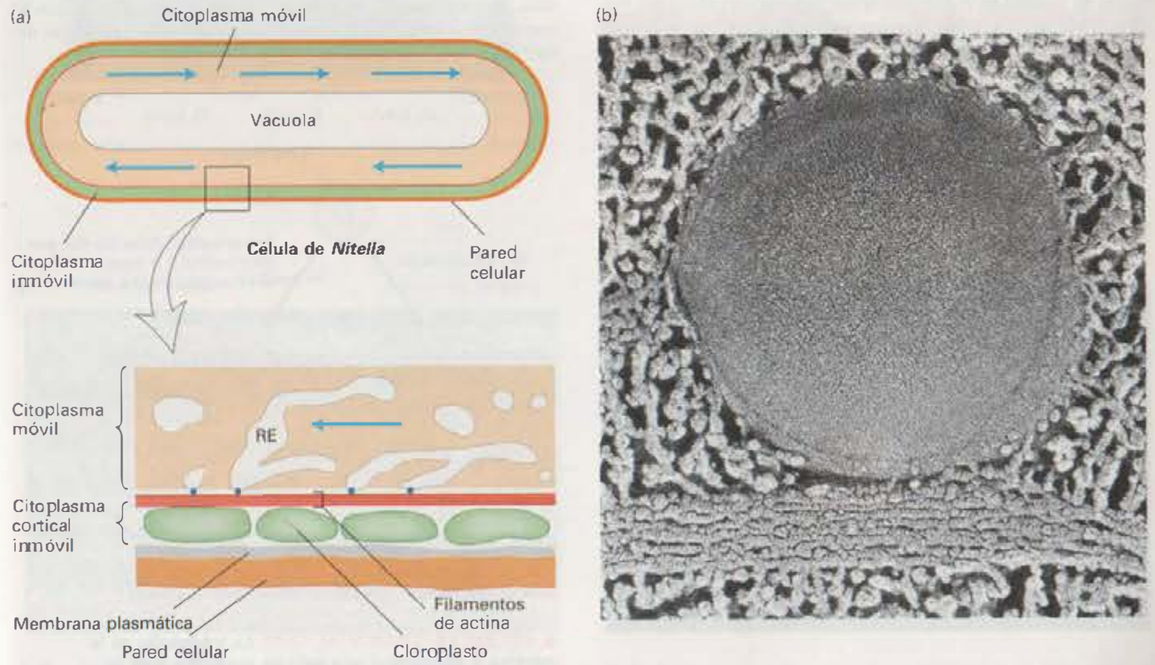
Transporte de vesículas (miosinas I, V y VI). Estudios con amebas proporcionaron las claves iniciales de que la miosina I participa en el transporte de vesículas. De hecho, la primera molécula de miosina I detectada y caracterizada se aisló de esos microorganismos, posteriormente, se identificó la secuencia cDNA de tres genes de miosinas I en *Acanthamoeba*, una ameba común del suelo. Mediante la aplicación de anticuerpos específicos para cada isoforma de miosina I, los investigadores hallaron que las diferentes isoformas se localizan sobre distintas estructuras de la membrana celular. Por ejemplo, la miosina IA se asocia con vesículas citoplasmáticas pequeñas. En cambio, la miosina IC se encuentra en la membrana plasmática y en la vacuola contráctil, una vesícula que regula la osmolaridad del citosol por fusión con la membrana plasmática. La introducción de anticuerpos contra la miosina IC en una ameba viva impide el transporte de la vacuola hacia la membrana; en consecuencia, la vacuola se expande en forma descontrolada y por último la célula explota. La miosina I también interviene en el transporte de vesículas en las células animales y sirve de enlace entre los microfilamentos y la membrana de las microvellosidades, otro ejemplo de una función asociada con la membrana.

Diversas evidencias sugieren que la miosina V participa también en el transporte intracelular de las vesículas limitadas por membrana. Por ejemplo, las mutaciones del gen de la miosina V en las levaduras interrumpen la secreción de proteínas y conducen a la acumulación de vesículas en el citoplasma. El tejido encefálico de los vertebrados es rico en miosina V, que se concentra en los apilamientos del Golgi. Esta asociación con las membranas concuerda con los efectos de las mutaciones de miosina V en los ratones. Estas mutaciones se relacionan con defectos de la transmisión sináptica y, por último, producen la muerte debida a convulsiones. La miosina V también se encuentra implicada en el transporte de vesículas de membrana.

A diferencia de la miosina de un filamento grueso en el cual múltiples cabezas interaccionan con el mismo filamento de actina, las miosinas citoplasmáticas trabajan solas en el transporte de sus cargas de membrana. ¿Cómo se mueven estas miosinas sin disociarse del filamento? La respuesta se halla en la llamada *tasa de rendimiento*, la fracción de tiempo en el que se encuentran adheridas a un filamento durante el ciclo de ATPasa. Las miosinas con una tasa de rendimiento alta, como las miosinas V y VI, se unen a los filamentos de actina durante la mayor parte del ciclo ATPasa. En consecuencia, se mueven a lo largo de un filamento por distancias considerables con poco riesgo de soltarse.

Corrientes citoplasmáticas (miosina XI). En las grandes algas verdes cilíndricas, como *Nitella* y *Chara*, el citosol fluye rápidamente, con una velocidad de unos 4,5 mm/min, en un giro sin fin alrededor de la circunferencia interna de la célula (fig. 19-19). Esta corriente citoplasmática es uno de los principales mecanismos de distribución de los metabolitos celulares, en especial, en células grandes como las vegetales y las amebas. Es probable que este tipo de movimiento sea una versión aumentada de los movimientos en menor escala exhibidos durante el transporte de las vesículas de membrana.

La inspección más cercana de objetos capturados en el flujo del citosol; por ejemplo, el retículo endoplasmático (RE) y otras vesículas limitadas por membrana, demostró que la velocidad de flujo aumenta desde el centro celular (velocidad cero) hacia la periferia. Este gradiente de la velocidad de flujo se explica mejor si el motor que lo genera se encuentra en la membrana. En las microfotografías electrónicas se distinguen haces de filamentos de actina alineados a lo largo de toda la célula, pegados a los cloroplastos que subyacen a la membrana. Las vesículas del RE se adosan a los haces de actina. La mayor parte del citosol es impulsada por miosina adosada a partes del RE ubicadas a lo largo de los filamentos de actina estacionarios. La velocidad de flujo del citosol en *Nitella* es, por lo menos, 15 veces mayor que la produci-



▲ Fig. 19-19. Flujo citoplasmático de un alga gigante cilíndrica. (a) El centro de una célula de *Nitella* está ocupado por una única vacuola grande, llena de agua, rodeada por una capa de citoplasma móvil (indicado por flechas azules). Justo por debajo de la membrana se encuentra una capa inmóvil de citoplasma cortical, lleno de cloroplastos (con mayor aumento en la figura inferior). En la cara interna de esta capa se encuentran haces de filamentos de actina estacionarios (rojo), todos orientados con la misma polaridad. Una proteína motora similar a la miosina (puntos azules), probablemente miosina IX, transporta porciones de retículo endoplasmático (RE) a lo largo de los filamentos de actina. El movimiento de la red del RE impulsa todo el citoplasma viscoso, incluso los orgánulos que están inmersos en la red del RE. (b) La microfotografía electrónica del citoplasma cortical muestra una gran vesícula conectada a un haz subyacente de filamentos de actina. Esta vesícula, que forma parte de la red del RE, establece contactos con los filamentos de actina estacionarios y es desplazada con ellos por un motor similar a la miosina. [Parte (b) según R. Kachar.]

da por cualquier otra miosina. Esta y otras evidencias sugieren que la corriente citoplasmática es impulsada por la miosina XI, una de las miosinas de movimiento más rápido.

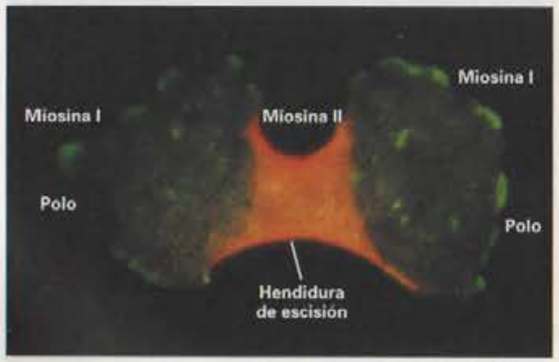
La actina y la miosina II forman haces contráctiles en las células no musculares

Las células no musculares contienen notables haces de filamentos de actina y miosina II. Los haces contráctiles de células no musculares, que pueden ser permanentes o transitorios, difieren de varias maneras de los no contráctiles de la actina ya descritos en este capítulo (véase fig. 19-5). La miosina II, intercalada entre los filamentos de actina de un haz contráctil, es la responsable de su contractilidad. Cuando se aíslan de las células, estos haces se contraen ante el agregado de ATP. Los haces contráctiles siempre se ubican en las adyacencias de la membrana plasmática, bajo la forma de una lámina o cinturón, mientras que los haces de actina no contráctiles forman el centro de las prolongaciones de la membrana (microvellosidades y filopodios).

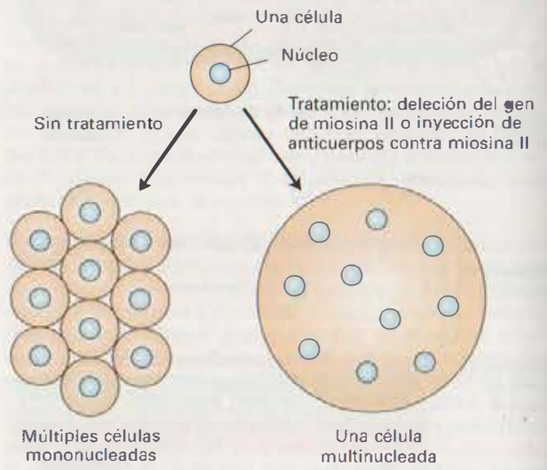
En las células epiteliales, los haces contráctiles suelen formar un *cinturón circular* que rodea la superficie interna de la célula en el nivel de la unión adherente (véase fig. 6-5). Las *fibras de estrés*, que yacen a lo largo de las superficies ventrales de las células cultivadas sobre superficies artificiales (vidrio o plástico) o sobre matrices extracelulares, son el segundo tipo de haces contráctiles. Los extremos de las fibras de estrés terminan en adhesiones focales que contienen integrina, estructuras especiales que adhieren la célula al sustrato subyacente (véase fig. 6-26). Los cinturones circulares y las fibras de estrés contienen diversas proteínas que pueden encontrarse en el músculo liso y ambas exhiben características organizativas semejantes a los sarcómeros musculares. Por esto, ambas estructuras parecen funcionar en la adhesión y el movimiento celular.

Un tercer tipo de haz contráctil, conocido como *anillo contráctil*, es una estructura transitoria que se ensambla en el ecuador de una célula en división y rodea la zona central celular entre los polos del huso. A medida que avanza la división del citoplasma (citocinesis) disminuye el diámetro del anillo contráctil, por lo que la célula se divide en dos partes por una hendidura de escisión cada vez más profunda. Las células en división teñidas con anticuerpos contra las miosinas I y II muestran que la miosina II se ubica en el anillo contráctil, mientras que la miosina I se encuentra en los polos celulares (fig. 19-20). Esta ubicación sugiere que es la miosina II, y no la I, la que interviene en la citocinesis.

Mediante estudios en los cuales se eliminó la miosina II activa de la célula, se demostró que la citocinesis depende de la miosina II (fig. 19-21). En un experimento se microinyectaron anticuerpos antimiosina II en un blastómero de embrión de erizo de mar en el estadio biccelular. En otros experimentos, la expresión de miosina II es inhibida por la deleción del gen de miosina o por inhibición antisentido de la expresión de su mRNA. En todos los casos, una célula carente de miosina II se replica y forma un sincitio multinucleado porque se inhibe la citocinesis, pero no la separación de los cromosomas. Sin miosina II, la célula falla en el armado del anillo contráctil, a pesar de que otros pasos del ciclo celular se desarrollan normalmente.



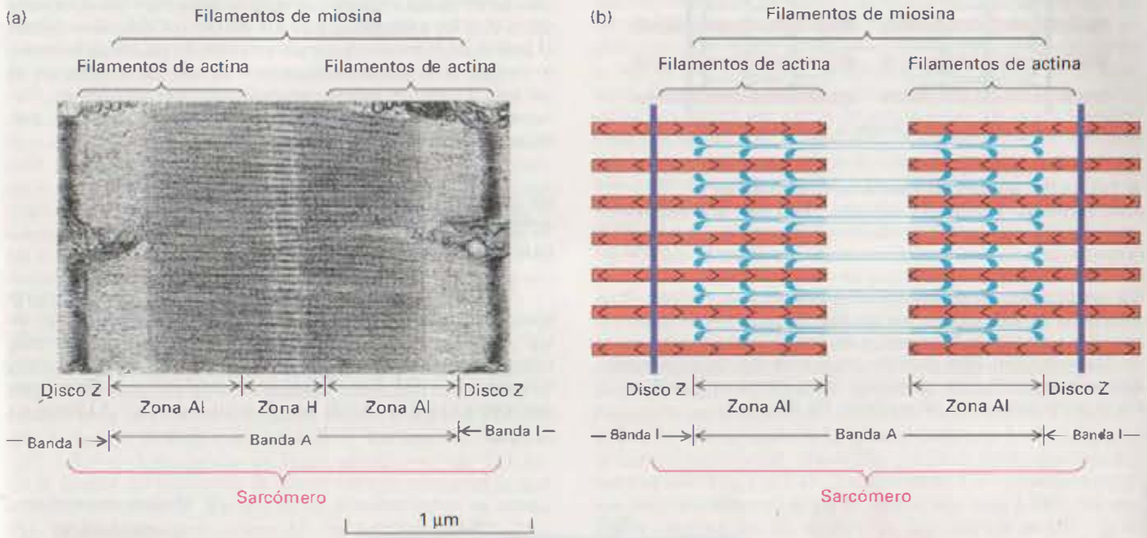
▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 19-20 Anticuerpos fluorescentes muestran la localización de la miosina I y la miosina II durante la citocinesis.** La observación con el microscopio de fluorescencia de una ameba *Dictyostelium* revela que la miosina II (rojiza) se concentra en el surco de escisión, mientras que la miosina I (verde) se localiza en los polos de la célula. La célula fue teñida con anticuerpos específicos para miosina I y miosina II, y cada preparación de anticuerpos unida a un colorante fluorescente diferente. (Cortesía de Y. Fukui.)

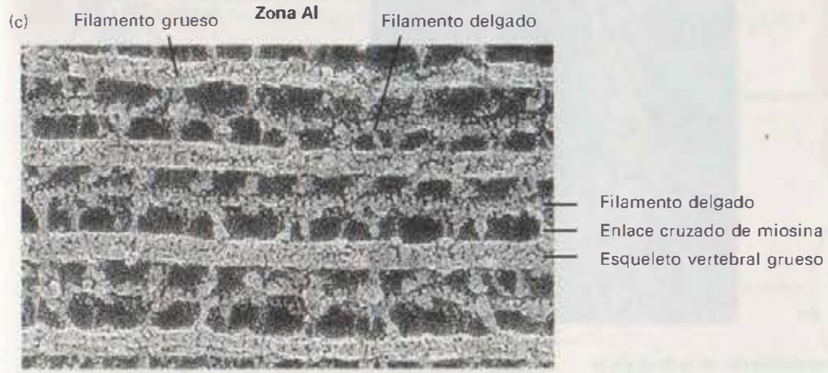


▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 19-21 La inhibición de la miosina II demuestra que ésta es necesaria para la citocinesis.** La actividad de la miosina II se inhibe por deleción del gen o por microinyección de anticuerpos antimiosina II en la célula. La célula que carece de miosina II puede replicar el DNA y el núcleo, pero es incapaz de dividirse; debido a este defecto, después de un cierto período, aumenta de tamaño y se transforma en un sincitio multinucleado. En comparación, una célula no tratada durante el mismo período continúa su división y forma múltiples células esféricas, en la que cada célula contiene un solo núcleo.

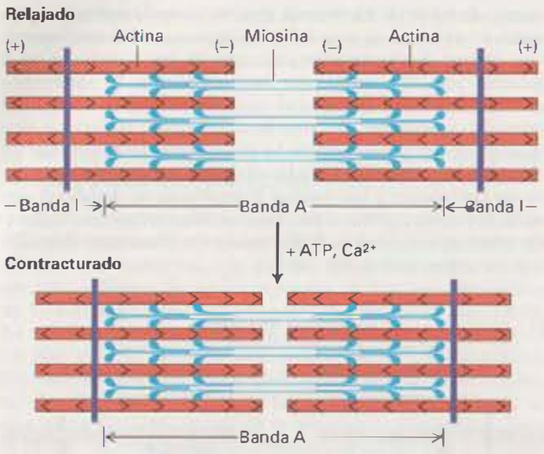
En el músculo esquelético los filamentos gruesos y delgados están ordenados y se deslizan unos sobre otros durante la contracción

Las células musculares surgieron con la finalidad de realizar una función muy especializada: la contracción. Las contracciones musculares deben ser rápidas y repetidas, y producirse a través de distancias considerables y con fuerza suficiente para mover cargas grandes. La célula típica del músculo esquelético, llamada miofibra, es cilíndrica, grande (1-40 mm de largo y 10-50 µm de ancho) y multinucleada (contiene hasta 100 núcleos). El citoplasma está empaquetado formando una matriz de haces de filamentos repetidos regularmente organizados en estructuras especializadas denominadas sarcómeros. Una cadena de sarcómeros, cada uno de 2 µm de largo en el músculo relajado, constituye una *miofibrilla*. El sarcómero es tanto la unidad estructural como la unidad funcional del músculo esquelético. Durante la contracción, los sarcómeros se acortan aproximadamente hasta un 70% de su longitud en el estado no contraído (estado relajado). Mediante el microscopio electrónico y los análisis bioquímicos se demostró que cada sarcómero contiene dos tipos de filamentos: los *filamentos gruesos*, compuestos de miosina y los *filamentos delgados* que contienen actina (fig. 19-22).





▲ **Fig. 19-22. Estructura del sarcómero.** (a) Microfotografía electrónica de músculo estriado murino en un corte longitudinal que muestra un sarcómero. A ambos lados de los discos Z se distinguen bandas I poco teñidas, compuestas totalmente de filamentos de actina. Estos filamentos delgados se extienden desde ambos lados del disco Z, para interdigitarse con los filamentos gruesos de miosina, teñidos de oscuro, que componen la banda A. La región que contiene filamentos delgados y gruesos (la zona AI) es más oscura que la zona que sólo contiene filamentos gruesos de miosina (zona H). (b) Esquema de un sarcómero. Los extremos (+) de los filamentos de actina se adosan a los discos Z. (c) Microfotografía electrónica que muestra enlaces cruzados entre actina y miosina en la zona AI de un músculo estriado de vuelo de un insecto. Esta imagen muestra una disposición casi cristalina de filamentos gruesos de miosina y delgados de actina. El músculo estaba en estado de rigor en el momento de la preparación. Nótese que las cabezas de miosina que sobresalen de los filamentos gruesos se conectan con los filamentos de actina a intervalos regulares. [Parte (a) cortesía de S. P. Daddoune. Parte (c) cortesía de M. Reedy.]



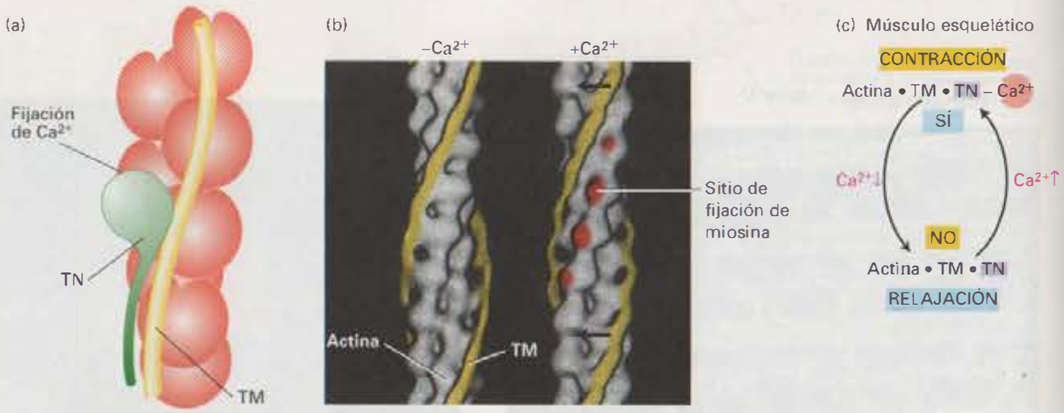
▲ Fig. 19-23. Modelo de filamento deslizante de la contracción en el músculo estriado. En el diagrama superior se muestra la disposición de filamentos gruesos de miosina y delgados de actina en el estado relajado. En presencia de ATP y Ca^{2+}, las cabezas de miosina que se extienden desde los filamentos gruesos caminan hacia los extremos (+) de los filamentos delgados. Dado que los filamentos delgados están anclados a los discos Z (violeta), este movimiento tracciona de los filamentos delgados de actina hacia el centro del sarcómero, acortando la longitud del sarcómero en el estado contraído, como se muestra en la parte inferior del diagrama.

Para comprender cómo se contrae un músculo, se deben considerar las interacciones entre una cabeza de miosina (de las cientos que hay en un filamento grueso) y un filamento delgado (actina) como se ilustra en el diagrama de la figura 3-25. Durante esas interacciones cíclicas, también denominadas *ciclo de los puentes cruzados*, la hidrólisis de ATP se acopla al movimiento de una cabeza de miosina hacia el disco Z, el cual corresponde al extremo (+) de un filamento delgado. Dado que el filamento grueso es bipolar, la acción de las cabezas de miosina en los extremos opuestos del filamento grueso lleva a los filamentos delgados hacia el centro del filamento grueso y, por tanto, hacia el centro del sarcómero (fig. 19-23). Este movimiento acorta el sarcómero hasta que los extremos del filamento grueso se desplazan hasta tocar el disco Z o los extremos (-) de los filamentos delgados cubren el centro de la banda A. La contracción de un músculo intacto resulta de la actividad de cientos de cabezas de miosina en un solo filamento grueso, amplificadas por cientos de filamentos gruesos y delgados en un sarcómero y miles de sarcómeros en una fibra muscular.

La contracción del músculo esquelético está regulada por Ca^{2+} y por proteínas que se unen a la actina

Al igual que muchos procesos celulares, la contracción muscular se inicia con un aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólico. Como se describe en el capítulo 7, en condiciones normales la concentración de Ca^{2+} se mantiene baja, inferior a 0,1 μM. Las células no musculares mantienen esta concentración disminuida por la acción de Ca^{2+} ATPasas en

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Animación tridimensional de un puente cruzado de actina-miosina regulado por tropomiosina-troponina



▲ Fig. 19-24. Regulación dependiente de actina de la contracción del músculo esquelético (a) Modelo del complejo regulador de tropomiosina-troponina (TM- TN) sobre un filamento delgado. TN, un complejo con forma de maza compuesto por subunidades de TN-C, TN-I y TN-T, está unido a la larga molécula a helicoidal de TM. (b) Reconstrucciones tridimensionales con el microscopio electrónico de la hélice TM (amarillo) en un filamento delgado de músculo de valva. TM está en estado "apagado" (NO) *(izquierda)* y se modifica a su nueva posición (flecha) en el estado "encendido" (SÍ) *(derecha)*, cuando se incrementa la concentración de Ca^{2+}. Este desplazamiento expone los sitios de fijación de la miosina (rojo) sobre la actina. TN no se muestra en esta representación. (c) Regulación de la contracción del músculo esquelético por fijación de Ca^{2+} a TN. Nótese que el complejo TN-TM permanece unido al filamento delgado, sin importar si el músculo está relajado o contraído. [Parte (b) adaptada de W. Lehman, R. Craig y P. Vibert, 1993; *Nature* 123:313, cortesía de P. Vibert.]

la membrana plasmática. En cambio, las células del músculo esquelético mantienen un nivel bajo de Ca^{2+} citosólico, sobre todo por la acción de una Ca^{2+} ATPasa exclusiva, que bombea Ca^{2+} continuamente desde el citosol hacia el retículo sarcoplasmático (RS), un retículo endoplasmático especializado ubicado en el citosol de la célula muscular (véase fig. 7-7). Esta actividad establece una reserva de calcio en el RS.

La llegada de un impulso nervioso a la unión neuromuscular induce la apertura de canales del Ca^{2+} regulados por voltaje ubicados en la membrana del RS (véase fig. 7-45). La liberación de Ca^{2+} desde el RS eleva la concentración citosólica de Ca^{2+} alrededor de las miofibrillas lo suficiente como para disparar la contracción. En el músculo esquelético, la concentración de Ca^{2+} citosólico influye en la interacción de cuatro proteínas accesorias con los filamentos delgados de actina. La posición de estas proteínas en los filamentos delgados está a su vez controlada por las interacciones miosina-actina.

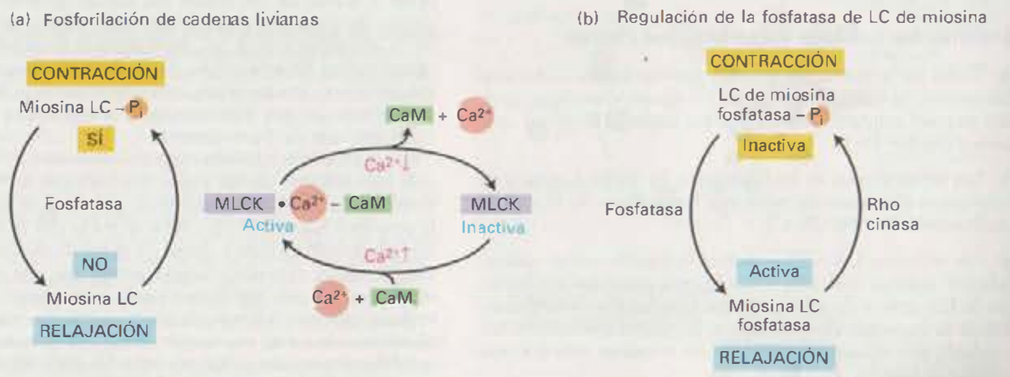
La *tropomiosina* (TM) es una molécula similar a un cordón, de unos 40 nm de largo; las moléculas de TM están unidas cabeza con cola, para formar una cadena continua a lo largo de cada filamento delgado de actina (fig. 19-24a). La tropomiosina se asocia con la *troponina* (TN), un complejo formado por tres subunidades, TN-T, TN-I y TN-C. La troponina-C es la subunidad fijadora de calcio de la troponina. Similar en secuencia a la calmodulina y las cadenas livianas de miosina, TN-C controla la posición de TM sobre la superficie de un filamento de actina a través de las subunidades TN-T y TN-I.

En la actualidad, los científicos creen que, bajo el control del Ca^{2+} y la TN, TM puede ocupar dos posiciones sobre un filamento delgado (un estado "apagado" y un estado "encendido"). En ausencia de Ca^{2+} (estado apagado), la miosina se puede fijar a un filamento delgado, pero el complejo TM-TN impide que se deslice a lo largo de él. La fijación de iones Ca^{2+} a TN-C desencadena un ligero movimiento de TM hacia el centro del filamento de actina (estado encendido), que expone los sitios de fijación de la miosina sobre la actina (fig. 19-24a). En consecuencia, las concentraciones de Ca^{2+} > 10^{-6} M eliminan la inhibición ejercida por el complejo TM-TN y se produce la contracción. En la figura 19-24c se resume el ciclo dependiente del Ca^{2+} entre los estados encendido y apagado del músculo esquelético.

Los mecanismos dependientes de miosina controlan la contracción en el músculo liso y en las células no musculares

Una célula de músculo liso contiene haces contráctiles largos y difusamente alineados que se asemejan a los haces contráctiles de las células epiteliales y al anillo contráctil durante la citocinesis. Aunque está especializado en generar fuerzas que estrechan los vasos sanguíneos, impulsan la comida hacia adelante en el intestino y disminuyen el pasaje de aire en las vías aéreas, el aparato contráctil del músculo liso y su regulación constituyen un modelo valioso para entender cómo se regula la actividad de la miosina en las células no musculares. Como ya se vio, la contracción del músculo esquelético está regulada por ciclos de actina entre los estados encendido y apagado. Por el contrario, la regulación en el músculo liso se encuentra regulada por ciclos de miosina II que alternan entre esos dos estados. La contracción del músculo liso y las células no musculares se encuentra regulada por los niveles de Ca^{2+} intracelular, que responden a muchas moléculas señal extracelulares.

Activación de la miosina II dependiente del calcio. La contracción del músculo liso de los vertebrados es regulada, primariamente, por una vía compleja en la cual las *cadenas livianas reguladoras de miosina (LC)* sufren fosforilaciones y desfosforilaciones. Cuando la cadena liviana reguladora se encuentra no fosforilada, la miosina II es inactiva. El músculo liso se contrae cuando la LC reguladora es fosforilada por la enzima *miosina LC cinasa* (fig. 19-25a). Dado que esta enzima es activada por Ca^{2+}, los niveles de Ca^{2+} citosólico regulan indirectamente el grado de fosforilación de LC, y, por ende, la contracción. La regulación dependiente de Ca^{2+} de la miosina LC cinasa es mediada por calmodulina. El calcio se une primero a la calmodulina; luego el complejo Ca^{2+} calmo-



▲ Fig. 19-25. Regulación de la contracción muscular por mecanismos dependientes de miosina. (a) En el músculo liso de los invertebrados, la fosforilación de la cadena liviana reguladora de la miosina por la cinasa de la LC de miosina dependiente del Ca^{2+}, activa la contracción. Con concentraciones de Ca^{2+} <10^{-6} M, la cinasa de la LC de miosina es inactiva, y una miosina LC fosfatasa, que no depende del Ca^{2+} para su actividad, desfosforila la LC de la miosina y causa la relajación muscular. (b) La activación de la Rho cinasa produce la fosforilación e inactivación de la miosina LC fosfatasa. Varias moléculas de señalización extracelular inducen la activación de la Rho cinasa tanto en células del músculo liso como en células no musculares.

dulina se fija a la miosina LC cinasa y la activa. Dado que este modo de regulación depende de la difusión del Ca^{2+} y de la acción de proteincinasas, la contracción muscular es mucho más lenta en el músculo liso que en el esquelético.

El papel de la miosina LC cinasa activada se puede demostrar mediante la microinyección de un inhibidor de cinasa en las células de músculo liso. Aunque el inhibidor no bloquee el aumento del nivel de Ca^{2+} citosólico, que sigue a la llegada del impulso nervioso, las células inyectadas no se contraen. El efecto del inhibidor se puede superar mediante la microinyección de un fragmento proteolítico de miosina LC cinasa, que es activa incluso en ausencia de Ca^{2+}-calmodulina (este tratamiento tampoco afecta a los niveles de Ca^{2+}).

Activación de la miosina II inducida por señal mediada por la Rho cinasa. A diferencia del músculo esquelético, que sólo es estimulado para la contracción por los impulsos nerviosos, el músculo liso y las células no musculares son regulados por muchos tipos de moléculas, además de los estímulos nerviosos. Por ejemplo, la norepinefrina, la angiotensina, la endotelina y la histamina, además de otros factores, pueden modular o inducir la contracción del músculo liso o inducir cambios en la forma y adhesión de células no musculares accionando varias vías de transducción de señales. Algunas de estas vías llevan a incrementar los niveles de Ca^{2+} citosólico; como ya se describió, estos incrementos pueden estimular la actividad de la miosina mediante la activación de la miosina LC cinasa (véase fig. 19-25a).

Otras vías de señalización activan la *Rho cinasa*, la cual puede estimular la actividad de la miosina en dos formas. Primero, la Rho cinasa puede fosforilar la miosina LC fosfatasa e inhibir su actividad (véase fig. 19-25b). El nivel de fosforilación de la miosina LC aumenta con la fosfatasa inactivada y, en consecuencia, aumenta la actividad de la miosina. Además, la Rho cinasa activa directamente la miosina mediante fosforilación de la cadena liviana reguladora. Cabe notar que el Ca^{2+} no desempeña ningún papel en la regulación de la actividad de la miosina por Rho cinasa.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 19.3

Movimientos celulares impulsados por miosina

- Todas las isoformas de miosina pueden interaccionar con filamentos de actina a través de sus dominios cabeza, pero sus papeles celulares son diferentes, según el dominio cola (véase cuadro 19-3).
- Los movimientos de los filamentos de actina pueden monitorizarse directamente mediante los ensayos de filamento deslizante (véase fig. 19-17).
- Las miosinas I, V y VI impulsan la translocación intracelular de algunas vesículas rodeadas por membrana a lo largo de filamentos de actina. Un proceso similar es responsable de la corriente citoplasmática, la cual es probablemente mediada por miosina XI, una de las miosinas móviles más rápidas (véase fig. 19-19).
- En las células no musculares, los filamentos de actina y de miosina II forman haces que tienen una organización similar a un sarcómero primitivo. Los ejemplos comunes son el cinto circular presente en las células epiteliales y las fibras de estrés en las células cultivadas en superficies de plástico o vidrio; en el último caso, pueden ser un artefacto. Ambas estructuras funcionan en la adhesión celular.
- Durante la citocinesis de células en división se forma un anillo contráctil, un haz transitorio de actina, miosina II, que separa a la célula en dos mitades.
- En el músculo esquelético, los filamentos delgados de actina y los filamentos gruesos de miosina se organizan en estructuras altamente ordenadas llamadas sarcómeros (véase fig. 19-22). El extremo (+) de los filamentos delgados se une al disco Z, el límite entre dos sarcómeros adyacentes.
- Durante la contracción del músculo esquelético, las cabezas de miosina en los extremos del filamento grueso se desplazan a lo largo de los filamentos delgados hacia el disco Z que limita el sarcómero. La fuerza generada por el movimiento de las miosinas empuja los filamentos delgados hacia el centro del sarcómero y acorta su longitud (véase fig. 19-23).
- El rápido incremento del Ca^{2+} citosólico inducido por los estímulos nerviosos en el músculo esquelético cambia la interacción entre los filamentos de actina y tropomiosina, exponiendo los sitios de unión a miosina, lo que permite que ocurra la contracción (véase fig. 19-24).
- La contracción en el músculo liso y en las células no musculares es desencadenada por la fosforilación de las cadenas livianas reguladoras de la miosina, tanto por la miosina LC cinasa, en respuesta a un aumento del Ca^{2+} citosólico, como por la Rho cinasa, en respuesta a señales externas (véase fig. 19-25).

19.4 Locomoción celular

Hasta ahora se han analizado los distintos mecanismos utilizados por las células para generar movimiento, desde el ensamblaje de los filamentos de actina y la formación de haces y retículos de actina-miosina, hasta la contracción de los haces de actina y miosina, así como el deslizamiento de moléculas de miosina aisladas a lo largo del filamento de actina. Se piensa que estos mecanismos son los principales procesos a través de los cuales las células generan las fuerzas necesarias para migrar. La locomoción celular es el resultado de la coordinación de los movimientos generados por diferentes partes de una célula. Estos movimientos son complejos, pero sus características más importantes pueden develarse por técnicas que usan anticuerpos con marca fluorescente y microscopia de fluorescencia.

Una propiedad de todas las células móviles es la polaridad; esto significa que ciertas estructuras siempre se forman en la parte frontal de la célula mientras que otras se encuentran en la posterior. La migración celular se inicia con la formación de una protrusión grande y ancha en el borde director. La observación con el videomicroscopio revela que una característica importante de este movimiento es la polimerización de actina en la membrana. Además, en las células de los vertebrados los filamentos de actina en el borde director se enlazan rápidamente en forma cruzada en haces y retículos en la región de la protrusión, llamada *lamelipodio*. En algunos casos, proyecciones de membrana delgadas semejantes a dedos, denominadas *filopodios*, también se extienden desde el borde director. Estas estructuras forman contactos estables con la superficie subyacente y previenen la retracción de la membrana. En esta sección se analizan en profundidad los procesos generadores de fuerza



▲ Fig. 19-26. Pasos en el movimiento de un queratinocito. En una célula de desplazamiento rápido, como la célula epidérmica de pez, el movimiento comienza con la extensión de uno o más lamelipodios desde el borde director de la célula (1); algunos lamelipodios se adhieren al sustrato a través de adhesiones focales (2). Luego, el grueso del citoplasma del cuerpo celular fluye hacia adelante (3). El extremo rezagado de la célula permanece adherido al sustrato hasta que la cola, finalmente, se separa y retrae hacia el interior del cuerpo celular (4). Para los detalles véase el texto

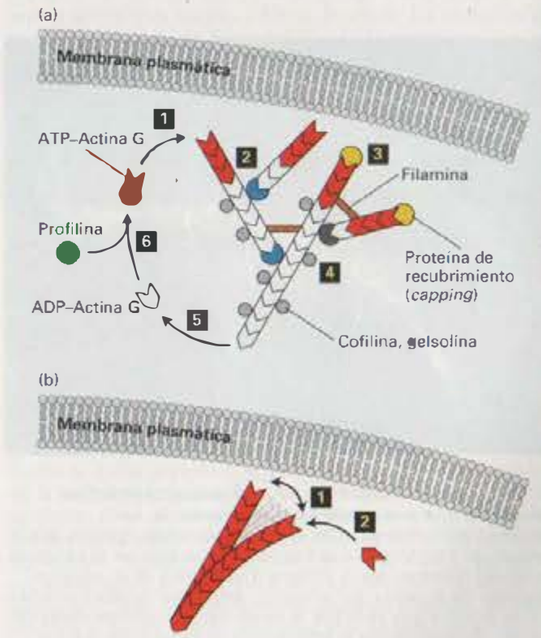
TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación general: Movilidad celular
Video: Mecánica de la migración de un queratinocito de pez

que utilizan estas células para moverse a través de una superficie. También se describe el papel de las vías de señalización en la coordinación e integración de las actividades del citoesqueleto, un tema importante en la investigación actual.

El movimiento celular coordina la generación de fuerza y la adhesión de la célula

Un queratinocito (célula epitelial) y un fibroblasto (célula del tejido conectivo) en movimiento muestran la misma secuencia de cambios de la morfología celular: una extensión inicial de una protrusión de membrana, adhesión al sustrato, flujo del citosol hacia adelante y retracción de la parte posterior de la célula (fig. 19-26).

Extensión de la membrana. El retículo de filamentos de actina en el borde director (véase fig. 19-12) es una especie de maquinaria celular que empuja la membrana hacia adelante mediante un mecanismo basado en la polimerización de actina (fig. 19-27a). El paso clave en la generación de fuerza (pa-



▲ Fig. 19-27. Fuerzas producidas por el ensamblaje del retículo de actina. (a) Como puede observarse en este diagrama, los filamentos de actina se ensamblan en un retículo ramificado en el cual los extremos de los filamentos se aproximan a la membrana plasmática en ángulo agudo. La actina G-ATP (rojo) se agrega al extremo del filamento y empuja la membrana hacia adelante (1). El complejo Arp2/3 (azul) se une a los costados del filamento (2) y forma una rama en un ángulo de 70° desde el filamento. Con el tiempo, los extremos de los filamentos se cubren con proteínas de cubierta (amarillo) (3); las subunidades de actina G-ATP se convierten en subunidades actina G-ADP (blanco) (4) y se disocian del filamento debido a la actividad de las proteínas seccionadoras cofilina y gelsolina (gris) (5). Las subunidades actina G-ADP se disocian del complejo con profilina (verde) (6) para regenerar subunidades actina G-ATP. (b) El retículo de filamentos de actina mantiene la elongación de los filamentos y la generación de fuerzas de empuje. Un filamento de actina es rígido, pero puede doblarse debido a fluctuaciones térmicas. En el modelo de propulsión elástica browniana, la curvatura de los filamentos en el borde director (1), donde el extremo (+) contacta a la membrana, crea el espacio en la membrana para que las subunidades se unan en los extremos del filamento (2). Entonces la fuerza elástica de torsión del filamento empuja la membrana hacia adelante. [Parte (a) adaptada de T. M. Svitkina y G. G. Borisy, 1999, *J. Cell Biol.* 145:1009.]

so 1) es la adición de subunidades de actina en los extremos de los filamentos próximos a la membrana. El complejo Arp2/3 crea nuevos extremos de filamentos (paso 2) mediante ramificación. La estructura ramificada de filamentos es estabilizada por proteínas de enlace cruzado como la filamina. A medida que los filamentos crecen, las subunidades de actina-ATP se convierten en subunidades actina-ADP. Consecutivamente (paso 3) las proteínas de cubierta recubren los extremos (+) de los filamentos (paso 4) y la cofilina y la gelsolina fragmentan los filamentos de actina (paso 5), lo que provoca la disociación de las subunidades de actina. La profilina convierte los monómeros de actina-ADP en monómeros de actina-ATP competentes para la polimerización listos para participar en el próximo ciclo.

Un mecanismo para explicar qué impulsa la membrana hacia adelante, llamado *modelo de propulsión elástica browniana*, se basa en la propiedad mecánica elástica de un filamento de actina (fig. 19-27b). Las microfotografías electrónicas muestran que los extremos de los filamentos de actina terminan contra la membrana y no dejan espacio para que las subunidades se unan. Sin embargo, la energía térmica causa que un filamento se doble y crea espacio para la adición de subunidades. Debido a que los filamentos de actina tienen la misma rigidez que una vara de plástico, la energía acumulada en la flexión endereza el filamento. La acción concertada de numerosos filamentos que sufren movimientos similares y su enlazamiento en forma cruzada en un retículo mecánicamente fuerte genera la fuerza suficiente (varios piconewtons) para empujar la membrana hacia adelante.

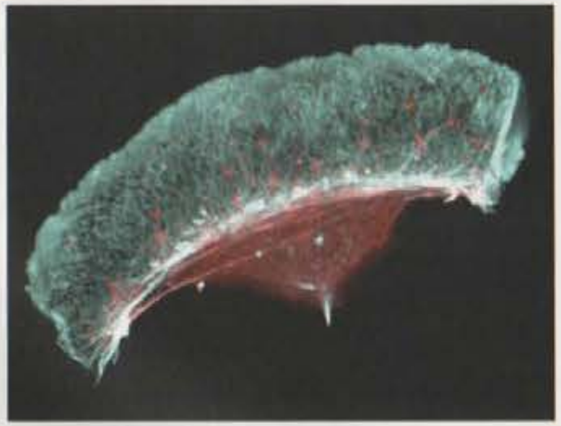
Adhesiones celulares a sustratos. Cuando la membrana ha sido movida y el citoesqueleto ha sido ensamblado, la membrana comienza a adherirse firmemente al sustrato. Con el microscopio dinámico se observa que los haces de actina del borde director quedan anclados al sitio de fijación, el cual se transforma con rapidez en una adhesión focal. La fijación tiene dos finalidades: impide la retracción de las laminillas directoras y actúa como anclaje de la célula al sustrato, lo que le permite a la célula empujar hacia adelante.

Translocación de cuerpo celular. Una vez establecidas las fijaciones anteriores, el grueso del contenido del cuerpo celular se transloca hacia adelante (véase fig 19-26). No se conoce el mecanismo subyacente; una propuesta sugiere que el núcleo y los demás orgánulos se incluyen en el citoesqueleto, y que la contracción cortical dependiente de miosina desplaza el citoplasma hacia adelante. La participación de la contracción cortical dependiente de miosina en la migración celular es sustentada por la localización de miosina II. La banda transversal de miosina II y filamentos de actina, en el límite entre el lamelipodio y el cuerpo celular, se asocia con el movimiento (fig. 19-28).

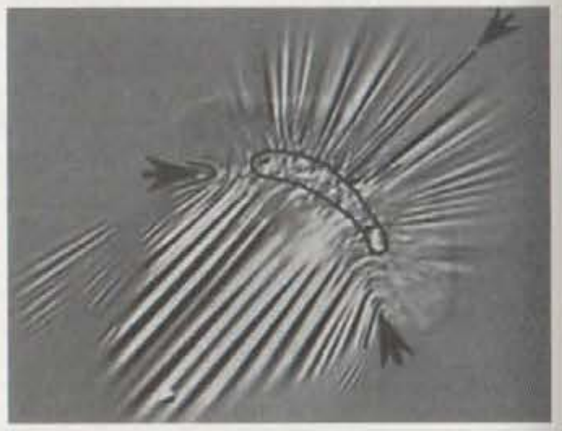
Rotura de las adhesiones celulares. Finalmente, en el último paso del movimiento (la desadhesión), se rompen las adhesiones focales en la parte posterior de la célula y la cola liberada se dirige hacia adelante. Con el microscopio óptico se observa que la cola se desprende de sus conexiones (quizá por contracción de las fibras de estrés de la cola o por tensión elástica), pero aún queda una pequeña porción de la membrana adherida con firmeza al sustrato.

La capacidad de una célula para moverse corresponde a un balance entre las fuerzas mecánicas generadas por el citocsqueleto y las fuerzas de resistencia generadas por las adhesiones celulares. Las células no pueden moverse, tanto si están adheridas demasiado fuerte o no están adheridas a la superficie. Esta relación puede demostrarse midiendo la tasa de movimiento en células que expresan variados niveles de

(a)



(b)



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 19-28 Fuerzas contráctiles generadas por una célula en movimiento.** (a) La microfotografía fluorescente de un queratinocito muestra que el retículo de filamentos de actina (azul) se localiza en el frente de la célula, mientras que la miosina II (rojo) está en el extremo posterior de la célula. Sin embargo, ambos se localizan en una banda (blanco) que atraviesa la célula inmediatamente antes del núcleo. Se postula que la contracción de esta banda empuja hacia adelante el cuerpo celular. (b) Una célula en movimiento ejerce fuerzas de tracción sobre el sustrato. Un queratinocito puesto sobre una membrana delgada de silicona ejerce fuerzas celulares debido a la contracción del cuerpo celular y causa que la membrana se ondule. [Parte (a) adaptada de T. M. Svitkina y G. G Borisy, 1999, *J. Cell Biol.* 145:1009; cortesía de T. M. Svitkina. Parte (b) de K. Burton et al., 1999, *Mol. Biol. Cell* 10:3745; cortesía de D. L. Taylor.]

integrinas, las moléculas de adhesión celular que median la mayoría de las interacciones entre la célula y la matriz (cap. 6). Estas medidas muestran que la migración más rápida ocurre a un nivel intermedio de adhesión, con la tasa de movimiento que cae rápidamente a niveles de adhesión altos y bajos. La locomoción celular resulta entonces de las fuerzas de tracción ejercidas por la célula sobre el sustrato subyacente. Las fuerzas de tracción pueden detectarse mediante el efecto causado por las células en membranas de silicona extremadamente delgadas (fig. 19-28b). A medida que la célula se mueve hacia adelante, las fuerzas contráctiles ejercidas en su parte frontal y posterior causan que la membrana se rice. Sobre una membrana más rígida que resiste la deformación, las fuerzas de rizamiento serán rransformadas en movimientos de avance de la célula.

En el movimiento ameboide intervienen transiciones gel-sol reversibles de los retículos de actina

Las amebas son grandes protozoos muy móviles, cuyo desplazamiento hacia adelante exhibe los mismos pasos básicos que caracterizan al de los queratmocitos. El movimiento ameboide se inicia cuando la membrana plasmática forma como un globo en la parte anterior, el *seudópodo* o "falso pie", similar a los lamelipodios de las células de los vertebrados. A medida que el seudópodo se fija al sustrato, se llena de citosol que fluye a través de la célula. En el último paso del movimiento se arrastra la parte posterior de la ameba y la fijación al sustrato se rompe.

El movimiento de una ameba se acompaña por cambios en la viscosidad del citosol, con ciclos entre los estados de sol y gel. La región central del citoplasma, el *endoplasma*, es un líquido que fluye con rapidez hacia la parte anterior de la célula, hasta llenar el seudópodo. Una vez allí el endoplasma se convierte en *ectoplasma*, un gel que constituye la corteza justo por debajo de la membrana plasmática. A medida que la célula se desplaza hacia adelante, el gel ectoplasmático de su extremo posterior vuelve a convertirse en sol endoplasmático, para transformarse después otra vez en ectoplasma, cuando llega hasta la parte anterior de la célula. Este ciclo entre los estados de sol y gel sólo continúa mientras migra la célula.

La transformación entre los estados de sol y gel es producto de la separación y el reensamblaje de los retículos de microfilamentos de actina en el citosol. Es probable que varias proteínas fijadoras de actina controlen este proceso y, por ende, la viscosidad del citosol. La profilina de la parte anterior de la célula estimula la polimerización de la actina, y la α-actinina y la filamina forman retículos de actina con consistencia de gel en el ectoplasma más viscoso, como se vio antes. Por otra parte, las proteínas como la cofilina seccionan los filamentos de actina, para formar el endoplasma más fluido.

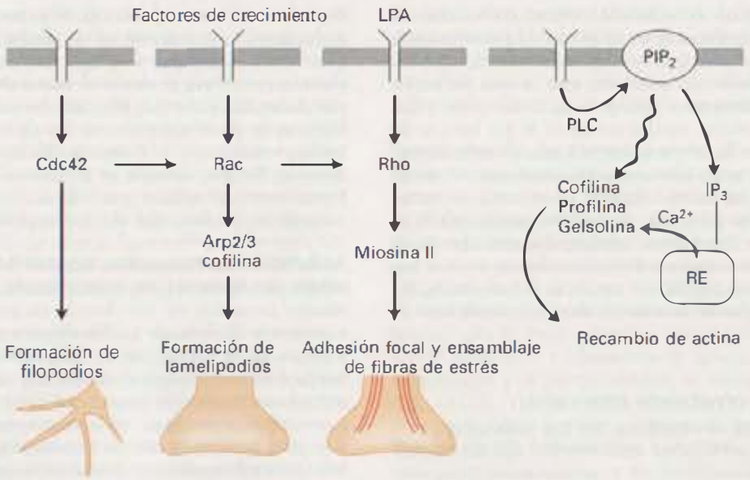
La migración de las células es coordinada por señales externas y vías de transducción de señales

Una característica notable de la célula en movimiento es su polaridad: una célula tiene una parte anterior y una parte posterior. Cuando gira, se forma una nueva laminilla o seudópodo en la nueva dirección. Si se forman láminas en todas direcciones, como ocurre en las amebas mutantes de miosina I, la célula es incapaz de elegir una nueva dirección de desplazamiento. Para sostener el movimiento en una dirección particular, la célula requiere señales para coordinar los procesos en la parte anterior con los de la parte posterior y, de hecho, señales que le indiquen dónde se encuentra la parte anterior. En esta sección se presentan varios ejemplos de la forma como las señales externas activan la migración celular y controlan la dirección del movimiento.

Activación de filopodios, bordes ondulados y fibras de estrés por factores de crecimiento. Los factores de crecimiento presentes en una herida reciente estimulan el crecimiento y la división de un fibroblasto en reposo en un cultivo a través de la formación de filopodios y lamelipodios en el borde director, y luego el ensamblaje de fibras de estrés y de adhesiones focales. Se piensa que eventos similares inducidos por señales tienen lugar en la respuesta de los fibroblastos in vivo para la cicatrización de heridas, en el desarrollo de las células en embriones y en la metástasis de células cancerosas. Estos procesos requieren la polimerización de los filamentos de actina, la activación de moléculas de miosina y el ensamblaje de haces y retículos de actina. En los reordenamientos citoesqueléticos que forman parte de la respuesta de cicatrización de heridas por los fibroblastos intervienen vías dirigidas directamente por Rac, Rho y Cdc42, todas moléculas semejantes a Ras que pertenecen a la superfamilia de proteínas interruptoras GTPasas. Estas vías se activan por la unión de factores de crecimiento a receptores tirosincinasas, una clase de receptores de superficie tratados en el capítulo 13.

Las funciones de las proteínas relacionadas con Ras se han demostrado a través de experimentos de microinyección simples. Cuando se microinyectó Rac a un fibroblasto, de inmediato la célula comenzó a formar proyecciones ascendentes, llamadas *borde ondulado*, y 5-10 minutos más tarde se formaron adhesiones focales y fibras de estrés. La myección de una forma inactiva de Ras inhibió toda la reorganización del citoesqueleto de actina, ante el agregado de factores de crecimiento a la célula. Cuando se inyectó Rho en lugar de Rac, la célula simuló los efectos mitogénicos del ácido lisofosfatídico (LPA), una quimiocina sérica y un estimulante potente de la agregación plaquetaria. Tanto Rho como LPA indujeron el ensamblaje de las fibras de estrés y las adhesiones focales dentro de los dos minutos posteriores, pero no indujeron la formación del borde ondulado de la membrana.

Estos hallazgos condujeron a la hipótesis de que los factores extracelulares desencadenan las vías de transducción de señales ligadas a Ras, que activan la polimerización de actina en la membrana del borde director, como proceso inicial, y la formación de adhesiones focales en un momento posterior (fig. 19-29). Si este modelo es correcto, la inhibición del ensamblaje de las fibras de estrés no debiera afectar la formación del borde ondulado de la membrana. Para probar este modelo, se inyecta un fibroblasto con Rac y ADP ribosilasa, una enzima que inactiva Rho por unión covalente con ADP. Como se había supuesto, se formaron los bordes ondulados de la membrana, pero se bloqueó el ensamblaje de las fibras de estrés. Estas observaciones sugieren que los procesos dependientes de Rho, como la formación de fibras de estrés, se encuentran "corriente abajo" del control de Rac. Experimentos posteriores, en los cuales se microinyectó Cdc42 en fibroblastos, demostraron que esta proteína controla un paso anterior, la formación de filopodios. Por lo tanto, la secuencia



▲ Fig. 19-29. Papel de las vías de transducción de señales en la locomoción de la célula y la organización del citoesqueleto. Las señales extracelulares son transmitidas a través de la membrana plasmática por receptores específicos para los distintos factores. Un conjunto de factores de crecimiento inducen la polimerización de actina en el borde director, a través de la vía dependiente de Rac- y de Cdc42 *(izquierda)*; otro conjunto de factores actúa corriente abajo a través de una vía dependiente de Rho, para inducir el ensamblaje de las adhesiones focales y la contracción cortical *(centro)*. La adhesión de una célula a la matriz extracelular desencadena una vía de señales paralela, que induce la activación de profilina, cofilina y gelsolina *(derecha)*. La inducción de esta vía activa la fosfolipasa C (PLC), que hidroliza PIP_2 en la membrana. El incremento posterior del Ca^{2+} citosólico estimula el recambio de actina. LPA, ácido lisofosfatídico; RE, retículo endoplasmático.

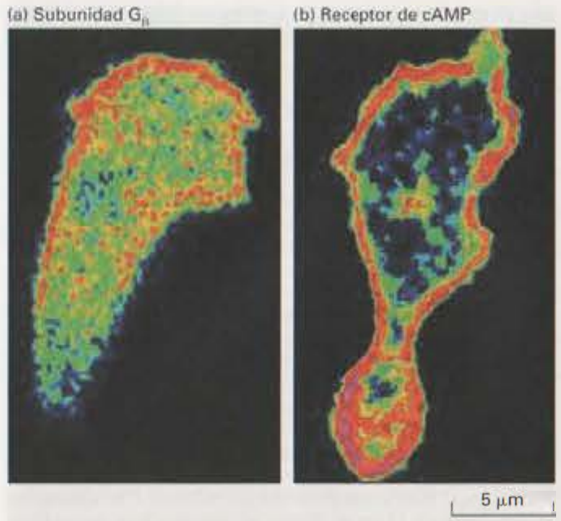
de procesos en la cicatrización de heridas comienza con la participación de filopodios y lamelipodios, durante la migración de la célula hacia la herida, y la formación de adhesiones focales y fibras de estrés para cerrarla.

Un aspecto importante de la locomoción es cómo se coordinan los movimientos en respuesta a distintos estímulos. Por ejemplo, el ensamblaje de un retículo de actina ramificado en la membrana plasmática es amplificado por la acción de varias vías de señalización y sus proteínas adaptadoras. La actividad ramificadora del complejo Arp2/3 es activada por una proteína adaptadora, WASp, bajo el control de la GTPasa Cdc42. Además, como ya se estudió, la hidrólisis de PIP_2 por la fosfolipasa C libera profilina, cofilina y gelsolina de la membrana. En otra vía, el inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3), un producto secundario de la hidrólisis de PIP_2, estimula la liberación de iones Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático hacia el citosol; este incremento de Ca^{2+} activa la miosina II y la actividad seccionadora de la gelsolina. En consecuencia, esta vía paralela estimula el corte de actina y el crecimiento de los filamentos, por lo que incrementa el recambio de actina (fig. 19-29, *derecha*).

Dirección de los desplazamientos por acción de moléculas quimiotácticas. En determinadas condiciones, agentes químicos extracelulares guían el desplazamiento de una célula en una dirección particular. En algunos casos el movimiento es guiado por moléculas insolubles del sustrato subyacente. En otros, la célula detecta moléculas solubles y las sigue a lo largo de un gradiente de concentración, hasta llegar al origen. Esta última respuesta se denomina quimiotaxis. Uno de los ejemplos mejor estudiados de quimiotaxis es la migración de amebas *Dictyostelium* a lo largo de una concentración creciente de cAMP. Después de seguir el cAMP hasta el origen, las amebas se agregan y luego se diferencian en un cuerpo fructífero. Muchas otras células también presentan movimientos quimiotácticos. Por ejemplo, los leucocitos son guiados por un tripéptido secretado por numerosas células bacterianas. En el desarrollo del músculo esquelético, una proteína señal secretada llamada factor de dispersión guía la migración de mioblastos a las ubicaciones correctas en los esbozos de los miembros (cap. 22).

A pesar de la variedad de las distintas moléculas quimiotácticas (azúcares, péptidos, metabolitos celulares, lípidos de pared celular o de membrana), todas actúan mediante un mecanismo común y conocido: la fijación a los receptores de superficie celular, la activación de vías de señales intracelulares y la remodelación del citoesqueleto, a través de la activación o la inhibición de diversas proteínas fijadoras de actina. La pregunta central es: ¿Cómo pueden los receptores de superficie celular detectar una diferencia del 2% en la concentración de moléculas quimiotácticas a lo largo de toda la célula? Para dirigir la migración celular, un gradiente quimiotáctico externo debe inducir de alguna manera gradientes internos que llevan a la polarización del citoesqueleto de actina.

Coincidencia entre gradientes quimiotácticos, proteínas G activadas y Ca^{2+}. Las microfotografías de receptores de cAMP fusionados con la proteína fluorescente verde (GFP) muestran que los receptores se distribuyen de manera uniforme a lo largo de una célula de ameba (fig. 19-30). Por lo tanto, el gradiente interno debe ser establecido por otro componente de la vía de señalización. Dado que los receptores de cAMP señalizan a través de proteínas G triméricas, una subunidad de proteína G trimérica y otras proteínas de señalización corriente abajo se fusionaron a GFP. Las microfotografías fluorescentes muestran que la concentración de proteínas G triméricas es mayor en la dirección de la quimiotaxina. Las proteínas G triméricas, acopladas a los receptores de cAMP pueden activar



◀ FIGURA EXPERIMENTAL 19-30 Quimiotaxina utilizada para demostrar la señalización inducida por un gradiente de subunidades G_β. Imágenes en falsos colores de amebas que expresan subunidades G_β fusionadas a GFP (a) y como control el receptor de cAMP fusionado a GFP (b). Cuando se pone una fuente externa de quimiotaxina cerca de la célula (en la parte superior de las fotografías), ésta se dirige hacia la fuente. (a) Las subunidades G_β se concentran en el borde director de la célula, cercanas a la quimiotaxina y están deplecionadas en la cola. (b) En cambio, el receptor de cAMP mantiene una distribución uniforme en la membrana celular. (W. F. Loomins y R. H. Insal, 1999, *Nature* 401:440-441; cortesía de Peter Devreotes Laboratory.)

vías que conducen a la activación de Arp2/3 a través de la proteína mediadora WASp o de otras vías que incrementan el Ca^{2+} citosólico (véase fig. 13-29).

Experimentos con colorantes fluorescentes, que actúan como sensores internos de Ca^{2+}, sugieren que, en las células que migran, también se establece un gradiente citosólico de Ca^{2+}, con la concentración más baja en la parte anterior de la célula y la más alta en la parte posterior. Si se coloca una pipeta con una quimiotaxina en el borde lateral de un leucocito migrante, producirá un incremento general de la concentración global de Ca^{2+} citosólico. Este gradiente iónico se vuelve a orientar, con las concentraciones más bajas sobre el lado de la célula más cercano a la pipeta, por lo que la célula girará hacia la fuente. Cuando el gradiente quimiotáctico se elimina, la célula continúa su movimiento en la dirección del nuevo gradiente de Ca^{2+} establecido (véase fig. 5-47).

Ya se observó que muchas proteínas fijadoras de actina, entre ellas las miosinas I y II, gelsolina, alfa actinina y fimbrina, son reguladas por el Ca^{2+}. En consecuencia, el gradiente citosólico de Ca^{2+} puede regular las transiciones de sol a gel que tienen lugar durante el desplazamiento de la célula. Las bajas concentraciones de Ca^{2+} en la parte anterior de la célula favorecerían la formación de retículos de actina al activar la miosina I e inactivar las proteínas seccionadoras de actina, y revirtiendo la inhibición, regulada por Ca^{2+}, de las proteínas que establecen enlaces cruzados entre la actina. La concentración elevada de Ca^{2+} en la parte posterior de la célula induciría la separación de los retículos de actina y la formación de un sol, al activar la gelsolina, o la contracción de los retículos corticales de actina, al activar la miosina II. En consecuencia, el gradiente interno de Ca^{2+} contribuiría al recambio de los filamentos de actina en las células migratorias.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 19.4

Locomoción celular

- Las células migratorias sufren varias modificaciones morfológicas características: extensión de un lamelipodio o seudópodo, adhesión del borde director extendido al sustrato, flujo hacia adelante (corriente del citosol) y retracción del cuerpo celular (véase fig. 19-26).
- Es probable que la locomoción celular se deba a un mecanismo común, en el que intervienen la polimerización de la actina y el movimiento del borde director, generado por miosina I, el ensamblaje de las estructuras de adhesión y la contracción cortical, mediada por miosina II (véase fig.19-28).
- Estímulos externos (p. ej., factores de crecimiento y moléculas quimiotácticas) inducen el ensamblaje y organización del citoesqueleto y el establecimiento de un gradiente interno de proteínas G triméricas y calcio (véase fig. 19-29). La polarización resultante de la célula conduce la locomoción.

19.5 Filamentos intermedios

En el resto de este capítulo se estudiarán los filamentos intermedios (FI) y las estructuras que forman en las células. Los filamentos intermedios se encuentran en casi todas las células animales, pero no en plantas ni en hongos. La asociación de los filamentos intermedios con el núcleo y la membrana plasmática sugiere que su función principal es estructural (fig. 19-31). En el epitelio, por ejemplo, los filamentos intermedios proveen el soporte mecánico para la membrana plasmática donde hace contacto con otras células o con la matriz extracelular. En las células epidérmicas (la capa más superficial de la piel) y los axones de las neuronas (fig. 19-32), los filamentos intermedios son, por lo menos, 10 veces más abundantes que los microfilamentos o los microtúbulos, los otros componentes del citoesqueleto.

Mucho de la siguiente discusión sobre los filamentos intermedios parecerá familiar porque su organización celular es similar a la de los microfilamentos de actina tratados en secciones anteriores. Estos dos tipos de fibras citoesqueléticas también se asemejan en que suelen estar asociadas con mem-



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 19-31 La tinción con anticuerpos fusionados a fluorocromos revela la distribución celular de la queratina y los filamentos intermedios de lamina.** En esta microfotografía fluorescente de una célula PtK2 teñida con dos anticuerpos antiqueratina y antilamina se puede observar una red de filamentos intermedios de lamina (azul) debajo de la membrana nuclear. El citoesqueleto citoplasmático de queratina (rojo) se extiende desde la membrana nuclear hasta la membrana plasmática. (Cortesía de R. D. Goldman.)

branas. A diferencia de los microfilamentos y los microtúbulos, los filamentos intermedios no participan en la movilidad celular. No existen ejemplos conocidos de movimientos celulares dependientes de FI o de proteínas motoras que se desplacen a lo largo de ellos.

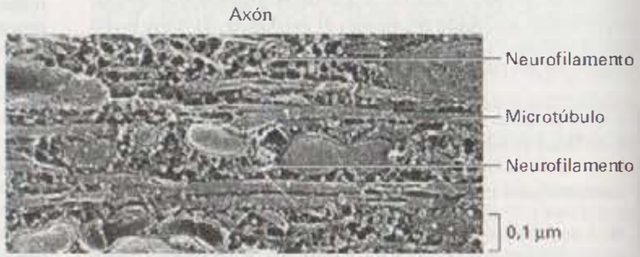
Los filamentos intermedios difieren de otras fibras citoesqueléticas en estabilidad, tamaño y estructura

Varias propiedades físicas y bioquímicas diferencian los filamentos intermedios de los microfilamentos y los microtúbulos. Para comenzar, los filamentos intermedios son muy estables. Incluso después de la extracción con soluciones que contienen detergentes y concentraciones elevadas de sales, la mayoría de los filamentos intermedios de una célula permanecen intactos, mientras que los microfilamentos y los microtúbulos se despolimerizan en sus subunidades solubles. De hecho, la mayoría de los métodos de purificación de los FI emplean estos tratamientos para liberarlos de otras proteínas. También difieren en tamaño de las otras dos fibras citoesqueléticas. Su nombre deriva del diámetro de 10 nm, más pequeño que los microtúbulos (24 nm), pero mayores que los microfilamentos (7 nm). Además, a diferencia de las subunidades globulares de actina y tubulina, que se polimerizan en microfilamentos y microtúbulos huecos respectivamente las subunidades de FI son bastones α-helicoidales que se ensamblan para formar filamentos similares a cordones. Por último, las subunidades de FI no se fijan a nucleótidos y su ensamblaje para formar filamentos intermedios no requiere la hidrólisis de GTP o ATP, como la polimerización de actina-G y tubulina. De todos modos, muchos de los detalles referidos al ensamblaje de los filamentos intermedios celulares aún son hipotéticos.

Las proteínas de los filamentos intermedios se clasifican de acuerdo con su distribución en tejidos específicos

En los vertebrados superiores, las subunidades que componen los filamentos intermedios constituyen una superfamilia de proteínas α-helicoidales ubicadas en el citoplasma de diferentes tejidos y la membrana nuclear. La superfamilia se divide en cuatro grupos sobre la base de la similitud en secuencia y el patrón de expresión en las células (cuadro 19-4). A diferencia de las isoformas de actina y tubulina, las clases de proteínas de FI son muy divergentes en secuencia y varían mucho en peso molecular. Aquí se hace una introducción a los cuatro grupos y luego se consideran las funciones en distintas células con mayor detalle.

El grupo más ubicuo de FI son las laminas. Al contrario de lo que ocurre con la localización citosólica de las otras cuatro clases de proteínas de FI, las laminas sólo se encuentran en el núcleo. De las tres laminas nucleares, dos son productos empalmados en forma alternada, codificados por un



▶ **FIGURA EXPERIMENTAL 19-32 La técnica de grabado profundo revela los microtúbulos y filamentos intermedios en un axón neuronal.** Los neurofilamentos y microtúbulos en un axón de rana congelado rápidamente se visualizan mediante la técnica de grabado profundo. Varios microtúbulos de 24 nm de diámetro corren en forma longitudinal; los filamentos intermedios más delgados, de 10 nm de diámetro, también corren en forma longitudinal. Conexiones ocasionales unen los dos tipos de fibras citoesqueléticas. (De N. Hirokawa, 1982, *J. Cell Biol.* 94:129; cortesía de N. Hirokawa.)

CUADRO 19-4 Principales proteínas de los filamentos intermedios en los mamíferos

Proteína FI	PM (10^{-3})*	Forma de filamento	Distribución tisular
LAMINAS NUCLEARES			
Lamina A	70	Homopolímeros	Núcleo
Lamina B	67	Homopolímeros	Núcleo
Lamina C	67	Homopolímeros	Núcleo
QUERATINAS†			
Queratinas ácidas	40-57	Heteropolímeros	Epitelio
Queratinas básicas	53-67	Heteropolímeros	Epitelio
FILAMENTOS INTERMEDIOS TIPO III			
Vimentina	57	Homo y heteropolímeros	Mesénquima (fibroblastos)
Desmina	53	Homo y heteropolímeros	Músculo
Proteína ácida fibrilar glial	50	Homo y heteropolímeros	Células gliales y astrocitos
Periferina	57	Homo y heteropolímeros	Neuronas periféricas y centrales
NEUROFILAMENTOS			
NF-L	62	Homopolímeros	Neuronas maduras
NF-M	102	Heteropolímeros	Neuronas maduras
NF-H	110	Heteropolímeros	Neuronas maduras
Internexina	66	—	SNC en desarrollo

*Los filamentos intermedios presentan variaciones de los pesos moleculares (PM) dependientes de especie.
†Se conocen más de 15 isoformas de queratinas básicas y ácidas.

gen común mientras que la tercera es codificada por un gen distinto. Sólo hay un gen de laminas en el genoma de *Drosophila* y ninguno en el genoma de las levaduras. Debido a que las laminas, pero no los grupos citosólicos de FI, se expresan en *Drosophila*, se cree que las laminas son los precursores evolutivos de la superfamilia de FI.

Las células epiteliales expresan queratinas ácidas y básicas. Se asocian en una relación 1:1 para formar heterodímeros que se ensamblan y generan filamentos de queratina heteropoliméricos; ninguno de estos tipos por sí solo se puede ensamblar para formar filamentos de queratina. Las queratinas son las clases más diversas de proteínas de FI y se expresan en numerosas isoformas. Las isoformas pueden dividirse en dos grupos: unas 10 queratinas son específicas para los tejido epiteliales "duros", que dan origen a las uñas, el pelo y la lana; unas 20 denominadas *citoqueratinas*, se suelen encontrar en los epitelios que recubren las cavidades internas del cuerpo. Cada tipo de epitelio siempre expresa una combinación característica de queratinas ácidas y básicas.

Cuatro proteínas se clasifican como proteínas FI de tipo III. A diferencia de las queratinas, las proteínas de tipo III pueden formar FI homopoliméricos y heteropoliméricos. La protcína de FI de más amplia distribución es la *vimentina*, de expresión típica en leucocitos, células endoteliales de los vasos sanguíneos, algunas células epiteliales y células mesenquimáticas, como los fibroblastos (véase la figura al comienzo de este capítulo). Los filamentos de vimentina contribuyen a sostener las membranas celulares. Las redes de vimentina también ayudan a mantener el núcleo y otros orgánulos en un lugar definido dentro de la célula. A menudo la vimentina se asocia con microtúbulos y, como se destacó antes, el retículo de los filamentos de vimentina es paralelo al de los microtúbulos (véase fig. 1-15). Las otras proteínas tipo III de los FI tienen una distribución mucho más limitada. Los filamentos de *desmina* de las células musculares son responsables de la estabilización de los sarcómeros en el músculo en contracción. La *proteína ácida fibrilar glial* forma filamentos en las células gliales que rodean a las neuronas y en los astrocitos. La *periferina* se encuentra en las neuronas del sistema nervioso periférico, pero se sabe poco acerca de ella.

El centro de los axones neuronales está ocupado por neurofilamentos (NF); cada uno de ellos es un heteropolímero compuesto de tres polipéptidos –NF-L, NF-M y NF-H– que difieren en gran medida en el peso molecular (véanse fig. 19-32 y cuadro 19-4). Los neurofilamentos son responsables del crecimiento radial de un axón y, en consecuencia, determinan el diámetro axonal, el cual se relaciona directamente con la velocidad del impulso nervioso que conduce. La influencia de

la cantidad de neurofilamentos sobre la conducción del impulso se determinó mediante una mutación en codornices, denominada *quiver*, que bloquea el ensamblaje de los neurofilamentos. En consecuencia, la velocidad de la conducción nerviosa está muy disminuida. Los microtúbulos también se encuentran presentes en los axones y dirigen la elongación axonal.

MEDICINA

Debido a su distribución característica, las proteínas de FI contribuyen al diagnóstico y tratamiento de ciertos tumores. En un tumor las células pierden su aspecto normal, por lo que no se puede identificar su origen por la morfología. Sin embargo, las células tumorales mantienen muchas de las propiedades diferenciadas de las células de las cuales derivan, entre ellas la expresión de proteínas de FI particulares. Mediante el uso de anticuerpos marcados con fluorescencia, específicos contra esas proteínas de FI, a menudo es posible diagnosticar si un tumor se originó en un tejido epitelial, mesenquimático o neuronal.

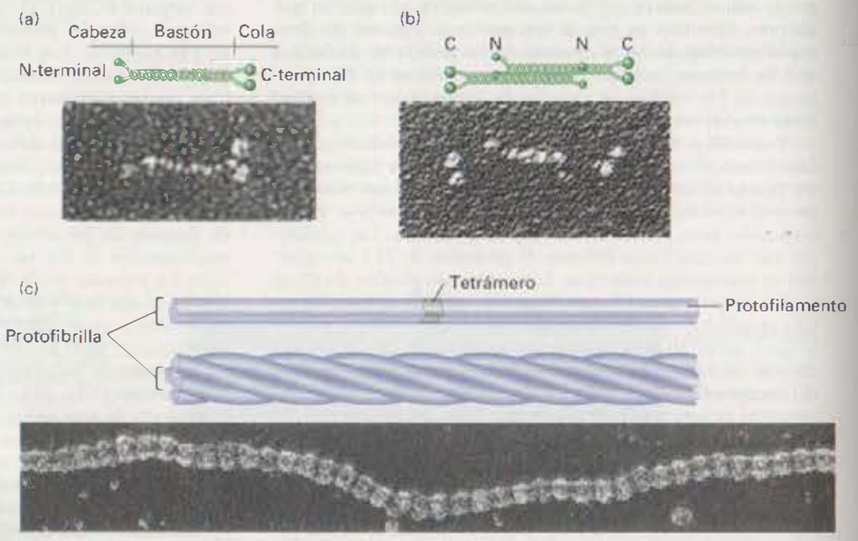
Por ejemplo, los tumores malignos más comunes de mama y de tubo digestivo contienen queratinas y carecen de vimentina; en consecuencia, derivan de células epiteliales (que contienen queratinas, pero no vimentinas) en lugar de las mesenquimáticas de la estroma subyacente (que contiene vimentina, pero no queratinas). Dado que los cánceres epiteliales y mesenquimáticos son sensibles a distintos tratamientos, la identificación de las proteínas de FI en una célula tumoral ayuda a seleccionar el tratamiento más eficaz para destruir el tumor.

Todas las proteínas de los filamentos intermedios tienen un dominio central conservado y se organizan de modo similar

Además de compartir la capacidad para formar filamentos de 10 nm de diámetro, todas las proteínas de las subunidades de FI tienen la estructura de un dominio en común: un dominio central α-helicoidal flanqueado por dominios globulares N y C terminales. El dominio central helicoidal, conservado en todas las proteínas de FI, está compuesto de cuatro hélices α largas separadas por tres regiones "espaciadoras" no helicoidales. Los segmentos α–helicoidales se aparean para formar un dímero de espirales.

En microfotografías electrónicas, un dímero de proteína de FI aparece como una molécula similar a un bastón con dominios globulares en los extremos; dos dímeros se asocian lateralmente para formar un tetrámero (fig. 19-33a,b). Experimentos con anticuerpos marcados en los dominios terminales C y N indican que las cadenas polipeptídicas son paralelas en el dímero, mientras que los dímeros en el tetrámero tienen orientación antiparalela. Los pasos siguientes en el ensamblaje no se conocen por completo, pero parecen incluir una asociación extremo con extremo de los tetrámeros para formar un largo protofilamento, el cual se agrega lateralmente para formar un haz laxo de protofibrillas. La compactación de las protofibrillas conduce a la formación de un filamento maduro de 10 nm con los dominios globulares N y C-terminal de los tetrámeros que forman grupos de cuentas a lo largo de toda la superficie (fig. 19-33c). Dado que el tetrámero no es simétrico, es interesante destacar que no siempre un FI tiene polaridad, como el filamento de actina o el microtúbulo. Este concepto es avalado por experimentos que demuestran que las subunidades de vimentina se pueden incorporar a lo largo de un filamento y en sus extremos.

Si bien el centro α–helicoidal es común a todas las proteínas de FI, los dominios terminales N y C de los distintos tipos de esas proteínas varían en gran medida en peso molecular y secuencia. Debido en parte a esta falta de conservación de la secuencia, en un principio los investigadores propusieron que los dominios terminales N y C no intervenían en el ensamblaje de FI. No obstante, varios experimentos posteriores demostraron que esta hipótesis es incorrecta, al menos en parte. Por ejemplo, si se acorta el dominio N terminal de una proteína de FI, ya sea por proteólisis o por deleción



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 19-33
El microscopio electrónico permite visualizar estructuras intermedias en el ensamblaje de los filamentos intermedios. Aquí se muestran microfotografías electrónicas y dibujos de dímeros y tetrámeros de proteínas de FI y de filamentos intermedios maduros de *Ascaris*, un gusano parásito intestinal. (a) Las proteínas de FI forman dímeros paralelos con dominios centrales muy enrollados y colas y cabezas globulares, que varían en longitud y secuencia. (b) Se forma un tetrámero por agregación antiparalela lateral y escalonada de dos dímeros idénticos. (c) Los tetrámeros se asocian extremo con extremo y lateralmente en una protofibrilla. En un filamento maduro, que consta de cuatro protofibrillas, los dominios globulares forman grupos de cuentas en la superficie. (Adaptado de N. Geisler et al., 1998, *J. Mol. Biol.* 282:601; cortesía de Ueli Aebi.)

mutagénica, la proteína truncada es incapaz de ensamblarse y formar un filamento. (Las queratinas son la excepción; se forman incluso en ausencia de ambos dominios terminales.) En la actualidad, el punto de vista dominante es que el dominio N terminal desempeña un papel importante en el ensamblaje de la mayoría de los filamentos intermedios. Si bien el dominio C terminal no es necesario para el ensamblaje de FI, parece afectar a la organización de los citoesqueletos de FI de la célula. En consecuencia, es posible que estos dominios controlen las interacciones laterales dentro de los filamentos intermedios, además de las interacciones entre éstos y otros componentes celulares.

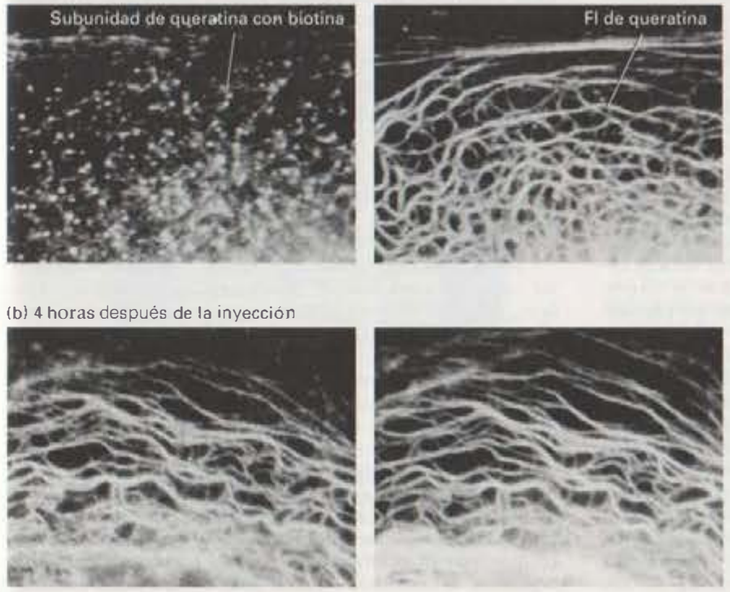
Identidad de las subunidades de FI. Un tema todavía sin resolver es si los monómeros, los dímeros o los tetrámeros constituyen las subunidades de ensamblaje, semejantes a los monómeros de actina-G en el ensamblaje de los microfilamentos. La evidencia más importante que sustenta la participación de los tetrámeros proviene de los experimentos de fraccionamiento celular en los cuales, a pesar de que la mayor parte de la vimentina de los fibroblastos en cultivo se encuentra polimerizada, entre el 1 y el 5% de las proteínas se encuentran como un *pool* soluble de tetrámeros. La presencia de un pool de tetrámeros sugiere que los monómeros de vimentina se convierten rápidamente en dímeros, los cuales se convierten enseguida en tetrámeros.

Filamentos homopoliméricos y heteropoliméricos. Algunas proteínas de FI pueden formar filamentos homoméricos, mientras que otras sólo forman filamentos heteropoliméricos con otras proteínas de su clase; y algunos pueden formar tanto unos como otros. Algunas proteínas de FI, pero no las queratinas, pueden formar heteropolímeros con proteínas de FI de otra clase. NF-L se autoasocia para formar un homopolímero, pero NF-H y NF-M por lo general se ensamblan junto con el esqueleto de NF-L, por lo que la mayoría de los neurofilamentos contienen las tres proteínas. Las secuencias espaciadoras en las espirales o secuencias en los diversos dominios N y C terminales o ambos podrían ser responsables de determinar si proteínas de FI particulares se ensamblan en heteropolímeros u homopolímeros. De hecho, las mutaciones de estas regiones generan polipéptidos de FI mutados capaces de formar heterooligómeros con proteínas de FI normales. Estas moléculas híbridas a menudo "envenenan" la polimerización IF al bloquear el ensamblaje en un estadio intermedio. La capacidad de las proteínas de FI mutadas de bloquear el ensamblaje de FI demostró ser muy útil en estudios de la función de los filamentos intermedios en una célula. En el final del capítulo se verá cómo estas mutaciones de las queratinas develaron el papel de los filamentos de queratina en la epidermis.

Los filamentos intermedios son dinámicos

Si bien los filamentos intermedios son claramente más estables que los microtúbulos y los microfilamentos, se demostró que las proteínas de FI se intercambian con el citoesqueleto de FI. En un experimento se inyectó queratina de tipo I marcada con biotina en fibroblastos; al cabo de dos horas, la proteína marcada se incorporó en el citoesqueleto de queratina ya existente (fig. 19-34). Los resultados de este experimento y otros demuestran que las subunidades de FI de un *pool* soluble se pueden agregar a filamentos preexistentes y que las subunidades también se pueden disociar de los filamentos intactos.

La estabilidad de los filamentos intermedios presenta problemas especiales en las células en mitosis, que deben reorga-



◀ FIGURA EXPERIMENTAL 19-34
La marcación química y la tinción fluorescente muestran la incorporación de queratina tipo I en un citoesqueleto de FI existente. Se purificó queratina de tipo I monomérica, se modificó químicamente con biotina y se inyectó en células de fibroblasto vivas. Luego se fijaron las células en distintos momentos y se tiñeron con un anticuerpo fluorescente contra la biotina y con anticuerpos contra queratina. (a) Veinte minutos después de la inyección, la queratina marcada con biotina microinyectada se concentró en pequeños focos dispersos por todo el citoplasma *(izquierda)*, y no se había integrado al citoesqueleto de queratina endógena *(derecha)*. (b) A las cuatro horas, las subunidades marcadas con biotina (izquierda) y los filamentos de queratina (derecha) muestran patrones idénticos; esto indica que la proteína microinyectada se incorporó en el citoesqueleto existente. (De R. K. Miller, K. Vistrom y R. D. Goldman: 1991 *J. Cell Biol.*; 113:843; cortesía de R. D. Goldman.)

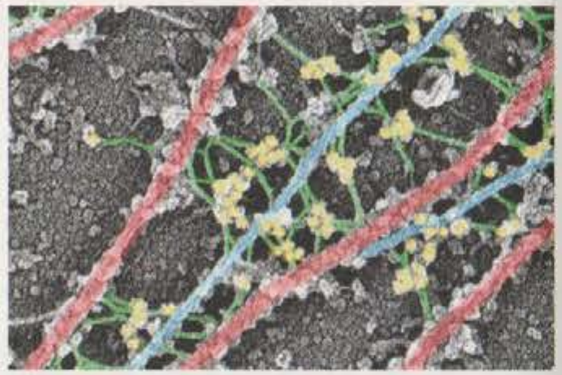
nizar los tres retículos del citoesqueleto durante el ciclo celular. En particular, el desarmado de la envoltura nuclear en la etapa temprana de la mitosis depende del desensamblaje de los filamentos de lamina que forma la red que sostiene la membrana. Como se explicó en el capítulo 21, la fosforilación de las laminas nucleares por Cdc2, una cinasa dependiente de ciclinas que se torna activa al comienzo de la mitosis (profase) induce el desensamblaje de filamentos intactos e impide su reensamblaje. En una etapa tardía de la mitosis (telofase), la eliminación de esos fosfatos por fosfatasas específicas promueve el rensamblaje de lamina, el cual es crítico en la nueva formación de la envoltura nuclear alrededor de los cromosomas hijos. La acción opuesta de cinasas y fosfatasas provee entonces un mecanismo rápido para controlar el estado de ensamblaje de las laminas de filamentos intermedios. Otros filamentos intermedios sufren un ensamblaje y desensamblaje similar a lo largo del ciclo celular.

Diversas proteínas establecen enlaces cruzados entre los filamentos intermedios y otras estructuras celulares

Las *proteínas asociadas con los filamentos intermedios (PAFI; en inglés, IFAP)* establecen enlaces cruzados entre los filamentos intermedios para organizarlos en un haz o retículo, y con otras estructuras celulares, incluida la membrana plasmática. Hasta el presente sólo se identificaron unas pocas PAFI, pero sin duda muchas otras se descubrirán a medida que los investigadores centren su atención sobre las proteínas que controlan la organización y el ensamblaje de los FI. A diferencia de las proteínas fijadoras de actina y las asociadas con los microtúbulos, ninguna de las PAFI secciona o forma casquete en los filamentos intermedios, secuestra proteínas de FI en un *pool* soluble ni actúa como proteína motora. Más bien, las PAFI parecen desempeñar un papel en la organización del citoesqueleto de FI, integrándolo con los citoesqueletos de actina y microtúbulos, y uniéndolo a la membrana nuclear y a la membrana plasmática, sobre todo en las uniones celulares.

Una unión física entre los filamentos intermedios y los microtúbulos se puede detectar mediante ciertas drogas. El tratamiento de las células con concentraciones elevadas de colchicina produce la disolución completa de los microtúbulos después de un período de varias horas. Si bien los filamentos de vimentina permanecen intactos en células tratadas con colchicina, se agrupan en haces desorganizados cercanos al núcleo. Este hallazgo demuestra que la organización de los filamentos de vimentina depende de los microtúbulos intactos y sugiere la presencia de proteínas que establezcan enlaces entre los dos tipos de filamentos. En otros estudios se demostró que los FI se enlazan en forma cruzada con los filamentos de actina.

Una familia de PAFI, las **plaquinas**, es responsable de la unión de los FI con los microtúbulos y los microfilamentos. Una de estas proteínas es la *plectina,* una PAFI de PM 500.000 que, según se demostró, une microtúbulos y filamentos de actina in vitro. La plectina también interactúa con otras proteínas del citoesqueleto, entre ellas espectrina, proteínas asociadas con microtúbulos y lamina B. Mediante el microscopio inmunoelectrónico se determinó que los anticuerpos contra plectina marcados con oro se ubican sobre cortas conexiones delgadas entre los microtúbulos y la vimentina, lo cual indica la presencia de plectina en estos enlaces cruzados (fig. 19-35).



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 19-35 Los anticuerpos marcados con oro permiten la visualización de enlaces cruzados de plectina entre filamentos intermedios y microtúbulos. En esta microfotografía inmunoelectrónica de un fibroblasto, los microtúbulos se destacan en rojo; los filamentos intermedios, en azul; y las fibras cortas de conexión entre ellos, en verde. La tinción con anticuerpos contra plectina marcados con oro (amarillo) muestra la presencia de esta proteína en las fibras. (De T. M. Svitkina, A. B. Verkhovsky y G. G. Borisy. 1996. *J. Cell Biol,* 135:991; cortesía de T. M. Svitkina.)

El N-terminal de la plectina y otras plaquinas tienen un dominio con homología calponina (CH) similar al encontrado en fimbrina y otras proteínas de enlace cruzado. Estas observaciones sugieren que algunas plaquinas forman enlaces cruzados entre los microfilamentos de actina y los filamentos intermedios.

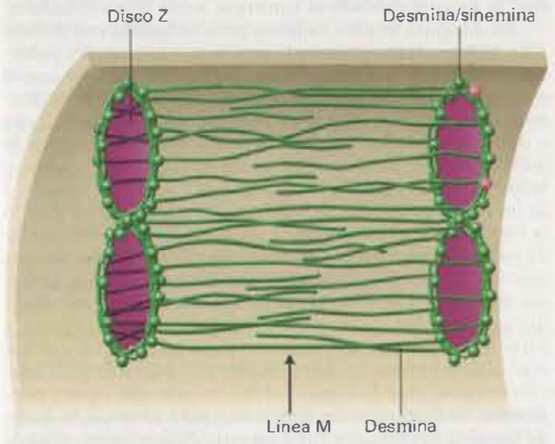
Enlaces cruzados entre microtúbulos y microfilamentos se observan en microfotografías de los axones de las células nerviosas (véase fig. 19-32). Si bien se desconoce la identidad de estas conexiones en los axones, pueden representar PAFI con la función de establecer enlaces cruzados entre los neurofilamentos y los microtúbulos, para crear un citoesqueleto estable. Como alternativa, estas conexiones con los microtúbulos pueden ser los brazos largos de NF-H, de conocida acción para la unión de los microtúbulos.

Los retículos de FI forman varias estructuras de soporte y se conectan a las membranas celulares

El retículo de filamentos intermedios a menudo se encuentra como una capa laminar adyacente a las membranas celulares, a las que proporciona sostén mecánico. El mejor ejemplo es la **lamina nuclear** ubicada a lo largo de la superficie interna de la envoltura nuclear (véase fig. 21-16). Este retículo de sostén se compone de filamentos de lamina A y lamina C, con enlaces cruzados que crean un enrejado ortogonal unido a la membrana nuclear interna a través de la lamina B, mediante la interacción con un receptor de lamina B, una PAFI, de la membrana. Al igual que el citoesqueleto de la membrana plasmática, el esqueleto nuclear de lamina no sólo sostiene la membrana nuclear interna sino que también proporciona sitios de unión para los poros nucleares y los cromosomas en interfase. Por lo tanto, las laminas nucleares organizan el contenido nuclear desde afuera hacia adentro.

Además de formar la lámina nuclear, es típico que los filamentos intermedios se organicen en el citosol como un sistema extenso que cubre el espacio entre la envoltura nuclear y la membrana plasmática (véase fig. 19-31). Algunos filamentos intermedios transcurren paralelos a la superficie celular, mientras que otros atraviesan el citosol; en conjunto forman un marco reticular interno que contribuye a mantener la forma y la elasticidad de la célula. Experimentos de unión in vitro sugieren que los filamentos de vimentina se unen a dos proteínas en la membrana plasmática: anquirina, la proteína fijadora de actina asociada con la ATPasa Na^+/K^+ de las células no eritroides, y plectina, que también se une a $\alpha 6\beta 4$, una integrina de ciertas uniones celulares (cap. 6). A través de estas dos PAFI, el citoesqueleto de vimentina se adhiere a la membrana plasmática y proporciona una estructura de sostén flexible.

En el músculo, el sarcómero está rodeado por un enrejado compuesto por una banda de filamentos de desmina (fig. 19-36). Estos filamentos rodean el disco Z y establecen enlaces cruzados con la membrana plasmática a través de varias PAFI, entre ellas, paranemina y anquirina. Filamentos longitudinales de desmina cruzan hasta los discos Z vecinos dentro de una miofibrilla y las conexiones entre los filamentos de desmina que rodean los discos Z de miofibrillas adyacentes sirven como enlaces cruzados entre miofibrillas para formar haces dentro de una célula muscular. El enrejado también se fija al sarcómero mediante interacciones con filamentos gruesos de miosina. Dado que los filamentos de desmina se encuentran por fuera del sarcómero, no participan activamente en la generación de las fuerzas de contracción. Más bien, la desmina desempeña un papel estructural esencial en el mantenimiento de la integridad muscular. Por ejemplo, en los ratones transgénicos que carecen de desmina se altera esta arquitectura de sostén y los músculos aparecen mal alineados.



▲ Fig. 19-36. Diagrama de los filamentos de desmina en el músculo. Estos filamentos intermedios tipo III rodean el disco Z y establecen conexiones adicionales con los discos Z vecinos. El alineamiento de los filamentos de desmina con el sarcómero muscular se mantiene en su lugar debido a un collar de heteropolímeros de desmina/sinemina.

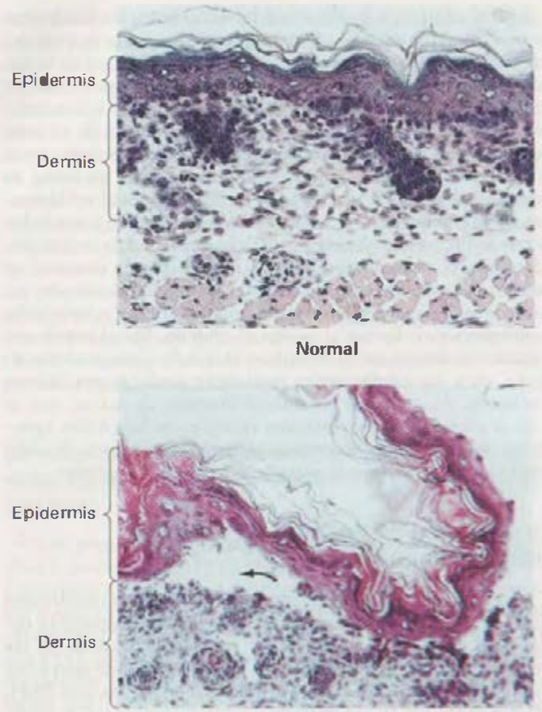
En el capítulo 6 se describió la unión entre los filamentos de queratina de las células epiteliales y dos tipos de moléculas de uniones de anclaje: los *desmosomas,* que median la adhesión célula a célula, y los *hemidesmosomas*, responsables de la fijación de las células a la matriz extracelular subyacente. Vistos con el microscopio electrónico, ambos tipos de uniones aparecen teñidas como placas proteináceas oscuras que se unen a la cara citoplasmática de la membrana y fijan los haces de filamentos de queratina (véase fig. 6-8). Entonces los filamentos de queratina de una célula están directamente conectados a los de una célula vecina por desmosomas o a la matriz extracelular por hemidesmosomas. Como resultado de estas conexiones, las fuerzas de fricción se distribuyen desde una región en una capa celular a toda la capa de células epiteliales y proporcionan fuerza y rigidez al epitelio. Sin el sostén del retículo de filamentos intermedios, el epitelio permanecería intacto, pero las células serían fácilmente dañadas por fuerzas abrasivas. Al igual que los microfilamentos de actina, que se fijan a un tercer tipo de uniones celulares en las células epiteliales, los filamentos intermedios forman un marco flexible, pero elástico, que brinda soporte estructural al epitelio.

La alteración de las redes de queratina produce ampollas

La epidermis es una capa externa de tejido resistente que actúa como barrera impermeable al agua para impedir la desecación y sirve como protección contra la abrasión. En las células de la epidermis, los haces de filamentos de queratina están unidos mediante enlaces cruzados de *filagrina,* una PAFI, y están anclados en sus extremos a los desmosomas. A medida que las células epidérmicas se diferencian, se condensan y mueren, pero los filamentos de queratina permanecen intactos y forman el centro estructural de la capa queratinizada muerta de la piel. La integridad estructural de la queratina es esencial para que esta capa resista la abrasión.

MEDICINA

En ratones y seres humanos, las isoformas de queratina K4 y K14 forman heterodímeros que se ensamblan para formar protofilamentos. Un mutante K14 con deleciones en los dominios N y C terminales puede formar heterodímeros in vitro, pero es incapaz de ensamblarse en protofilamentos. La expresión celular de estas proteínas de queratina mutantes induce la ruptura de los retículos de FI en agregados. Los ratones transgénicos que expresan una proteína mutante K14 en las células progenitoras basales de la epidermis presentan notables anomalías cutáneas, sobre todo ampollas en la epidermis similares a la enfermedad cutánea humana *epidermólisis ampollar simple*. El análisis histológico de la zona con ampollas muestra una incidencia elevada de células basales muertas. La muerte de estas células parece causada por traumatismos mecánicos como consecuencia del frotamiento de la piel durante el movimiento de las extremidades. Sin los haces normales de filamentos de queratina, las células basales mutadas son frágiles y se lesionan con facilidad, lo que induce la delaminación y la formación de ampollas en las capas epidérmicas suprayacentes (fig. 19-37). Al igual que los filamentos de desmina en el tejido muscular de sostén, los filamentos de queratina parecen desempeñar un papel general en el mantenimiento de la integridad estructural de los tejidos, al reforzar de manera mecánica las conexiones entre las células. ▮



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 19-37 Un ratón transgénico portador de una mutación en un gen de queratina muestra un ampollado similar a la enfermedad humana llamada epidermólisis ampollar simple. Cortes histológicos a través de la piel de un ratón normal y uno transgénico portador del gen K14 de queratina mutante. En el ratón normal la epidermis presenta una capa epidérmica dura externa que cubre la capa dérmica blanda interna. En cambio, en la piel de los ratones transgénicos, las dos capas se encuentran separadas (flecha) a causa de la debilidad de las células basales de la epidermis. (De P. Coulombe, et al 1991 *Cell*; 66:1301; cortesía de E. Fuchs.)

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 19.5

Filamentos intermedios

- Los filamentos intermedios sólo se encuentran en las células que presentan una organización multicelular. Una de sus funciones esenciales es distribuir las fuerzas de tensión a través de las células de un tejido.
- A diferencia de los microtúbulos y los microfilamentos, los filamentos intermedios se ensamblan a partir de un gran número de distintas proteínas de FI. Éstas se clasifican en cuatro grandes grupos, sobre la base de sus secuencias y distribución tisular. Las laminas se expresan en todas las células, mientras que los demás tipos lo hacen en tejidos específicos (véase cuadro 19-4).
- Es probable que el ensamblaje de los filamentos intermedios tenga lugar a través de varias estructuras intermedias que se asocian mediante interacciones laterales y extremo a extremo (véase fig. 19-33).
- A pesar de que los filamentos intermedios son mucho más estables que los microfilamentos y los microtúbulos, intercambian subunidades a través de un *pool* soluble.
- La fosforilación de los filamentos intermedios en la mitosis temprana conduce a su desensamblaje; éstos se reensamblan en la mitosis tardía después de la desfosforilación de las subunidades.
- La organización de los filamentos intermedios en retículos y haces, mediada por distintas PAFI, proporciona estabilidad estructural a las células. Las PAFI también forman enlaces cruzados entre los filamentos intermedios y las membranas plasmática y nuclear, los microtúbulos y los microfilamentos.
- Importantes enfermedades degenerativas de la piel, el músculo y las neuronas son causadas por alteraciones del citoesqueleto de FI o de sus conexiones con otras estructuras celulares.

PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO

Dado que la lista de proteínas codificadas por el genoma crece cada vez más, uno de los principales desafíos es comprender cómo contribuyen a la motilidad intracelular y a los movimientos celulares. Históricamente, los conocimientos sobre la movilidad se construyeron sobre bases bioquímicas y estructurales. Se identificó a los componentes bioquímicos mayoritarios del citoesqueleto de actina y se descubrió su papel en la definición de la estructura del citoesqueleto y su regulación. Sin embargo, la motilidad es un proceso dinámico en el cual la función también se construye sobre bases mecánicas.

La dinámica implica cambios en la estructura con el tiempo e incluye el movimiento de proteínas y estructuras proteicas. A partir de las leyes físicas de Newton, se sabe que el movimiento está ligado con fuerzas, pero recién ahora estamos adquiriendo la capacidad para estudiarlo a nivel celular y molecular. Mucho cambió desde los estudios pioneros de los fisiólogos musculares, que midieron las fuerzas contráctiles de las fibras musculares mediante el registro de tensión, y de los experimentos de los fisiólogos celulares, que estimaron la fuerza del anillo contráctil a partir de la flexión de agujas de vidrio. Estas primeras investigaciones condujeron directamente a los estudios modernos que incorporan técnicas físicas elegantes, como las trampas ópticas, capaces de medir fuerzas del orden de piconewtons o que deducen la rigidez a partir de imágenes de microtúbulos y microfilamentos doblándose contra objetos no movibles. En el corazón de estos descubrimientos yace la capacidad del microscopio óptico para mostrar un único tipo de molécula y para observar la unión de ligandos individuales y la acción de enzimas sobre nucleótidos individuales.

Pero para comprender totalmente el movimiento de una célula es necesario medir las fuerzas dentro de ella. Todavía no se han inventado métodos in vivo para hacerlo. ¿Qué se precisa? Un sensor mecánico, desarrollado quizás a partir de una proteína fluorescente, que sea capaz de cambiar la fluorescencia cuando se aplica una fuerza. Este tipo de tecnología sería análoga a los experimentos en los cuales la actina marcada fluorescentemente fue microinyectada en una célula viva y los científicos pudieron observar por primera vez el mecanismo de "cinta rodante" del citoesqueleto de actina en el borde director de las células.

Un segundo desafío es comprender cómo una célula se mueve en su ambiente natural, entre capas de células en una matriz extracelular tridimensional. La historia de la motilidad celular está formada por estudios de células que se mueven sobre superficies planas. El mundo plano impone una geometría en la cual las interacciones con el sustrato se dan a través de adhesiones en la superficie ventral de la célula mientras que la superficie libre, que no interacciona, define una superficie dorsal. Consideremos en cambio, el movimiento a través de una matriz formada por un gel. Cuando las células están rodeadas por una matriz, pierden su forma estereotípica plana y adoptan una forma de huso tubular. Con adhesiones sobre todos sus lados, las células se mueven como un tirabuzón a través del gel de moléculas de la matriz. Las adhesiones son más pequeñas que las formadas en una superficie plana, lo que dificulta aún más el estudio de las adhesiones. Las técnicas utilizadas para estimar las fuerzas que la célula debe ejercer para desplazarse en una superficie plana no pueden aplicarse a una situación tridimensional. La capacidad de las células para deformarse a través de un gel agrega varias dimensiones de complejidad a la comprensión de cómo se acoplan la movilidad y la adhesión celular.

PALABRAS CLAVE

Actina F *781*
Actina G *781*
Concentración crítica *785*
Cinasa de LC de miosina *799*
Citoesqueleto *779*
Dominios cabeza de miosina *791*
Dominios cola de miosina *793*
Ensayo de filamento deslizante *793*
Filamentos delgados *797*
Filamentos gruesos *797*
Filamentos intermedios *779*
Haces contráctiles *796*
Laminas *806*
Lamelipodios *800*
Locomoción celular *800*
Microfilamentos *779*
Mecanismo de "cinta rodante" *786*
Plaquinas *810*
Profilina *787*
Proteínas motoras *779*
Proteínas relacionadas con la actina (Arp) *788*
Sarcómero *797*
Superfamilia de dominios homólogos de la calponina *782*
Timosina β_4 *786*
Queratinas *807*
Quimiotaxis *804*

REVISIÓN DE CONCEPTOS

1. Los filamentos de actina tienen una polaridad definida. ¿Qué es la polaridad de un filamento? ¿Cómo se genera a nivel de las subunidades? ¿Cómo se puede detectar la polaridad de un filamento?

2. En las células, los filamentos de actina forman haces, retículos o ambos. ¿Cómo pueden las células formar esas estructuras y qué determina específicamente si los filamentos de actina forman haces o retículos?

3. La compresión del ensamblaje de actina en la célula deriva de experimentos in vitro que utilizan actina purificada. ¿Qué técnicas pueden utilizarse para estudiar el ensamblaje de actina in vitro? Explique cómo trabaja cada técnica.

4. La forma predominante de actina dentro de la célula es actina G-ATP y actina F-ADP. Explique cómo la interconversión de estado de los nucléotidos se acopla al ensamblaje y desensamblaje de las subunidades de actina. ¿Cuál sería la consecuencia para los filamentos de actina si una mutación inhibiera la capacidad de la actina para fijar ATP? ¿ Cuál sería la consecuencia si la mutación inhibiera la actividad de la actina para hidrolizar ATP?

5. Se cree que los filamentos de actina del borde director de una célula que se desplaza sufren un mecanismo de cinta rodante. ¿Qué es ese mecanismo y qué acontece por ese comportamiento del ensamblaje?

6. A pesar de que la actina purificada puede ensamblarse reversiblemente in vitro, varias proteínas fijadoras de actina regulan el ensamblaje de los filamentos de actina en la célula. Prediga el efecto en el citoesqueleto de actina celular si se microinyectan en forma independiente en la célula anticuerpos contra las siguientes proteínas: profilina, timosina β_4, gelsolina, tropomodulina y el complejo Arp2/3.

7. Hay al menos 17 tipos diferentes de miosinas. ¿Qué propiedades comparten todos los tipos y cuáles las hacen diferentes?

8. La capacidad de la miosina para desplazarse a lo largo de un filamento de actina puede observarse con la ayuda de un microscopio correctamente equipado. Describa cómo se realizan estos ensayos típicos. ¿Por qué se necesita ATP en estos ensayos? ¿Cuántos de estos ensayos deben efectuarse para determinar la dirección de movimiento de la miosina o la fuerza producida por ésta?

9. A pesar de ser estructuras menos organizadas que los sarcómeros musculares, los haces contráctiles se encuentran en las células no musculares. ¿Cuál es el propósito de los haces contráctiles en las células no musculares?

10. La contracción de ambos músculos, liso y esquelético, se dispara por un incremento de la concentración citosólica de Ca^{2+}. Compare el mecanismo por el cual cada tipo de músculo convierte el incremento de Ca^{2+} en una contracción.

11. Varios tipos celulares utilizan el citoesqueleto de actina para impulsar la locomoción a través de superficies. ¿Qué tipos de células se utilizaron como modelo para los estudios de locomoción? ¿Qué cambios morfológicos secuenciales de cada uno de estos modelos celulares exhiben las células mientras se mueven a lo largo de una superficie? ¿Cómo se encuentran involucrados los filamentos de actina en cada uno de estos cambios morfológicos?

12. Para moverse en una dirección específica, las células migratorias deben utilizar señales extracelulares para establecer qué porción de la célula actuará como el frente y cuál como la parte posterior. Describa cómo los gradientes de proteínas G y Ca^{2+} parecen estar involucrados en las vías de señalización utilizadas por las células migratorias para determinar la dirección de movimiento.

13. A diferencia de los filamentos de actina, los filamentos intermedios no exhiben polaridad. Explique cómo la estructura de las subunidades de filamentos intermedios y la rela-

ción entre las subunidades ensambladas en un filamento intermedio producen falta de polaridad de un filamento.

14. Comparados con los filamentos de actina, los filamentos intermedios son relativamente más estables; sin embargo, las células pueden inducir el desensamblaje de los filamentos intermedios si es necesario. ¿Cómo ocurre este desensamblaje y por qué es necesario?

15. Las células animales contienen proteínas que se pueden considerar proteínas asociadas con filamentos intermedios. Se identificaron varias de ellas. ¿Qué funciones llevan a cabo estas proteínas en las células? ¿A qué otras estructuras celulares se unen las proteínas asociadas con los filamentos intermedios?

ANÁLISIS DE LOS DATOS

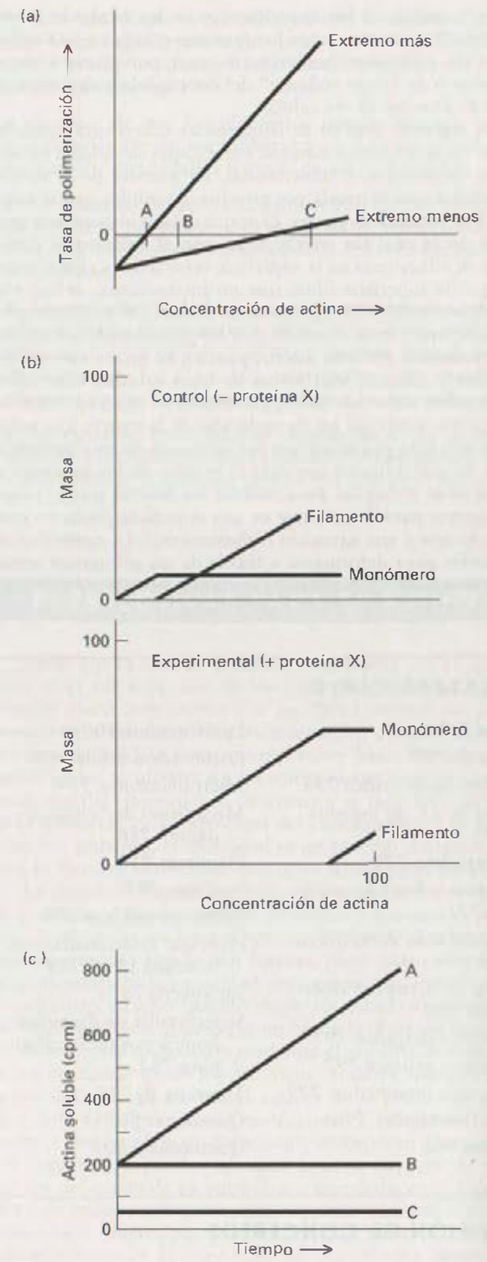
La comprensión de los filamentos de actina ha sido muy facilitada por la capacidad de los científicos para purificar actina y proteínas fijadoras de actina, y por la capacidad de la actina para ensamblarse in vitro. A continuación se presentarán varias aproximaciones experimentales diseñadas para caracterizar el ensamblaje de actina y los efectos de las proteínas fijadoras de actina en el ensamblaje.

a. El gráfico en la parte (a) de la figura representa la tasa de polimerización de actina en los extremos más (+) y menos (-) de la actina de conejo, en función de la concentración de actina. Suponga que se pueden agregar filamentos de actina de un largo predefinido, a la actina de conejo mantenida en las concentraciones marcadas A, B y C en la figura. Diagrame la apariencia de los filamentos después de una incubación de 10 minutos en cada una de las concentraciones de actina marcadas, si el filamento original se representa de la siguiente manera:

Fragmento original: + _____ –

Asegúrese de marcar en su diagrama la ubicación original de los extremos (+) y (-) del filamento.

b. Una proteína nueva de fijación a actina (X) se sobreexpresa en cierto tipo de cánceres muy malignos. A usted le gustaría averiguar si la proteína X recubre los filamentos de actina en el extremo (+) o (-). Usted incuba, bajo condiciones que producen la polimerización, un exceso de proteína X con varias concentraciones de actina G. Las muestras control las incuba en ausencia de proteína X. Los resultados se muestran en la parte (b) de la figura. ¿Cómo puede concluir a partir de estos datos que la proteína X se une al extremo (+) de los filamentos de actina? Diseñe un experimento utilizando fragmentos de miosina S1 y un microscopio electrónico, para corroborar la conclusión que la proteína X se une al extremo (+). ¿Qué resultados podría esperar si esta conclusión fuera correcta?



c. Se desarrolló un sistema in vitro para estudiar el ensamblaje y desensamblaje de actina en células no musculares. En este estudio, las células cultivadas son incubadas por varias horas con [^{35}S] metionina para que se marcaran todos los monómeros de actina de cada filamento. Los filamentos de actina se colectaron luego por centrifugación diferencial y se los puso en una solución buffer que contenía uno de tres diferentes extractos citosólicos (A, B o C). La cantidad de actina soluble de cada muestra se controló a través del tiempo (véase parte (c) de la fig.). ¿Qué indican estos datos sobre los efectos de A, B y C en el ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina?

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía general

Bray, D. 2001. Cell Movements. Garland.

Howard, J. 2001. The Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton. Sinauer.

Kreis, T., and R. Vale. 1999. Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins. Oxford University Press.

Sitios Web

The following site contains links to laboratories that study the cytoskeleton

http:/vlib.org/Science/Cell_Biology/labs.shtml

Actin-centric sites containing all things actin

http://www.bms.ed.ac.uk/research/others/smaciver/Cyto-Topics/Topics.htm

http://expmed.bwh.harvard.edu/main/resources.html#cytoskeleton

The myosin home page

http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/myosin/myosin.html

The cytokinetic mafia home page—all things cytokinetic

http://www.unc.edu/depts/salmlab/mafia/mafia.html

Estructuras de actina

Bretscher, A. 1999. Regulation of cortical structure by the ezrinradixin-moesin protein family. Curr. Opin. Cell Biol. 11:109-116.

Furukawa, R., and M. Fechheimer. 1997. The structure, function, and assembly of actin filament bundles. Int'l. Rev. Cytol. 175:29-90.

McGough, A. 1998. F-actin-binding proteins. Curr. Opin. Struc. Biol. 8:166-176.

Sheterline, P., J. Clayton, and J. C. Sparrow. 1995. Protein profile. Actin 2:1-103.

Stossel T. P., et al.2001. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. Nature Rev. Cell Biol. 2(2):138-145.

Stradal, T., W Kranewitter, S. J. Winder, and M. Gimona. 1998. CH domains revisited. FEBS Lett. 431:134-137.

Dinámica del ensamblaje de actina

Cameron, L. A., P. A. Giardini, F. S. Soo, and J. A. Theriot. 2000. Secrets of actin-based motility revealed by a bacterial pathogen. Nature Rev Mol. Cell Biol. 1:110-119.

Cooper, J. A., and D. A. Schafer. 2000. Control of actin assembly and disassembly at filament ends. Curr. Opin. Cell Biol. 12:97-103.

Higgs, H. N., and T. D. Pollard. 2000. Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. Ann. Rev. Biochem. 70:619-676.

Kwiatkowski, D. J. 1999. Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer Curr. Opin. Cell Biol. 11:103-108.

Theriot, J. A. 1997. Accelerating on a treadmill: ADF/cofilin promotes rapid actin filament turnover in the dynamic cytoskeleton. J. Cell Biol. 136:1165-1168.

Pollard, T. D., L. Blanchoin, and R. D. Mullins. 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struc. 29:545-576.

Small, J. V., T. Strada, E. Vignal, and K. Rottner. 2002. The lamellipodium: where motility begins. Trends Cell Biol. 12:112-120.

Movimientos celulares impulsados por miosina

Berg, J. S., B. C. Powell, and R. E. Cheney. 2001. A millennial myosin census. Mol. Biol. Cell 12:780-794.

Bresnick, A. R. 1999. Molecular mechanisms of nonmuscle myosin: II. Regulation. Curr. Opin. Cell Biol. 11:26-33.

Buss, F., J. Luzio, and J. Kendrick-Jones. 2002. Myosin VI, an actin motor for membrane traffic and cell migration. Traffic 3:851-858.

Field, C., R. Li, and K. Oegema. 1999. Cytokinesis in eukaryotes: a mechanistic comparison. Curr. Opin. Cell Biol. 11:68-80.

Gregorio, C. C., H. Granzier, H. Sorimachi, and S. Labeit. 1999. Muscle assembly: a titanic achievement? Curr. Opin. Cell Biol. 11:18-25.

Mermall, V., P. L. Post, and M. S. Mooseker. 1998. Unconventional myosin in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. Science 279:527-533.

Rayment, I. 1996. The structural basis of the myosin ATPase activity. J. Biol. Chem. 271:15850-15853.

Simmon, R. 1996. Molecular motors: single-molecule mechanics. Curr. Biol. 6:392-394.

Squire, J. M., and E. P. Morris. 1998. A new look at thin filament regulation in vertebrate skeletal muscle. FASEB J. 12:761-771.

Vale, R. D., and R. A. Milligan. 2000. The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. Science 288: 88-95.

Locomoción celular

Borisy, G. G., and T. M. Svitkina. 2000. Actin machinery: pushing the envelope. Curr. Opin. Cell Biol. 12:104-112.

Chung, C. Y., S. Funamoto, and R. A. Firtel. 2001. Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis. Trends Biochem. Sci. 26:557-566.

Condeelis, J. 2001. How is actin polymerization nucleated in vivo? Trends Cell Biol. 11:288-93.

Hall, A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. Science 279:509-514.

Pettit, E. J., and F. S. Fay. 1998. Cytosolic free calcium and the cytoskeleton in the control of leukocyte chemotaxis. Physiol. Rev. 78:949-967.

Pollard, T. D., and G. G. Borisy. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. Cell 112:453-465.

Welch, M. D., A. Mallavarapu, J. Rosenblatt, and T. J. Mitchison. 1997. Actin dynamics in vivo. Curr. Opin. Cell. Biol. 9:54-61.

Filamentos intermedios

Coulombre, P. A., and B. M. Omary. 2002. "Hard" and "Soft" principles defining the structure, function, and regulation of keratin intermediate filaments. Curr. Opin. Cell Biol. 14:110-122.

Fuchs, E., and D. W. Cleveland. 1998. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. Science 279:514-519.

Leung, C. L., K. J. Green, and R. K. Liem. 2002. Plakins: a family of versatile cytolinker proteins. Trends Cell Biol. 12:37-45.

Stuurman, N., S. Heins, and U. Aebi. 1998 Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. J. Struc. Biol. 122:42-66.

20
MICROTÚBULOS



Una película con imágenes obtenidas cada 3 segundos registra el movimiento impulsado por cinesina de una vesícula a lo largo de un microtúbulo. [De N. Pollack y col., *1999 J. Cell Biol.*; 147:493-506; cortesía de R. D. Vale.]

En el capítulo 19 se describieron los microfilamentos y los filamentos intermedios, dos de los tres tipos de fibras del citoesqueleto y sus proteínas asociadas. Este capítulo está dedicado al tercer sistema del citoesqueleto, los **microtúbulos**. Como los microfilamentos, los microtúbulos participan en ciertos movimientos celulares, como los de cilios y flagelos, y en el transporte de vesículas en el citoplasma. Estos movimientos son resultado de la polimerización y la despolimerización de microtúbulos o de los efectos de proteínas motoras de éstos. Para algunos otros movimientos celulares, como la alineación y la separación de los cromosomas en la meiosis y la mitosis se necesitan ambos procesos (véase fig. 9-3). Los microtúbulos también dirigen la migración de los axones neuronales, guiando la prolongación del cono de crecimiento neuronal.

Además de contribuir con la motilidad celular, los microtúbulos tienen un papel importante en la organización de la célula, por medio de una estructura especial denominada **centro de organización de microtúbulos**, o **MTOC**. Localizado cerca del núcleo, el MTOC dirige el ensamblaje y orientación de los microtúbulos, la dirección del desplazamiento de vesículas y la orientación de los orgánulos. Debido a que los orgánulos y las vesículas se transportan a lo largo de los microtúbulos, el MTOC es responsable de establecer la polaridad de la célula y la dirección de los procesos citoplasmáticos en las células en interfase y en mitosis (fig. 20-1).

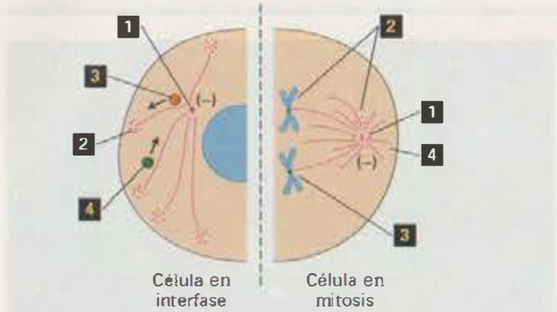
En esta exposición se retoman los principios generales aprendidos en el capítulo 19 sobre la estructura y la función de los microfilamentos del citoesqueleto, y se muestra cómo muchos de sus conceptos también se aplican a los microtúbulos. El capítulo comienza con un examen de la estructura y el ensamblaje de los microtúbulos, y luego se explica cómo el ensamblaje y las proteínas motoras del microtúbulo pueden impulsar los movimientos celulares. La descripción acerca de los microtúbulos concluye con un examen detallado de la translocación de los cromosomas en la mitosis. Aunque los microtúbulos, los microfilamentos y los filamentos intermedios se describen en forma individual, los tres sistemas del citoesqueleto no actúan de forma por completo independiente. Un ejemplo importante de su interdependencia puede encontrarse en la división celular, cuando la interacción entre los microfilamentos de actina y los microtúbulos determina el plano de división.

CONTENIDO

20.1 Organización y dinámica de los microtúbulos

20.2 Movimientos impulsados por cinesina y dineína

20.3 Dinámica de los microtúbulos y proteínas motoras en la mitosis



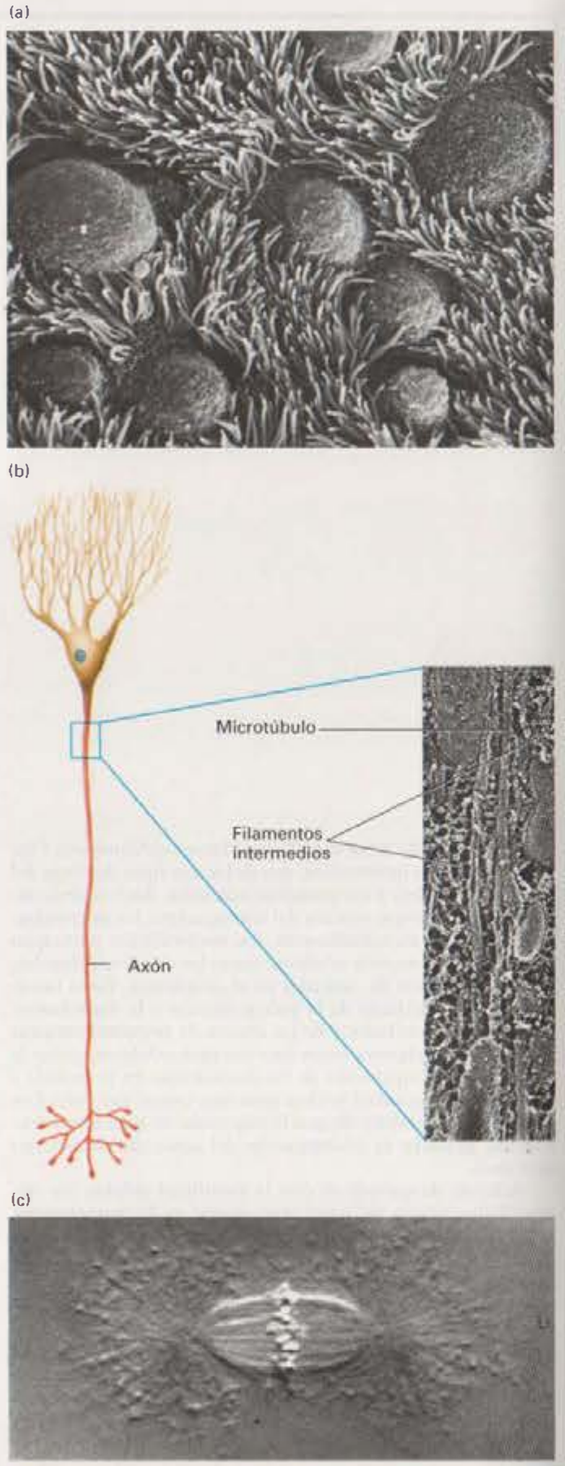
COMPONENTE DEL CITOESQUELETO		FUNCIÓN CELULAR
1	MTOC, polo del huso	Organización de la polaridad celular
2	Dinámica de los microtúbulos	Movimientos de los cromosomas Ensamblaje de MT
3	Motores de cinesina	Transporte de vesículas y cromosomas dirigido al extremo (+)
4	Motores de dineína	Transporte de vesículas dirigido al extremo (–) Ensamblaje del huso

▲ Fig. 20-1. Los microtúbulos (en rojo) organizados alrededor del MTOC y los polos del huso (1) establecen una polaridad interna de los movimientos y las estructuras en la célula en interfase (*izquierda*) y en la célula en mitosis (*derecha*). El ensamblaje y el desarmado (2) hacen que los microtúbulos sondeen el citoplasma celular y funcionen como un aparejo para desplazar los cromosomas durante la mitosis. El movimiento a largas distancias de las vesículas (3 y 4) es impulsado por los motores de cinesina y dineína. Ambos motores son fundamentales para el ensamblaje del huso y la separación de los cromosomas en la mitosis.

20.1 Organización y dinámica de los microtúbulos

Un microtúbulo es un polímero de subunidades de **tubulina** globular, organizadas en forma de tubo cilíndrico de 25 nm de diámetro, o sea, más del doble del espesor de un filamento intermedio y el triple de un microfilamento (véase fig. 5-29). La longitud de los microtúbulos varía desde una fracción de micrón a centenares de micrones, y son mucho más rígidos que los microfilamentos o los filamentos intermedios debido a su estructura tubular. Una consecuencia de este diseño tubular es su capacidad de generar fuerzas de propulsión sin doblarse, propiedad que es fundamental para el movimiento de los cromosomas y el huso mitótico durante la mitosis.

Las células contienen dos poblaciones de microtúbulos: los microtúbulos estables, de larga vida, y los inestables, de vida corta. Por lo general, los primeros se encuentran en las células que no se dividen e incluyen al haz central de microtúbulos de los **cilios** y los **flagelos**, que son prolongaciones de la membrana plasmática con un movimiento ondulante rítmico destinado a transportar materiales sobre superficies epiteliales, que permite el desplazamiento de los espermatozoides o transporta un óvulo a través del oviducto (fig. 20-2a). Una banda marginal de microtúbulos estables presentes en algunos eritrocitos y plaquetas permite a estas células atravesar los vasos sanguíneos pequeños. Otro ejemplo lo constituyen las células nerviosas (neuronas) que deben mantener largas prolongaciones denominadas axones (véase fig. 7-29). Un núcleo interno de microtúbulos estables existente en los axones no solo soporta su estructura, sino que también proporciona vías a lo largo de las que se desplazan vesículas a través del citoplasma del axón (fig. 20-2b). La desorganización de estas estructuras estables tendría consecuencias catastróficas: los espermatozoides serían incapaces de desplazarse, los eritrocitos perderían su flexibilidad elástica y los axones se retraerían.



◀ FIGURA EXPERIMENTAL 20-2 Para visualizar estructuras de microtúbulos estables y transitorias se usan diversas técnicas microscópicas. (a) Superficie del epitelio ciliado que tapiza el oviducto del conejo vista con el microscopio electrónico de barrido. Los cilios que contienen microtúbulos cubren las células ciliadas, y las microvellosidades que contienen actina pueblan la superficie de las células secretorias. El movimiento rítmico de los cilios impulsa un huevo en dirección descendente por el oviducto. (b) Microtúbulos y filamentos intermedios en un axón de rana congelado con rapidez, visualizados por la técnica de grabado profundo (*derecha*). Pueden verse varios microtúbulos de 24 nm de diámetro y filamentos intermedios más delgados, de 10 nm de diámetro. Ambos tipos de fibras se orientan en sentido longitudinal; están unidos por uniones cruzadas con diversas proteínas. (c) Aparato mitótico aislado visualizado por microscopia de contraste de interferencia diferencial. El huso y los ásteres, que son fundamentales para llevar los cromosomas hacia los polos, están compuestos de microtúbulos transitorios que se ensamblan al comienzo de la mitosis y se desarman cuando ésta termina. [Parte (a) de R. G. Kessels y R. H. Kardon, 1975. *Tissues and Organs*. W. H. Freeman and Company. Parte (b) de N. Hirokawa, 1982, *J. Cell Biol.* 94:129; cortesía de N. Hirokawa. Parte (c) de E. D. Salmon y R. R. Segall, 1980, *J. Cell Biol.* 86:355.]

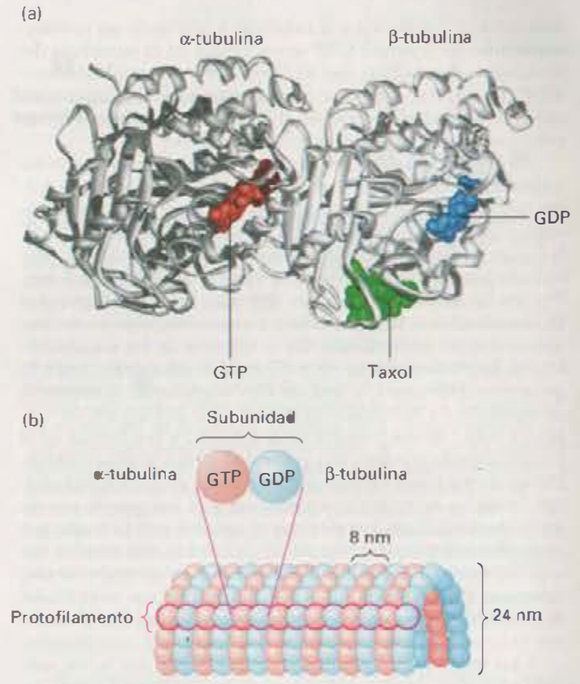
Al contrario de lo que sucede con estas estructuras permanentes, estables, los microtúbulos inestables se encuentran en células que necesitan montar y desmontar con rapidez las estructuras formadas por microtúbulos. Por ejemplo, durante la mitosis, la red de microtúbulos del citosol característica de las células en interfase se desarma y la tubulina proveniente de ella se usa para formar el aparato fusiforme que reparte los cromosomas en partes iguales a las células hijas (fig. 20-2c). Cuando la mitosis se completa, el huso se desarma y se forma de nuevo la red de microtúbulos de la interfase.

Antes de comenzar con la descripción de los movimientos basados en microtúbulos, se estudiará el armado, el desarmado y la polaridad de los microtúbulos, así como un grupo de proteínas que forman parte integral de ellos. Una propiedad importante de los microtúbulos es la oscilación entre las fases de crecimiento y acortamiento. Este comportamiento dinámico complejo permite a las células armar y desarmar estructuras de microtúbulos con rapidez.

Subunidades heterodiméricas de tubulina componen la pared de los microtúbulos

La unidad de construcción de un microtúbulo es la subunidad de tubulina, un heterodímero de α-tubulina y β-tubulina. Estos dos monómeros de peso molecular 55.000 se encuentran en todos los eucariontes y sus secuencias están muy conservadas. Aunque una tercera tubulina, la γ-tubulina, no forma parte de la subunidad de tubulina, es probable que nuclee la polimerización de las subunidades para formar α, β-microtúbulos. Codificadas por genes distintos, la tres tubulinas muestran homología con una GTPasa bacteriana de peso molecular 40.000, denominada FtsZ (véase fig. 5-30b). Como la tubulina, esta proteína bacteriana tiene la capacidad de polimerizar y participa en la división celular. Quizá la proteína que lleva a cabo estas funciones ancestrales en las bacterias se modificó en el curso de la evolución para cumplir las diversas funciones de los microtúbulos en los eucariontes.

Cada subunidad de tubulina se une a dos moléculas de GTP. Un sitio de unión al GTP, localizado en la α-tubulina, se une de forma irreversible al GTP y no lo hidroliza. El segundo sitio, localizado en la β-tubulina, se une al GTP de forma reversible y lo hidroliza a GDP. Por consiguiente, la tubulina es una GTPasa similar a la proteína FtsZ bacteriana. En la estructura atómica de la subunidad de tubulina, el GTP unido a la α-tubulina queda atrapado en la interfase entre los



▲ Fig. 20-3. Estructura de los monómeros de tubulina y su organización en microtúbulos. (a) Diagrama de cintas de la subunidad dimérica de tubulina. El GTP (en rojo) unido al monómero de α-tubulina no es intercambiable, en tanto que el GDP (en azul) unido al monómero de β-tubulina es intercambiable por GTP. El fármaco anticanceroso taxol (en verde) se usó en estudios estructurales para estabilizar la estructura dimérica. (b) Organización de las subunidades de tubulina en un microtúbulo. Las subunidades se alinean de extremo a extremo para formar protofilamentos, que a su vez se empaquetan de lado a lado para formar la pared del microtúbulo. En este modelo, los protofilamentos están ligeramente alternados, de manera que la α-tubulina de un protofilamento está en contacto con una α-tubulina de los protofilamentos vecinos. El microtúbulo muestra polaridad estructural, de forma que las subunidades se agregan en mayor medida al extremo, denominado extremo (+), en el que se exponen los monómeros de β-tubulina. [Parte (a) modificada de E. Nogales et al., 1998, *Nature* 391:199; cortesía de E. Nogales. Parte (b) adaptado de Y. H. Song y E. Mandelkow, 1993, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:1671.]



▲ **Fig. 20-4. Disposición de los protofilamentos en singuletes, dobletes y tripletes de microtúbulos.** En un corte transversal, un microtúbulo típico, un singulete, es un tubo simple constituido por 13 protofilamentos. En un doblete de microtúbulos, un juego adicional de 10 protofilamentos forma un segundo túbulo (B) por fusión a la pared de un singulete (A). La unión de otros 10 protofilamentos al túbulo B de un doblete de microtúbulos crea un túbulo C y una estructura en triplete.

monómeros α-tubulina y β-tubulina, y por ende no es intercambiable. El segundo GTP se encuentra en la superficie del monómero β-tubulina; éste es libremente intercambiable con GDP (fig. 20-3a). Como se explica más adelante, la guanina unida a la β-tubulina modula el agregado de subunidades de tubulina en los extremos de un microtúbulo.

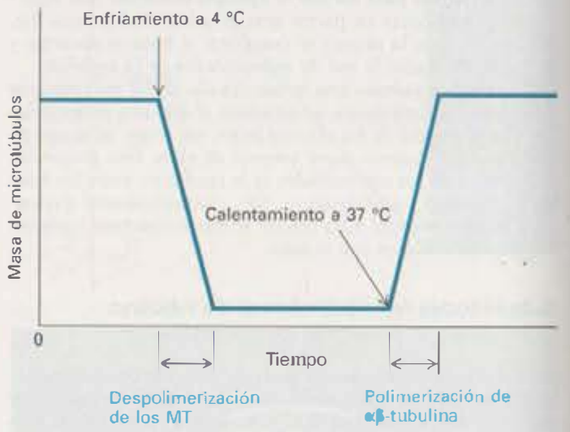
En éste las interacciones laterales y longitudinales entre las subunidades de tubulina son responsables de mantener la forma tubular. Los contactos longitudinales entre los extremos de subunidades adyacentes unen las subunidades "cabeza con cola" para formar un *protofilamento* lineal. Dentro de cada protofilamento las subunidades diméricas se repiten cada 8 nm. Por medio de las interacciones laterales, los protofilamentos se asocian uno al lado del otro y forman una hoja o un cilindro, o sea, un microtúbulo. En la mayoría de los microtúbulos los heterodímeros de protofilamentos adyacentes están ligeramente alternados, y forman filas sesgadas de monómeros de α-tubulina y β-tubulina en la pared. La disposición de "cabeza a cola" de los dímeros de α-tubulina y β-tubulina en el protofilamento confiere una polaridad global al microtúbulo. Debido a que todos los protofilamentos de un microtúbulo tienen la misma orientación, un extremo está compuesto por un anillo de α-tubulina, en tanto que el opuesto está formado por un anillo de β-tubulina (fig. 20-3b). Como sucede con los microfilamentos de actina, los dos extremos de un microtúbulo, denominados extremos (+) y (–), difieren en sus velocidades de ensamblaje y en sus concentraciones críticas (C_c). El extremo (+) corresponde al extremo β-tubulina del microtúbulo.

Casi todos los microtúbulos de una célula son tubos simples, *singuletes de microtúbulos*, constituidos por 13 protofilamentos. En casos raros los singuletes contienen más o menos protofilamentos; por ejemplo, ciertos microtúbulos de las neuronas de los nematodos contienen 11 o 15 protofilamentos. Además de la estructura simple del singulete, se encuentran *dobletes* o *tripletes* de microtúbulos en estructuras especializadas, como los cilios y los flagelos (dupletes de microtúbulos), y en los centríolos y el cuerpo basal (tripletes de microtúbulos). Cada doblete o triplete contiene un microtúbulo completo de 13 protofilamentos (túbulo A) y uno o dos túbulos adicionales (B y C) de 10 protofilamentos (fig. 20-4).

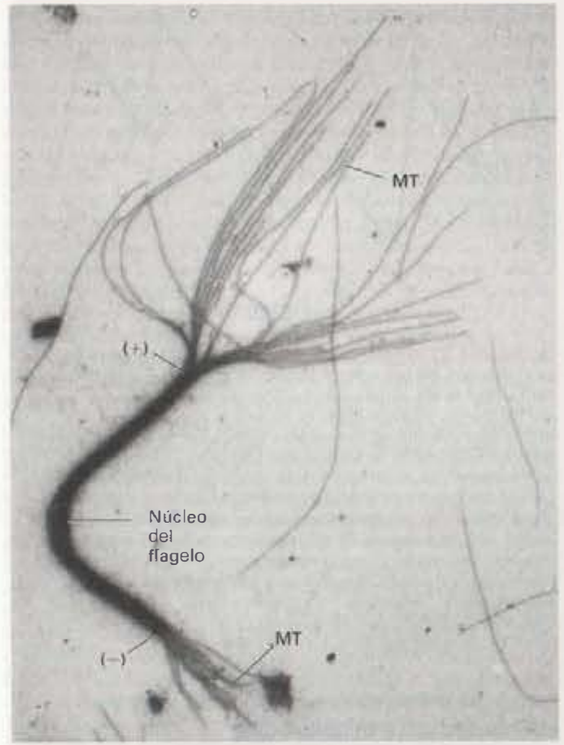
El ensamblaje y el desarmado de los microtúbulos tiene lugar en mayor medida en el extremo (+)

Los microtúbulos se ensamblan por la polimerización de la αβ-tubulina dimérica. El ensamblaje y la estabilidad de los microtúbulos dependen de la temperatura. Por ejemplo, si los microtúbulos se enfrían a 4 °C, se despolimerizan en dímeros de αβ-tubulina (fig. 20-5). Cuando se calienta a 37 °C en presencia de GTP, los dímeros de tubulina se polimerizan para formar microtúbulos. Los ciclos de calentamiento y enfriamiento son pasos clave para purificar microtúbulos y sus proteínas asociadas a partir de extractos celulares.

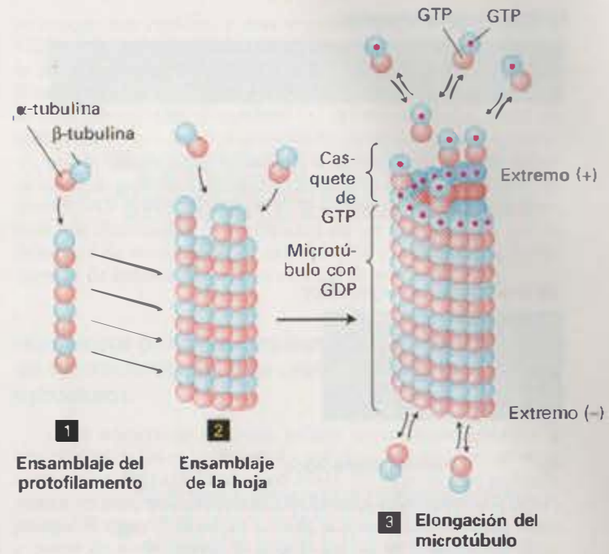
La polimerización de la tubulina tiene varias propiedades en común con la polimerización de la actina para formar microfilamentos. En primer lugar, a concentraciones de αβ-tubulina superiores a la *concentración crítica* (C_c), los dímeros se polimerizan para formar microtúbulos, en tanto que a concentraciones por debajo de la C_c, los microtúbulos se despolimerizan, en forma similar al comportamiento de la G-actina y la F-actina (véase fig. 19-7). Segundo, el nucleótido, GTP o GDP, unido a la β-tubulina hace que la concentración crítica (C_c) para el ensamblaje en los extremos (+) y (–) de un microtúbulo sea diferente. Por la analogía con el ensamblaje de la F-actina, el extremo preferido para el ensamblaje se denomina extremo (+). Tercero, con concentraciones de αβ-tubulina superiores a la C_c para la polimerización, los dímeros se agregan en mayor medida al extremo (+). Cuarto, cuando la concentración de αβ-tubulina es más elevada que la C_c del extremo (+), pero menor que la C_c del (–), los microtúbulos pueden *crecer en una sola dirección* agregando subunidades a un extremo y disociando subunidades en el extremo opuesto (véase fig. 19-9). Debido a que la concentración intracelular de tubulina capaz de ensamblarse (10-20 μM) es mucho más alta que la concentración crítica (C_c) para el ensamblaje (0,03 μM), la polimerización está muy favorecida en la célula. Por último, la velocidad inicial de polimerización de la tubulina se acelera en presencia de núcleos, es decir, de estructuras o fragmentos formados por microtúbulos (fig. 20-6).



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 20-5 La temperatura determina si los microtúbulos (MT) se ensamblan o desarman.** A temperaturas bajas los microtúbulos se despolimerizan, liberando αβ-tubulina, que se repolimeriza a temperaturas más altas en presencia de GTP.

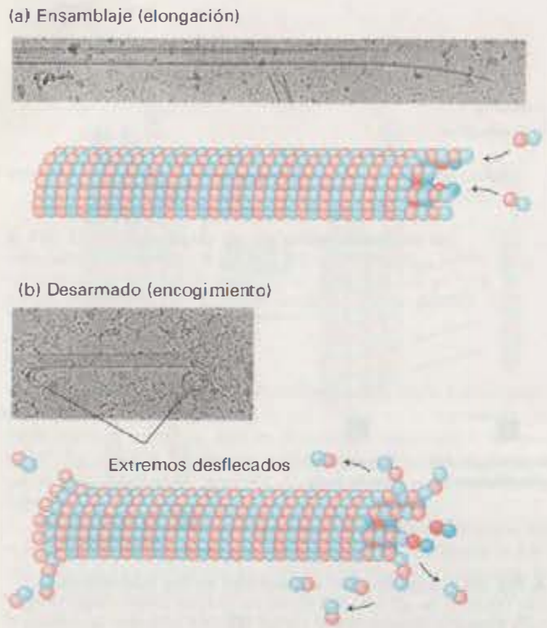


▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 20-6 El agregado de fragmentos de microtúbulos muestra la polaridad de la polimerización de la tubulina.** Los fragmentos de microtúbulos flagelares actúan como núcleos para el agregado in vitro de αβ-tubulina. El fragmento flagelar que actúa como núcleo puede distinguirse con el microscopio electrónico de los microtúbulos recién formados (MT) que se ven divergiendo en forma radial de los extremos del fragmento flagelar. La mayor longitud de los microtúbulos en uno de los extremos indica que las subunidades de tubulina se agregan en mayor medida a este extremo. (Cortesía de G. Borisy.)

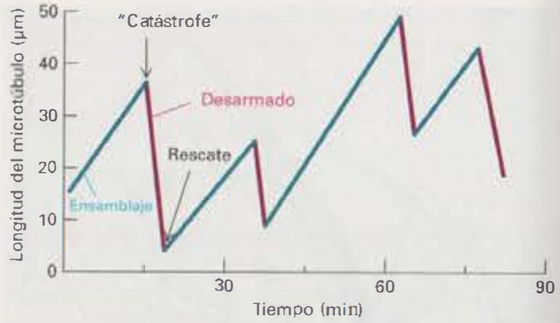


▲ **Fig. 20-7. Estadios del ensamblaje de los microtúbulos.** Los dímeros de αβ-tubulina libres se asocian longitudinalmente para formar protofilamentos cortos (1). Es probable que éstos sean inestables y se asocien con rapidez en sentido lateral en hojas curvas más estables (2). Por último, las hojas se envuelven para formar un microtúbulo con 13 protofilamentos. El microtúbulo crece luego por el agregado de subunidades a los extremos de los protofilamentos que componen la pared del microtúbulo (3). Los dímeros de tubulina libres tienen GTP (punto rojo) unido al sitio intercambiable de unión a nucleótidos del monómero de β-tubulina. Después de la incorporación de una subunidad dimérica a un microtúbulo, el GTP de la β-tubulina (pero no de la α-tubulina) se hidroliza a GDP. Si la velocidad de polimerización es más rápida que la de hidrólisis del GTP, se forma un casquete de subunidades con GTP unido en el extremo (+), aunque la mayor parte de la β-tubulina de un microtúbulo contendrá GDP. La velocidad de polimerización es dos veces más rápida en el extremo (+) que en el extremo (–).

El ensamblaje de los microtúbulos comprende tres pasos: 1) se forman protofilamentos a partir de subunidades de α β tubulina; 2) los protofilamentos se asocian para formar la pared del microtúbulo, y 3) el agregado de más subunidades a los extremos de los protofilamentos alarga el microtúbulo (fig. 20-7). Bajo el microscopio electrónico, los extremos de los microtúbulos en crecimiento con frecuencia parecen desiguales porque algunos protofilamentos se alargan con más rapidez que otros. El aspecto de los microtúbulos que sufren un acortamiento es bastante diferente, lo que sugiere que el mecanismo de desarmado difiere del de ensamblaje (fig. 20-8). En condiciones de acortamiento, los extremos del microtúbulo están deflecados, como si se hubieran perdido las interacciones laterales entre protofilamentos. Cuando se deshilachan y liberan de las interacciones estabilizadoras laterales, los protofilamentos pueden despolimerizarse por disociación de las subunidades de tubulina de su extremo. El aspecto desflecado de un microtúbulo en acortamiento indica la posible inestabilidad de los microtúbulos.



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 20-8 La criomicroscopia electrónica permite la observación de microtúbulos desarmados.** Los microtúbulos en proceso de ensamblaje (a) o desarmado (b) pueden congelarse con rapidez en etano líquido y examinarse en estado de congelación con un criomicroscopio electrónico. En condiciones de ensamblaje, los extremos del microtúbulo son relativamente parejos; en ocasiones se ve un protofilamento corto que se proyecta de un extremo. En condiciones de desarmado, los protofilamentos se despliegan desde los extremos del microtúbulo, lo que confiere un aspecto desflecado a los extremos. Es probable que el despliegue de los protofilamentos promueva la pérdida de subunidades de tubulina de sus extremos, lo que conduce al acortamiento del microtúbulo. (Microfotografías cortesía de E. Mandelkow y E. M. Mandelkow.)

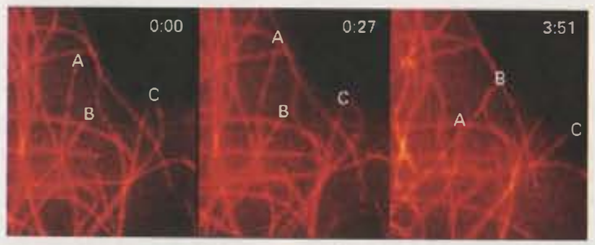


▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 20-9 La velocidad de crecimiento de los microtúbulos in vitro es mucho más lenta que la de acortamiento.** Pueden observarse microtúbulos aislados en el microscopio óptico y sus longitudes pueden representarse gráficamente en diferentes momentos durante el ensamblaje y el desarmado. El ensamblaje y el desarmado tienen lugar a velocidades uniformes, pero hay una gran diferencia entre la velocidad de ensamblaje y la de desarmado, como se ve por la pendiente de las distintas rectas. El acortamiento de un microtúbulo es mucho más rápido (7 μm/min) que el crecimiento (1 μm/min). Nótense las transiciones abruptas hacia el estadio de acortamiento "catástrofe" y hacia el estadio de elongación (rescate). [Adaptado de P. M. Bayley, K. K. Sharma y S. R Martin, 1994, en *Microtubules,* Wiley-Liss, pág. 118.]

La inestabilidad dinámica es una propiedad intrínseca de los microtúbulos

En condiciones apropiadas in vitro algunos microtúbulos oscilan entre las fases de crecimiento y acortamiento (fig. 20-9). En todos los casos la tasa de crecimiento del microtúbulo es mucho más lenta que la de acortamiento. Cuando se observó por primera vez, este comportamiento de los microtúbulos, denominado *inestabilidad dinámica*, sorprendió a los investigadores, porque esperaban que, bajo cualquier condición dada, todos los microtúbulos en solución o en el mismo citosol se comportaran de forma idéntica.

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Ensamblaje citoplasmático de microtúbulos en células cultivadas



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 20-10 La microscopia de fluorescencia revela el crecimiento y acortamiento de microtúbulos individuales in vivo.** Se hicieron microinyecciones de tubulina marcada con un colorante fluorescente en fibroblastos humanos cultivados. Las células se enfriaron para despolimerizar los microtúbulos preexistentes a dímeros de tubulina y luego se incubaron a 37 °C para permitir la repolimerización, con lo que la tubulina fluorescente se incorporó a todos los microtúbulos de la célula. Se observó una región de la periferia celular bajo el microscopio de fluorescencia a los 0 segundos, 27 segundos después y 3 minutos 51 segundos después (paneles de izquierda a derecha). En este período varios microtúbulos se alargaron y acortaron. Las letras marcan la posición del extremo de tres microtúbulos. (De P. J. Sammak y G. Borisy 1988, Nature 332:724.)

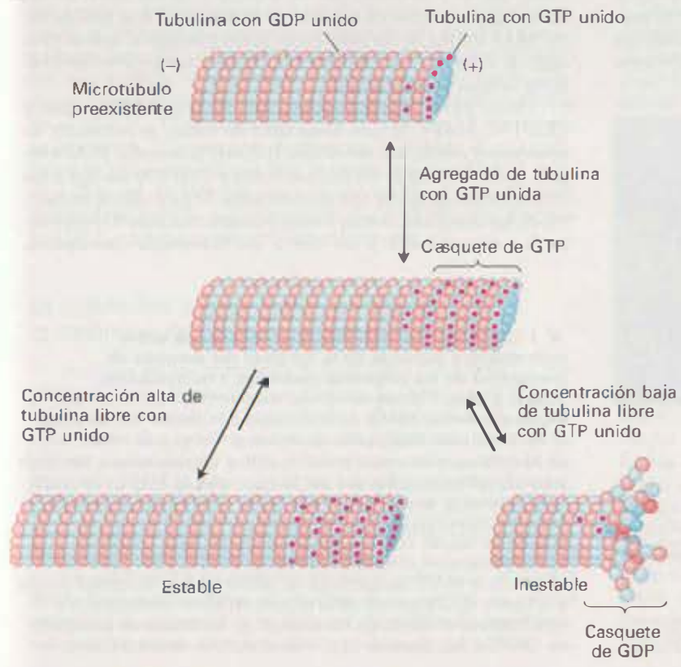
Los resultados de estudios posteriores in vivo mostraron que microtúbulos individuales, citosólicos y mitóticos, exhiben inestabilidad dinámica. En un conjunto de experimentos, subunidades de αβ-tubulina fluorescentes se microinyectaron en células vivas cultivadas. Las células se enfriaron para despolimerizar los microtúbulos preexistentes a dímeros de tubulina y luego se incubaron a 37 °C para permitir la repolimerización, incorporando así la tubulina fluorescente a todos los microtúbulos de la célula. Las grabaciones de video de regiones pequeñas de las células marcadas mostraron que algunos microtúbulos se alargaban, otros se acortaban y algunos parecían crecer y encogerse en forma alternada en un período de varios minutos (fig. 20-10). Debido a que la mayoría de los microtúbulos de una célula se asocia por su extremo (–) a un MTOC, su inestabilidad se limita en gran medida al extremo (+).

Dos condiciones influyen sobre la estabilidad de los microtúbulos. Primero, las oscilaciones entre crecimiento y encogimiento in vitro tienen lugar con concentraciones de tubulina cercanas a la C_c. Como ya se señaló, si las concentraciones de tubulina superan a la C_c toda la población de microtúbulos crece, y si se encuentran por debajo de ella, todos los microtúbulos se encogen. Sin embargo, en concentraciones cercanas a la C_c, algunos microtúbulos crecen, en tanto que otros se encogen. La segunda condición que afecta la estabilidad de los microtúbulos es si el GTP o el GDP ocupan el sitio ligador de nucleótidos intercambiables de la β-tubulina del extremo (+) de un microtúbulo (fig. 20-11). Debido a que la disociación (velocidad de "salida") de un dímero de tubulina unido a GDP es cuatro órdenes de magnitud más rápida que la de un dímero unido a GTP, un microtúbulo se desestabiliza y despolimeriza con rapidez si el extremo (+) adquiere un casquete de subunidades que contienen β-tubulina unida a GDP en lugar de unida a GTP. Esta situación puede surgir cuando un microtúbulo se encoge con rapidez, y deja expuesta la β-tubulina unida a GDP en las paredes del microtúbulo, o cuando un microtúbulo crece con tanta lentitud que la hidrólisis del GTP unido a la β-tubulina lo convierte en GDP antes de que puedan agregarse más subunidades al extremo (+) del microtúbulo. Antes de que un microtúbulo en acortamiento desaparezca por completo, puede "rescatarse" y empieza a crecer si se agregan subunidades de tubulina con GTP unido al extremo (+) antes de que el GTP unido se hidrolice. Por consiguiente, los parámetros que determinan la estabilidad de un microtúbulo son la velocidad de crecimiento, la velocidad de encogimiento, la frecuencia de catástrofes y la frecuencia de rescates.

Numerosas proteínas regulan la dinámica de los microtúbulos y su unión cruzada a otras estructuras

Gran número de proteínas influye sobre el ensamblaje y la estabilidad de los microtúbulos y sobre su asociación con otras estructuras de la célula (cuadro 20-1). Estas proteínas se denominan en conjunto **proteínas asociadas a microtúbulos** (MAP) porque la mayoría de ellas se aísla junto con los microtúbulos a partir de las células. Los resultados de estudios de localización por inmunofluorescencia también mostraron una distribución paralela de las MAP y los microtúbulos en las células, lo que constituye una prueba de peso de su interacción in vivo.

Las MAP se clasifican en dos grupos, de acuerdo con su función. Un grupo estabiliza los microtúbulos. La estructura de una MAP estabilizadora presenta dos dominios: uno básico de unión al microtúbulo y uno de proyección ácido. Bajo el microscopio electrónico, el dominio de proyección aparece como un brazo filamentoso que se extiende hacia afuera de la pared del micro-



◀ **Fig. 20-11. Modelo de inestabilidad dinámica del crecimiento y acortamiento de los microtúbulos.** Las subunidades de αβ-tubulina con GTP unido (en rojo) se agregan en mayor medida al extremo (+) de un microtúbulo preexistente. Después de la incorporación de una subunidad, el GTP (punto rojo) unido al monómero de β-tubulina se hidroliza a GDP. Solo los microtúbulos cuyos extremos (+) se asocian con GTP-tubulina (los que poseen un casquete de GTP) son estables y pueden servir como cebadores para la polimerización de más tubulina. Los microtúbulos con GDP-tubulina (azul) en su extremo (+) (los que tienen un casquete de GDP) se despolimerizan con rapidez y pueden desaparecer en el lapso de 1 minuto. Con concentraciones altas de GTP-tubulina no polimerizada, la velocidad de agregado de tubulina es más rápida que la velocidad de hidrólisis del GTP unido al microtúbulo o que la velocidad de disociación de la GTP-tubulina de los extremos del microtúbulo; por lo tanto, el microtúbulo crece. Con concentraciones bajas de GTP-tubulina no polimerizada, la velocidad de agregado de tubulina disminuye; por consiguiente, la velocidad de hidrólisis del GTP excede la de agregado de subunidades de tubulina y se forma un casquete de GDP. Debido a que el casquete de GDP es inestable, el extremo del microtúbulo se desfleca y liberan subunidades de tubulina. (Véase T. Mitchison y M. Kirschner, 1984, *Nature* 312:237; M. Kirschner y T. Mitchison, 1986, *Cell* 45:329; y R. A. Walker et al., 1988, *J. Cell Biol.* 107:1437.)

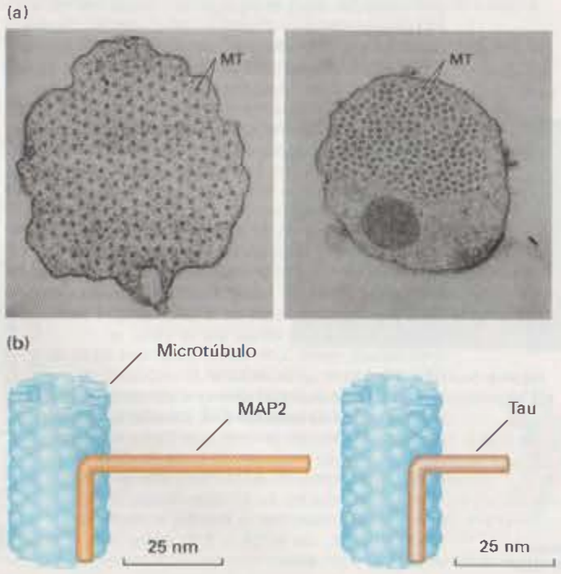
CUADRO 20-1 Proteínas que modulan la dinámica de los microtúbulos (MT)

Proteína	PM	Ubicación	Función
PROTEÍNAS ESTABILIZADORAS DE LOS MICROTÚBULOS			
MAP1	250.000-300.000 (cadena pesada)	Dendritas y axones; células no nerviosas	Ensambla y estabiliza MT
MAP2	42.000 y 200.000	Dendritas	Ensambla y establece uniones cruzadas entre MT y con filamentos intermedios
MAP4	210.000	La mayor parte de los tipos celulares	Estabiliza los MT
Tau	55.000-62.000	Dendritas y axones	Ensambla, estabiliza y establece uniones cruzadas entre MT
CLIP 170	170.000	La mayor parte de los tipos celulares	Establece uniones cruzadas entre MT y endosomas y cromosomas
PROTEÍNAS DESESTABILIZADORAS DE LOS MICROTÚBULOS			
Katanina	84.000	La mayor parte de los tipos celulares	Desarma microtúbulos
Op 18 (estatmina)	18.000	La mayor parte de los tipos celulares	Se une a dímeros de tubulina

túbulo. Este brazo puede unirse a membranas, filamentos intermedios u otros microtúbulos, y su longitud controla la distancia que separa los microtúbulos entre sí (fig. 20-12).

El dominio de unión con los microtúbulos contiene varias repeticiones de una secuencia muy conservada de cuatro aminoácidos cargados positivamente que se une al C-terminal con carga negativa de la tubulina. Se postuló que esta unión neutraliza la repulsión de cargas entre las subunidades de tubulina dentro de un microtúbulo, estabilizando de esta forma el polímero. MAP1A y MAP1B son moléculas grandes, filamentosas, que se encuentran en los axones y las dendritas de las neuronas, así como en células no nerviosas. Cada una de estas MAP deriva de un solo polipéptido precursor, que se procesa de manera proteolítica en la célula para generar una cadena liviana y una pesada.

Otras MAP estabilizadoras son MAP2, MAP4, Tau y CLIP170. MAP4, la más abundante de todas, se encuentra en neuronas y células no nerviosas. Durante la mitosis, MAP4 regula la estabilidad de los microtúbulos y CLIP170 los liga a los cromosomas mediante uniones cruzadas. MAP2 sólo se encuentra en las dendritas, donde forma puentes cruzados fibrosos entre los microtúbulos y los une a los filamentos intermedios.



◀ **FIGURA EXPERIMENTAL 20-12 El espacio entre microtúbulos depende de la longitud del dominio de proyección de las proteínas asociadas a microtúbulos unidas a ellos.** Células de insecto transfectadas con DNA que expresa proteínas MAP2 de brazo largo o proteínas Tau de brazo corto desarrollan largas prolongaciones similares a axones. (a) Microfotografías electrónicas de cortes transversales a través de las prolongaciones inducidas por la expresión de MAP2 (*izquierda*) o Tau (*derecha*) en células transfectadas. Nótese que el espacio entre microtúbulos (MT) en las células con MAP2 es mayor que en las células con Tau. Ambos tipos celulares contienen aproximadamente el mismo número de microtúbulos, pero el efecto de la MAP2 es aumentar el calibre de la prolongación similar a un axón. (b) Diagramas de la asociación entre microtúbulos y MAP. Nótese la diferencia de longitud de los brazos de proyección en MAP2 y Tau. [Parte (a) de J. Chen et al., 1992, *Nature* 360:674.]

Tau, que es mucho más pequeña que la mayoría de las otras MAP, está presente en axones y dendritas. Esta proteína se encuentra en varias isoformas, derivadas del empalme alternativo de un mRNA *tau*. La capacidad de Tau para agrupar mediante uniones cruzadas a los microtúbulos en haces gruesos puede contribuir a la estabilidad de los microtúbulos del axón. Los hallazgos de los experimentos de transfección genética implican a Tau en la elongación de los axones. La deleción de los genes que codifican Tau y MAP1B produce los fenotipos más graves de disgenesia axónica y mortalidad. Además, la polimerización aberrante de Tau para formar filamentos se asocia con enfermedades neurodegenerativas, como demencia, en los pacientes con enfermedad de Alzheimer.

Cuando las MAP estabilizadoras cubren la pared externa de un microtúbulo, las subunidades de tubulina no pueden disociarse de los extremos de ese microtúbulo. Aunque las MAP unidas suelen reducir la velocidad de desarmado del microtúbulo, el ensamblaje de los microtúbulos se afecta en grados variables: algunas MAP, como Tau y MAP4, estabilizan el microtúbulo, en tanto que otras no lo hacen. Debido al efecto de ensamblaje de las MAP sobre la dinámica del microtúbulo, la modulación de la unión de las MAP puede controlar la longitud de éstos. En la mayoría de los casos, este control se lleva a cabo por la fosforilación reversible del dominio de proyección de la MAP. Las formas fosforiladas son incapaces de unirse a los microtúbulos; por lo tanto, estimulan su desarmado. La MAP cinasa, una enzima clave para la fosforilación de las MAP, participa en muchas vías de señalización-transducción (cap. 14), lo que indica que las MAP son blanco de muchas señales extracelulares. Las MAP, sobre todo MAP4, también son fosforiladas por una **cinasa dependiente de ciclina (CDK)** que tiene un papel importante en el control de la actividad de varias proteínas durante el ciclo celular (cap. 21).

Un segundo grupo de MAP desestabiliza de manera directa los microtúbulos en muchos tipos celulares. Una MAP de este grupo, denominada katanina, desarma microtúbulos citosólicos intactos por un proceso dependiente del ATP. Las ligaduras internas entre subunidades de tubulina en la pared del microtúbulo se rompen, lo que hace que los microtúbulos se fragmenten. Esta actividad puede liberar microtúbulos en el MTOC. Otra proteína, denominada Op 18 o estatmina, aumenta la frecuencia de desarmado rápido de microtúbulos en el huso mitótico. Esta proteína puede actuar al unirse a dímeros de tubulina, reduciendo así el total de dímeros disponibles para la polimerización. La fosforilación inactiva la Op18 e inhibe su efecto desestabilizador.

La colchicina y otros fármacos alteran la dinámica de los microtúbulos

Algunos de los primeros estudios sobre microtúbulos emplearon varios fármacos que inhiben la mitosis, un proceso celular que depende del ensamblaje y el desarmado de microtúbulos. Se demostró que dos de estos fármacos aislados de plantas, la *colchicina* y el *taxol*, son instrumentos muy poderosos para estudiar la función de los microtúbulos, en parte porque solo se unen a la αβ-tubulina o a los microtúbulos y no a otras proteínas, y porque sus concentraciones en la célula pueden controlarse con facilidad.

La colchicina y un sintético similar, la colcemida, se usaron desde hace mucho como inhibidores de la mitosis. En células expuestas a concentraciones elevadas de colcemida, los microtúbulos citosólicos se despolimerizan, dejando un MTOC. Sin embargo, cuando células vegetales o animales se exponen a concentraciones bajas de colcemida, los microtúbulos se conservan y las células se "bloquean" en metafase, la etapa de la mitosis en la que los cromosomas reproducidos se condensan por completo (véase fig. 9-3). Cuando las células tratadas se lavan con una solución sin colcemida, la colcemida se difunde de la célula y se reanuda la mitosis normal. Por lo tanto, los investigadores suelen usar colcemida para acumular células en metafase para hacer estudios citogenéticos; la eliminación de la colcemida deja una población de células cuyo ciclo celular está sincronizado. Estas poblaciones sincronizadas son muy útiles para los estudios del ciclo celular (cap. 21).

La interfaz entre los monómeros de α-tubulina y β-tubulina en la tubulina dimérica contiene un sitio de unión de alta afinidad, pero reversible, para la colchicina. Los dímeros de tubulina portadores de colchicina, en concentraciones mucho menores que la de subunidades de tubulina libres, pueden agregarse al extremo de un microtúbulo en crecimiento. Sin embargo, la presencia de una o dos tubulinas portadoras de colchicina al final de un microtúbulo impide el agregado o la pérdida de otras subunidades de tubulina. Por consiguiente, la colchicina "envenena" el extremo de un microtúbulo y altera el estado de equilibrio entre el ensamblaje y el desarmado. Como resultado de esta ruptura de la dinámica del microtúbulo, la mitosis se inhibe en las células tratadas con concentraciones bajas de colchicina.

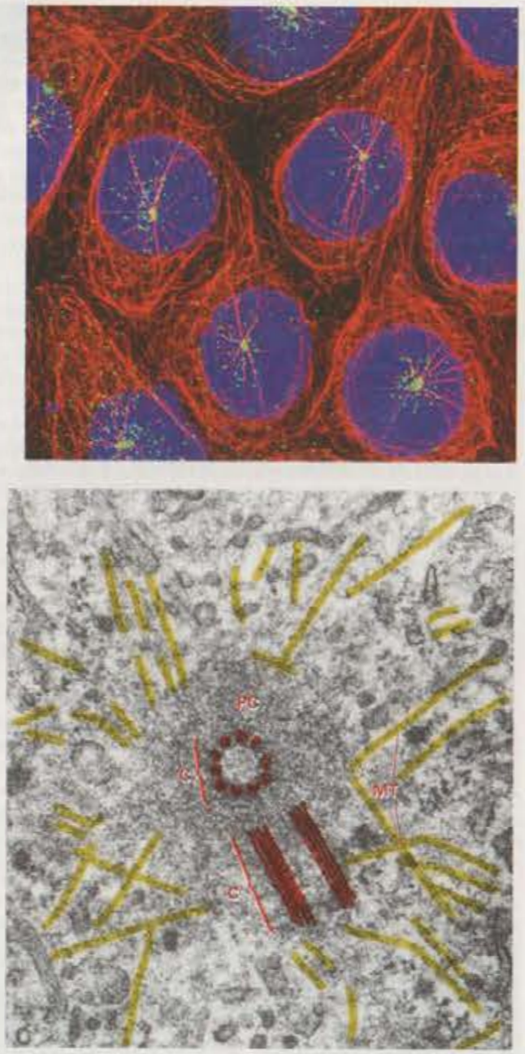
Otros fármacos se unen a sitios diferentes en los dímeros de tubulina o en los microtúbulos, y por consiguiente afectan la estabilidad del microtúbulo por medio de mecanismos diferentes. Por ejemplo, a concentraciones bajas, el taxol se une a los microtúbulos y los estabiliza, inhibiendo su acortamiento.

MEDICINA

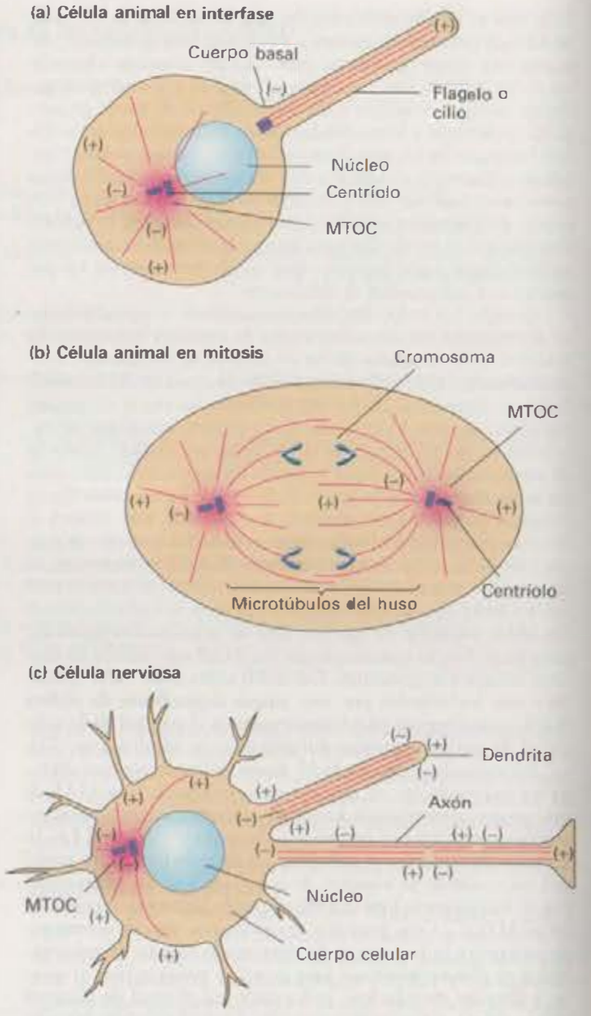
Los fármacos que alteran el ensamblaje y el desarmado de los microtúbulos se usaron con amplitud para tratar diversas enfermedades. De hecho, hace más de 2.500 años, los antiguos egipcios trataban los problemas cardíacos con colchicina. En el presente, este fármaco se usa sobre todo para el tratamiento de la gota y ciertas enfermedades que afectan a las articulaciones y a la piel. Otros inhibidores de la dinámica del microtúbulo, como el taxol, son agentes anticancerosos eficaces y se usan para el tratamiento del cáncer ovárico. ■

Los MTOC orientan la mayor parte de los microtúbulos y determinan la polaridad celular

En un fibroblasto en interfase los microtúbulos citosólicos se ordenan en una disposición característica, como rayos de una rueda, en el centro de la célula (fig. 20-13a). Los rayos formados por los microtúbulos surgen de un centro ocupado por el centrosoma, que es el centro de organización de microtúbulos primario en muchas células en interfase. El término *MTOC* se usará en adelante para referirse a cualquiera de las estructuras usadas por las células para reunir y organizar los microtúbulos. En las células de los animales, el MTOC suele ser un centrosoma, un conjunto de proteínas asociadas con los microtúbulos que algunas veces, pero no siempre, contiene un par de centríolos (fig. 20-13b). Los centríolos, cada uno de los cuales adopta la forma de un molinillo compuesto por tripletes de microtúbulos, se encuentran en el centro del MTOC, pero no hacen contacto directo con los extremos (−) de los microtúbulos citosólicos. Los MTOC de plantas y hongos no poseen centríolos; además, algunas células epiteliales y los huevos recién



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 20-13 El centrosoma, que funciona como centro de organización de los microtúbulos, contiene un par de centríolos ortogonales en la mayor parte de las células animales.** (a) Microfotografía que muestra varias células, cada una de las cuales contiene un centro de organización de microtúbulos (MTOC) identificado por anticuerpos contra PCM1, una proteína del centrosoma, marcados con fluoresceína. (b) Microfotografía electrónica del MTOC de una célula animal. El par de centríolos (en rojo) C y C', del centro, está orientado en ángulo recto; por lo tanto, un centríolo se ve en corte transversal y el otro en corte longitudinal. Rodeando a los centríolos se ve una nube de material, la matriz pericentriolar (PC), que contiene γ-tubulina y pericentrina. Empotrados dentro del MTOC, pero sin entrar en contacto con los centríolos, se encuentran los extremos (–) de microtúbulos (MT; en amarillo). [Parte (a) de A. Kubo y S. Tsukita, 2003, *J. Cell Sci.* **116**:919. Parte (b) de B. R. Brinkley, 1987 en *Encyclopedia of Neuroscience*, vol. 2, Birkhauser Press, pág. 665; cortesía de B. R. Brinkley.]



▲ **Fig. 20-14. Orientación de los microtúbulos celulares.** (a) En las células animales en interfase, el extremo (–) de la mayor parte de los microtúbulos es proximal al MTOC. En forma similar, los microtúbulos de flagelos y cilios tienen sus extremos (–) en continuidad con el cuerpo basal, que actúa como MTOC para estas estructuras. (b) Cuando las células entran en mitosis, la red de microtúbulos se reestructura, formando un huso mitótico. Los extremos (–) de todos los microtúbulos del huso apuntan hacia uno de los dos MTOC, o polos, como se denominan en las células en mitosis. (c) En las células nerviosas, los extremos (–) de todos los microtúbulos del axón se orientan hacia la base del axón, pero los microtúbulos de las dendritas tienen polaridades mixtas.

fecundados de los animales también carecen de centríolos. Por consiguiente, las proteínas asociadas en un MTOC son las que poseen la capacidad de organizar los microtúbulos citosólicos.

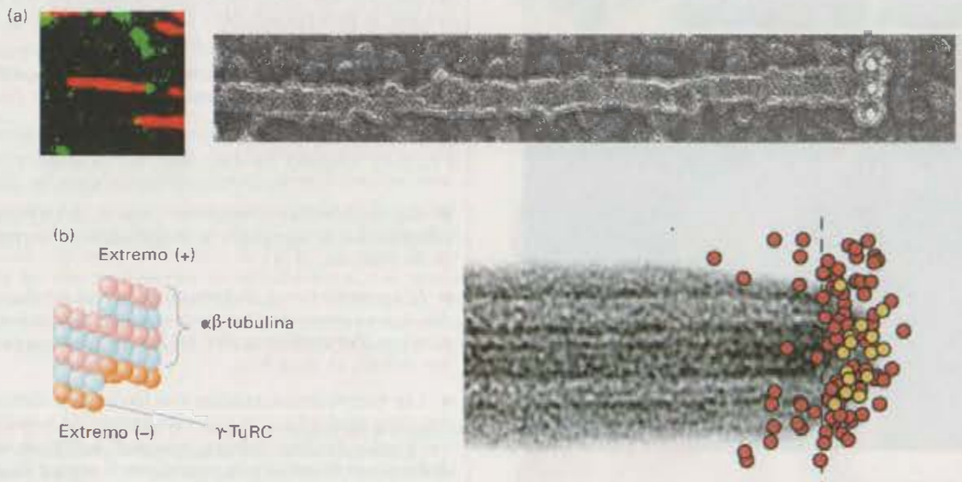
Debido a que los microtúbulos se ensamblan a partir del MTOC, su polaridad adopta una orientación característica (fig. 20-14). En la mayoría de las células en interfase de origen animal, por ejemplo, los extremos (–) de los microtúbulos son los más cercanos al MTOC. Durante la mitosis, el centrosoma se duplica y migra a posiciones nuevas a los lados del núcleo. Allí, el centrosoma se transforma en el centro de organización de los microtúbulos que forman el aparato mitótico que separará los cromosomas hacia las células hijas en la mitosis. Los microtúbulos en el axón de una neurona, que ayudan a estabilizar la larga prolongación, se orientan todos en la misma dirección.

Al contrario del MTOC perinuclear único que presenta la mayor parte de las células animales en interfase, las células vegetales, las epiteliales polarizadas y las embrionarias contienen centenares de MTOC distribuidos a lo largo de la célula, a menudo cerca de la corteza celular. En las células vegetales y en las epiteliales polarizadas un conjunto cortical de microtúbulos se alinea según el eje celular. En ambos tipos celulares la polaridad de la célula está ligada a la orientación de los microtúbulos.

El complejo en anillo de γ-tubulina nuclea la polimerización de las subunidades de tubulina

El MTOC organiza los microtúbulos citosólicos nucleando primero el ensamblaje de los microtúbulos y después fijando y liberando microtúbulos. A pesar de su aspecto amorfo, el material que rodea el centríolo de un MTOC es un enrejado organizado que contiene muchas proteínas necesarias para el ensamblaje de los microtúbulos (véase fig. 20-13). Una de estas proteínas, la γ-tubulina, se identificó por primera vez durante estudios genéticos diseñados para descubrir proteínas que interactuaran con la β-tubulina. Los resultados de estudios posteriores mostraron que la γ-tubulina y la proteína del enrejado pericentrina forman parte del material pericentriolar de los centrosomas; estas proteínas también se han detectado en MTOC que carecen de centríolo. El hallazgo acerca de que la introducción de anticuerpos contra la γ-tubulina en las células bloquea el ensamblaje de los microtúbulos implica que la γ-tubulina es un factor necesario para nuclear la polimerización de las subunidades de tubulina.

Alrededor del 80% de la γ-tubulina existente en las células forma parte de un complejo 25S que se aisló a partir de extractos de ovocitos de rana y embriones de mosca. Denominado *complejo en anillo de γ-tubulina* (*γ-TuRC*) por su aspecto anular en el microscopio electrónico, el complejo comprende ocho polipéptidos y mide 25 nm de diámetro. Los hallazgos de experimentos in vitro muestran que el γ-TuRC puede nuclear el ensamblaje de microtúbulos en forma directa en presencia de concentraciones de tubulina subcríticas, esto es, concentraciones por debajo de las cuales la polimerización no tendría lugar en ausencia del γ-TuRC. Para investigar cómo se asocia el γ-TuRC con los microtúbulos, los científicos realizaron experimentos de inmunomarcado con anticuerpos conjugados con oro, específicos para los componentes del γ-TuRC, ya sea γ-tubulina o XGRIP. Los resultados revelaron que los complejos se localizan en un extremo del microtúbulo y no están presentes a sus lados (fig. 20-15a). Esta situación es compatible con la función de nuclear el ensamblaje



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 20-15 El complejo en anillo de γ-tubulina (γ-TuRC) se localiza en un extremo del microtúbulo.** (a) Una microfotografía de fluorescencia (*izquierda*) y una microfotografía electrónica (*derecha*) de microtúbulos teñidos con anticuerpos marcados con oro contra γ-tubulina o XGRIP, una proteína ligadora de microtúbulos. Ambas proteínas son componentes del γ-TuRC. Las proteínas marcadas se localizan en un extremo del microtúbulo. (b) Modelo del γ-TuRC. Se cree que este complejo nuclea el ensamblaje de los microtúbulos presentando una hilera de subunidades de γ-tubulina, que pueden unirse directamente a subunidades de αβ-tubulina. Este modelo se apoya en la representación gráfica de las posiciones de los anticuerpos marcados con oro dirigidos contra γ-tubulina (en rojo) o XGRIP109 (en amarillo) obtenidos en el extremo de un microtúbulo en varios experimentos. [Partes (a) y (b, derecha) de J. Keating y G. G. Borisy, 2000, *Nature Cell Biol.* 2:352; cortesía de J. Keating y G. G. Borisy. Parte (b, izquierda) modificado de C. Wiese y Y. Zheng, 1999, *Curr. Opin. Struc. Biol.* 9:250.]

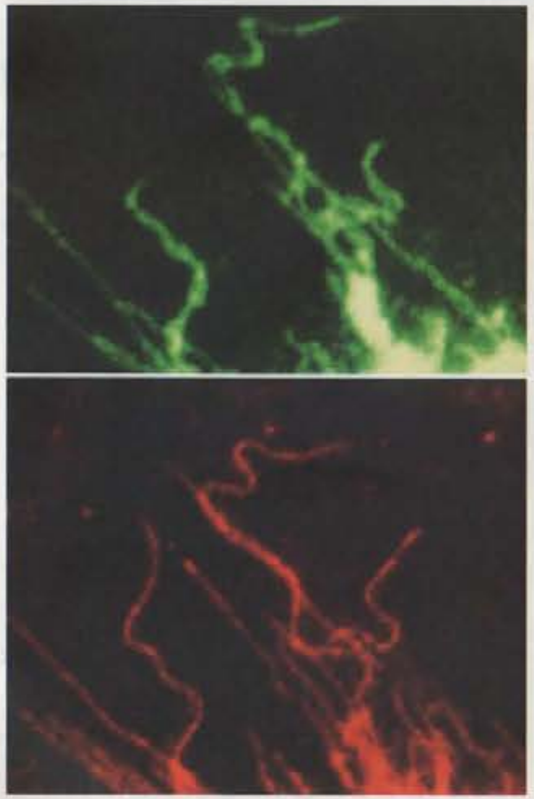
de microtúbulos del γ-TuRC. Un modelo del γ-TuRC basado en la microscopia electrónica muestra que la γ-tubulina está en contacto con el extremo (–) del microtúbulo (fig. 20-15b).

Los microtúbulos organizan los orgánulos y las vesículas citoplasmáticas

La microscopia de fluorescencia revela que los orgánulos limitados por membranas, como el retículo endoplasmático (RE) el Golgi, los endosomas y las mitocondrias, se asocian con microtúbulos. Por ejemplo, en fibroblastos cultivados teñidos con anticuerpos antitubulina y $DiOC_6$, un colorante fluorescente específico para el RE, la red de anastomosis del RE del citosol se localiza en los mismos sitios que los microtúbulos (fig. 20-16). Si se tratan las células con un fármaco que despolimeriza los microtúbulos, el RE pierde su organización reticular. Después de eliminar por lavado el fármaco de las células, se desarrollan dedos tubulares de RE a medida que se ensamblan microtúbulos nuevos. En sistemas libres de células, el RE puede reconstituirse con microtúbulos y un extracto celular abundante en RE. Incluso en este sistema libre de células, las membranas del RE se elongan a lo largo de microtúbulos. Esta asociación íntima entre el RE y los microtúbulos intactos sugiere que hay proteínas que unen las membranas del RE a los microtúbulos.

El papel de los microtúbulos en la organización del complejo de Golgi también se estudió en gran medida. En los fibroblastos en interfase, el complejo de Golgi se concentra cerca del MTOC. Durante la mitosis (o después de la despolimerización de los microtúbulos con colcemida) el complejo de Golgi se fragmenta en vesículas pequeñas que se dispersan por todo el citosol. Cuando los microtúbulos citosólicos se forman de nuevo durante la interfase (o después de eliminar la colcemida), las vesículas de Golgi se desplazan a lo largo de estos microtúbulos hacia el MTOC, donde se reúnen para formar otra vez grandes complejos membranosos.

Estas observaciones fueron las primeras que sugirieron que los microtúbulos tienen importancia en el transporte intracelular de orgánulos y vesículas membranosas. En la sección 20-2 se describen otros ejemplos de este transporte y las proteínas motoras que lo impulsan.



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 20-16 La microscopia de fluorescencia revela que la localización de las membranas del retículo endoplasmático y los microtúbulos citosólicos es coincidente.** Se usó $DiOC_6$, un colorante fluorescente que se une al RE (verde), y anticuerpos antitubulina marcados con un colorante fluorescente (rojo) para teñir un fibroblasto de rana cultivado. La coincidencia de la red del RE y de los microtúbulos en muchas, pero no todas, las regiones del citoplasma son evidentes porque la célula tiene pocos microtúbulos. (Cortesía de M. Terasaki.)

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 20.1

Organización y dinámica de los microtúbulos

- Las tubulinas pertenecen a una antigua familia de GTPasas que se polimerizan para formar microtúbulos, estructuras cilíndricas huecas de 25 nm de diámetro.
- Los microtúbulos, como los microfilamentos de actina, exhiben polaridad estructural y funcional.
- Las subunidades diméricas de αβ-tubulina interactúan de forma terminoterminal para formar protofilamentos que se asocian lateralmente en microtúbulos (véase fig. 20-7).
- Los microtúbulos muestran polaridad estructural. Las subunidades se agregan y se desprenden en mayor medida de un extremo, el (+).
- El ensamblaje y el desarmado de los microtúbulos dependen de una concentración crítica, C_c, de subunidades de αβ-tubulina. Por encima de ella, los microtúbulos se ensamblan; por debajo, se desarman.
- Los microtúbulos exhiben dos fenómenos dinámicos que son muy marcados con concentraciones de tubulina cercanas a la C_c: 1) cinta rodante, esto es, el agregado de subunidades en un extremo y su pérdida en el otro, y 2) inestabilidad dinámica, que es la oscilación entre el alargamiento y el acortamiento (véase fig. 20-9).
- El equilibrio entre el crecimiento y el acortamiento de los microtúbulos inestables depende de la presencia de GTP intercambiable unido al extremo (+) de la β-tubulina o si el GTP ya ha sido hidrolizado a GDP (véase fig. 20-11).
- Las proteínas asociadas a microtúbulos (MAP) organizan estos últimos y afectan su estabilidad. Algunas MAP impiden o estimulan la despolimerización de los microtúbulos citosólicos; otras MAP organizan los microtúbulos en haces o los juntan por medio de uniones cruzadas a las membranas y los filamentos intermedios o a ambos (véase cuadro 20-1).
- Diversos fármacos, como la colchicina y el taxol, alteran la dinámica de los microtúbulos y tienen un efecto antimitótico. Algunos son útiles para el tratamiento de ciertos cánceres.
- La polaridad celular, incluidas la organización de los orgánulos de la célula, la dirección del movimiento de la membrana y la orientación de los microtúbulos, se determina por los centros organizadores de microtúbulos (MTOC). La mayor parte de las células animales en interfase contiene un solo MTOC perinuclear, del que parten en forma radial los microtúbulos citosólicos (véase fig. 20-13).
- Debido a que los MTOC centralizan el ensamblaje de los microtúbulos, el extremo (–) de la mayor parte de los microtúbulos es adyacente al MTOC y el extremo (+) es distal (véase fig. 20-14).
- Un complejo que contiene γ-tubulina es un componente importante del material pericentriolar y es capaz de centralizar la polimerización de subunidades de tubulina para formar microtúbulos in vitro.

20.2 Movimientos impulsados por cinesina y dineína

Dentro de las células, las proteínas, vesículas y otros orgánulos limitados por membranas, con frecuencia se transportan a distancias de muchos micrómetros a lo largo de vías bien definidas en el citosol, y se depositan en determinadas localizaciones. La difusión simple no puede ser la única responsable de la velocidad, la direccionalidad y el destino de estos procesos de transporte. Los resultados de los primeros experimentos con células pigmentarias de escamas de pescado y células nerviosas mostraron que los microtúbulos funcionan como caminos para el transporte intracelular de varios tipos de "cargas". Por último, se encontró que dos familias de proteínas motoras, las **cinesinas** y las **dineínas**, median el transporte a lo largo de los microtúbulos.

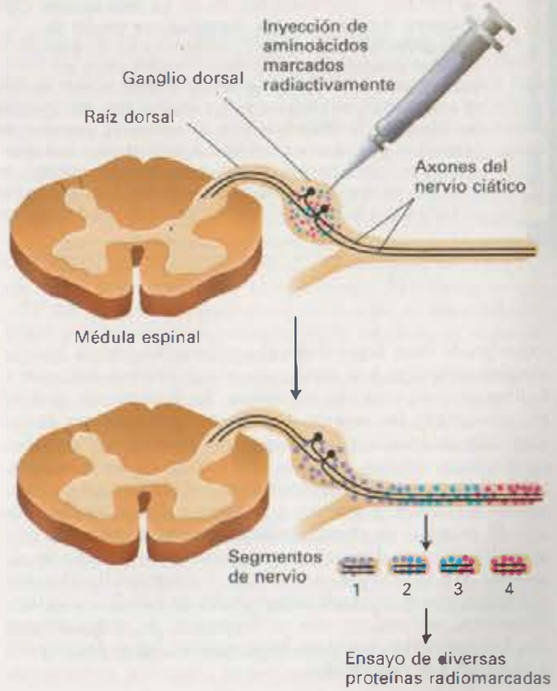
Un segundo tipo de movimiento que depende de las proteínas motoras del microtúbulo es el de los cilios y los flagelos. Una cantidad enorme de cilios (más de 10^7/mm²) cubre las superficies de las vías respiratorias de los mamíferos, y su movimiento desaloja y expele las partículas que se acumulan en las secreciones mucosas de estos tejidos. En el oviducto, los cilios ayudan al descenso de los huevos a lo largo de la trompa de Falopio. Por el contrario, los espermatozoides y muchos microorganismos unicelulares tienen un solo flagelo, que impulsa las células hacia adelante a velocidades cercanas a 1 mm/segundo.

En esta sección se tratará en primer lugar el transporte de materiales en los axones. Los estudios de este *transporte axónico*, proceso descubierto por primera vez hace más de cincuenta años, contribuyeron en gran medida a nuestra comprensión del transporte intracelular asociado con microtúbulos. A continuación se describirán la estructura y la función de las proteínas motoras de los microtúbulos. Esta sección concluye con una descripción de las estructuras peculiares formadas por los microtúbulos y las proteínas motoras responsables del movimiento de cilios y flagelos.

El transporte axónico a lo largo de los microtúbulos tiene lugar en ambas direcciones

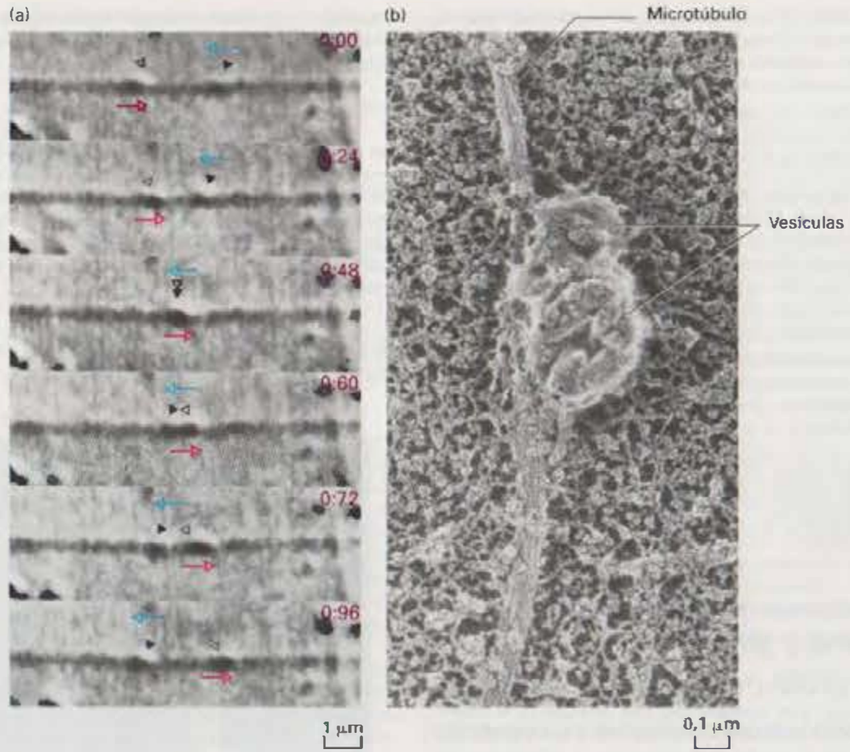
Una neurona debe proporcionar de manera constante materiales nuevos (proteínas y membranas) a la terminal del axón para reemplazar los materiales perdidos por la exocitosis de neurotransmisores en la unión (sinapsis) con otra célula. Debido a que las proteínas y las membranas sólo se sintetizan en el cuerpo celular, estos materiales deben transportarse a lo largo del axón, que puede tener hasta un metro de longitud, hasta la región sináptica. Este movimiento de materiales se cumple por los microtúbulos, todos los cuales se orientan con sus extremos (+) hacia la terminal (véase fig. 20-14c).

Los resultados de experimentos clásicos de "pulso y caza" en los que se inyectan precursores radiactivos en los ganglios de la raíz dorsal cerca de la médula espinal y luego se rastrean a lo largo de sus axones, demostraron que el transporte axónico se cumple en ambas direcciones. El transporte



▶ **FIGURA EXPERIMENTAL 20-17 La velocidad de transporte axónico in vivo puede determinarse por radiomarcado y electroforesis en gel.** Los cuerpos celulares de las neuronas del nervio ciático se localizan en los ganglios de la raíz dorsal. Los aminoácidos radiactivos inyectados en estos ganglios en animales de experimentación se incorporan a las proteínas recién sintetizadas, que luego son transportadas por el axón hacia la sinapsis. Los animales se sacrifican en diversos momentos después de la inyección y el nervio ciático disecado se corta en pequeños segmentos para su análisis mediante electroforesis en geles. Los puntos rojos, azules y violeta representan grupos de proteínas que se transportan en el axón a diferentes velocidades, el rojo con la mayor velocidad y el violeta con la menor.

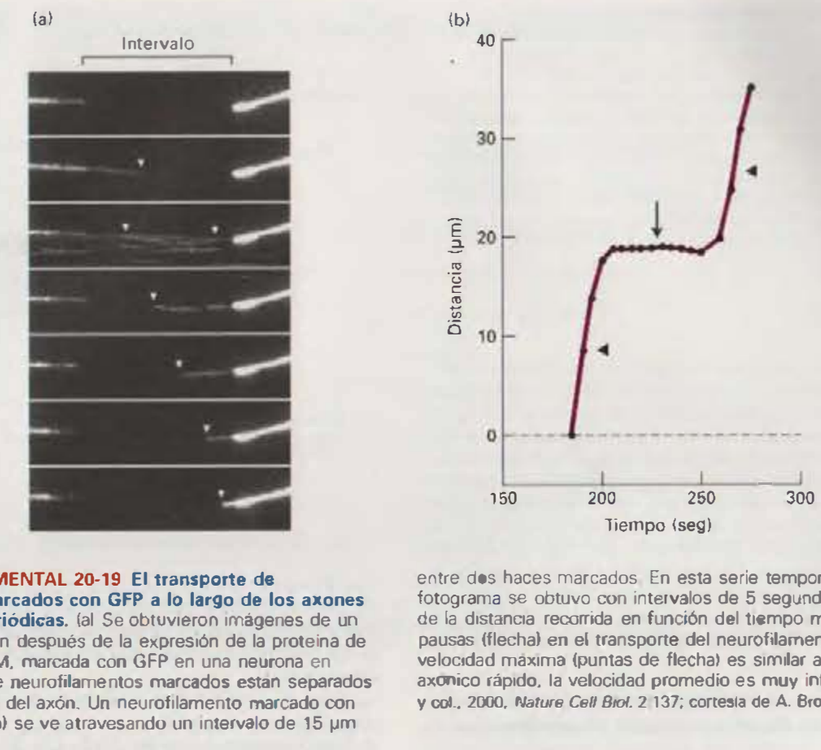
TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Movimiento de orgánulos a lo largo de microtúbulos en un axón de calamar



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 20-18 La microscopia CID muestra el transporte de vesículas por medio de microtúbulos in vitro.** (a) El citoplasma de un axón de calamar gigante se extruyó con un rodillo sobre un portaobjetos de vidrio. Después de agregar buffer con ATP a la preparación, se observó en un microscopio de contraste de interferencia diferencial y las imágenes se grabaron en un video. En las imágenes secuenciales mostradas, los dos orgánulos indicados por los triángulos huecos y sólidos se mueven en direcciones opuestas (indicadas por las flechas coloreadas) a lo largo del mismo filamento, se entrecruzan y continúan en sus direcciones originales. El tiempo transcurrido en segundos aparece en el ángulo superior derecho de cada fotograma. (b) Una región de citoplasma similar a la mostrada en la parte (a) se liofilizó, se sombreó con platino por rotación y se observó con un microscopio electrónico. Se ven dos estructuras grandes unidas a un microtúbulo; es probable que estas estructuras sean vesículas pequeñas que se estaban desplazando a lo largo del microtúbulo en el momento en que la preparación se congeló (Véase B. J. Schnapp et al., 1985, *Cell* 40:455; cortesía de B. J. Schnapp, R. D. Vale, M. R. Sheetz y T. S. Reese.)

anterógrado tiene lugar desde el cuerpo celular hacia las terminales sinápticas y se asocia con el crecimiento del axón y la liberación de vesículas sinápticas. En la dirección contraria, *retrógrada*, las membranas "viejas" provenientes de las terminales sinápticas se desplazan con rapidez por el axón hacia el cuerpo celular, donde se degradarán en los lisosomas. Los hallazgos de estos experimentos también revelan que materiales diferentes se mueven a distintas velocidades (fig. 20-17). El material de desplazamiento rápido, constituido por vesículas con pared membranosa, tiene una velocidad de alrededor de 250 mm/día, o sea, unos 3 µm/segundo. El material lento, que comprende subunidades de tubulina y neurofilamentos, se desplaza solo un fragmento de milímetro por día. Los orgánulos, como las mitocondrias, bajan por el axón a una velocidad intermedia.

El transporte axónico puede observarse en forma directa por videomicroscopia del citoplasma extruido de un axón de calamar gigante. El movimiento de las vesículas a lo largo de los microtúbulos en este sistema libre de células requiere ATP, su velocidad es similar a la del transporte axónico rápido en las células intactas y puede tener lugar en ambas direcciones, anterógrada y retrógrada (fig. 20-18a). La microscopia electrónica de la misma región del citoplasma del axón revela vesículas unidas a microtúbulos individuales (fig. 20-18b). Estos experimentos in vitro establecieron de manera definitiva que los orgánulos se desplazan a lo largo de microtúbulos individuales y que su movimiento requiere ATP. Como se describió antes, estas dos observaciones llevaron a la identificación de proteínas motoras de los microtúbulos, que son las que generan los movimientos.



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 20-19 El transporte de neurofilamentos marcados con GFP a lo largo de los axones muestra pausas periódicas.** (a) Se obtuvieron imágenes de un segmento de un axón después de la expresión de la proteína de neurofilamento, NF-M, marcada con GFP en una neurona en cultivo. Los haces de neurofilamentos marcados están separados por intervalos dentro del axón. Un neurofilamento marcado con GFP (punta de flecha) se ve atravesando un intervalo de 15 µm entre dos haces marcados. En esta serie temporal, cada fotograma se obtuvo con intervalos de 5 segundos. (b) Un gráfico de la distancia recorrida en función del tiempo muestra las pausas (flecha) en el transporte del neurofilamento. Aunque la velocidad máxima (puntas de flecha) es similar al transporte axónico rápido, la velocidad promedio es muy inferior. [De L. Wang y col., 2000, *Nature Cell Biol.* 2:137; cortesía de A. Brown.]

Los resultados de experimentos recientes, en los que neurofilamentos marcados con una proteína fluorescente verde (GFP) se inyectaron en células cultivadas, sugieren que los neurofilamentos hacen pausas frecuentes cuando descienden por un axón (fig. 20-19). Aunque la velocidad máxima de los neurofilamentos es similar a la de las vesículas de desplazamiento rápido, sus numerosas pausas disminuyen la velocidad de transporte promedio. Estos resultados sugieren que no hay diferencia fundamental alguna entre el transporte axónico rápido y el lento, aunque no se sabe por qué el transporte de los neurofilamentos se detiene de manera periódica.

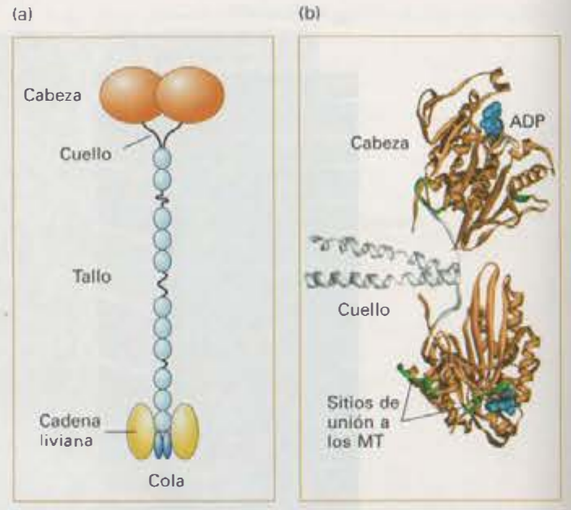
La cinesina I impulsa el transporte anterógrado de vesículas en los axones

La primera proteína motora de los microtúbulos se identificó mediante un sistema simple, consistente en microtúbulos ensamblados in vitro a partir de subunidades de tubulina purificadas, y estabilizados por el fármaco taxol. Cuando se agregaron vesículas sinápticas y ATP a estos microtúbulos, las vesículas no se unieron a los microtúbulos ni se desplazaron a lo largo de ellos. Sin embargo, el agregado de un extracto citosólico de axón de calamar gigante (sin tubulina) hizo que las vesículas se unieran a los microtúbulos y se desplazan a lo largo de ellos, lo que indica que para la translocación se necesita una proteína soluble presente en el citosol del axón.

Cuando los investigadores incubaron vesículas, citosol del axón y microtúbulos en presencia de AMPPNP, un análogo no hidrolizable del ATP, las vesículas se unieron con firmeza a los microtúbulos, pero no se desplazaron. Sin embargo, las vesículas se movieron cuando se agregó ATP. Estos resultados sugirieron que una proteína motora del citosol se une a los microtúbulos en presencia de ATP o AMPPNP, pero el movimiento requiere la hidrólisis del ATP. Para purificar la proteína motora soluble, los científicos incubaron una mezcla de microtúbulos, células o extractos tisulares y AMPPNP, suponiendo que el AMPPNP promovería la unión firme entre los microtúbulos y las proteínas motoras presentes en el extracto. Después de una incubación, los microtúbulos con cualquier proteína unida a ellos se separaron por centrifugación. El tratamiento con ATP del material del sedimento, abundante en microtúbulos, liberó una proteína predominante en la solución; en el presente, ésta se conoce como cinesina I.

La cinesina I aislada de axones de calamar gigante es un dímero de dos cadenas pesadas, cada una de las cuales está unida a una cadena liviana, con un peso molecular total de 380.000. La molécula comprende un par de *dominios cabeza* globulares grandes, conectados por un *tallo central* largo a un par de *dominios cola* globulares pequeños, que contienen las cadenas livianas (fig. 20-20). Cada dominio tiene una función particular: el dominio cabeza, que se une a los microtúbulos y al ATP, es responsable de la actividad motora de la cinesina, y el dominio cola es responsable de la unión a la membrana de vesículas, muy probablemente a través de la cadena liviana de la cinesina.

El movimiento de vesículas dependiente de la cinesina puede rastrearse por medio de ensayos de motilidad in vitro simi-



▶ **Fig. 20-20. Estructura de la cinesina.** (a) Modelo esquemático de la cinesina que muestra la disposición de las dos cadenas pesadas (cada una con un peso molecular de 110.000 -135.000) y las dos cadenas livianas (PM 60.000 - 70.000). (b) Estructura tridimensional del dímero de cinesina de acuerdo con la cristalografía de rayos X. Cada cabeza está unida a una región del cuello α-helicoidal, que forma un dímero doble-helicoidal. Los microtúbulos se unen a la hélice indicada; esta interacción es regulada por el nucleótido (color azul) unido al lado opuesto del dominio. La distancia entre los sitios de unión a los microtúbulos es de 5,5 nm. [Parte (b) cortesía de E. Mandelkow y E. M. Mandelkow, adaptado de M.Thormahlen y col., 1998, *J. Struc. Biol.* 122:30.]

lares a los que se usan para estudiar los movimientos dependientes de la miosina. En un tipo de ensayo se coloca una vesícula o una perla de plástico cubierta en un portaobjetos, junto con una preparación de microtúbulos. En presencia de ATP, puede verse bajo el microscopio que las perlas se desplazan a lo largo de un microtúbulo en una sola dirección. Al determinar la polaridad de los microtúbulos, los investigadores encontraron que las perlas recubiertas de cinesina I siempre se movían desde el extremo (–) hacia el (+) (fig. 20-21). Por consiguiente, la cinesina I es una proteína motora hacia el extremo (+) de los microtúbulos. Como esta dirección corresponde al transporte anterógrado, la cinesina I se considera una proteína motora que media el transporte axónico anterógrado.

La mayor parte de las cinesinas son proteínas motoras que se desplazan hacia el extremo (+)

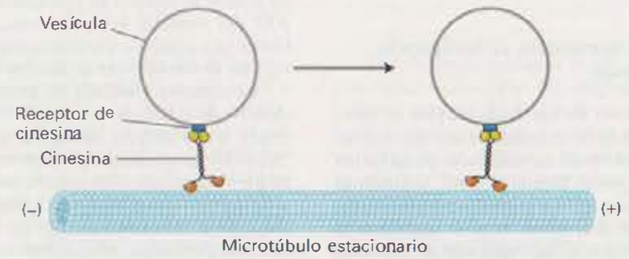
Hasta el presente, se identificaron alrededor de 10 subfamilias diferentes de cinesinas. Todas presentan una cabeza globular (motora), pero difieren en sus dominios cola y en otras diversas propiedades. En la mayor parte de las cinesinas, el dominio motor se encuentra en el extremo N (tipo N) de la cadena pesada, pero en otras, se localiza en el centro (tipo M) o en el extremo C (tipo C). Las cinesinas de los tipos N y M son *motoras hacia el extremo (+)*, en tanto que las de tipo C son *motoras hacia el (–)*. Aunque la mayor parte de las cinesinas tiene dos cadenas pesadas (p. ej., la cinesina I), otras presentan una sola (p. ej., la KIF1) o cuatro (p. ej., BimC). La BimC tetramérica tiene una disposición bipolar fuera de lo común, en la que los pares de dominios motores se encuentran en los extremos opuestos de un segmento cilíndrico central.

Las cinesinas pueden dividirse en dos grupos funcionales, *citosólicas* y *mitóticas*, de acuerdo con la naturaleza del material que transportan (cuadro 20-2). Las diferencias funcionales entre las cinesinas se relacionan con sus dominios peculiares de la cola, que determinan la naturaleza del material que transportan. Las cinesinas citosólicas participan en el transporte de vesículas y orgánulos; entre ellos se incluye la clásica cinesina I axónica, que transporta lisosomas y otros orgánulos. Sin embargo, algunas cinesinas citosólicas transportan una carga específica. Por ejemplo, la KIF1B y la estrechamente relacionada KIF1A transportan mitocondrias y vesículas sinápticas, respectivamente, a las terminaciones nerviosas. Otras cinesinas citosólicas median el transporte de vesículas secretorias a la membrana plasmática y el movimiento radial de las membranas del RE y de gránulos de pigmento. En cambio, las cinesinas mitóticas participan en el ensamblaje del huso y la separación de los cromosomas durante la división celular. Este grupo comprende numerosas proteínas, como la proteína asociada al cinetocoro CENP-E, la BimC bipolar y una proteína motora hacia el extremo (–) llamada Ned. En la sección 20-3 se describen las funciones de las cinesinas mitóticas con mayor detalle.

En época reciente se identificó una secuencia denominada *tetratricopeptídica* en las cadenas livianas de la cinesina I, que puede interactuar con proteínas receptoras presentes en la membrana de diversos elementos transportados. Estas interacciones vincularían el orgánulo o la vesícula a transportar a la cinesina. Por ejemplo, se encontró que la secuencia tetratricopeptídica se une a varias proteínas, como la precursora del amiloide. Otras cinesinas pueden tener secuencias de interacción diferentes que se unen a otros receptores presentes en las membranas.

Dos propiedades fundamentales de la cinesina motora, el largo y la fuerza del paso, se determinaron mediante experimentos de trampa óptica similares a los realizados con la miosina (véase fig. 19-18). Los resultados muestran que una molécula de cinesina dimérica (p. ej., la cinesina I) ejerce una fuerza de 6 piconewtons, que es suficiente para desplazar una vesícula unida a ella a través del citoplasma viscoso. El paso de la cinesina, de 8 nm, coincide con la distancia entre dos monómeros consecutivos de α o β tubulina en un protofilamento, lo que sugiere que la cinesina se une sólo a uno u otro monómero. Las reconstrucciones por microscopia electrónica muestran que la cinesina se une en primer término a la β tubulina. En otros experimentos los investigadores establecieron que una molécula de cinesina de doble cabeza se desplaza a lo largo de un solo protofilamento, con una cabeza siempre unida al microtúbulo. Como resultado, una molécula de cinesina puede recorrer una distancia larga sobre un microtúbulo sin desprenderse de él, propiedad denominada *procesividad*. Debido a su procesividad elevada, las cinesinas diméricas son muy eficientes para transportar cargas de una parte de la célula a otra.

En el capítulo 3 vimos que la región del cuello de la miosina, que actúa como un brazo de palanca rígido, es fundamental para coordinar la hidrólisis del ATP con el movimiento de la miosina a lo largo de un microfilamento de actina. A diferencia de la miosina, la cinesina tiene un cuello flexible, que une el dominio cabeza al dominio central del tallo (véase fig. 20-20). Los modelos actuales proponen que la hidrólisis del ATP por la cinesina produce un movimiento del cuello flexible, que ubica el dominio cabeza en el próximo paso a lo largo del protofilamento del microtúbulo. Según este modelo la dirección del movimiento de la cinesina depende de la función del cuello, no del dominio motor. Ésta se sustenta en los resultados de experimentos recientes de sustitución de dominios. Por ejemplo, el reemplazo del dominio motor de la Ncd dirigida al extremo (–) por el dominio motor de una cinesina I dirigida al extremo (+) produce una proteína quimérica dirigida al extremo (–). De forma similar, el intercambio de los dominios motores de cinesina y Vcd en la cinesina I genera una proteína dirigida al extremo (+). Estos resultados muestran que la dirección del movimiento no es una propiedad intrínseca del dominio motor. En cambio, las mutaciones en la región del cuello de la Ncd la transforman de una proteína motora dirigida al extremo (–) a una dirigida al extremo (+).



▲ **Fig. 20-21. Modelo de transporte de vesículas catalizado por cinesina.** Las moléculas de cinesina, unidas a receptores no identificados en la superficie de la vesícula, transportan las vesículas del extremo (–) al extremo (+) de un microtúbulo estacionario. El ATP es necesario para que haya movimiento. (Adaptado de R. D. Vale y col., 1985, *Cell* 40:559; y T Schroer et al., 1988, *J. Cell Biol.* 107:1785.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Transporte de vesículas impulsado por cinesina a lo largo de microtúbulos in vitro

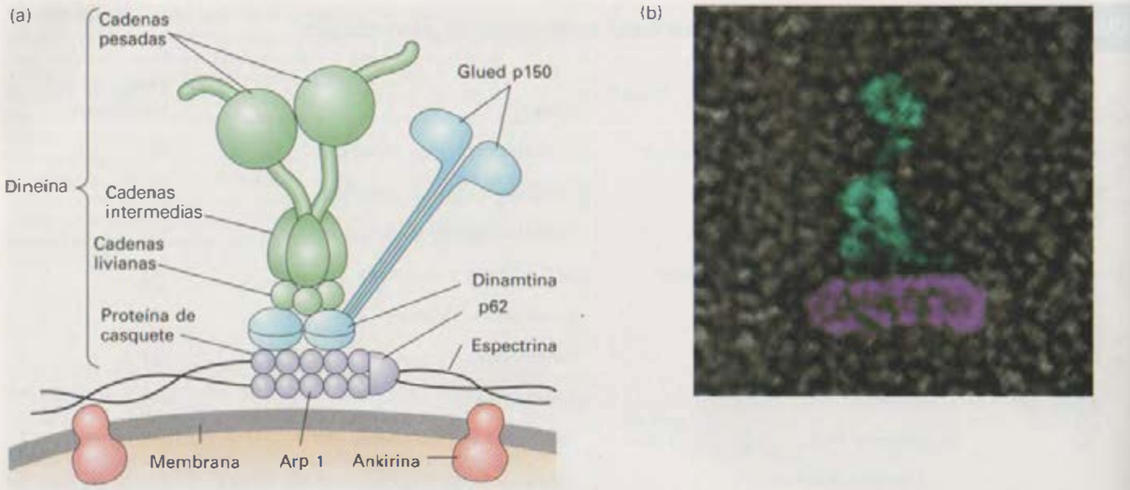
CUADRO 20-2 Clases funcionales de proteínas motoras de los microtúbulos

Clase	Miembros comunes	Carga	Dirección del movimiento*
Motores citosólicos	Cinesinas (I, KIFIA, KIFIB)	Vesículas/orgánulos citosólicos	(+)
	Dineína citosólica	Vesículas/orgánulos citosólicos	(–)
	Cinesina II	Vesículas/orgánulos citosólicos	(+)
Motores mitóticos	Cinesina BimC (bipolar)	MT del huso y los ásteres	(+)
	Cromocinesinas	Cromosomas (brazos)	(+)
	MCAK	Cinetocoros	(+)
	CENP-E	Cinetocoros	(+)
	Cinesina Ncd	MT del huso y los ásteres	(–)
	Dineína citosólica	Cinetocoros, centrosomas, corteza celular cerca de los polos del huso	(–)
Motores axonémicos	Dineínas de brazo externo e interno†	Dobletes de microtúbulos en cilios y flagelos	(–)

*Movimiento de la proteína motora hacia los extremos (+) o (–) de los microtúbulos.
† Las dineínas de brazo externo tienen tres cadenas pesadas y las de brazo interno tienen dos.

Las dineínas citosólicas son proteínas motoras dirigidas al extremo (–) que se unen a su carga a través de la dinactina

La segunda familia de proteínas motoras de los microtúbulos, las dineínas, son responsables del transporte axónico re-



▲ Fig. 20-22. Dineína citosólica y heterocomplejo de dinactina. (a) Diagrama de la dineína (verde) unida al complejo de la dinactina (celeste y violeta) por medio de las interacciones entre las cadenas livianas de la dineína y las subunidades de dinamtina de la dinactina. Las subunidades Arp1 de la dinactina forman un minifilamento que se asocia con la espectrina que está debajo de la membrana celular. Las subunidades Glued se unen a microtúbulos y vesículas. (b) Microfotografía electrónica de una réplica en metal del complejo de la dinactina aislada de células del cerebro. Se ve el minifilamento de Arp1 (violeta) y el brazo lateral de dinamtina/Glued (azul). [Parte (a) adaptada de N. Hirokawa, 1998, *Science* 279:518. Parte (b) de D. M. Eckley et al., 1999, *J. Cell Biol.* 147:307]

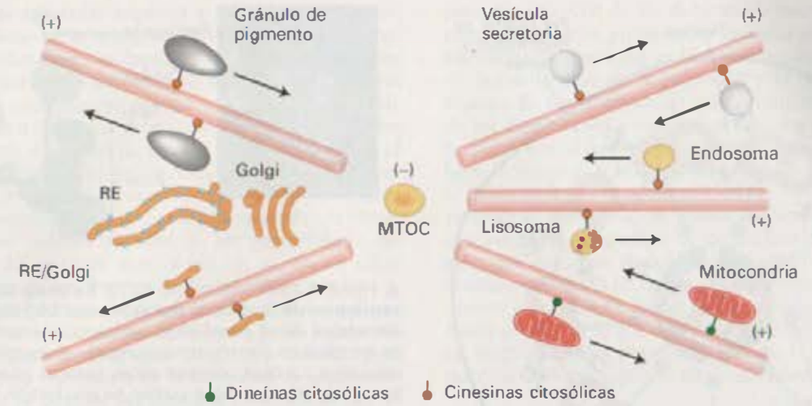
trógrado, del tránsito de las vesículas de Golgi al centrosoma y de algunos otros movimientos dirigidos al extremo (–). Las dineínas son proteínas multiméricas excepcionalmente grandes, con pesos moleculares que superan 1 x 10^6. Están compuestas por dos o tres cadenas pesadas, que forman un complejo con un número indeterminado de cadenas intermedias y livianas. Como se resume en el cuadro 20-2, las dineínas se dividen en dos clases funcionales. Aquí se estudiarán las dineínas *citosólicas*, que tienen importancia en el movimiento de vesículas y cromosomas. Las del *axonema*, responsables del movimiento de cilios y flagelos, se describen más adelante.

Como la cinesina I, la dineína citosólica es una molécula con dos cabezas, con dos cadenas pesadas idénticas o casi idénticas que conforman los dominios de la cabeza. Sin embargo, a diferencia de la cinesina, la dineína no puede transportar cargas por sí sola. El transporte relacionado con la dineína requiere la presencia de *dinactina*, un gran complejo proteico que une vesículas y cromosomas a las cadenas livianas de la dineína (fig. 20-22). Los resultados de los experimentos de unión in vitro muestran que la dinactina también se une a los microtúbulos, para incrementar así la procesividad del movimiento dependiente de dineína. La dinactina presenta por lo menos ocho subunidades, entre las que se incluyen una proteína llamada Glued que se une a los microtúbulos, la Arp1, una proteína relacionada con la actina que se une a la espectrina, y la dinamtina, que interactúa con las cadenas livianas de la dineína. El sitio de unión al microtúbulo de Glued contiene un motivo de 57 residuos que también está presente en CLIP170, una proteína asociada a los microtúbulos que establece uniones cruzadas entre éstos y las vesículas endocíticas (véase cuadro 20-1). Un modelo propone que la dineína genera la fuerza necesaria para el movimiento de la vesícula, aunque permanece unida al microtúbulo por la dinactina.

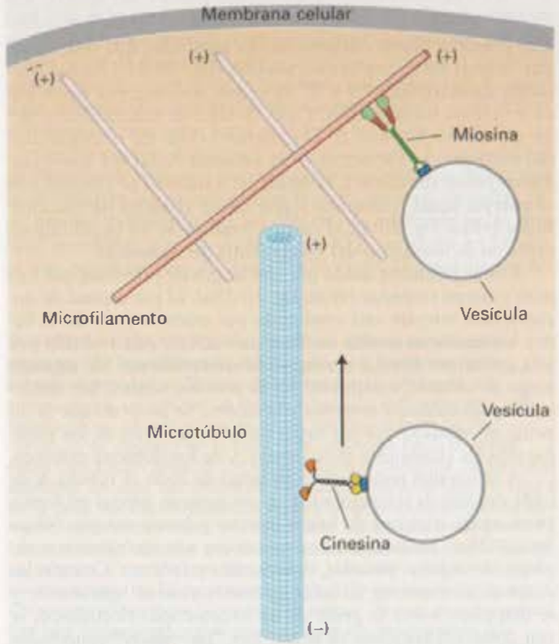
Como se describe más adelante, varias líneas de evidencia sugieren que el complejo dineína-dinactina y otro complejo, la proteína del aparato nuclear/mitótico (NuMA) median la asociación de los microtúbulos con los centrosomas durante la mitosis. Los resultados de estudios in vitro muestran que la proteína NuMA truncada se une a los microtúbulos si se conserva la región del extremo C. Como sucede con las MAP, la región del extremo C de la proteína NuMA es muy ácida y las interacciones iónicas pueden mediar su unión a los microtúbulos.

Varias proteínas motoras a veces transportan la misma carga

En la figura 20-23 se resume el papel de las cinesinas y las dineínas citosólicas en el transporte intracelular a lo largo de los microtúbulos. Debido a que la orientación de los microtúbulos es determinada por el MTOC, la dirección de transporte (hacia la periferia o el centro de la célula) depende de la proteína motora. Algunas cargas, como los gránulos de pigmento, pueden alternar su dirección de movimiento a lo largo de un solo microtúbulo. En este caso, tanto una proteína motora anterógrada como una retrógrada deben asociarse con la misma carga. En experimentos bioquímicos recientes se identificó dinactina formando un complejo con cinesina. Un modelo propone que la dinactina forma parte de los receptores de membrana y funciona como un adaptador común para la unión de la cinesina y la dineína citoplasmáticas. De esa forma, la dirección del movimiento puede lograrse al alternar una proteína motora con la otra.



▲ Fig. 20-23. Modelo general del transporte mediado por cinesina y dineína en una célula típica. La serie de microtúbulos, con sus extremos (+) apuntando hacia la periferia celular, irradia de un MTOC localizado en la región del Golgi. El transporte anterógrado dependiente de la cinesina (en rojo) lleva las mitocondrias, los lisosomas y una variedad de vesículas al retículo endoplasmático (RE) o a la periferia celular. El transporte retrógrado dependiente de la dineína citosólica (en verde) lleva mitocondrias, elementos del RE y endosomas hacia el centro de la célula. (Adaptado de N. Hirokawa, 1998, *Science* 279:518.)

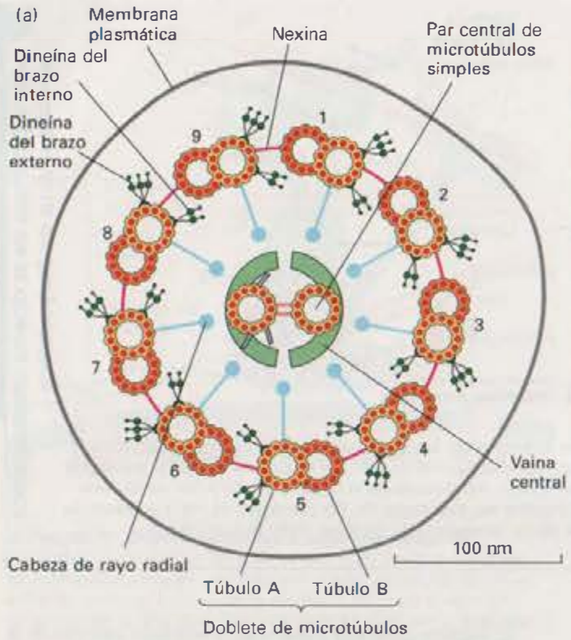


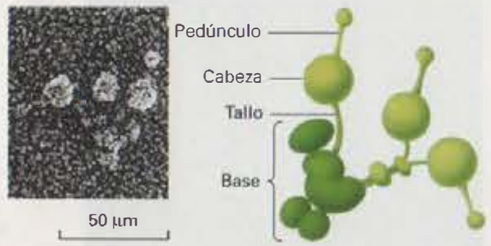
▲ Fig. 20-24. Cooperación de la miosina y la cinesina en la corteza celular. Los microtúbulos se acercan a la membrana celular abundante en actina. Por consiguiente, algunas cargas se transportan a la periferia celular por acción de la proteína motora cinesina a lo largo de los microtúbulos, pero completan su viaje sobre microfilamentos bajo el impulso de la proteína motora miosina.

En algunos casos una vesícula debe atravesar regiones de la célula con escasa cantidad de microtúbulos, pero con abundantes microfilamentos. Por ejemplo, durante la endocitosis, las vesículas provenientes de la membrana plasmática con abundante actina deben transportarse hacia adentro, en tanto que durante la secreción, las vesículas derivadas del retículo endoplasmático y del Golgi se desplazan hacia afuera. Los resultados de varios experimentos complementarios indican que las proteínas motoras de los microtúbulos y los microfilamentos se unen a las mismas vesículas y cooperan en su transporte. Una prueba de esto se obtuvo por la observación microscópica de los movimientos de las vesículas en el citoplasma extruido de un axón de calamar gigante. Como se había observado muchas veces antes, las vesículas viajaban a lo largo de las sendas representadas por los microtúbulos; sorprendentemente, el movimiento continuó en la periferia del citoplasma extruido, a través de una región que contenía microfilamentos, pero ningún microtúbulo. En los experimentos siguientes se demostró que una vesícula determinada puede desplazarse a lo largo de un microtúbulo o un microfilamento. Por lo tanto, al menos dos proteínas motoras, la miosina, y la cinesina o la dineína citosólicas, deben poder unirse a la misma vesícula (fig. 20-24). El descubrimiento de que una vesícula determinada puede viajar a lo largo de ambos sistemas del citoesqueleto sugiere que, en una neurona, las vesículas sinápticas se transportan a una velocidad rápida por la cinesina en el axón abundante en microtúbulos y luego viajan a través de la corteza abundante en actina de la terminal nerviosa unidas a un motor de miosina.

Los cilios y los flagelos de los eucariontes contienen un centro formado por un doblete de microtúbulos tachonado con dineínas axonémicas

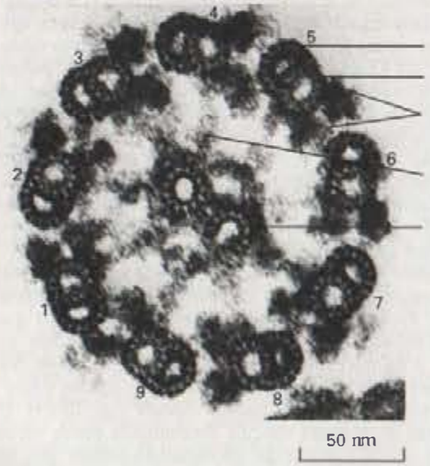
Los cilios y los flagelos son prolongaciones flexibles de la membrana que se proyectan de ciertas células. Varían en lon-





▲ FIGURA EXPERIMENTAL 20-26 La criograbación revela la estructura de la dineína del axonema. Microfotografía electrónica de un criograbado del brazo externo de la dineína de los cilios de *Tetrahymena* y una interpretación artística de su estructura. La base contiene varias cadenas intermedias y livianas. Unidas a la base común se encuentran tres cadenas pesadas, cada una de ellas compuesta por un pedúnculo largo, un dominio cabeza globular grande y un dominio globular pequeño y un tallo corto que conecta los dominios globulares. Los microtúbulos se unen a la punta del pedúnculo. Se cree que todas las dineínas del axonema tienen la estructura general mostrada aquí, aunque en algunas el brazo externo contiene dos cadenas pesadas y el brazo interno presenta una o dos cadenas pesadas. (Microfotografía electrónica de U. W. Goodenough y J. E. Heuser, 1984, *J. Mol. Biol.* 18:1083.)

(b)



▲ Fig. 20-25. Estructura de un axonema. (a) Diagrama de un corte transversal de un flagelo típico, que muestra sus estructuras principales. Los brazos de dineína y los rayos radiales con sus cabezas rodean un par central de microtúbulos simples. (b) Microfotografía de un corte transversal de un cilio aislado desprovisto de su membrana [Véase U. W. Goodenough y J. E. Heuser, 1985, *J. Cell Biol.* 100:2008. Parte (b) cortesía de L. Tilney.]

gitud desde unos pocos micrómetros a más de 2 mm en el caso de los flagelos de los espermatozoides de algunos insectos. Virtualmente todas los cilios y los flagelos de los eucariontes poseen un haz central de microtúbulos, llamado axonema, que presenta nueve dobletes de microtúbulos que rodean un par central de microtúbulos simples (fig. 20-25). Esta disposición característica "9 + 2" se ve por microscopia electrónica en cortes transversales. Cada doblete de microtúbulos tiene un túbulo A y uno B. El extremo (+) de los microtúbulos del axonema se encuentra en el extremo distal del axonema. En su punto de unión a la célula, el axonema se conecta con el **cuerpo basal**. Compuesto por nueve tripletes de microtúbulos (véase fig. 20-4), el cuerpo basal tiene un papel importante en la iniciación del crecimiento del axonema.

Éste se mantiene unido por tres juegos de proteínas que forman uniones cruzadas (véase fig. 20-25a). El par central de microtúbulos simples está conectado por puentes periódicos, como los escalones de una escalera de mano, y está rodeado por una estructura fibrosa denominada *vaina interna*. Un segundo juego de uniones, compuesto por la proteína *nexina*, une dobletes de microtúbulos externos adyacentes. Se propuso que la dineína es regulada por los *rayos radiales*, que van de los túbulos simples centrales a cada túbulo A de los dobletes externos.

A intervalos periódicos a lo largo de todo el túbulo A de cada doblete de microtúbulos, se encuentran unidas en forma permanente dineínas de *brazo interno* y *brazo externo* (véase fig. 20-25a). Estas dineínas axonémicas son multímeros complejos de cadenas pesadas, intermedias y livianas. Cuando las dineínas axonémicas aisladas se desnaturalizan ligeramente y se dispersan sobre la grilla de un microscopio electrónico, se ven como un ramillete de dos o tres "pimpollos" conectados a una base común (fig. 20-26). Cada pimpollo presenta el dominio globular grande de la cabeza unido a uno pequeño por un pedúnculo corto; un tallo conecta uno o más pimpollos a una base común. Se cree que la base se une a una dineína en el túbulo A, en tanto que los dominios globulares se proyectan hacia el túbulo B del doblete vecino.

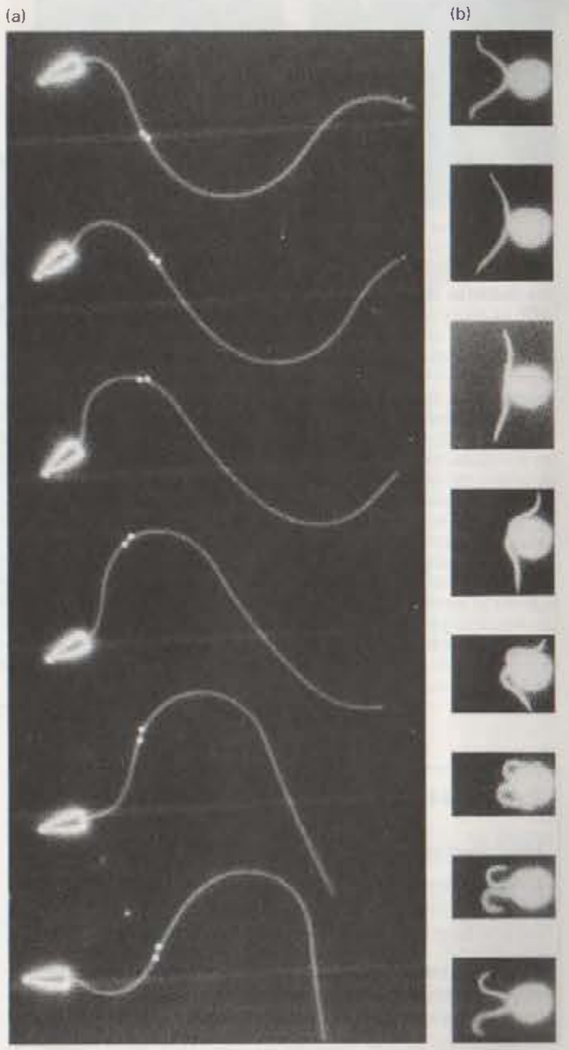
La cadena pesada única que forma cada pedúnculo, cabeza y tallo es enorme, de unos 4.500 aminoácidos de longitud, con un peso molecular superior a 540.000. Se identificaron por lo menos ocho o nueve cadenas pesadas diferentes, cada una de las cuales es capaz de hidrolizar ATP. Sobre la base de comparaciones de secuencia de los sitios ligadores de ATP de otras proteínas, se predijo que el sitio ligador de ATP de la dineína axonémica debe encontrarse en el dominio globular de cabeza de la cadena pesada, y el sitio de unión al microtúbulo en la punta del pedúnculo. Las dineínas del brazo interno son estructuras de una o dos cabezas, que contienen una o dos cadenas pesadas. Las dineínas del brazo externo contienen dos cadenas pesadas (p. ej., en el flagelo del espermatozoide del erizo de mar) o tres (p. ej., en los cilios de *Tetrahymena* y en los flagelos de *Chlamydomonas*).

Se cree que las cadenas intermedias y livianas de la dineína axonémica forman la región de la base. Éstas colaboran en la unión del brazo de dineína al túbulo A y también pueden participar en la regulación de la actividad de la dineína. Las proteínas de la base de las dineínas axonémicas por lo tanto son análogas a las que componen los complejos de dinactina asociados con la dineína citosólica.

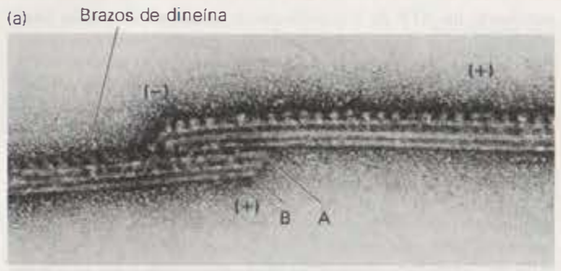
El movimiento rítmico de cilios y flagelos se produce por el deslizamiento controlado de los dobletes de microtúbulos externos

El movimiento rítmico de cilios y flagelos se caracteriza por una serie de curvaturas, que se originan en la base de la estructura y se propagan hacia la punta (fig. 20-27). Las curvaturas empujan y hacen presión contra el líquido circundante, propulsando la célula hacia adelante o desplazando líquido sobre un epitelio fijo. La curvatura es resultado del deslizamiento entre sí de dobletes de microtúbulos adyacentes. Debido a que el deslizamiento activo tiene lugar a todo lo largo del axonema, las curvaturas pueden propagarse sin amortiguarse. Los resultados de estudios de microscopia con axonemas aislados de los que se eliminaron las proteínas que forman uniones cruzadas (p. ej., nexina) exhibieron que los dobletes de microtúbulos se deslizan uno sobre otro en presencia de ATP, pero esto no produce una curvatura (fig. 20-28a). Por lo tanto, el movimiento dependiente de ATP de los dobletes de microtúbulos debe estar restringido por las proteínas de unión cruzada para que el deslizamiento se convierta en la curvatura de un axonema.

Sobre la base de la polaridad y la dirección del deslizamiento de los dobletes de microtúbulos y las propiedades de las dineínas del axonema, se cree que los dominios cabeza pequeños de los brazos de dineína del túbulo A de un doblete "caminan" a lo largo del túbulo B del doblete adyacente hacia su base, el extremo (–) (fig. 20-28b). La fuerza que produce el deslizamiento activo requiere ATP y es probable que involucre un cambio de conformación de la cabeza y el tallo que transloca el pedúnculo. Las uniones y las hidrólisis consecutivas del ATP hacen que los pedúnculos de dineína se liberen y se unan en forma consecutiva al doblete adyacente. Aunque es factible que este modelo general sea el más correcto, muchos detalles importantes, como el mecanismo de transducción de fuerzas por la dineína, todavía se desconocen.



▶ FIGURA EXPERIMENTAL 20-27 La videomicroscopia muestra los movimientos del flagelo que impulsan los espermatozoides y *Chlamydomonas* hacia adelante. En ambos casos las células se mueven hacia la izquierda. (a) En el flagelo de un espermatozoide típico, las olas sucesivas de curvatura se originan en la base y se propagan hacia la punta; estas olas hacen presión contra el agua e impulsan la célula hacia adelante. En esta secuencia de exposición múltiple, una curvatura en la base del espermatozoide en el primer fotograma (*arriba*) se movió en dirección distal hasta la mitad del flagelo en el último fotograma. Se observa que un par de perlas de oro en el flagelo se separan a medida que la curvatura atraviesa la región en que se encuentran. (b) El movimiento rítmico de los dos flagelos de *Chlamydomonas* tiene lugar en dos etapas, llamadas *golpe eficaz* (los tres fotogramas superiores) y *golpe de recuperación* (los fotogramas restantes). El golpe eficaz empuja al microorganismo a través del agua. Durante el golpe de recuperación, una ola diferente de curvaturas se desplaza hacia afuera a partir de las bases de los flagelos, empujando los flagelos a lo largo de la superficie de la célula hasta que alcanzan la posición adecuada para comenzar otro golpe eficaz. Por lo general, estos movimientos rítmicos se producen 5-10 veces por segundo. [Parte (a) de C. Brokaw, 1991, *J. Cell Biol.* 114(6): fotografía de tapa; cortesía de C. Brokaw. Parte (b) cortesía de S. Goldstein.]



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 20-28 El deslizamiento in vitro de los dobletes de microtúbulos mediado por dineína requiere ATP. (a) Microfotografía electrónica de dos dobletes de microtúbulos en un axonema tratado con proteasa e incubado con ATP. En ausencia de las proteínas de unión cruzada, que son eliminadas por la proteasa, los dobletes de microtúbulos se desplazan en exceso. Los brazos de dineína pueden verse protruyendo de los túbulos A e interactuando con el túbulo B del microtúbulo superior. (b) Moléculas de dineína con una sola cabeza en su estado previo al golpe y posterior a él. Se registraron miles de imágenes de dineína de brazo interno purificada en un microscopio electrónico y luego se promediaron. Una comparación de la dineína que contiene ADP y vanadato, un estado similar al estado ADP-Pi, con la dineína desprovista de todo nucleótido unido a ella, sugiere que la diferencia en la estructura puede relacionarse con cambios de conformación que tienen lugar durante el ciclo del ATP. Un modelo del mecanismo de generación de fuerza sugiere que la cabeza cambia de orientación con respecto al tallo, lo que causa un movimiento del pedúnculo unido al microtúbulo. [Parte (a) cortesía de R. Satir. Parte (b) de S. A. Burgess y col., 2003, *Nature* 421:715; cortesía de S. A. Burgess.]

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 20.2

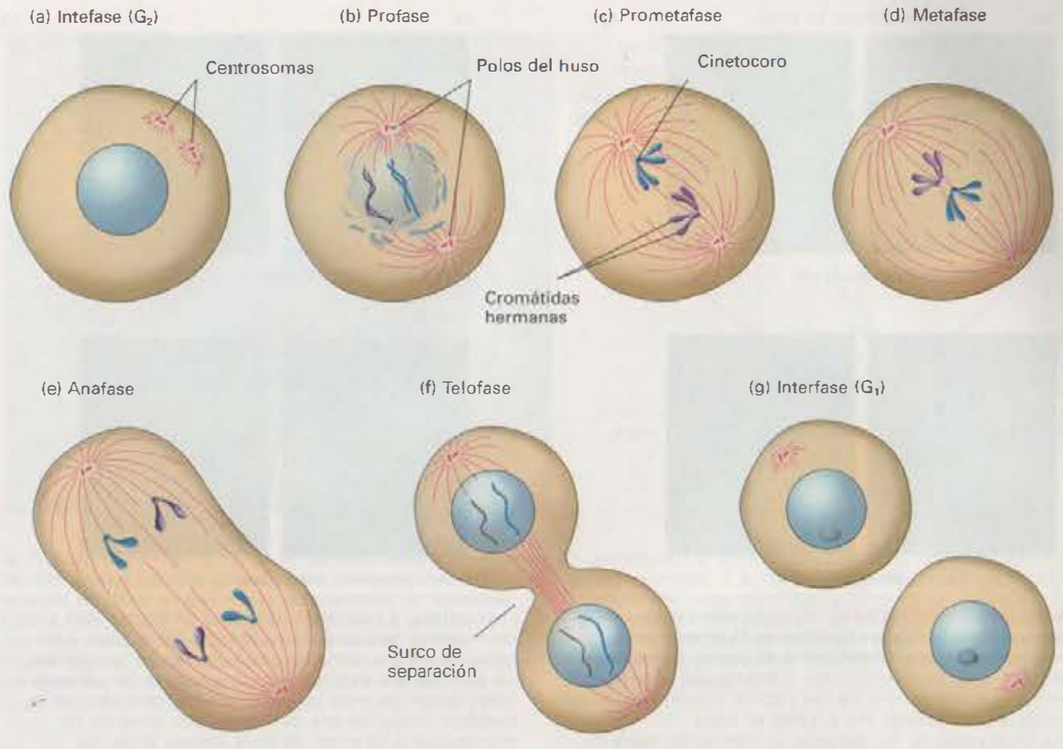
Movimientos impulsados por cinesina y dineína

- Dos familias de proteínas motoras, la cinesina y la dineína, transportan vesículas membranosas, proteínas y orgánulos a lo largo de los microtúbulos (véase cuadro 20-2).
- Casi todas las cinesinas mueven la carga hacia el extremo (+) de los microtúbulos (transporte anterógrado), en tanto que las dineínas lo hacen hacia el extremo (–) (transporte retrógrado).
- La mayoría de las cinesinas son dímeros con un dominio cabeza que se une a los microtúbulos y el ATP, y uno de cola que se une a las vesículas u otras cargas (véase fig. 20-20). La región flexible del cuello determina la dirección del movimiento de la cinesina y el dominio de cola determina la especificidad de la carga.
- Las dineínas citosólicas se unen a sus cargas (vesículas y cromosomas) por medio de la dinactina, un gran complejo multiproteico (véase fig. 20-22). La dinactina también se une a los microtúbulos, y aumenta así la procesividad del transporte mediado por dineína.
- En las zonas de la célula con escasos microtúbulos es probable que las vesículas se transporten a lo largo de microfilamentos, impulsadas por un motor de miosina.
- El movimiento rítmico de los flagelos impulsa las células hacia adelante y el movimiento rítmico de los cilios desplaza materiales por los tejidos.
- El axonema de los flagelos y los cilios contiene nueve dobletes de microtúbulos externos, colocados en círculo alrededor de dos microtúbulos simples centrales (véase fig. 20-25).
- Las dineínas del axonema, que son más grandes y más complejas que las citosólicas, se encuentran unidas en forma permanente a los dobletes de microtúbulos en los axonemas. Los brazos de dineína, con sus cabezas globulares pequeñas, se proyectan hacia el doblete adyacente.
- La marcha de los brazos de dineína, que se extienden desde un doblete hacia el extremo (–) del doblete vecino, genera una fuerza de deslizamiento en el axonema (véase fig. 20-27). Esta fuerza lineal se convierte en una curvatura por las regiones que resisten el deslizamiento.

20.3 Dinámica de los microtúbulos y proteínas motoras en la mitosis

La mitosis es el proceso que reparte por igual los cromosomas recién reproducidos en partes separadas de una célula. El último paso del ciclo celular, la mitosis, insume alrededor de 1 hora en una célula animal en división activa (véase fig. 1-17). En ese período la célula construye y después desmonta una estructura especializada de microtúbulos, el aparato mitótico. Más grande que el núcleo, el aparato mitótico está diseñado para ligar y capturar los cromosomas, alinearlos y luego separarlos de forma que el material genético se reparta de manera uniforme en cada célula hija. Quince horas después, las dos células hijas repiten todo el proceso.

En la figura 20-29 se muestra la serie característica de acontecimientos que pueden observarse por microscopia óptica durante la mitosis en una célula eucarionte. Aunque los acontecimientos se suceden en forma continua, de manera convencional se dividen en cuatro subestadios: profase, metafase, anafase y telofase. El comienzo de la mitosis se caracteriza por la aparición de cromosomas condensados, que al principio se ven como hilos delgados dentro del núcleo. En la profase avanzada, cada cromosoma aparece como dos filamentos idénticos, las cromátidas (a menudo denominadas *cromátidas hermanas*), que se mantienen unidas en una región estrechada, el *centrómero*. Cada cromátida contiene una de las dos nuevas moléculas hijas de DNA producidas en la fase S precedente del ciclo celular; así, cada célula que entra en mitosis tiene cuatro copias de cada DNA cromosómico, designado $4n$.



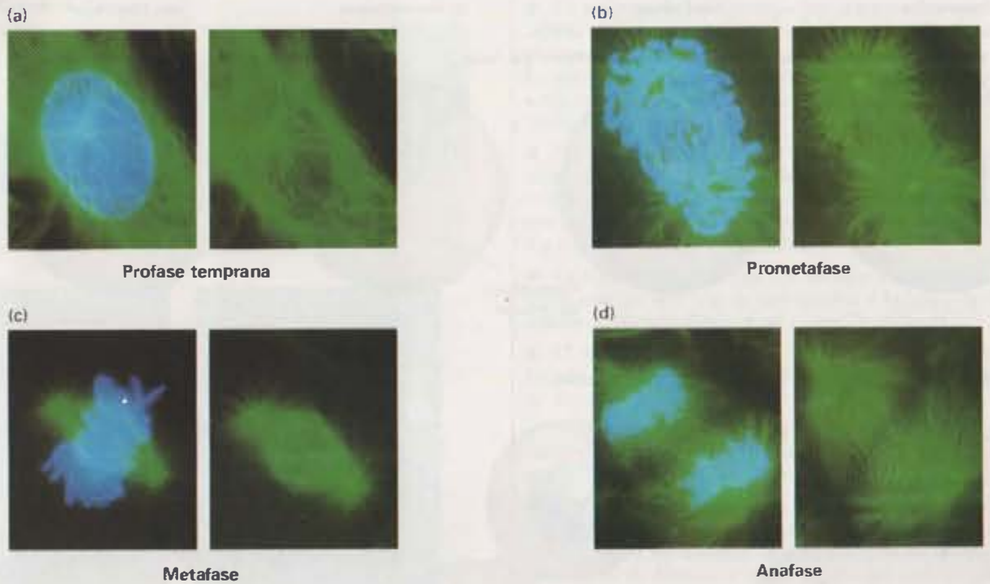
▲ Fig. 20-29. Etapas de la mitosis y la citocinesis en una célula animal. Para simplificar, se representan sólo dos juegos de cromosomas replicados, diferenciados por el color. (a) *Interfase (G_2): replicación del DNA y del centrosoma.* Después de la replicación del DNA durante la fase S, los cromosomas, cada uno de los cuales contiene una cromátida hermana, están descondensados y no son visibles como estructuras definidas. Al alcanzar G_2 los centríolos se han replicado para formar los centrosomas hijos. (b) *Profase: migración de los centrosomas.* Los centrosomas, cada uno de los cuales posee un centríolo hijo, empiezan a acercarse a los polos opuestos de la célula. Los cromosomas comienzan a condensarse y toman el aspecto de hilos largos. (c) *Prometafase: formación del huso.* La membrana nuclear se fragmenta en vesículas pequeñas y los microtúbulos del huso ingresan en la región nuclear. La condensación de los cromosomas se completa; cada cromosoma visible está compuesto de dos cromátidas unidas por sus centrómeros. Los cinetocoros presentes en los centrómeros unen los cromosomas a los microtúbulos del huso. (d) *Metafase: alineación de los cromosomas.* Los cromosomas se acercan al ecuador de la célula donde se alinean en el plano ecuatorial. (e) *Anafase: separación de los cromosomas.* Las dos cromátidas hermanas se separan en cromosomas independientes. Cada cromosoma, unido a un microtúbulo de cinetocoro, se desplaza hacia un polo. Simultáneamente, los polos se separan. (f) *Telofase y citocinesis.* Las membranas nucleares se forman nuevamente alrededor de los núcleos hijos; los cromosomas se descondensan y se hacen menos netos. El huso desaparece a medida que los microtúbulos se despolimerizan y tiene lugar la separación celular. (g) Interfase (G_1): después de la separación, las células hijas entran en el estadio G_1 de la interfase.

En el capítulo 21 se considera en detalle cómo se regula la progresión a través del ciclo celular y la replicación celular. En esta sección se examina la mecánica de la mitosis en una célula animal "típica." Los errores en la mitosis pueden conducir a la falta o el exceso de cromosomas, lo que a su vez produce patrones anormales de desarrollo cuando esto se presenta durante la embriogénesis y diversas patologías cuando tiene lugar después del nacimiento. Para asegurar que las mitosis transcurren sin errores en los trillones de divisiones celulares que tienen lugar durante la vida de un organismo, la evolución creó un mecanismo muy redundante, en el que cada paso crucial lo efectúan en forma concurrente las proteínas motoras de los microtúbulos y la dinámica de ensamblaje de éstos.

El aparato mitótico es una máquina de microtúbulos para separar los cromosomas

La estructura del aparato mitótico cambia en forma constante durante la mitosis (fig. 20-30). Sin embargo, durante un período breve de la metafase, los cromosomas se alinean en el ecuador de la célula. Esta descripción comenzará con el examen de la estructura del aparato mitótico en la metafase y luego se analizará la manera en que este aparato captura y organiza los cromosomas durante la profase, cómo separa los cromosomas durante la anafase y cómo determina el lugar por donde las células se dividen durante la telofase.

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación focalizada: Mitosis

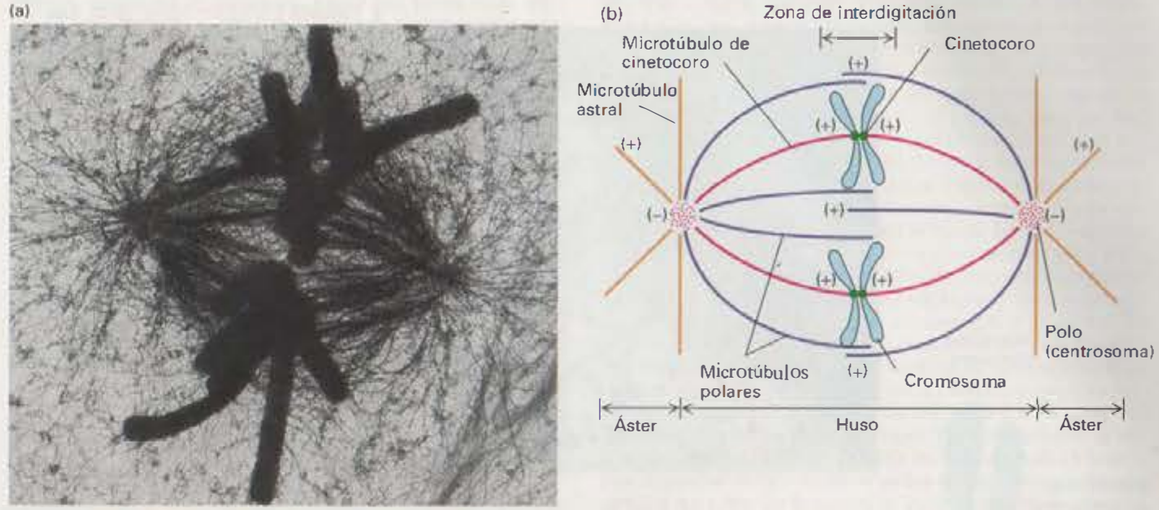


▲ FIGURA EXPERIMENTAL 20-30 La microscopia de fluorescencia revela los cambios en la organización de los cromosomas y microtúbulos en cuatro estadios de la mitosis. Se tiñeron fibroblastos cultivados con un anticuerpo antitubulina fluorescente (verde) y con el colorante etidio que se fija al DNA (violeta). Por lo tanto, en estas microfotografías de fluorescencia, el color verde revela los microtúbulos; el violeta, la cromatina y el azul, las regiones con ambas estructuras. (a) Durante la profase temprana, el núcleo está rodeado por un conjunto de microtúbulos de interfase y la cromatina es difusa. (b) Al llegar a la prometafase, la membrana nuclear se ha fragmentado y los centrosomas replicados (los centríolos) han migrado a los polos, de los que irradian microtúbulos. (c) En la metafase, los cromosomas totalmente condensados se han alineado a mitad de camino entre los polos para formar la placa de la metafase. Haces densos de microtúbulos conectan los cromosomas a los polos. (d) En la anafase tardía, los cromosomas son atraídos hacia los polos a lo largo de los microtúbulos radiados. (De J. C. Waters, R. W. Cole y C. L. Rieder, 1993, *J. Cell Biol.* 122:361; cortesía de C. L. Rieder.)

En la metafase el aparato mitótico está organizado en dos partes: un **huso mitótico** central y un par de ásteres (fig. 20-31a; también véase fig. 20-2c). El huso es un haz de microtúbulos y proteínas asociadas con simetría bilateral y con forma de pelota de rugby; queda dividido en dos mitades opuestas por los cromosomas en metafase ubicados en el ecuador de la célula. Un áster es un conjunto de microtúbulos dispuestos en forma de estrella en cada polo del huso.

En cada mitad del huso un solo centrosoma en el polo organiza tres juegos distintos de microtúbulos, cuyos extremos (–) apuntan hacia el centrosoma (fig. 20-31b). Uno de estos conjuntos, los *microtúbulos astrales*, forman el áster; estos microtúbulos se irradian hacia afuera del centrosoma, hacia la corteza celular, donde ayudan a ubicar el aparato mitótico y después colaboran con la determinación del plano de división en la citocinesis. Los otros dos juegos de microtúbulos componen el huso. Los *microtúbulos de los cinetocoros* se unen a los cromosomas en sitios especializados de unión de los cromosomas llamados cinetocoros. Los *microtúbulos polares* no interactúan con los cromosomas, sino que se superponen con los microtúbulos polares del polo opuesto. Dos tipos de interacciones mantienen las mitades del huso juntas para formar el aparato mitótico con simetría bilateral: 1) las interacciones laterales entre los extremos (+) superpuestos de los microtúbulos polares y 2) las interacciones terminales entre los microtúbulos de los cinetocoros y los cinetocoros de las cromátidas hermanas. En el capítulo 21 se describen los grandes complejos de proteínas, llamados *cohesinas*, que mantienen unidas las cromátidas hermanas.

El aparato mitótico es un componente básico de la mitosis en todos los organismos, pero su aspecto y componentes pueden variar con amplitud. En la levadura brotante *Saccharomyces cerevisiae*, por ejemplo, el aparato mitótico sólo es un huso, formado por un número mínimo de microtúbulos de cinetocoros y polares. Los *cuerpos polares del huso*, estructuras trilaminadas localizadas en la membrana nuclear, que no se rompen durante la mitosis, organizan estos microtúbulos. Además, debido a que la célula de levadura es pequeña, no necesita ásteres bien desarrollados que ayuden durante la mitosis. Aunque el cuerpo polar del huso y los centrosomas son diferentes desde el punto de vista estructural, poseen proteínas comunes, como la γ-tubulina, que tienen como función organizar el huso mitótico. Como sucede en las células de levadura, la mayor parte de las células vegetales no contiene centrosomas visibles. Las características peculiares del aparato mitótico de las células vegetales se describen al final de esta sección.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 20-31 La microscopia electrónica de alto voltaje permite visualizar los componentes del aparato mitótico en una célula de mamífero en metafase. (a) Los microtúbulos se tiñeron con anticuerpos antitubulina marcados con biotina para aumentar su tamaño en esta microfotografía electrónica. Los objetos cilíndricos grandes son cromosomas. (b) Esquema que corresponde a la célula en metafase mostrada en (a). Tres juegos de microtúbulos (MT) constituyen el aparato mitótico. Todos los microtúbulos tienen sus extremos (–) en los polos (centrosomas). Los microtúbulos astrales se proyectan hacia la corteza y se unen a ella. Los microtúbulos de cinetocoro se conectan a los cromosomas (azul). Los microtúbulos polares se proyectan hacia el centro de la célula con sus extremos distales (+) solapados. [Parte (a) cortesía de J. R. McIntosh.]

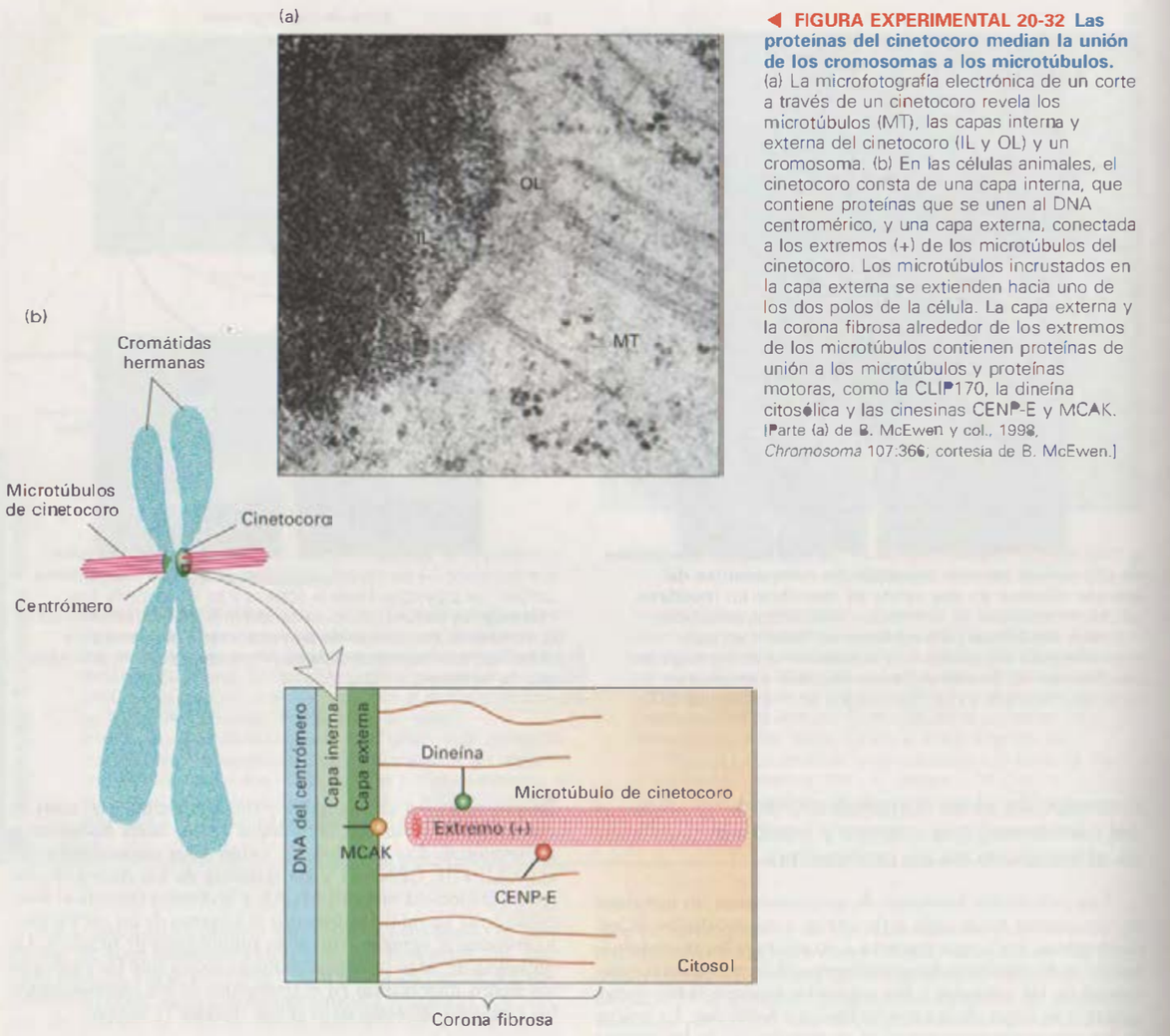
El cinetocoro es un complejo proteico del centrómero que captura y colabora en el transporte de los cromosomas

Las cromátidas hermanas de un cromosoma en metafase se transportan hacia cada polo unidas a microtúbulos de los cinetocoros. En lo que respecta a su unión a los microtúbulos y a su movimiento, los cromosomas difieren en grado sustancial de las vesículas y los orgánulos transportados como cargas a lo largo de los microtúbulos citosólicos. La unión de los cromosomas en metafase al extremo (+) de los microtúbulos de los cinetocoros es mediada por un gran complejo proteico, el cinetocoro, que tiene varias funciones: atrapar y unir los extremos de los microtúbulos a los cromosomas, generar fuerzas para mover los cromosomas a lo largo de los microtúbulos y regular la separación de los cromosomas y su translocación a los polos. En una célula animal, el cinetocoro se forma en el centrómero y presenta una capa interna y una externa, incrustadas en una corona fibrosa (fig. 20-32).

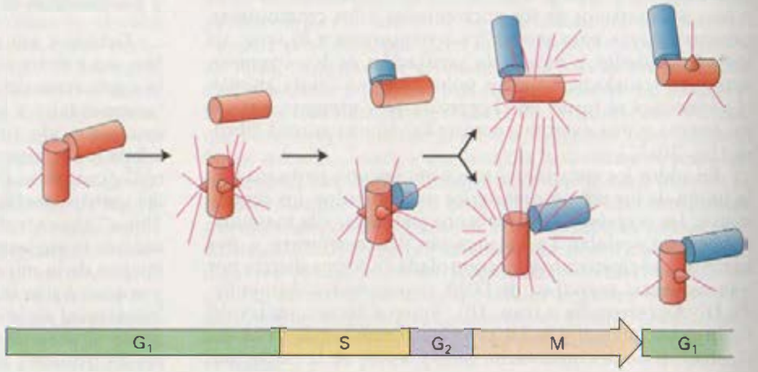
En todos los eucariontes tres componentes participan en la unión de los cromosomas a los microtúbulos: los centrómeros, las proteínas del cinetocoro y el huso, y la maquinaria del ciclo celular. La localización del centrómero y, por lo tanto, del cinetocoro está controlada en forma directa por una secuencia específica de DNA cromosómico denominada *DNA centromérico* (cap. 10). Aunque las secuencias del DNA centromérico y de las proteínas ligadoras de DNA del cinetocoro no se conservaron bien a través de la evolución, las proteínas del ciclo celular y muchas de las que unen el cinetocoro al huso son homólogas en los seres humanos y las levaduras. Las proteínas de unión a los microtúbulos (p. ej., CLIP170, CENP-E) y las motoras de los microtúbulos (p. ej., la cinesina mitótica MCAK y la dineína citosólica) cooperan en la unión del cinetocoro al extremo de un microtúbulo mientras se agregan o disocian subunidades de tubulina. La presencia de estas proteínas motoras indica que los cinetocoros tienen importancia en el transporte de los cromosomas a los extremos opuestos de la célula durante la mitosis.

Los centrosomas duplicados se alinean y comienzan a separarse en la profase

Debido a que cada mitad del aparato mitótico en metafase surge de un centrosoma polar, su ensamblaje depende de la duplicación del centrosoma y del movimiento de los centrosomas hijos a las mitades opuestas de la célula. Este proceso, conocido como *ciclo del centríolo* (o *del centrosoma*) señala los primeros pasos de la mitosis, que empiezan durante G_1, cuando se duplican los centríolos y otros componentes del centrosoma (fig. 20-33). Al llegar a G_2, los dos centríolos "hijos" alcanzaron su longitud completa, pero los duplicados todavía se encuentran dentro de un solo centrosoma. Al comienzo de la mitosis los dos pares de centríolos se separan y migran hacia lados opuestos del núcleo, estableciendo la bipolaridad de la célula en división. Por consiguiente, en algunos aspectos la mitosis puede considerarse la migración de los centrosomas duplicados que, a lo largo de su desplaza-



◀ **FIGURA EXPERIMENTAL 20-32 Las proteínas del cinetocoro median la unión de los cromosomas a los microtúbulos.** (a) La microfotografía electrónica de un corte a través de un cinetocoro revela los microtúbulos (MT), las capas interna y externa del cinetocoro (IL y OL) y un cromosoma. (b) En las células animales, el cinetocoro consta de una capa interna, que contiene proteínas que se unen al DNA centromérico, y una capa externa, conectada a los extremos (+) de los microtúbulos del cinetocoro. Los microtúbulos incrustados en la capa externa se extienden hacia uno de los dos polos de la célula. La capa externa y la corona fibrosa alrededor de los extremos de los microtúbulos contienen proteínas de unión a los microtúbulos y proteínas motoras, como la CLIP170, la dineína citosólica y las cinesinas CENP-E y MCAK. [Parte (a) de B. McEwen y col., 1998, *Chromosoma* 107:366, cortesia de B. McEwen.]

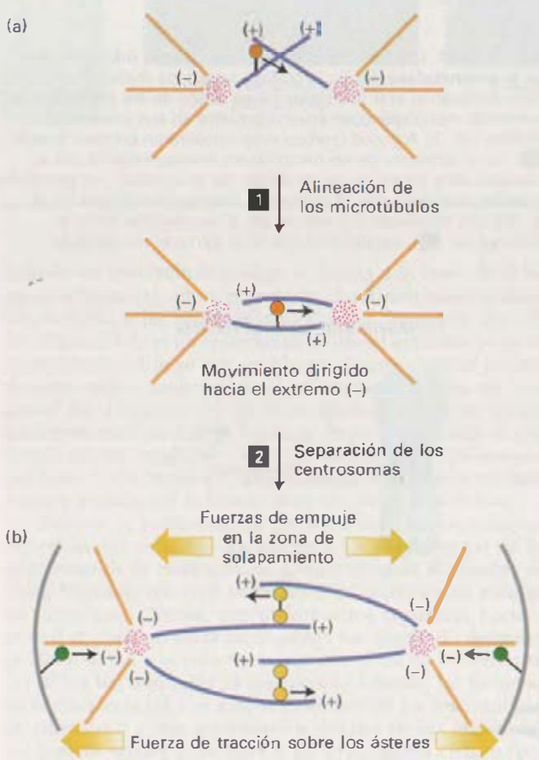


▶ **Fig. 20-33. Relación de la duplicación del centrosoma con el ciclo celular.** Después de que el par de centriolos padres (en rojo) se separan ligeramente, un centríolo hijo (en azul) brota de cada uno de ellos y se elonga. Al llegar a G_2, el crecimiento de los centríolos hijos se ha completado, pero los dos pares permanecen dentro de un solo complejo centrosómico. Al comienzo de la mitosis, el centrosoma se divide y cada par de centríolos migra a extremos opuestos de la célula.

miento, captan los cromosomas, hacen una pausa en la metafase, y durante la anafase continúan su movimiento hacia las localizaciones nuevas en la células hijas, donde liberan los cromosomas y organizan los microtúbulos citosólicos.

La dinámica de los microtúbulos cambia en forma drástica al comienzo de la mitosis, cuando los largos microtúbulos de la interfase desaparecen y son reemplazados por los microtúbulos astrales y del huso. Estos microtúbulos mitóticos, que se nuclean alrededor de los centrosomas recién duplicados, son más numerosos, más cortos y menos estables que los de la interfase. La vida media de un microtúbulo disminuye de 10 minutos en las células en interfase a 60-90 segundos en el aparato mitótico. Este aumento de la inestabilidad dinámica permite que los microtúbulos se ensamblen y desarmen con rapidez durante la mitosis.

Los resultados de los estudios genéticos y de biología celular, efectuados en primer término en levaduras y moscas, implican a varias cinesinas en la organización de los microtúbulos en una disposición bipolar, orientando de esa forma el ensamblaje del huso y los ásteres del huso. Por ejemplo, los anticuerpos dirigidos contra una cinesina de extremo (+) o extremo (–) inhiben la formación del huso bipolar cuando se microinyectan a la célula antes de la profase, pero no después. Se cree que una cinesina dirigida hacia el extremo (–), como la Kin-C, coopera en la alineación de los microtúbulos polares de orientación opuesta que se extienden de cada centrosoma. A continuación, una cinesina dirigida al extremo (+), que es muy probable que sea la BimC bipolar, establece uniones cruzadas entre microtúbulos antiparalelos y los separa entre sí. Además, los resultados de los experimentos de localización con anticuerpos antidineína mostraron la presencia de dineína citosólica en los centrosomas y la corteza de células animales en división. Los resultados de otros estudios con mutantes de levaduras que carecen de dineína citosólica sugieren que la dineína presente en la corteza coopera en forma simultánea en el anclaje de los microtúbulos astrales y en la orientación de los polos del huso. Por consiguiente, la alineación y la separación iniciales de los centrosomas en la profase dependen del crecimiento de los microtúbulos polares y astrales, así como de la acción de algunas proteínas motoras, como se muestra en la figura 20-34.



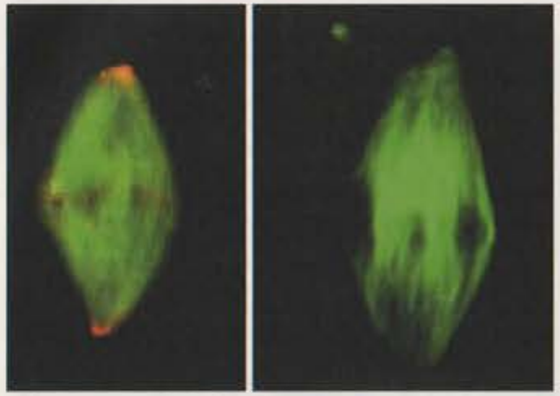
▲ **Fig. 20-34. Modelo de la participación de las proteínas motoras de los microtúbulos en los movimientos del centrosoma durante la profase.** (a) Durante la profase, los microtúbulos polares que crecen al azar a partir de los polos opuestos se alinean con la ayuda de motores dirigidos a los extremos (–) (en anaranjado). (b) Después de la alineación, cinesinas mitóticas dirigidas al extremo (+) (en amarillo), como la cinesina bipolar BimC, generan fuerzas de empuje que separan los polos. Además, una fuerza dirigida hacia el extremo (–), ejercida por la dineína citosólica (en verde) presente en la corteza, puede traccionar los ásteres hacia los polos. Fuerzas similares actúan después durante la anafase.

Aunque los centrosomas facilitan la formación de los polos del huso, según resultados recientes los microtúbulos polares pueden ensamblarse y organizarse en haces antiparalelos en ausencia de centrosomas. Por ejemplo, la Ran GTPasa, que actúa en la importación y la exportación nucleares (cap. 12) parece promover la polimerización de subunidades de tubulina. La Ran actúa con otras proteínas, quizá las proteínas motoras, para estabilizar los microtúbulos aumentando su frecuencia de rescate.

La formación del huso mitótico de la metafase requiere proteínas motoras y microtúbulos dinámicos

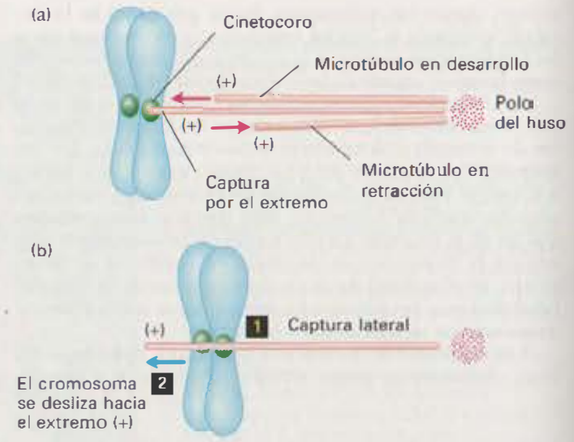
Cuando los centrosomas duplicados se alinean, comienza la formación del huso, determinada por acontecimientos simultáneos que tienen lugar en los centrosomas y los cromosomas. Como se explicó recién, el centrosoma facilita la formación del huso al nuclear el ensamblaje de los microtúbulos del huso. Además, los extremos (–) de los microtúbulos se congregan y estabilizan en los polos por la acción de la dineína-dinactina sobre la proteína del aparato nuclear/mitótico. El papel de la dineína en la formación de los polos del huso se demostró por estudios de reconstitución, en los que se forman husos bipolares en extractos de huevos de *Xenopus* en presencia de centrosomas, microtúbulos y núcleos de espermatozoides. El agregado de anticuerpos contra la dineína citosólica a este sistema in vitro libera y dispersa los microtúbulos del huso, pero deja los microtúbulos centrosómicos astrales en su lugar (fig. 20-35).

La inestabilidad dinámica de los microtúbulos del huso en el otro extremo, el (+), es crítica para la captura de los cromosomas durante la profase tardía, a medida que la membrana nuclear empieza a desintegrarse. Mediante el alargamiento y el acortamiento rápidos de su extremo (+), un microtúbulo dinámico sondea el ambiente abundante en cromosomas de la célula. A veces el extremo (+) de un microtúbulo entra en contacto directo con un cinetocoro, haciendo un "centro exacto". Con mayor frecuencia un cinetocoro entra en contacto con un

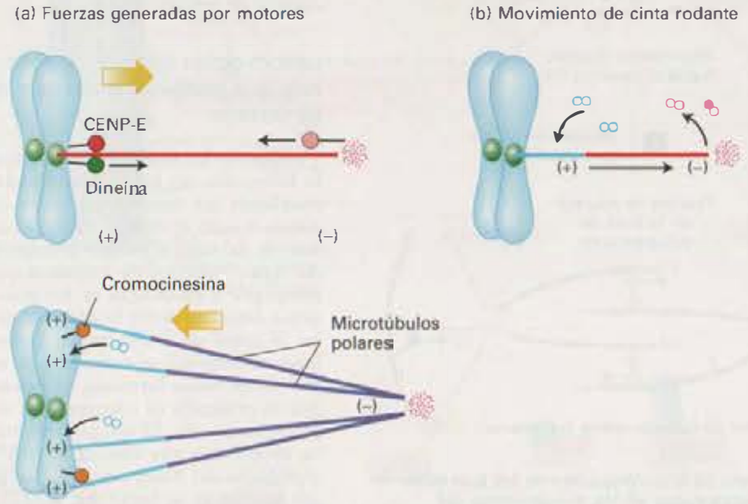


Control | Agregado de anticuerpos antidineína

▲ FIGURA EXPERIMENTAL 20-35 La dineína citosólica participa en la formación y la estabilización de los polos del huso mitótico. Husos reconstituidos in vitro se tiñeron con anticuerpos policlonales marcados con fluorocromos, contra tubulina (verde) y contra dineína (rojo) y se examinaron en un microscopio de fluorescencia. En el huso control (*izquierda*), la dineína citosólica está presente en ambos extremos, así como en el ecuador. El agregado de un anticuerpo monoclonal contra dineína después de la formación del huso (*derecha*) altera la localización de la dineína y provoca el ensanchamiento de los polos (De R. Heald et al., 1997 *J. Cell Biol.* 138:615; cortesía de R. Heald.)

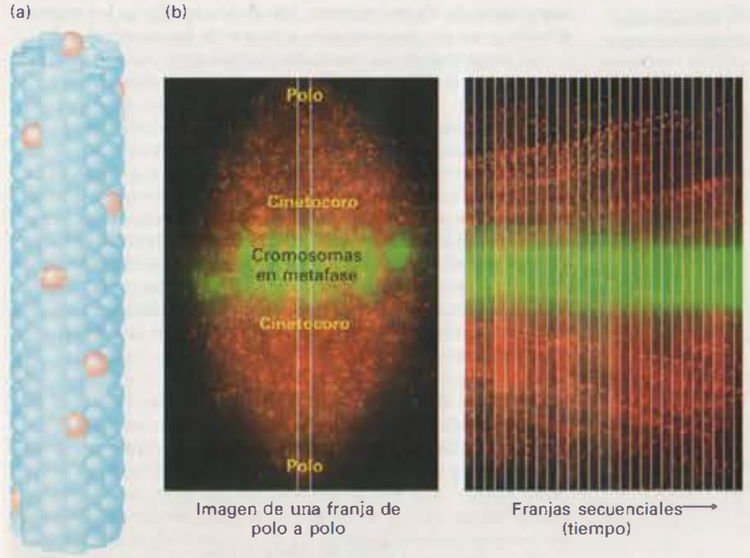


▲ Fig. 20-36. Captura de cromosomas por los microtúbulos en la prometafase. (a) En la profase tardía, los microtúbulos del huso sondean al azar el citoplasma en busca de los cromosomas, creciendo y encogiéndose alternadamente en sus extremos distales (+). (b) Algunos cromosomas encuentran primero el lado (**1**), no el extremo, de un microtúbulo, interaccionando con el microtúbulo a través de las proteínas del cinetocoro. Las proteínas motoras asociadas con el cinetocoro dirigidas al extremo (+) (p. ej., MCAK) desplazan a continuación el cromosoma hacia el extremo (+) (**2**), estabilizando de esta forma el microtúbulo.



▲ Fig. 20-37. Modelo de las fuerzas que estabilizan los cromosomas de metafase en la placa ecuatorial. (a) La dineína citoplasmática, un motor dirigido hacia el extremo (−) (en verde claro) presente en el cinetocoro y un motor dirigido al extremo (+) (en rosa) presente en el polo del huso traccionan los cromosomas hacia el polo. La cromocinesina, un motor no perteneciente al cinetocoro dirigido hacia el extremo (+) y presente en el brazo de la cromátida, ejerce una fuerza opuesta sobre los microtúbulos polares y aleja los cromosomas del polo. La CENP-E, una cinesina que no media el movimiento, mantiene al cinetocoro anclado al microtúbulo del cinetocoro. (b) El movimiento de cinta rodante (*treadmilling*) de las subunidades de tubulina estabiliza brevemente las longitudes de los microtúbulos del huso durante la metafase y equilibra el ensamblaje del cinetocoro con el desarmado de los polos.

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación focalizada: Dinámica de los microtúbulos



◀ FIGURA EXPERIMENTAL 20-38 El flujo en dirección a los polos de las subunidades de tubulina durante la metafase se visualiza por microscopia de puntos fluorescentes. (a) Cuando una cantidad subestoiquiométrica de subunidades de tubulina fluorescente se ensamblan en un microtúbulo, éste toma un aspecto punteado. (b) En una célula viva en metafase, los microtúbulos punteados no tienen el aspecto fibroso que se observa con el microscopio de fluorescencia convencional. Sin embargo, la dinámica de la translocación de las subunidades se pone en evidencia si se toma una franja a través de la misma posición de cada exposición de una serie de fotografías tomadas a lapsos determinados (zona recuadrada). Si las subunidades de tubulina marcadas se mueven, la pendiente de la línea formada por un punto determinado en las imágenes consecutivas corresponde a la velocidad de translocación. Aquí, los puntos en ambos lados del huso viajan hacia los polos a una velocidad de 0,75 μm/s. [Parte (b) de T. J. Mitchison y E. D. Salmon, 2001, *Nature Cell Biol.* 3:E17; cortesía de A. Desai.]

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Microscopia de puntos fluorescentes durante la dinámica de la metafase

lado de un microtúbulo y luego se desliza a lo largo de él hacia el extremo (+), en un proceso en el que participan la dineína citosólica y las cinesinas mitóticas del cinetocoro (fig. 20-36). Más allá de si un cromosoma se une al extremo (+) de un microtúbulo del huso por un blanco directo o por el proceso de captura/deslizamiento lateral, el cinetocoro forma un "casquete" en el extremo (+) del microtúbulo. Por último, el cinetocoro de cada cromátida hermana de un cromosoma es capturado por microtúbulos que surgen de los polos más cercanos del huso. Cada brazo del cromosoma se une a otros microtúbulos a medida que la mitosis progresa hacia la metafase.

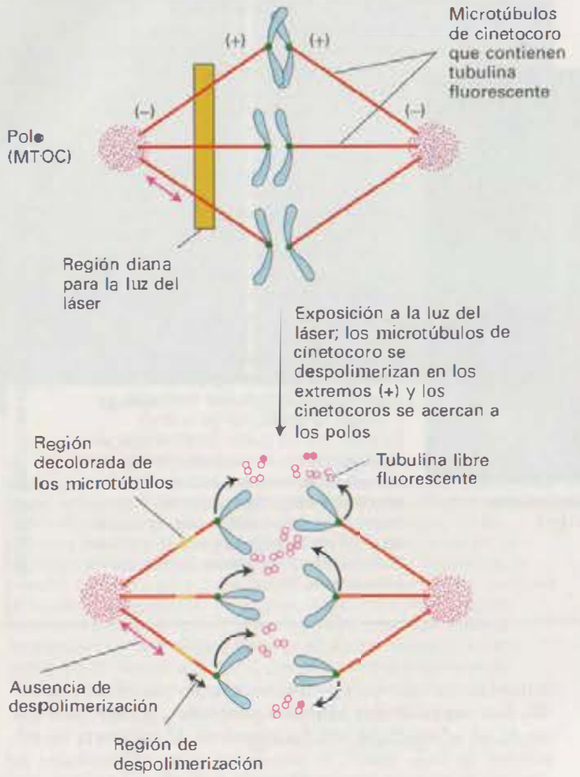
Durante la profase tardía (prometafase), los cromosomas recientemente condensados unidos a los extremos (+) de los microtúbulos de cinetocoro se desplazan hacia el ecuador del huso. Mientras recorren su camino, los cromosomas exhiben una *conducta saltona*, con movimientos oscilantes hacia el polo o el ecuador. Estas oscilaciones son resultado de la despolimerización y la polimerización alternada de los extremos (+) de los microtúbulos de cinetocoro. Además, las proteínas motoras asociadas con ambos extremos de los microtúbulos de cinetocoro y con los extremos distales de los microtúbulos polares unidos a los brazos del cromosoma ejercen fuerzas contrarias, que se piensa que son las responsables de la ubicación simétrica de los cromosomas capturados entre los dos polos del huso (fig. 20-37a).

Aunque las longitudes de los microtúbulos de cinetocoro y polares terminan por estabilizarse, continúa un flujo, o una recirculación, de subunidades a través de los microtúbulos hacia los polos. En la metafase, la pérdida de subunidades de tubulina en los extremos (−) de los microtúbulos del huso se equilibra por el agregado de subunidades en los extremos (+) (fig. 20-37b). El flujo de subunidades de tubulina desde los cinetocoros hacia los polos puede visualizarse después de inyectar un "pulso" muy pequeño de subunidades de tubulina marcadas con un colorante fluorescente en una célula (fig. 20-38). Los microtúbulos aparecen punteados, porque muy pocas de las subunidades son fluorescentes. Al comparar las posiciones de cada punto, se puede ver si las subunidades de tubulina se mueven en una dirección específica. Las imágenes muestran que el huso mitótico de la metafase es una estructura finamente equilibrada, pero todavía dinámica, que mantiene los cromosomas en el plano ecuatorial. Por los mecanismos descritos en el capítulo 21, el ciclo celular se mantiene en suspenso hasta que todos los cromosomas sean capturados y estén alineados. Un solo cinetocoro suelto es suficiente para impedir el inicio de la anafase.

En la anafase los cromosomas se separan y el huso se elonga

Las mismas fuerzas que forman el huso durante la profase y la metafase también dirigen la separación de los cromosomas hacia los polos opuestos durante la anafase. Ésta se divide en dos etapas bien diferenciadas, la *anafase A* y la *anafase B* (anafase temprana y tardía). La anafase A se caracteriza por el acortamiento de los microtúbulos de cinetocoro en sus extremos (+), lo que atrae a los cromosomas hacia los polos. En la anafase B, los dos polos se separan aun más, arrastrando los cromosomas unidos a ellos hacia los que se transformarán en las dos células hijas.

Acortamiento de los microtúbulos en la anafase A. Los resultados de los estudios in vitro indican que la despolimerización de los microtúbulos en huevos de *Xenopus* es suficiente para desplazar los cromosomas hacia los polos. En uno de esos estudios, microtúbulos purificados se mezclaron con cromosomas en anafase purificados; como se esperaba, los cinetocoros se unieron de manera preferencial a los extremos (+)

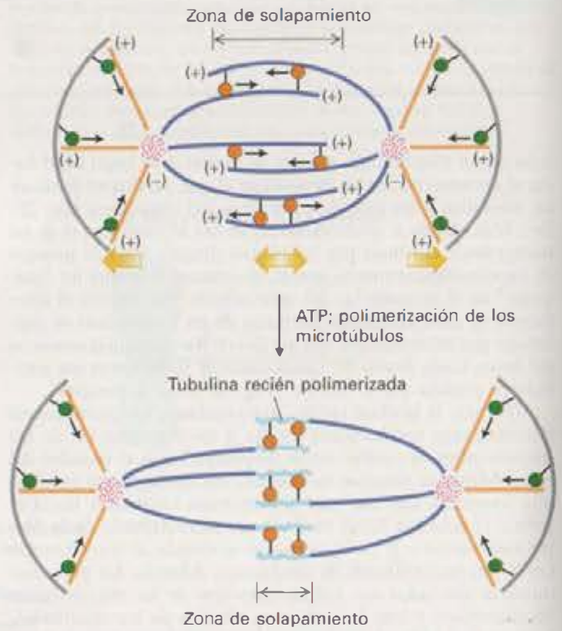


▲ FIGURA EXPERIMENTAL 20-39 El acortamiento del extremo (+) de los microtúbulos del cinetocoro mueve los cromosomas hacia los polos en la anafase A. Se inyectan fibroblastos con tubulina fluorescente y luego se permite que entren en metafase para que todos los microtúbulos sean fluorescentes. Sólo se muestran los microtúbulos de cinetocoro. En la anafase temprana, una franja de microtúbulos (recuadro amarillo) se somete a una luz láser, que elimina la fluorescencia, pero deja los microtúbulos intactos y funcionales en la región decolorada. El segmento decolorado de cada microtúbulo proporciona de esta forma un marcador de la posición de esa parte del microtúbulo. En la anafase, la distancia entre la zona decolorada y el polo adyacente (marcada por las flechas rojas de dos puntas) no cambia, en tanto que la distancia a la cromátida adyacente (marcada por las flechas negras de dos puntas) disminuye. Este hallazgo indica que durante la anafase los microtúbulos se desarman en su extremo (+) inmediatamente por detrás de los cinetocoros, no en los polos. (Adaptado de G. J. Gorbsky et al., 1987, *J. Cell Biol.* 104:9, y 1988, *J. Cell Biol.* 106:1185.)

de los microtúbulos. Para inducir la despolimerización de los microtúbulos se diluyó la mezcla de reacción; de esa manera se redujo la concentración de dímeros de tubulina libre. El análisis por videomicroscopia mostró entonces que los cromosomas se desplazaban hacia el extremo (–), a una velocidad similar a la del movimiento de los cromosomas durante la anafase en las células intactas. Debido a que no había ATP (ni ninguna otra fuente de energía) presente en estos experimentos, el movimiento de los cromosomas hacia el extremo (–) debe haberse impulsado, de alguna manera, por el desarmado de los microtúbulos y no por las proteínas motoras de los microtúbulos.

El experimento de marcado fluorescente in vivo que se muestra en la figura 20-39 proporciona pruebas de que el acortamiento de los microtúbulos de cinetocoro en su extremo (+) desplaza los cromosomas hacia los polos en las células de mamífero. Una cinesina asociada con el cinetocoro, la MCAK, promueve el desarmado del extremo (+) mientras la CENP-E, también del cinetocoro, se une al extremo que se acorta de manera progresiva. Según este modelo, el desarmado de los microtúbulos determina el movimiento de los cromosomas hacia los polos. Aunque las cinesinas del cinetocoro promueven este desarmado o mantienen los cromosomas unidos al extremo (+) que se acorta de los microtúbulos de cinetocoro, no son las que realmente mueven los cromosomas a lo largo de éstos.

Elongación del huso en la anafase B. Los resultados de varios tipos de experimentos implican tres procesos en la separación de los polos en la anafase B: una fuerza de empuje generada por el deslizamiento de los microtúbulos polares



▲ Fig. 20-40. Modelo de elongación del huso y del movimiento de los polos durante la anafase B. Una o más cinesinas del huso dirigidas hacia el extremo (+) (en anaranjado) se unen a microtúbulos polares antiparalelos en la región de solapamiento y luego "caminan" a lo largo de un microtúbulo del otro semihuso hacia su extremo (+). En las células que forman un áster, la dineína citoplasmática, una proteína motora dirigida hacia el extremo (–) (en verde), anclada en la corteza de la membrana plasmática, camina a lo largo de los microtúbulos astrales, traccionado los polos hacia afuera. Simultáneamente, subunidades de tubulina se agregan a los extremos (+) de todos los microtúbulos polares, y alargan el huso. (Adaptado de H. Masuda y W. Z. Cande, 1987 *Cell* 49:193.)

entre sí mediada por cinesina una fuerza de tracción generada por la dineína citosólica asociada con la corteza y el alargamiento de los microtúbulos polares en su extremo (+). En la figura 20-40 se observa el efecto coordinado de estos procesos.

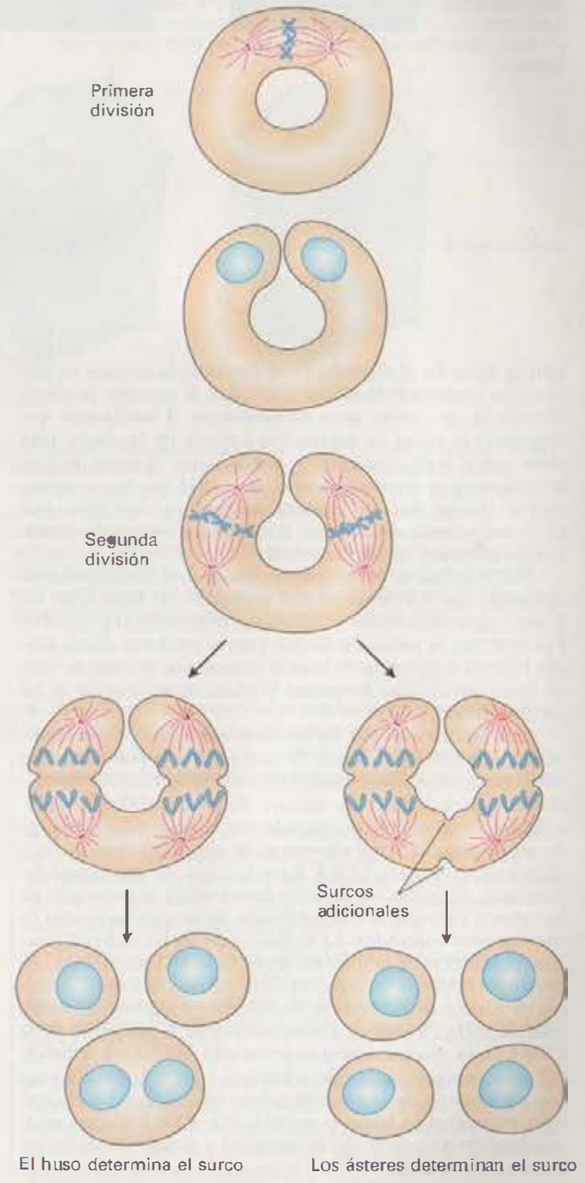
Cuando se elimina el ATP de células en metafase por tratamiento suave con un detergente, el movimiento de los cromosomas hacia los polos (anafase A) continúa, pero los polos del huso no se separan (anafase B). Este hallazgo indica que las proteínas motoras de los microtúbulos participan en la separación de los polos del huso, como lo hacen en el movimiento de los centrosomas en la prometafase (véase fig. 20-34). Los experimentos con husos artificiales ensamblados a partir de extractos de huevos de rana proporcionaron mayores detalles acerca de los movimientos de la anafase B. En presencia de calcio, el huso se activa y se elonga, simulando una anafase B, y la longitud de la zona de solapamiento entre las dos mitades del huso disminuye. La observación de que los microtúbulos antiparalelos adyacentes en este sistema migran en dirección al extremo (–) que mira hacia el polo sugiere que una cinesina dirigida al extremo (+) separa los polos del huso en la anafase B. En un modelo, la cinesina bipolar BimC unida a un microtúbulo en la región de solapamiento se desplaza hacia el extremo (+) de un microtúbulo vecino pero antiparalelo, empujando así el microtúbulo adyacente en dirección de su extremo (–) (véase fig. 20-40). La participación de una cinesina motora se sustenta en experimentos en los que anticuerpos dirigidos contra una región conservada de la superfamilia de las cinesinas inhiben la elongación inducida por ATP de husos de diatomea in vitro.

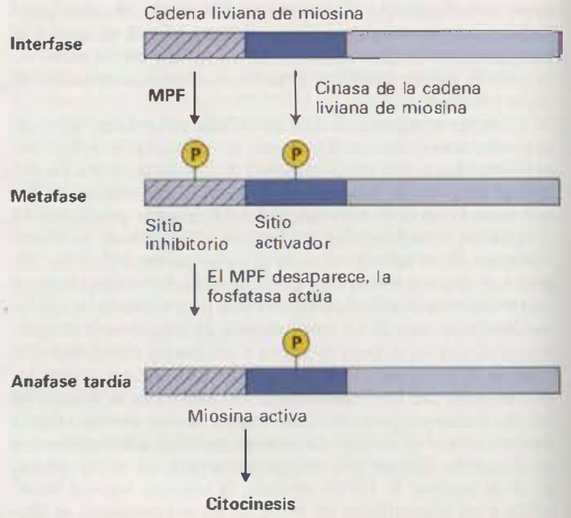
En presencia de αβ-tubulina, husos de rana reactivados y husos de diatomea aislados agregan subunidades de tubulina al extremo (+) de los microtúbulos polares, alargándolos. El tercer proceso que tiene lugar durante la anafase B puede demostrarse al cortar el huso por la mitad con una microaguja durante la anafase; los semihusos resultantes se desplazan con rapidez hacia los polos, a una velocidad más rápida que la habitual durante la anafase. Esta observación sugiere que la dineína citosólica, una proteína motora dirigida al extremo (–) asociada con la corteza, tracciona los microtúbulos astrales, separando así los polos (véase fig. 20-40).

▶ FIGURA EXPERIMENTAL 20-41 Los experimentos de micromanipulación pueden determinar si el huso o los ásteres controlan la ubicación del plano de separación durante la citocinesis. Una perla pequeña de vidrio se presiona contra un huevo fecundado hasta que las membranas de los lados opuestos de la célula entran en contacto, se fusionan y cambian así la forma esférica del huevo a una forma de rosquilla. En la primera división celular, se desarrolla un huso normal y la célula en forma de rosquilla se divide para producir una sola célula en forma de C, con dos núcleos normales. Este resultado es de esperar, más allá de si los ásteres o el huso son los que determinan el plano de separación. En la segunda división celular, cada uno de los dos núcleos produce un huso normal. Si el huso determinara el plano de separación, la separación de la célula en forma de C produciría tres células, una de ellas con dos núcleos (*izquierda abajo*). Si los ásteres son los que determinan el plano de separación, se formaría un tercer plano de separación entre los ásteres de dos husos diferentes (*derecha abajo*). La división celular produjo cuatro células, lo que indica que se formó un surco adicional entre un par de ásteres.

Los microtúbulos y los microfilamentos trabajan en cooperación durante la citocinesis

Después de que los cromosomas migraron a extremos opuestos de la célula durante la anafase, se suceden dos acontecimientos estrechamente relacionados (véase fig. 20-29): se forma de nuevo la envoltura nuclear alrededor de cada juego completo de cromosomas, lo que marca así el final de la mitosis (telofase), y el citoplasma se divide, proceso denominado citocinesis. Cuando la citocinesis termina, se forman dos





▶ Fig. 20-42. Regulación de la cadena liviana de la miosina por el factor promotor de la mitosis. El factor promotor de la mitosis (MPF) es un complejo activado formado por una cinasa dependiente de ciclina (CDK1) y una proteína ciclina mitótica. La fosforilación de los sitios inhibitorios en la cadena liviana de la miosina por la actividad de la cinasa del MPF al principio de la mitosis impide que las cadenas pesadas activas de la miosina interactúen con los filamentos de actina y su desplazamiento a lo largo de ellos, proceso necesario para la citocinesis. Cuando la actividad del MPF decae durante la anafase, una fosfatasa constitutiva desfosforila los sitios inhibitorios y permite la citocinesis. Otra enzima, la cinasa de las cadenas livianas de miosina, fosforila un residuo diferente, lo que activa la miosina para interactuar con los filamentos de actina. (Véase L. L. Satterwhite et al., 1992, *J. Cell Biol.* 118:595; adaptado de A. Murray y T. Hunt, 1993, *The Cell Cycle: An Introduction*, W. H. Freeman and Company.)

células hijas. En el capítulo 19 se describió la manera en que el anillo contráctil de actina y miosina II estrecha la célula durante la citocinesis, pero no constituye el mecanismo que determina el plano de separación a través de la célula. Está claro que el anillo contráctil y, por lo tanto, el surco de división siempre se desarrollan en el sitio en el que los cromosomas se alinean durante la metafase, pero no está claro cuál es el componente del aparato mitótico que determina dónde se ensamblará el anillo contráctil.

Los resultados de experimentos de micromanipulación muestran que diferentes células dependen del huso o de los ásteres para determinar el plano de separación (fig. 20-41). Por ejemplo, la presencia de dos ásteres establece dónde tendrá lugar la separación en huevos fecundados de erizo de mar, en tanto que el huso determina el plano de separación en las células animales.

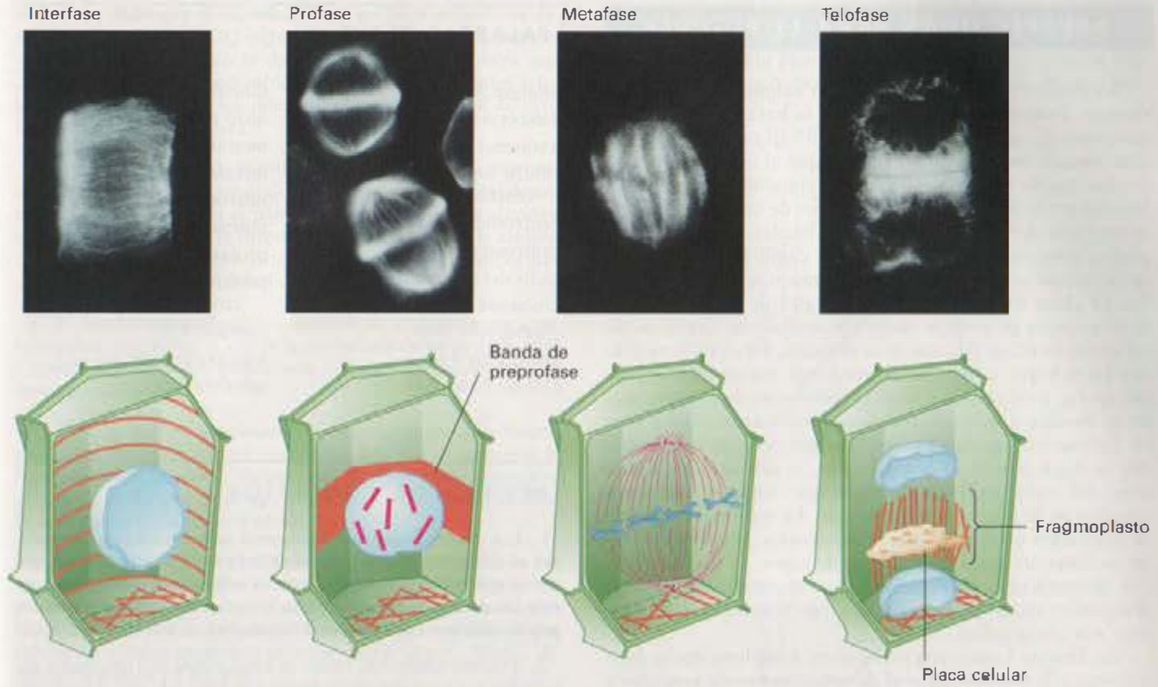
Una hipótesis es que los microtúbulos astrales o del huso envían una señal a la región de la corteza a mitad de camino entre los ásteres. Esta señal promueve la interacción de microfilamentos de actina y miosina II, produciendo la formación del anillo contráctil, seguida por el desarrollo del surco de separación. La señal todavía no se identificó, pero un candidato seductor es la CDK1. La activación de esta cinasa dependiente de la ciclina no sólo desencadena el comienzo de la mitosis, sino que la cadena liviana de la miosina es uno de sus sustratos conocidos. La fosforilación de las cadenas livianas reguladoras de la miosina II por la CDK1 al principio de la mitosis inhibe la interacción de la miosina con los filamentos de actina; así se evita la formación prematura del anillo contráctil (fig. 20-42). La disminución de la actividad de la CDK1 en la anafase tardía suprime esta inhibición, y propicia el ensamblaje del anillo contráctil y su contracción para formar el surco de separación (véase fig. 19-20). En el capítulo 21 se explica cómo la actividad de CDK1 y otras cinasas dependientes de la ciclina aumenta y disminuye en las células en replicación.

Las células vegetales reorganizan sus microtúbulos y construyen una nueva pared celular durante la mitosis

PLANTAS

Como se señaló, las células vegetales en interfase carecen de un solo centro perinuclear que organice los microtúbulos en la disposición radial típica de la interfase de las células animales. En cambio, numerosos MTOC tapizan la corteza de las células vegetales y organizan el ensamblaje de bandas transversales de microtúbulos por debajo de la pared celular (fig. 20-43, *izquierda*). Estos microtúbulos corticales, unidos por uniones cruzadas por MAP vegetales específicas, colaboran en la deposición de microfibrillas de celulosa extracelular, el elemento principal de la pared celular rígida (véase fig. 6-33).

Aunque los acontecimientos mitóticos en las células vegetales en general son similares a los de las células animales, la formación del huso y la citocinesis tienen características peculiares en las plantas (véase fig. 20-43). Las células vegetales agrupan sus microtúbulos corticales y los reorganizan en un huso durante la profase sin la colaboración de centrosomas. En la metafase, el aparato mitótico es muy similar en las células vegetales y animales. Durante esta etapa aparecen vesículas derivadas del Golgi que son transportadas hacia el aparato mitótico a lo largo de microtúbulos irradiados de cada extremo del huso. Durante la telofase estas vesículas se alinean cerca del centro de la célula en división y luego se fusionan para formar el *fragmoplasto*, una estructura de la membrana que reemplaza el anillo contráctil de las células animales. Las membranas de las vesículas que forman el fragmoplasto se transforman en las membranas plasmáticas de las células hijas. Los contenidos de estas vesículas, como los precursores polisacáridos de la celulosa y la pectina, forman la placa celular temprana, que se desarrolla para formar la pared celular nueva entre las células hijas.



▲ Fig. 20-43. Mitosis en una célula vegetal superior. Microfotografías de tinciones inmunofluorescentes (*arriba*) y los diagramas correspondientes (*abajo*) que muestran la disposición de los microtúbulos en las células vegetales en interfase y en mitosis. Un conjunto de microtúbulos corticales rodea la célula como un cinturón durante la interfase. Redes de microtúbulos cubren los extremos en crecimiento de las células vegetales y permanecen intactos durante la división celular. Cuando una célula entra en profase, los microtúbulos forman haces alrededor del núcleo y se reorganizan en un huso de aspecto similar al de la metafase de las células animales. En la telofase tardía, la membrana nuclear se ha formado nuevamente alrededor de los núcleos hijos y el fragmoplasto derivado del Golgi se ha ensamblado en la placa ecuatorial. Vesículas pequeñas adicionales, derivadas del complejo de Golgi, se acumulan en la placa ecuatorial y se fusionan con el fragmoplasto para formar una nueva placa celular. (Adaptado de R. H. Goddard et al., 1994, *Plant Physiol.* 104:1; microfotografías cortesía de Susan M. Wick.)

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 20.3

Dinámica de los microtúbulos y proteínas motoras en la mitosis

- En la mitosis los cromosomas replicados se separan y reparten de manera uniforme en dos cromosomas hijos. Esta parte del ciclo celular por lo general se divide en cuatro subestadios: profase, metafase, anafase y telofase (véase fig. 20-29).
- El aparato mitótico de las células animales comprende los microtúbulos astrales que forman los ásteres, los microtúbulos polares y del cinetocoro que forman el huso como una pelota de rugby, los polos del huso derivados de los centrosomas replicados y los cromosomas unidos a los microtúbulos de cinetocoro (véase fig. 20-31).
- Un conjunto simple del proteínas motoras de los microtúbulos, BimC, CENP-E y la dineína citosólica, está conservado en todos los husos. En los organismos más complejos hay otras proteínas motoras adicionales.
- Las interacciones mediadas por las proteínas motoras entre microtúbulos polares opuestos y entre los ásteres y la corteza celular alinean y separan los centrosomas durante la profase, estableciendo la orientación bipolar del huso (véase fig. 20-34).
- Los microtúbulos de cinetocoro capturan los cromosomas durante la profase (véase fig. 20-32). Las fuerzas opuestas generadas por las proteínas motoras a ambos extremos de los microtúbulos del huso centran los cromosomas durante la metafase (véase fig. 20-37).
- El efecto combinado de la dinámica de los microtúbulos (polimerización y despolimerización) y de los motores de los microtúbulos es responsable del transporte de los cromosomas hacia polos opuestos durante la anafase (véanse figs. 20-39 y 20-40).
- La separación durante la citocinesis produce dos células hijas. La señal para la separación se desconoce, pero es probable que elimine la inhibición de la interacción entre los filamentos de actina y miosina II, que impide la formación prematura del anillo contráctil.

PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO

La dineína es un motor molecular enigmático por varias razones. Primero, el dominio cabeza se basa en distintas repeticiones de un motivo "superbarril" (*β-propeller*). El diseño basado en este motivo sugiere que el mecanismo catalizador puede diferir de los de la cinesina y la miosina. Igualmente distintivo es el tallo ligador de microtúbulos que se proyecta del dominio cabeza catalizador. Las microfotografías electrónicas sugieren que los cambios de estructura de la cabeza se amplifican por movimientos grandes del tallo. La clave de este mecanismo surgirá de la estructura a nivel atómico de toda la molécula de dineína. Como se hizo en los estudios previos de la miosina, los científicos usarán un enfoque a dos puntas, mediante microscopia y cristalografía, para crear un modelo compuesto de la estructura de la dineína. Las reconstrucciones tridimensionales a partir de microfotografías electrónicas por congelación revelarán la organización global del tallo, la cabeza y los dominios del tallo bajo condiciones que simulen diferentes estadios en la generación de fuerzas. La información de alta resolución acerca del centro catalizador y la unión al tallo se obtendrá por cristalografía de rayos X. Las estructuras determinadas por este enfoque se integrarán con las densidades electrónicas obtenidas por microscopia electrónica por congelación.

La dineína parece una compañera complementaria de la cinesina y la miosina para el desplazamiento de vesículas y cromosomas. Si bien se conoce que la dinactina acopla una carga rodeada por membrana a la dineína o la cinesina, no se sabe cómo se coordinan los movimientos de los microtúbulos con los producidos por la miosina. Varias líneas de investigación sugieren que la dineína puede tener un papel central en la coordinación. Debido a que los extremos (+) de los filamentos de actina y de los microtúbulos tienden a apuntar hacia la periferia celular, la dineína es la única clase importante de motores que se desplazan hacia el interior de la célula. La ubicación de la dineína citoplasmática en la corteza celular abundante en actina es similar a la de la miosina y distinta de la ubicación de la cinesina. No se sabe si la dinactina también acopla la miosina al transporte de membranas.

La máquina de microtúbulos más impresionante es el aparato mitótico. En el curso del ciclo celular, se ensambla y se desarma, y lleva a cabo en forma confiable su función central: la separación de los cromosomas. El aparato mitótico no existe como un programa grabado en el genoma. En cambio, las instrucciones de estructura son consecuencia de la química, el ensamblaje está codificado por interacciones reversibles entre las proteínas y el ritmo está controlado por circuitos de señales. Las cuestiones en particular interesantes son los mecanismos de detección de tensión que centran los cromosomas en la placa de la metafase y translocan los cromosomas durante la anafase, los mecanismos de ubicación de los polos del huso y del anillo contráctil, y el mecanismo de generación de fuerzas durante la citocinesis. Para responder a estas preguntas se empleará una combinación de métodos de medida de fuerzas biofísicas y de mutagénesis de la biología molecular.

PALABRAS CLAVE

anafase *838*
ásteres *840*
axonema *836*
centro organizador de microtúbulos (MTOC) *817*
centrómero *838*
centrosoma *825*
ciclo del centríolo *841*
cinesinas *829*
cinetocoros *840*
citocinesis *848*
cuerpo basal *836*
dineínas *829*
huso mitótico *840*
inestabilidad dinámica *822*
metafase *838*
microtúbulos *817*
mitosis *838*
profase *838*
proteínas asociadas a microtúbulos (MAP) *823*
telofase *838*
transporte axónico *829*
tubulina *828*

REVISIÓN DE CONCEPTOS

1. Los microtúbulos son filamentos polares; esto es, un extremo es diferente del otro. ¿Cuál es la base de esta polaridad, cómo se relaciona la polaridad con la organización de los microtúbulos dentro de la célula y con los movimientos intracelulares producidos por los motores dependientes de los microtúbulos?

2. Los microtúbulos, tanto in vitro como in vivo, están sometidos a inestabilidad dinámica y se cree que este tipo de ensamblaje es intrínseco al microtúbulo. ¿Cuál es el modelo actual para explicar la inestabilidad dinámica?

3. En las células, el ensamblaje de los microtúbulos depende de otras proteínas, así como de la concentración de tubulina y de la temperatura. ¿Qué tipos de proteínas influyen sobre el ensamblaje de los microtúbulos in vivo y cómo afecta cada tipo al ensamblaje?

4. Los microtúbulos dentro de una célula parecen ordenarse en disposiciones específicas. ¿Qué estructura celular es responsable de la determinación del ordenamiento de los microtúbulos dentro de una célula? ¿Cuántas de estas estructuras se encuentran en una célula típica? Describa cómo funcionan estas estructuras para dirigir el ensamblaje de los microtúbulos.

5. Muchos fármacos que inhiben de manera específica la mitosis se unen a la tubulina, a los microtúbulos o a ambos. ¿Cuáles son las enfermedades para cuyo tratamiento se usan estos fármacos? Desde el punto de vista funcional, estos fármacos pueden dividirse en dos grupos, de acuerdo con su efecto sobre el ensamblaje de los microtúbulos. ¿Cuáles son los dos mecanismos por los que esos fármacos alteran el ensamblaje de los microtúbulos?

6. La cinesina I fue el primer miembro de la familia de cinesinas motoras en identificarse y, por consiguiente, quizá sea el miembro de la familia mejor caracterizado. Describa cómo se aisló e identificó por primera vez la cinesina I. ¿Qué propiedad fundamental de los motores dependientes de microtúbulos se aprovechó en este procedimiento?

7. Ciertos componentes celulares parecen moverse en ambas direcciones sobre los microtúbulos. Describa cómo es posible esto, dado que la orientación de los microtúbulos es determinada por el MTOC. ¿Qué tipo de procesos reguladores se piensa que controlan la dirección en que se moverá una carga celular dada? ¿Es posible que ciertos componentes celulares se desplacen por los microtúbulos y filamentos de actina? Explique su respuesta.

8. Las propiedades de motilidad de las proteínas motoras cinesinas residen tanto en el dominio motor como en el dominio del cuello. Describa el papel de cada dominio en el movimiento de la cinesina, la dirección del movimiento, o ambos. ¿Cuál es la evidencia experimental que sustenta la importancia del cuello en la motilidad de la cinesina?

9. El desplazamiento celular depende de apéndices que contienen microtúbulos. ¿Cuál es la estructura de estos apéndices y cómo generan estas estructuras la fuerza necesaria para el desplazamiento?

10. El huso mitótico se describe a menudo como una máquina celular formada por microtúbulos. Los que constituyen el huso mitótico pueden clasificarse en tres tipos distintos. ¿Cuáles son los tres tipos de microtúbulos del huso y cuál es la función de cada uno de ellos?

11. La función del huso mitótico depende sobre todo de los motores de los microtúbulos. Para cada una de las siguientes proteínas motoras, prediga el efecto que tendría sobre la formación o la función del huso el agregado de un fármaco que inhiba de manera específica sólo ese motor: Kin-C, BimC, dineína citosólica y CENP-E.

12. El movimiento hacia los polos de los cinetocoros, y por lo tanto de las cromátidas, durante la anafase A requiere que los cinetocoros se mantengan unidos a los microtúbulos en acortamiento. ¿Cómo se sostiene un cinetocoro en los microtúbulos que se acortan?

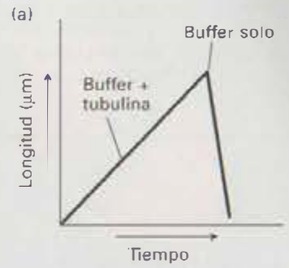
13. La anafase B implica la separación de los polos del huso. ¿Qué fuerzas se supone que manejan esta separación? ¿Qué mecanismos moleculares subyacentes se cree que proporcionan estas fuerzas?

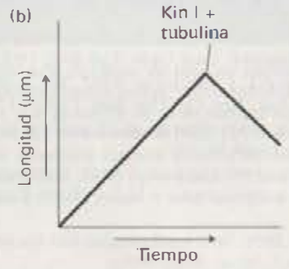
14. La citocinesis, el proceso de división del citoplasma, se produce después que las cromátidas hermanas separadas se acercaron a los polos opuestos del huso. ¿Cómo se determina el plano de citocinesis? ¿Cuáles son los papeles respectivos de los microtúbulos y los filamentos de actina en la citocinesis?

ANÁLISIS DE LOS DATOS

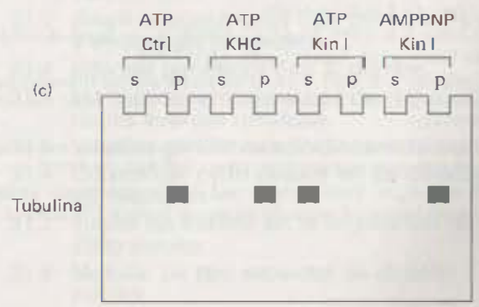
Por lo general se considera que las proteínas motoras desplazan componentes celulares a lo largo de los microtúbulos. Sin embargo, algunas familias de cinesinas motoras pueden tener otras funciones, como se describe a continuación.

a. En un grupo de experimentos se observaron microtúbulos en una cámara microscópica en la que la solución podía intercambiarse con rapidez. La parte (a) de la figura que acompaña este texto muestra el efecto sobre la longitud del microtúbulo en función del tiempo cuando la tubulina y el buffer de la cámara se reemplazaron primero por una solución idéntica de tubulina y buffer, y luego por buffer solo. La parte (b) muestra los resultados cuando la solución de tubulina y buffer de la cámara se reemplazó con una solución que contenía tubulina y la proteína motora Kin I, una cinesina tipo M. ¿Qué conclusiones puede extraer usted de estos experimentos?





b. En otro ensayo, microtúbulos estabilizados con taxol fueron incubados solos (Ctrl), con cadena pesada de cinesina (KHC) y ATP, con Kin I y ATP, o con Kin I y AMPPNP, y luego se centrifugaron para sedimentar la tubulina polimerizada. Luego se fraccionó el sobrenadante (s) y el sedimento (p) mediante SDS-PAGE y el gel se tiñó para revelar la posición de la tubulina, como se muestra en la parte (c). ¿Qué conclusiones puede extraer usted de estos experimentos? ¿Cuál es la importancia del nucleótido presente para la actividad de Kin I? ¿Usted esperaría que hubiera ATP presente en los experimentos representados en la parte (b) de la figura? ¿Por qué?



c. También se obtuvieron resultados similares a los mostrados en la parte (c) cuando se usó GMPCPP, un análogo del GTP no hidrolizable, para ensamblar microtúbulos estabilizados. ¿Qué sugiere este resultado acerca de la acción de Kin I?

d. Hay más pruebas de que Kin I puede producir resultados similares incluso en proporciones menores con respecto a la tubulina. En vista de esto y lo que usted sabe sobre el ensamblaje de los microtúbulos, ¿dónde podría usted esperar encontrar el motor sobre los microtúbulos?

BIBLIOGRAFÍA

Kinesin home page
http://www.proweb.org/kinesin/

Kreis, T., and R. Vale. 1999. Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins, 2d ed. Oxford University Press.

Organización y dinámica de los microtúbulos

Bornens, M. 2002. Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. Curr. Opin. Cell Biol. 14:25-34.

Desai, A., and T. J. Mitchison. 1997. Microtubule polymerization dynamics. Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 13:83-117.

Dutcher, S. K. 2001. The tubulin fraternity: alpha to eta. Curr. Opin. Cell Biol. 13:49-54.

Mathur, J., and M. Hulskamp. 2002. Microtubules and microfilaments in cell morphogenesis in higher plants. Curr. Biol. 12:R669-R676.

Nogales, E. 2001. Structural insights into microtubule function. Ann. Rev. Biomol. Struc. 30:397-420.

Vaughn, K. C., and J. D. I. Harper. 1998. Microtubule-organizing centers and nucleating sites in land plants. Int'l. Rev. Cytol. 181:75-149.

Zimmerman, W., C. A. Sparks, and S. J. Doxsey. 1999. Amorphous no longer: the centrosome comes into focus. Curr. Opin. Cell Biol. 11:122-128.

Movimientos impulsados por cinesina y dineína

Allan, V. J., H. M. Thompson, and M. A. McNiven. 2002. Motoring around the Golgi. Nature Cell Biol. 4:E236-E242.

Dell, R. R. 2003. Dynactin polices two-way organelle traffic. J. Cell Biol. 160:291-293.

Dietz, S., W. R. Schief, and J. Howard. 2002. Molecular motors: single-molecule recordings made easy. Curr. Biol. 12:R203-R205.

Dujardin, D. L., and R. B. Vallee. 2002. Dynein at the cortex. Curr. Opin. Cell Biol. 14:44-49.

Dutcher, S. K. 1995. Flagellar assembly in two hundred and fifty easy-to-follow steps. Trends Genet. 11:398-404.

Goldstein, L. S. 2001. Kinesin molecular motors: transport pathways, receptors, and human disease. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 98:6999-7003.

Higuchi, H., and S. A. Endow. 2002. Directionality and processivity of molecular motors. Curr. Opin. Cell Biol. 14:50-57.

Hirokawa, N. 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. Science 279:519-526.

Holleran, E. A., S. Karki, and E. L. F. Holzbaur. 1998. The role of the dynactin complex in intracellular motility. Int'l. Rev Cytol. 182:69-109.

Karcher, R. L., S. W. Deacon, and V. I. Gelfand. 2002. Motor-cargo interactions: the key to transport specificity. Trends Cell Biol. 12:21-27.

Kull, F. J., and S. A. Endow. 2002. Kinesin: switch I and II and the motor mechanism. J. Cell Sci. 115:15-23.

Mandelkow, E., and K. A. Johnson. 1998. The structural and mechanochemical cycle of kinesin. Trends Biochem. Sci. 23:429-433.

Moore, J. D., and S. A. Endow. 1996. Kinesin proteins: a phylum of motors for microtubule-based motility. Bioessays 18:207-218.

Sablin, E. P., and R. J. Fletterick. 2001. Nucleoride switches in molecular motors: structural analysis of kinesins and myosins. Curr. Opin. Struc. Biol. 11:716-724.

Shaw, J. V., and D. W. Cleveland. 2002. Slow axonal transport: fast motors in the slow lane. Curr. Opin. Cell Biol. 14:58-62.

Thaler, C. D., and L. T. Haimo. 1996. Microtubules and microtubule motors: mechanisms of regulation. Int'l. Rev. Cytol. 164:269-327.

Vale, R. D., and R. J. Fletterick. 1997. The design plan of kinesin motors. Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 8:4-9.

Dinámica de los microtúbulos y proteínas motoras en la mitosis

Compton, D. A. 1998. Focusing on spindle poles. J. Cell Sci. 111:1477-1481.

Cyr, R. J. 2001. Plant cells: mitosis, cytokinesis, and cell plate formation. Encyclopedia of Life Sciences.

Doxsey, S. 2001. Re-evaluating centrosome function. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2:688-698.

Inoue, S. 1996. Mitotic organization and force generation by assembly/disassembly of microtubules. Cell Struc. Funct. 21:375-379.

Kapoor, T. M., and D. A. Compton. 2002. Searching for the middle ground: mechanisms of chromosome alignment during mitosis. J. Cell Biol. 157:551-556.

Karsenti, E., and I. Vernos. 2001. The mitotic spindle: a self-made machine. Science 294:543-547.

Kitagawa, K., and P. Hieter. 2001. Evolutionary conservation between budding yeast and human kinetochores. Nature Rev. Mol. Cell. Biol. 2:678-687.

Mitchison, T. J., and E. D. Salmon. 2001. Mitosis: a history of division. Nature Cell Biol. 3:E17-E21.

Nicklas, R. B. 1997. How cells get the right chromosomes. Science 275:632-637.

Nigg, E. A.2001. Mitosis. Nature Encyclopedia of Life Sciences.

Palazzo, R. E., and T. N. Davis. 2001. Centrosomes and spindle pole bodies. Methods in Cell Biology, vol. 67. Academic Press.

Rieder, C. L., and E. D. Salmon. 1998. The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. Trends Cell Biol. 8:310-318.

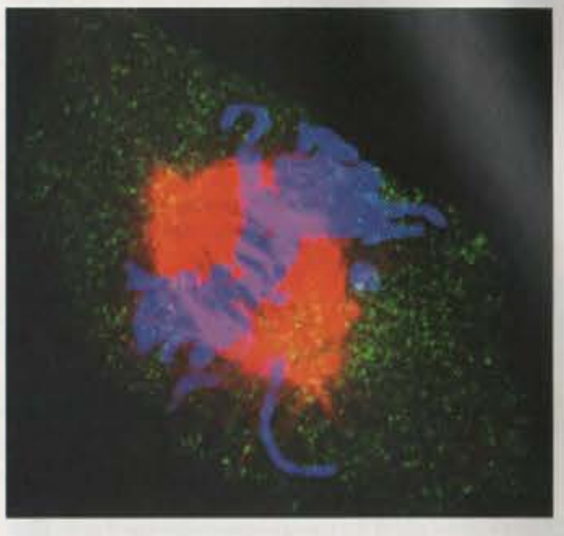
Schimoda, S. L., and F. Solomon. 2002. Integrating functions at the kinetochore. Cell 109:9-12.

Wittmann, T., A. Hyman, and A. Desai. 2001. The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. Nature Cell Biol, 3:E28-E34.

Zhou, J., J. Yao, and H. C. Joshi. 2002. Attachment and tension in the spindle assembly checkpoint. J. Cell Sci. 115:3547-3555.

21

REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR EUCARIONTE



Esta célula cultivada de riñón de rata en metafase muestra cromosomas condensados (azul), microtúbulos del aparato del huso (rojo) y la proteína de la envoltura nuclear interna POM121 (verde). La tinción de la POM121 muestra que las proteínas de la envotura nuclear interna se retiran hacia el RE durante la mitosis. [Brian Burke y Jan Ellenberger, 2002. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3:487.]

El ciclo celular está constituido por una serie ordenada de acontecimientos macromoleculares que llevan a la división celular y a la producción de dos células hijas, cada una de las cuales contiene cromosomas idénticos a los de la madre. La duplicación de los cromosomas paternos tiene lugar durante la fase S del ciclo, y durante la mitosis los cromosomas hijos resultantes se distribuyen en cada una de las células hijas (véase fig. 9-3). El control temporal preciso de los acontecimientos del ciclo celular asegura que la replicación de cromosomas y su segregación a las células hijas se produzca en el orden apropiado y con una fidelidad extraordinariamente alta. La regulación del ciclo celular es fundamental para el desarrollo normal de los organismos multicelulares y la pérdida de control termina por conducir al cáncer, una enfermedad demasiado familiar que mata a una de cada seis personas en el mundo desarrollado (cap. 23).

A fines de la década de 1980, se hizo evidente que los procesos moleculares que regulan los dos acontecimientos importantes del ciclo celular, la replicación y la segregación de los cromosomas, son esencialmente similares en todas las células eucariontes. Debido a esta similitud la investigación de diversos organismos, cada uno de ellos con sus propias ventajas experimentales particulares, contribuyó a tener un mayor conocimiento de cómo se coordinan y controlan estos acontecimientos. Para estudiar los diversos aspectos del ciclo celular en los eucariontes se emplearon técnicas bioquímicas y genéticas, así como la tecnología del DNA recombinante. Estos estudios revelaron que el control primario de la división celular es la regulación del momento de la replicación del DNA nuclear y la mitosis. Los controladores principales de estos acontecimientos son un número pequeño de *proteincinasas heterodiméricas* que contienen una subunidad reguladora (ciclina) y una catalizadora (cinasa dependiente de ciclina). Estas cinasas regulan la actividad de numerosas proteínas involucradas en la replicación del DNA y la mitosis por fosforilación de sitios reguladores específicos, activando algunos e inhibiendo otros para coordinar sus actividades. Este capítulo se centra en la manera en que se regula el ciclo celular y los sistemas experimentales que llevaron a nuestro conocimiento actual sobre estos mecanismos reguladores cruciales.

CONTENIDO

21.1 Panorama general del ciclo celular y su control
21.2 Estudios bioquímicos con ovocitos, huevos y embriones tempranos
21.3 Estudios genéticos con *S. pombe*
21.4 Mecanismos moleculares de regulación de los eventos mitóticos
21.5 Estudios genéticos con *S. cerevisiae*
21.6 Control del ciclo celular en las células de mamífero
21.7 Puntos de control en la regulación del ciclo celular
21.8 Meiosis: un tipo especial de división celular

21.1 Panorama general del ciclo celular y su control

Empezaremos esta descripción con el repaso de los estadios del ciclo celular eucarionte, mediante un resumen del modelo actual de cómo se regula el ciclo y una descripción breve de los sistemas experimentales clave que proporcionaron información reveladora acerca de esa regulación.

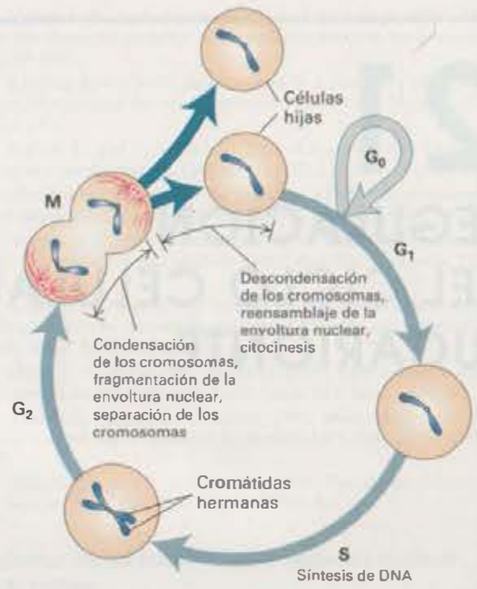
El ciclo celular es una serie ordenada de acontecimientos que conducen a la replicación celular

Como se ilustra en la figura 21-1, el ciclo celular se divide en cuatro fases principales. En las células somáticas en ciclo (en replicación), las células sintetizan RNA y proteínas durante la fase G_1, para prepararse para la síntesis de DNA y la replicación de los cromosomas durante la fase S (de síntesis). Después de avanzar a través de la fase G_2, las células empiezan el proceso complicado de la mitosis, también llamada fase M (mitótica), que se divide en varios estadios (véase fig. 20-29).

Al describir la mitosis, el término cromosoma suele usarse para designar las estructuras *replicadas* que se condensan y se hacen visibles con el microscopio óptico durante el período de profase de la mitosis. Por lo tanto, cada cromosoma está compuesto por las dos moléculas hijas de DNA que provienen de la replicación del DNA, más histonas y otras proteínas cromosómicas asociadas con ellas (véase fig. 10-27). Las moléculas hijas de DNA idénticas y las proteínas cromosómicas asociadas que forman un cromosoma se denominan cromátidas hermanas. Éstas se unen entre sí por uniones cruzadas de proteínas en toda su longitud. En los vertebrados estas uniones se condensan en una sola región de asociación llamada centrómero, a medida que avanza la condensación de los cromosomas.

Durante la interfase, la parte del ciclo celular que transcurre entre el fin de una fase M y el principio de la siguiente, la membrana nuclear externa es continua con el retículo endoplasmático (véase fig. 5-19). Cuando comienza la mitosis en la profase, la envoltura nuclear se retrae hacia el retículo endoplasmático en la mayoría de las células de los eucariontes superiores y las membranas de Golgi se fragmentan en vesículas. Como se describió en el capítulo 20, los microtúbulos celulares se ensamblan y desarman para formar el aparato mitótico, que es un haz de microtúbulos con forma de pelota de rugby (el huso) con un grupo de microtúbulos en forma de estrella que se irradian de cada extremo, o polo, del huso. Durante el período de metafase de la mitosis en cada centrómero se forma un complejo multiproteico, el cinetocoro. Los cinetocoros de las cromátidas hermanas se asocian a continuación con microtúbulos que vienen de los polos opuestos del huso (véase fig. 20-31). Durante el período de anafase de la mitosis, las cromátidas hermanas se separan. Al inicio las traccionan proteínas motoras a lo largo de los microtúbulos del huso hacia los polos opuestos y luego se separan aún más a medida que el huso mitótico se elonga (véase fig. 20-40).

Una vez que la separación de los cromosomas es completa, el huso mitótico se desarma y los cromosomas se descondensan durante la telofase. La envoltura nuclear se forma de nuevo alrededor de los cromosomas separados a medida que se descondensan. La división física del citoplasma, llamada **citocinesis**, produce dos células hijas cuando el complejo de Golgi se forma otra vez en cada célula hija. Después de la mitosis, las células en ciclo entran en la fase G_1, comenzando otra vuelta del ciclo. En las levaduras y otros hongos, la envoltura nuclear no se fragmenta durante la mitosis. En estos microorganismos, el huso mitótico se forma dentro de la envoltura nuclear, que luego se fragmenta para formar dos núcleos en el momento de la citocinesis.



▲ Fig. 21-1. Resumen de los eventos principales del ciclo celular de los eucariontes y destino de un solo cromosoma paterno. En las células en proliferación, G_1 es el período entre el "nacimiento" de una célula después de la mitosis y la iniciación de la síntesis de DNA, que marca el principio de la fase S. Al final de la fase S, un cromosoma replicado presenta dos moléculas hijas de DNA y las proteínas cromosómicas asociadas. Cada una de las moléculas hijas de DNA y sus proteínas cromosómicas asociadas (no mostradas) se denomina cromátida hermana. El fin de G_2 está marcado por el inicio de la mitosis, durante la cual se forma el huso mitótico (líneas rojas) y tracciona las cromátidas hermanas separándolas, seguido por la división del citoplasma (citocinesis) para producir dos células hijas. Las fases G_1, S y G_2 se denominan en conjunto interfase, el período entre una mitosis y la siguiente. La mayor parte de las células que no proliferan en los vertebrados abandonan el ciclo celular en G_1 y entran en el estado G_0.

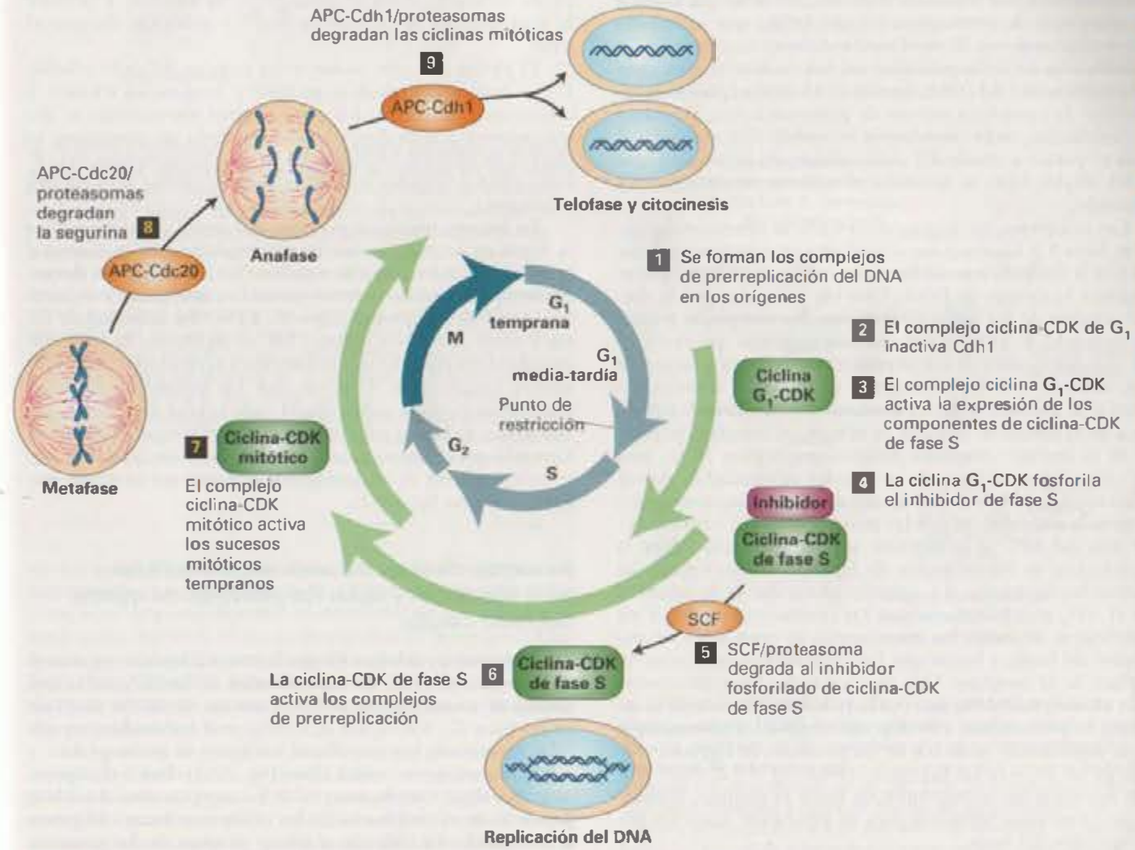
En los vertebrados y las levaduras diploides, las células en G_1 tienen un número diploide de cromosomas ($2n$), uno heredado de cada padre. En las levaduras haploides, las células en G_1 tienen un representante de cada cromosoma ($1n$), es decir, un número haploide. Las células humanas en replicación rápida cumplen el ciclo celular completo en alrededor de 24 horas: la mitosis insume unos 30 minutos; G_1, 9 horas; la fase S, 10 horas y G_2, 4,5 horas. Por el contrario, en las células de levadura en crecimiento rápido el ciclo completo insume sólo cerca de 90 minutos.

En los organismos multicelulares la mayoría de las células diferenciadas "salen" del ciclo celular y sobreviven durante días, semanas o, en algunos casos (p. ej., neuronas y células del cristalino del ojo) incluso durante toda la vida del organismo sin dividirse de nuevo. Estas células *posmitóticas* por lo general salen del ciclo celular en G_1 e ingresan en una fase llamada G_0 (véase fig. 21-1). Algunas células en G_0 pueden volver al ciclo celular y reanudar su replicación; este reingreso es regulado, lo que proporciona un control de la proliferación celular.

La fosforilación y la degradación regulada de las proteínas controla el pasaje a través del ciclo celular

Las concentraciones de las ciclinas, las subunidades reguladoras de las proteincinasas heterodiméricas que controlan los acontecimientos del ciclo celular, aumentan y disminuyen a medida que las células avanzan por éste. Las subunidades catalizadoras de estas cinasas, llamadas **cinasas dependientes de ciclina (CDK)**, no poseen actividad de cinasa a menos que se asocien con una ciclina. Cada CDK puede asociarse con diferentes ciclinas y la ciclina asociada determina qué proteínas serán fosforiladas por un complejo ciclina-CDK determinado.

En la figura 21-2 se presenta un esquema del papel de las tres clases principales de complejos ciclina-CDK que controlan el pasaje por el ciclo celular: los complejos ciclina G_1-CDK, de fase S y mitóticos. Cuando las células se estimulan para replicarse, los complejos ciclina- G_1-CDK se expresan en primer



▲ Fig. 21-2. Panorama general del modelo actual de regulación del ciclo celular en los eucariontes. El pasaje a través del ciclo es controlado por complejos cinasa-ciclina dependiente de G_1, fase S y mitóticos (verde). Éstos están compuestos por una subunidad de ciclina reguladora y una de cinasa dependiente de ciclina catalizadora (CDK). Dos complejos de ligasa de ubicuitina (naranja), SCF y APC, generan poliubicuitinación de sustratos específicos, como los inhibidores de fase S (paso 5), la segurina (paso 8) y las ciclinas mitóticas (paso 9), marcando estos sustratos para su degradación por los proteasomas. La proteólisis del inhibidor de la fase S activa los complejos ciclina-CDK de fase S, lo que conduce a la replicación de los cromosomas. La proteólisis de la segurina tiene como resultado la degradación de los complejos proteicos que conectan las cromátidas hermanas durante la metafase, lo que ongina así la anafase, el período mitótico en el que las cromátidas hermanas se separan y se desplazan hacia los polos opuestos del huso. La reducción de la actividad de los complejos ciclina-CDK mitóticos causada por la proteólisis de las ciclinas mitóticas permite que tengan lugar los acontecimientos mitóticos tardíos y la citocinesis. Estas degradaciones proteolíticas impulsan el ciclo en una sola dirección, debido a la irreversibilidad de la degradación de las proteínas. Para mayor explicación véase el texto.

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación general: Control del ciclo celular

lugar. Éstos preparan la célula para la fase S, activando factores de transcripción que promueven la transcripción de genes que codifican las enzimas requeridas para la síntesis de DNA y de genes que codifican ciclinas y CDK de fase S. Al principio, la actividad de los complejos ciclina-CDK de fase S es controlada por inhibidores. Al final de G_1, los complejos ciclina G_1-CDK inducen la degradación de los inhibidores de fase S por medio de fosforilación y la consecuente estimulación de su poliubicuitinación por el complejo multiproteico SCF ubicuitina ligasa (paso 5). La degradación posterior por los proteasomas del inhibidor de la fase S poliubicuitinado libera los complejos ciclina-CDK de fase S activos.

Una vez activados, los complejos ciclina-CDK de fase S fosforilan los sitios reguladores en las proteínas que forman los complejos de prerreplicación del DNA, que se ensamblan en los *orígenes de replicación* durante G_1 (cap. 4). La fosforilación de estas proteínas no sólo activa el comienzo de la replicación del DNA, sino que también impide el reensamblaje de complejos nuevos de prerreplicación. Debido a esta inhibición, cada cromosoma se replica sólo una vez durante el pasaje a través del ciclo celular; así se asegura que en las células hijas se mantiene el número de cromosomas adecuado.

Los complejos mitóticos ciclina-CDK se sintetizan durante las fases S y G_2, pero sus actividades se mantienen inhibidas por la fosforilación de los sitios inhibitorios hasta que se completa la síntesis de DNA. Una vez activados por la desfosforilación de los sitios inhibitorios, los complejos mitóticos ciclina-CDK fosforilan numerosas proteínas que promueven la condensación de los cromosomas, la desintegración de la envoltura nuclear, el ensamblaje del huso del aparato mitótico y la alineación de los cromosomas condensados en la placa de la metafase. Durante la mitosis, el complejo promotor de la anafase (*anaphase promoting complex*, APC), una ubicuitina ligasa compuesta por varias subunidades, genera poliubicuitinación de proteínas reguladoras clave, marcándolas para la degradación por los proteasomas. Un sustrato importante del APC es la securina, una proteína que inhibe la degradación de las proteínas de ligadura cruzada entre las cromátidas hermanas. La poliubicuitinación de la securina por el APC se inhibe hasta que los cinetocoros unidos a los centrómeros de todos los cromosomas se unen a los microtúbulos del huso, y hacen que los cromosomas se alineen en la placa de la metafase. Una vez que todos los cromosomas están alineados, el APC provoca la poliubicuitinación de la securina, lo que conduce a su degradación por los proteasomas y a la degradación posterior de las proteínas de ligadura cruzada de las cromátidas hermanas (véase fig. 21-2, paso 8). Esta secuencia de acontecimientos inicia la anafase, liberando las cromátidas hermanas para su separación hacia los polos opuestos del huso.

Al final de la anafase, el APC también dirige la poliubicuitinación y la degradación posterior por los proteasomas de las ciclinas mitóticas. La poliubicuitinación de las ciclinas mitóticas por el APC se inhibe hasta que los cromosomas en separación alcanzan la ubicación apropiada en la célula en división (véase fig. 21-2, paso 9). La degradación de las ciclinas mitóticas conduce al cese de la actividad proteincinasa de las CDK mitóticas. La disminución resultante de la actividad de las CDK mitóticas permite que proteinfosfatasas consitutivamente activas eliminen los fosfatos agregados a las proteínas específicas por los complejos ciclina-CDK mitóticos. Como resultado, los cromosomas ya separados se descondensan, la envoltura nuclear se forma de nuevo alrededor de los núcleos de las células hijas y el aparato de Golgi vuelve a ensamblarse durante la telofase; por último, el citoplasma se divide durante la citocinesis, y se forman las dos células hijas.

Durante la primera parte de G_1 del ciclo celular siguiente, las fosfatasas desfosforilan las proteínas que forman complejos de prerreplicación. Estas proteínas habían sido fosforiladas por los complejos ciclina-CDK de fase S durante la fase S anterior y su fosforilación se mantuvo durante la mitosis por los complejos ciclina-CDK mitóticos. Como resultado de su desfosforilación en G_1, los complejos nuevos de prerreplicación son capaces de reensamblarse en los orígenes de replicación, y se preparan para la próxima fase S (véase fig. 21-2, paso 1). La fosforilación de Cdh1 por los complejos ciclina G_1-CDK al final de G_1 lo inactiva, y permite la acumulación de ciclinas de fase S y mitóticas durante el ciclo.

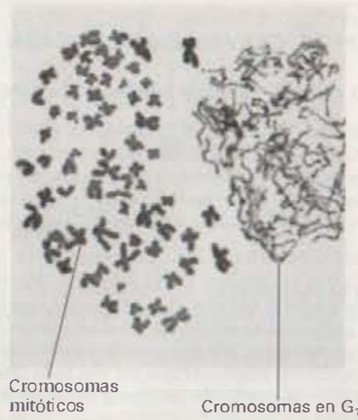
El pasaje por tres transiciones críticas del ciclo celular, G_1 → fase S, metafase → anafase y anafase → telofase y citocinesis, es irreversible porque estas transiciones se desencadenan por la degradación regulada de proteínas, lo cual es un proceso irreversible. Como consecuencia, las células están obligadas a realizar el ciclo celular sólo en una dirección.

En los organismos superiores, el control del ciclo celular se logra en primer término por la regulación de la síntesis y la actividad de los complejos ciclina G_1-CDK. Factores de crecimiento extracelulares funcionan como mitógenos e inducen la síntesis de complejos ciclina G_1-CDK. La actividad de éstos y otros complejos ciclina-CDK se regula por la fosforilación de sitios específicos, inhibitorios y activadores, de la subunidad catalizadora. Una vez que los mitógenos actuaron durante un período suficiente, el ciclo celular continúa hacia la mitosis, incluso si estos mitógenos se eliminan. El punto de G_1 tardío en el que el pasaje a través del ciclo celular se hace independiente de los mitógenos se denomina punto de restricción (véase fig. 21-2).

Se usaron diversos sistemas experimentales para identificar y aislar las proteínas de control del ciclo celular

La primera evidencia de que factores difusibles regulan el ciclo celular provino de experimentos de fusión celular con células de mamífero cultivadas. Cuando células en interfase en las fases G_1, S o G_2 del ciclo celular se fusionaban con células en mitosis, sus envolturas nucleares se desintegraban y sus cromosomas se condensaban (fig. 21-3). Este hallazgo indica que algún componente o varios componentes difusibles presentes en el citoplasma de las células mitóticas obligaban a los núcleos en interfase a iniciar muchos de los procesos asociados con la mitosis temprana. En el presente se sabe que estos factores son los complejos ciclina-CDK mitóticos.

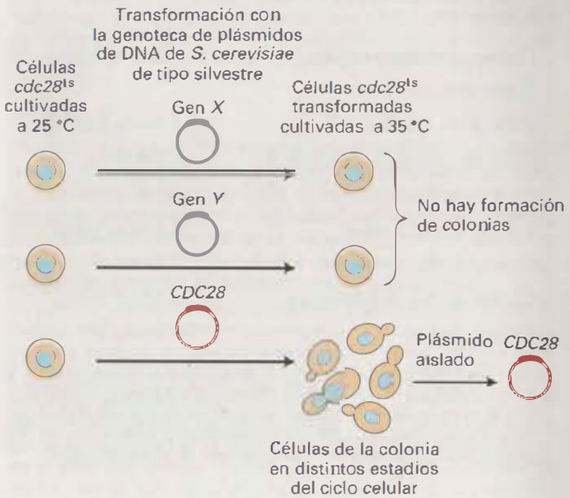
De forma similar, cuando se fusionaban células en G_1 con células en fase S y las células fusionadas se exponían a timidina con marca radiactiva, la marca se incorporaba en el DNA del núcleo en G_1, así como en el núcleo en fase S, lo que indica que la síntesis de DNA empezaba en el núcleo en G_1 poco después de la fusión. Sin embargo, cuando se fusionaron células en G_2 con otras en fase S, no hubo incorporación de timidina marcada en los núcleos en G_2. Por lo tanto, los factores difusibles de una célula en fase S pueden entrar en el núcleo de una célula en G_1 y estimular la síntesis de DNA, pero estos factores no pueden inducir la síntesis de DNA en un núcleo en G_2. En la actualidad se sabe que estos factores son complejos ciclina-CDK de fase S que pueden activar los complejos de prerreplicación ensamblados en los orígenes de replicación del DNA en los núcleos en fase G_1 temprana. Aunque en estos experimentos de fusión celular se demostró que los factores difusibles controlan la entrada en las fases S y M del ciclo celular, se necesitaron ensayos genéticos y bioquímicos para identificarlos.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 21-3 Un factor difusible presente en las células mitóticas puede inducir la mitosis en una célula en interfase. En células en interfase no fusionadas, la envoltura nuclear está intacta y los cromosomas no se condensan, de forma que no pueden distinguirse los cromosomas individuales (véanse figs. 1-2b y 5-25). En las células mitóticas, la envoltura nuclear está ausente y los cromosomas individuales replicados están muy condensados. Esta microfotografía muestra una célula híbrida, resultado de la fusión de una célula mitótica (lado izquierdo) con una en interfase en G_1 (lado derecho). Un factor proveniente del citoplasma de la célula mitótica hizo que la envoltura nuclear de la célula en G_1 se retraiga hacia el retículo endoplasmático, por lo que no es visible. El factor también provoca la condensación parcial de los cromosomas de la célula en G_1. Los cromosomas mitóticos pueden distinguirse porque las dos cromátidas hermanas están unidas por el centrómero. (De R.T. Johnson y P. N. Rao, 1970, Biol. Rev. 46:97)

La levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae* y la lejanamente relacionada levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* fueron en especial útiles para el aislamiento de mutantes bloqueadas en pasos específicos del ciclo celular o que muestran alteraciones en la regulación del ciclo. En estas dos levaduras, las mutantes sensibles a la temperatura, con defectos en proteínas específicas necesarias para avanzar a través del ciclo celular, se reconocen con facilidad en el microscopio y por consiguiente se pueden aislar sin dificultad (véase fig. 9-6). Estas células se denominan mutantes *cdc* (ciclo de división celular). Los alelos de tipo silvestre de los alelos mutantes recesivos *cdc* sensibles a la temperatura pueden aislarse con facilidad, por transformación de las células haploides mutantes con una genoteca de plásmidos preparada a partir de células de tipo silvestre y luego sembrando placas con las células transformadas a la temperatura no permisiva (fig. 21-4). Cuando se siembran en placas, las células haploides mutantes no pueden formar colonias a la temperatura no permisiva. Sin embargo, la complementación de la mutación recesiva con el alelo de tipo silvestre contenido en uno de los clones de plásmidos de la genoteca permite que una célula mutante transformada desarrolle una colonia; los plásmidos portadores del alelo de tipo silvestre pueden recuperarse a partir de esas células. Debido a que muchas de las proteínas que regulan el ciclo celular están muy conservadas, el cDNA humano clonado en vectores de expresión de levaduras a menudo puede complementar los mutantes de ciclo celular de levaduras, lo que permite el aislamiento rápido de genes humanos que codifican proteínas de control del ciclo celular.

Los estudios bioquímicos requieren la preparación de extractos celulares. Para realizar estudios bioquímicos del ciclo celular son potencialmente conveniente los huevos y embriones tempranos de anfibios e invertebrados marinos. En estos organismos se producen múltiples ciclos celulares sincronizados después de la fecundación del huevo. Mediante



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 21-4 Los genes del ciclo de división celular (*CDC*) de tipo silvestre pueden aislarse a partir de una genoteca de *S. cerevisiae* por la complementación funcional de mutantes *cdc*. Células mutantes con una mutación sensible a la temperatura en un gen *CDC* se transforman con una genoteca preparada a partir de células de tipo silvestre y se cultivan en placas sobre agar nutritivo a temperatura no permisiva (35 °C). Cada célula transformada capta un solo plásmido que contiene un fragmento genómico de DNA. La mayor parte de estos fragmentos implica genes (p. ej., X e Y) que no codifican la proteína defectuosa Cdc; las células transformadas que captan esos fragmentos no forman colonias a la temperatura no permisiva. Las muy escasas células que captan un plásmido que contiene la versión de tipo silvestre del gen mutante (en este caso *CDC28*) se complementan, lo que permite que la célula se reproduzca y forme una colonia a la temperatura no permisiva. El plásmido de DNA aislado de esta colonia es portador del gen *CDC* de tipo silvestre que corresponde al gen defectuoso en las células mutantes. El mismo procedimiento se usa para aislar los genes *CDC* de tipo silvestre en *S. pombe*. Véanse las figuras 9-19 y 9-20 para una ilustración más detallada de la construcción y la detección de genes en una genoteca de levaduras.

CUADRO 21-1 Ciclinas y cinasas dependientes de ciclina (CDK) seleccionadas*

Organismo/Proteína	Nombre
S. POMBE	
CDK (solo una)	Cdc2
Ciclina mitótica (solo una)	Cdc13
S. CEREVISIAE	
CDK (solo una)	Cdc28
Ciclina de G_1 media	Cln3
Ciclinas de G_1 tardía	Cln1, Cln2
Ciclinas de fase S temprana	Clb5, Clb6
Ciclinas de fase S tardía y mitóticas tempranas	Clb3, Clb4
Ciclinas mitóticas tardías	Clb1, Clb2
VERTEBRADOS	
CDK de G_1 media	CDK4, CDK6
CDK de G_1 tardía y de fase S	CDK2
CDK mitótica	CDK1
Ciclinas de G_1 media	Ciclinas tipo D
Ciclina de G_1 tardía y de fase S	Ciclina E
Ciclina de fase S y mitótica	Ciclina A
Ciclina mitótica	Ciclina B

* Las ciclinas y CDK descritas en este capítulo se enumeran y clasifican de acuerdo con el período del ciclo celular en el que actúan. Un heterodímero compuesto por una ciclina mitótica y una CDK, por lo general se designa como un factor promotor de la mitosis (MPF).

el aislamiento de grandes cantidades de huevos de las hembras y la fecundación de manera simultánea por el agregado de espermatozoides (o a través de formas de tratamiento que imitan la fecundación), los investigadores pueden obtener extractos de células que se encuentran en puntos específicos del ciclo celular para el análisis de proteínas y actividades enzimáticas.

En las secciones siguientes se describen los experimentos críticos que condujeron al modelo actual de regulación del ciclo celular eucarionte, resumidos en la figura 21-2, y se presentan detalles adicionales de los diversos acontecimientos reguladores. Como se verá, los resultados obtenidos con los diferentes sistemas y enfoques experimentales proporcionaron un panorama de cada uno de los puntos de transición importantes del ciclo celular. Por razones históricas, los nombres de diversas ciclinas y cinasas dependientes de ciclina de las levaduras y los vertebrados son diferentes. En el cuadro 21-1 se enumeran los nombres de las que se describen en este capítulo y se indica en qué momento del ciclo celular son activas.

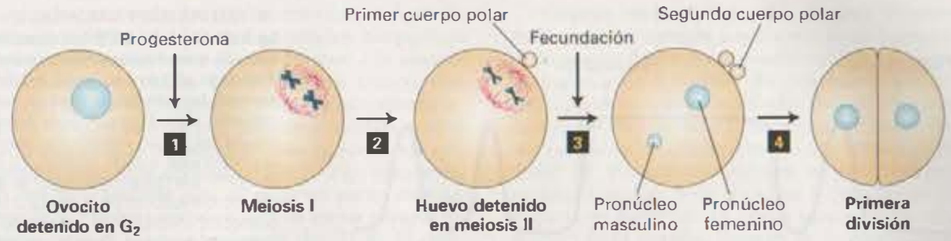
CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 21.1

Panorama general del ciclo celular y su control

- El ciclo celular eucarionte se divide en cuatro fases: M (mitosis), G_1 (el período entre la mitosis y el comienzo de la replicación del DNA nuclear), S (el período de replicación del DNA nuclear) y G_2 (el período entre la finalización de la replicación del DNA nuclear y la mitosis) (véase fig. 21-1).
- Los complejos ciclina-CDK, compuestos por una subunidad de ciclina reguladora y una de cinasa dependiente de ciclina catalizadora, regulan el progreso de una célula por medio del ciclo celular (véase fig. 21-2). Grandes ligasas de ubicuitina compuestas por varias subunidades también poliubicuitinan en los reguladores clave del ciclo celular, y los marcan para su degradación por los proteasomas.
- Los complejos difusibles ciclina-CDK mitóticos producen la condensación de los cromosomas y la fragmentación de la envoltura nuclear en células en G_1 y G_2 cuando se fusionan con células mitóticas. De forma similar, los complejos ciclina-CDK de fase S estimulan la replicación del DNA en los núcleos de las células en G_1 cuando se fusionan con células en fase S.
- El aislamiento de mutantes del ciclo de división celular (*cdc*) de levaduras condujo a la identificación de genes que regulan el ciclo celular (véase fig. 21-4).
- Los huevos de anfibios e invertebrados y los embriones tempranos provenientes de huevos fecundados de forma sincronizada proporcionan fuentes de extractos para estudios bioquímicos de los eventos del ciclo celular.

21.2 Estudios bioquímicos con ovocitos, huevos y embriones tempranos

Los estudios de maduración de ovocitos de la rana *Xenopus laevis* permitieron un gran adelanto en la identificación de factores que inducen la mitosis. Para comprender estos experimentos, primero deben describirse los acontecimientos de maduración del ovocito que puede reproducirse in vitro. Cuando los ovocitos se desarrollan en el ovario de la rana, replican su DNA y se detienen en G_2 durante 8 meses, tiempo durante el cual aumentan de tamaño hasta alcanzar un diámetro de 1 mm, y acumulan todos los materiales que se requieren para las numerosas divisiones celulares necesarias para generar un renacuajo capaz de nadar y alimentarse. Cuando son estimuladas por un macho, las células ováricas de una hembra adulta secretan la hormona esteroide progesterona, que induce a los ovocitos detenidos en G_2 a entrar en meiosis I y progresar hasta la segunda metafase meiótica (fig. 21-5). En este estadio, las células se denominan *huevos*. Cuando los espermatozoides lo fecundan, el núcleo del huevo se libera de su detención en metafase II y completa la meiosis. El pronúcleo haploide resultante se fusiona luego con el del espermatozoide, lo que produce el núcleo diploide del cigoto. A continuación tiene lugar la replicación del DNA y comienza la primera división mitótica de la embriogénesis temprana. Las células embrionarias resultantes atraviesan luego 11 ciclos celulares más



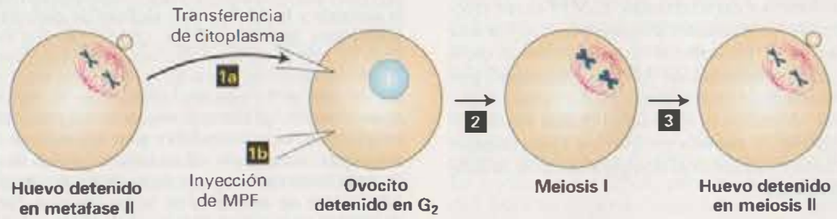
▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 21-5 La progesterona estimula la maduración meiótica de ovocitos de *Xenopus* in vitro.** Paso 1: El tratamiento con progesterona de ovocitos de *Xenopus* detenidos en G_2 y extirpados mediante cirugía del ovario de una hembra adulta hace que los ovocitos ingresen en la meiosis I. Se muestran de manera esquemática dos pares de cromosomas homólogos unidos (azul) conectados a los microtúbulos del huso mitótico (rojo) para representar las células en la metafase de la meiosis I. Paso 2: La separación de los cromosomas homólogos y una división celular muy asimétrica envía la mitad de los cromosomas a una célula pequeña llamada primer cuerpo polar. El ovocito comienza de inmediato la meiosis II y se detiene en metafase para producir un huevo. Se muestran en forma esquemática dos cromosomas conectados a los microtúbulos del huso para representar las células del huevo detenidas en la metafase de la meiosis II. Paso 3: Fecundación por el espermatozoide libera a los huevos de su detención en metafase, y les permite avanzar a través de la anafase de la meiosis II y sufrir una segunda división celular muy asimétrica que separa una cromátida de cada cromosoma y lo envía a un segundo cuerpo polar. Paso 4: El pronúcleo femenino haploide resultante se fusiona con el pronúcleo haploide del espermatozoide para producir un cigoto diploide que sufre la replicación del DNA y la primera de 12 divisiones mitóticas embrionarias tempranas sincronizadas.

rápidos, sincronizados, que generan una esfera hueca, la blástula. La división celular luego se hace más lenta y las divisiones siguientes no son sincronizadas, por lo que las células de diferentes lugares de la blástula se dividen en distintos momentos.

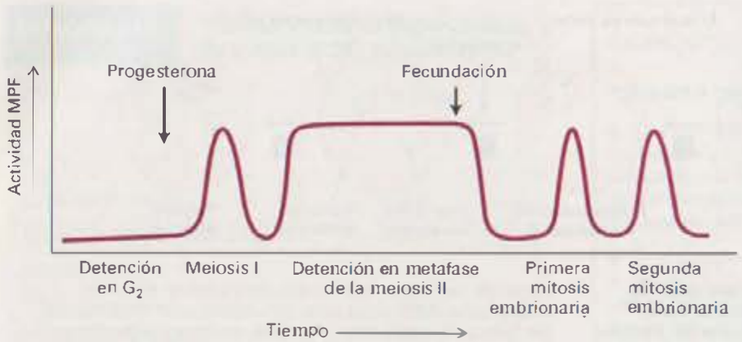
El factor promotor de la maduración (MPF) estimula la maduración meiótica de los ovocitos y la mitosis de las células somáticas

Cuando los ovocitos de *Xenopus* detenidos en G_2 se extraen del ovario de una rana hembra adulta y se tratan con progesterona, sufren una *maduración meiótica*, el proceso de maduración del ovocito desde un ovocito detenido en G_2 hasta el huevo detenido en metafase de la meiosis II (véase fig. 21-5). La microinyección de citoplasma proveniente de huevos detenidos en metafase de la meiosis II a ovocitos detenidos en G_2 estimula a los ovocitos a madurar a huevos en ausencia de progesterona (fig. 21-6). Este sistema no sólo condujo a la identificación inicial de un factor presente en el citoplasma del huevo que estimula la maduración de los ovocitos in vitro, sino que también proporcionó una forma de ensayo para el mismo, llamado factor *promotor de la maduración (MPF)*. Como se verá en breve, el MPF resultó el factor clave que regula la iniciación de la mitosis en todas las células eucariontes.

Usando el sistema de microinyección para ensayar la actividad del MPF en diferentes momentos durante la maduración de ovocitos in vitro, los investigadores encontraron que los ovocitos no tratados detenidos en G_2 tienen niveles bajos de actividad MPF; el tratamiento con progesterona induce la actividad MPF en el momento en que las células entran en meiosis I (fig. 21-7). La actividad MPF decae a medida que las células entran en la interfase entre la meiosis I y II, pero luego aumenta de nuevo cuando las células entran en meiosis II y permanece elevada en las células huevo detenidas en la metafase II. Después de la fecundación, la actividad MPF disminuye de nuevo hasta



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 21-6 Un factor difusible presente en los huevos de *Xenopus* detenidos promueve la maduración meiótica.** Cuando alrededor de un 5% del citoplasma de un huevo no fecundado de *Xenopus* detenido en la metafase de la meiosis II se microinyecta en un ovocito detenido en G_2 (paso 1a), el ovocito entra en meiosis I (paso 2) y sigue hasta la metafase de la meiosis II (paso 3), generando un huevo maduro en ausencia de progesterona. Este proceso puede repetirse varias veces sin el agregado de progesterona, lo que demuestra que el citoplasma del huevo contiene un factor promotor de maduración (MPF) de ovocitos. La microinyección de ovocitos detenidos en G_2 fue el primer ensayo para determinar la actividad del MPF (paso 1b) en diferentes estadios del ciclo celular y en diversos organismos. [Véase Y. Masui y C. L. Markert, 1971. J. Exp. Zool. 177:129.]



◀ FIGURA EXPERIMENTAL 21-7 La actividad del MPF en ovocitos, huevos y embriones tempranos de *Xenopus* alcanza su nivel máximo cuando las células entran en meiosis y mitosis. En la figura 21-5 se observan los diagramas de las estructuras celulares que corresponden a cada estadio. La actividad del MPF fue determinada por el ensayo de microinyección de la figura 21-6 y se cuantificó mediante diluciones de extractos celulares. Para la explicación véase el texto. [Véase J. Gerhart y col., 1984, J Cell Biol 98:1247; adaptado de A. Murray y M. W. Kirschner, 1989, Nature 339:275.]

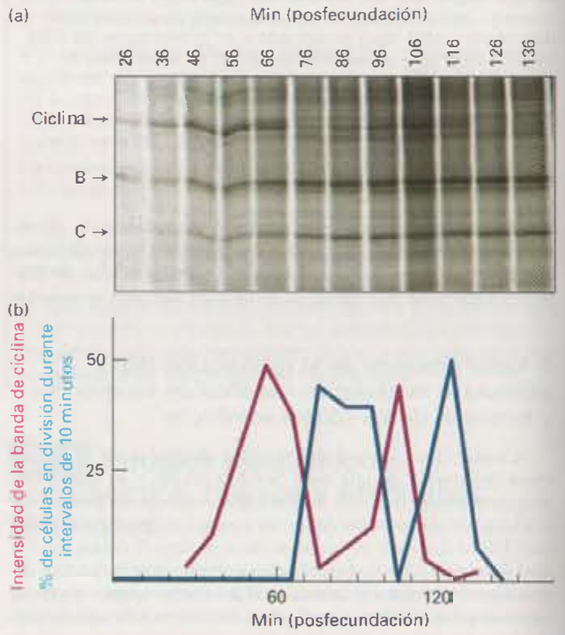
que el cigoto (huevo fecundado) entra en la primera mitosis del desarrollo embrionario. A lo largo de los siguientes 11 ciclos de mitosis sincronizados en el embrión temprano, la actividad MPF es baja en los períodos de interfase entre las mitosis y aumenta a medida que las células entran en mitosis.

Aunque primero se descubrió en las ranas, la actividad MPF se halló en las células mitóticas de todas las especies ensayadas. Por ejemplo, células de mamífero cultivadas pueden detenerse en mitosis por tratamiento con compuestos (p. ej., colchicina) que inhiben el ensamblaje de los microtúbulos. Cuando el citoplasma de esas células de mamífero detenidas en mitosis se inyectó en ovocitos de *Xenopus* detenidos en G_2, los ovocitos maduraron a huevos; esto es, las células somáticas de mamífero en mitosis contenían un factor citosólico con actividad de MPF de rana. Este hallazgo sugirió que el MPF controla la entrada de las células somáticas de mamífero en la mitosis, así como el ingreso de ovocitos de rana en la meiosis. Cuando el citoplasma de células somáticas de mamífero detenidas en mitosis se inyectó a células en interfase, estas últimas entraron en mitosis; o sea, sus membranas nucleares se fragmentaron y sus cromosomas se condensaron. Por lo tanto, el MPF es el factor difusible, encontrado por primera vez en los experimentos de fusión celular (véase fig. 21-3), que promueve la entrada de las células en mitosis. Es muy conveniente que la sigla MPF también signifique mitosis **p**romoting **f**actor, un nombre que denota una actividad más general de este factor.

Debido a que el ensayo de inyección de ovocitos usado en principio para medir la actividad MPF es muy engorroso, pasaron varios años antes de que el MPF fuera purificado por cromatografía en columna y caracterizado. El MPF es, en efecto, uno de los complejos heterodiméricos compuestos por una ciclina y CDK que en el presente se sabe regulan el ciclo celular. Al inicio cada subunidad de MPF se reconoció por medio de diferentes enfoques experimentales. En primer lugar se explicará cómo se identificó la subunidad ciclina reguladora y luego se describirá la manera en que los experimentos genéticos con levaduras condujeron al descubrimiento de la subunidad CDK catalizadora.

La ciclina mitótica se identificó primero en embriones tempranos de erizo de mar

Los experimentos con inhibidores mostraron que para el aumento de MPF durante la fase mitótica de cada ciclo celular en embriones tempranos de rana se necesita la síntesis de proteínas nuevas. Como sucede en los embriones tempranos de rana, los ciclos celulares iniciales en el embrión temprano de erizo de mar



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 21-8 Detección experimental de la síntesis y la destrucción cíclicas de ciclinas mitóticas en embriones de erizo de mar. Una suspensión de huevos de erizo de mar se fecundó de manera sincronizada por el agregado de espermatozoides de erizo de mar y se adicionó ^{35}S-metionina. A intervalos de 10 minutos, empezando 16 minutos después de la fecundación, se tomaron muestras para el análisis de proteínas en gel de SDS-poliacrilamida y para la detección de la división celular por microscopia. (a) Autorradiogramas de los geles SDS de cada muestra. La mayor parte de las proteínas, como X e Y, aumentaron de intensidad en forma continua. Por el contrario, la intensidad de la ciclina disminuyó de manera súbita a los 76 minutos después de la fecundación y luego comenzó a aumentar de nuevo a los 86 minutos. La banda de ciclina alcanzó su nivel máximo cada vez a los 106 min y volvió a disminuir a los 126 min. (b) Gráfico de la intensidad de la banda de ciclina (línea roja) y de la fracción de células que sufrieron división durante el intervalo de 10 minutos previo (línea azul). Nótese que la cantidad de ciclina disminuyó con rapidez inmediatamente antes de la división celular. [De T. Evans y col., 1983, Cell 33:389; cortesía de R.Timothy Hunt, Imperial Cancer Research Fund.]

son sincronizados, con todas las células embrionarias que entran en mitosis en forma simultánea. Los estudios bioquímicos con huevos y embriones de erizo de mar llevaron a la identificación del componente ciclina del MPF. Estos ensayos con huevos de erizo de mar fertilizados de manera sincronizada revelaron que la concentración de una proteína alcanzaba su nivel máximo al principio de la mitosis, disminuía en forma abrupta inmediatamente antes de la división celular y luego aumentaba durante la interfase siguiente para alcanzar un punto máximo al comienzo de la próxima mitosis y caer en forma abrupta inmediatamente antes de la segunda división (fig. 21-8). El análisis cuidadoso mostró que esta proteína, denominada *ciclina B*, se sintetiza de manera continua durante los ciclos celulares embrionarios, pero se destruye en forma abrupta después de la anafase. Dado que su concentración alcanza el nivel máximo en la mitosis, la ciclina B funciona como una *ciclina mitótica*.

En experimentos posteriores, se usó una copia de cDNA que codifica la ciclina B del erizo de mar como sonda para aislar un cDNA de ciclina B homólogo en *Xenopus laevis*. La ciclina B pura de *Xenopus*, obtenida por la expresión del cDNA en *E. coli*, se usó para producir anticuerpos específicos contra ciclina B. Mediante este anticuerpo, se detectó un polipéptido en Western blot que coincidía con la actividad MPF de huevos de *Xenopus*, lo que demostró que la ciclina B es de hecho una subunidad del MPF.

Los niveles de ciclina B y la actividad cinasa del factor promotor de la mitosis (MPF) cambian juntos en extractos de huevos de *Xenopus* en ciclo

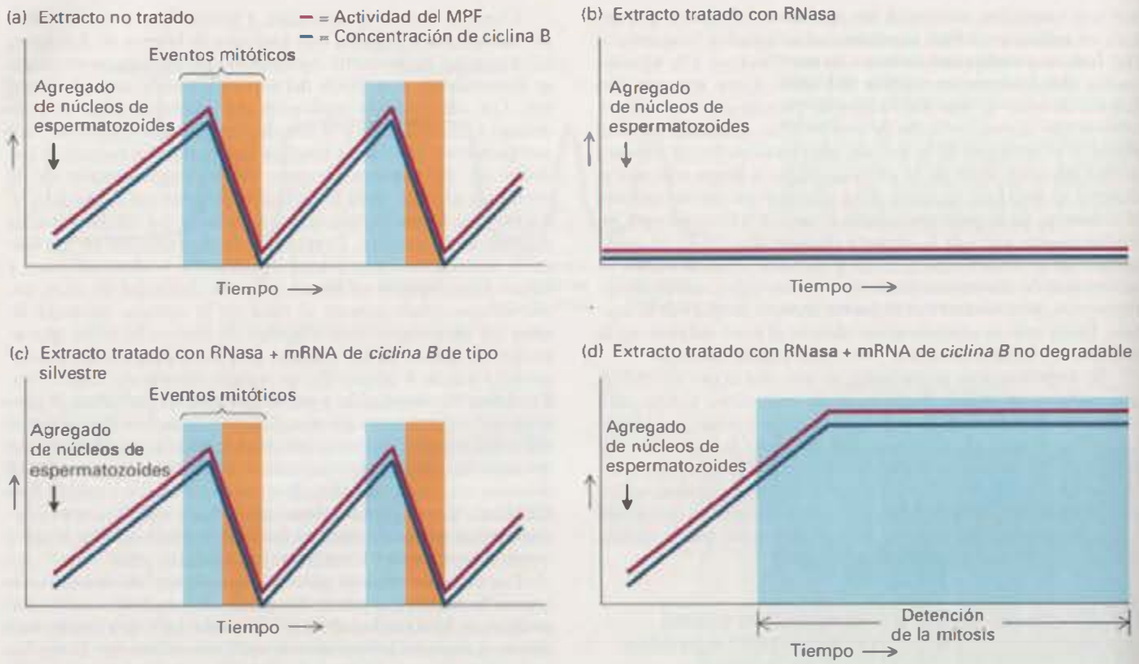
Algunos aspectos fuera de lo común de los ciclos celulares sincronizados de los embriones tempranos de *Xenopus* proporcionaron una forma de estudiar el papel de la ciclina mitótica en el control de la actividad del MPF. Primero, después de la fecundación de huevos de *Xenopus* los períodos G_1 y G_2 se reducen a un nivel mínimo durante los 12 ciclos celulares sincronizados iniciales. Esto es, una vez terminada la mitosis, las células embrionarias tempranas pasan de inmediato a la próxima fase S, y una vez que termina la replicación del DNA, las células pasan casi inmediatamente a la próxima mitosis. Segundo, la oscilación de la actividad MPF que se produce cuando los embriones tempranos de rana entran y salen de la mitosis se observa en el citoplasma de un huevo de rana fecundado incluso cuando el núcleo se extirpa y no puede haber transcripción alguna. Este hallazgo indica que todos los componentes celulares requeridos para que se produzcan los ciclos celulares truncados en los embriones tempranos de *Xenopus* están almacenados en el huevo no fertilizado. En las células somáticas formadas en etapas más tardías del desarrollo y en las levaduras descritas en secciones posteriores, deben producirse mRNA específicos en determinados momentos del ciclo celular para que tenga lugar el progreso a través del ciclo. Pero en los embriones tempranos de *Xenopus*, todos los mRNA necesarios para las divisiones celulares tempranas están presentes en el huevo no fecundado.

Por lo tanto, los extractos preparados a partir de huevos de *Xenopus* no fecundados contienen todos los materiales requeridos durante varios ciclos celulares, incluidas enzimas y precursores necesarios para la replicación del DNA, histonas y otras proteínas de la cromatina necesarias para el ensamblaje del DNA replicado para formar cromosomas, así como proteínas y fosfolípidos necesarios para la formación de la envoltura nuclear. Estos extractos de huevos también sintetizan proteínas codificadas por mRNA presentes en el extracto, incluida la ciclina B.

Cuando núcleos preparados a partir de espermatozoides de *Xenopus* se agregan a este extracto de huevos de *Xenopus*, la cromatina fuertemente condensada de los espermatozoides se descondensa y el DNA del espermatozoide se replica una vez. Los cromosomas replicados del espermatozoide se condensan a continuación y la envoltura nuclear se fragmenta, como sucede en las células intactas que entran en mitosis. Alrededor de 10 minutos después de la fragmentación de la envoltura nuclear, toda la ciclina B presente en el extracto se degrada en forma súbita, como sucede en las células intactas después de la anafase. Después de la degradación de la ciclina B, los cromosomas del espermatozoide se descondensan y la envoltura nuclear se forma otra vez alrededor de ellos, como en una célula intacta al final de la mitosis. Después de unos 20 minutos, el ciclo empieza de nuevo. El DNA que se encuentra dentro de los núcleos formados después del primer período mitótico (ahora $2n$) se replica, formando núcleos $4n$. La ciclina B, sintetizada a partir del mRNA de ciclina B presente en el extracto, aumenta. Cuando la ciclina B se aproxima a sus niveles máximos, los cromosomas se condensan una vez más, las envolturas nucleares se fragmentan y cerca de 10 minutos más tarde la ciclina B se destruye una vez más de forma súbita. Estos notables extractos de huevos de *Xenopus* pueden mediar varios de estos ciclos que imitan los ciclos sincronizados rápidos de un embrión temprano de rana.

Los estudios con este sistema experimental de extractos de huevos se facilitaron por el desarrollo de un ensayo nuevo para detectar la actividad del MPF. Usando MPF purificado mediante el ensayo de inyección de ovocitos (véase fig. 21-6), los investigadores encontraron que el MPF fosforila la histona H1. Esta actividad de cinasa de H1 proporcionó un ensayo mucho más simple y más fácil de cuantificar para la actividad MPF que el ensayo de inyección de ovocitos. Al disponer de un ensayo conveniente, los investigadores rastrearon la actividad MPF y la concentración de ciclina B en extractos de huevos de *Xenopus* en ciclo. Estos estudios mostraron que la actividad MPF aumenta y disminuye de forma simultánea con la concentración de ciclina B (fig. 21-9a). Los eventos tempranos de la mitosis, la condensación de los cromosomas y la fragmentación de la envoltura nuclear tenían lugar cuando la actividad MPF alcanzaba sus niveles más altos, en forma paralela al aumento de la concentración de ciclina B. El agregado de cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas, impidió la síntesis de ciclina B y también impidió la elevación de la actividad MPF, la condensación de los cromosomas y la fragmentación de la envoltura nuclear.

Para probar las funciones de la ciclina B en estos eventos del ciclo celular, todos los mRNA presentes en los extractos de huevos se degradaron por digestión con una concentración baja de RNasa que luego se inactivó por el agregado de un inhibidor específico. Este tratamiento destruye los mRNA sin afectar los tRNA y rRNA necesarios para la síntesis de proteínas, ya que su degradación requiere concentraciones mucho más altas de RNasa. Cuando se agregaron núcleos de espermatozoides a los extractos tratados con RNasa, los núcleos $1n$ replicaron su DNA, pero no hubo aumento de la actividad MPF ni tuvieron lugar los eventos mitóticos tempranos (condensación de cromosomas y fragmentación de la envoltura nuclear) que promueven los extractos no tratados (fig. 21-9b). El agregado de mRNA de *ciclina B*, producido in vitro a partir de cDNA clonado de *ciclina B*, al extracto de huevos tratado con RNasa más los núcleos de espermatozoides restauró las oscilaciones paralelas de la concentración de la ciclina B y la actividad MPF y los eventos mitóticos característicos tempranos y tardíos, como se observan con el extracto de huevos no tratado (fig. 21-9c). Dado que la ciclina B es



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 21-9 Los ciclos de actividad del MPF y los eventos mitóticos en extractos de huevos de *Xenopus* dependen de la síntesis y la degradación de ciclina B. En todos los casos la actividad del MPF y la concentración de ciclina B se determinó en diferentes momentos después del agregado de núcleos de espermatozoides a un extracto de huevos de *Xenopus* tratado como se indica en cada panel. Las observaciones microscópicas determinaron la presencia de eventos mitóticos tempranos (sombreado azul), como la condensación de los cromosomas y la fragmentación de la envoltura nuclear, y de eventos tardíos (sombreado anaranjado), como la descondensación de los cromosomas y el reensamblaje de la envoltura nuclear. Para la explicación véase el texto. [Véase A. W. Murray y col., 1989, Nature 339:275; adaptado de A. Murray y T. Hunt, 1993, The Cell Cycle: An Introduction, W. H. Freeman and Company.]

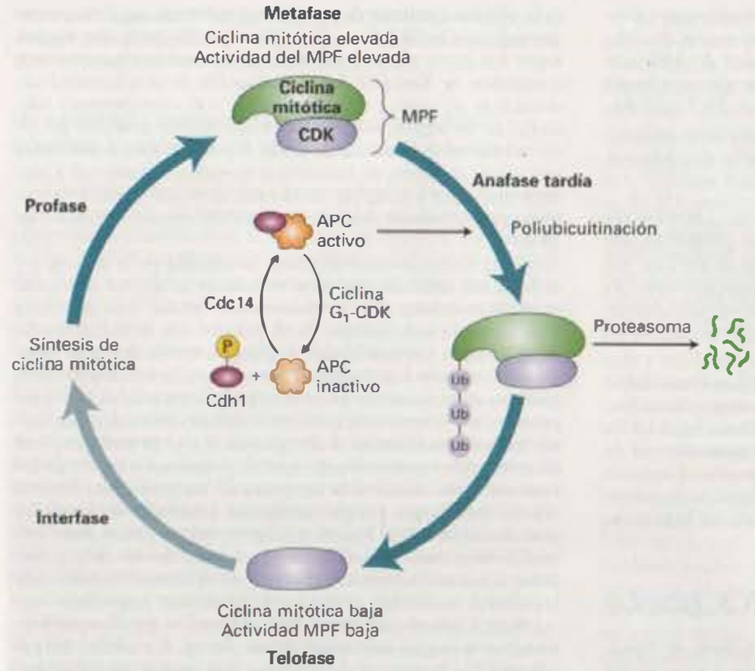
la única proteína sintetizada en estas condiciones, estos resultados muestran que es la proteína crucial cuya síntesis es necesaria para regular la actividad MPF y los ciclos de condensación de los cromosomas y de fragmentación de la envoltura nuclear mediados por los extractos de huevos de *Xenopus*.

En estos experimentos la descondensación de los cromosomas y el ensamblaje de la envoltura nuclear (los eventos mitóticos tardíos) coincidieron con las disminuciones del nivel de ciclina B y de la actividad del MPF. Para determinar si la degradación de la ciclina B es necesaria para salir de la mitosis, los investigadores agregaron un mRNA mutante que codifica una ciclina B no degradable a una mezcla de extracto de huevos de *Xenopus* tratados con RNasa y núcleos de espermatozoides. Como se muestra en la figura 21-9d, la actividad MPF aumentó en forma paralela con el nivel de ciclina B mutante, lo que desencadena la condensación de la cromatina de los espermatozoides y la fragmentación de la envoltura nuclear (eventos mitóticos tempranos). Sin embargo, la ciclina B mutante producida en esta reacción nunca se degradó. En consecuencia, la actividad MPF permanecía elevada y los eventos mitóticos tardíos de descondensación de los cromosomas y formación de la envoltura nuclear estaban bloqueados. Este experimento muestra que el descenso de la actividad MPF y la salida de la mitosis dependen de la degradación de la ciclina B.

Los resultados de los dos experimentos con extractos tratados con RNasa muestran que la entrada en mitosis precisa la acumulación de ciclina B, la ciclina mitótica de *Xenopus*, hasta alcanzar niveles altos, y que la salida de la mitosis requiere la degradación de esta ciclina mitótica. Dado que la actividad cinasa del MPF varió en forma paralela con la concentración de la ciclina mitótica, los resultados implican que la actividad alta de MPF cinasa produce la entrada en mitosis y que se necesita una caída en la actividad MPF cinasa para salir de ella.

El complejo promotor de la anafase (APC) controla la degradación de las ciclinas mitóticas y la salida de la mitosis

En estudios adicionales se reveló que las células de vertebrados contienen tres proteínas que pueden funcionar como una ciclina B para estimular la maduración de ovocitos de *Xenopus*: dos ciclinas B estrechamente relacionadas y una ciclina A. Denominadas en conjunto ciclinas de tipo B, estas proteínas muestran regiones de alta homología de secuencias. (Las ciclinas de tipo B se diferencian de las G_1 descritas en la sección 21.5.) En las células intactas, la degradación de todas las ciclinas de tipo B empieza después del inicio de la anafase, el



◀ Fig. 21-10. Regulación de los niveles de ciclina mitótica en las células embrionarias tempranas de *Xenopus* en ciclo. En la anafase tardía, el complejo promotor de la anafase (APC) poliubicuitina a las ciclinas mitóticas. Cuando las ciclinas se degradan por acción de los proteasomas, la actividad cinasa del MPF disminuye con rapidez, activando el inicio de la telofase. La actividad del APC se dirige hacia las ciclinas mitóticas por acción de un factor de especificidad, llamado Cdh1, que es fosforilado y por ende inactivado por los complejos ciclina G_1-CDK. Una fosfatasa específica, llamada Cdc14, elimina el fosfato regulador del factor de especificidad en la anafase tardía. Una vez que el factor de especificidad se inhibe en G_1, la concentración de ciclina mitótica aumenta y termina por alcanzar un nivel lo suficientemente alto como para estimular la entrada en la mitosis siguiente.

período de la mitosis en el que las cromátidas hermanas se separan y se traccionan hacia los polos opuestos del huso.

Los estudios bioquímicos con extractos de huevos de *Xenopus* mostraron que, en el momento de su degradación, las ciclinas de tipo B silvestre se modifican por el agregado covalente de numerosas moléculas de ubicuitina. Este proceso de poliubicuitinación marca a las proteínas de las células eucariontes para su degradación rápida por los proteasomas, que son estructuras cilíndricas multiproteicas que contienen numerosas proteasas. El agregado de una cadena de ubicuitina a una ciclina del tipo B o a otra proteína diana requiere tres tipos de enzimas (véase fig. 3-13). La ubicuitina se activa primero en su extremo carboxilo por la formación de una ligadura tioéster con un residuo de cisteína de la *enzima activadora de la ubicuitina*, E1. A continuación la ubicuitina se transfiere de la E1 a una cisteína de una clase de enzimas relacionadas, llamadas *enzimas conjugadoras de ubicuitina*, E2. La E2 específica determina, junto con una tercera proteína, la *ubicuitina ligasa* (E3), la proteína sustrato a la que se unirá de forma covalente una cadena de ubicuitina. Muchas ligasas de ubicuitina son proteínas con varias subunidades.

La determinación de la secuencia de los cDNA que codifican algunas ciclinas del tipo B de varios eucariontes mostró que todas contienen una secuencia homóloga de nueve residuos cerca del extremo N, denominada *caja de destrucción*. La deleción de esta caja de destrucción, como se ve en el mRNA mutante usado en el experimento representado en la figura 21-8, impide la poliubicuitinación de las ciclinas del tipo B y por consiguiente las transforma en no degradables. La ligasa de la ubicuitina que reconoce la caja de destrucción de la ciclina mitótica es una proteína con múltiples subunidades denominada *complejo promotor de la anafase* (APC), que se mencionó antes en este capítulo (véase fig. 21-2, pasos [8] y [9]).

En la figura 21-10 se observa el modelo actual que mejor explica los cambios en los niveles de ciclina mitótica vistos en las células de embriones tempranos de *Xenopus* en ciclo. La ciclina B, la ciclina mitótica primaria de los animales multicelulares (metazoos), se sintetiza a lo largo del ciclo celular a partir de un mRNA estable. El descenso observado en su concentración en la anafase tardía es resultado de su degradación estimulada por el APC en esta fase del ciclo celular. Como se explicará en la sección 21.5, los estudios genéticos con levaduras condujeron a la identificación de un *factor de especificidad APC*, denominado *Cdh1*, que se une al APC y lo dirige hacia las ciclinas mitóticas en las que se produjo poliubicuitinación. Este factor de especificidad es activo solo en la anafase tardía, cuando los cromosomas en separación se distanciaron lo suficiente en la célula en división como para asegurar que ambas células hijas contendrán un juego completo de cromosomas. La fosforilación de *Cdh1* por otros complejos ciclina-CDK durante G_1 inhibe su asociación con el APC y por ende la degradación de la ciclina mitótica (véase fig. 21-2, paso [2]). Esta inhibición permite la elevación gradual de los niveles de ciclina mitótica observada a lo largo de la interfase del ciclo celular siguiente.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 21.2

Estudios bioquímicos con ovocitos, huevos y embriones tempranos

- El MPF es una proteincinasa que requiere una ciclina mitótica para su actividad. La actividad proteincinasa del MPF estimula el comienzo de la mitosis al fosforilar varios sustratos proteicos específicos, la mayoría de los cuales todavía no se identificaron.

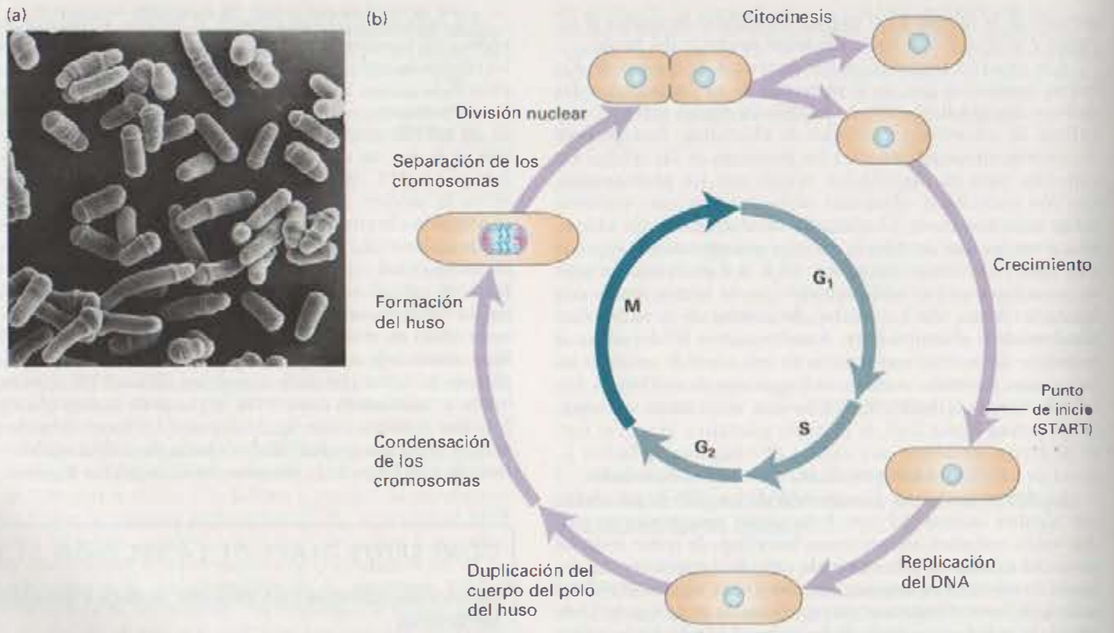
- En las células en división sincronizada de embriones tempranos de *Xenopus* y erizo de mar, la concentración de ciclinas mitóticas (p. ej., la ciclina B) y la actividad del MPF aumentan a medida que las células ingresan en mitosis y luego disminuyen cuando salen de ella (véanse figs. 21-7 y 21-8).
- La elevación y la caída de la actividad del MPF durante el ciclo celular es resultado de la síntesis y la degradación concomitante de ciclina mitótica (véase fig. 21-9).
- El complejo promotor de la anafase (APC) compuesto por numerosas subunidades es una ligasa de ubicuitina que reconoce la secuencia conservada de una caja de destrucción de las ciclinas mitóticas y promueve su poliubicuitinación, para marcar así a las proteínas para su degradación rápida en los proteasomas. La disminución resultante de actividad MPF lleva a la finalización de la mitosis.
- La actividad ligasa de ubicuitina del APC es controlada, de forma que en las ciclinas mitóticas sólo se produzca poliubicuitinación durante la anafase tardía (véase fig. 21-10). La desactivación del APC en G_1 permite la acumulación de ciclinas mitóticas durante el ciclo celular siguiente. Esto produce los aumentos y las disminuciones cíclicos en la actividad de MPF que causan la entrada y la salida de la mitosis.

21.3 Estudios genéticos con *S. pombe*

Mediante los estudios con extractos de huevos de *Xenopus* descritos en la sección previa se demostró que se necesita la síntesis continua de una ciclina mitótica, seguida por su degradación periódica en la anafase tardía, para que tengan lugar los ciclos rápidos de mitosis observados en embriones tempranos de *Xenopus*. La identificación de la subunidad catalizadora de proteincinasa del MPF y el conocimiento adicional de su regulación provienen del análisis genético del ciclo celular en la levadura de fisión *S. pombe*. Ésta crece como una célula en forma de bastón que aumenta de longitud a medida que crece y luego se divide por la mitad durante la mitosis, para producir dos células hijas del mismo tamaño (fig. 21-11).

En la *S. pombe* tipo silvestre, la entrada en la mitosis está regulada con cuidado para coordinar en forma adecuada la división celular con el crecimiento celular. Las mutantes sensibles a la temperatura de *S. pombe* con defectos condicionales en la capacidad de progresar a través del ciclo celular se reconocen con facilidad porque esos defectos producen cambios característicos en la longitud de las células a la temperatura no permisiva. La mayoría de tales mutantes que fueron aislados pertenecen a dos grupos. En el primer grupo se encuentran las mutantes *cdc*, que no progresan a través de las fases del ciclo celular a la temperatura no permisiva; forman células muy largas porque continúan creciendo en longitud, pero no se dividen. Por el contrario, las mutantes *wee* forman células más pequeñas de lo normal, debido a que son defectuosas en las proteínas que normalmente impiden que las células se dividan cuando son demasiado pequeñas.

Para *S. pombe* los genes tipo silvestre se escriben en cursiva, con un signo más como exponente (p. ej., *cdc2*$^+$); los genes con una mutación recesiva, en cursiva con un signo menos como exponente (p.ej., *cdc2*$^-$). Las proteínas codificadas por un gen particular se designan por el símbolo del gen en tipo romano con una inicial mayúscula (p. ej., Cdc2).



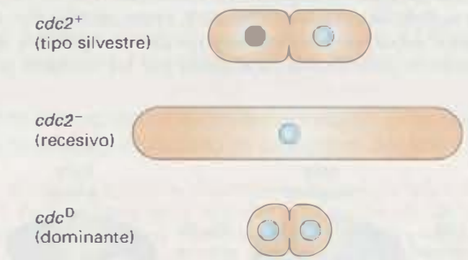
▲ **Fig. 21-11. Levadura de fisión *S. pombe*.** (a) Microfotografía electrónica de barrido de células de *S. pombe* en diferentes estadios del ciclo celular. Las células largas están a punto de entrar en mitosis; las cortas recién sufrieron citocinesis. (b) Eventos principales en el ciclo celular de *S. pombe*. Nótese que la envoltura nuclear no se fragmenta durante la mitosis en *S. pombe* ni en otras levaduras. [Parte (a) cortesía de N. Hajibagheri.]

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Mitosis y división celular en *S. pombe*

Un complejo muy conservado similar al MPF controla la entrada en la mitosis de *S. pombe*

Las mutaciones sensibles a la temperatura de *cdc2*, uno de varios genes *cdc* diferentes en *S. pombe*, producen fenotipos opuestos en función de si la mutación es recesiva o dominante (fig. 21-12). Las mutaciones recesivas (*cdc2*$^-$) por lo general dan lugar a células anormalmente largas, en tanto que las dominantes (*cdc2*^{D}) generan células demasiado pequeñas, el fenotipo wee. Como se describió en el capítulo 9, las mutaciones recesivas por lo general causan una *pérdida* de la función de la proteína del tipo silvestre; en las células diploides ambos alelos deben estar mutados para que se observe el fenotipo mutante. Por el contrario, las mutaciones dominantes suelen producir un *aumento* de la función de la proteína, ya sea por la superproducción o por la falta de regulación; en este caso, la presencia de sólo un alelo mutante confiere el fenotipo mutante a las células diploides. El hallazgo de que una pérdida de actividad de Cdc2 (mutantes *cdc2*$^-$) impide la entrada en la mitosis y que un aumento de su actividad (mutantes *cdc2*^{D}) la inicia más temprano de lo normal identificó a Cdc2 como un regulador importante de la entrada en la mitosis en *S. pombe*.

El gen de tipo silvestre *cdc2*$^+$ contenido en una genoteca de plásmidos de *S. pombe* se identificó y aisló por su capacidad de complementar las mutantes *cdc2*$^-$ (véase fig. 21-4). La determinación de secuencias mostró que el *cdc2*$^+$ codifica una proteína de 34 kDa con homología con las proteincinasas de los eucariontes. En estudios posteriores, los investigadores identificaron clones de cDNA de otros organismos que podían complementar los mutantes *cdc2*$^-$ de *S. pombe*. Lo más notable fue que aislaron un cDNA humano que codifica una proteína idéntica a la Cdc2 de *S. pombe* en el 63% de sus residuos.



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 21-12 Las mutantes recesivas y dominantes *cdc2* de *S. pombe* tienen fenotipos opuestos.** La célula del tipo silvestre (*cdc2*$^+$) se representa en forma esquemática con dos células hijas de tamaño normal inmediatamente antes de la citocinesis. La mutante recesiva *cdc2*$^-$ no puede entrar en mitosis a la temperatura no permisiva y aparece como una célula larga con un solo núcleo que contiene los cromosomas replicados. La mutante *cdc2*^{D} dominante entra en mitosis de manera prematura, antes de alcanzar el tamaño normal en G_2; así, las dos células hijas que resultan de la citocinesis son de menor tamaño que lo normal, o sea, tienen el fenotipo wee.

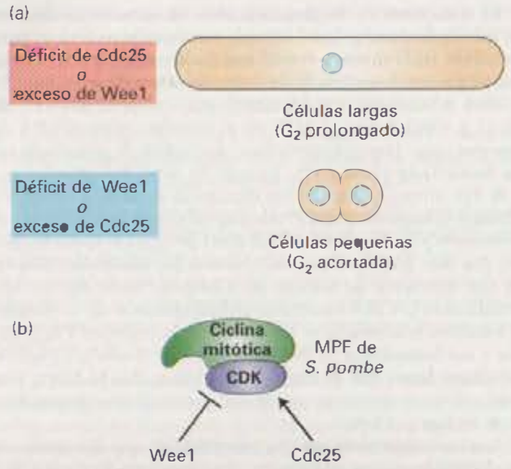
El aislamiento y la determinación de secuencias de otro gen *cdc* de *S. pombe* (*cdc13*$^+$), que también es necesario para la entrada en la mitosis, reveló que codifica una proteína con homología con la ciclina B del erizo de mar y de *Xenopus*. En estudios adicionales se demostró que un heterodímero de Cdc13 y Cdc2 forma el MPF de *S. pombe*; como el MPF de *Xenopus*, este heterodímero tiene actividad de proteincinasa que fosforila la histona H1. Es más, la actividad proteincinasa de H1 aumenta cuando las células de *S. pombe* entran en mitosis y disminuye cuando salen de ella, en forma paralela al incremento y la disminución del nivel de Cdc13. Estos hallazgos, que son análogos por completo a los resultados obtenidos con extractos de huevos de *Xenopus* (véase fig. 21-9a), identificaron a Cdc13 como la ciclina mitótica de *S. pombe*. En estudios adicionales se observó que la proteína Cdc2 aislada y sus homólogos en otros eucariontes tienen poca actividad cinasa hasta que se unen a una ciclina. Por lo tanto, esta familia de proteincinasas se conoció como cinasas dependientes de ciclina o CDK.

Los investigadores pronto encontraron que los anticuerpos dirigidos contra una región muy conservada de la Cdc2 reconocen un polipéptido que se purifica junto con el MPF purificado a partir de huevos de *Xenopus*. Por lo tanto, el MPF de *Xenopus* también está compuesto por una ciclina mitótica (ciclina B) y una CDK (llamada CDK1). Esta convergencia de resultados de los estudios bioquímicos en un invertebrado (el erizo de mar) y un vertebrado (*Xenopus*), así como de los análisis genéticos en una levadura indican que la entrada en la mitosis es controlada por complejos ciclina-CDK mitóticos análogos en todos los eucariontes (véase fig. 21-2, paso 7). Es más, se encontró que la mayoría de proteínas que participan están muy conservadas durante la evolución.

La fosforilación de la subunidad CDK regula la actividad cinasa del MPF

El análisis de otras mutantes *cdc* de *S. pombe* reveló que proteínas codificadas por otros genes regulan la actividad de proteincinasa del complejo ciclina-CDK mitótico (MPF) en las levaduras que se reproducen por fisión. Por ejemplo, los mutantes *cdc25*$^-$ sensibles a la temperatura demoran su entrada en la mitosis a la temperatura no permisiva, y produce células largas. Por otro lado, la sobreexpresión de Cdc25 por acción de un plásmido presente en varias copias por célula disminuye la duración de G_2, y genera la entrada prematura en mitosis y células pequeñas (wee) (fig. 21-13a). Por el contrario, las mutaciones con pérdida de función en el gen *wee1*$^+$ causan la entrada prematura en mitosis, lo que produce células pequeñas, en tanto que la superproducción de proteína Wee1 aumenta la duración de G_2, lo que genera células largas. Una interpretación lógica de estos resultados es que la proteína Cdc25 estimula la actividad cinasa del MPF de *S. pombe*, en tanto que la proteína Wee1 inhibe la actividad MPF (fig. 21-13b).

En estudios posteriores se aislaron los genes *cdc25*$^+$ y *wee1*$^+$ del tipo silvestre, se determinó su secuencia y se usaron para producir las proteínas que codifican mediante vectores de expresión convenientes. Las secuencias deducidas de Cdc25 y Wee1, así como los estudios bioquímicos de las proteínas demostraron que ellas regulan la actividad cinasa del MPF de *S. pombe* por fosforilación y desfosforilación de sitios reguladores específicos en Cdc2, la subunidad CDK del MPF.



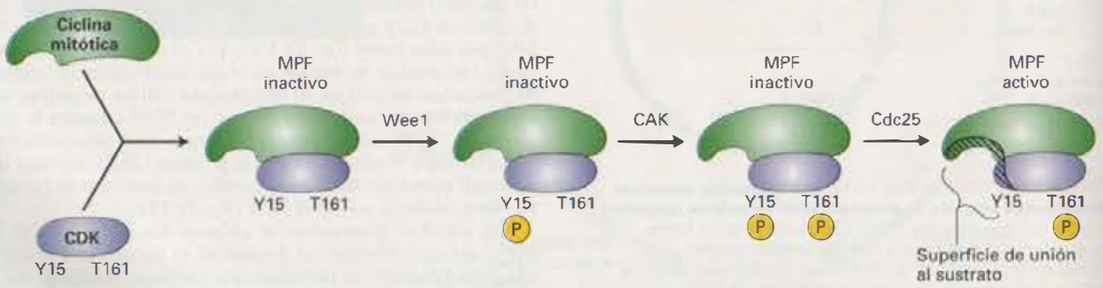
▲ FIGURA EXPERIMENTAL 21-13 Cdc25 y Wee1 tienen efectos opuestos sobre la actividad de MPF en *S. pombe*. (a) Las células que carecen de actividad Cdc25 o Wee1, como resultado de mutaciones recesivas sensibles a la temperatura en los genes correspondientes, tienen fenotipos opuestos. De la misma forma, las células con copias numerosas de plásmidos que contienen *cdc25*$^+$ o *wee1*$^+$ de tipo silvestre y que por lo tanto producen un exceso de las proteínas codificadas por ellos, tienen fenotipos opuestos. (b) Estos fenotipos implican que el complejo ciclina-CDK mitótico es activado (→) por Cdc25 e inhibido (—|) por Wee1. Para una explicación adicional véase el texto.

En la figura 21-14 se ilustran las funciones de cuatro proteínas que regulan la actividad proteincinasa de la CDK de *S. pombe*. La primera es Cdc13, la ciclina mitótica de *S. pombe* (equivalente a la ciclina B de los metazoos) que se asocia con la CDK para formar un MPF con actividad muy baja. La segunda es la Wee1 proteína-tirosincinasa, que fosforila un residuo de tirosina inhibidor (Y15) en la subunidad CDK. La tercera es otra cinasa, denominada cinasa activadora de CDK (CAK), que fosforila un residuo de treonina activador (T161). Cuando ambos residuos están fosforilados, el MPF es inactivo. Por último, la *fosfatasa Cdc25* elimina el fosfato de Y15, lo que genera un MPF muy activo. La mutagénesis específica de sitio, que cambia el Y15 en la CDK de *S. pombe* a una fenilalanina que no puede fosforilarse, produce mutantes con el fenotipo wee, similar al de las mutantes *wee1*$^-$. Ambas mutaciones impiden la fosforilación inhibitoria de Y15, lo que produce una incapacidad para regular en forma adecuada la actividad del MPF y, en consecuencia, la entrada prematura en mitosis.

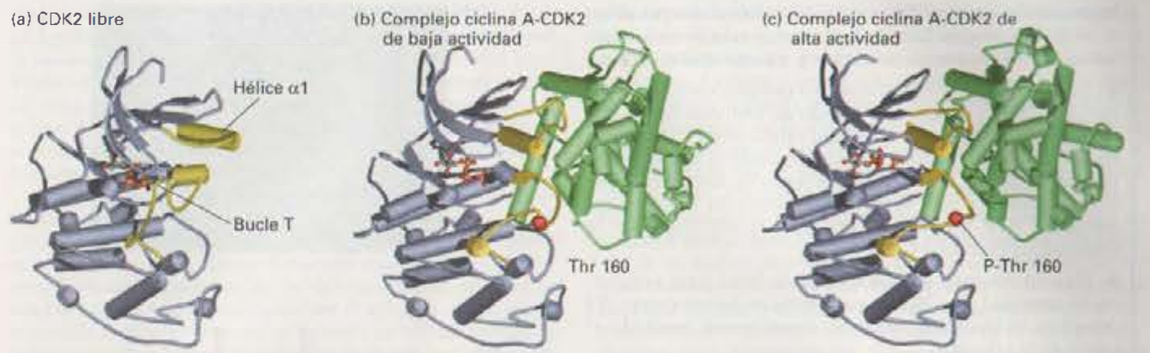
Los cambios de conformación inducidos por la unión y la fosforilación de la ciclina aumentan la actividad del MPF

A diferencia de lo que sucede con las levaduras que se reproducen por fisión y brotación, cada una de las cuales produce solo una CDK, los vertebrados generan varias CDK (véase cuadro 21-1). Se determinó la estructura tridimensional de una cinasa dependiente de ciclina humana (CDK2) y proporcionó un panorama de la manera en que la unión de la ciclina y la fosforilación de las CDK regulan su actividad de proteincinasa. Aunque no se determinaron las estructuras tridimensionales de la CDK de *S. pombe* y de la mayor parte de las otras cinasas dependientes de ciclina, su extensa homología de secuencias con la CDK2 humana sugiere que todas estas CDK tienen una estructura y un mecanismo de regulación similares.

La CDK2 no fosforilada, inactiva, contiene una región flexible, llamada bucle T, que bloquea el acceso de los sustratos proteicos al sitio activo donde se une el ATP (fig. 21-15a). Este bloqueo estérico por el bucle T explica en gran medida por qué la CDK2 libre, no unida a la ciclina, no tiene actividad de proteincinasa. La CDK2 no fosforilada unida a una de sus ciclinas asociadas, la ciclina A, tiene una actividad de proteincinasa mínima, pero detectable in vitro, aunque puede ser esencialmente inactiva in vivo. Las interacciones extensas entre la ciclina A y el bucle T causan un cambio espectacular en la posición del bucle T, y exponen así el sitio activo de CDK2 (fig. 21-15b). La unión de la ciclina A también desplaza la posición de la hélice α1 de la CDK2, y modifica su superficie de unión al sustrato. La fosforilación de la treonina activadora, localizada en el bucle T, causa cambios de conformación adicionales en el complejo ciclina A-CDK2, que aumentan en gran medida su afinidad por los sustratos proteicos (fig. 21-15c). Como resultado, la actividad cinasa del complejo fosforilado es cien veces mayor que la del no fosforilado.



▲ Fig. 21-14. Regulación de la actividad cinasa del factor promotor de la mitosis (MPF) de *S. pombe*. La interacción de la ciclina mitótica (Cdc13) con la cinasa dependiente de ciclina (Cdc2) forma el MPF. La subunidad de CDK puede fosforilarse en dos sitios reguladores; por el Wee1 en la tirosina 15 (Y15) y por la cinasa activadora de CDK (CAK) en la treonina 161 (T161). La eliminación del fosfato de Y15 por la fosfatasa Cdc25 produce MPF activo, en el que la subunidad de CDK está monofosforilada en T161. La subunidad de ciclina mitótica contribuye con la especificidad de unión al sustrato del MPF, probablemente formando parte de la superficie de unión al sustrato (zona rayada), que también implica el residuo inhibidor Y15.



▲ Fig. 21-15. Modelos estructurales de la CDK2 humana, que es homóloga a la cinasa dependiente de ciclina (CDK) de *S. pombe*. (a) CDK2 libre, inactiva, no unida a la ciclina A. En la CDK2 libre, el bucle T bloquea el acceso de los sustratos proteicos al fosfato γ del ATP que está unido, representado como un modelo de esferas y barras. Las estructuras de las regiones resaltadas en amarillo se alteran cuando la CDK se une a la ciclina A. (b) Complejo ciclina A-CDK2 no fosforilado de baja actividad. Los cambios de conformación inducidos por la unión de un dominio de ciclina A (verde) hace que el bucle T se separe del sitio activo de CDK2, de manera que las proteínas sustrato puedan unirse. La hélice α1 en CDK2, que interactúa en forma extensa con la ciclina A, se desplaza varios angstroms dentro del surco catalizador, cambiando de posición cadenas laterales catalizadoras clave necesarias para la especificidad de sustrato de la reacción de fosforotransferencia. Las esferas rojas marcan la posición equivalente a la treonina 161 en la Cdc2 de *S. pombe*. (c) Complejo fosforilado, de alta actividad, ciclina A-CDK2. Los cambios de conformación inducidos por la fosforilación de la treonina activadora (esfera roja) modifican la forma de la superficie de unión al sustrato, aumentando en gran medida la afinidad por el sustrato proteico. [Cortesía de P. D. Jeffrey. Véase A. A. Russo y col., 1996, Nature Struct. Biol. 3:696.]

El residuo inhibidor de tirosina (Y15) en la CDK de *S. pombe* está en la región de la proteína que liga los fosfatos del ATP. Las proteínas CDK2 de los vertebrados contienen un segundo residuo inhibidor, treonina-14 (T14), localizado en la misma región de la proteína. La fosforilación de Y15 y T14 en estas proteínas impide la unión del ATP, debido a la repulsión electrostática entre los fosfatos unidos a la proteína y los del ATP. Por lo tanto, estas fosforilaciones inhiben la actividad de proteincinasa incluso cuando la proteína CDK está unida a una ciclina y el residuo activador está fosforilado.

Otros mecanismos también controlan la entrada en la mitosis regulando la actividad del MPF

Hasta el presente se describieron dos mecanismos de control de la entrada en la mitosis: a) la regulación de la concentración de ciclinas mitóticas como se muestra en la figura 21-10, y b) la regulación de la actividad cinasa del MPF, como se observa en la figura 21-14. Estudios adicionales de mutantes de *S. pombe* con ciclos celulares alterados revelaron otros genes, cuyas proteínas codificadas influyen en forma directa o indirecta en la actividad del MPF. En la actualidad está claro que la actividad del MPF en *S. pombe* se regula de una manera compleja con el objeto de controlar con precisión el momento de la mitosis y por consiguiente el tamaño de las células hijas.

Se encontraron enzimas con actividades equivalentes a las Wee1 y Cdc25 del *S. pombe* en extractos de huevos en ciclo de *Xenopus*. La actividad de tirosincinasa de la Wee1 de *Xenopus* es alta y la de fosfatasa de Cdc25 es baja durante la interfase. Como resultado, el MPF de *Xenopus* formado por la CDK1 y la ciclina mitótica recién sintetizada es inactivo. A medida que el extracto inicia los sucesos de la mitosis, la actividad de Wee1 disminuye y la de Cdc25 aumenta, de forma que MPF se convierte en su forma activa. Aunque la ciclina B es la única proteína cuya síntesis es necesaria para el ciclo de los embriones tempranos de *Xenopus*, las actividades de otras proteínas, como Wee1 y Cdc25 de *Xenopus*, deben regularse en forma adecuada para que el ciclo se produzca. En su forma activa, Cdc25 está fosforilada. Su actividad también la controlan proteincinasas y fosfatasas adicionales.

La actividad del MPF también puede regularse por control de la transcripción de los genes que codifican las proteínas que regulan la actividad del MPF. Por ejemplo, después de las divisiones celulares sincronizadas rápidas iniciales del embrión temprano de *Drosophila*, todos los mRNA se degradan y las células se detienen en G_2. Esta detención se produce porque el homólogo de Cdc25 en *Drosophila*, llamado String, es inestable. La disminución resultante de la actividad fosfatasa de String mantiene el MPF en su estado inhibido y evita la entrada en mitosis. El ingreso ulterior en la mitosis, regulado por grupos específicos de células se desencadena por la transcripción regulada del gen *string*.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 21.3

Estudios genéticos con *S. pombe*

- En la levadura de fisión *S. pombe*, el gen *cdc2*$^+$ codifica una proteincinasa dependiente de ciclina (CDK) que se asocia con una ciclina mitótica codificada por el gen *cdc13*$^+$. El

heterodímero ciclina-CDK mitótico resultante es equivalente al MPF de *Xenopus*. Las mutantes que carecen de ciclina mitótica o CDK no entran en mitosis y forman células largas.

- La actividad de proteincinasa del complejo mitótico ciclina-CDK (MPF) depende del estado de fosforilación de dos residuos presentes en la subunidad catalizadora CDK (véase fig. 21-14). La actividad es máxima cuando la treonina-161 está fosforilada y se inhibe por la fosforilación de la tirosina-15 catalizada por Wee1, que interfiere en la unión correcta del ATP. Este fosfato inhibidor es eliminado por la fosfatasa de proteínas Cdc25.
- Una disminución en la actividad de Wee1 y un aumento en la actividad de Cdc25, que producen la activación del complejo ciclina-CDK mitótico, tienen como resultado el inicio de la mitosis.
- El complejo ciclina A-CDK2 humano es similar al MPF de *Xenopus* y *S. pombe*. Los estudios estructurales con proteínas humanas revelan que la unión de la ciclina a CDK2 y la fosforilación de la treonina activadora (equivalente a la treonina-161 de la CDK de *S. pombe*) producen cambios de conformación que exponen el sitio activo y modifican la superficie de unión al sustrato para que tenga alta actividad y afinidad por el sustrato proteico (véase fig. 21-15).

21.4 Mecanismos moleculares de regulación de los eventos mitóticos

En las secciones anteriores, se observó que un aumento regulado de la actividad del MPF induce la entrada en la mitosis. Es probable que ese ingreso sea consecuencia de la fosforilación de proteínas específicas por la actividad de proteincinasa del MPF. Aunque muchos de los sustratos críticos del MPF todavía no se identificaron, se conocen ejemplos que muestran cómo la regulación por la fosforilación del MPF media muchos de los eventos tempranos de la mitosis que llevan a la metafase: la condensación de los cromosomas, la formación del huso mitótico y la fragmentación de la envoltura nuclear (véase fig. 20-29).

Recordemos que una disminución de las ciclinas mitóticas y la inactivación asociada del MPF coinciden con los estadios más tardíos de la mitosis (véase fig. 21-9a). Inmediatamente antes de esto, en la anafase temprana, las cromátidas hermanas se separan y desplazan hacia los polos opuestos del huso. Durante la telofase, la dinámica de los microtúbulos retorna a las condiciones de la interfase, los cromosomas se descondensan, la envoltura nuclear se forma de nuevo, el complejo de Golgi se remodela y tiene lugar la citocinesis. Algunos de estos procesos se activan por desfosforilación; otros, por degradación de proteínas.

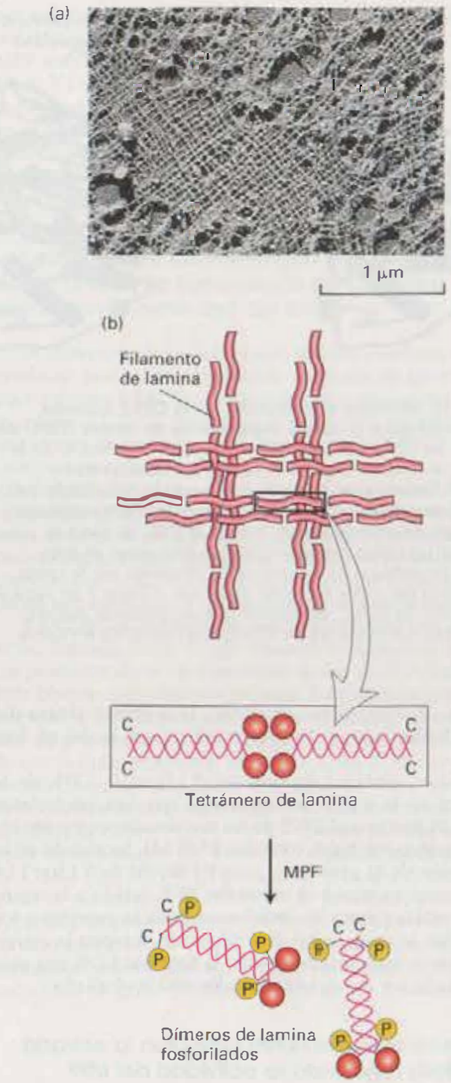
En esta sección se explican los mecanismos moleculares y las proteínas específicas asociadas con algunos de los eventos que caracterizan a la mitosis temprana y tardía. Estos mecanismos ilustran cómo los complejos ciclina-CDK, junto con las ligasas de ubicuitina, controlan el pasaje a través de la fase mitótica del ciclo celular.

La fosforilación de laminas nucleares y otras proteínas promueve los eventos mitóticos tempranos

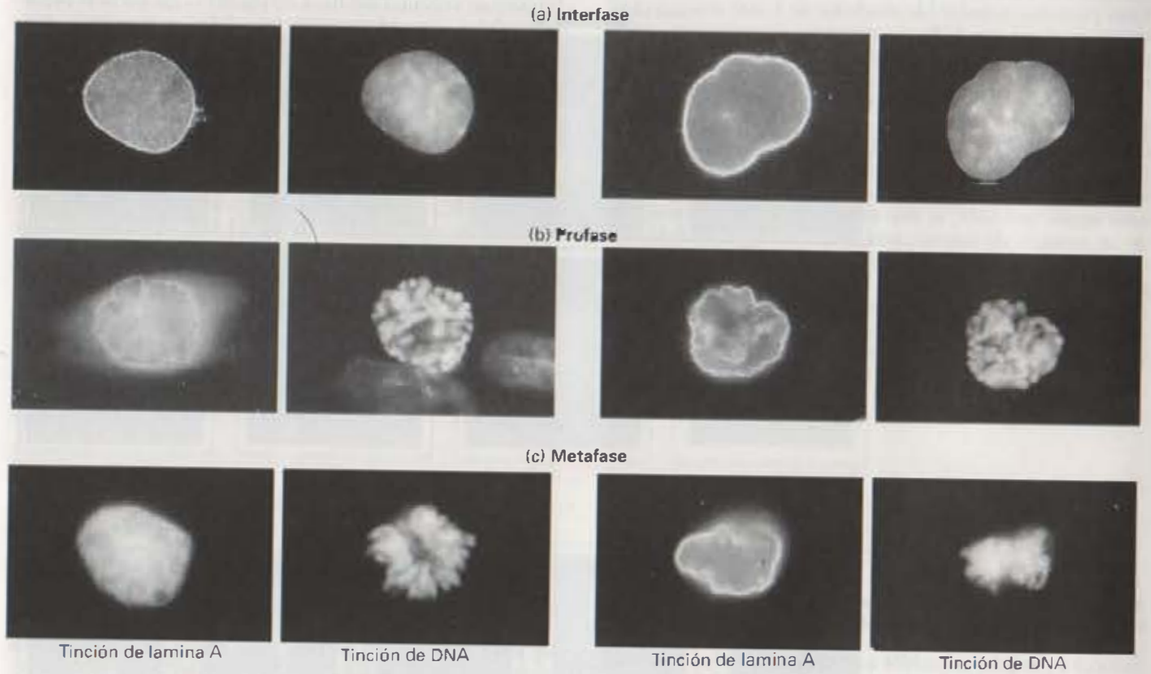
La envoltura nuclear es una extensión de la doble membrana del retículo endoplasmático rugoso que contiene muchos complejos de poros nucleares (véase fig. 5-19). La bicapa lipídica de la membrana nuclear interna está soportada por la laminilla nuclear, una malla de filamentos de lamina localizada adyacente a la cara interna de la envoltura nuclear (fig. 21-16a). Las tres laminas nucleares (A, B y C) presentes en las células de vertebrados pertenecen a los filamentos intermedios, una clase de proteínas del citoesqueleto, que son fundamentales para el soporte de las membranas celulares (cap. 19).

Las laminas A y C, codificadas por la misma unidad de transcripción y producidas por el empalme alternativo de un único pre-mRNA, son idénticas, salvo en una región de 133 residuos en el extremo C de la lamina A que está ausente en la C. La lamina B, codificada por una unidad de transcripción diferente, se modifica después de la traducción por el agregado de un grupo isoprenilo hidrófobo cerca de su extremo carboxilo. Este ácido graso queda incluido por completo en la membrana nuclear interna, y fija así la laminilla nuclear a la membrana (véase fig. 5-15). Las tres laminas nucleares forman dímeros con una región central de aspecto tubular formada por dos hélices α paralelas y enrolladas entre sí, y dominios de cabeza globular y de cola; la polimerización de estos dímeros por medio de asociaciones cabeza a cabeza y cola a cola generan los filamentos intermedios que componen la laminilla nuclear (véase fig. 19-33).

Al comienzo de la mitosis, el MPF fosforila residuos de serina específicos en las tres laminas nucleares y produce la despolimerización de los filamentos intermedios de lamina (fig. 21-16b). Los dímeros fosforilados de lamina A y C se liberan en solución, en tanto que los dímeros fosforilados de lamina B permanecen asociados a la membrana nuclear a través de su anclaje isoprenilo. La despolimerización de las laminas nucleares conduce a la desintegración de la malla de la laminilla nuclear y contribuye a la fragmentación de la envoltura nuclear. El experimento resumido en la figura 21-17 muestra que la fragmentación de la envoltura nuclear, que por lo general se produce temprano en la mitosis, depende de la fosforilación de la lamina A.



▲ Fig. 21-16. La laminilla nuclear y su despolimerización. (a) Microfotografía electrónica de la laminilla nuclear de un ovocito de *Xenopus*. Nótese la red tipo malla regular de filamentos intermedios de lamina. Esta estructura se encuentra adyacente a la membrana nuclear interna (véase fig. 19-31). (b) Diagramas esquemáticos de la estructura de la laminilla nuclear. Dos juegos ortogonales de filamentos de 10 nm de diámetro compuestos por laminas A, B y C forman la laminilla nuclear (*arriba*). Cada uno de los filamentos de lamina está formado por la polimerización terminoterminal de tetrámeros de lamina, que presentan dos dímeros de lamina (*medio*). Los círculos rojos representan los dominios globulares del extremo N. La fosforilación de los residuos de serina específicos cerca de la sección central de aspecto tubular helicoidal enrollada de los dímeros de lamina hace que los tetrámeros se despolimericen (*abajo*). Como resultado, la laminilla nuclear se desintegra. [Parte (a) de U. Aebi y col., 1986, Nature 323:560; cortesía de U. Aebi. Parte (b) adaptado de A. Murray y T. Hunt, 1993, The Cell Cycle: An Introduction, W. H. Freeman and Company.]



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 21-17 Los experimentos de transfección muestran que la fosforilación de la lamina humana A es necesaria para la despolimerización de la lamina. Se usó mutagénesis dirigida a sitios para preparar un gen mutante de *lamina A* humana que codifica una proteína en la que alaninas reemplazan a las serinas que en condiciones normales se fosforilan en la lamina A de tipo silvestre (véase fig. 21-16b). Como resultado, la lamina A mutante no puede fosforilarse. Vectores de expresión portadores del gen humano de tipo silvestre o mutante se transfectaron por separado en las células de hámster cultivadas. Debido a que los genes de *lamina* transfectados se expresan a niveles mucho más altos que el gen de *lamina* endógeno de hámster, la mayor parte de la lamina A producida en las células transfectadas es humana. Células transfectadas en diferentes estadios del ciclo celular se tiñeron con un anticuerpo monoclonal específico para la lamina A humana marcado con fluoresceína y con un colorante fluorescente que se une al DNA. La banda brillante de fluorescencia alrededor del perímetro del núcleo en las células en interfase teñidas para detectar lamina A humana representa lamina A polimerizada (no fosforilada) (a). En las células que expresan el tipo silvestre de lamina A humana, la tinción difusa de la lamina en todo el citoplasma en la profase y la metafase (b y c) y la ausencia de la banda periférica brillante en la metafase (c) indican la despolimerización de la lamina A. Por el contrario, no hubo despolimerización alguna de la lamina en células que expresan lamina A mutante. La tinción para DNA mostró que los cromosomas estaban condensados por completo en la metafase en las células que expresan lamina A de tipo silvestre o mutante. [De R. Heald y F. McKeon, 1990, Cell 61:579.]

Además, la fosforilación catalizada por MPF de nucleoporinas específicas (véase cap. 12) hace que los complejos de poro nucleares se disocien en subcomplejos durante la profase. De forma similar, se cree que la fosforilación de proteínas integrales de la membrana nuclear interna disminuye su afinidad por la cromatina y contribuye con la fragmentación de la envoltura nuclear. El debilitamiento de las asociaciones entre la membrana nuclear interna y la laminilla nuclear y la cromatina puede permitir que hojas de membrana nuclear interna se retraigan hacia el retículo endoplasmático, que es continuo con la membrana nuclear externa.

Varias líneas de evidencia indican que la fosforilación catalizada por MPF también tiene importancia en la condensación de los cromosomas y la formación del aparato del huso mitótico. Por ejemplo, en experimentos genéticos realizados con la levadura de gemación *S. cerevisiae* se identificó una familia de proteínas SMC (structural *m*aintenance of *c*hromosomes, mantenimiento estructural de los cromosomas) que son necesarias para la separación normal de los cromosomas. Estas proteínas grandes (de alrededor de 1.200 aminoácidos) contienen dominios ATPasa característicos en su extremo C y regiones largas que se supone participan en estructuras enrolladas entre sí.

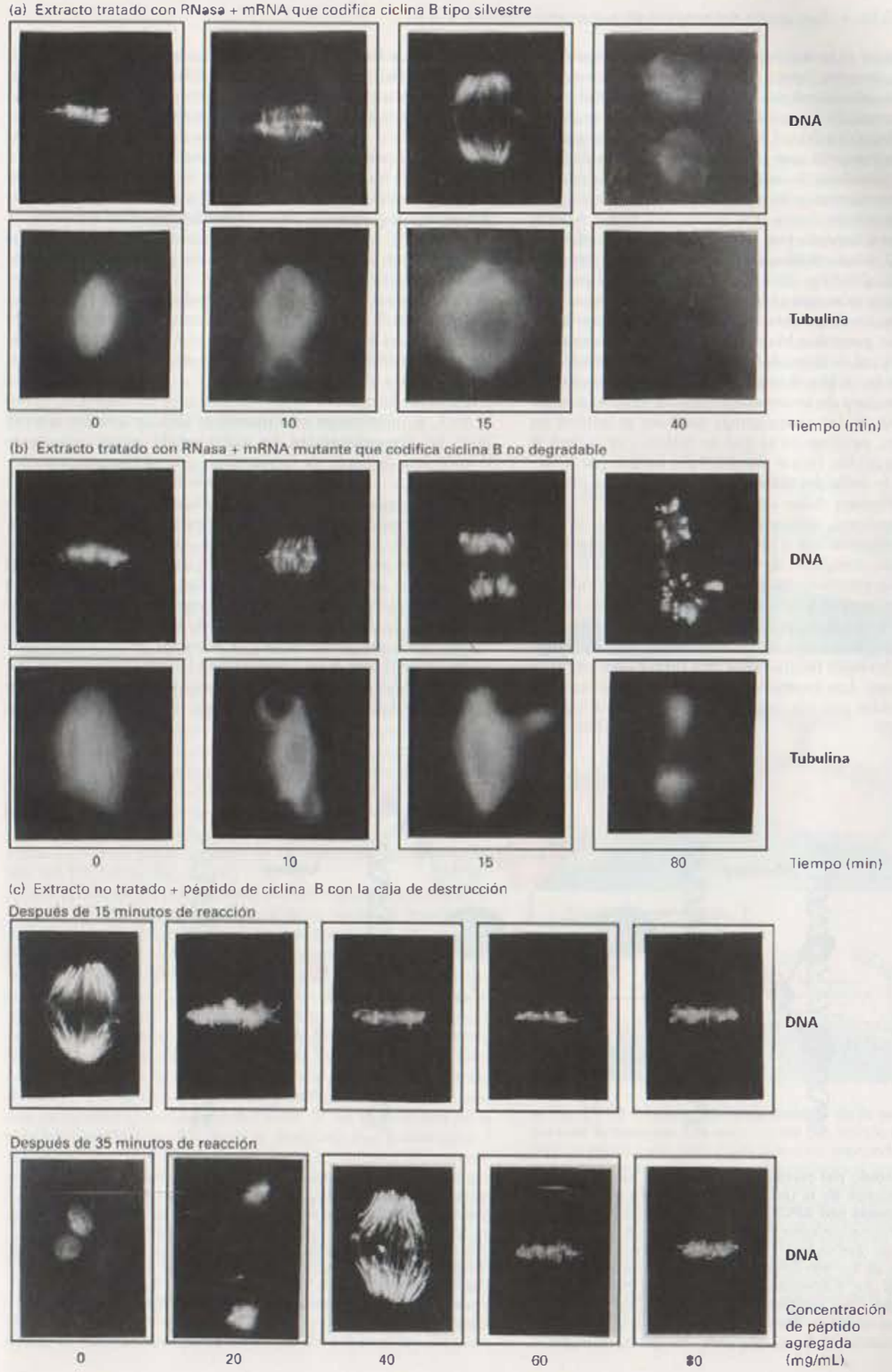
Los estudios de inmunoprecipitación con anticuerpos específicos para proteínas SMC de *Xenopus* revelaron que en extractos de huevos en ciclo algunas proteínas SMC forman parte de un complejo multiproteico llamado *condensina*, que se fosforila cuando las células entran en mitosis. Cuando los anticuerpos anti-SMC se usaron para eliminar la condensina de un extracto de huevos, éste perdió su capacidad de condensar la cromatina de espermatozoides agregados. Otros experimentos in vitro mostraron que la condensina fosforilada purificada se une al DNA y lo pliega en superhélices (véase fig. 4-7), en tanto que la no fosforilada no lo hace. Estos resultados condujeron al modelo que indica que los complejos de condensina individuales se activan por la fosforilación catalizada por MPF u otra proteincinasa regulada por el MPF. Una vez activados, los complejos de condensina se unen al DNA a intervalos a lo largo del armazón del cromosoma. Se postuló que la condensación de los cromosomas es causada por la autoasociación de los complejos unidos a través de sus dominios de espiral enrollada y por el superenrollamiento de los segmentos de DNA entre sí.

Es probable que la fosforilación de las proteínas asociadas con los microtúbulos por el MPF sea necesaria para que se produzcan los cambios espectaculares en la dinámica de los microtúbulos cuyo resultado es la formación del huso mitótico y los ásteres (cap. 20). Además, se cree que la fosforilación de las proteínas asociadas con el retículo endoplasmático (RE) y el complejo de Golgi, por el MPF u otras proteincinasas activadas por la fosforilación catalizada por MPF, altera el tránsito de vesículas entre el RE y el Golgi para favorecer el tránsito en dirección hacia el RE durante la profase. Como resultado, durante la mitosis no tiene lugar el tránsito de vesículas del RE a través del Golgi hacia la superficie celular (cap. 17), visto en las células en interfase.

La separación de las cromátidas hermanas inicia la anafase

Como se explicó, en la anafase tardía la poliubicuitinación de la ciclina mitótica por el complejo promotor de la anafase (APC) conduce a la destrucción por parte de los proteasomas de esta ciclina (véase fig. 21-10). Experimentos adicionales con extractos de huevos de *Xenopus* proporcionaron pruebas de que la degradación de la ciclina B, la ciclina mitótica del *Xenopus*, y la disminución resultante de actividad MPF son necesarias para la descondensación de los cromosomas, pero no para su separación (fig. 21-18a,b).

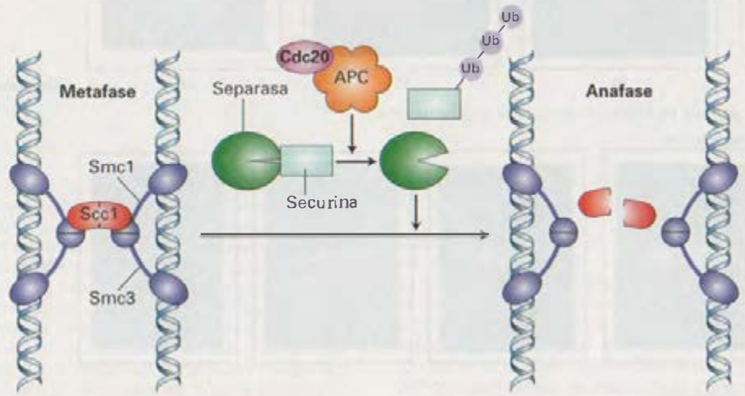
▶ FIGURA EXPERIMENTAL 21-18 El comienzo de la anafase depende de la poliubicuitinación de proteínas diferentes de la ciclina B en los extractos de huevos de *Xenopus* en ciclo. Las mezclas de reacción contenían extractos de huevos de *Xenopus* no tratados o tratados con RNasa y núcleos aislados de espermatozoides de *Xenopus*, más otros componentes indicados a continuación. Los cromosomas se visualizaron mediante un colorante fluorescente que se une al DNA. La tubulina marcada con rodamina fluorescente en las reacciones se incorporó en los microtúbulos, lo que permitió la observación del huso del aparato mitótico. (a, b) Después de que el extracto de huevos se trató con RNasa para destruir los mRNA endógenos, se agregó un inhibidor de la RNasa. Luego se agregó un mRNA que codificaba una ciclina B de tipo silvestre o una ciclina B mutante no degradable. El momento en el que los cromosomas condensados y el aparato del huso ensamblado se hicieron visibles después del agregado de núcleos de espermatozoides se designa tiempo 0. En presencia de ciclina B de tipo silvestre, los cromosomas condensados se unieron a los microtúbulos y se separaron hacia los polos del huso. Hacia los 40 minutos, el huso se había despolimerizado (por eso no es visible) y los cromosomas se habían descondensado (tinción difusa del DNA) a medida que la ciclina B se degradaba. En presencia de ciclina B no degradable (b), los cromosomas se separaron hacia los polos del huso a los 15 minutos, como en (a), pero los microtúbulos del huso no se despolimerizaron y los cromosomas no se descondensaron ni siquiera después de 80 minutos. Estas observaciones indican que la degradación de la ciclina B no es necesaria para la separación de los cromosomas durante la anafase, aunque se requiere para la despolimerización de los microtúbulos del huso y la descondensación de los cromosomas durante la telofase. (c) Se agregaron diferentes concentraciones de un péptido de ciclina B que contenía la caja de destrucción a extractos que no se habían tratado con RNasa; las muestras se tiñeron para detectar DNA a los 15 o 35 minutos después de la formación del huso del aparato. Las dos concentraciones de péptido más bajas demoraron la separación de los cromosomas y las concentraciones más altas inhibieron por completo la separación de los cromosomas. En este experimento se cree que el péptido de la ciclina B agregado inhibe competitivamente la poliubicuitinación mediada por APC de la ciclina B, así como la de otra proteína diana cuya degradación es necesaria para la separación de los cromosomas. [De S. L. Holloway y col., 1993, *Cell* 73:1393; cortesía de A. W. Murray.]



Para determinar si se necesita la degradación dependiente de ubicuitina de otra proteína para la separación de los cromosomas, los investigadores prepararon un péptido que contiene la secuencia de la caja de destrucción de la ciclina y el sitio de poliubicuitinación. Cuando este péptido se agregó a una mezcla de reacción que contenía un extracto de huevos no tratado y núcleos de espermatozoides, la descondensación de los cromosomas y, lo más interesante, el movimiento de los cromosomas hacia los polos del huso, fueron retrasados en gran medida por concentraciones del péptido de 20 a 40 µg/mL y fueron bloqueados por completo por concentraciones más altas (fig. 21-18c). Se piensa que el péptido con caja de destrucción agregado en exceso actúa como sustrato para el sistema de poliubicuitinación dirigido por APC, y compite con las proteínas blanco endógenas normales para demorar o evitar así su degradación por los proteasomas. La competición por la ciclina B explica la inhibición observada de la descondensación de los cromosomas. La observación de que la separación de los cromosomas también se inhibió en este experimento, pero no en el que se realizó con ciclina B mutante no degradable (véase fig. 21-18b) indica que la separación depende de la degradación por parte de los proteasomas de una proteína diana diferente.

Como se mencionó, cada cromátida hermana de un cromosoma en metafase se une a los microtúbulos por medio de su cinetocoro, un complejo de proteínas ensamblado en el centrómero. Los extremos opuestos de estos microtúbulos de cinetocoro se asocian con uno de los polos del huso (véase fig. 20-31). En la metafase, el huso está en un estado de tensión, con fuerzas que traccionan los dos cinetocoros hacia los polos opuestos del huso balanceados por fuerzas que separan los polos del huso. Las cromátidas hermanas no se separan porque están unidas por sus centrómeros y en varios lugares a lo largo de los brazos del cromosoma por complejos multiproteicos llamados *cohesinas*. Entre las proteínas que componen los complejos de cohesina se encuentran los miembros de la familia de proteínas SMC descritos en la sección anterior. Cuando se eliminó la cohesina de extractos de huevos de *Xenopus* por tratamiento con anticuerpos específicos para las proteínas SMC de la cohesina, los extractos deplecionados pudieron replicar el DNA de los núcleos de los espermatozoides agregados, pero las cromátidas hermanas resultantes no se asociaron en forma adecuada entre sí. Estos resultados muestran que la cohesina es necesaria para las uniones cruzadas entre cromátidas hermanas.

En estudios genéticos recientes realizados con la levadura de gemación *S. cerevisiae* se llegó al modelo representado en la figura 21-19 que describe cómo el APC regula la separación de las cromátides hermanas para comenzar la anafase. Las proteínas SMC de la cohesina se unen a cada una de las cromátidas hermanas; otras subunidades de cohesina, como la *Scc1*, se unen luego a las proteínas SMC, y asocian con firmeza las dos cromátidas. La actividad de unión cruzada de la cohesina depende de la *segurina,* que se encuentra en todos los eucariontes. Antes de la anafase, la segurina se une e inhibe a la separasa, una proteasa ubicua relacionada con las proteasas caspasas que regulan la muerte celular programada (cap. 22). Una vez que todos los cinetocoros de los cromosomas se unieron a los microtúbulos del huso, el APC es dirigido por un factor de especificidad llamado *Cdc20* para generar la poliubicuitinación de la segurina, lo que produce el inicio de la anafase. (Este factor de especificidad es distinto del Cdh1, que dirige al APC a provocar poliubicuitinación en las ciclinas tipo B.) La segurina en la que se produjo la poliubicuitinación se degrada con rapidez por acción de los proteasomas, liberando así a la separasa. Libre de su inhibidor,



▲ Fig. 21-19. Modelo del control de entrada en anafase por degradación regulada de la unión cohesina entre cromátidas hermanas y mediada por APC. (*Izquierda*) El complejo multiproteico cohesina contiene SMC1 y SMC3 (violeta), proteínas diméricas que se unen al DNA de cada cromátida hermana a través de los dominios globulares de un extremo. La Scc1 (rojo) y otras dos subunidades de la cohesina (no mostradas) se unen a las proteínas SMC asociadas con cada cromátida, estableciendo de ese modo uniones cruzadas entre las cromátidas. (*Centro*) Una vez que todos los cinetocoros de los cromosomas se han unido a los microtúbulos del huso, el factor de especificidad Cdc20 del APC dirige el APC a la poliubicuitinación de la segurina, que luego es degradada por los proteasomas (no mostrado). (*Derecha*) La separasa liberada se une luego a Scc1, deshaciendo la unión cruzada entre cromátidas hermanas. Para la explicación véase el texto. [Adaptado de F Uhlmann, 2001, Curr. Opin. Cell Biol. 13:754; y A. Tomans, Nature Milestones.http://www.nature.com/celldivision/milestones/full/milestone23.html]

la separasa degrada el Scc1, rompiendo la unión cruzada de proteínas entre cromátidas hermanas. Una vez rota esta unión, la fuerza de tracción hacia los polos ejercida sobre los cinetocoros puede desplazar las cromátidas hermanas hacia los polos opuestos del huso.

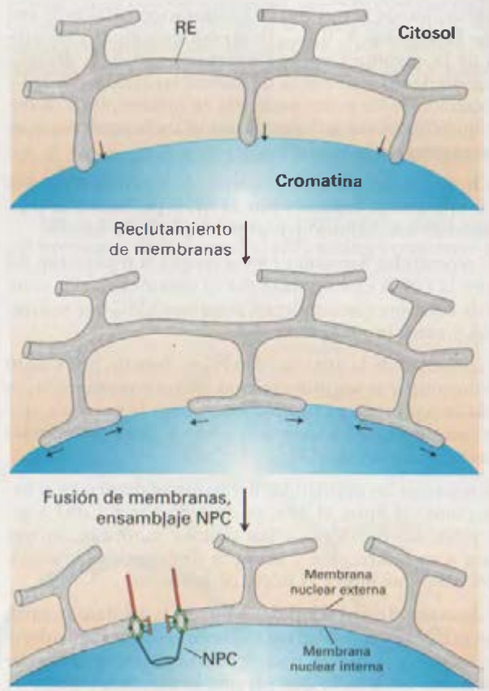
Debido a que el Cdc20, el factor de especificidad que dirige el APC hacia la segurina, se activa antes que el Cdh1, el factor de especificidad que dirige el APC a las ciclinas mitóticas, la actividad MPF no disminuye hasta después que los cromosomas se separaron (véase fig. 21-2, pasos 8 y 9). Como resultado de este orden temporal en la activación de los dos factores de especificidad del APC (Cdc20 y Cdh1), los cromosomas permanecen condensados y el reensamblaje de la envoltura nuclear no tiene lugar hasta que los cromosomas alcanzan su posición apropiada. En una sección más adelante se considerará cómo se regula el momento de activación de Cdh1.

El reensamblaje de la envoltura nuclear y la citocinesis dependen de la actividad sin oposición de una fosfatasa constitutiva

Con anterioridad se explicó la manera en que la fosforilación mediada por MPF de las laminas nucleares, nucleoporinas y proteínas de la membrana nuclear interna contribuye a la disociación de los complejos de poro nucleares y la retracción de la membrana nuclear hacia el RE rugoso. Una vez que el MPF se inactiva en la anafase tardía por la degradación de las ciclinas mitóticas, la acción sin oposición de las fosfatasas revierte la acción del MPF. Se cree que las proteínas de la membrana nuclear interna desfosforiladas se unen de nuevo a la cromatina. Como resultado se supone que múltiples proyecciones de regiones de la membrana del RE que contienen estas proteínas se asocian con la superficie de los cromosomas en descondensación y luego se fusionan entre sí para formar una membrana doble continua alrededor de cada cromosoma (fig. 21-20). Se cree que la desfosforilación de los subcomplejos de poro nuclear les permite volver a formar complejos de poro nuclear que atraviesan las membranas interna y externa poco después de la fusión de las proyecciones del RE (véase fig. 12-20).

La fusión de las proyecciones del RE representadas en la figura 21-20 tiene lugar por un mecanismo similar al descrito para la fusión de vesículas y membranas diana en la vía secretoria (véase fig. 17-11). Se demostró que proteínas con actividades similares a las del NSF y α-SNAP de la vía secretoria funcionan en la fusión de vesículas de la envoltura nuclear producidas de manera experimental in vitro y se supone que median la fusión de las proyecciones del RE alrededor de los cromosomas durante la telofase en la célula intacta. Estas mismas proteínas también funcionan en la fusión que vuelve a ensamblar el aparato de Golgi. No se identificaron las proteínas SNARE asociadas con membranas, que dirigen la fusión de las extensiones de la envoltura nuclear del RE, pero se demostró que la sintaxina 5 funciona como la V-SNARE y la T-SNARE durante el reensamblaje del Golgi. Durante la fusión de vesículas de la envoltura nuclear in vitro, la misma Ran GTPasa que funciona en el transporte a través de los complejos de poro nucleares (cap. 12) funciona de forma similar a las Rab GTPasas en la fusión de vesículas de la vía secretoria. Debido a que el factor de intercambio de nucleótidos de guanosina específico de Ran (Ran-GEF) se asocia con la cromatina, se produce una concentración local alta de Ran-GTP alrededor de los cromosomas, que dirige las fusiones de la membrana en la superficie del cromosoma. El reensamblaje de las envolturas nucleares que contienen complejos de poro nuclear alrededor de cada cromosoma forma mininúcleos individuales, llamados *cariómeros* (véase fig. 21-20). La fusión posterior de los cariómeros asociados con cada polo del huso genera los dos núcleos de las células hijas, cada uno de los cuales contiene un juego completo de cromosomas. Las laminas A y C desfosforiladas parecen importarse a través de los complejos de poro nuclear vueltos a formar durante este período y se vuelven a organizar en una laminilla nuclear nueva. Es probable que el reensamblaje de la laminilla nuclear en los núcleos hijos se comience sobre las moléculas de lamina B que permanecen asociadas a la membrana del RE por medio de su ancla de isoprenilo a lo largo de la mitosis y quedan ubicadas en la membrana interna de las envolturas nucleares nuevas que se vuelven a formar a partir de los cariómeros.

Durante la citocinesis, el paso final de la división celular, los filamentos de actina y miosina que componen el anillo contráctil se deslizan unos sobre otros para formar un surco



▲ Fig. 21-20. Modelo del reensamblaje de la envoltura nuclear durante la telofase. Las extensiones del retículo endoplasmático (RE) se asocian con cada cromosoma en descondensación y luego se fusionan entre sí, formando una membrana doble alrededor del cromosoma. Los subcomplejos de poro nuclear vuelven a formar los poros nucleares, generando mininúcleos individuales llamados cariómeros. El cromosoma incluido se descondensa aún más y la fusión posterior de todas las envolturas nucleares de los cariómeros en cada polo del huso forma un solo núcleo que contiene un juego completo de cromosomas. El reensamblaje de la laminilla nuclear no se muestra. [Adaptado de B. Burke y J. Ellenberg, 2002, Nature Rev. Mol. Cell Biol. 3:487]

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Dinámica de la envoltura nuclear durante la mitosis

de división de diámetro continuamente decreciente (véase fig. 19-20). Cuando la actividad del MPF aumenta al principio de la mitosis, fosforila la cadena liviana reguladora de la miosina e inhibe así la capacidad de la miosina de asociarse con filamentos de actina. La inactivación del MPF al final de la anafase permite que las proteinfosfatasas desfosforilen la cadena liviana de la miosina (véase fig. 20-42). Como resultado, la maquinaria contráctil se activa, el surco de división puede formarse y la citocinesis tiene lugar. Este mecanismo regulador asegura que la citocinesis no se produzca hasta que los cromosomas hijos se hayan separado lo suficiente hacia los polos opuestos como para asegurar que cada célula hija reciba el número apropiado de cromosomas.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 21.4

Mecanismos moleculares de regulación de los eventos mitóticos

- Al principio de la mitosis, la fosforilación catalizada por MPF de las laminas A, B y C, de las nucleoporinas y las proteínas de la envoltura nuclear internas produce la despolimerización de los filamentos de lamina (véase fig. 21-16) y la disociación de los poros nucleares en subcomplejos de poro, lo que conduce a la fragmentación de la envoltura nuclear y su retracción en el RE.
- La fosforilación de los complejos de condensina por el MPF o una cinasa regulada por el MPF promueve la condensación de los cromosomas al principio de la mitosis.
- Las cromátidas hermanas formadas por la replicación del DNA en la fase S están unidas por el centrómero por complejos de cohesina que contienen proteínas SMC que se unen al DNA y otras proteínas.
- Al comienzo de la anafase, el APC es dirigido por Cdc20 a poliubicuitinar la segurina la cual, como consecuencia, es degradada por los proteasomas. Esto activa la separasa, que divide una subunidad de cohesina y libera así las cromátidas hermanas (véase fig. 21-19).
- Después que las cromátidas hermanas se desplazaron hacia los polos del huso, el APC es dirigido por el Cdh1 a generar poliubicuitinación en las ciclinas mitóticas, lo que conduce a su destrucción y causa la disminución de actividad del MPF que marca el inicio de la telofase.
- El descenso de actividad del MPF en la telofase permite que las fosfatasas constitutivas eliminen fosfatos reguladores de la condensina, laminas, nucleoporinas y otras proteínas de la membrana nuclear, lo que permite la descondensación de los cromosomas y el reensamblaje de la membrana nuclear, de la laminilla nuclear y los complejos de poro nucleares.
- La asociación del Ran-GEF con la cromatina produce una alta concentración local de Ran. GTP cerca de los cromosomas que se descondensan, y estimulan la fusión de las extensiones de la envoltura nuclear provenientes del RE alrededor de cada cromosoma. Esto forma cariómeros que luego se fusionan para generar los núcleos celulares hijos (véase fig. 21-20).
- El descenso en la actividad MPF también elimina su inhibición sobre la cadena liviana de la miosina, lo que permite que se forme el surco de división y tenga lugar la citocinesis.

21.5 Estudios genéticos con *S. cerevisiae*

En la mayor parte de las células de vertebrados la decisión clave para determinar si una célula se dividirá o no es la de entrar en fase S. En la mayoría de los casos, una vez que una célula de vertebrado está comprometida para entrar en fase S, lo hace unas pocas horas después y avanza a través del resto del ciclo celular hasta terminar la mitosis. Las células de *S. cerevisiae* regulan su proliferación de forma similar, y gran parte de nuestro conocimiento actual de los mecanismos moleculares que controlan la entrada en fase S y del control de la replicación del DNA proviene de los estudios genéticos realizados con *S. cerevisiae*.

Las células de *S. cerevisiae* se reproducen por brotación (fig. 21-21). Tanto la célula madre como la hija permanecen en el período G_1 del ciclo celular mientras crecen, aunque las células madre, al inicio más grandes, necesitan un tiempo más breve para alcanzar un tamaño compatible con la división celular. Cuando las células de *S. cerevisiae* en G_1 crecieron lo suficiente, empiezan un programa de expresión genética que conduce a la entrada en la fase S. Si las células en G_1 se pasan de un medio abundante en nutrientes a otro en el que éstos escasean antes de que alcancen un tamaño crítico, las células permanecen en G_1 y crecen con lentitud hasta que son lo bastante grandes como para entrar en la fase S. Sin embargo, una vez que las células en G_1 alcanzan el tamaño crítico, están destinadas a completar el ciclo celular, entran en fase S y continúan a través de G_2 y la mitosis, aun cuando se transfieran a un medio con bajo contenido de nutrientes. El punto del final del período G_1 en el que las células de *S. cerevisiae* en crecimiento quedan determinadas irreversiblemente para ingresar en la fase S y desarrollar el ciclo celular se llama punto de inicio (START). Como se verá en la sección 21.6, en las células de mamíferos en división se produce un fenómeno comparable.

Una cinasa dependiente de ciclina (CDK) es fundamental para la entrada en fase S de *S. cerevisiae*

Todas las células de *S. cerevisiae* que portan una mutación en un gen *cdc* particular se detienen en el mismo tamaño de brote a la temperatura no permisiva (véase fig. 9-6b). Cada tipo de mutante tiene un fenotipo terminal con un tamaño de brote particular: ningún brote (*cdc28*), brotes de tamaño intermedio o brotes grandes (*cdc7*). Nótese que en *S. cerevisiae* los genes de tipo silvestre se escriben con letras mayúsculas en cursiva (p. ej., *CDC28*) y los genes mutantes recesivos en minúsculas en cursiva (p. ej., *cdc28*); las proteínas del tipo silvestre correspondientes se escriben en tipo romano con una mayúscula inicial (p. ej., Cdc28), de forma similar a las proteínas de *S. pombe*.

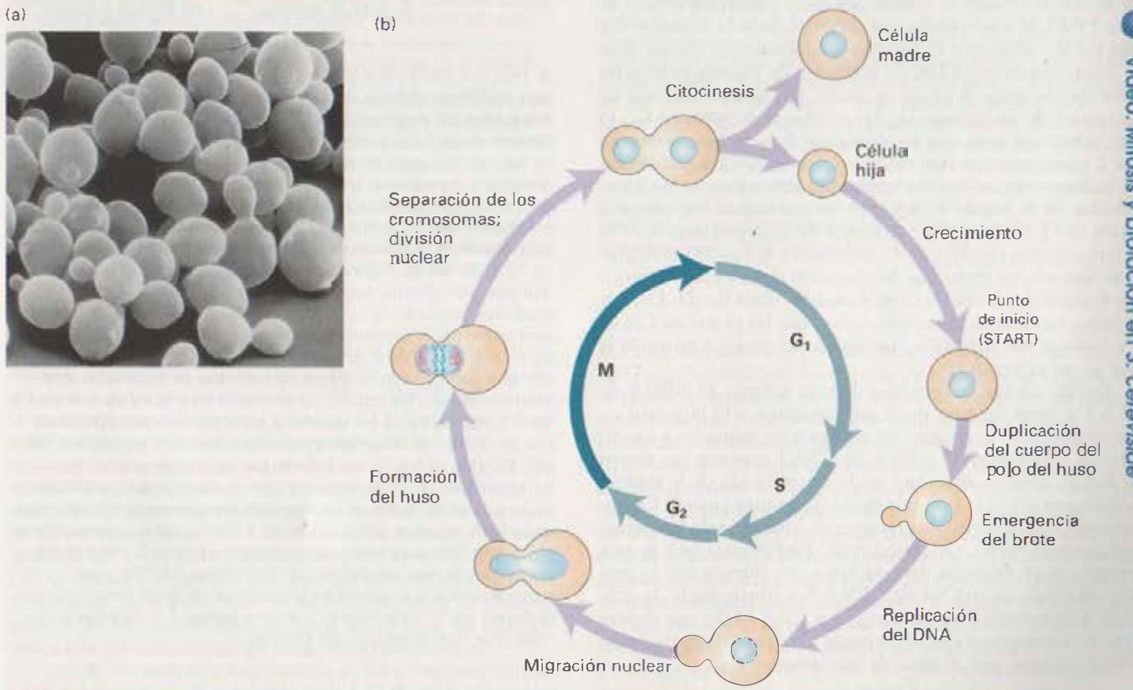
El comportamiento fenotípico de las mutantes *cdc28* sensibles a la temperatura indica que la función de Cdc28 es crítica para la entrada en la fase S. Cuando estas mutantes se pasan a la temperatura no permisiva, se comportan como células del tipo silvestre privadas de nutrientes en forma súbita. Esto es, las células mutantes *cdc28* que crecieron hasta un tamaño suficiente para pasar el punto de inicio en el momento del cambio de temperatura continúan a través del ciclo celular con normalidad y sufren mitosis, en tanto que las que son demasiado pequeñas para haber pasado el punto de inicio cuando se pasan a la temperatura no permisiva no entran en fase S aunque los nutrientes sean abundantes. Por más que las células *cdc28* bloqueadas en fase G_1 continúen aumentando de tamaño a la temperatura no permisiva, no pueden pasar el punto de inicio ni entrar en la fase S. Por consiguiente, aparecen como células grandes sin brotes.

El gen de tipo salvaje *CDC28* se aisló por su capacidad de complementar las células *cdc28* mutantes a la temperatura no permisiva (véase fig. 21-4). La determinación de la secuencia de *CDC28* mostró que la proteína codificada es homóloga a las proteincinasas conocidas, y cuando la proteína Cdc28 se expresó en *E. coli*, mostró actividad de proteincinasa. En realidad, la Cdc28 de *S. cerevisiae* fue la primera proteína del ciclo celular que se demostró que es una proteincinasa. Con ulterioridad, se encontró que el gen de tipo silvestre *cdc2*$^+$ de *S. pombe* tiene homología con el gen *CDC28* de *S. cerevisiae* y las dos proteínas codificadas, Cdc2 y Cdc28, eran análogas desde el punto de vista funcional. Cada tipo de levadura contiene una *sola* proteincinasa dependiente de ciclina (CDK), cada una de las cuales puede ser sustituida por la otra: Cdc2 en *S. pombe* y Cdc28 en *S. cerevisiae* (véase cuadro 21-1).

La diferencia en los fenotipos mutantes de las células *cdc2*- de *S. pombe* y las *cdc28* de *S. cerevisiae* puede explicarse en términos de la fisiología de las dos levaduras. En las células de *S. pombe* que crecen en medios de cultivo con abundantes nutrientes, el control del ciclo celular se ejerce sobre todo en la transición $G_1 \rightarrow M$ (o sea, en la entrada en la mitosis). En muchas mutantes *cdc2*$^-$, incluidas las aisladas primero, se mantiene bastante actividad de Cdc2 a la temperatura no permisiva como para permitir que las células entren en fase S, pero no la suficiente para permitir la entrada en mitosis. Se observa que estas células mutantes son células alargadas, detenidas en G_2. A la temperatura no permisiva, los cultivos de mutantes *cdc2*$^-$ defectuosos por completo implican algunas células detenidas en G_1 y otras detenidas en G_2, en función de su situación en el ciclo celular en el momento del cambio de temperatura. Por el contrario, la regulación del ciclo celular en *S. cerevisiae* se hace en primer término sobre la transición $G_1 \rightarrow S$ (o sea la entrada en la fase S). Por consiguiente, las células *cdc28* parcialmente defectuosas se detienen en G_1, pero las que lo son por completo se detienen en G_1 o G_2. Estas observaciones demuestran que las CDK de *S. pombe* y *S. cerevisiae* son necesarias para la entrada en la fase S y la mitosis.

Tres ciclinas de G_1 se asocian con la CDK de *S. cerevisiae* para formar factores promotores de fase S

Hacia fines de la década de 1980 estaba claro que el factor promotor de la mitosis (MPF) estaba compuesto por dos



▶ **Fig. 21-21. La levadura brotante *S. cerevisiae*.** (a) Microfotografía electrónica de barrido de células de *S. cerevisiae* en diferentes estadios del ciclo celular. Cuanto más grande es el brote, que surge al final de la fase G_1, más avanzada está la célula en el ciclo. (b) Eventos principales del ciclo celular de *S. cerevisiae*. Las células hijas nacen más pequeñas que las madres y deben crecer hasta un tamaño mayor en G_1 antes de que tengan el tamaño suficiente como para entrar en la fase S. Como sucede en *S. pombe*, la envoltura nuclear no se fragmenta durante la mitosis. A diferencia de los cromosomas de *S. pombe*, los pequeños cromosomas de *S. cerevisiae* no se condensan lo suficiente como para ser visibles por microscopia óptica. [Parte (a) cortesía de E. Schachtbach e I. Herskowitz.]

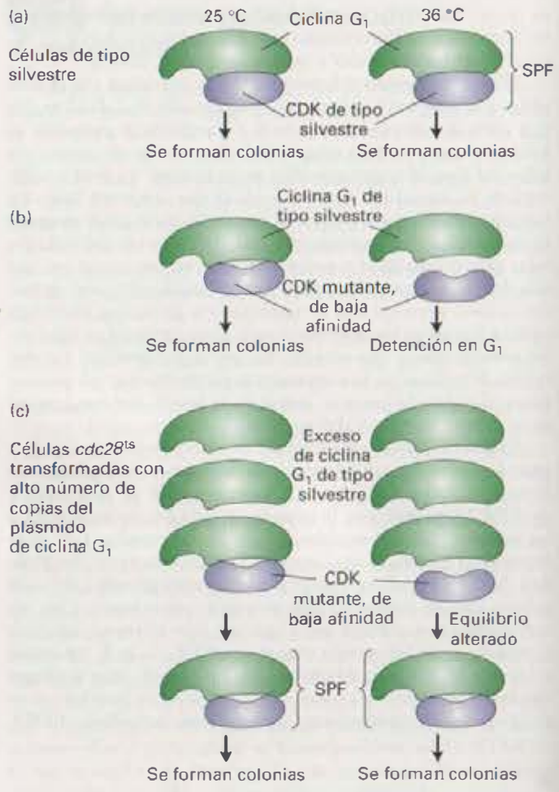
TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Mitosis y brotación en *S. cerevisiae*

subunidades: una CDK y una ciclina de tipo B mitótica necesaria para activar la subunidad catalizadora. Por analogía, parecía probable que *S. cerevisiae* contuviera un factor promotor de fase S (SPF) que fosforilaba y regulaba las proteínas necesarias para la síntesis de DNA. Por similitud con el MPF, se postuló que el SPF era un heterodímero compuesto por CDK de *S. cerevisiae* y una ciclina, en este caso una que actuaba en G_1 (véase fig. 21-2, pasos 2 a 4).

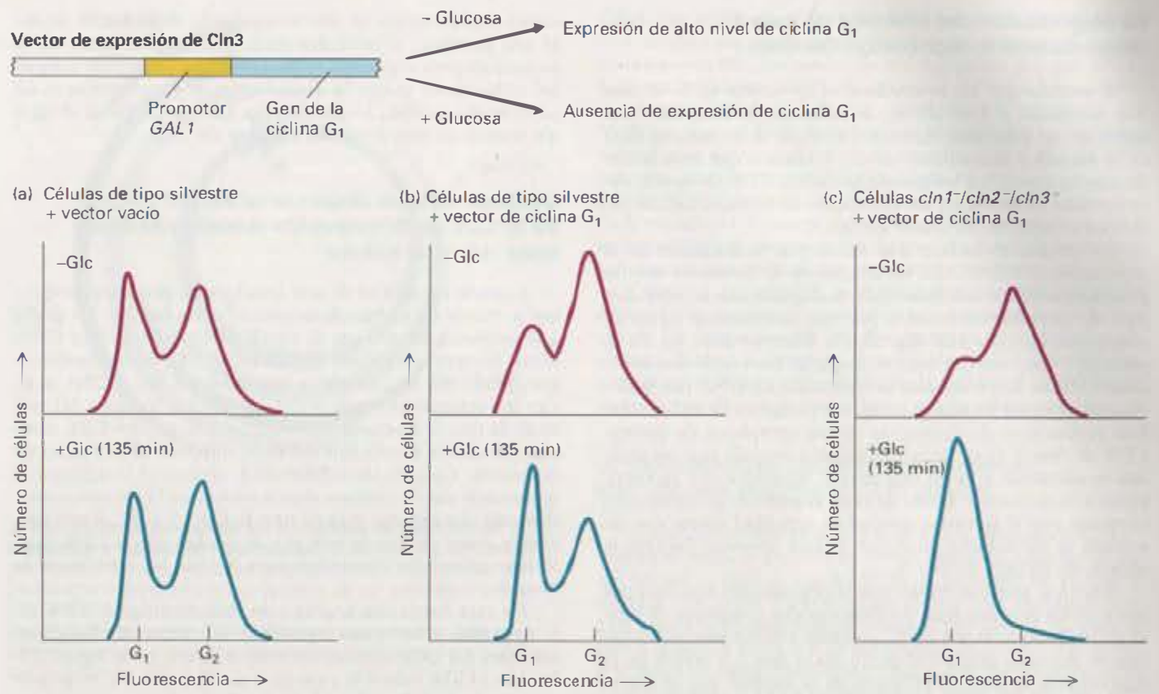
Para identificar esta supuesta ciclina de G_1, los investigadores buscaron genes que, cuando se expresaban en concentraciones altas, podían suprimir ciertas mutaciones sensibles a la temperatura de la CDK de *S. cerevisiae*. En la figura 21-22 se ilustra la base racional de este enfoque. Los investigadores aislaron dos de estos genes, denominados *CLN1* y *CLN2*. Mediante un enfoque diferente, otros investigadores identificaron una mutación dominante en un tercer gen, llamado *CLN3*. La determinación de la secuencia de los tres genes *CLN* mostró que codificaban proteínas relacionadas, cada una de las cuales incluía una región de alrededor de 100 residuos que mostraba homología importante con las ciclinas del tipo B del erizo de mar, *Xenopus*, el hombre y *S. pombe*. Esta región codifica el dominio de la ciclina que interactúa con las CDK y está incluido en el dominio de la ciclina A humana mostrado en la figura 21-15b, c. El hallazgo de que las tres proteínas Cln contienen esta región de homología con las ciclinas mitóticas sugirió que eran las tan buscadas ciclinas G_1 de *S. cerevisiae*. (Nótese que los dominios homólogos de unión a CDK encontrados en las diferentes ciclinas difieren en la caja de destrucción mencionada antes, que sólo se encuentra en las ciclinas del tipo B.)

Experimentos de desactivación genética (*knockout*) mostraron que las células de *S. cerevisiae* pueden crecer en un medio abundante en nutrientes si poseen cualquiera de los tres genes de ciclina G_1. Como lo indican los datos presentados en la figura 21-23, la superproducción de una ciclina G_1 disminuye la fracción de células en G_1, lo que demuestra que niveles altos de complejos ciclina-CDK G_1 conducen de manera prematura a las células hacia el punto de inicio. Es más, en ausencia de cualquiera de las ciclinas G_1, las células se detienen en G_1, lo que indica que para que las células de *S. cerevisiae* entren en fase S es necesario un heterodímero ciclina G_1-CDK, o SPF. Estos hallazgos recuerdan los resultados obtenidos con la ciclina mitótica de *S. pombe* (Cdc13) en lo que respecta al pasaje a través de G_2 y la entrada en mitosis. La superproducción de la ciclina mitótica produjo un G_2 acortado y la entrada prematura en mitosis, en tanto que la inhibición de la ciclina mitótica por mutación produjo un G_2 prolongado (véase fig. 21-12). Por lo tanto, estos resultados confirmaron que las proteínas Cln de *S. cerevisiae* son *ciclinas* G_1 que regulan el pasaje a través de la fase G_1 del ciclo celular.

En las células de levadura de tipo salvaje, el mRNA de *CLN3* se produce a un nivel casi constante a lo largo del ciclo celular, pero su traducción se regula en respuesta a los niveles de nutrientes. El mRNA de *CLN3* contiene un marco de lectura abierto corto que inhibe la iniciación de la traducción de este mRNA. Esta inhibición disminuye cuando los nutrientes y, por lo tanto, los factores de iniciación de la traducción se encuentran en abundancia. Dado que Cln3 es una proteína muy inestable, su concentración fluctúa con la tasa de traducción del mRNA de *CLN3*. Por consiguiente, la cantidad y la actividad de los complejos Cln3-CDK, que dependen de la concentración de proteína Cln3, están reguladas en primer término por el nivel de nutrientes.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 21-22 Se identificaron dos genes que codifican ciclinas de G_1 de *S. cerevisiae* por su capacidad de suprimir una CDK mutante sensible a la temperatura. Este rastreo genético se basa en las diferencias de las interacciones entre las ciclinas G_1 con CDK de tipo silvestre y sensibles a temperatura (ts) de *S. cerevisiae*. (a) Las células de tipo silvestre producen una CDK normal que se asocia con las ciclinas G_1 formando el factor promotor de fase S (SPF) activo, tanto a temperatura permisiva como no permisiva (o sea, 25 °C y 36 °C). (b) Algunas mutantes *cdc28*^{ts} expresan una CDK mutante con afinidad baja por la ciclina G_1 a 36 °C. Estas mutantes producen la suficiente ciclina-CDK (SPF) de G_1 como para estimular el crecimiento y el desarrollo de colonias a 25 °C, pero no a 36 °C. (c) Cuando las células *cdc28*^{ts} se transformaron con una genoteca de *S. cerevisiae* clonada en plásmidos con elevado número de copias, se formaron tres tipos de colonias a 36 °C: una contenía un plásmido portador del gen *CDC28* de tipo silvestre; las otras dos contenían plásmidos portadores del gen *CLN1* o *CLN2*. En las células transformadas portadoras del gen *CLN1* o *CLN2*, la concentración de ciclina G_1 codificada es lo suficientemente alta como para compensar la baja afinidad de la CDK mutante por la ciclina G_1 a 36 °C, por lo que se forma suficiente SPF para estimular la entrada en fase S y la mitosis consecuente. Las células no transformadas *cdc28ts* y las transformadas con plásmidos portadoras de otros genes se detienen en G_1 y no forman colonias. [Véase J. A. Hadwiger y col., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6255.]



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 21-23 La sobreexpresión de ciclina G_1 impulsa en forma prematura las células de *S. cerevisiae* a la fase S. El vector de expresión de levadura usado en estos experimentos (*arriba*) era portador de uno de los tres genes de ciclina G_1 de *S. cerevisiae* unido al fuerte promotor *GAL1*, que se inhibe cuando hay glucosa presente en el medio. Para determinar la proporción de células en G_1 y G_2 se expusieron las células a un colorante fluorescente que se une al DNA y luego se pasaron a través de un clasificador de células activadas por fluorescencia (véase fig. 5-34). Dado que el contenido de DNA de las células en G_2 es el doble del de las células en G_1, este procedimiento puede diferenciar las células en las dos fases del ciclo celular. (a) Células de tipo silvestre transformadas con un vector de expresión vacío mostraron una distribución normal de células en G_1 y G_2 en ausencia de glucosa (Glc) y después del agregado de glucosa. (b) En ausencia de glucosa, las células de tipo silvestre transformadas con el vector de expresión de ciclina G_1 mostraron un porcentaje superior al normal de células en fase S y G_2 porque la sobreexpresión de la ciclina G_1 disminuyó la duración del período G_1 (curva superior). Cuando la expresión del vector de ciclina G_1 se eliminó por el agregado de glucosa, la distribución celular volvió a la normalidad (curva inferior). (c) Las células con mutaciones en los tres genes de ciclina G_1 y transformadas con el vector de expresión de ciclina G_1 también mostraron un porcentaje alto de células en fases S y G_2 en ausencia de glucosa (curva superior). Es más, cuando la expresión del vector de ciclina se eliminó por el agregado de glucosa, las células completaron el ciclo celular y se detuvieron en G_1 (curva inferior), lo que indica que se necesita una ciclina G_1 para la entrada en fase S. [Adaptado de H. E. Richardson y col., 1988, *Cell* 59:1127.]

Una vez que se sintetiza suficiente Cln3 a partir de su mRNA, el complejo Cln3-CDK fosforila y activa dos factores de transcripción relacionados, SBF y MBF. Éstos inducen la transcripción de los genes *CLN1* y *CLN2*, y las proteínas codificadas por ellos aceleran la entrada en la fase S. Por lo tanto, se cree que la regulación de la traducción del mRNA de CLN3 en respuesta a la concentración de nutrientes en el medio es el responsable principal del control de la duración de G_1 en *S. cerevisiae*. SBF y MBF también estimulan la transcripción de otros genes necesarios para la replicación del DNA, como los genes que codifican las subunidades de DNA polimerasa, las subunidades de RPA (la proteína de unión a ssDNA de los eucariontes), la ligasa de DNA y las enzimas necesarias para la síntesis de desoxirribonucleótidos.

Uno de los sustratos importantes de los complejos ciclina-CDK del final de G_1 (Cln1-CDK y Cln2-CDK en *S. cerevisiae*) es Cdh1. Recordemos que este factor de especificidad dirige el APC a poliubicuitinar las ciclinas de tipo B durante la anafase tardía de la mitosis previa, marcando estas ciclinas para la proteólisis por parte de los proteasomas (véase fig. 21-10). El factor de transcripción MBF activado por el complejo Cln3-CDK también estimula la transcripción de *CLB5* y *CLB6*, que codifican ciclinas de tipo *B*, de donde proviene su nombre. Debido a que los complejos formados entre estas ciclinas de tipo B y la CDK de *S. cerevisiae* son necesarios para la iniciación de la síntesis de DNA, las proteínas Clb5 y Clb6 se llaman *ciclinas de fase S*. La inactivación del APC al principio de G_1 permite que los complejos ciclina-CDK de fase S se acumulen al final de G_1. El factor de especificidad Cdh1 se fosforila e inactiva tanto por los complejos de final de G_1 como por los de ciclina tipo B-CDK, y por lo tanto permanece inhibido a través de las fases S, G_2 y M hasta la anafase tardía.

La degradación del inhibidor de fase S desencadena la replicación del DNA

A medida que los heterodímeros de ciclina-CDK de fase S se acumulan al final de G_1, se inactivan de inmediato por unión de un inhibidor, llamado *Sic1*, que se expresa al final de la mitosis y al comienzo de G_1. Debido a que Sic1 inhibe de manera específica los complejos ciclina-CDK de tipo B, pero no tiene efecto sobre los complejos de ciclina-CDK de G_1, funciona como un *inhibidor de fase S*.

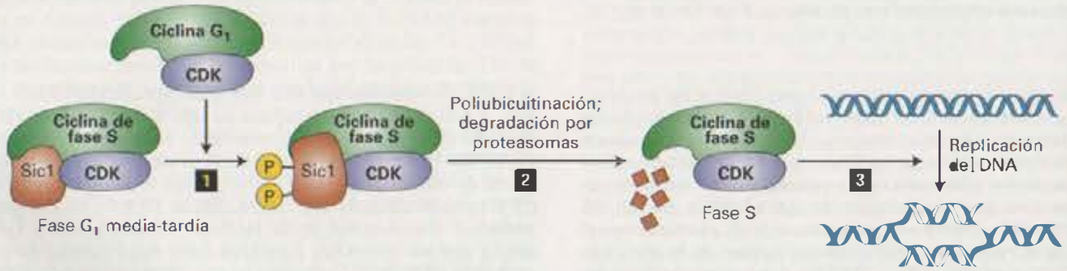
La entrada en la fase S se define por la iniciación de la replicación del DNA. En las células de *S. cerevisiae* esto se produce cuando el inhibidor Sic1 se degrada con rapidez después de su poliubicuitinación por una determinada ligasa de ubicuitina, llamada *SCF* (fig. 21-24; véase también fig. 21-2, paso 5). Una vez que Sic1 se degradó, los complejos de ciclina-CDK de fase S inducen la replicación de DNA por fosforilación de varias proteínas unidas a los orígenes de replicación. Este mecanismo de activación de los complejos de ciclina-CDK de fase S (o es decir inhibirlos a medida que las ciclinas se sintetizan y luego degradar el inhibidor con rapidez), permite la activación súbita de gran número de complejos, en contraste con el aumento gradual de actividad cinasa que resultaría si no hubiera inhibidor alguno presente durante la síntesis de ciclinas de fase S.

Ahora se puede entender que la degradación regulada por parte de los proteasomas, dirigida por dos complejos de ligasa de ubicuitina, SCF y APC, controla tres transiciones principales del ciclo celular: el inicio de la fase S a través de la degradación de Sic1, el principio de la anafase por la degradación de la segurina y la salida de la mitosis mediante la degradación de ciclinas de tipo B. El APC se dirige a generar poliubicuitinación de la segurina, que funciona como un inhibidor de la anafase, por el factor de especificidad Cdc20 (véase fig. 21-19). Otro factor de especificidad, Cdh1, dirige al APC a las ciclinas tipo B (véase fig. 21-10). El SCF se dirige a la poliubicuitinación del Sic1 por un mecanismo diferente, como es la fosforilación de Sic1 por un complejo ciclina-CDK de G_1 (véase fig. 21-24). Es probable que esta diferencia de estrategia se produzca porque el APC tiene varios sustratos, como la segurina y las ciclinas de tipo B, que deben degradarse en momentos diferentes del ciclo. Por el contrario, la entrada en fase S requiere la degradación de solo una proteína, el inhibidor Sic1. Una ventaja obvia de la proteólisis para controlar el pasaje por estos puntos críticos del ciclo celular es que la degradación de las proteínas es un proceso irreversible, lo que asegura que las células se dirigen sin retorno en una dirección a través del ciclo.

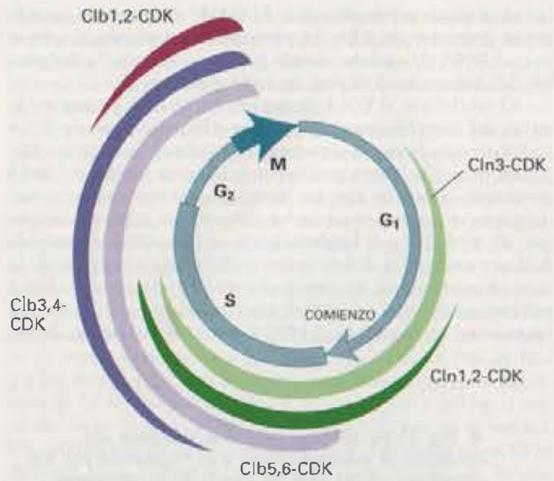
Múltiples ciclinas dirigen la actividad cinasa de la CDK de *S. cerevisiae* durante diferentes fases del ciclo celular

Cuando las células de una levadura de gemación progresan a través de la fase S, empiezan a transcribir los genes que codifican dos ciclinas de tipo B adicionales, Clb3 y Clb4. Éstas forman complejos de ciclina-CDK heterodiméricos que, junto con los complejos que poseen Clb5 y Clb6, activan los orígenes de replicación del DNA a lo largo del resto de la fase S. Los complejos Clb3-CDK y Clb4-CDK también inician la formación del huso mitótico al principio de la mitosis. Cuando las células de *S. cerevisiae* completan la replicación de los cromosomas y entran en G_2, comienzan a expresar dos ciclinas más de tipo B, Clb1 y Clb2. Éstas funcionan como ciclinas mitóticas y se asocian con la CDK para formar complejos necesarios para mediar los sucesos de la mitosis.

De esta forma, cada grupo de ciclinas dirige la CDK de *S. cerevisiae* a funciones específicas asociadas con las diversas fases del ciclo celular, como se muestra en la figura 21-25. Cln3-CDK induce la expresión de Cln1, Cln2 y otras proteínas en la mitad y el final de G_1 por fosforilación y activación de los factores de transcripción SBF y MBF. Cln1-CDK y Cln2-CDK inhiben el APC, y permiten que las ciclinas tipo B se acumulen; estas ciclinas-CDK de G_1 también activan la degradación del inhibidor de fase S Sic1. A continuación los complejos de fase S de CDK que contienen Clb5, Clb6, Clb3 y Clb4 desencadenan la síntesis de DNA. Clb3 y Clb4 también funcionan como ciclinas mitóticas, en el sentido que los complejos que ellos forman con CDK desencadenan la formación de husos mitóticos. Las dos ciclinas restantes de *S. cerevisiae*, Clb1 y Clb2, cuyas concentraciones alcanzan el nivel máximo a mitad del camino hacia la mitosis, funcionan exclusivamente como ciclinas mitóticas, y forman complejos con CDK que desencadenan la separación de los cromosomas y la división nuclear (véase cuadro 21-1).



▲ Fig. 21-24. Control de la transición G_1 → fase S en *S. cerevisiae* por proteólisis regulada del inhibidor de fase S Sic1. Los complejos ciclina-CDK de fase S (Clb5-CDK y Clb6-CDK) empiezan a acumularse en G_1, pero son inhibidos por el Sic1. Esta inhibición impide la iniciación de la replicación del DNA hasta que la célula está preparada por completo. Los complejos ciclina-CDK de G_1 formados en la fase G_1 tardía (Cln1-CDK y Cln2-CDK) fosforilan a Sic1 (paso 1), marcándolo para su poliubicuitinación por la SCF ubicuitina ligasa y la degradación posterior por los proteasomas (paso 2). Los complejos ciclina-CDK de fase S activos desencadenan entonces la iniciación de la síntesis de DNA (paso 3) por fosforilación de sustratos que todavía no se identificaron. [Adaptado de R. W. King y col. 1996, Science 274:1652.]



▲ Fig. 21-25. Actividad de los complejos ciclina-CDK de *S. cerevisiae* a través del ciclo celular. El espesor de las bandas coloreadas es aproximadamente proporcional a la actividad de proteincinasa demostrada o propuesta de los complejos ciclina-CDK indicados. *S. cerevisiae* produce una sola cinasa dependiente de ciclina (CDK) cuya actividad es controlada por diversas ciclinas que se expresan durante diferentes momentos del ciclo celular.

La fosfatasa Cdc14 promueve la salida de la mitosis

Los estudios genéticos efectuados con *S. cerevisiae* proporcionaron un panorama de la manera en que se inactivan los complejos ciclina tipo B-CDK en la anafase tardía, lo que permite que tengan lugar los diversos acontecimientos que constituyen la telofase y luego la citocinesis. Estos complejos son el equivalente en *S. cerevisiae* del factor promotor de la mitosis (MPF), identificado por primera vez en los ovocitos y los embriones tempranos de *Xenopus*. Como se mencionó, el factor de especificidad Cdh1 que dirige el APC a la poliubicuitinación de las ciclinas tipo B es fosforilado tanto por los complejos G_1 tardíos como por ciclina tipo B-CDK, lo que inhibe así la actividad de Cdh1 durante el final de G_1, S, G_2 y la mitosis antes de la anafase tardía.

Cuando los cromosomas hijos se separaron de manera adecuada en la anafase tardía, la *fosfatasa Cdc14* se activa y desfosforila Cdh1, lo que permite su unión al APC. Esta interacción lleva con rapidez a la poliubicuitinación mediada por APC y a la degradación por parte de los proteasomas de las ciclinas de tipo B, y por lo tanto a la inactivación del MPF (véase fig. 21-10). Dado que éste todavía está activo cuando Cdc14 se activa por primera vez en la anafase tardía, podría competir con Cdc14 por la refosforilación de Cdh1. Sin embargo, Cdc14 también induce la expresión de Sic1 al eliminar un fosfato inhibidor presente en un factor de transcripción que activa la transcripción del gen *SIC1*. Sic1 puede unirse e inhibir la actividad de todos los complejos ciclina-CDK de tipo B. Así, al empezar la inhibición del MPF por Sic1 al final de la mitosis permite que la fosfatasa Cdc14 gane ventaja; el factor de especificidad Cdh1 de APC para las ciclinas de tipo B se desfosforila y dirige la degradación rápida de todas las ciclinas de tipo B de *S. cerevisiae*. En la sección 21.7 se verá cómo la actividad del propio Cdc14 se controla para asegurar que una célula salga de la mitosis solo cuando sus cromosomas se separaron en forma adecuada.

Como ya se describió, Sic1 también inhibe los complejos ciclina-CDK de fase S a medida que se forman hacia la mitad de G_1 (véase fig. 21-24). Por lo tanto, este inhibidor de ciclinas de tipo B tiene una función dual en el ciclo celular, lo cual contribuye con la salida de la mitosis y con el retraso en la entrada en la fase S hasta que la célula esté lista.

La replicación en cada origen comienza solo una vez durante el ciclo celular

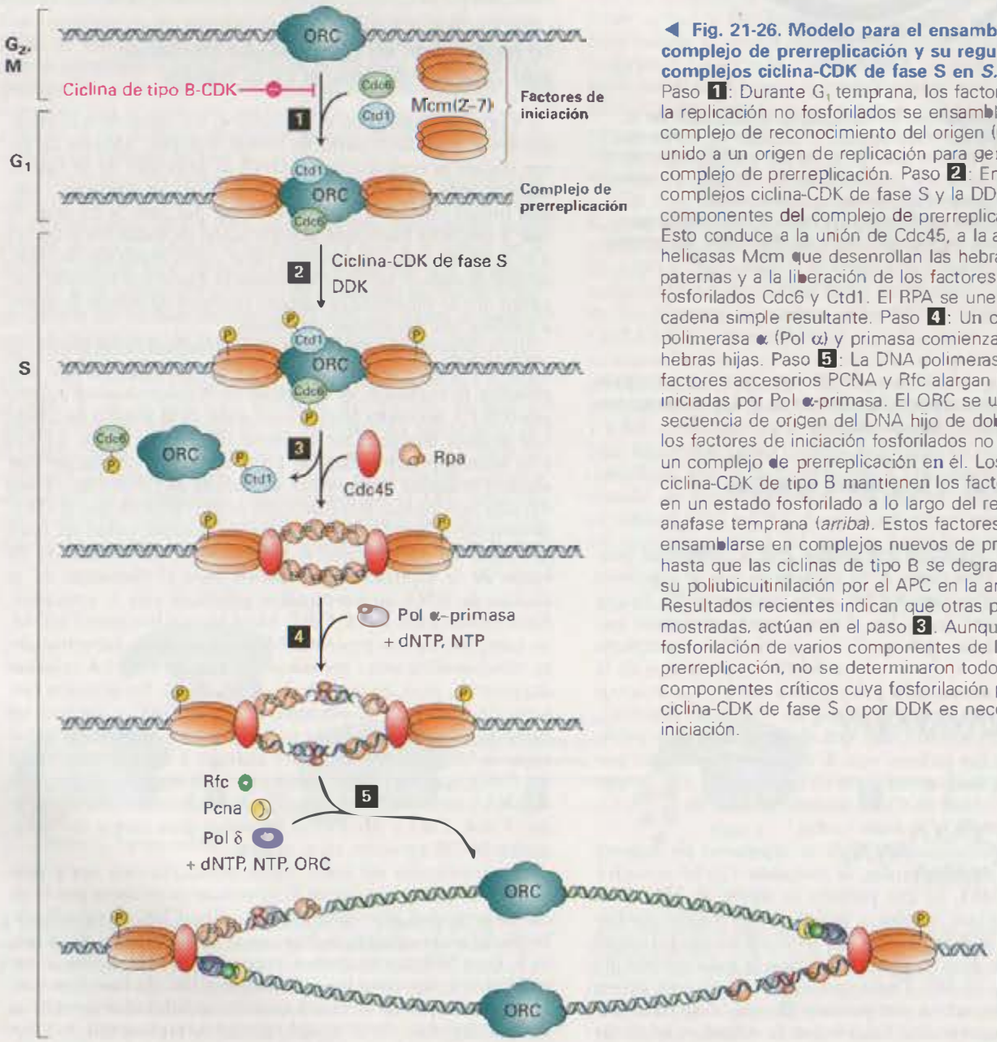
Como se explicó en el capítulo 4, los cromosomas eucariontes se replican a partir de varios orígenes. Algunos de éstos inician la replicación del DNA al principio de la fase S, algunos más tarde y otros recién al final. Sin embargo, ningún origen comienza más de una vez por fase S. Es más, la fase S continúa hasta que la replicación de todos los orígenes a lo largo de cada cromosoma tiene como resultado la replicación de todo el DNA cromosómico. Estos dos factores aseguran que se mantiene el número correcto de copias de genes a medida que las células proliferan.

Los orígenes de replicación de las levaduras contienen una secuencia básica conservada de 11-pb a la que se une una proteína hexamérica, el *complejo de reconocimiento de origen* (ORC), necesaria para la iniciación de la síntesis de DNA. Los análisis mediante footprinting con DNasa I (fig. 11-15) y la inmunoprecipitación de proteínas de la cromatina con uniones cruzadas a secuencias específicas de DNA (fig. 11-40) durante las diversas fases del ciclo celular indican que el ORC permanece asociado con los orígenes durante todas las fases del ciclo. En un principio se identificaron varios factores de inicio de la replicación necesarios para el comienzo de la síntesis de DNA en los estudios genéticos con *S. cerevisiae*. Estos factores son Cdc6, Cdt1, Mcm 10, y el hexámero MCM, un complejo de seis proteínas Mcm adicionales, estrechamente relacionadas; estas proteínas se asocian con los orígenes durante G_1, pero no durante G_2 o M. En G_1 los diversos factores de iniciación se ensamblan con el ORC y forman un *complejo de prerreplicación* en cada origen. Se cree que el hexámero MCM actúa de forma análoga a los del antígeno T del SV40, que funcionan como una helicasa para desenrollar el DNA paterno en las horquillas de replicación (véase fig. 4-36). Cdc6, Cdt1 y Mcm10 se necesitan para cargar los hexámeros MCM opuestos en el origen.

La restricción del inicio de la repliación una vez y solo una vez por ciclo celular en *S. cerevisiae* se refuerza por el ciclo de actividad alternante de las ciclina-CDK de tipo B a lo largo del ciclo celular: es baja en la telofase hasta G_1 y alta en S, G_2 y M hasta la anafase (véase fig. 21-25). Como se explicó recién, los complejos de ciclina-CDK de fase S se activan al principio de la fase S cuando su inhibidor específico, Sic1, se degrada. En el modelo actual de replicación de *S. ce-*

revisiae, los complejos de prerreplicación se forman al principio de G_1, cuando la actividad de la ciclina de tipo B es baja (fig. 21-26, paso 1). La iniciación de la replicación del DNA requiere un complejo ciclina-CDK de fase S activo y una segunda proteincinasa heterodimérica, Dbf4-Cdc7, que se expresa en G_1 (paso 2). Por analogía con las cinasas dependientes de ciclina (CDK) que deben unirse a una ciclina para activar su actividad de proteincinasa, la cinasa dependiente de Dbf4 Cdc7 a menudo se llama *DDK*. Aunque el juego completo de proteínas que debe fosforilarse para activar la iniciación de la síntesis del DNA todavía no se determinó, hay pruebas de que se necesita por lo menos la fosforilación de una subunidad de la *helicasa MCM* hexamérica y de Cdc6. Otra consecuencia de la activación del complejo ciclina-CDK de fase S es la unión del factor de iniciación Cdc45 al complejo de prerreplicación. El Cdc45 es necesario para la unión posterior de RPA, la proteína heterotrimérica que se une al DNA de cadena simple generado cuando la helicasa MCM desenrolla el dúplex de DNA paterno.

Al estabilizar el DNA desenrollado, el RPA promueve la unión del complejo entre la primasa y la polimerasa de DNA a (Pol α) que inicia la síntesis de las hebras hijas (véase fig. 21-26, paso 3). Como sucede con la helicasa MCM, el Cdc45 permanece asociado con las horquillas de replicación a medida que se extienden en ambas direcciones a partir del origen. Es probable que también actúe en los ciclos de unión de RPA y primasa-Pol α necesarios para iniciar la síntesis de la hebra hija retrasada. Se cree que la unión posterior de la DNA polimerasa δ y sus cofactores adicionales Rfc y PCNA tiene lugar como en la síntesis del DNA del SV40 (véase fig. 4-34);



◀ Fig. 21-26. Modelo para el ensamblaje del complejo de prerreplicación y su regulación por los complejos ciclina-CDK de fase S en *S. cerevisiae*. Paso 1: Durante G_1 temprana, los factores de inicio de la replicación no fosforilados se ensamblan formando un complejo de reconocimiento del origen (ORC) que está unido a un origen de replicación para generar un complejo de prerreplicación. Paso 2: En la fase S, los complejos ciclina-CDK de fase S y la DDK fosforilan los componentes del complejo de prerreplicación. Paso 3: Esto conduce a la unión de Cdc45, a la activación de las helicasas Mcm que desenrollan las hebras de DNA paternas y a la liberación de los factores de iniciación fosforilados Cdc6 y Ctd1. El RPA se une al DNA de cadena simple resultante. Paso 4: Un complejo de DNA polimerasa α (Pol α) y primasa comienza la síntesis de hebras hijas. Paso 5: La DNA polimerasa δ más sus factores accesorios PCNA y Rfc alargan las hebras hijas iniciadas por Pol α-primasa. El ORC se une a la secuencia de origen del DNA hijo de doble cadena, pero los factores de iniciación fosforilados no pueden armar un complejo de prerreplicación en él. Los complejos ciclina-CDK de tipo B mantienen los factores de iniciación en un estado fosforilado a lo largo del resto de S, G_2 y la anafase temprana (*arriba*). Estos factores no pueden ensamblarse en complejos nuevos de prerreplicación hasta que las ciclinas de tipo B se degradan después de su poliubicuitinilación por el APC en la anafase tardía. Resultados recientes indican que otras proteínas, no mostradas, actúan en el paso 3. Aunque se muestra la fosforilación de varios componentes de los complejos de prerreplicación, no se determinaron todos los componentes críticos cuya fosforilación por un complejo ciclina-CDK de fase S o por DDK es necesaria para la iniciación.

estas proteínas se necesitan para la síntesis continua de la hebra conductora y para la síntesis de la mayor parte de la hebra retrasada. Una polimerasa de DNA adicional, la Pol e, también es necesaria para la síntesis del DNA cromosómico, pero su función todavía no se conoce.

A medida que las horquillas de replicación se alejan de cada origen, es factible que las formas fosforiladas de Cdc6, Cdt1 y Mcm10 se desplacen de la cromatina. Sin embargo, los complejos ORC se unen de inmediato a la secuencia de origen del DNA hijo replicado de doble cadena y permanecen unidos durante todo el ciclo celular (véase fig. 21-26, paso 4). Los orígenes sólo pueden activarse una vez durante la fase S porque los factores de iniciación fosforilados no pueden volver a agruparse en un complejo de prerreplicación. Por consiguiente, la fosforilación de los componentes del complejo de prerreplicación por los complejos ciclina-CDK de fase S y los complejos DDK en forma simultánea, activa la iniciación de la replicación del DNA en un origen e inhibe la reiniciación de la replicación en ese origen. Como ya se señaló, los complejos ciclina-CDK de tipo B permanecen activos durante toda la fase S, G_2 y la anafase temprana, lo que mantiene el estado fosforilado de los factores de iniciación de la replicación e impide el ensamblaje de complejos nuevos de prerreplicación (paso 5).

Sólo cuando el APC desencadena la degradación de todas las ciclinas de tipo B en la anafase tardía y la telofase, la acción sin oposición de la fosfatasa elimina los fosfatos de los factores de iniciación (Cdc6, Cdt1 y Mcm10), lo que permite el ensamblaje nuevo de los complejos de prerreplicación durante G_1. Como se describió antes, la inhibición de la actividad del APC a lo largo de G_1 establece las condiciones para la acumulación de las ciclinas de fase S necesarias para el inicio de la fase S. Este mecanismo regulador tiene dos consecuencias: 1) los complejos de prerreplicación se ensamblan sólo durante G_1, cuando la actividad de los complejos ciclina-CDK de tipo B es baja, y 2) cada origen inicia la replicación sólo una vez durante la fase S, cuando la actividad de los complejos ciclina-CDK de fase S es alta. Como resultado, el DNA cromosómico se reproduce sólo una vez en cada ciclo celular.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 21.5

Estudios genéticos con *S. cerevisiae*

- *S. cerevisiae* expresa una sola proteincinasa dependiente de ciclina (CDK), codificada por *CDC28*, que interactúa con varias ciclinas diferentes durante las diversas fases del ciclo celular (véase fig. 21-25).
- Hay tres ciclinas activas en G_1: Cln1, Cln2 y Cln3. La concentración de mRNA de *CLN3* no varía en grado significativo a través del ciclo celular, pero su traducción se regula por la disponibilidad de nutrientes.
- Una vez que los complejos Cln3-CDK activos se acumulan hacia la mitad y el final de G_1, fosforilan y activan dos factores de transcripción que estimulan la expresión de Cln1 y Cln2, de enzimas y otras proteínas necesarias para la replicación del DNA, y de las ciclinas de tipo B de fase S Clb5 y Clb6.
- Los complejos ciclina-CDK de G_1 tardío (Cln1-CDK y Cln2-CDK) fosforilan e inhiben a Cdh1, el factor de especificidad que dirige el complejo promotor de la anafase (APC) hacia las ciclinas tipo B, lo que permite la acumulación de ciclinas tipo B de fase S.
- Los complejos ciclina-CDK de fase S son inhibidos al inicio por Sic1. La poliubicuitinación de Sic1 por la SCF ubicuitina ligasa marca a Sic1 para su degradación por parte de los proteasomas, liberando complejos ciclina-CDK de fase S activados, que desencadenan el inicio de la fase S (véase fig. 21-24).
- Las ciclinas tipo B Clb3 y Clb4, expresadas en la fase S tardía, forman heterodímeros con la CDK que también promueven la replicación del DNA e inician la formación del huso al comienzo de la mitosis.
- Las ciclinas de tipo B Clb1 y Clb2, expresadas en G_2, forman heterodímeros con la CDK, que estimulan los acontecimientos mitóticos.
- En la anafase tardía, el factor de especificidad Cdh1 se activa por desfosforilación y luego dirige al APC a poliubicuitinar todas las ciclinas de tipo B (Clb). Su degradación posterior por los proteasomas inactiva el MPF y permite la salida de la mitosis (véase fig. 21-10).
- La replicación del DNA se inicia a partir de complejos de prerreplicación formados en los orígenes de replicación al principio de G_1. Los complejos ciclina-CDK de fase S desencadenan en forma simultánea la iniciación a partir de los complejos de prerreplicación e inhiben la formación de complejos nuevos de prerreplicación por fosforilación de los componentes del complejo de prerreplicación (véase fig. 21-26).
- La iniciación de la replicación del DNA tiene lugar en cada origen, pero sólo una vez, hasta que la célula atraviesa la anafase, cuando la activación del APC conduce a la degradación de las ciclinas tipo B. El bloqueo de la reiniciación de la replicación del DNA hasta que los cromosomas replicados se hayan separado asegura que las células hijas contengan el número apropiado de cromosomas por célula.

21.6 Control del ciclo celular en las células de mamífero

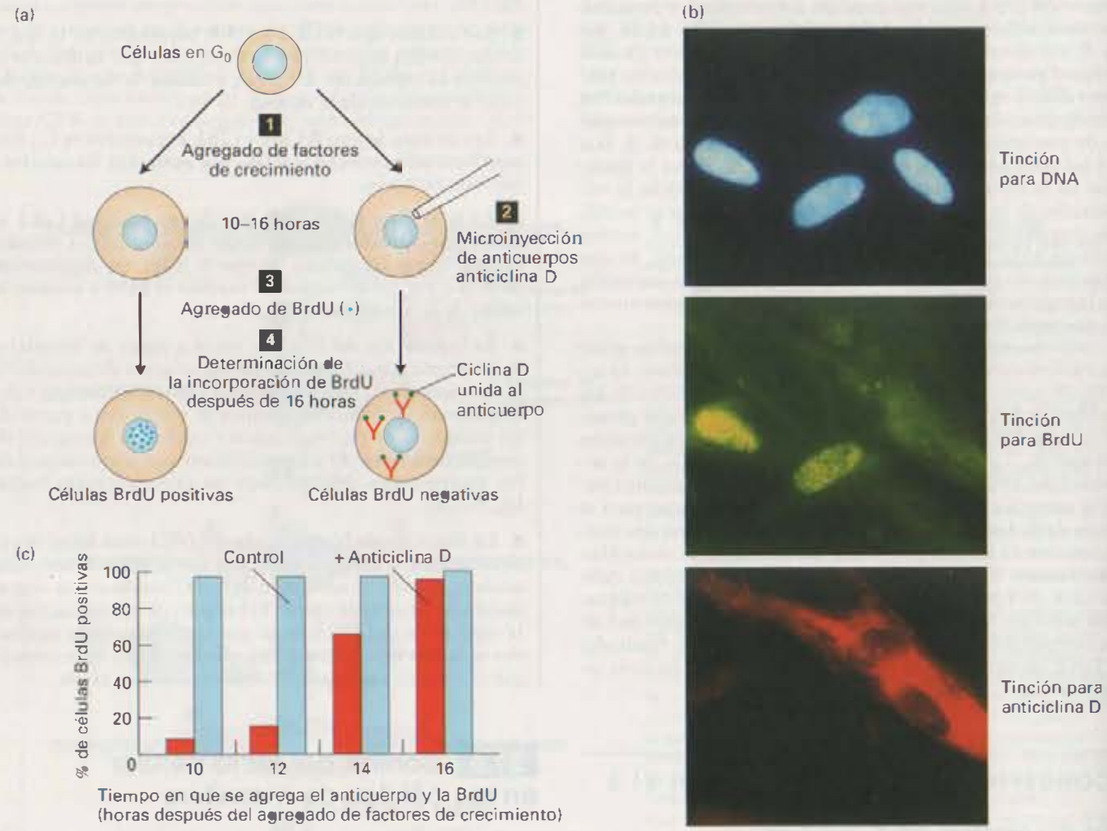
En los organismos multicelulares, el control preciso del ciclo celular durante el desarrollo y el crecimiento es crítico para determinar el tamaño y la forma de cada tejido. La replicación celular es controlada por una red compleja de vías de señalización que integran señales extracelulares acerca de la identidad y el número de las células vecinas, y señales intracelulares sobre el tamaño de la célula y el programa de desarrollo (cap. 15). Las células más diferenciadas abandonan el ciclo celular durante G_1, y entran en estado G_0 (véase fig. 21-1). Algunas células diferenciadas (p. ej., los fibroblastos y los linfocitos) pueden estimularse para que reingresen en el ciclo y se repliquen. Sin embargo, muchas células posmitóticas diferenciadas nunca vuelven a entrar en el ciclo celular para reproducirse de nuevo. Como se verá en esta sección, los mecanismos reguladores del ciclo celular descubiertos en las levaduras y los huevos y los embriones tempranos de *Xenopus* también operan en las células somáticas de los eucariontes superiores, como los seres humanos y otros mamíferos.

El punto de restricción de los mamíferos es análogo al START de las células de levadura

La mayor parte de los estudios de control del ciclo celular en mamíferos se hizo con células en cultivo que requieren ciertos factores de crecimiento polipeptídicos (mitógenos) para estimular la proliferación celular.

La unión de estos factores de crecimiento a proteínas receptoras específicas que atraviesan la membrana plasmática comienza una cascada de transducción de señales que termina por influir en la transcripción y el control del ciclo celular (caps. 13 a 15).

Las células de mamífero cultivadas en ausencia de factores de crecimiento se detienen, con una dotación diploide de cromosomas, en el período G_0 del ciclo celular. Si se agregan factores de crecimiento al medio de cultivo, estas **células en reposo** superan el punto de restricción después de 14 a 16 horas, entran en fase S 6 a 8 horas después de esto y cumplen el resto del ciclo celular (véase fig. 21-2). Como el punto de inicio de las células de levadura, el punto de restricción es el del ciclo celular en el que las células de mamífero se comprometen a entrar en fase S y completar el ciclo celular. Si se transfieren de un medio con factores de crecimiento a otro que no los presenta antes de que alcancen el punto de restricción, las células no entran en fase S. No obstante una vez que las células pasaron el punto de restricción, están destinadas a entrar en fase S y avanzar a través de todo el ciclo celular, lo que insume unas 24 horas para la mayor parte de las células de mamífero en cultivo.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 21-27 Los experimentos de microinyección con anticuerpos anticiclina D muestran que la ciclina D es necesaria para el pasaje a través del punto de restricción. Las células de mamífero detenidas en G_0 usadas en estos experimentos pasan el punto de restricción 14-16 horas después del agregado de factores de crecimiento y entran en fase S 6-8 horas después. (a) Esquema del protocolo experimental. A diferentes tiempos después de 10-16 horas del agregado de factores de crecimiento (**1**), algunas células se microinyectaron con anticuerpos de conejo contra ciclina D (**2**). Luego se agregó al medio bromodesoxiuridina (BrdU), un análogo de la timidina (**3**), y las células control sin inyectar (*izquierda*) y las microinyectadas del experimento (*derecha*) se incubaron durante 16 horas más. Cada muestra se analizó luego para determinar el porcentaje de células que habían incorporado BrdU (**4**), lo que indica que entraron en fase S. (b) Análisis de las células control y de las células experimentales 8 horas después del agregado de factores de crecimiento. Las tres microfotografías muestran el mismo campo de células teñidas 16 horas después del agregado de BrdU al medio. Las células se tiñeron con diferentes agentes fluorescentes para visualizar el DNA (*arriba*), la BrdU (*medio*) y el anticuerpo anticiclina D (*abajo*). Nótese que las dos células en este campo inyectadas con el anticuerpo anticiclina D (células rojas en la microfotografía inferior) no incorporaron BrdU en el DNA nuclear, como lo indica la ausencia de tinción de la microfotografía del medio. (c) Porcentaje de células control (barras azules) y células experimentales (barras rojas) que incorporaron BrdU. La mayor parte de las células inyectadas con anticuerpos anticiclina D 10 o 12 horas después del agregado de factores de crecimiento no entró en fase S, lo que se indica por el bajo nivel de incorporación de BrdU. Por el contrario, los anticuerpos anticiclina D tuvieron poco efecto sobre la entrada en fase S y la síntesis de DNA cuando se inyectaron a las 14 o 16 horas, es decir, después de que las células habían pasado el punto de restricción. Estos resultados indican que la ciclina D es necesaria para superar el punto de restricción, pero una vez que las células pasaron este punto, no necesitan ciclina D para entrar en la fase S 6-8 horas después. [Partes (b) y (c) adaptadas de V. Baldin y col., 1993, Genes & Devel. 7:812.]

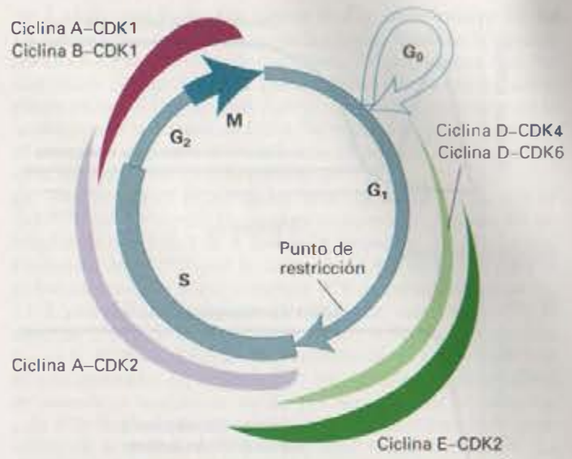
Numerosas CDK y ciclinas regulan el pasaje de células de mamífero por el ciclo celular

A diferencia de *S. pombe* y *S. cerevisiae*, cada uno de los cuales produce una sola cinasa dependiente de ciclina (CDK) para regular el ciclo celular, las células de mamífero usan una pequeña familia de CDK relacionadas para regular la progresión por este ciclo. En la mayoría de las células de mamíferos se expresan cuatro CDK en niveles significativos, que tienen importancia en la regulación del ciclo celular. Denominadas CDK1, 2, 4 y 6, estas proteínas se identificaron por la capacidad de sus cDNA clonados para complementar ciertas mutantes *cdc* de levaduras o por su homología con otras CDK.

Como *S. cerevisiae*, las células de mamíferos expresan varias ciclinas. Las ciclinas A y las ciclinas B, que actúan en las fases S, G_2 y en la mitosis temprana, se detectaron por primera vez en experimentos realizados con embriones tempranos sincronizados en erizo de mar y almeja como proteínas cuya concentración oscilaba (véase fig. 21-8). En todos los animales multicelulares examinados se encontraron proteínas homólogas a las ciclinas A y a las ciclinas B. Se aislaron cDNA que codifican tres ciclinas relacionadas del tipo D humano y ciclina E por su capacidad de complementar células de *S. cerevisiae* mutantes en los tres genes *CLN* que codifican las ciclinas de G_1. Las cantidades relativas de las tres ciclinas de tipo D expresadas en los diversos tipos celulares (p. ej., fibroblastos, células hematopoyéticas) son diferentes. Aquí se denominan en conjunto ciclinas D. Las ciclinas D y E son las G_1 de los mamíferos. En los experimentos en los que células cultivadas de mamífero se microinyectaron con anticuerpos anticiclina D en diferentes momentos después del agregado de factores de crecimiento se demostró que la ciclina D es esencial para el pasaje por el punto de restricción (fig. 21-27).

En la figura 21-28 se observa un modelo actual de los períodos del ciclo celular en los que actúan los diferentes complejos ciclina-CDK en células de mamífero detenidas en G_0, estimuladas a dividirse por el agregado de factores de crecimiento. En ausencia de factores de crecimiento, las células cultivadas en G_0 no expresan ciclinas ni CDK; la ausencia de estas proteínas críticas explica por qué las células en G_0 no progresan a través del ciclo celular ni se replican.

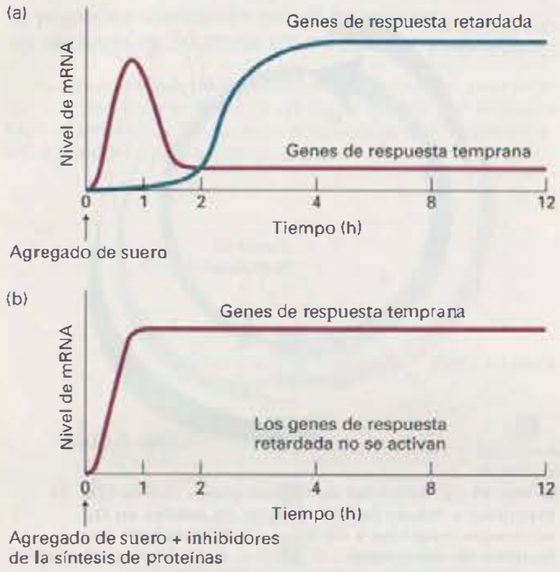
En el cuadro 21-1, presentado antes en este capítulo, se resumen las diversas ciclinas y CDK que se mencionaron y las porciones del ciclo celular en las que actúan. Las ciclinas pertenecen a dos grupos principales, las G_1 y las tipo B que actúan en S, G_2 y M. Aunque no es posible establecer una correspondencia simple entre las funciones de las diversas ciclinas y CDK de *S. pombe*, de *S. cerevisiae* y de los vertebrados, los diferentes complejos ciclina-CDK que forman pueden considerarse de manera general en términos de sus funciones en las fases G_1 media y tardía, S y M. Todas las ciclinas tipo B contienen una caja de destrucción con una secuencia conservada reconocida por la APC ubicuitina ligasa, en tanto que las ciclinas G_1 carecen de esta secuencia. Por lo tanto, el APC regula sólo la actividad de los complejos ciclina-CDK que implican ciclinas del tipo B.



▲ Fig. 21-28. Actividad de los complejos ciclina-CDK de mamífero a través del ciclo celular de células en G_0 cultivadas inducidas a dividirse por tratamiento con factores de crecimiento. El espesor de las bandas coloreadas es aproximadamente proporcional a la actividad de proteincinasa de los complejos indicados. La ciclina D engloba las tres ciclinas de tipo D.

La expresión regulada de dos clases de genes hace retornar las células de mamífero en G_0 al ciclo celular

El agregado de factores de crecimiento a células de mamífero detenidas en G_0 induce la transcripción de varios genes, la mayor parte de los cuales pertenece a una de dos clases, de *respuesta temprana* o de *respuesta retardada*, según la rapidez con la que aparecen los mRNA codificados por ellos (fig. 21-29a). La transcripción de los genes de respuesta temprana se induce unos pocos minutos después del agregado de factores de crecimiento, por cascadas de transducción de señales que activan factores de transcripción preexistentes en el citosol o el núcleo. La inducción de los genes de respuesta temprana no es bloqueada por los inhibidores de la síntesis de proteínas (fig. 21-29b) porque los factores de transcripción necesarios están presentes en las células G_0 y se activan por fosforilación o eliminación de un inhibidor en respuesta a la estimulación de las células por los factores de crecimiento (cap. 14). Muchos de los genes de respuesta temprana codifican factores de transcripción, como c-Fos y c-Jun, que estimulan la transcripción de los genes de respuesta retardada. Los retrovirus oncogénicos expresan formas mutantes, no reguladas de c-Fos y c-Jun (cap. 23); el descubrimiento de que



▲ Fig. 21-29. Curso temporal general de la expresión de genes de respuesta temprana y retardada en células de mamífero detenidas en G_0 después del agregado de suero. (a) En ausencia de inhibidores de la síntesis de proteínas, la expresión de los genes de respuesta temprana alcanza su nivel máximo alrededor de 1 hora después del agregado de suero que contiene varios mitógenos y luego declina a medida que comienza la expresión de los genes de respuesta tardía. (b) Los inhibidores de la síntesis de proteínas impiden el descenso de la expresión de los genes de respuesta temprana y bloquean por completo la expresión de los genes de respuesta tardía. Para la explicación véase el texto. [Adaptado de A. Murray y T. Hunt, 1993, The Cell Cycle: An Introduction, W. H. Freeman and Company.]

las formas virales de estas proteínas (v-Fos y v-jun) pueden transformar las células normales en cancerosas llevó a la identificación de las formas de regulación celular de estos factores de transcripción.

Después de alcanzar el nivel máximo unos 30 minutos luego del agregado de factores de crecimiento, las concentraciones de mRNA de respuesta temprana descienden a un nivel menor, que se mantiene mientras los factores de crecimiento estén presentes en el medio. La mayor parte de los mRNA tempranos inmediatos son inestables; por consiguiente, su concentración disminuye a medida que decae su tasa de síntesis. Este descenso de la transcripción se bloquea mediante inhibidores de la síntesis de proteínas (véase fig. 21-29b), lo que indica que depende de la producción de una o más proteínas de respuesta temprana.

Debido a que la expresión de los genes de respuesta retardada depende de proteínas codificadas por genes de respuesta temprana, los primeros no se transcriben cuando se agregan mitógenos a las células detenidas en G_0 en presencia de un inhibidor de la síntesis de proteínas. Algunos genes de respuesta retardada codifican factores de transcripción adicionales (véase más adelante); otros codifican ciclinas de tipo D, ciclina E, CDK2, CDK4 y CDK6. Las ciclinas de tipos D, CDK4 y CDK6 se expresan primero, seguidas por las ciclinas E y CDK2 (véase fig. 21-28). Si se eliminan los factores de crecimiento antes del pasaje por el punto de restricción, cesa la expresión de estas ciclinas de G_1 y CDK. Dado que estas proteínas y los mRNA que las codifican son inestables, sus concentraciones decaen con rapidez. Como consecuencia, las células no pasan el punto de restricción y no se reproducen.

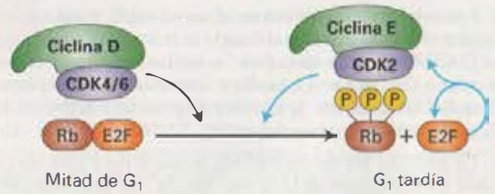
Además del control transcripcional del gen que codifica la ciclina D, la concentración de esta ciclina de la mitad de G_1 también se regula mediante el control de la *traducción* de su mRNA. En este aspecto, la ciclina D es similar a la Cln3 de *S. cerevisiae*. El agregado de factores de crecimiento a las células de mamífero en cultivo desencadena la transducción de señales por la vía de la cinasa PI-3 descrita en el capítulo 14, lo que lleva a la activación del factor de traducción-iniciación eIF4 (cap. 4). Como resultado, se estimula la traducción del mRNA de la ciclina D y otros mRNA. Los agentes que inhiben la activación del eIF4, como el TGF-β, inhiben la traducción del mRNA de la ciclina D y por lo tanto también lo hacen con la proliferación celular.

El pasaje a través del punto de restricción depende de la fosforilación de la proteína Rb supresora de tumores

Algunos miembros de una pequeña familia de factores de transcripción relacionados, denominados en conjunto *factores E2F*, son codificados por los genes de respuesta retardada. Estos factores de transcripción activan los genes que codifican muchas de las proteínas involucradas en la síntesis de DNA y desoxirribonucleótidos. También estimulan la transcripción de genes que codifican la ciclina de G_1 tardía (ciclina E), la ciclina de fase S (ciclina A) y la CDK de fase S (CDK2). Por lo tanto, los E2F funcionan al final de G_1, de forma similar a los factores de transcripción SBF y MBF de *S. cerevisiae*. Además, los E2F autoestimulan la transcripción de sus propios genes. Funcionan como represores de la transcripción cuando están unidos a la *proteína Rb*, que a su vez se une a los complejos de histona desacetilasa. Como se explicó en el capítulo 11, la transcripción de un gen es máxima cuando las histonas asociadas están muy acetiladas; la desacetilación de las histonas hace que la cromatina asuma una forma más condensada, inactiva desde el punto de vista transcripcional.

MEDICINA

La proteína Rb se identificó por primera vez como el producto del gen supresor tumoral prototipo, *RB*. Los productos de los genes supresores de tumores actúan de varias maneras para inhibir la progresión a través del ciclo celular (cap. 23). Las mutaciones con pérdida de función de *RB* se asocian con la enfermedad *retinoblastoma hereditario*. Un niño con esta afección hereda un alelo RB^+ normal de un padre y un alelo RB^- mutante del otro. Si el alelo RB^+ en cualquiera de los trillones de células que constituyen el cuerpo humano muta a un alelo RB^-, no se expresa ninguna proteína funcional y esa célula o alguna de sus descendientes tienen probabilidades de hacerse cancerosas. Por razones no bien comprendidas, esto suele observarse en células de la retina, lo cual produce los tumores de retina que caracterizan esta enfermedad. Asimismo, en la mayor parte de las células cancerosas humanas la función de Rb está inactivada, ya sea por mutaciones en ambos alelos de *RB* o por la regulación anormal de la fosforilación de Rb. ∎



▲ Fig. 21-30. Regulación de las actividades de Rb y E2F en G_1 media-tardía. La estimulación de células en G_0 con mitógenos induce la expresión de CDK4, CDK6, ciclinas de tipo D y la transcripción de factores E2F, todos codificados por los genes de respuesta retardada. La proteína Rb inhibe al inicio la actividad de E2F. Cuando la señalización de los mitógenos es sostenida, los complejos ciclina D-CDK4/6 resultantes empiezan a fosforilar a Rb, liberando parte de E2F, que estimula la transcripción de los genes que codifican ciclina E, CDK2 y E2F (autoestimulación). Los complejos ciclina E-CDK4 fosforilan más Rb, produciendo ciclos de retroalimentación positiva (flechas azules), que conducen a una elevación rápida de la expresión y actividad de E2F y ciclina E-CDK2 a medida que la célula se aproxima a la transición $G_1 \rightarrow S$.

La proteína Rb es uno de los sustratos más importantes de los complejos ciclina G_1-CDK de los mamíferos. La fosforilación de la proteína Rb en varios sitios impide su asociación con los E2F, lo que permite a los E2F activar la transcripción de los genes necesarios para la entrada en fase S. Como se muestra en la figura 21-30, la fosforilación de la proteína Rb es iniciada por las ciclinas D-CDK4 y D-CDK6 en la mitad de G_1. Una vez que las ciclinas E y CDK2 son inducidas por la fosforilación de algunas Rb, la ciclina resultante E-CDK2 fosforila más Rb al final de G_1. Cuando la ciclina E-CDK2 se acumula hasta alcanzar un nivel umbral crítico, la fosforilación adicional de la Rb por la ciclina E-CDK2 continúa, aun cuando la actividad de la ciclina D-CDK4/6 se elimina. Éste es uno de los principales eventos bioquímicos responsables del pasaje a través del punto de restricción. Llegado a este punto, la fosforilación adicional de la Rb por la ciclina E-CDK2 se produce incluso cuando se eliminan los mitógenos, y los niveles de ciclina D y CDK4/6 caen. Dado que E2F estimula su propia expresión y la de las ciclinas E y CDK2, la regulación cruzada positiva de E2F y de la ciclina E-CDK2 produce una elevación rápida de ambas actividades al final de G_1.

A medida que se acumulan, los complejos ciclina-CDK de fase S y los complejos ciclina-CDK mitóticos mantienen la proteína Rb en estado fosforilado a lo largo de las fases S, G_2 y M temprana. Después de que las células completan la anafase y entran en G_1 temprano o G_0, el descenso de los niveles de los complejos ciclina-CDK conduce a la desfosforilación de la Rb por fosfatasas sin oposición. Como consecuencia, la Rb hipofosforilada está disponible para inhibir la actividad de E2F durante la fase G_1 temprana del próximo ciclo y en las células detenidas en G_0.

La ciclina A es necesaria para la síntesis de DNA y la CDK1 para la entrada en la mitosis

Los niveles altos de E2F activan la transcripción del gen de ciclina A a medida que las células de mamífero se aproximan a la transición $G_1 \rightarrow S$. (A pesar de su nombre, la ciclina A es de tipo B, no una ciclina de G_1; véase cuadro 21-1.) La eliminación de la función de la ciclina A inhibe la síntesis de DNA en las células de mamífero, lo que sugiere que los complejos ciclina A-CDK2 pueden funcionar como los complejos ciclina-CDK de fase S de *S. cerevisiae* para activar la iniciación de la síntesis de DNA. También hay pruebas de que el complejo ciclina E-CDK2 puede contribuir con la activación de complejos de prerreplicación.

Tres proteínas relacionadas inhibidoras de CDK, o *CIP* ($p27^{KIP1}$, $p57^{KIP2}$ y $p21^{CIP1}$), parecen compartir la función del inhibidor de fase S Sic1 de *S. cerevisiae* (véase fig. 21-24). La fosforilación de $p27^{KIP1}$ por la ciclina E-CDK2 la marca para la poliubicuitinación por el complejo SCF de mamífero (véase fig. 21-2, paso 5). La subunidad de SCF que marca la $p27^{KIP1}$ se sintetiza a medida que las células se aproximan a la transición $G_1 \rightarrow S$. El mecanismo de degradación de $p21^{CIP}$ y $p57^{KIP2}$ es menos conocido. La actividad de los complejos ciclina-CDK2 de mamífero también se regula por mecanismos de fosforilación y de desfosforilación, similares a los que controlan el promotor de la mitosis de *S. pombe*, MPF (véase fig. 21-14). La *fosfatasa Cdc25A*, que elimina el fosfato inhibidor de la CDK2, es un equivalente en los mamíferos de la Cdc25 de *S. pombe*, solo que actúa en la transición $G_1 \rightarrow S$ en lugar de hacerlo en la transición $G_2 \rightarrow M$. La fosfatasa de los mamíferos normalmente se activa de manera tardía en G_1, pero se degrada durante la respuesta de las células al daño del DNA, para impedir que entren en fase S (véase sección 21.7).

Una vez que el complejo ciclina A-CDK2 es activado por Cdc25A y los inhibidores de fase S se degradaron, la replicación de DNA se inicia en los complejos de prerreplicación. Se cree que el mecanismo general es similar al de *S. cerevisiae* (véase fig. 21-26), aunque se encuentran pequeñas diferencias en los vertebrados. Como sucede en las levaduras, es muy probable que la fosforilación de ciertos factores de iniciación por el complejo ciclina A-CDK2 promueva la iniciación de la replicación del DNA y evite el reensamblaje de los complejos de prerreplicación hasta que la célula finalice la mitosis, para asegurar así que la replicación en cada origen sólo se produce una vez durante cada ciclo celular. En los metazoos, una segunda proteína pequeña, la geminina, contribuye a inhibir la reiniciación en los orígenes de replicación hasta que las células completan un ciclo celular.

La CDK principal de los mamíferos en G_2 y mitosis es CDK1 (véase fig. 21-28). Esta CDK, que tiene gran homología con la Cdc2 de *S. pombe*, se asocia con las ciclinas A y B. Los mRNA que codifican estas dos ciclinas de mamífero pueden promover la maduración meiótica cuando se inyectan en ovocitos de *Xenopus* detenidos en G_2 (véase fig. 21-6), lo que demuestra que actúan como ciclinas mitóticas. Por lo tanto, los complejos ciclina A-CDK1 y ciclina B-CDK1 de los mamíferos son equivalentes desde el punto de vista funcional al MPF de *S. pombe* (complejo ciclina-CDK mitótico). La actividad cinasa de estos complejos de mamíferos también parece estar regulada por proteínas análogas a las que controlan la actividad del MPF de *S. pombe* (véase fig. 21-14). El fosfato inhibidor de CDK1 es eliminado por la *fosfatasa Cdc25C*, que es análoga a la Cdc25 de *S. pombe*.

En las células de mamífero en ciclo, la ciclina B se sintetiza primero en la fase S tardía y su concentración aumenta a medida que las células progresan a través de G_2, alcanza el máximo durante la metafase y desciende después de la anafase tardía. Esto es paralelo a la evolución de la expresión de la ciclina B en los extractos de huevos de *Xenopus* en ciclo (véase fig. 21-9). En células humanas la ciclina B primero se acu-

mula en el citosol y luego ingresa en el núcleo justo antes que la envoltura nuclear se fragmente al comienzo de la mitosis. Así, la actividad del MPF se controla no sólo por la fosforilación y la desfosforilación, sino también por la regulación del transporte nuclear de ciclina B. De hecho, la ciclina B va y viene entre el núcleo y el citosol, y el cambio de su localización durante el ciclo celular es resultado de un cambio en las tasas relativas de importación y exportación. Como sucede en los huevos de *Xenopus* y en *S. cerevisiae*, se produce poliubicuitinación de las ciclinas A y B por acción del complejo promotor de la anafase (APC) durante la anafase tardía y luego son degradadas por los proteasomas (véase fig. 21-2, paso 9).

Dos tipos de inhibidores de los complejos ciclina-CDK contribuyen al control del ciclo celular en los mamíferos

Como se señaló, tres CIP relacionadas, $p21^{CIP}$, $p27^{KIP2}$ y $p57^{KIP2}$, inhiben la actividad del complejo ciclina A-CDK2 y deben degradarse para que pueda iniciarse la replicación del DNA. Estas mismas proteínas inhibidoras de CDK también pueden unirse e inhibir a los otros complejos ciclina-CDK de mamífero comprometidos en el control del ciclo celular. Como se verá más adelante, la $p21^{CIP}$ tiene importancia en la respuesta de las células de mamífero al daño del DNA. En los experimentos con ratones knockout que carecen de $p27^{KIP2}$ se demostró que esta CIP es en particular importante en el control de la proliferación celular generalizada poco después del nacimiento. Aunque los knockout $p27^{KIP2}$ son más grandes que lo habitual, la mayoría se desarrolla con normalidad. Por el contrario, los knockout $p57^{KIP2}$ muestran defectos en la diferenciación celular y la mayoría muere poco después del nacimiento debido al desarrollo defectuoso de diversos órganos.

Una segunda clase de inhibidores de los complejos ciclina-CDK, llamada *INK4* (inhibidores de la cinasa 4), comprende varias proteínas pequeñas, estrechamente relacionadas, que sólo interactúan con CDK4 y CDK6, y por lo tanto actúan de manera específica en el control de la fase media de G_1. La unión de INK4 a CDK4/6 bloquea su interacción con la ciclina D y por lo tanto su actividad de proteincinasa. La disminución resultante de la fosforilación de la proteína Rb impide la activación de la transcripción por los E2F y la entrada en la fase S. Un INK4 llamado p16 es un supresor de tumores, como la proteína Rb descrita antes. La presencia de dos alelos mutantes de p16 en gran parte de los cánceres humanos es una evidencia del papel importante de p16 en el control del ciclo celular (cap. 23).

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 21.6

Control del ciclo celular en las células de mamífero

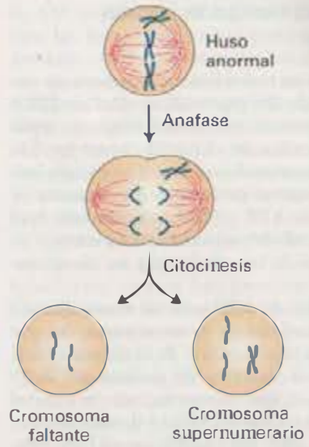
- Diversos factores de crecimiento polipeptídicos, llamados mitógenos, estimulan las células de mamífero en cultivo a proliferar por inducción de la expresión de genes de respuesta temprana. Muchos de estos genes codifican factores de transcripción que estimulan la expresión de genes de respuesta retardada, que codifican las CDK de G_1, las ciclinas de G_1 y los factores de transcripción E2F.
- Una vez que las células pasan el punto de restricción, pueden entrar en fase S y completar S, G_2 y la mitosis en ausencia de factores de crecimiento.
- Las células de mamífero usan varias CDK y ciclinas para regular el pasaje a través del ciclo celular. El complejo ciclina D-CDK4/6 actúa en la fase G_1 media a tardía; el complejo ciclina E-CDK2 en G_1 tardía y S temprana; el complejo ciclina A-CDK2 en fase S; y el complejo ciclina A/B-CDK1 en G_2 y M hasta la anafase (véase fig. 21-28).
- La proteína Rb no fosforilada se une a los E2F y los convierte en represores de la transcripción. La fosforilación de Rb por el complejo ciclina D-CDK4/6 en la porción media de G_1 libera los E2F para activar la transcripción de genes que codifican ciclina E, CDK2 y otras proteínas requeridas para la fase S. Los E2F también autoestimulan la transcripción de sus propios genes.
- El complejo ciclina E-CDK2 fosforila más Rb, con lo que los E2F se activan aún más. Una vez que se expresa un nivel crítico de complejo ciclina E-CDK2, un mecanismo de retroalimentación positiva de E2F produce una elevación rápida de ambas actividades, lo que impulsa el pasaje a través del punto de restricción (véase fig. 21-30).
- La actividad del complejo ciclina A-CDK2, inducida por la elevada actividad de E2F, se mantiene inhibida al comienzo por acción de los CIP, que funcionan como inhibidores de la fase S, y por la presencia de un fosfato inhibitorio en CDK2. A medida que las células se acercan a la transición $G_1 \rightarrow S$, la degradación por parte de los proteasomas de los inhibidores y la activación de la fosfatasa Cdc25A genera complejos activos ciclina A-CDK2. Este complejo activa los complejos de prerreplicación para comenzar la síntesis de DNA por un mecanismo similar al de *S. cerevisiae* (véase fig. 21-26).
- El complejo ciclina A/B-CDK1 induce la mitosis hasta la anafase temprana. Las ciclinas A y B son poliubicuitinadas por acción del complejo promotor de la anafase (APC) durante la anafase tardía y luego son degradadas por los proteasomas.
- La actividad de los complejos mitóticos ciclina-CDK de los mamíferos también se regula por la fosforilación y la desfosforilación de forma similar al mecanismo de *S. pombe*, y en este caso la fosfatasa Cdc25C es la que elimina los fosfatos inhibidores (véase fig. 21-14).
- Las actividades de los complejos ciclina-CDK de los mamíferos también se regulan por los inhibidores de CDK (CIP), que se unen e inhiben cada uno de los complejos ciclina-CDK de mamífero, y por las proteínas INK4, que bloquean el pasaje a través de G_1 al inhibir de manera específica CDK4 y CDK6.

21.7 Puntos de control en la regulación del ciclo celular

Si las células progresan a la próxima fase del ciclo celular antes de que la anterior se complete de manera adecuada, puede producirse un daño genético catastrófico. Por ejemplo, cuando células en fase S son inducidas a entrar en mitosis por fusión con una célula en mitosis, el MPF presente en la célula mitótica fuerza la condensación de los cromosomas de la célula en fase S. Sin embargo, debido a que los cromosomas en replicación se fragmentan por el proceso de condensación, esta entrada prematura en mitosis es desastrosa para la célula.

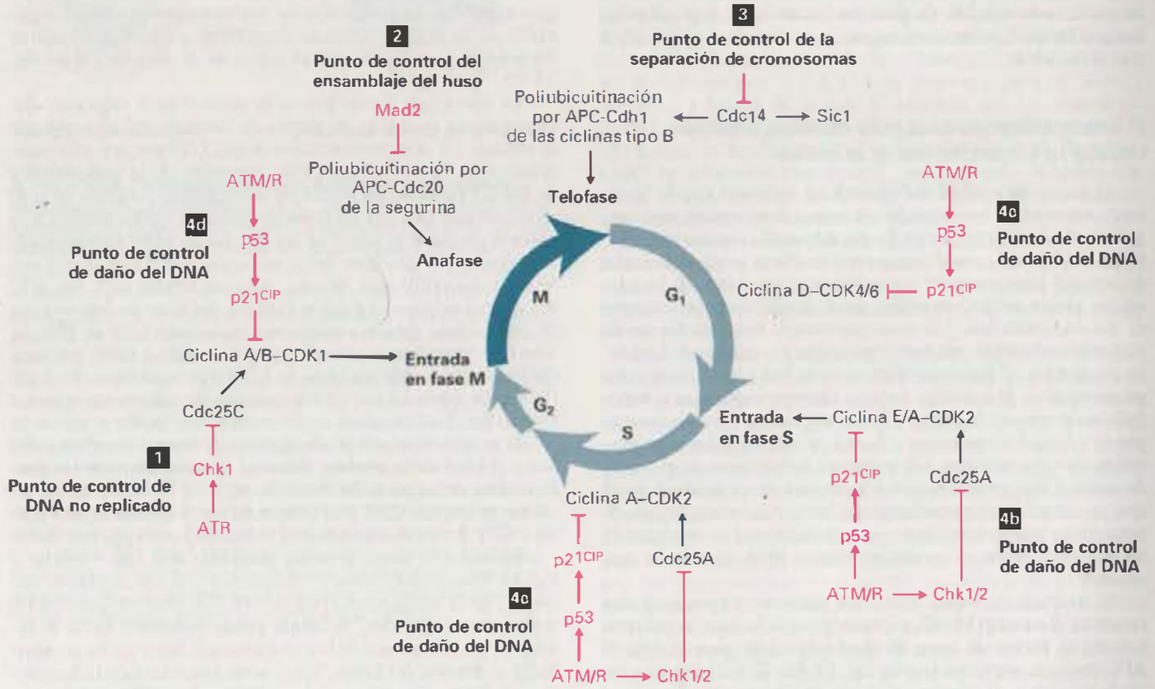
MEDICINA

Otro ejemplo es la unión de los cinetocoros a los microtúbulos del huso mitótico durante la metafase. Si la anafase se inicia antes de que ambos cinetocoros de un cromosoma replicado se unan a los microtúbulos provenientes de polos opuestos del huso, se producen células hijas que carecen de un cromosoma o tienen uno de más (fig. 21-31). Cuando este proceso, llamado *no disyunción*, se produce durante la división meiótica que genera los óvulos humanos, puede aparecer un síndrome de Down por trisomía del cromosoma 21, que produce anomalías de desarrollo y retraso mental. ■



◀ Fig. 21-31. No disyunción. Esta anomalía se produce cuando los cromosomas se separan en la anafase antes de que el cinetocoro de cada cromátida hermana se haya unido a los microtúbulos (líneas rojas) de los polos opuestos del huso. Como resultado, una célula hija contiene dos copias de un cromosoma, mientras la otra carece de ese cromosoma. [Adaptado de A. Murray y T. Hunt, 1993, The Cell Cycle: An Introduction, W. H. Freeman and Company.]

Para reducir al mínimo este tipo de errores durante los acontecimientos del ciclo celular, el progreso de una célula a través del ciclo se supervisa en varios puntos de control (fig. 21-32). Los mecanismos de control que operan en ellos aseguran que los cromosomas estén intactos y que cada estadio del ciclo celular se complete antes de comenzar el siguiente. Nuestro conocimiento de estos mecanismos de control a nivel molecular avanzó en grado considerable en los últimos años.



▲ Fig. 21-32. Esquema general del control del ciclo celular mediado por los puntos de control. El punto de control del DNA no replicado (1) impide la activación de los complejos ciclina A-CDK1 y ciclina B-CDK1 (esto es, el factor promotor de la mitosis, MPF) por activación de una cascada de la proteincinasa ATR-Chk1, que fosforila e inactiva Cdc25C, inhibiendo así la entrada en la mitosis. En el punto de control de ensamblaje del huso (2), Mad2 y otras proteínas inhiben la activación del factor de especificidad del APC (Cdc20) necesario para la poliubicuitinación de la segurina, impidiendo así la entrada en anafase. El punto de control de separación de los cromosomas (3) impide la liberación de la fosfatasa Cdc14 de los nucléolos, bloqueando de ese modo la activación del factor de especificidad del APC (Cdh1) necesario para la poliubicuitinación de las ciclinas tipo B, así como para la inducción de Sic1. Como resultado, no tiene lugar la disminución de actividad del MPF requerida para los acontecimientos de la telofase. En la fase inicial del punto de control de daño del DNA (4) se activa la proteincinasa ATM o ATR (ATM/R). Las cinasas activas desencadenan entonces dos vías, la vía de Chk-Cdc25A (4b y 4c), que bloquea la entrada en fase S, y la vía del p53-$p21^{CIP}$, que produce la detención en G_1, S y G_2 (4a - 4b). Para mayor explicación véase el texto. Los símbolos rojos indican vías que inhiben la progresión a través del ciclo celular.

La presencia de DNA no replicado impide la entrada en la mitosis

Las células que no replican todos sus cromosomas no entran en mitosis. El mecanismo del *punto de control de DNA no replicado* involucra el reconocimiento del DNA no replicado y la inhibición de la activación del MPF (véase fig. 21-32, 1). En estudios genéticos recientes con *S. pombe* y ensayos bioquímicos con extractos de huevos de *Xenopus* se sugirió que las proteincinasas ATR y Chkl, que también funcionan en el punto de control de daño del DNA, inhiben la entrada en mitosis por parte de las células que no completaron la síntesis de DNA.

Se cree que la asociación de ATR con las horquillas de replicación estimula su actividad de proteincinasa, lo que conduce a la fosforilación y la activación de la cinasa Chk1. La Chk1 activa fosforila e inactiva la fosfatasa Cdc25 (Cdc25C en los vertebrados), que en condiciones normales elimina el fosfato inhibidor de las CDK que actúan durante la mitosis. Como resultado, los complejos ciclina A/B-CDK1 permanecen inhibidos y no pueden fosforilar los objetivos necesarios para iniciar la mitosis. El ATR continúa iniciando esta cascada de proteincinasas hasta que todas las horquillas de replicación completan la replicación del DNA y se desarman.

El ensamblaje inadecuado del huso mitótico impide la iniciación de la anatase

El *punto de control del ensamblaje del huso* impide la entrada en anafase aun cuando un solo cinetocoro de una cromátida no esté asociado en forma adecuada con los microtúbulos del huso. Los indicios acerca de cómo actúa este punto de control provienen del aislamiento de mutantes de levaduras en presencia de benomilo, un fármaco despolimerizador de los microtúbulos. Las concentraciones bajas de benomilo aumentan el tiempo necesario para que las células de levadura ensamblen el huso mitótico y unan los cinetocoros a los microtúbulos. Las células de tipo silvestre expuestas a benomilo no empiezan la anafase hasta que estos procesos se completan y luego sufren mitosis, lo que produce células hijas normales. Por el contrario, las mutantes defectuosas en el punto de control del ensamblaje del huso entran en anafase antes que se complete el ensamblaje del huso y la unión de los cinetocoros; por consiguiente, sus cromosomas se separan de forma inadecuada, y producen células hijas anormales que mueren.

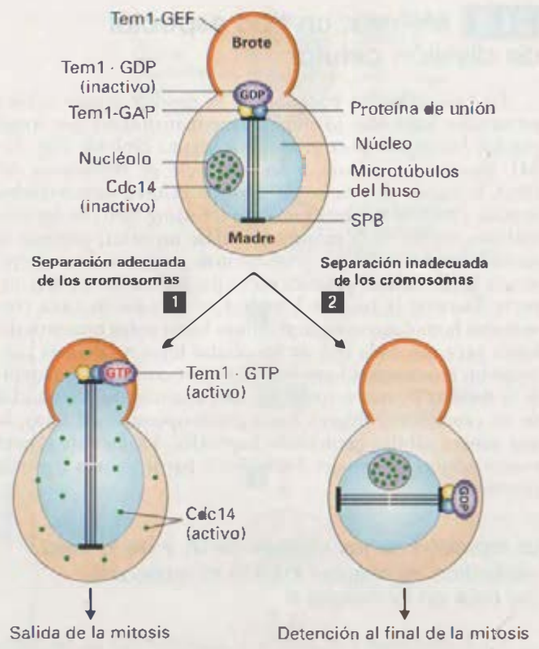
El análisis de estas mutantes permitió identificar una proteína llamada Mad2 y otras proteínas que regulan a Cdc20, el factor de especificidad requerido para dirigir al APC hacia la segurina (véase fig. 21-32, 2). Es preciso recordar que la poliubicuitinación de la segurina mediada por APC y su degradación posterior son necesarias para la entrada en anafase (véase fig. 21-19). Se demostró que Mad2 se asocia con los cinetocoros que no están unidos a microtúbulos. Los experimentos con Mad2 unida a una proteína fluorescente verde (GFP) indican que la Mad2 unida a cinetocoros se intercambia con rapidez con una forma soluble de Mad2. Los modelos actuales proponen que cuando la Mad2 se asocia con un complejo de cinetocoro que no está unido a un microtúbulo, se convierte en una forma activada de vida corta que puede interactuar e inhibir a Cdc20. La unión al microtúbulo impide esta activación de la Mad2. Por consiguiente, una vez que todos los complejos de cinetocoro se unen a un microtúbulo, cesa la generación de la forma activada de Mad2, se elimina la inhibición de Cdc20 y ésta queda libre para dirigir el APC a poliubicuitinar de la segurina, lo que desencadena el comienzo de la anafase.

La red de salida de la mitosis controla la separación apropiada de los cromosomas hijos

Una vez que los cromosomas se separaron de manera adecuada, comienza la telofase. Los diversos acontecimientos de la telofase y la citocinesis siguiente, llamados en conjunto salida de la mitosis, requieren la inactivación del MPF. Como se explicó, la desfosforilación del factor de especificidad Cdh1 del APC por la fosfatasa Cdc14 conduce a la degradación de las ciclinas mitóticas y a la pérdida de actividad del MPF en la anafase (véase fig. 21-10). Durante la interfase y la mitosis temprana, Cdc14 se encuentra secuestrada e inactivada en el nucléolo. El *punto de control de separación de los cromosomas,* que supervisa la ubicación de los cromosomas hijos separados al final de la anafase, determina si hay Cdc14 activa disponible para promover la salida de la mitosis (véase fig. 21-32, 3).

La operación de este punto de control en *S. cerevisiae* depende de un conjunto de proteínas llamado *red de salida de la mitosis*. Un componente clave es una GTPasa pequeña (monomérica), llamada Tem1. Este miembro de la superfamilia de las GTPasas de proteínas de intercambio controla la actividad de una cascada de proteincinasas de forma similar a la manera en que Ras controla las vías de las MAP cinasas (cap. 14). Durante la anafase, Tem1 se asocia con el cuerpo del polo del huso (SPB) más cercano al brote celular hijo. (El SPB, del que se originan los microtúbulos del huso es equivalente al centrosoma de los eucariontes superiores.) En el SPB, la Tem1 se mantiene en estado inactivo unido a GDP por una GAP (proteína aceleradora de GTPasa) específica. El GEF (factor de intercambio de nucleótidos de guanosina) que activa a Tem1 se localiza en la corteza del brote y no en la célula madre. Cuando la elongación de los microtúbulos del huso al final de la anafase ubica de manera correcta los cromosomas en separación en el brote hijo, la Tem1 entra en contacto con su GEF y se convierte en el estado activo unido a GTP. La cinasa terminal de la cascada activada por Tem1 - GTP fosforila luego el ancla nucleolar que liga e inhibe a Cdc14, liberándolo hacia el citoplasma y el nucleoplasma del brote y de la célula madre (fig. 21-33, 1). Una vez que Cdc14 activo está disponible, la célula puede proseguir hacia la telofase y la citocinesis. Si los cromosomas hijos no se separan hacia el interior del brote, Tem1 permanece en su estado inactivo, Cdc14 no se libera del nucléolo y la salida de la mitosis se bloquea (fig. 21-33, 2).

En la levadura de fisión *S. pombe*, la formación del tabique que divide las células hijas está regulada por proteínas homólogas a las que constituyen la red de salida de la mitosis de *S. cerevisiae*. También se encontraron genes que codifican proteínas similares en organismos superiores, donde es probable que estos homólogos actúen en un punto de control análogo que conduce a la detención de la mitosis tardía cuando los cromosomas hijos no se separan en forma adecuada.



▲ Fig. 21-33. Funcionamiento del punto de control de la separación de cromosomas. En *S. cerevisiae*, la actividad de la fosfatasa Cdc14 es necesaria para la salida de la mitosis. (*Arriba*) Durante la interfase y el comienzo de la mitosis Cdc14 es secuestrado e inactivado en el nucléolo. Tem1 GDP inactivo (violeta) se asocia con el cuerpo del polo del huso (SPB) más cercano al brote al comienzo de la anafase con la ayuda de una proteína de unión (verde) y se mantiene en estado inactivo por una GAP (proteína aceleradora de GTPasa) específica. Si la separación de los cromosomas es adecuada (**1**), la extensión de los microtúbulos del huso inserta el SPB hijo en el brote, haciendo que Tem1 entre en contacto con un GEF (factor de intercambio de guanina nucleótido) específico localizado en la corteza del brote (naranja). Este GEF convierte Tem1 GDP inactivo en Tem1 GTP activo, el que desencadena una cascada de proteincinasas que lleva a la liberación de Cdc14 activo y a la salida de la mitosis. Si el aparato del huso no inserta el SPB hijo en el brote (**2**), Tem1 permanece en estado inactivo unido a GDP y Cdc14 permanece asociado con los nucléolos. Como resultado, hay una detención al final de la mitosis. [Adaptado de G. Pereira y E. Schiebel, 2001, Curr. Opin. Cell Biol. 13:762.]

La detención del ciclo celular en células con DNA dañado depende de supresores tumorales

MEDICINA

El *punto de control de DNA dañado* bloquea la progresión a través del ciclo celular hasta que el daño se repara. El daño del DNA puede ser resultado de la acción de agentes químicos y de la irradiación con luz ultravioleta (UV) o rayos γ. La detención en G_1 y S impide que se copien bases dañadas, que perpetuarían las mutaciones en el genoma. La replicación de DNA dañado también promueve reestructuraciones cromosómicas que pueden contribuir con el inicio del cáncer. La detención en G_2 permite que los daños del DNA de dohle cadena se reparen antes de la mitosis. Si un daño de doble cadena no se repara, la porción distal rota del cromosoma dañado no se separa en forma adecuada porque no se une físicamente a un centrómero traccionado hacia un polo del huso durante la anafase.

Como se explicará en detalle en el capítulo 23, la inactivación de los genes supresores de tumores contribuye al desarrollo del cáncer. Las proteínas codificadas por varios genes supresores de tumores, como *ATM* y *Chk2*, en condiciones normales actúan en el punto de control de daños del DNA. Los pacientes con mutaciones en ambas copias de *ATM* o *Chk2* desarrollan cánceres con frecuencia mucho mayor que lo normal. Ambos genes codifican proteincinasas.

El daño del DNA debido a la luz UV de algún modo activa la cinasa ATM, que fosforila Chk2, para estimular así su actividad cinasa. La Chk2 activada fosforila luego la fosfatasa Cdc25A, y la marca para su poliubicuitinación por una ligasa de ubicuitina todavía no determinada y su degradación posterior en los proteasomas. Se debe recordar que la eliminación del fosfato inhibidor de la CDK2 de los mamíferos por la Cdc25A es necesaria para el inicio y el pasaje a través de la fase S mediado por los complejos ciclina E-CDK2 y ciclina A-CDK2. La degradación de Cdc25A, que es resultado de la activación de la vía de ATM-Chk2 en células en fase G_1 o S, conduce así a la detención en G_1 o S (véase fig. 21-32, 4b y 4c). Una vía similar, que consiste en las proteincinasas ATR y Chk1, lleva a la fosforilación y poliubicuitinación de Cdc25A en respuesta a la radiación γ. Como se describió antes para el punto de control de DNA no replicado, la Chk1 también inactiva a Cdc25C, lo que impide la activación de CDK1 y la entrada en mitosis.

Otra proteína supresora de tumores, p53, contribuye a la detención de células con DNA dañado. Las células con p53 funcional se detienen en G_1 y G_2 cuando se exponen a radiación γ, en tanto que las que carecen de p53 funcional no se detienen en G_1. Aunque la proteína p53 es un factor de transcripción, en condiciones normales es muy inestable y por lo general no se acumula en niveles lo suficientemente altos como para estimular la transcripción. La inestabilidad del p53 es resultado de su poliubicuitinación por una ligasa de ubicuitina llamada Mdm2 y su degradación posterior por los proteasomas. La degradación rápida de p53 es inhibida por ATM y quizá por ATR, que fosforila p53 en un sitio que interfiere su unión con Mdm2. Ésta y otras modificaciones de p53 en respuesta al daño del DNA aumentan en gran medida su capacidad de activar la transcripción de genes específicos que ayudan a la célula a superar el daño del DNA. Uno de estos genes codifica $p21^{CIP}$, un CIP generalizado que se une e inhibe todos los complejos ciclina-CDK de mamífero. Como resultado, las células se detienen en G_1 y G_2 hasta que se repara el daño del DNA y descienden los niveles de p53 y a continuación los de $p21^{CIP}$ (véase fig. 21-32, 4a a 4d).

En algunas circunstancias, como cuando el daño del DNA es extenso, p53 también activa la expresión de genes que conducen a la apoptosis, el proceso de muerte celular programada que en condiciones normales se produce en células específicas durante el desarrollo de los animales multicelulares.

En los vertebrados, la respuesta de p53 probablemente evolucionó para inducir apoptosis ante el daño extenso del DNA, para prevenir la acumulación de mutaciones múltiples que podrían convertir una célula normal en cancerosa. El papel dual de p53, tanto en la detención del ciclo celular como en la inducción de apoptosis, puede explicar la observación de que casi todas las células cancerosas tienen mutaciones en ambos alelos del gen *p53* o en las vías que estabilizan el p53 en respuesta al daño del DNA (cap. 23). Las consecuencias de las mutaciones en *p53*, *ATM* y *Chk1* proporcionan ejemplos espectaculares de la importancia de los puntos de control del ciclo celular para la salud de un organismo multicelular. ■

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 21.7

Puntos de control en la regulación del ciclo celular

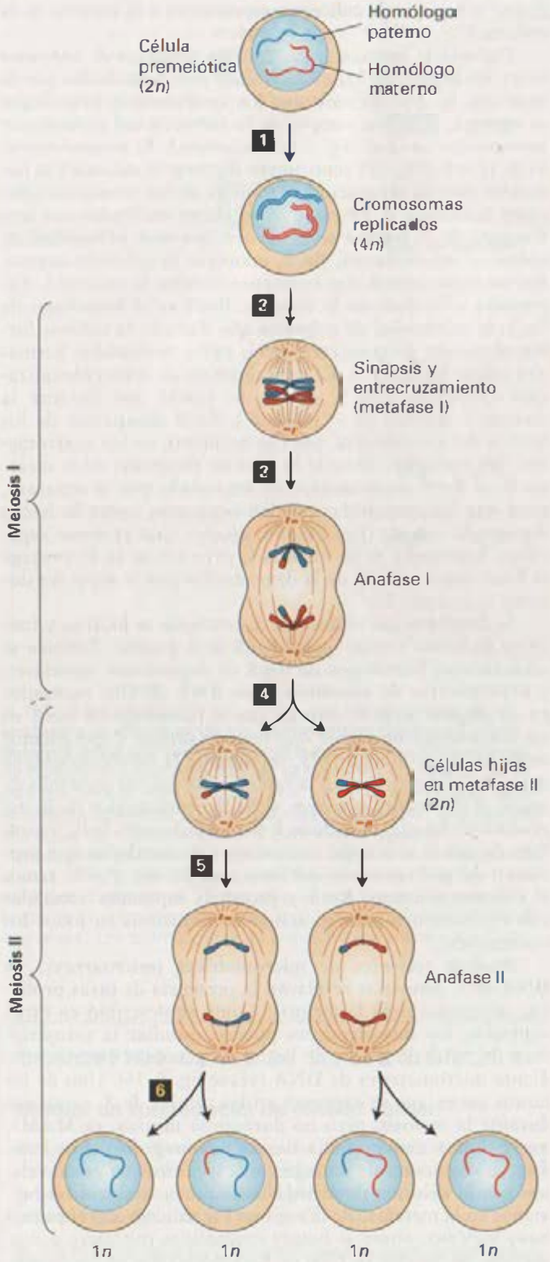
- Los puntos de control funcionan para asegurar que los cromosomas están intactos y que los estadios críticos del ciclo celular se hayan completado antes de que comience el siguiente.
- El punto de control del DNA no replicado actúa durante S y G_2 para prevenir la activación del MPF antes de que se complete la síntesis del DNA e inhibe la activación de CDK1 por Cdc25C (véase fig. 21-32, 1).
- El punto de control de ensamblaje del huso, que impide la iniciación prematura de la anafase, utiliza Mad2 y otras proteínas para regular el factor de especificidad Cdc20 del APC, que marca la segurina para la poliubicuitinación (véanse figs. 21-32, 2 y 21-19).
- El punto de control de la separación de cromosomas impide la telofase y la citocinesis hasta que los cromosomas hijos se hayan separado de manera adecuada, para que las células hijas tengan un juego completo de cromosomas (véase fig. 21-32, 3).
- En el punto de control de la separación de cromosomas, la pequeña GTPasa Tem1 controla la disponibilidad de fosfatasa Cdc14, que a su vez activa el factor de especificidad Cdh1 del APC, que marca las ciclinas tipo B para la degradación, lo que produce la inactivación del MPF (véase fig. 21-10).
- El punto de control del daño de DNA detiene el ciclo celular en respuesta al daño del DNA hasta que la lesión se repara. Tres tipos de proteínas supresoras de tumores (ATM/ATR, Chk1/2 y p53) son fundamentales en este punto de control.
- La activación de las proteincinasas ATM o ATR en respuesta al daño del DNA debido a luz UV o radiación γ lleva a la detención en G_1 y en fase S a través de una vía que conduce a la pérdida de la actividad de la fosfatasa Cdc25A. Una segunda vía de ATM/R activada estabiliza el p53, lo que estimula la expresión de $p21^{CIP}$. La inhibición posterior de varios complejos CDK-ciclina por $p21^{CIP}$ causa una detención prolongada en G_1 y G_2 (véase fig. 21-32, 4a a 4d).
- En respuesta al daño extenso del DNA, p53 también activa genes que inducen la apoptosis.

21.8 Meiosis: un tipo especial de división celular

En casi todos los eucariontes, la meiosis genera células germinales haploides (óvulos y espermatozoides) que luego pueden fusionarse para generar un cigoto diploide (fig. 21-34). Durante la meiosis, a un solo ciclo de replicación del DNA le siguen dos ciclos de división celular, denominados *meiosis I* y *II*. El entrecruzamiento (*crossing over*) de las cromátidas, visible en la primera metafase meiótica, produce la recombinación entre los cromosomas paternos. Esto incrementa la diversidad genética entre los individuos de una especie. Durante la meiosis I, ambas cromátidas de cada cromosoma homólogo se separan juntas hacia polos opuestos del huso, para que cada una de las células hijas resultantes contenga un cromosoma homólogo con dos cromátidas. Durante la meiosis II, que se parece a una mitosis, las cromátidas de un cromosoma migran hacia polos opuestos del huso, lo que genera células germinales haploides. La meiosis genera cuatro células germinales haploides a partir de una diploide premeiótica.

La represión de las ciclinas de G_1 y de la Ime2 específica de meiosis impide la replicación del DNA en la meiosis II

En *S. cerevisiae* y *S. pombe* el agotamiento de las fuentes de nitrógeno y carbono induce a las células diploides a sufrir meiosis y producir esporas haploides (véase fig. 1-5). Este proceso es análogo a la formación de células germinales en los eucariontes superiores. Se aislaron varias mutantes de levadura que no podían formar esporas y se analizaron las proteínas de tipo silvestre codificadas por estos genes. En estos ensayos se identificaron proteínas especializadas del ciclo celular que son necesarias para la meiosis.



▶ **Fig. 21-34. Meiosis.** Las células premeióticas tienen dos copias de cada cromosoma (2*n*), una derivada del padre y una de la madre. Para simplificar, sólo se muestra un cromosoma homólogo paterno y uno materno. Paso **1**: Todos los cromosomas se replican durante la fase S antes de la primera división meiótica, produciendo un complemento cromosómico 4*n*. Los complejos de cohesina (no mostrados) unen las cromátidas hermanas que componen cada uno de los cromosomas replicados en toda su longitud. Paso **2**: A medida que los cromosomas se condensan durante la primera profase meiótica, los homólogos replicados se disponen de a pares como resultado de por lo menos un entrecruzamiento entre una cromátida paterna y una materna. Esta disposición en pares de los cromosomas homólogos replicados se llama sinapsis. En la metafase, como se muestra aquí, ambas cromátidas de un cromosoma se asocian con microtúbulos que provienen de un polo del huso, pero cada miembro de un par de cromosomas homólogos se asocia con microtúbulos que vienen de polos opuestos. Paso **3**: Durante la anafase de la meiosis I, los cromosomas homólogos, cada uno de los cuales presenta dos cromátidas, es traccionado hacia los polos opuestos del huso. Paso **4**: La citocinesis produce dos células hijas (ahora 2*n*), que entran en la meiosis II sin sufrir replicación del DNA. En la metafase de la meiosis II, mostrada aquí, las cromátidas que componen cada uno de los cromosomas replicados se asocian con microtúbulos del huso provenientes de polos opuestos, como lo hacen en la mitosis. Pasos **5** y **6**: La separación de las cromátidas a polos opuestos durante la segunda anafase meiótica, seguida de citocinesis, genera células germinales haploides (1*n*) que contienen una copia de cada cromosoma (llamada cromátida con anterioridad).

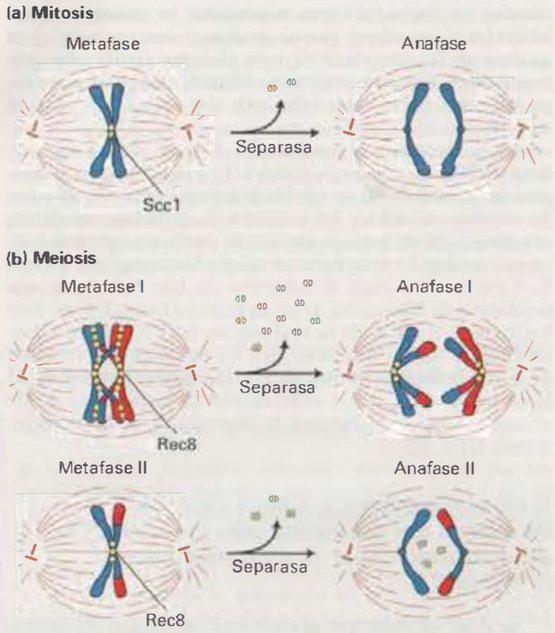
En *S. cervisiae*, en condiciones de inanición, se reprime la expresión de ciclinas G_1 (Cln1/2/3), lo que bloquea la progresión normal de G_1 en células que completaron la mitosis. En cambio, se induce un conjunto de proteínas meióticas tempranas. Entre éstos se encuentra *Ime2*, una proteincinasa que realiza la función esencial de los complejos ciclina G_1-CDK de fosforilar al inhibidor de fase S Sic1, lo que conduce a la liberación de complejos ciclina-CDK de fase S activos y al inicio de la replicación del DNA en la meiosis I (véase fig. 21-34, paso 1). La ausencia de expresión de la Ime2 durante la meiosis II y la represión continua de la expresión de Cln son responsables de la ausencia de replicación del DNA durante la segunda división meiótica (pasos 5 y 6).

El entrecruzamiento y el Rec8 específico de meiosis son necesarios para la separación especializada de los cromosomas durante la meiosis I

Se debe recordar que al comenzar la mitosis, las cromátidas hermanas replicadas durante la fase S al inicio están unidas por complejos de cohesina en varios puntos a lo largo de toda su longitud (véase fig. 21-19, *izquierda*). A medida que los cromosomas se condensan, los complejos de cohesina quedan restringidos a la región del centrómero y en la metafase las cromátidas hermanas que componen cada cromosoma (replicado) se asocian con microtúbulos que emanan de los polos opuestos del huso. Aunque las proteínas motoras traccionan las cromátidas hermanas hacia polos opuestos del huso, su movimiento es resistido en principio por los complejos de cohesina que las unen por el centrómero. La degradación posterior catalizada por la separasa de la subunidad Scc1 de la cohesina permite comenzar el movimiento de las cromátidas hacia los polos del huso, lo que anuncia el inicio de la anafase (fig. 21-35a; también véase fig. 21-19, *derecha*).

En la metafase de la meiosis I, ambas cromátidas hermanas de un cromosoma (replicado) se asocian con microtúbulos que provienen del *mismo* polo del huso, en lugar de polos opuestos, como sucede en la mitosis. Se piensa que dos uniones físicas entre los cromosomas homólogos resisten la fuerza de tracción del huso hasta la anafase: a) el entrecruzamiento entre cromátidas, una de cada par de cromosomas homólogos, y b) uniones cruzadas de cohesina entre las cromátidas, distales al punto de entrecruzamiento.

Las pruebas de la importancia del entrecruzamiento durante la meiosis de *S. cerevisiae* provienen de la observación de que cuando se bloquea la recombinación, por mutación de las proteínas esenciales para el proceso, los cromosomas se separan al azar durante la meiosis I; o sea, los cromosomas homólogos no siempre migran a los polos opuestos del huso. Esta separación hacia polos opuestos del huso por lo general se produce porque ambas cromátidas de pares de cromosomas homólogos se asocian con fibras del huso que emanan de polos opuestos del huso (véase fig. 21-34, paso 3). Esto



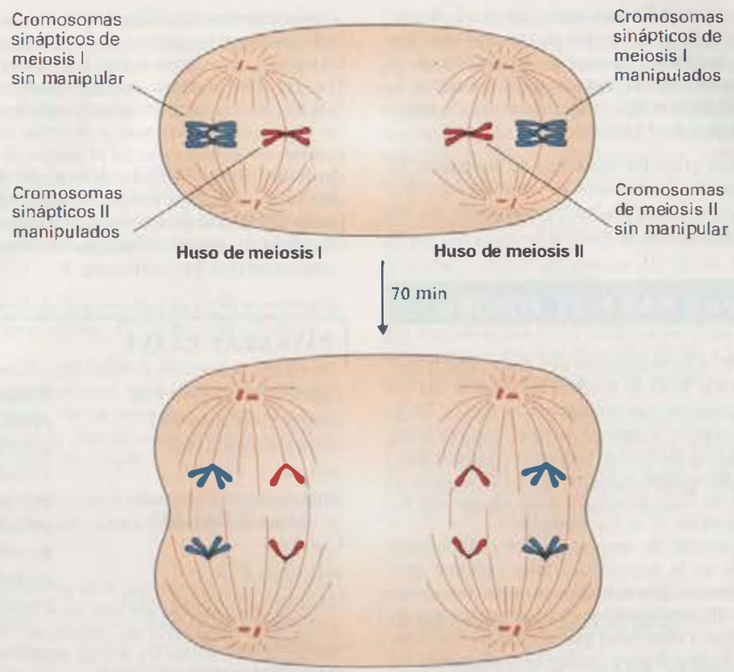
▲ Fig. 21-35. Función de la cohesina durante la mitosis y la meiosis. (a) Durante la mitosis, las cromátidas hermanas generadas por la replicación del DNA en la fase S están unidas al comienzo por complejos de cohesina en toda su longitud. Durante la condensación del cromosoma, los complejos de cohesina (amarillo) van quedando restringidos a la región del centrómero en metafase, como se ilustra aquí. Una vez que la separasa degrada la subunidad Scc1 de la cohesina, las cromátidas hermanas pueden separarse, lo que marca el comienzo de la anafase (véase fig. 21-19). (b) En la metafase de la meiosis I, el entrecruzamiento de las cromátidas materna y paterna produce la sinapsis de los cromosomas paternos homólogos. Las cromátidas de cada cromosoma replicado están unidas por uniones cruzadas de complejos de cohesina en toda su longitud. Rec8, un homólogo de Scc1 específico de la meiosis, se degrada en los brazos del cromosoma, pero no en el centrómero, lo que permite que los pares de cromosomas homólogos se separen en las células hijas. El Rec8 centromérico se degrada durante la meiosis II, lo que le posibilita a cada cromátida separarse hacia las células hijas. [Modificado de F. Uhlmann, 2001, Curr. Opin. Cell Biol. 13:754.]

requiere a su vez que los cromosomas homólogos se dispongan en pares durante la meiosis I, proceso llamado *sinapsis*, que puede visualizarse con el microscopio en los eucariontes que tienen cromosomas grandes. Por consiguiente, el hallazgo de que mutaciones que bloquean la recombinación también bloquean la separación apropiada en la meiosis I implica que la recombinación es necesaria para la sinapsis en *S. cerevisiae*. En los eucariontes superiores, otros procesos, además de la recombinación y la unión de las cromátidas mediante complejos de cohesina, contribuyen a la sinapsis en la meiosis I.

Durante la meiosis I, las uniones cruzadas de cohesina entre los brazos de los cromosomas son degradadas por la **separasa**, lo que permite que los cromosomas homólogos se separen, pero los complejos de cohesina del centrómero permanecen unidos (fig. 21-35b, *arriba*). El mantenimiento de la cohesión del centrómero durante la meiosis I es necesario para la **separación** apropiada de las cromátidas durante la meiosis II. En estudios recientes realizados con una mutante de *S. pombe* se demostró que una subunidad de cohesina especializada, *Rec8*, mantiene la cohesión centromérica entre cromátidas hermanas durante la meiosis I. Expresado sólo durante la meiosis, Rec8 es el homólogo de Sec1, la subunidad de cohesina que durante la mitosis forma el puente propiamente dicho entre cromátidas hermanas (véase fig. 21-19). En experimentos de inmunolocalización realizados con *S. pombe* se reveló que durante la anafase temprana de la meiosis I, Rec8 desaparece de los brazos del cromosoma, pero se mantiene en los centrómeros. Sin embargo, durante la anafase temprana de la meiosis II, el Rec8 centromérico es degradado por la separasa, para que las cromátidas puedan separarse, como lo hacen durante la mitosis (fig. 21-35b, *abajo*). Una proteína específica, expresada en la meiosis I, pero no en la II, protege el Rec8 centromérico de la degradación por la separasa durante la meiosis I.

Se demostró que el Rec8 de *S. cerevisiae* se localiza y funciona de forma similar que el Rec8 de *S. pombe*. También se identificaron homólogos de Rec8 en organismos superiores, y experimentos de interferencia de RNA (RNAi) realizados en *C. elegans* (cap. 9) indican que el homólogo de Rec8 en ese microorganismo tiene una función similar. Experimentos recientes de micromanipulación durante la espermatogénesis del saltamontes sustentan la hipótesis de que las proteínas de unión al cinetocoro protegen al Rec8 centromérico de la degradación durante la meiosis I, pero no durante la II, y también dirigen la unión del cinetocoro a microtúbulos que provienen del polo correcto del huso (fig. 21-36). Por lo tanto, el entrecruzamiento, Rec8 y proteínas especiales asociadas con el cinetocoro parecen actuar en la meiosis en todos los eucariontes.

Análisis recientes de micromatrices (*microarrays*) de DNA en *S. cerevisiae* revelaron la presencia de otras proteínas necesarias para la meiosis. Como se describió en otros capítulos, los investigadores pueden estudiar la transcripción de miles de genes, de hecho de genomas enteros, mediante micromatrices de DNA (véase fig. 9-35). Uno de los tantos genes que se expresan en las células de *S. cerevisiae* durante la meiosis, pero no durante la mitosis, es *MAM1*, que codifica una proteína llamada *monopolina*. Los estudios subsiguientes de mutagénesis específicas de gen revelaron que la deleción de *MAM1* hace que las cromátidas hermanas en la metafase de la meiosis I se asocien con el primer huso meiótico como si fueran cromátidas mitóticas o cromátidas de meiosis II. Esto es, los cinetocoros de las cromátidas hermanas que componen un solo cromosoma (replicado) se unen a microtúbulos que emanan de los polos opuestos del huso, en lugar de hacerlo del mismo polo. Este resultado indica que la monopolina es necesaria para la formación de un cinetocoro especializado en la meiosis I, responsable de la coorientación propia de las cromátidas hermanas de los cromosomas homólogos sinápticos de la primera división meiótica.



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 21-36 Los movimientos de la anafase y la cohesión de los cromosomas meióticos están determinados por proteínas asociadas con los cromosomas. Se fusionaron espermatocitos de saltamontes en meiosis I y II para que ambos tipos de husos con sus cromosomas asociados estuvieran presentes en una sola célula fusionada. Luego se usó una aguja de micromanipulación para mover algunos cromosomas de meiosis I (azul) y de meiosis II (rojo) de un huso al otro; otros cromosomas quedaron unidos a sus husos normales. Después de 70 minutos, ambos husos con sus respectivos cromosomas habían completado los movimientos de la anafase. Los cromosomas de meiosis I en sinapsis (azul) se separaron normalmente (o sea, un par homólogo hacia un polo del huso y el otro hacia el otro polo) más allá de que estuvieran unidos al huso de meiosis I *(izquierda)* o de meiosis II *(derecha)*. De forma similar, los cromosomas de meiosis II (rojo) se separaron con normalidad (esto es, una cromátida hacia un polo del huso y la otra hacia el otro) independientemente de a qué huso estaban unidos. Estos resultados indican que la asociación de los cinetocoros con los microtúbulos del huso y la estabilidad de las cohesinas que unen a los cromosomas están determinadas por factores asociados con los cromosomas y no por los husos o componentes solubles de células en meiosis I y II. [Véase L. V. Paliulis y R. B. Nicklas, 2000, J. Cell Biol. 150:1223.]

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 21.8

Meiosis: un tipo especial de división celular

- La meiosis involucra un ciclo de replicación de los cromosomas, seguido por dos ciclos de división celular para producir células germinales haploides a partir de una célula premeiótica diploide (véase fig. 21-34).
- Durante la meiosis I, los cromosomas homólogos replicados se disponen en pares en toda su longitud, en un proceso llamado sinapsis. Casi siempre se produce por lo menos una recombinación entre las cromátidas de cromosomas homólogos.
- La mayor parte de las proteínas del ciclo celular que funcionan en células en división mitótica también lo hacen en células en meiosis, pero algunas proteínas son propias de la meiosis.
- En *S. cerevisiae* la expresión de ciclinas de G_1 (Cln) se reprime durante toda la meiosis. La Ime2, específica de la meiosis, cumple la función de los complejos de ciclina-CDK de G_1 en lo que respecta a promover la iniciación de la replicación del DNA durante la meiosis I. La replicación del DNA no tiene lugar durante la meiosis II porque no se expresan Ime2 ni las ciclinas de G_1.
- En *S. cerevisiae*, la recombinación (entrecruzamiento) entre cromátidas de cromosomas paternos homólogos y la unión cruzada entre cromátidas, mediada por cohesina distal al entrecruzamiento, son las responsables de la sinapsis de los cromosomas homólogos durante la profase y la metafase de la meiosis I. Una subunidad de cohesina especializada, Rec8, reemplaza a la subunidad Scc1 de la cohesina durante la meiosis.
- Durante la anafase temprana de la meiosis I, el Rec8 presente en los brazos de los cromosomas se degrada, pero una proteína específica de la meiosis, asociada con el cinetocoro,

protege el Rec8 de la región del centrómero frente a la degradación. Como resultado, las cromátidas de cromosomas homólogos permanecen asociadas durante la segregación de la meiosis I. La degradación de Rec8 centromérico durante la anafase de la meiosis II permite que cada cromátida sea segregada hacia las células germinales (véase fig. 21-35b).

■ La monopolina, otra proteína específica de la meiosis, es necesaria para que ambas cromátidas de cromosomas homólogos se asocien con microtúbulos provenientes de los mismos polos del huso durante la meiosis I.

PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO

El ritmo notable de la investigación del ciclo celular durante los últimos 25 años llevó al modelo de control del ciclo celular de los eucariontes bosquejado en la figura 21-2. Una lógica hermosa subyace a estos controles moleculares. Cada evento de regulación tiene dos funciones importantes: activar un paso del ciclo celular y preparar la célula para el próximo evento del ciclo. Esta estrategia asegura que las fases del ciclo se produzcan en el orden apropiado.

Aunque la lógica general de regulación del ciclo celular parece bien establecida en la actualidad, falta conocer muchos detalles fundamentales. Por ejemplo, aunque los investigadores identificaron algunos componentes del complejo de prerreplicación que deben fosforilarse por acción de los complejos de CDK-ciclina de fase S para iniciar la replicación del DNA, otros componentes se desconocen. También se ignora todavía la mayor parte de los sustratos fosforilados por los complejos ciclina-CDK mitóticos, que llevan a la condensación de los cromosomas y la reorganización notable de los microtúbulos que produce el ensamblaje del bello huso mitótico. Queda mucho por conocer acerca de cómo se controlan las actividades de la cinasa Wee1 y la fosfatasa Cdc25; estas proteínas a su vez regulan la actividad cinasa de la subunidad CDK en la mayor parte de los complejos ciclina-CDK.

Mucho se descubrió en época reciente acerca de cómo operan los puntos de control del ciclo celular, pero los mecanismos que activan ATM y ATR en el punto de control de daño de DNA son poco conocidos. De la misma forma, queda mucho por saber acerca del control y el mecanismo de Mad2 en el punto de control del ensamblaje del huso, y de Cdc14 en el punto de control de la separación de cromosomas en las células superiores. Como se verá en el próximo capítulo, la división celular asimétrica tiene una importancia fundamental en el desarrollo normal de los organismos multicelulares. Quedan muchas dudas acerca de cómo se determina el plano de citocinesis y la localización de los cromosomas hijos en las células que se dividen de manera asimétrica. De forma similar, todavía no se dilucidaron los mecanismos subyacentes de la separación característica de las cromátidas durante la meiosis I.

MEDICINA

El conocimiento de estos aspectos detallados del control del ciclo celular tendrá consecuencias importantes, en particular para el tratamiento del cáncer. La radiación y muchas formas de quimioterapia producen daño al DNA y detención del ciclo celular en las células diana, lo que conduce a su apoptosis. Sin embargo, esta inducción de la apoptosis depende de la función del p53. Por esta razón, los cánceres humanos asociados con mutaciones de ambos alelos del *p53*, que son bastante frecuentes, son en particular resistentes a estos tratamientos. Si se conociera más acerca del control del ciclo celular y los puntos de control, podrían desarrollarse estrategias nuevas para tratar los cánceres negativos para p53. Por ejemplo, algunos agentes quimioterapéuticos inhiben la función de los microtúbulos interfiriendo en la mitosis. Células resistentes seleccionadas durante el curso del tratamiento pueden ser defectuosas en el punto de control de ensamblaje del huso, como resultado de mutaciones en los genes que codifican las proteínas comprometidas. Quizá la pérdida de este punto de control podría transformarse en una ventaja terapéutica. Sólo un mejor conocimiento de los procesos moleculares comprometidos lo confirmará. ■

PALABRAS CLAVE

caja de destrucción *863*
células en reposo *883*
ciclina mitótica *861*
ciclinas de G1 *876*
cinasas dependientes de ciclina (CDK) *855*
CIP *885*
cohesinas *872*
complejo promotor de la anafase (APC) *863*
condensina *870*
entrecruzamiento (*crossing over*) *890*
factor promotor de fase S (SPF) *876*
factor promotor de la mitosis (MPF) *860*
factores de especificidad del APC *863*
fosfatasa Cdc25 *866*
inhibidor de fase S *868*
interfase *854*
meiosis *890*
mitógenos *856*
proteína p53 *889*
proteína Rb *884*
proteínas E2F *834*
proteína-tirosincinasa Wee1 *866*
puntos de control *887*
punto de restricción *883*
punto de control de daño del DNA *889*
segurina *872*
sinapsis *892*

REVISIÓN DE CONCEPTOS

1. ¿Qué estrategia asegura que el pasaje a través del ciclo celular sea unidireccional e irreversible? ¿Cuál es el mecanismo molecular que subyace a esta estrategia?

2. Cuando se fusionan con una célula en fase S, las células que están en cuál de las siguientes fases del ciclo comenzarán la replicación del DNA en foma prematura: ¿G1? ¿G2? ¿M? Prediga el efecto que tendrá fusionar una célula en G_1 y una en G_2 con respecto al momento de la fase S en cada célula.

3. En 2001, el Premio Nobel de Fisiología o Medicina se otorgó a tres científicos investigadores del ciclo celular. Sir Paul Nurse fue galardonado por sus estudios con la levadura de fisión *S. pombe*, en particular por el descubrimiento y la caracterización del gen *wee1*. ¿Qué es el fenotipo wee? ¿Qué nos informa la caracterización del gen *wee1* acerca del control del ciclo celular?

4. Tim Hunt compartió el Premio Nobel 2001 por su trabajo de descubrimiento y caracterización de proteínas ciclinas en huevos y embriones. ¿Qué evidencia experimental indica que la ciclina B es necesaria para que una célula entre en mitosis? ¿Qué evidencia indica que la ciclina B debe destruirse para que una célula salga de la mitosis?

5. Leeland Hartwell, el tercer galardonado con el Premio Nobel 2001, recibió la distinción por su caracterización de los puntos de control del ciclo celular en la levadura de gemación *S. cerevisiae*. ¿Qué es un punto de control del ciclo celular? ¿Dónde se encuentran? ¿Cómo ayudan a conservar la fidelidad del genoma?

6. En *Xenopus*, uno de los sustratos del MPF es la fosfatasa Cdc25. Cuando es fosforilada por el MPF, Cdc25 se activa. ¿Cuál es el sustrato de Cdc25? ¿Cómo explica esta información la naturaleza autocatalítica del MPF como se describe en la figura 21-6?

7. Explique cómo se modula la actividad de CDK por acción de las siguientes proteínas: a) ciclina, b) CAK, c) Wee1, d) p21.

8. Tres sustratos conocidos del MPF o de cinasas reguladas por el MPF son las laminas nucleares, las subunidades de condensina y la cadena liviana de la miosina. Describa cómo afecta la fosforilación de cada una de estas proteínas su función y progresión a través de la mitosis.

9. Describa la serie de acontecimientos por la que el APC promueve la separación de las cromátidas hermanas en la anafase.

10. Una característica frecuente de la regulación del ciclo celular es que los acontecimientos de una fase aseguran la progresión a la siguiente. En *S. cerevisiae*, los complejos Cdc28-Cln catalizan la progresión a través de G1 y Cdc28-C1b la catalizan a través de S/G2/M. Nombre tres maneras por las que la actividad de Cdc28-Cln promueve la activación de Cdc28-Clb.

11. Para que la fase S se complete de forma oportuna, en los eucariontes la replicación del DNA comienza en varios orígenes. En *S. cerevisiae*, ¿qué papel tienen los complejos CDK-ciclina de fase S para asegurar que todo el genoma se replique una vez y solo una vez por ciclo celular?

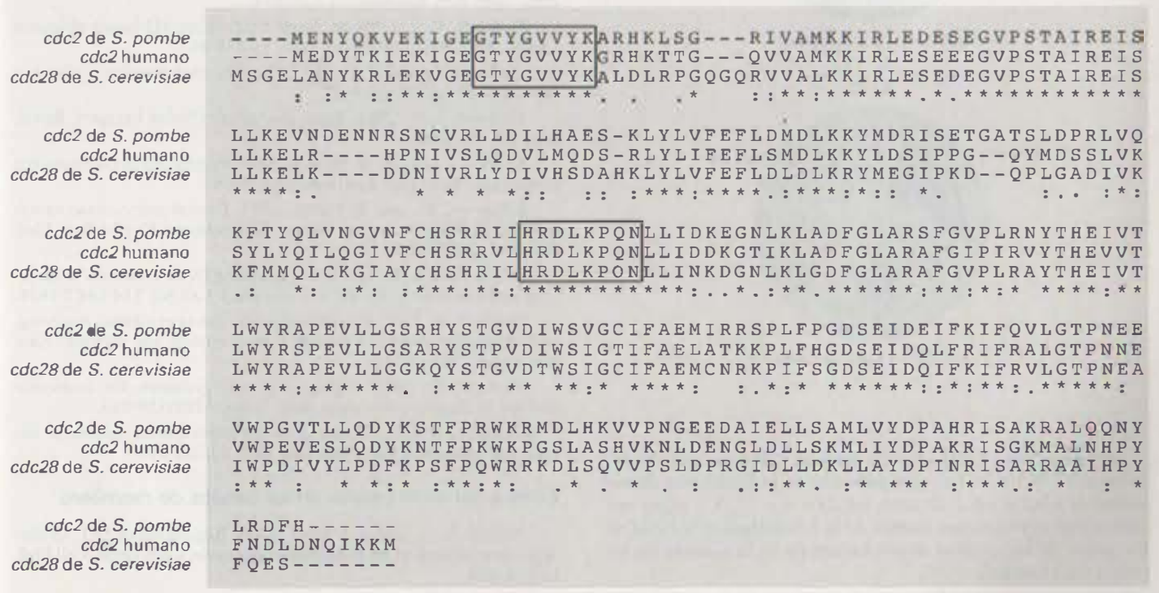
12. ¿Cuál es la definición funcional del punto de restricción? En los casos típicos las células cancerosas pierden el punto de control de restricción. Explique cómo las siguientes mutaciones, que se encuentran en algunas células cancerosas, conducen a una omisión de los puntos de control de restricción: a) sobreexpresión de ciclina D, b) pérdida de función de Rb, c) infección por retrovirus que codifican v-Fos y v-Jun.

13. Los individuos con el trastorno hereditario denominado ataxia telangiectasia padecen neurodegeneración, inmunodeficiencia y mayor incidencia de cáncer. La base genética de la ataxia telangiectasia es una mutación con pérdida de función del gen ATM (ATM = ataxia telangiectasia-mutado). Nombre dos sustratos del ATM. ¿Cómo conduce la fosforilación de estos sustratos a la inactivación de las CDK para forzar que el ciclo celular se detenga en un punto de control?

14. La meiosis y la mitosis en general son procesos análogos que involucran muchas proteínas iguales. Sin embargo, algunas funcionan sólo en uno de esos tipos de división celular. Explique la función específica en la meiosis de las siguientes: a) Ime2, b) Rec8, c) monopolina.

ANÁLISIS DE LOS DATOS

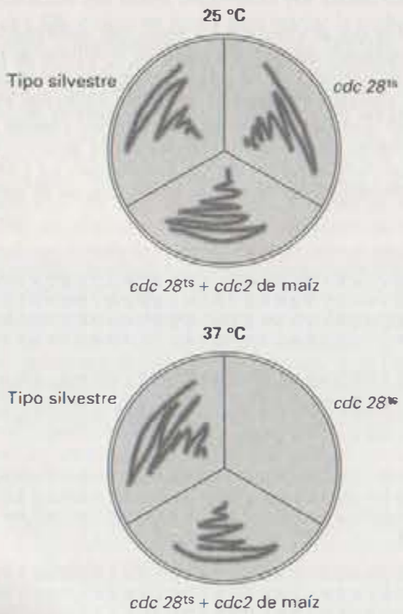
A medida que se clonaron los genes que codifican las cinasas dependientes de ciclina a partir de levaduras de fisión, levaduras de gemación y de células animales, los investigadores que trabajan en sistemas vegetales diseñaron experimentos para determinar si las plantas también poseían CDK que funcionaran como catalizadores para la progresión del ciclo celular. Para aislar un cDNA que codifica un CDK del maíz, los investigadores alinearon las secuencias de aminoá-



cidos de los genes *cdc2* humano, *cdc2* de *S. pombe* y *cdc28* de *S. cerevisiae* (véase la figura en la página anterior). Se generaron cebadores para PCR con oligonucleótidos degenerados correspondientes a los aminoácidos encerrados en el recuadro y se sintetizó mediante PCR un fragmento de DNA del tamaño esperado usando como molde estos cebadores y una genoteca de cDNA de maíz. ¿Por qué se seleccionaron las regiones recuadradas como base para el diseño del cebador?

El producto de la PCR se usó luego como sonda para revisar la genoteca de cDNA de maíz y se aisló un clon de cDNA de longitud completa. Se estableció la secuencia del clon y la secuencia de aminoácidos predicha fue un 64% idéntica a la del *cdc2* humano y un 63% idéntica al *cdc2* de *S. pombe* y al *cdc28* de *S. cerevisiae*. ¿Qué sugiere este nivel de similitud de secuencias acerca de la evolución de los genes *cdc2*?

Se realizó un experimento de complementación con células de *S. cerevisiae* que poseen una mutación del *cdc28* sensible a la temperatura. Las células de tipo silvestre, células *cdc28ts* y células *cdc28ts* transformadas con el cDNA del *cdc2* del maíz bajo la influencia de un promotor fuerte, se cultivaron a temperatura permisiva (25 °C) o restrictiva (37 °C). La proliferación celular se monitorizó por el desarrollo de colonias en placas de cultivo (como se muestra en la figura que sigue).



¿Por qué las células *cdc28ts* forman colonias a 25 °C pero no a 37 °C? ¿Cuál es el significado de la formación de colonias de células *cdc2* de maíz *cdc28ts* + a 37 °C? ¿Qué nos indica este experimento acerca de la homología funcional de los genes de las cinasas dependientes de ciclina entre las especies eucariontes?

BIBLIOGRAFÍA

Panorama general del ciclo celular y su control

Nasmyth, K. 2001. A prize for proliferation. Cell 107:689-701.

Estudios bioquímicos con ovocitos, huevos y embriones tempranos

Doree, M., and T. Hunt. 2002. From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? J Cell. Sci. 115:2461-2464.

Fang, G., H. Yu, and M. W. Kirschner. 1999. Control of mitotic transitions by the anaphase-promoting complex. Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B 354:1583-1590.

R. Jessberger, 2002. The many functions of SMC proteins in chromosome dynamics. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 3:67-78.

Y. Masui. 2001. From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: the history of discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF). Differentiation 69:1-17.

Estudios genéticos con *S. pombe*

Nurse, P. 2002. Cyclin dependent kinases and cell cycle control (Nobel Lecture). Chembiochem. 3:596-603.

Mecanismos moleculares de regulación de los eventos mitóticos

Burke, B., and J. Ellenberg, 2002. Remodeling the walls of the nucleus. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 3:487-497.

Nelson, W. J. 2000. W(h)ither the Golgi during mitosis? J. Cell Biol. 149:243-248.

Nigg, E. A. 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. Nature. Rev. Mol. Cell Biol. 2:21-32.

Estudios genéticos con *S. cerevisiae*

Bell, S. P., and A. Dutta. 2002. DNA replication in eukaryotic cells. Ann. Rev. Biochem. 71:333-374.

Deshaies, R. J. 1999. SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. Ann. Rev. Cell Devel. Biol. 15:435-467.

Diffley, J. F., and K. Labib. 2002. The chromosome replication cycle. J. Cell Sci. 115:869-872.

Hartwell, L. H. 2002. Yeast and cancer (Nobel Lecture). Biosci. Rep. 22:373-394.

Kelly, T. J., and G. W. Brown. 2000. Regulation of chromosome replication. Ann. Rev. Biochem. 69:829-880.

Kitagawa, K., and P. Hieter. 2001. Evolutionary conservation between budding yeast and human kinetochores. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2:678-687.

Lei, M., and B. K. Tye. 2001. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. J. Cell Sci. 114:1447-1454.

Nasmyth, K. 2001. Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. Ann. Rev Genet. 35:673-745.

Nasmyth, K. 2002. Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. Science 297:559-565.

Uhlmann, F. 2001. Chromosome cohesion and segregation in mitosis and meiosis. Curr. Opin. Cell Biol. 13:754-761.

Control del ciclo celular en las células de mamífero

Ekholm, S. V., and S. I. Reed. 2000. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. Curr. Opin. Cell Biol. 12:676-684.

Harper, J. W., J. L. Burton, and M. J. Solomon. 2002. The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. Genes Devel. 16:2179-2206.

Sears, R. C., and J. R. Nevins. 2002. Signaling networks that link cell proliferation and cell fate. J. Biol. Chem. 277: 11617-11620.

Sherr, C. J. 2001. The INK4a/ARF network in tumour suppression. Nature Rev Mol. Cell Biol. 2:731-737.

Puntos de control en la regulación del ciclo celular

Bardin, A. J., and A. Amon. 2001. Men and sin: what's the difference? Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2:815-826.

Osborn, A. J., S. J. Elledge, and L. Zou. 2002. Checking on the fork: the DNA-replication stress-response pathway. Trends Cell Biol. 12:509-516.

Pereira, G., and E. Schiebel. 2001. The role of the yeast spindle pole body and the mammalian centrosome in regulating late mitotic events. Curr. Opin. Cell Biol. 13:762-769.

Shah, J. V., and D. W. Cleveland. 2000. Waiting for anaphase: Mad2 and the spindle assembly checkpoint. Cell 103:997-1000.

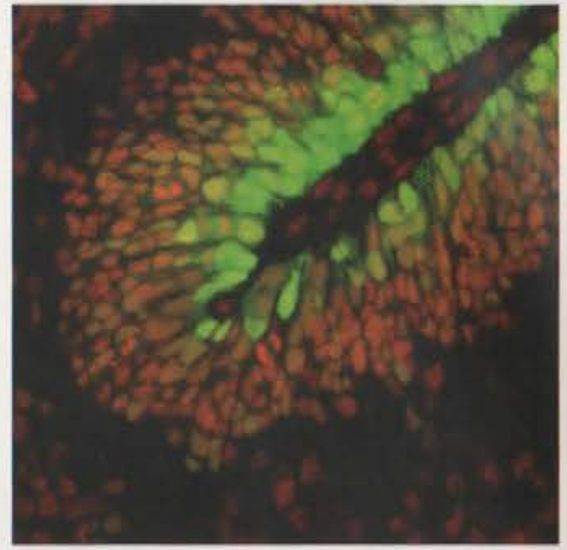
Meiosis: un tipo especial de división celular

Lee, B., and A. Amon. 2001. Meiosis: how to create a specialized cell cycle. Curr. Opin. Cell Biol. 13:770-777.

Petronczki, M., M. F. Siomos, and K. Nasmyth. 2003. Un menage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. Cell 112:423-440.

22

NACIMIENTO, LINAJE Y MUERTE DE LA CÉLULA



Células naciendo en el cerebelo en desarrollo. Todos los núcleos están marcados en rojo; las células verdes se están dividiendo y migran hacia capas internas del tejido neuronal. (Cortesía de Tal Raveh, Matthew Scott y Jane Johnson.)

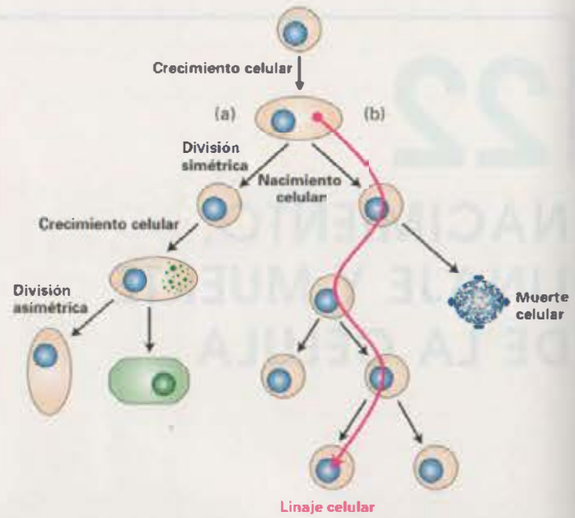
Durante la evolución de los organismos multicelulares surgieron mecanismos nuevos para diversificar tipos de células, coordinar su producción, regular su tamaño y cantidad, organizarlas en tejidos funcionales y eliminar las extrañas o envejecidas. El señalamiento entre las células comienza a ser más importante de lo que es para los organismos unicelulares. El modo de reproducción también cambia; algunas células comienzan a ser especializadas, como las células germinales (p. ej., los óvulos y los espermatozoides), dan origen a nuevos organismos y se distinguen del resto de las células del cuerpo, denominadas **células somáticas**. En condiciones normales las células somáticas nunca serán parte de un nuevo individuo.

La formación de los tejidos funcionales y de los órganos durante el desarrollo de un organismo multicelular depende en parte de patrones específicos de división celular mitótica. Una serie de estas divisiones semejantes a un árbol genealógico, denominada *linaje celular*, traza la determinación progresiva de las células y restringe su potencial de desarrollo y su *diferenciación* a tipos celulares especializados. Los linajes celulares están controlados por factores intrínsecos (internos), células que actúan de acuerdo con su historia y con reguladores internos, como también por factores extrínsecos (externos), como señales intercelulares y aportes ambientales (fig. 22-1). Un linaje celular comienza con las células madre (*stem cells*), células no especializadas que pueden reproducirse a sí mismas y generar indefinidamente células más especializadas. Su nombre proviene de la imagen de un tallo vegetal, que crece hacia arriba, continuando para formar más tallo, mientras se ramifica y extiende hacia los laterales. Un linaje celular, en definitiva, culmina en la formación de células diferenciadas, como las de la piel, las neuronas o las musculares. La diferenciación terminal suele ser irreversible y las células resultantes muy especializadas a menudo no pueden dividirse: sobreviven, llevan a cabo sus funciones durante variados períodos y luego se mueren.

Muchos linajes celulares contienen células intermediarias, referidas *como células precursoras* o *progenitoras*, cuyo potencial para formar diferentes clases de células diferenciadas es más limitado que el de las células madre, a partir de las cuales se originan. (Aunque algunos investigadores distinguen entre células precursoras y progenitoras, utilizaremos estos términos indistintamente.) Una vez que se crea un tipo de célula precursora nueva, suele producir factores de trans-

CONTENIDO

22.1 El nacimiento de las células
22.2 Especificación del tipo de célula en las levaduras
22.3 Especificación y diferenciación del músculo
22.4 Regulación de la división celular asimétrica
22.5 Muerte celular y su regulación



▶ Fig. 22-1. Esquema general del nacimiento, linaje y muerte de las células. Siguiendo el crecimiento, las células "nacen" como resultado de la división celular simétrica o asimétrica. (a) Las dos células hijas resultantes de la división simétrica son esencialmente idénticas entre sí y a la célula progenitora. Estas células hijas pueden tener luego destinos diferentes si son expuestas a señales distintas. Las dos células hijas resultantes de la división celular asimétrica difieren a partir del nacimiento y consecuentemente tienen destinos diferentes. La división asimétrica suele estar precedida por la localización de moléculas reguladoras (verdes) en una parte de la célula progenitora. (b) Una serie de divisiones celulares simétricas, asimétricas, o ambas denominada linaje celular, da lugar al nacimiento de cada uno de los tipos celulares especializados encontrados en un organismo multicelular. El patrón de linaje celular puede estar bajo un fuerte control genético. La muerte celular programada sucede durante el desarrollo normal (p. ej., en la membrana interdigital que inicialmente se desarrolla cuando crecen los dedos) y también en respuesta a la infección o al envenenamiento. Una serie de sucesos programados específicos, denominados apoptosis, se activa en estas situaciones.

cripción característicos de su destino. Estos factores de transcripción coordinadamente activan, o reprimen, una batería de genes que dirigen los procesos de diferenciación. Por ejemplo, algunos factores de transcripción reguladores clave crean los diferentes tipos de apareamiento de las levaduras y coordinan los numerosos genes necesarios para que una célula precursora se vuelva célula muscular, dos ejemplos que se analizarán en este capítulo.

Típicamente pensamos en los destinos celulares en función de los tipos celulares diferenciados que se forman. Un destino celular bastante diferente, la muerte celular programada, también es crucial en la formación y el mantenimiento de muchos tejidos. Un sistema regulador genético preciso, que revisa y balancea, controla la muerte celular, tal como otros programas genéticos controlan la diferenciación celular. En este capítulo consideramos el ciclo de vida de las células, su nacimiento, sus patrones de división (linaje) y su muerte. Estos aspectos de la biología celular convergen con la biología del desatrollo y están entre los procesos más importantes regulados por varias vías de señalización analizadas en capítulos anteriores.

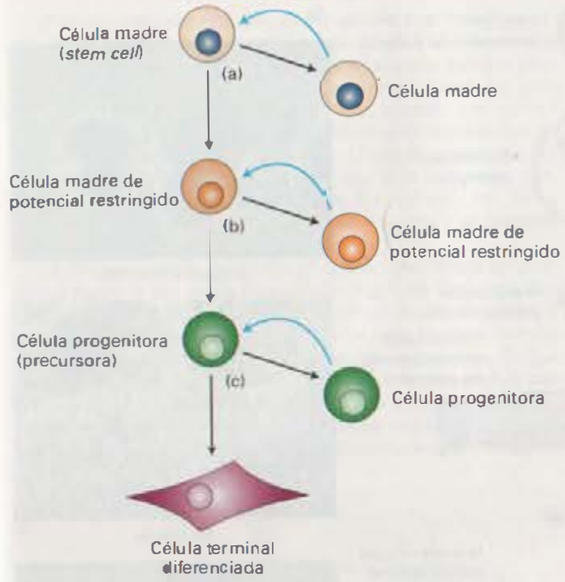
22.1 El nacimiento de las células

Muchas descripciones de la división celular implican que la célula progenitora da lugar a dos células hijas que se asemejan y comportan exactamente como aquella, es decir, la división celular es *simétrica* y la progenie no cambia sus propiedades. Sin embargo, si fuera así ninguno de los cientos de tipos celulares diferenciados podría formarse. Las diferencias entre las células surgen cuando dos células hijas inicialmente idénticas divergen al recibir distintas señales ambientales o del desarrollo. De manera alternativa, las dos células hijas pueden diferir a partir de su "nacimiento", con diferentes partes heredadas de la célula progenitora (véase fig. 22-1). Las células hijas producidas por esta división celular asimétrica pueden diferir en tamaño, forma, composición, o todos ellos, o sus genes pueden estar en diferentes estados de actividad o actividad potencial. Las diferencias en estas señales internas confieren destinos distintos a las dos células.

Aquí analizamos algunas características generales de cómo se generan diferentes tipos celulares, culminando con el linaje celular complejo mejor comprendido: el nematodo *Caenorhabditis elegans*. En la última sección, nos centramos en ejemplos de los mecanismos moleculares que determinan tipos celulares particulares en las levaduras, *Drosophila* y los mamíferos.

Las células madre generan otras células madre y células diferenciadas

Las células madre, que dan origen a las células especializadas que componen los tejidos del cuerpo, exhiben distintos patrones de división celular. Una célula madre puede dividirse simétricamente para producir dos células madre hijas idénticas a sí misma (fig. 22-2a). Como alternativa, una célula madre puede dividirse asimétricamente para generar una copia de sí misma y una célula madre derivada que tiene capacidades más restrictivas, como dividirse por un período limitado o dar origen a algunos tipos de progenie comparada con la célula madre progenitora (fig. 22-2b). Una célula madre *pluripotencial* (o multipotencial) tiene la capacidad de generar una cantidad de diferentes tipos celulares, pero no todos. Por ejemplo, una célula madre sanguínea pluripotencial formará más de sí misma más múltiples tipos de células sanguíneas, pero nunca una célula de la piel. En cambio, una célula madre *unipotencial* se divide para formar una copia de sí misma más una célula que puede formar sólo un tipo celular. En muchos casos, la división asimétrica de una célula madre genera una célula progenitora, que se embarcará en una vía de diferenciación o en una célula diferenciada terminal (fig. 22-2c,d).



▲ Fig. 22-2. Patrones de la división de una célula madre. (a) La división de una célula madre (*stem cell*) produce dos células, una de las cuales es una célula madre igual a la célula que le dio origen. Así se mantiene la población de células madre. (b) La otra célula hija, una célula madre de potencial más restringido, comienza en una vía hacia la producción de más células diferenciadas. Cuando se divide, una de las hijas será de la misma clase de célula madre de potencial restringido como la que le dio ongen y la otra será una célula precursora para un cierto tipo de célula diferenciada. Las células progenitoras (precursoras) pueden dividirse para reproducirse a sí mismas y, en respuesta a señales apropiadas, pueden diferenciarse en una célula que no se divide, terminalmente diferenciada.

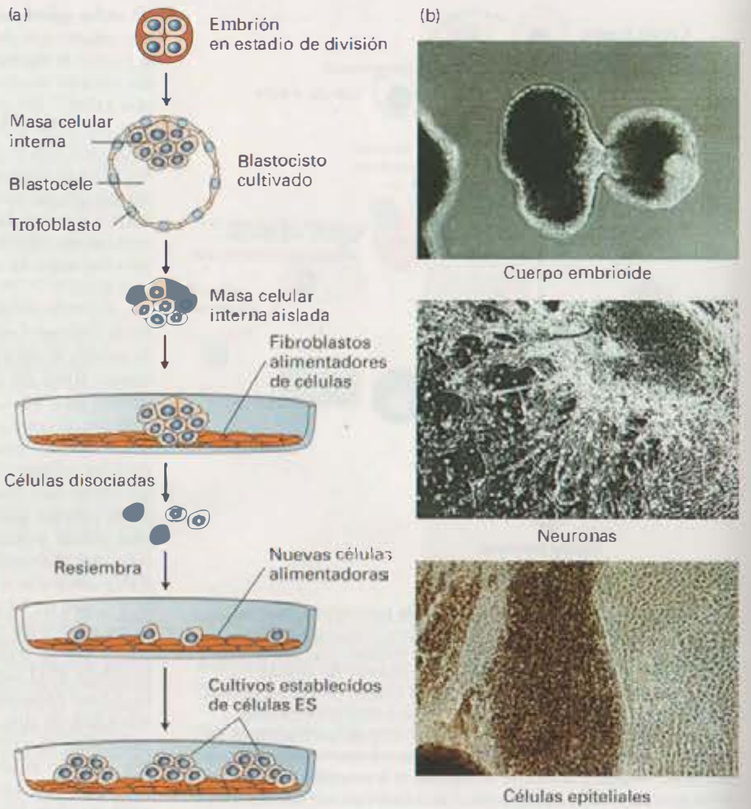
Las dos propiedades críticas de la célula madre que la distinguen de todas las otras células son la capacidad de reproducirse a sí misma indefinidamente, a menudo denominada *autorrenovación*, y la capacidad de dividirse asimétricamente para formar una célula madre hija idéntica a sí misma y una célula hija que es diferente y casi siempre de potencial más restringido. A este respecto, la división mitótica de las células madre preserva una población de células indiferenciadas mientras continuamente produce una corriente de células diferenciadas. Aunque algunos tipos de células precursoras pueden dividirse simétricamente para formar más de sí mismas, sólo lo hacen por períodos limitados. Más aún, a diferencia de las células madre, si una célula precursora se divide asimétricamente, se generan dos células hijas distintas, ninguna de las cuales es idéntica a la célula precursora progenitora.

Un huevo fecundado, o cigoto, es la célula totipotencial suprema porque tiene la capacidad de generar todos los tipos celulares del cuerpo. Si bien no es técnicamente una célula madre porque no se autorregenera, el cigoto da origen a células con propiedades de célula madre. Por ejemplo, los embriones tempranos de ratón pasan a través de un estadio de ocho células en el cual cada célula puede dar origen a cualquier tipo de célula del embrión. Si las ocho células se separan de manera experimental y se implantan por separado en una madre sustituta, cada una puede formar un ratón entero sin perder partes. Este experimento demuestra que las ocho células son capaces de formar cada tejido; es decir que son *totipotenciales*. Por lo tanto, la subdivisión de las células embrionarias tempranas para construir diferentes partes del cuerpo y diferenciarse en distintos tejidos no ocurre irreversiblemente en el estadio de ocho células. En el estadio de 16 células, esto ya no es más verdad; algunas de las células están comprometidas a vías de diferenciación particulares.

A partir de una célula precursora común pueden surgir tipos celulares especializados bastante diferentes. Una célula madre hematopoyética puede dar origen a todos los diversos tipos de células sanguíneas. Sin embargo, no se requiere una serie entera de divisiones celulares; una simple división de una célula precursora pluripotencial puede producir distinta progenie. Por ejemplo, estudios de linaje en el cual las células están marcadas por una infección estable con un retrovirus detectable han demostrado que las neuronas y las células gliales pueden surgir de una sola división de una célula precursora particular. Estos tipos celulares son bastante diferentes: las neuronas propagan y transmiten señales eléctricas y las células gliales proporcionan aislamiento y soporte. El precursor que genera las neuronas y las células gliales no es una célula madre, ya que es incapaz de autorregenerarse; presumiblemente la neurona, precursor de la célula glial surge de una célula madre anterior en el linaje. Observaciones recientes han sugerido la interesante posibilidad de que las células madre de un tejido pueden ser inducidas en ciertas condiciones a actuar como células madre para un tejido bastante diferente. Como analizamos más adelante, los animales posnatales contienen células madre para muchos tejidos incluidos los de la sangre, el intestino, la piel, los ovarios, los testículos, los músculos y el hígado. Aun algunas partes del cerebro adulto, en el que normalmente ocurre muy poca división celular, tienen una población de células madre. En los músculos y el hígado, la importancia de la función regeneradora de las células madre es máxima, ya que en estos tejidos adultos hay relativamente poca división celular.

Las células madre embrionarias cultivadas pueden diferenciarse en diversos tipos celulares

Las células madre embrionarias (*embrionic stem* [ES] *cells*) pueden ser aisladas de embriones de mamífero tempranos y crecer en cultivo (fig. 22-3a). Las células ES cultivadas pueden diferenciarse en una amplia variedad de tipos celulares, tanto in vitro o después de su reinserción en un embrión huésped. Cuando las células ES humanas crecen en un cultivo en suspensión primero se diferencian en agregados multicelulares, denominados cuerpos embrioides, que se reensamblan en embriones tempranos en los tejidos que forman. Cuando se los transfiere luego a un medio sólido, crecen en forma de hojas de células confluentes que contienen diversos tipos celulares diferenciados incluidas células neuronales y células epiteliales pigmentadas y no pigmentadas (fig. 22-3b). En otras condiciones, las células ES han sido inducidas a diferenciarse en precursores para diferentes tipos de células sanguíneas.



▶ **FIGURA EXPERIMENTAL 22-3 Se pueden mantener en cultivo las células madres embrionarias (ES) y formar tipos celulares diferenciados.** (a) Se hacen crecer blastocistos de embriones humanos en etapa de división inicial, obtenidos por fertilización in vitro. Se separa la masa celular interna de los tejidos extraembrionarios que la rodean y se la siembra sobre una capa de fibroblastos que ayudan a nutrir las células embrionarias. Las células individuales son resembradas y forman colonias de células ES, que pueden ser mantenidas por muchas generaciones y almacenarse congeladas. (b) Cultivo en suspensión, células ES humanas diferenciadas en agregados multicelulares (cuerpos embrioides) (*arriba*). Después que los cuerpos embrioides son transferidos a un medio sólido gelatinizado, se diferencian en láminas de células confluentes que contienen varios tipos celulares diferenciados incluidas células neuronales (*al medio*) y células epiteliales pigmentadas y no pigmentadas (*abajo*). [Partes (a) y (b) adaptadas de J. S. Odorico et al., 2001, *Stem Cells* 19:193-204.]

MEDICINA

La posibilidad de utilizar células madre en terapéutica para restaurar o reemplazar tejidos dañados es tema de mucha investigación sobre cómo reconocer y cultivar estas células notables a partir de embriones y de diferentes tejidos en animales posnatales (adultos). Por ejemplo, si las neuronas que producen el neurotransmisor dopamina pudieran generarse de células madre crecidas en cultivo, sería posible tratar a personas con la enfermedad de Parkinson que han perdido muchas neuronas. Para que un enfoque así suceda, se debe encontrar una vía para dirigir una población de células embrionarias o madre para formar el tipo correcto de neuronas productoras de dopamina, y se debe prevenir el rechazo por parte del sistema inmune. En un estudio en desarrollo en el cual se trasplantaron neuronas embrionarias en más de 300 pacientes con Parkinson, algunas de las células insertadas sobrevivieron durante más de 12 años y proporcionaron un mejoramiento clínico significativo. Sin embargo, el tejido fetal utilizado en este estudio es escaso y su uso es controversial. Las células madre cultivadas de embriones muy tempranos son otra opción para tratar la enfermedad de Parkinson y tal vez otros trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer. Existen similares posibilidades para generar células sanguíneas, pancreáticas y otros tipos celulares. Deben responderse numerosas cuestiones importantes antes de que la factibilidad de utilizar células madre para tales propósitos pueda probarse de manera adecuada. ▮

Aparte de su posible beneficio en el tratamiento de enfermedades, se demostró que las células ES son invalorables para la producción de ratones mutantes útiles para el estudio de un amplio rango de enfermedades, mecanismos del desarrollo, comportamiento y fisiología. Mediante técnicas descritas en el capítulo 9, es posible eliminar o modificar la función de un gen específico en una célula ES (véase fig. 9-38). Luego las células ES mutadas pueden emplearse para producir ratones con un gen desactivado (***knockout***) (véase fig. 9-39). El análisis de los efectos causados por una deleción o modificación de un gen de esta forma a menudo proporciona pistas acerca del funcionamiento normal del gen y de su proteína codificada.

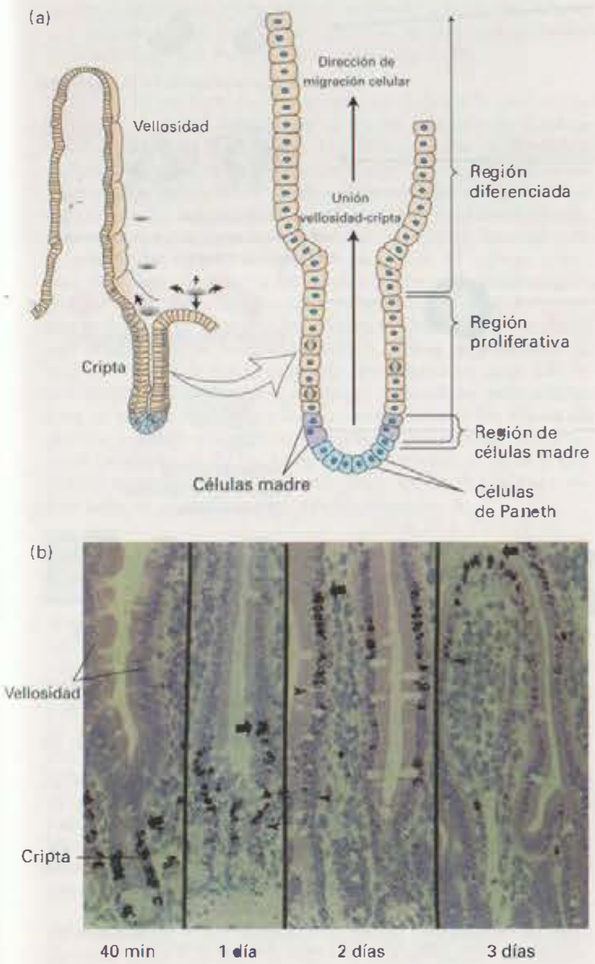
Los tejidos son mantenidos por poblaciones asociadas de células madre

Muchos tipos celulares diferenciados son recambiados del cuerpo o tienen períodos de vida más cortos que el del organismo. Las enfermedades o el trauma también pueden llevar a la pérdida de células diferenciadas. Puesto que estas células por lo general no se dividen, deben ser reabastecidas de poblaciones de células madre cercanas.

Nuestra piel, por ejemplo, es un epitelio con múltiples capas (la epidermis) bajo el cual subyace una capa de células madre que dan origen tanto a más de sí mismas como a *queratinocitos*, el principal tipo de célula cutánea. Luego los queratinocitos se mueven hacia la superficie externa, y se tornan cada vez más aplanados y llenos de filamentos intermedios de queratina. Se requieren alrededor de 15-30 días para que un queratinocito recién "nacido" en la capa más interna se diferencie y se mueva a la capa superior. En realidad, las "células" que forman la capa superior están muertas y se desprenden continuamente de la superficie.

A diferencia de la epidermis, el epitelio que reviste el intestino delgado es una única capa celular (fig. 6-4). Esta capa delgada evita la entrada de toxinas y patógenos en el cuerpo y también transporta nutrientes esenciales para la supervivencia desde la luz intestinal hacia el interior del cuerpo (cap. 7). Las células del epitelio intestinal se regeneran continuamente de una población de células madre ubicada en lo profundo de la pared intestinal en depresiones denominadas *criptas* (fig. 22-4a). Las células madre producen células precursoras que proliferan y se diferencian a medida que ascienden por los flancos de las criptas para formar la capa superficial de las proyecciones digitiformes intestinales denominadas *vellosidades*, a través de las cuales se produce la absorción intestinal. Los experimentos de marcación con pulso y caza mostraron que el tiempo transcurrido desde el nacimiento celular en las criptas hasta la pérdida de las células en la punta de las vellosidades es sólo de 2 o 3 días (fig. 22-4b). De esta manera, es necesaria una producción continua de células para mantener el epitelio intacto. La producción de nuevas células está controlada con minuciosidad: si las divisiones son insuficientes se eliminarían las vellosidades, lo que conduciría al colapso de la superficie intestinal; demasiadas divisiones crearían un epitelio excesivamente grande y también podrían ser un paso hacia el cáncer.

Se requieren señales específicas para crear y mantener las poblaciones de células madre. Tanto en la piel como en el epitelio intestinal, su crecimiento está regulado en parte por la *β-catenina*, una proteína que ayuda a conectar ciertas uniones entre célula y célula al citoesqueleto (véase fig. 6-7) y también funciona como un transductor de señales en la vía Wnt (véase fig. 15-32). La activación de la β-catenina mueve las células desde la epidermis hacia los destinos del cabello o vello. Por el contrario, la eliminación de la β-catenina de la piel de ratones genéticamente modificados elimina los destinos de las células a cabello o vello. Por lo tanto, las células madre epiteliales forman sólo epidermis, no células del cabello. Por ende, la β-catenina actúa como un interruptor entre destinos celulares alternativos. La sobreproducción de β-catenina activa conduce a la proliferación excesiva del epitelio intestinal. El bloqueo de la función de la β-catenina, mediante la interferencia con el factor de transcripción TCF que lo activa, elimina las células madre en el intestino. Parece probable que la señalización Wnt, o al menos los componentes de la vía intracelular, sea crítica para la formación, el mantenimiento o la activación de las células madre de diversos tejidos.

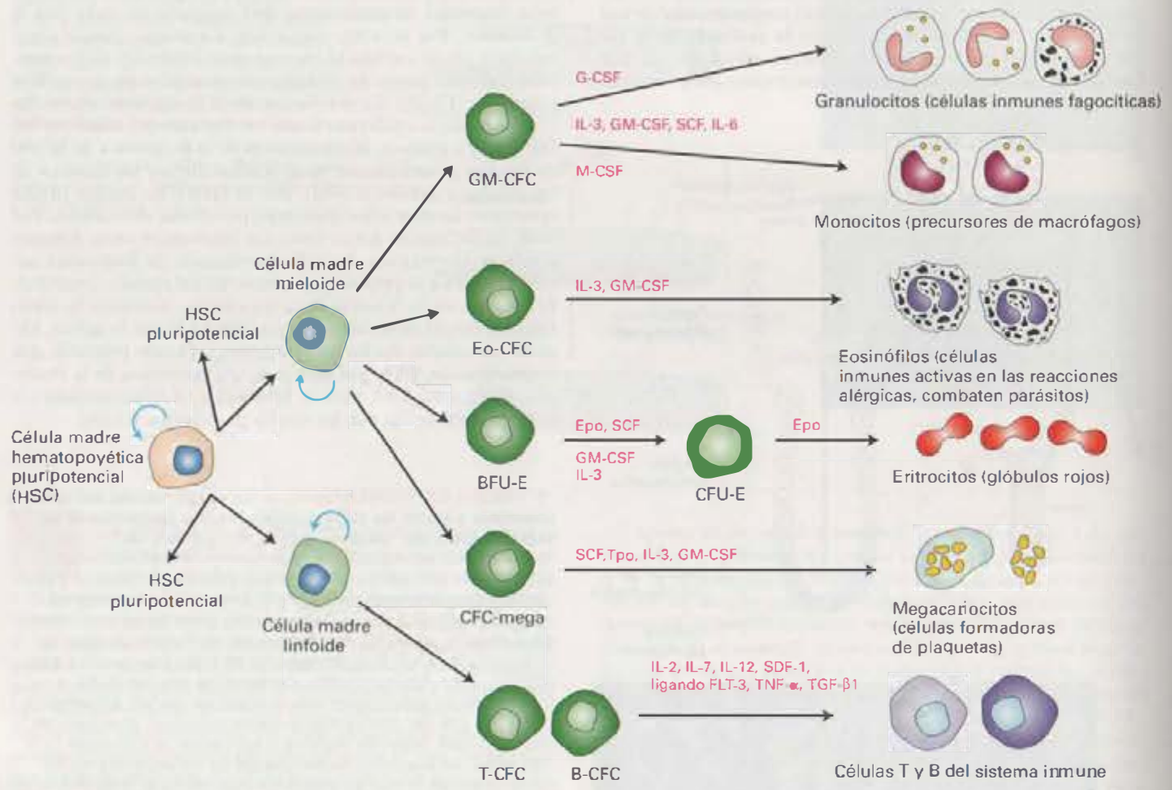


◀ **FIGURA EXPERIMENTAL 22-4 La regeneración del epitelio intestinal a partir de células madre puede demostrarse en experimentos de "pulso y caza".** (a) Esquema del revestimiento del intestino delgado, que contiene numerosas vellosidades formadas a partir de una columna de células. Estas células epiteliales nacen cerca de la base de las depresiones (criptas) ubicadas entre las vellosidades. Localizadas en el fondo de las criptas se encuentran las células de Paneth, un tipo de células de soporte; justo por encima de éstas hay cuatro a seis células madre, que se dividen alrededor de una vez al día, y forman células precursoras que también se dividen activamente. A medida que las células diferenciadas entran en el epitelio de una vellosidad, dejan de dividirse y comienzan a incorporar nutrientes del intestino. (b) Resultados de un experimento de pulso y caza en el cual se añadió timidina marcada radiactivamente (el pulso) a un cultivo de tejido del epitelio intestinal. Las células en división incorporaron la timidina marcada a su DNA recién sintetizado. La timidina marcada fue eliminada mediante lavados y reemplazada por timidina no marcada (la caza) luego de un breve período; las células que se dividieron luego de la etapa de caza no se marcaron. Estas microfotografías muestran que 40 minutos después del marcado, todas las marcas se observan en células próximas a la base de la cripta. Con posterioridad, las células marcadas se ven progresivamente más alejadas de su sitio de nacimiento en la cripta. Las células en la parte superior son despojadas. Este proceso asegura el constante reabastecimiento del epitelio intestinal con nuevas células. [Parte (a) adaptada de C. S. Potten, 1998, *Philos. Trans. R. Soc. Londres, Ser.* B 353:821. Parte (b) cortesía de C. S. Potten, de P. Kaur y C. S. Potten, 1986, *Cell Tiss. Kinet.* 19:601.]

MEDICINA La piel también contiene células T epidérmicas dendríticas, una célula del sistema inmune que produce una cierta forma del receptor de las células T (véase cuadro 14-1). Cuando células T dendríticas epidérmicas se modifican genéticamente de manera que no produzcan receptores de células T, la cicatrización de heridas es lenta y menos completa que en la piel normal. La curación normal se restablece mediante adición del factor de crecimiento de queratinocitos. La hipótesis vigente es que cuando las células dendríticas epidérmicas reconocen antígenos sobre las células en tejidos dañados, responden produciendo proteínas estimulantes, como el factor de crecimiento de queratinocitos, que promueve el crecimiento de queratinocitos y la cicatrización de las heridas. Muchas otras señales controlan también el crecimiento de células epiteliales, incluido Wnt/β-catenina, Hedgehog, calcio, factor de crecimiento y transformación α (TGFα) y TGFβ. Descubrir cómo estas señales trabajan en conjunto para controlar el crecimiento y estimular la curación producirá un cambio sustancial que aumentará nuestra comprensión de enfermedades como la psoriasis y el cáncer de piel, y quizás allane el camino para elaborar tratamientos eficaces. ▮

Otro tejido con continuo recambio es la sangre, cuyas células madre se ubican en la médula ósea en los animales adultos. Todos los diversos tipos de células sanguíneas derivan de un único tipo de *célula madre hematopoyética pluripotencial*, que da origen a las células madre mieloide y linfoide, más restringidas (fig. 22-5). La frecuencia de las células madre hematopoyéticas es de alrededor de 1 célula por cada 10^4 células de la médula ósea, aún menor que la frecuencia de las células madre intestinales en las criptas. Los numerosos factores de crecimiento extracelulares denominados citocinas regulan la proliferación y diferenciación de las células precursoras para diversos linajes de células sanguíneas. Por ejemplo, la eritropoyetina puede activar varias vías intracelulares de transducción de señales, y conducir a cambios en la expresión génica que promueven la formación de eritrocitos (véase fig. 14-7).

El linaje hematopoyético se desarrolló inyectando diversos tipos de células precursoras en ratones cuyas células precursoras habían sido en un principio aniquiladas mediante radiación. Al observar cuáles células sanguíneas fueron restituidas en estos experimentos de trasplante, los investigadores pudieron inferir qué precursores o células diferenciadas terminalmente (p. ej., eritrocitos, monocitos) surgen de un tipo de precursor en particular. El primer paso en estos experimentos fue la separación de los diferentes tipos de precursores hematopoyéticos. Esto es posible porque cada tipo produce combinaciones únicas de proteínas de superficie celular que pueden servir como marcadores específicos del tipo. Si los extractos de médula ósea se tratan con anticuerpos marcados con fluorocromo contra estos marcadores, se puede separar las células con diferentes marcadores de superficie en un clasificador celular activado por fluorescencia (véase fig. 5-34).

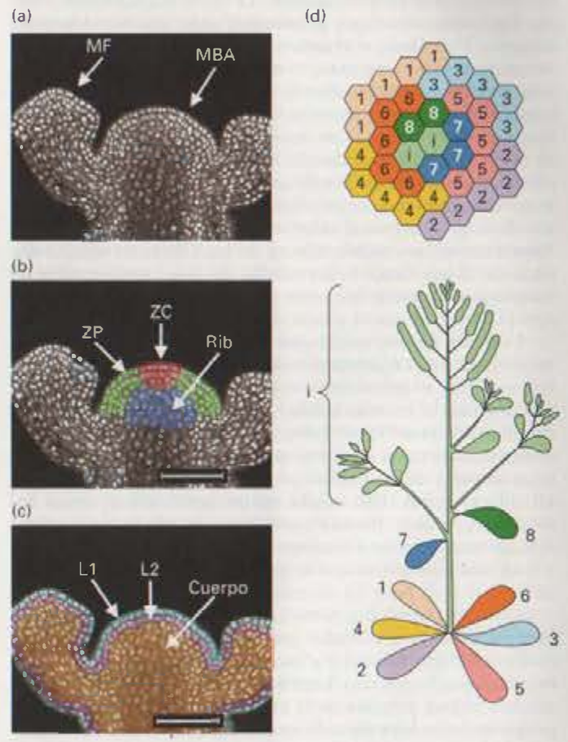


▲ Fig. 22-5. Formación de células sanguíneas diferenciadas a partir de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea. Las células madre pluripotenciales se pueden dividir simétricamente para autorrenovarse (flecha curva) o dividirse asimétricamente para formar una célula madre mieloide o linfoide (verde claro) y una célula hija que es pluripotencial como la célula de origen. Aunque estas células madre son capaces de autorrenovarse, están comprometidas a uno de los tres linajes hematopoyéticos. Según los tipos y cantidades de las citocinas presentes, las células mieloide y linfoide generan diferentes tipos de células precursoras (verde oscuro), que son incapaces de autorrenovarse. Las células precursoras se detectan por su capacidad para formar colonias que contienen los tipos celulares diferenciados que se muestran a la derecha, cuantificados como "células formadoras de colonias (CFC)". Las colonias se detectan en el bazo de animales a los que se le han eliminado sus propias células y se les han introducido células precursoras. La posterior proliferación, compromiso y diferenciación de las células precursoras, inducidas por citosina, da origen a los distintos tipos de células sanguíneas. Se indican algunas de las citocinas que sustentan este proceso (marcas rojas). GM: granulocito-macrófago; Eo: eosinófilo; E: eritrocito; mega: megacariocito; T: célula T; B: célula B; CFU: unidad formadora de colonia; CSF: factor estimulante de colonias; IL: interleucina; SCF: factor de la célula madre; Epo: eritropoyetina; Tpo: trombopoyetina; TNF: factor de necrosis tumoral; TGF: factor de crecimiento transformador; SDF: factor derivado de célula estromal; FLT-3: ligando para receptor tirosincinasa 3 similar a fms. (Adaptado de M. Socolovsky et al., 1998, *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* USA 95:6573.)

MEDICINA Hasta la fecha, los trasplantes de médula ósea representan el uso de células madre más exitoso y difundido en la medicina. Las células madre en la médula trasplantada pueden generar nuevas células sanguíneas funcionales en los pacientes con ciertas enfermedades sanguíneas hereditarias y en los pacientes con cáncer que recibieron irradiación y/o quimioterapia, las cuales destruyen tanto las células de la médula ósea como las células cancerosas. El trabajo actual está dirigido a explorar si las células madre embrionarias pueden ser inducidas a diferenciarse en tipos celulares terapéuticamente útiles. Por ejemplo, las células madre de ratón tratadas con inhibidores de fosfatidilinositol-3 cinasa, un regulador en una de las vías de señalización de fosfoinosítidos (cap. 14), se convierten en células que se asemejan a las células pancreáticas β en su producción de insulina, su sensibilidad a los niveles de glucosa y su aglomeración en estructuras que evocan las estructuras pancreáticas. El implante de estas células en ratones diabéticos restableció su crecimiento, peso, niveles de glucosa y velocidades de supervivencia a niveles normales. ▮

PLANTAS Las células madre en las plantas se localizan en los meristemas, poblaciones de células no diferenciadas que se encuentran en las puntas de los retoños en crecimiento. Los meristemas de los brotes apicales (MBA) producen hojas y retoños, y por supuesto más células madre que constituyen los casi inmortales meristemas. Éstos pueden persistir durante miles de años en especies longevas como las secuoyas y el pino del Colorado (*Pinus aristata*). A medida que una planta crece, las células "dejan atrás" los meristemas, son encerrados en paredes celulares rígidas y no pueden crecer más. Los MBA pueden dividirse para formar ramas, cada una con sus propias MBA, o convertirse en meristemas florales (fig. 22-6). Los meristemas florales dan origen a los cuatro órganos florales –sépalos, estambres, carpelos y pétalos– que forman las flores. A diferencia de los MBA, los meristemas florales se agotan gradualmente a medida que dan origen a los órganos florales.

Se descubrió que numerosos genes regulan la formación, el mantenimiento y las propiedades de los meristemas. Muchos de estos genes codifican factores de transcripción que dirigen la progenie de células madre a lo largo de distintos caminos de diferenciación. Por ejemplo, una jerarquía de reguladores, particularmente factores de transcripción, controla la separación de células diferenciadas de los MBA a medida que se forman las hojas; de manera similar, tres tipos de reguladores controlan la formación de los órganos florales a partir de los meristemas florales (cap. 15). En ambos casos tiene lugar una cascada de interacciones genéticas, en que los primeros factores de transcripción provocan la producción de los últimos. Al mismo tiempo, las células se dividen y las que se diferencian son esparcidas desde sus sitios originales de nacimiento. ▮



▲ Fig. 22-6. Destinos celulares en meristemas de *Arabidopsis*. En estas secciones longitudinales a través de un brote de meristema apical, los núcleos celulares se revelan mediante tinción con yoduro de propidio, que se une al DNA. (a) El meristema del brote apical (MBA) produce brotes, hojas y más meristemas. La producción de flores tiene lugar cuando el meristema alterna de producción de hojas/brotes a la producción de flores, concomitante con un incremento del número de células para formar meristemas florales (MF), como se muestra aquí. (b) Las células en un MBA exhiben diferentes destinos y comportamientos. Las células se dividen rápidamente en la zona periférica (ZP) para producir hojas y en la zona rib (Rib) para producir estructuras centrales de brotes. Las células en la zona central (ZC) se dividen más lentamente, producen una fuente continua de meristemas y proveen células a ZP y Rib. (c) Las capas del meristema, aquí en colores, derivan (clonadas) de la misma célula precursora. Los destinos de las células en diferentes posiciones en la capa L2 se muestran codificados por color en la parte (d). Barra (escala), 50 μm. [Parte (a)-(c) de E. Meyerowitz, 1997, *Cell* 88:299; microfotografías cortesía de Elliot Meyerowitz. Parte (d) según C. Wolpert et al., 2002, *Principles of Development*, 2d ed. (Oxford: Oxford University Press.]

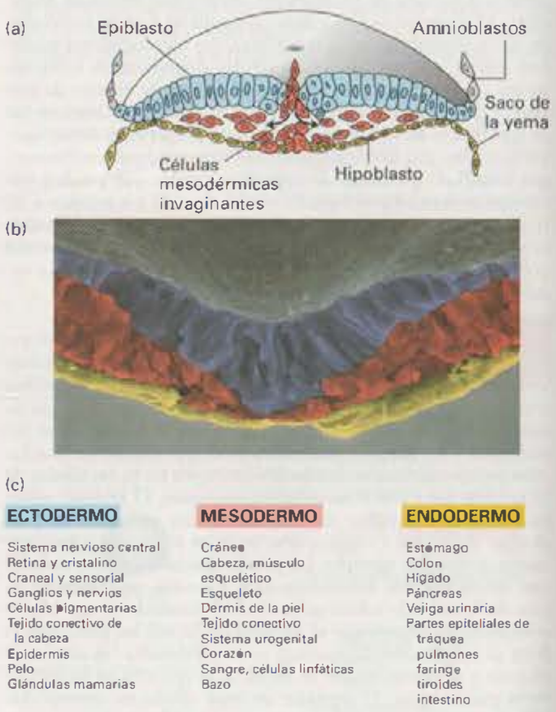
Los destinos celulares se restringen progresivamente durante el desarrollo

Las ocho células resultantes de las tres primeras divisiones de un cigoto de mamífero (huevo fecundado) tienen la misma apariencia. Como se demostró experimentalmente en las ovejas, cada una de las células tiene el potencial de dar origen a un animal completo. Las divisiones adicionales producen una masa, compuesta de ≈64 células, que se separa en dos tipos celulares: el trofoectodermo, que formará tejidos extraembrionarios como la placenta, y la *masa celular interna*, que da origen al propio embrión. La masa celular interna forma finalmente tres capas germinales, cada una con diferentes destinos. Una capa, el ectodermo, constituirá las células epidérmicas y nerviosas; otra, el mesodermo, dará origen al tejido conectivo y muscular; la tercera capa, el endodermo, constituirá el epitelio intestinal (fig. 22-7). Esta conclusión se basa en experimentos con animales quiméricos compuestos de células de pollo y codorniz. Los embriones compuestos de células de ambas especies de aves se desarrollan con bastante normalidad, aunque las células derivadas de cada donador son distinguibles con el microscopio. De esta forma, pueden determinarse las contribuciones de las diferentes células donadoras al ave final. Si las células de una capa germinal se trasplantan a una de las otras capas, no dan origen a células apropiadas a su nueva ubicación.

Una vez que se establecen las tres capas germinales, se subdividen en poblaciones celulares con destinos diferentes. Por ejemplo, el ectodermo se divide en las células que son precursoras del epitelio celular y las que son precursoras del sistema nervioso. Parece haber una restricción progresiva en el espectro de tipos celulares que pueden formarse de las células madre y de las células precursoras a medida que el desarrollo progresa. Una célula madre embrionaria, como hemos visto, puede formar cada tipo de célula, una célula ectodérmica tiene una elección entre los destinos neuronales y epidérmico, mientras que un precursor de queratinocito puede formar piel, pero no neuronas.

Otra restricción que tiene lugar en el desarrollo animal es la separación de las células que formarán la **línea germinal**, es decir, las células madre y las células precursoras que darán origen a óvulos en una hembra y a espermatozoides en un macho. Sólo el genoma de la línea germinal será pasado a la progenie. Se ha hipotetizado que la separación de la línea germinal al comienzo del desarrollo protegería a los cromosomas del daño reduciendo el número de ciclos de replicación que atraviesan o permitiendo una protección especial de las células que son críticas para la herencia. Sea cual fuere la razón, la segregación temprana de la línea germinal está amplia (aunque no universalmente) difundida en los animales. Por el contrario, las plantas no lo hacen en absoluto; la mayoría de los meristemas pueden originar células de la línea germinal.

Una consecuencia de la segregación temprana de las células germinales es que la pérdida o el reordenamiento de los genes en las células somáticas no afectaría el genoma heredado de un futuro cigoto. Aunque se reacomodan y se pierden segmentos del genoma durante el desarrollo de linfocitos a partir de los precursores hematopoyéticos, la mayoría de las células somáticas parecen tener un genoma intacto, equivalente al de la línea germinal. La evidencia de que al menos algunas células somáticas tienen un genoma completo y funcional proviene de la producción exitosa de animales clonados mediante clonación por transferencia nuclear. En este procedimiento, el núcleo de una célula (somática) adulta se introduce en un óvulo que carece de su núcleo; luego, el óvulo manipulado, que contiene el número diploide de cromosomas y que es equivalente a un cigoto, se implanta en una madre adoptiva. La única fuente de información genética para guiar el desarrollo del embrión es el genoma nuclear de la célula somática donadora. Sin embargo, la falla frecuente de estos experimentos de clonación plantea preguntas acerca de cuántas células somáticas adultas tienen realmente un genoma funcional. Aun los éxitos, como la famosa oveja clonada "Dolly", parecen tener algunos problemas médicos aunque las células diferenciadas



▲ Fig. 22-7. Destinos de las capas germinales en los animales. Durante el período inicial del desarrollo de los mamíferos, las células migran para crear las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo. Este proceso se denomina gastrulación. Las células en diferentes capas tienen destinos en gran parte distintivos y por lo tanto representan linajes celulares distintivos. El linaje celular detallado, sin embargo, no es exactamente el mismo en diferentes individuos. (a) Aquí se muestra un boceto de un embrión humano de alrededor de 16 días después de la fecundación de un óvulo. Las primeras células en moverse desde el epiblasto al interior forman el endodermo, y son seguidas por células invaginantes que se convierten en mesodermo. Las células del epiblasto restantes se convierten en ectodermo. Hipoblasto: capa de cobertura. Amnioblastos: células que revestirán la cavidad amniótica. Saco de la yema: recuerdo de nuestros ancestros ovíparos. (b) Microfotografía de barrido electrónico de un corte transversal de un embrión en una etapa similar. (c) Se listan algunos de los tejidos derivados de las tres capas germinativas. [Parte (a) según T. W. Sadler, 2000, *Langman's Medical Embryology*, 8th ed. (Baltimore: Lippincott Williams y Wilkins), pp. 64-65, fig. 4.3]). Parte (b) cortesía de Kathy Sulik, Universidad de Carolina del Norte – Chapel Hill.]

tienen un genoma físicamente completo, sólo porciones de éste son transcripcionalmente activas (cap. 10). Es cuestión de considerable debate si el genoma de una célula diferenciada puede revertirse para tener el potencial de desarrollo característico de una célula embrionaria. Una célula podría, por ejemplo, tener un genoma intacto, pero ser incapaz de reactivarlo apropiadamente debido a estados de cromatina heredados.

Estas observaciones plantean dos preguntas importantes: ¿Cómo se restringen progresivamente los destinos celulares durante el desarrollo? ¿Son estas restricciones irreversibles? Al tratar estas cuestiones, cabe recordar que lo que hará una célula en su localización normal in vivo puede diferir de lo que puede hacer si se la manipula de manera experimental. Por lo tanto, los límites observados de lo que una célula es capaz de hacer pueden ser resultado de mecanismos reguladores naturales o pueden reflejar los fracasos en encontrar condiciones que revelen el potencial completo de una célula.

Aunque nuestro enfoque en este capítulo se centra en cómo las células se tornan diferentes, su capacidad para permanecer iguales también es crítica para el funcionamiento de los tejidos y del organismo en su totalidad. Las células diferenciadas que no se dividen con características particulares deben retenerlas, a veces durante muchas décadas. Las células madre que se dividen regularmente, como una célula madre de la piel, deben producir una célula hija con las propiedades de la célula progenitora, reteniendo su composición característica, forma, comportamiento y respuestas a señales externas específicas. Mientras tanto, la otra célula hija con su propia herencia distintiva, como resultado de la división celular asimétrica, se embarca en una vía de diferenciación en particular, que puede ser determinada tanto mediante las señales que la célula recibe como por la predisposición intrínseca en el potencial de la célula, tal como la activación previa de ciertos genes.

Se conoce el linaje celular completo de *C. elegans*

En el desarrollo de algunos organismos, los linajes celulares se encuentran bajo estricto control genético y por ende son idénticos en todos los individuos de una especie. En otros organismos, el número exacto y la disposición de las células varían sustancialmente enrre los diferentes individuos. El ejemplo mejor documentado de un patrón reproducible de divisiones celulares proviene del nematodo *C. elegans*. Los científicos trazaron el linaje de todas las células somáticas en *C. elegans*, desde el huevo fecundado al gusano maduro, mediante el seguimiento del desarrollo de gusanos vivos empleando el microscopio de interferencia de Nomarski (fig. 22-8).

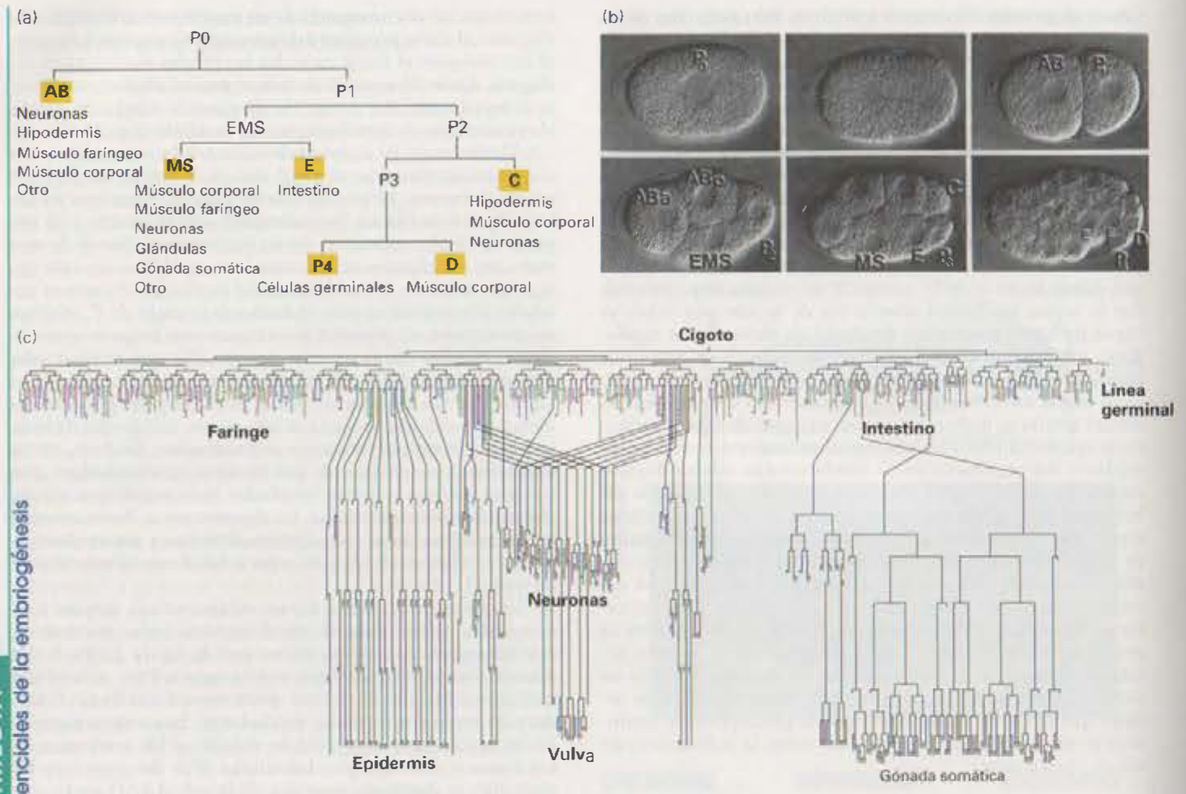
Alrededor de 10 ciclos de división celular, o menos, crean el gusano adulto, que es alrededor de 1 mm de largo y 70 µm de diámetro. El gusano adulto tiene 959 núcleos de células somáticas (forma hermafrodita) o 1031 (macho). El número de células somáticas es un poco menor que el de núcleos porque algunas células contienen múltiples núcleos (p. ej., son sincitios). Notablemente, el patrón de divisiones celulares que comienzan de un huevo fecundado de *C. elegans* es casi siempre el mismo. Como trataremos luego en este capítulo, muchas células que se generan durante el desarrollo sufren muerte celular programada y se pierden en el gusano adulto. La consistencia del linaje de *C. elegans* no es totalmente el resultado de cada célula recién nacida que hereda información específica acerca de su destino. Es decir, en su nacimiento, las células no son siempre "comandadas" por sus propias instrucciones heredadas para seguir una vía de diferenciación en particular. En algunos casos, diversas señales dirigen las células inicialmente idénticas a desarrollos diferentes, y los resultados de estas señales son semejantes en un animal o en otro.

Las primeras pocas divisiones celulares en *C. elegans* producen seis *células fundadoras* diferentes, cada una con un destino separado como se muestra en la figura 22-9a, b. La división inicial es asimétrica y da origen a P1 y a la célula fundadora AB. Las divisiones posteriores en el linaje P forman las otras cinco células fundadoras. Se conocen algunas de las señales que controlan la división y las asimetrías en los destinos. Por ejemplo, las señales Wnt del precursor P2 controlan la división asimétrica de la célula EMS en las células fundadoras E y MS. La señalización Wnt (véase fig. 15-32) también se emplea en otras divisiones asimétricas en los gusanos.

La asimetría bilateral del gusano implica la duplicación de los linajes sobre los dos lados; sin embargo, las células funcionalmente equivalentes a cada lado pueden originarse de un patrón de división diferente en los dos lados. Algunas de las células embrionarias funcionan como células madre y se dividen repetidamente para formar más de ellas mismas u otro



▲ Fig. 22-8. Larva de *C. elegans* recién incubada. Muchos de los 959 núcleos de células somáticas en esta forma hermafrodita se visualizan en esta microfotografía obtenida con el microscopio de interferencia de Nomarski (De J. E. Sulston y H. R. Horvitz, 1977, *Devel. Biol.* 56:110.)



▲ **Fig. 22-9. Linaje de *C. elegans*.** (a) Patrón de las primeras pocas divisiones que comienzan con P0 (el cigoto) y llevan a la formación de seis células fundadoras (puntos resaltados en amarillo). La primera división, en P1 y AB, es asimétrica. Las divisiones posteriores en el linaje P generan las otras células fundadoras. Nótese que más de un linaje puede llevar al mismo tipo de tejido (p. ej., neuronas o músculo). La célula EMS es así llamada porque es la precursora de la mayoría del endodermo y el mesodermo. El linaje que comienza con las células P4 da origen a todas las células de la línea germinal, que se colocan a un lado al comienzo, como en la mayoría de los animales. Todos los otros linajes dan origen a las células somáticas. (b) Microfotografías ópticas de las primeras divisiones del embrión que generan las células fundadoras con las células marcadas como en la parte (a). La textura de las células muestra la presencia de orgánulos y se revela por microscopia de contraste por interferencia diferencial, a veces denominado microscopia de Nomarski. (c) Linaje completo de todo el cuerpo del gusano, que muestra algunos de los tejidos formados. Nótese que cualquier célula particular sufre relativamente pocas divisiones, siempre menos de 15. [Parte [b] de Einhard Schierenberg Zoologisches Institut, Universität Köln.]

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Imágenes secuenciales de la embriogénesis de *C. elegans*

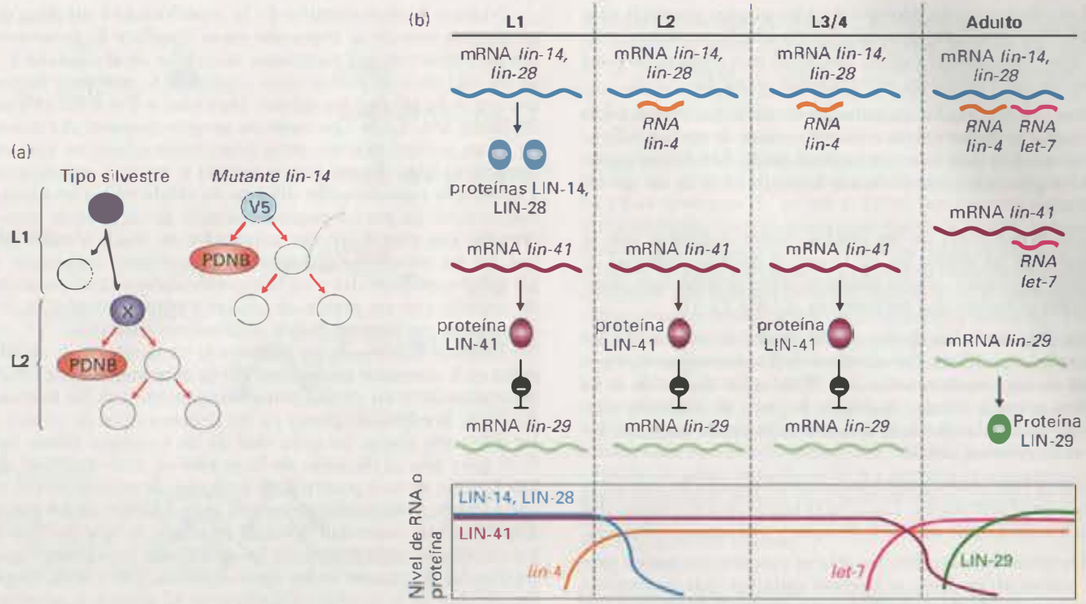
tipo de células madre, mientras se desarrollan células diferenciadas que dan origen a un tejido en particular. En un patrón de división, una de las células hijas de una división inicia una repetición del patrón de linaje de las pocas divisiones previas. El linaje completo de *C. elegans* se muestra en la figura 22-9c. Este organismo fue un sistema modelo muy útil para los estudios genéticos a fin de identificar los reguladores que controlan los linajes celulares en tiempo y espacio.

Los mutantes heterocrónicos proporcionan claves acerca del control del linaje celular

El aislamiento y análisis de *mutantes heterocrónicos* ha proporcionado evidencia intrigante para el control genético del linaje celular. En estos mutantes, un evento típico de una etapa de desarrollo tiene lugar demasiado temprano (desarrollo precoz) o demasiado tarde (desarrollo retardado). Un ejemplo del primero es la aparición de una división celular que produce una célula que se diferencia y una célula que muere; como resultado, el linaje que debió haber provenido de la célula muerta nunca sucede. En el último caso, la aparición demorada de un linaje provoca la producción incorrecta de estructuras juveniles en animales más maduros. En ambos casos, la característica de una célula parental es, en esencia, cambiada a la característica de una célula en una etapa de desarrollo diferente.

Un ejemplo de desarrollo precoz en *C. elegans* proviene de las mutaciones con pérdida de función en el gen *lin-14*, que causa la formación prematura del neuroblasto PDNB (fig. 22-10a). Se halló que el gen *lin-14* y otros varios son defectuosos en los gusanos mutantes heterocrónicos que codifican proteínas de unión al DNA o de unión al RNA, que presumiblemente coordinan la expresión de otros genes. Sin embargo, otros dos genes (*lin-4* y *let-7*) involucrados en regular el tiempo de las divisiones celulares fueron al principio muy intrigantes, ya que parecían codificar RNA pequeños que no codifican ninguna proteína. Para descubrir los productos de estos genes, los científicos primero determinaron qué partes del DNA genómico podrían restituir la función génica, y por ende un apropiado linaje celular, a los mutantes defectuosos en cada gen. Luego hicieron lo mismo con el DNA genómico de las regiones genómicas correspondientes de diferentes especies de gusanos. La comparación de los fragmentos de "rescate" de las diferentes especies reveló que compartían secuencias cortas con poco potencial codificador de proteína.

Más tarde, las moléculas de RNA cortas codificadas por *lin-4* y *let-7* mostraron inhibir la traducción de los mRNA codificados por *lin-14* y otros genes heterocrónicos (fig. 22-10b). Estos RNA pequeños, o **microRNA (miRNA)**, son complementarios a secuencias en las partes 3′ no traducidas de mRNA dianas y se cree que controlan la traducción de los mRNA hibridándolos. Los cambios temporales en la producción de estos y otros miRNA durante el ciclo vital de *C. elegans* sirven como un reloj regulador del linaje celular. Se identificaron moléculas relativas al RNA *let-7* en otros muchos animales incluidos vertebrados e insectos; puesto que en estos animales su producción también está regulada temporalmente, pueden servir a una función similar en su desarrollo al igual que en *C. elegans*. Aún se desconoce cómo se controla temporalmente la producción de estos miRNA reguladores, pero se demostró que cumplen muchos papeles en la regulación de la expresión génica (cap. 12).



▲ **Fig. 22-10. Patrón en el tiempo de tipos específicos de divisiones celulares durante el desarrollo de *C. elegans*.** (a) Se muestra el patrón de divisiones celulares para la célula V5 de *C. elegans* para gusanos normales y para un mutante heterocrónico denominado *lin-14*. En el mutante *lin-14*, el patrón de divisiones celulares (flechas rojas) que normalmente tiene lugar sólo en la segunda etapa larval (L2) tiene lugar en la primera etapa larval (L1) lo que causa la agenciación prematura del neuroblasto PDNB. En el mutante, la célula V5 se comporta durante L1 como normalmente lo hace una célula "X" (violeta) en L2. La inferencia es que la proteína LIN-14 previene las divisiones celulares de tipo L2, aunque se desconoce cómo hace esto precisamente. (b) Dos RNA reguladores pequeños, *lin-4* y *let-7*, sirven como cronometradores coordinados de la expresión génica. La unión del RNA *lin-4* a las regiones 3′ no traducidas (UTR) de los mRNA de *lin-14* y *lin-28* evita la traducción de estos mRNA a proteínas. Esto tiene lugar a continuación de la primera etapa larval (L1), lo que permite que el desarrollo prosiga a las siguientes etapas larvales. Comenzando en la cuarta etapa larval (L4), se inicia la producción del RNA *let-7*. Éste forma híbridos con los mRNA *lin-14*, *lin-28* y *lin-41* permite su traducción. La proteína LIN-41 es un inhibidor de la traducción del mRNA *lin-29*, de modo que la aparición de RNA *lin-41* permite la producción de la proteína LIN-29, necesaria para la generación de linajes celulares adultos. LIN-4 también puede unirse al RNA del *lin-41* en etapas tardías. Sólo se representa el 3′ UTR de los mRNA (Adaptado de B. J. Reinhart et al., 2000, *Nature* 403:901.)

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 22.1

El nacimiento de las células

- En la división celular asimétrica se forman dos tipos diferentes de células hijas a partir de una célula progenitora. Por el contrario, ambas células hijas formadas en las divisiones simétricas son idénticas, pero pueden tener destinos diferentes si son expuestas a señales externas distintas (véase fig. 22-1).

- Las células madre pluripotenciales pueden producir más de un tipo de células descendientes, incluida en algunos casos una célula madre con un potencial más restringido para producir tipos celulares diferenciados (véase fig. 22-2).
- Las células madre embrionarias cultivadas (células ES) son capaces de dar origen a muchas clases de tipos celulares diferenciados. Son útiles en la producción de ratones modificados genéticamente y ofrecen la posibilidad de su uso terapéutico.
- Las poblaciones de las células madre asociadas con la mayoría de los tejidos (p. ej., la piel, el epitelio intestinal, la sangre) regeneran células tisulares diferenciadas que están dañadas o envejecidas (véanse figs. 22-4 y 22-5).
- La diferenciación de las células madre se evita mediante controles específicos. Un alto nivel de β catenina, un componente de las vías de señalización Wnt, se ha implicado en la preservación de células madre en la piel y el intestino, dirigiendo las células hacia la división en lugar de hacia los estados de diferenciación.
- Las células madre vegetales persisten durante la vida de la planta en el meristema. Las células meristémicas pueden dar origen a un amplio espectro de tipos y estructuras celulares.
- Durante el desarrollo, las células precursoras suelen perder potencial; es decir, se vuelven cada vez más restrictivas en el número de tipos celulares que pueden formar.
- Al comienzo del desarrollo animal, se forman las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo. Cada una da origen a tejidos y órganos específicos (véase fig. 22-7).
- Las células de la línea germinal dan origen a óvulos o espermatozoides. Por definición, todas las otras células son células somáticas.
- El desarrollo embrionario de C. *elegans* comienza con la división asimétrica del huevo fertilizado (cigoto). Se conoce el linaje de todas las células en los gusanos adultos y es altamente reproducible (véase fig. 22-9).
- Los RNA reguladores cortos controlan el tiempo de divisiones celulares para el desarrollo evitando la traducción de mRNA cuyas proteínas codificadas controlan los linajes celulares (véase fig. 22-10).

22.2 Especificación del tipo de célula en las levaduras

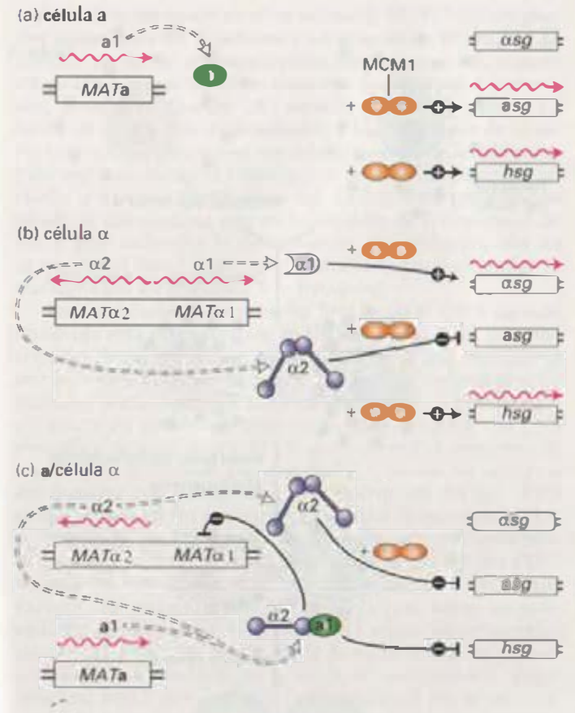
En la sección anterior vimos que las células madre y las células precursoras/progenitoras producen una progenie que se embarca en diferentes caminos de diferenciación. Los complicados mecanismos reguladores mediante los cuales las células se tornan diferentes se conocen como *especificación del tipo de célula*. La especificación suele involucrar una combinación de señales externas con mecanismos de transducción de señales internos como los descritos en los capítulos 14 y 15. La transición de una célula no diferenciada a una diferenciada involucra a menudo la producción de uno, o de un número pequeño de factores de transcripción. Los factores de transcripción recién producidos son interruptores poderosos que desencadenan la activación (y a veces la represión) de grandes baterías de genes subordinados. Por lo tanto, un cambio inicialmente modesto puede provocar cambios masivos en la expresión génica que confieren una nueva personalidad a la célula.

Nuestro primer ejemplo de la especificación del tipo de célula proviene de la brotación en la levadura *S. cerevisiae*. Introdujimos este útil eucarionte unicelular en el capítulo 1 y lo encontramos en varios otros capítulos. *S. cerevisiae* forma tres tipos de células: las células haploides a y α y las células diploides a/α. Cada tipo tiene su propio conjunto distintivo de genes activos; muchos otros genes están activos en los tres tipos de células. En un patrón común a muchos organismos y tejidos, la especificación del tipo de célula en las levaduras está controlada por un pequeño número de factores de transcripción que coordinan las actividades de muchos otros genes. En las respuestas de las células eucariontes superiores a las señales ambientales y en la especificación y la disposición de acuerdo con un patrón de células y tejidos durante el desarrollo, se encuentran rasgos reguladores similares.

Estudios recientes de los patrones de transcripción de ~6000 genes en *S. cerevisiae* mediante el uso de micromatrices de DNA proporcionaron un amplio panorama genómico de las fluctuaciones de la expresión génica en los distintos tipos de células y las diferentes etapas del ciclo vital de las levaduras (véase fig. 9-35 para una explicación de la técnica de micromatrices de DNA). Una ventaja poderosa de la técnica de micromatrices es que identifica sistemáticamente una gran fracción de los genes relevantes que controlan diversos procesos, lo que permite a los científicos concentrarse en los genes más importantes que regulan las diferencias en los tipos de célula. Entre otras cosas, los estudios de la levadura identificaron 32 genes que se transcriben a niveles más de dos veces superiores en las células α que en las células a. Otros 50 genes se transcriben a más del doble de los niveles más altos en las células a que en las células α. Los productos de estos 82 genes de especificación del tipo de célula que inicialmente son activados por reguladores de la transcripción, traspasan muchas de las diferencias críticas entre los dos tipos de célula. Los resultados demuestran con claridad que los cambios en la expresión de sólo una pequeña fracción del genoma pueden alterar de modo significativo el comportamiento y las propiedades de las células. La transcripción de un número mucho mayor de genes, alrededor del 25% del total analizado, difería sustancialmente en las células diploides en comparación con las haploides. Las células a y las células α son muy similares, y las células haploides y diploides son bastantes diferentes, por lo que los resultados de los estudios con micromatrices tienen sentido.

Los factores de transcripción codificados en el locus *MAT* actúan en forma concertada con MCM1 para especificar el tipo de célula

Cada uno de los tres tipos de células de *S. cerevisiae* expresa un único conjunto de genes reguladores que es responsable de todas las diferencias entre los tres tipos celulares. Todas las células haploides expresan ciertos genes específicos haploides; además las células a expresan genes específicos de a, y las células α expresan genes específicos de α. En las células diploides a/α, se expresan genes específicos diploides, mientras que no se expresan los genes específicos haploides, los específicos de a y los específicos de α. Como se ilustra en la figura 22-11, tres factores de transcripción específicos del tipo de célula (α1, α2, y a1) codificados en el *locus MAT*, en combinación con un factor general de la transcripción denominado *MCM1*, que se expresa en los tres tipos de células, median la expresión génica específica del tipo de célula en *S. cerevisiae*. Por lo tanto, las acciones de apenas tres factores de transcripción pueden colocar la célula de la levadura en una vía de



▲ **Fig. 22-11. Control transcripcional de los genes específicos del tipo celular en *S. cerevisiae*.** Las secuencias codificadas portadas en el locus *MAT* difieren en las células haploides **a** y α y en las células diploides. Tres factores de transcripción tipo-específicos (α1, α2 y **a**1) codificados en el locus *MAT* actúan con el MCM1, un factor de transcripción constitutivo producido por los tres tipos celulares, para producir un patrón distintivo de expresión génica en cada uno de los tres tipos celulares. ***a**sg:* genes/mRNA específicos para **a**; *αsg:* genes/mRNA específicos para α; *hsg:* genes/mRNA haploide-específicos.

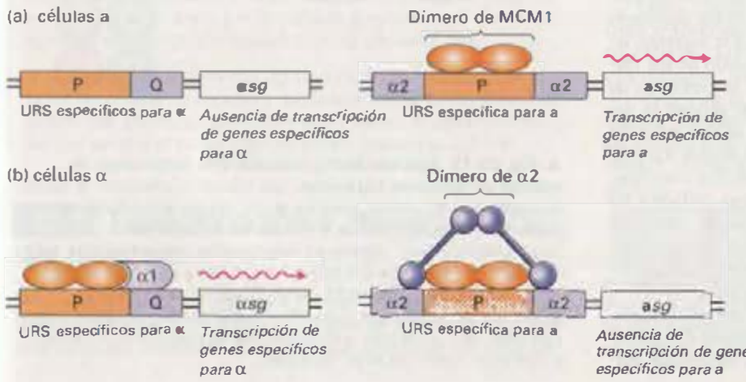
diferenciación específica que culmina en un determinado tipo celular. A partir de los experimentos de micromatrices de DNA conocemos un efecto de estos jugadores esenciales: la activación o represión de muchas docenas de genes que controlan las características celulares.

MCM1 fue el primer miembro de la *familia* de factores de transcripción *MADS* en ser descubierto. (MADS es un acrónimo de los cuatro factores iniciales identificados en esta familia.) Las proteínas de unión al DNA que componen esta familia se dimerizan y contienen un dominio MADS N-terminal similar. En la sección 22.3 se describen otros factores de transcripción MADS que participan en el desarrollo del músculo esquelético. Los factores de transcripción MADS también especifican tipos celulares en los órganos florales (véase fig. 15-28). MCM1 exhibe actividad diferente en las células haploides a y α debido a su asociación con la proteína α1 o α2 en las células α. Actuando solo, MCM1 activa la transcripción de los genes específicos de a en las células a y de los genes específicos haploides en ambas células a y α (véase fig. 22-11a,b). Como resultado de esta acción combinada, MCM1 promueve la transcripción de genes específicos de α y reprime la transcripción de genes específicos de a en las células α. Ahora analizaremos más detenidamente cómo MCM1 y las proteínas codificadas por *MAT* ejercen sus efectos.

Los complejos MCM1 y α1-MCM1 activan la transcripción génica

En las células a, el MCM1 homodimérico se une a la denominada secuencia caja P en las secuencias reguladoras en dirección 5' y estimula su transcripción (fig. 22-12a). La transcripción de los genes específicos de α está controlada por dos secuencias adyacentes –la caja P y la caja Q– ubicadas en las URS asociadas con estos genes. Aunque MCM1 por sí mismo se une a la caja P en una URS específica para a, no se une a la caja P en una URS específica para α.

En las células α, que producen el factor de transcripción α1 codificado por *MAT*α, la unión simultánea de MCM1 y α1 a los sitos PQ ocurre con alta afinidad (fig. 22-12b). Esta unión pone en marcha la transcripción de genes específicos de α. Por lo tanto, la transcripción específica para a es una simple cuestión de unión de un único factor de transcripción a sus genes diana, mientras que la transcripción específica para α requiere



◀ **Fig. 22-12. Actividad del MCM1 en células de las levaduras a y α.** El MCM1 se une como un dímero al sitio P en las secuencias reguladoras comente arriba (URS), que controlan la transcripción de genes específicos para α y genes específicos para **a**, respectivamente. (a) En las células **a**, el MCM1 estimula la transcripción de genes específicos para **a**. El MCM1 no se une eficientemente al sitio P en las URS específicas para **a** en ausencia de la proteína α1. (b) En las células α, la actividad de MCM1 se modifica por su asociación con α1 o α2. El complejo α1-MCM1 estimula la transcripción de genes específicos para α, mientras que el complejo MCM1-a2 bloquea la transcripción de genes específicos para **a**. El complejo α2-MCM1 también se produce en las células diploides, donde tiene el mismo efecto de bloqueo sobre la transcripción de genes específicos para **a** (véase fig. 22-11c).

una combinación de dos factores, ninguno de los cuales puede activar los genes diana por sí mismo.

Los complejos α2-MCM1 y α2-a1 reprimen la transcripción

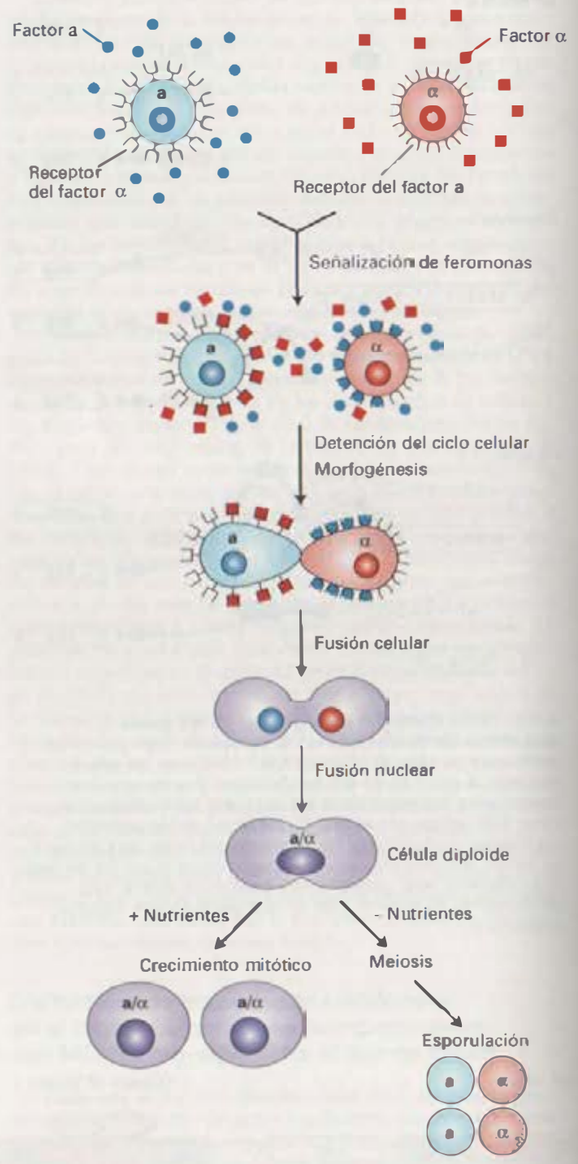
La unión altamente específica tiene lugar como consecuencia de la interacción de α2 con otros factores de transcripción en diferentes sitios en el DNA. Dos sitios de unión de α2 flanquean la caja P en cada URS específica para a. Tanto MCM1 como α2 pueden unirse independientemente a una URS específica para a con afinidad relativamente baja. Sin embargo, en las células α altamente cooperativas, la unión simultánea tanto de α2 como de las proteínas MCM1 a estos sitos tiene lugar con alta afinidad. Esta unión de alta afinidad reprime la transcripción de genes específicos de a, asegurando que no se expresen en las células α ni en las células diploides (véase fig. 22-12b, *derecha*). MCM1 promueve la unión de α2 a una URS específica de a orientando los dos dominios de unión al DNA del dímero α2 hacia las secuencias de unión de α2 en esta URS. Puesto que una molécula dimérica de α2 se une a ambos sitios en una URS específica para α, a cada sitio de DNA se lo denomina medio sitio. Las posiciones relativas de ambos medios sitios y sus orientaciones están altamente conservadas entre diferentes URS específicas para a.

Las combinaciones de factores de transcripción crean una especificidad adicional en la regulación génica. La presencia de numerosos sitios de unión de α2 en el genoma y la especificidad "laxa" de la proteína α2 pueden expandir el espectro de genes que puede regular. Por ejemplo, en una célula diploide a/α, α2 forma un heterodímero con a1 que reprime tanto los genes específicos de la forma haploide como el gen que codifica α1 (véase fig. 22-11c) El ejemplo de α2 sugiere que la especificidad laxa sería una estrategia general para incrementar el rango regulador de un único factor de transcripción.

Las feromonas inducen el apareamiento de las células α y a para generar un tercer tipo de célula

Una característica importante del ciclo vital de las levaduras es la capacidad de las células haploides a y α de aparearse, es decir, adherirse y fusionarse para originar una célula diploide a/α (véase fig. 1-5). Cada tipo celular haploide secreta un *factor de apareamiento* diferente, una pequeña feromona polipeptídica, y expresa un receptor de superficie celular asociado con la proteína G que reconoce la feromona secretada por las células del otro tipo. Así, las células a y α secretan feromonas y responden a ellas (fig. 22-13). La unión de los factores de apareamiento a sus receptores induce la expresión de un grupo de genes que codifican proteínas que dirigen la detención del ciclo celular en G_1 y promueve la adhesión/fusión de las células haploides para formar células diploides. En presencia de suficientes nutrientes, las células diploides continuarán creciendo. La falta de nutrientes, sin embargo, induce a las células diploides a progresar a través de la meiosis, cada una produciendo cuatro esporas haploides. Si las condiciones ambientales se tornan conducentes para el crecimiento vegetativo, las esporas germinarán y sufrirán división mitótica.

Los estudios con mutantes de levaduras proporcionaron datos acerca de cómo las feromonas a y α inducen el apareamiento. Por ejemplo, las células de levaduras haploides por-



▲ Fig. 22-13. Apareamiento inducido por feromonas de células de levadura haploides. Las células α producen el factor de apareamiento α y el receptor **a**; las células **a** producen el factor **a** y el receptor α. La unión de los factores de apareamiento a sus receptores relacionados con las células del tipo opuesto conduce a la activación génica y da como resultado el apareamiento y la producción de células diploides. En presencia de suficientes nutrientes, estas células crecerán como diploides. Sin nutrientes suficientes, las células sufrirán meiosis y formarán cuatro esporas haploides.

tadoras de mutaciones en el locus *estéril 12 (STE12)* no pueden responder a las feromonas y no se aparean. El gen *STE12* codifica un factor de transcripción que se une a una secuencia de DNA conocida como elemento de respuesta a feromonas, presente en muchas URS específicas para a y para α. La unión de factores de apareamiento a los receptores de la superficie celular induce una cascada de eventos de señalización y da como resultado la fosforilación de diversas proteínas incluida la proteína Ste12 (véase fig. 14-24). Esta fosforilación rápida se correlaciona con un incremento de la capacidad de Ste12 para estimular la transcripción. Sin embargo, aún no se conoce si Ste12 debe estar fosforilada para estimular la transcripción en respuesta a la feromona.

La interacción de la proteína Ste12 con el DNA ha sido estudiada más extensamente en URS que controlan la transcripción de *STE2*, un gen específico para a que codifica el receptor para la feromona α. La producción del receptor α, inducida por feromonas, codificado por STE2 incrementa la eficiencia del proceso de apareamiento. Adyacente a la URS específica de a en el gen *STE2* se encuentra el elemento de respuesta a feromonas que une Ste12. Cuando las células a son tratadas con feromona α, la transcripción del gen *STE2* se incrementa en un proceso que requiere la proteína Ste12. Se descubrió que la proteína Ste12 se une más eficientemente al elemento de respuesta a feromonas en la URS del *STE2* cuando MCM1 se une de manera simultánea al sitio P adyacente. Ya vimos que MCM1 puede actuar como un activador o un represor en diferentes URS según forme complejos con α1 o α2. En este caso, la función de MCM1 como activador es estimulada por la unión de otro factor de transcripción, Ste12, cuya actividad es modificada por señales extracelulares.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 22.2

Especificación del tipo de célula en las levaduras

- La especificación de cada uno de los tres tipos de células de las levaduras –las células haploides a y α, y las células diploides a/α– está determinada por un único conjunto de factores de transcripción que actúan en diferentes combinaciones en sitios reguladores específicos en el genoma de las levaduras (véase fig. 22-11).
- Algunos factores de transcripción pueden actuar como represores o activadores según los siros reguladores específicos a los que se unen y la presencia o ausencia de otros factores de transcripción unidos a sitios circundantes.
- La unión de feromonas del tipo de apareamiento por parte de las células de levadura haploides activa la expresión de genes que codifican proteínas que median el apareamiento, lo que genera el tercer tipo de célula (véase fig. 22-13).

22.3 Especificación y diferenciación del músculo

Como indican los patrones globales de expresión, las células de levaduras de diferentes tipos de apareamiento son aún bastante similares. Los biólogos celulares no conocen todavía el conjunto completo de moléculas que distinguen un tipo de célula (p. ej. las musculares) de todos los otros tipos de células en un organismo multicelular. La extensa especificación y diferenciación celular que tiene lugar durante el desarrollo de animales y plantas depende tanto de las diferencias cuantitativas como cualitativas en la expresión génica, controlada a nivel de la transcripción, al igual que en las estructuras celulares y en los estados de actividad proteica.

Una impresionante disposición de estrategias moleculares, algunas análogas a las que se encuentran en la especificación del tipo celular de las levaduras, evolucionaron para llevar a cabo las complejas vías del desarrollo que caracterizan a los organismos multicelulares. Las células musculares fueron el foco de muchos de esos estudios porque su desarrollo puede estudiarse en células cultivadas y en animales intactos. Los primeros avances en la comprensión de la formación de las células musculares (miogénesis) provinieron del descubrimiento de genes reguladores que pudieron convertir células cultivadas en células musculares. Luego se crearon y estudiaron las mutaciones murinas que afectan esos genes para aprender acerca de las funciones de las proteínas codificadas por ellos, seguido por lo que los científicos investigaron acerca de cómo los genes reguladores del músculo controlan otros genes.

La proteína twist es un factor de transcripción necesario para crear células musculares en moscas y otros animales. Twist pone en marcha la producción de otros factores de transcripción que a su vez activan genes que codifican miosina, actina y otras proteínas musculares específicas. Para entender la función de *twist* y otros genes reguladores del desarrollo muscular se aplicaron análisis de micromatrices de DNA. Por ejemplo, el patrón de expresión de embriones de *Drosophila* normales se comparó con el de embriones mutantes en los cuales el gen *twist* es defectuoso. Para evaluar cuántos genes son necesarios para especificar el músculo, los investigadores determinaron la expresión de alrededor de 4000 genes de mosca (alrededor del 30% del total) en embriones normales de mosca y en mutantes *twist*. De los genes incluidos en la micromatriz, alrededor de 130 (3,3%), incluidos muchos genes de diferenciación muscular conocidos, se transcribieron a bajos niveles (o no lo hicieron en absoluto) en los mutantes *twist*. Estos resultados sugieren que los cambios transcripcionales en al menos varios cientos de genes están asociados con la diferenciación de un tipo de célula altamente especializado como la muscular.

Otros estudios recientes de micromatrices buscaron genes cuya transcripción difiere en diversos subtipos de músculo en ratones. Estos identificaron 49 genes, entre 3000 genes examinados, que se transcriben a niveles sustancialmente diferentes en el músculo rojo (resistencia) y en el músculo blanco (respuesta rápida). Las claves de la base molecular de las diferencias funcionales entre los músculos rojo y blanco provienen de estudiar aquellos 49 genes y sus productos.

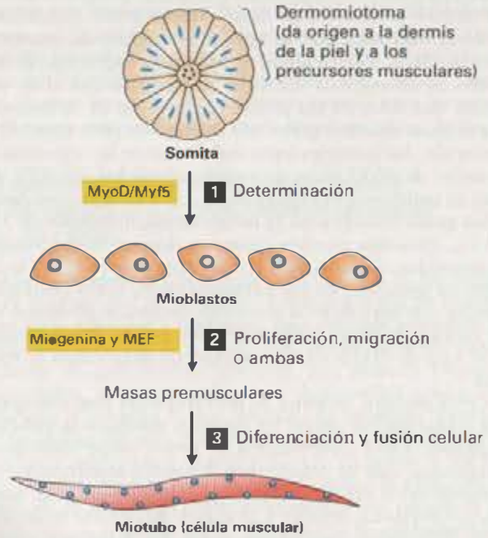
Aquí analizamos el papel de ciertos factores de transcripción en la creación del músculo esquelético en los vertebrados. Estos reguladores musculares ilustran cómo la transcripción coordinada de conjuntos de genes diana puede producir tipos de células diferenciadas y cómo se necesita una cascada de procesos y señales transcripcionales para coordinar el comportamiento y las funciones celulares.

Las somitas embrionarias dan origen a los mioblastos, los precursores de las células musculares esqueléticas

La miogénesis esquelética de los vertebrados tiene lugar en tres etapas: la determinación de los precursores de las células musculares, denominados *mioblastos*; la proliferación y en algunos casos la migración de mioblastos; y su ulterior diferenciación en músculo maduro (fig. 22-14). En la primera etapa, los mioblastos se originan de bloques de células mesodérmicas, denominadas *somitas*, que se encuentran a los lados del tubo neural en el embrión. Las señales específicas de los tejidos circundantes cumplen un papel importante para determinar dónde se formarán los mioblastos en la somita en desarrollo. A nivel molecular, la decisión de una célula mesodérmica de adoptar el destino de una célula muscular refleja la activación de genes que codifican factores de transcripción en particular.

A medida que los mioblastos proliferan y migran, digamos, al brote de un miembro en desarrollo, se alinean, dejan de dividirse y se fusionan para formar un sincitio (una célula que contiene muchos núcleos, pero comparte el citoplasma). Nos referimos a estas células multinucleadas como un *miotubo*. Concomitante con la fusión celular se produce un espectacular aumento de la expresión de los genes necesarios para el posterior desarrollo y función del músculo.

Las señales extracelulares específicas que inducen la determinación de cada grupo de mioblastos se expresan sólo transitoriamente. Estas señales desencadenan la producción de factores intracelulares que mantienen el programa miogénico después de la desaparición de las señales inductoras. En las siguientes secciones tratamos la identificación y las funciones de estas proteínas miogénicas y sus interacciones.



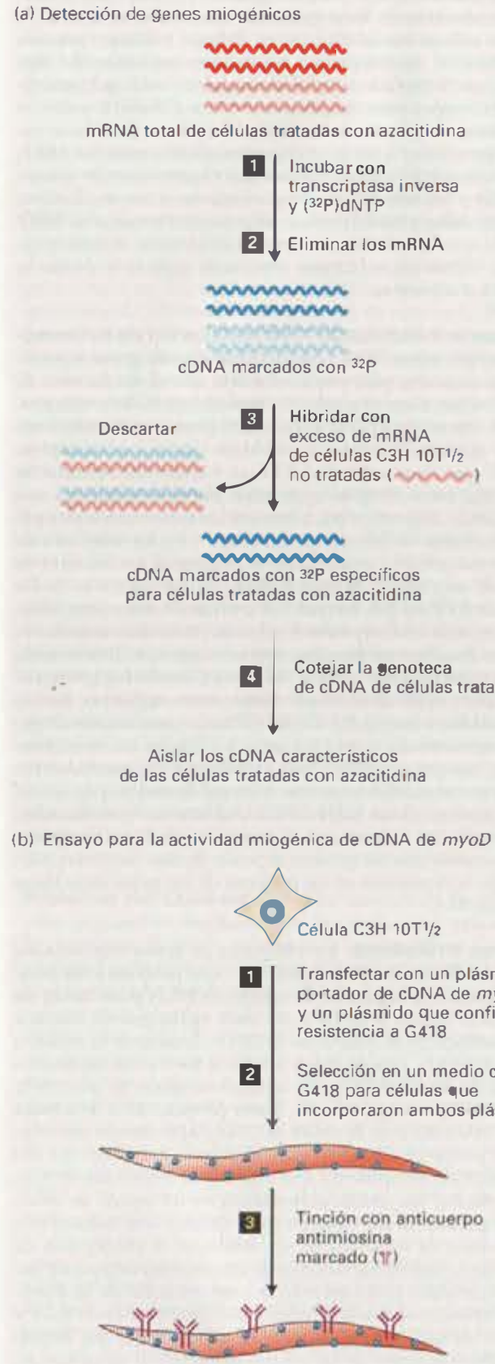
▲ Fig. 22-14. Tres etapas en el desarrollo del músculo esquelético de los vertebrados. Las somitas son esferas epiteliales de células mesodérmicas embrionarias, algunas de las cuales (el miotoma) adquieren determinación como mioblastos luego de recibir señales de otros tejidos. (1) Después que los mioblastos proliferan y migran a los brotes de las extremidades y a otros lugares (2) sufren diferenciación terminal en células musculares esqueléticas multinucleares, llamadas miotubos (3). Los factores de transcripción clave que ayudan a llevar a cabo el programa miogénico se resaltan en amarillo. Véase también la fig. 22-17.

Los genes miogénicos se identificaron por primera vez en estudios con fibroblastos en cultivo

Los genes miogénicos son un ejemplo fino de cómo los factores de transcripción controlan la diferenciación progresiva que tiene lugar en un linaje celular. Los estudios in vitro con la línea celular de fibroblastos designada C3H 10T½ fueron de gran importancia en el análisis de los mecanismos de control de la transcripción que regulan la miogénesis esquelética. Cuando estas células se incuban en presencia de 5-azacitidina, un derivado de la citidina que no puede ser metilado y por lo tanto alterar la transcripción, se diferencian en miotubos. Una vez que entra en las células, la 5-azacitidina se convierte en 5-azadesoxicitidina trifosfato y luego se incorpora en el DNA en lugar de la desoxicitidina. Debido a que los residuos de desoxicitidina metilados suelen estar presentes en las regiones de DNA transcripcionalmente inactivas, el reemplazo de los residuos de citidina con un derivado que no puede ser metilado permite la activación de genes antes reprimida por la metilación.

La alta frecuencia con que las células C3H 10T½ tratadas con azacitidina se convierten en miotubos sugirió a los primeros investigadores que la reactivación de un gen o un pequeño número de genes estrechamente vinculados es suficiente para impulsar un programa miogénico. Para verificar esta hipótesis los investigadores aislaron DNA de células C3H 10T½ cultivadas en presencia de 5-azacitidina y lo transfectaron a células no tratadas. La observación de que 1 en 10^4 células transfectadas con este DNA se convertía en miotubos es compatible con la hipótesis de que un gen o un pequeño grupo de genes estrechamente vinculados es responsable de que los fibroblastos se conviertan en miotubos.

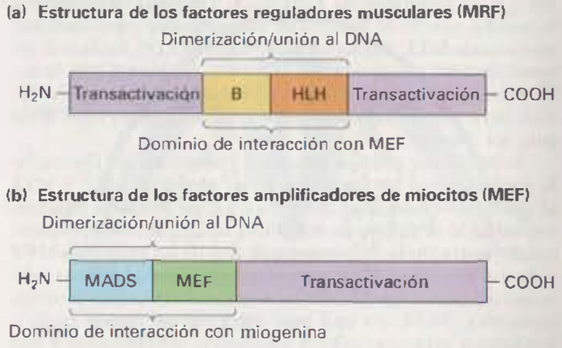
Los estudios posteriores condujeron al aislamiento y caracterización de cuatro genes diferentes pero relacionados que pueden convertir las células C3H 10T½ en células musculares. En la figura 22-15 se reseña el protocolo experimental para la identificación y el análisis de uno de estos genes, denominado gen de *determinación miogénica (myoD)*. Las células C3H 10T½ transfectadas con cDNA *myoD* así como las tratadas con 5-azacitidina formaron miotubos. El cDNA *myoD* también fue capaz de convertir un número de otras líneas celulares cultivadas en músculo. Sobre la base de estos hallazgos, se propuso que el gen *myoD* desempeña un papel clave en el desarrollo muscular. Un enfoque similar identificó otros tres genes –*miogenina*, *myf5* y *mrf4*– que también actúan en su desarrollo.



▶ FIGURA EXPERIMENTAL 22-15 Los genes miogénicos aislados de células tratadas con azacitidina pueden impulsar la miogénesis cuando son transfectados a otras células. (a) Cuando las células C3H 10T½ (una línea celular de fibroblastos) son tratadas con azacitidina, se desarrollan en miotubos a una alta frecuencia. Para aislar los genes responsables de convertir las células tratadas con azacitidina en miotubos, primero se aislaron todos los mRNA de las células tratadas a partir de extractos celulares en una columna de oligo-dT. Debido a sus colas poli(A), los mRNA son retenidos de forma selectiva en esta columna. Pasos 1 y 2: Los mRNA aislados fueron convertidos a cDNA radiomarcados. Paso 3: Cuando los cDNA se mezclaron con mRNA de células C3H 10T½ *no tratadas*, sólo se hibridaron los cDNA derivados de los mRNA (rojo claro) producidos tanto por las células tratadas con azacitidina como por las no tratadas. El DNA de hebra doble resultante se separó de los cDNA no hibridados (azul oscuro) producidos sólo por las células tratadas con azacitidina. Paso 4: Los cDNA específicos para las células tratadas con azacitidina se emplearon como sondas para cotejar una genoteca de cDNA de células tratadas con azacitidina (cap. 9). Al menos algunos de los clones identificados con estas sondas corresponden a genes necesarios para la miogénesis. (b) Cada uno de los clones de cDNA identificados en la parte (a) se incorporaron a plásmidos portadores de un promotor fuerte. Pasos 1 y 2: Las células C3H 10T½ fueron cotransfectadas con cada plásmido recombinante más un segundo plásmido que transporta un gen que confiere resistencia a un antibiótico denominado G418; sólo las células que incorporaron los plásmidos crecerán en un medio que contiene G418. Uno de los clones seleccionados, designado *myoD*, demostró impulsar la conversión de C3H 10T½ en células musculares, identificadas por su unión de anticuerpos marcados contra miosina, una proteína específica del músculo (paso 3) (Véase R. L. Davis et al., 1987, *Cell* 51:987.)

Los factores reguladores musculares (MRF) y los factores amplificadores de miocitos (MEF) actúan en forma concertada para conferir especificidad miogénica

Las cuatro proteínas miogénicas –MyoD, Myf5, miogenina y MRF4– son miembros de la familia hélice-bucle-hélice (bHLH) de los factores de transcripción que se unen al DNA (véase fig. 11-22b). Cerca del centro de estas proteínas se encuentra una región básica (B) de unión al DNA adyacente al dominio HLH, que media la formación de dímeros. A ambos lados de esta región de unión al DNA/dimerización se encuentran dos dominios de activación. Nos referimos a las cuatro proteínas miogénicas bHLH designadas de manera colectiva *factores reguladores musculares*, o *MRF* (fig. 22-16a).



▲ Fig. 22-16. Estructuras generales de dos clases de factores de transcripción que participan en la miogénesis. Los MRF (factores reguladores musculares) son proteínas bHLH (hélice-bucle-hélice) producidas sólo en el músculo en desarrollo. Los MEF (factores amplificadores de miocitos), que se producen en varios tejidos además del muscular en desarrollo, pertenecen a la familia MADS. La actividad miogénica de los MRF se potencia por su interacción con los MEF.

Las proteínas bHLH forman homodímeros y heterodímeros que se unen a un sitio del DNA de 6 pb con la secuencia consenso CANNTG (N = cualquier nucleótido). Conocida como la caja E, esta secuencia está presente en muchas ubicaciones diferentes dentro del genoma (por puro azar aparece una caja E cada 256 nucleótidos). Por lo tanto, algún mecanismo (o algunos mecanismos) debe asegurar que los MRF regulen en forma específica los genes específicos para el músculo y no otros que contengan cajas E en sus regiones de control de la transcripción. Una clave para entender cómo se logra esta especificidad miogénica fue el hallazgo de que la afinidad de unión al DNA de MyoD es diez veces mayor cuando se une como heterodímero en complejo con E2A, otra proteína bHLH, que cuando se une como homodímero. Más aún, en las células C3H 10T½ tratadas con azacitidina, la MyoD se encuentra como un heterodímero formando complejo con E2A, y ambas proteínas son necesarias para la miogénesis de estas células. Los dominios de unión al DNA de E2A y MyoD tienen secuencias aminoacídicas similares, pero no idénticas, y ambas proteínas reconocen las secuencias caja E. Los otros MRF también forman heterodímeros con E2A que tienen propiedades similares a los complejos MyoD-E2A. Esta heterodimerización restringe la actividad de los factores de transcripción miogénicos a genes con cajas E estrechamente vinculados.

Puesto que E2A se expresa en muchos tejidos, el requerimiento de E2A no es suficiente para conferir especificidad miogénica. Los estudios ulteriores sugirieron que los aminoácidos específicos en el dominio bHLH de todos los MRF confieren especificidad miogénica permitiendo la unión específica de los complejos MRF-E2A a otra familia de proteínas de unión al DNA denominada *factores de amplificación de miocitos*, o *MEF*. Los MEF se consideraron excelentes candidatos para la interacción con MRF por dos razones. Primero, muchos genes específicos de los músculos contienen sitios de reconocimiento tanto para MEF como para MRF. Segundo, aunque los MEF no pueden inducir la conversión miogénica de células C3H 10T½ tratadas con azacitidina por sí mismas, potencian la capacidad de los MRF para hacerlo. Esta potenciación requiere la interacción física entre un heterodímero MEF y un heterodímero MRF-E2A. Los MEF pertenecen a la familia MADS de factores de transcripción y por contener un dominio MEF, adyacente al dominio MADS, median la interacción con miogenina (fig. 22-16b). Se piensa que la acción sinérgica del homodímero MEF y del heterodímero MRF-E2A lleva a la expresión de altos niveles de genes específicos para los músculos.

Se utilizaron ratones *knockout* y mutantes de *Drosophila* para explorar las funciones de las proteínas MRF y MEF al conferir especificidad miogénica en los animales intactos, extendiendo el trabajo en un cultivo celular. Estos experimentos demostraron la importancia de tres de las proteínas MRF y de las proteínas MEF para distintos pasos del desarrollo muscular (véase fig. 22-14). La función de la cuarta proteína miogénica, Mrf4, no está muy clara; se expresaría tarde y ayudaría a mantener células musculares diferenciadas y por control combinatorio a asegurar que se activen sólo los genes específicos de los músculos.

La diferenciación terminal de los mioblastos se encuentra bajo control positivo y negativo

No puede permitirse que los reguladores fuertes del desarrollo como los MRF se activen incontroladamente. De hecho, sus acciones están circunscriptas a varios niveles. Primero, la producción de los reguladores musculares se activa sólo en las células mesodérmicas, en el lugar y tiempo precisos en el embrión, en respuesta a reguladores espaciales del tipo descrito en el capítulo 15. Otras proteínas median mecanismos adicionales para asegurar un control estricto sobre la miogénesis: las proteínas remodeladoras de cromatina se necesitan para hacer a los genes diana accesibles para los MRF; las proteínas inhibidoras pueden restringirse cuando actúan los MRF; y las relaciones antagonistas entre los reguladores del ciclo celular y los factores de diferenciación como los MRF aseguran que las células en diferenciación no se dividan y viceversa. Todos estos factores controlan cuándo y dónde se forman los músculos.

Proteínas activadoras de la remodelación de la cromatina. Las proteínas MRF controlan baterías de genes específicos para músculo, pero pueden hacerlo sólo si los factores de cromatina permiten el acceso. La remodelación de cromatina, que suele necesitarse para la activación génica, es llevada a cabo por grandes complejos proteicos (p. ej., el complejo Swi/Snf) que tiene actividad ATPasa y quizá de helicasa. Se piensa que estos complejos reclutan histonas acetilasas que modifican la cromatina para hacer a los genes accesibles para los factores de transcripción (cap. 11). La hipótesis de que los complejos remodeladores ayudan a los factores se confirmó empleando versiones dominantes negativas de las proteínas ATPasa que forman los centros de estos complejos. (Cabe recordar del capítulo 9 que una mutación dominante negativa produce un fenotipo mutante aun también cuando está presente un alelo normal del gen.) Cuando los genes que transportan estas mutaciones dominantes negativas fueron transfectados a las células C3H 10T½, la introducción de genes miogénicos no convirtió más las células en miotubos. Además, un gen específico para el músculo que normalmente está activo no exhibió su patrón habitual de cambios de la cromatina en las células C3H 10T½ doblemente transfectadas. Estos resultados indican que la activación de la transcripción mediante proteínas miogénicas depende de una estructura adecuada de la cromatina en las regiones de los genes específicos para músculo.

Proteínas inhibidoras. La búsqueda de genes relacionados con *myoD* llevó a la identificación de una proteína relacionada que retiene la región de dimerización HLH pero carece de la región de unión al DNA y por ende es incapaz de unirse a las secuencias de la caja E en el DNA. Mediante la unión a MyoD o a E2A, esta proteína inhibe la formación de heterodímeros de MyoD-E2A y por lo tanto su unión de alta afinidad al DNA. En consecuencia, a esta proteína se la denomina Id, por inhibidora de la unión al DNA. Id evita que las células que producen MyoD y E2A activen la transcripción del gen específico del músculo que codifica la creatincinasa. Como resultado, las células permanecen en un estado de crecimiento proliferativo. Cuando estas células son inducidas a diferenciarse en músculos (p. ej., mediante la eliminación de suero, que contiene los factores de crecimiento necesarios para el crecimiento proliferativo), la concentración de Id disminuye. Entonces se pueden formar los dímeros MyoD-E2A y unirse a las regiones reguladoras de genes diana, que impulsan la diferenciación de las células C3H 10T½ en células similares a mioblastos.

Trabajos actuales muestran que las histonas acetilasas y desacetilasas también son cruciales para regular los genes específicos de los músculos. Como se explica en el capítulo 11, la acetilación de histonas en la cromatina es necesaria para activar muchos genes; por el contrario, las histonas desacetilasas provocan la represión transcripcional (véase fig. 11-32). Los MEF2 reclutan histonas acetilasas como p300/CBP, a través de otra proteína que sirve como un mediador, activando así la transcripción de genes diana. Los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina con anticuerpos contra la histona acetilada H4 muestran que el nivel de histona acetilada asociada con genes regulados por MEF2 es superior en los miotubos diferenciados que en los mioblastos (véase fig. 11-31). La función de las histonas desacetilasas en el desarrollo muscular se reveló en los experimentos en los cuales los científicos primero indujeron genes *myoD* adicionales en cultivos de células C3H 10T½ para elevar el nivel de MyoD. Esto dio como resultado la mayor activación de genes diana y la diferenciación más veloz de las células en miotubos. Sin embargo, cuando los genes que codifican las histonas desacetilasas también se introdujeron en las células C3H 10T½, el efecto inductor muscular del MyoD se bloqueó y las células no se diferenciaron en miotubos.

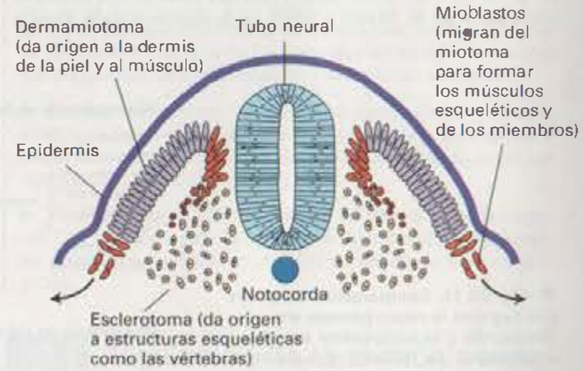
La explicación de cómo las histonas desacetilasas inhiben la diferenciación muscular inducida por MyoD provino del sorprendente hallazgo de que MEF2 puede unirse, a través de sus dominios MADS, a una histona desacetilasa. Esta interacción, que puede evitar la función de MEF2 y la diferenciación muscular, se bloquea normalmente durante la diferenciación porque la histona desacetilasa se fosforila mediante una proteincinasa dependiente de calcio/calmodulina; la desacetilasa fosforilada luego se mueve desde el núcleo al citoplasma. Tomados en conjunto, estos resultados indican que la activación de los genes de músculo mediante MyoD y MEF2 compite con la inactivación de los genes musculares mediante estructuras de cromatina represivas y que la localización nuclear frente a la citoplasmática, de los factores de la cromatina es un paso regulador clave.

Proteínas del ciclo celular. El comienzo de la diferenciación terminal en muchos tipos de células está asociado con la detención del ciclo celular, por lo general en G_1, lo que sugiere que la transición desde el estado determinado hacia el diferenciado puede estar influida por proteínas del ciclo celular incluidas las **ciclinas** y las **cinasas dependientes de ciclina** (cap. 21). Por ejemplo, ciertos inhibidores de cinasas dependientes de ciclina pueden inducir la diferenciación muscular en cultivo celular y las cantidades de estos inhibidores son muy superiores en las células musculares en diferenciación que en las que no están en diferenciación in vivo. Por el contrario, la diferenciación de mioblastos cultivados puede ser inhibida mediante la transfección de células con DNA que codifica la ciclina D1 bajo el control de un promotor constitutivamente activo. En muchos tipos celulares, la expresión de la ciclina D1, que suele producirse sólo durante G_1, es inducida por factores mitogénicos y conduce el ciclo celular (véase fig. 21-28). La capacidad de la ciclina D1 para prevenir la diferenciación de los mioblastos in vitro puede imitar aspectos de las señales in vivo que se oponen a la vía de diferenciación. Es probable que el antagonismo entre los reguladores positivos y negativos de la progresión G_1 cumpla un papel importante en el control de la miogénesis in vivo.

Las señales entre célula y célula son cruciales para la determinación del destino de las células musculares y la migración de los mioblastos

Como ya se dijo, después que los mioblastos surgen de las somitas no sólo deben proliferar sino también moverse a localizaciones apropiadas y formar los aditamentos adecuados a medida que se diferencian en células musculares (fig. 22-17). La expresión génica miogénica a menudo sigue procesos elaborados que le indican a ciertas células somitas que se delaminen desde el epitelio somita y en qué dirección moverse. Un factor de transcripción, Pax3, es producido en el subgrupo de las células somitas que formarán el músculo. Pax3 parece estar en la cima de la jerarquía hereditaria que controla la formación muscular en la pared corporal y en los miembros. Los mioblastos que migrarán, pero no las células que permanecen detrás, también producen un factor de transcripción denominado Lbx1. Si Pax3 no es funcional, las transcripciones de Lbx1 no se ven y los mioblastos no migran. Tanto Pax3 como Lbx1 pueden afectar la expresión de *myoD*.

La partida de mioblastos de las somitas depende de la recepción de una señal proteica denominada *factor de diseminación* o *factor de crecimiento de hepatocitos (SF/HGF)*. Esta señal es producida por células de tejido conectivo embrionario (mesénquima) en el extremo de los brotes a los cuales migran los mioblastos. La producción de SF/HGF es inducida previamente por otras señales secretadas, como el factor de crecimiento de fibroblastos y Sonic hedgehog, que son críticos para el desarrollo de los miembros (cap. 15). El receptor de la superficie celular para SF/HGF, que se expresa en los mioblastos, pertenece a la clase de receptores tirosincinasa (RTK) (cap. 14). Las células migran desde las somitas en las regiones a lo largo del eje corporal cabeza a cola donde se formarán los miembros, y a ningún otro lado, debido



▲ Fig. 22-17. Determinación embrionaria y migración de mioblastos en los mamíferos. Luego de la formación del tubo neural, cada somita forma el esclerotoma, que se desarrolla en estructuras esqueléticas, y el dermomiotoma. El dermomiotoma da origen a la dermis de la piel y a los músculos. Los mioblastos laterales migran al brote del miembro; los mioblastos mediales se desarrollan en los músculos del tronco. El resto de un dermomiotoma da origen al tejido conectivo de la piel. (Adaptado de M. Buckingham, 1992, *Trends Genet.* 8:144.)

a la presencia de SF/HGF en las localizaciones de los miembros y en ningún otro lado. Si la señal de SF/HGF o su receptor no es funcional, las células somitas producirán Lbx1, pero no continuarán migrando: por lo tanto no se formará ningún músculo en las extremidades. La expresión del gen *miogenina*, que es necesaria para la formación del miotubo, y de *mrf4*, que lo es para la diferenciación de la fibra muscular, no comienza hasta que los mioblastos en migración se aproximan a su destino en el brote de la extremidad; estos pasos en la diferenciación muscular terminal presumiblemente no son compatibles con la migración.

Nos acercamos apenas a algunas de las numerosas señales externas y factores de transcripción que participan en el desarrollo de un músculo apropiadamente diseñado. La función de estas moléculas reguladoras debe ser coordinada tanto en el tiempo como en el espacio durante la miogénesis.

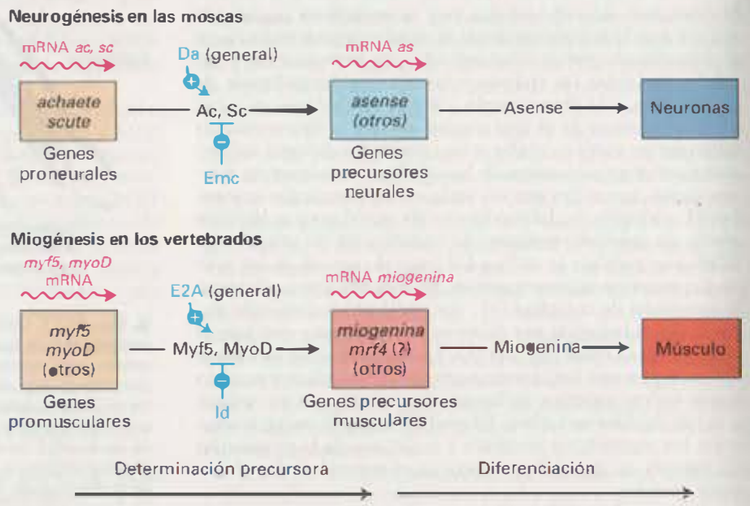
Las proteínas reguladoras bHLH actúan en la creación de otros tejidos

Cuatro factores de transcripción bHLH que son notablemente similares a las proteínas miogénicas bHLH controlan la neurogénesis en *Drosophila*. Proteínas similares parecen funcionar en la neurogénesis en los vertebrados y tal vez en la determinación y diferenciación de las células hematopoyéticas.

Las proteínas bHLH neurogénicas de *Drosophila* son codificadas por un segmento de DNA genómico de ≈100 kb, denominado *achaete-scute complex* (AS-C), que contiene cuatro genes designados *achaete (ac), scute (sc), letal de scute (l'sc)* y *asense (a)*. El análisis de los efectos de las mutaciones con pérdida de función indica que las proteínas Achaete (Ac) y Scute (Sc) participan en la determinación de las células madre neuronales, denominadas *neuroblastos*, mientras que la proteína Asense (AS) es necesaria para la diferenciación de la progenie de estas células en las neuronas. Estas funciones son análogas a las de MyoD y Myf5 en la determinación muscular y a la de la miogenina en la diferenciación. Otras dos proteínas de *Drosophila*, denominadas Da y Emc, son análogas en estructura y función a las E2A e Id de los vertebrados, respectivamente. Por ejemplo, los complejos heterodiméricos de Da con Ac o Sc se unen al DNA mejor que las formas homodiméricas de Ac y Sc. Emc, al igual que Id, carecen de un dominio básico de unión al DNA; se une a las proteínas Ac y Sc e inhibe así su asociación con Da y su unión al DNA. Las funciones similares de estas proteínas neurogénicas y miogénicas se representan en la figura 22-18.

En los vertebrados se identificó una familia de proteínas bHLH relacionadas con las proteínas Achaete y Scute de *Drosophila*. Una de éstas, denominada neurogenina, identificada en rata, ratón y rana, controla la formación de los neuroblastos. Los experimentos de hibridación in situ mostraron que la neurogenina es producida en un estadio inicial del desarrollo del sistema nervioso e induce la producción de NeuroD, otra proteína bHLH que actúa más tarde (fig. 22-19a). La inyección de grandes cantidades de mRNA de *neurogenina* en embriones de *Xenopus* demostró de manera adicional la capacidad de la neurogenina para inducir la neurogénesis (fig. 22-19b). Estos estudios sugieren que la función de la neurogenina es análoga a la de Achaete y Scute en *Drosophila*; de igual forma, NeuroD y Asense podrían tener funciones análogas en los vertebrados y en *Drosophila*, respectivamente.

Además de las neuronas, el sistema nervioso contiene gran número de células gliales, que también se originan del neuroectodermo. Las células gliales dan apoyo y aíslan neuronas; también proveen superficies de guía y de contacto para las neuronas en migración durante el desarrollo y envían una señal a las neuronas que promueven la formación de sinapsis. Las neurogeninas controlan los destinos de las células precursoras capaces de hacer neuronas o células gliales al promover el desarrollo neuronal y reprimir el desarrollo glial. Por ende, las neurogeninas son interruptores que controlan la decisión entre dos destinos alternativos al igual que los reguladores del tipo de apareamiento en las levaduras seleccionan entre tres tipos celulares.



▶ **Fig. 22-18. Comparación de genes que regulan la neurogénesis en *Drosophila* y la miogénesis en los mamíferos.** Los factores de transcripción bHLH tienen funciones análogas en la determinación de células precursoras (p. ej., los neuroblastos y los mioblastos) y su diferenciación en neuronas maduras y células musculares. En ambos casos, las proteínas codificadas por los genes que actúan primero (*izquierda*) se encuentran bajo el control tanto positivo como negativo de otras proteínas relacionadas (tipo azul). (Adaptado de Y. N. Jan y L. Y. Jan, 1993, *Cell* 75:827)



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 22-19 Los experimentos de inyección e hibridación in situ demuestran que la neurogenina actúa antes que la NeuroD en la neurogénesis de los vertebrados.** (a) Las secciones del tubo neural de rata se trataron con una sonda específica para el mRNA *neurogenina* (*izquierda*) o el mRNA de *NeuroD* (*derecha*). El espacio abierto en el centro es el ventrículo y las células que revisten esta cavidad se encuentran en la capa ventricular y luego migran hacia afuera. Como se ilustra en estas microfotografías, el mRNA de *neurogenina* se expresa en los neuroblastos en proliferación en la capa ventricular (*flecha*), mientras que el mRNA de *neuroD* está presente en los neuroblastos en migración que abandonaron la zona ventricular (*otra flecha*). (b) Una de las dos células en los embriones de *Xenopus* fue inyectada con mRNA de *neurogenina* (inj) y luego teñida con una sonda específica para mRNA específicos para neurona que codifican la tubulina β (*izquierda*) o la NeuroD (*derecha*). La región del embrión derivada de las células no inyectadas sirvió como control (con). El mRNA de la *neurogenina* indujo un incremento masivo de la cantidad de neuroblastos que expresan mRNA de *neuroD* y las neuronas que expresan mRNA de *β-tubulina* en la región del tubo neural derivado de la célula inyectada. (De Q. Ma et al., 1996, *Cell* 87:43; cortesía de D. J. Anderson.)

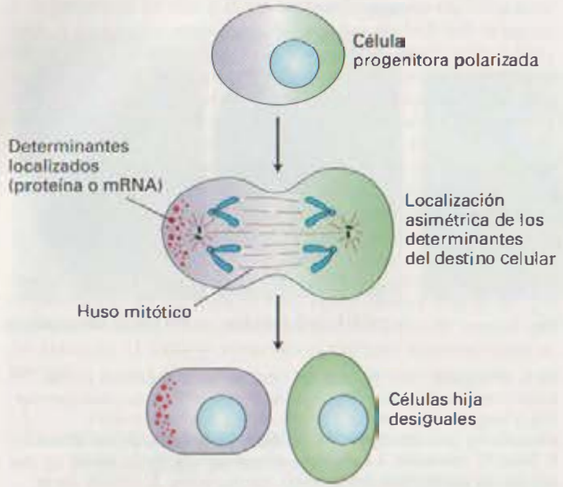
CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 22.3

Especificación y diferenciación del músculo

- El desarrollo del músculo esquelético comienza con la determinación inducida por señales de ciertas células del mesodermo en las somitas como mioblastos. Luego de su proliferación y migración, los mioblastos dejan de dividirse y se diferencian en células musculares multinucleadas (miotubos) que expresan las proteínas específicas de los músculos (véase fig. 22-14).
- Cuatro factores de transcripción miogénicos bHLH –MyoD, miogenina, Myf5 y MRF4, llamados factores reguladores musculares (MRF)– se asocian con E2A y MEF para formar grandes complejos transcripcionales que conducen la miogénesis y la expresión de genes específicos de los músculos.
- La dimerización de los factores de transcripción bHLH con diferentes compañeros modula la especificidad o afinidad de su unión a sitios reguladores de DNA específicos y también puede evitar su unión por completo.
- El programa miogénico conducido por los MRF depende del complejo remodelador de la cromatina Swi/Snf, que hace accesibles a los genes diana.
- El programa miogénico se inhibe mediante la unión de la proteína Id a MyoD, bloqueando así la unión de MyoD al DNA, y mediante las histonas desacetilasas, que reprimen la activación de los genes diana por los MRF.
- La migración de los mioblastos a las extremidades de los brotes está inducida por el factor scatter/factor de crecimiento de los hepatocitos (SF/HGF), una señal proteica secretada por las células mesenquimáticas (véase fig. 22-17). Los mioblastos deben expresar tanto los factores de transcripción Pax3 como Lbx1 para migrar.
- La diferenciación terminal de los mioblastos y la inducción de proteínas específicas de los músculos no suceden hasta que los mioblastos dejan de dividirse y comienzan a migrar.
- La neurogénesis en *Drosophila* depende de un grupo de cuatro proteínas neurogénicas bHLH que son conceptual y estructuralmente similares a las proteínas miogénicas de los vertebrados (véase fig. 22-18).
- Una proteína de los vertebrados relacionada, la neurogenina, es necesaria para la formación de precursores neuronales y también controla su división en neuronas o en células gliales.

22.4 Regulación de la división celular asimétrica

Durante la embriogénesis, la etapa más temprana en el desarrollo animal, la división celular asimétrica a menudo crea la diversidad inicial que en última instancia culmina en la formación de tipos celulares diferenciados. Aun en las bacterias, la división celular puede producir células hijas desiguales; por ejemplo, una que permanece adherida a un tallo de una planta y una que desarrolla un flagelo empleado para nadar. La *polarización*



▲ **Fig. 22-20. Características generales de las divisiones celulares asimétricas.** Diversos mecanismos pueden conducir a la distribución asimétrica de los componentes citoplasmáticos, como proteínas particulares o mRNA (puntos rojos) para formar una célula progenitora polarizada. La división de una célula polarizada será asimétrica si el huso mitótico se orienta de forma tal que los componentes citoplasmáticos se distribuyan desigualmente a las dos células hijas, como se muestra aquí. Sin embargo, si el huso está posicionado en forma diferente con relación a los componentes citoplasmáticos localizados, la división de una célula polarizada puede producir células hijas equivalentes.

es esencial para la división celular asimétrica de la célula progenitora y luego la incorporación diferencial de partes de la célula progenitora a las dos hijas (fig. 22-20). Se emplean diversos mecanismos moleculares para crear y propagar la asimetría inicial que polariza la célula progenitora. Además de ser diferentes, las células hijas a menudo deben ser colocadas en una orientación específica con respecto a las estructuras circundantes.

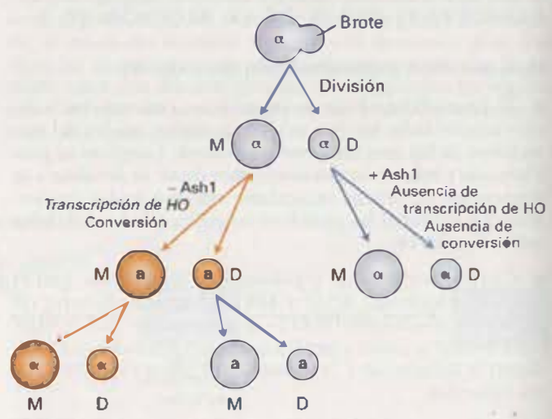
Comenzamos con un ejemplo muy bien comprendido de división celular asimétrica, la brotación de células de las levaduras, y continuamos hasta los recientes descubrimientos de complejos proteicos importantes para las divisiones celulares asimétricas en los organismos multicelulares. Vemos en este ejemplo el sistema complejo que conecta la división asimétrica con el proceso de controlar el tipo celular.

La conversión del tipo de apareamiento de las levaduras depende de la división celular asimétrica

Las células de *S. cerevisiae* emplean un mecanismo notable para controlar la diferenciación a medida que progresa su linaje. Que una célula de levadura haploide exhiba el tipo de apareamiento a o α está determinado por cuáles genes están presentes en el locus *MAT* (véase fig. 22-11). Como se describió en el capítulo 11, el locus *MAT* en el genoma de *S. cerevisiae* está flanqueado por dos locus transcripcionalmente inactivos, "silenciosos" que contienen las secuencias α o a (véase fig. 11-28). Un reordenamiento específico del DNA lleva los genes que codifican los factores de transcipción específicos para α o específicos para a, desde este locus silencioso al locus *MAT* activo donde pueden ser transcriptos.

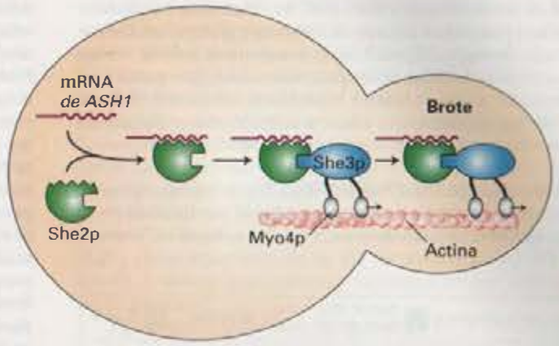
Es interesante notar que algunas células haploides de levadura pueden alternar repetidamente entre los tipos α y a. La *conversión del tipo de apareamiento* tiene lugar cuando el alelo α que ocupa el locus *MAT* es reemplazado por el alelo a o viceversa. El primer paso en este proceso está catalizado por la endonucleasa HO, que se expresa en las células progenitoras, pero no en las células hijas. Por lo tanto, la conversión del tipo de apareamiento tiene lugar sólo en las células progenitoras (fig. 22-21). La transcripción del gen *HO* es dependiente del *complejo remodelador de la cromatina Swi/Snf* (véase fig. 11-37), el mismo complejo que se describió al comienzo de la discusión de la miogénesis. Las células hijas de las levaduras que se originaron por brotación de las células progenitoras contienen una proteína denominada Ash 1 que evita el reclutamiento del complejo Swi/Snf al gen *HO*, evitando así su transcripción. La ausencia de Ash1 en las células progenitoras les permite transcribir el gen *HO*.

Experimentos recientes revelaron cómo se establece la asimetría en la distribución de Ash1 entre las células progenitora e hija. El mRNA de *ASH1* se acumula en el brote en crecimiento que formará una célula hija debido a la acción de una proteína motora de miosina (cap. 19). Esta proteína motora, denominada Myo4p, mueve el mRNA del *ASH1*, al igual que un complejo ribonucleoproteico, a lo largo de los filamentos de actina sólo en una dirección, hacia el brote (fig. 22-22). Dos proteínas conectoras unen el mRNA de *ASH1* a la proteína motora. Para el momento en que el brote se separa de la célu-



▲ **Fig. 22-21. Especificidad de la conversión del tipo de apareamiento en las células haploides de las levaduras.** La división por brotación forma una célula madre más grande (M) y células hijas más pequeñas (D), las cuales tienen el mismo tipo de apareamiento que la célula original (α en este ejemplo). La madre puede cambiar el tipo de apareamiento durante el G_1 del siguiente ciclo celular y luego dividirse nuevamente, produciendo dos células del tipo a opuesto. El cambio depende de la transcripción del gen *HO*, que tiene lugar sólo en ausencia de la proteína Ash1. Las células hijas más pequeñas, que producen proteína Ash1, no pueden cambiar; luego de crecer en tamaño a través de la interfase, se dividen para formar una célula madre y una célula hija. Las células anaranjadas y las flechas indican sucesos de cambio.

▶ **Fig. 22-22. Modelo para la restricción de la conversión del tipo de apareamiento de las células madre en *S. cerevisiae*.** La proteína Ash1 evita que una célula transcriba el gen *HO* cuya proteína codificada inicia el reordenamiento del DNA que resulta en el cambio del tipo de apareamiento de a a α o de α a a. La conversión tiene lugar sólo en la célula madre, luego de que se separa de una célula hija recién brotada, debido a que la proteína Ash1 está presente en la célula hija, pero no en la célula madre. El fundamento molecular para esta localización diferencial de Ash1 es el transporte unidireccional del mRNA de *ASH1* al brote. Una proteína conectora, She2p, se une a secuencias 3′ no traducidas específicas en el mRNA de *ASH1* y también se une a la proteína She3p. Esta proteína a su vez se une a una miosina motor, Myo4p, que se mueve a lo largo de los filamentos de actina en el brote. (Véase S. Koon y B. J. Schnapp, 2001, *Curr. Biology* 11:R166-R168.)



TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Localización del mRNA ASH1

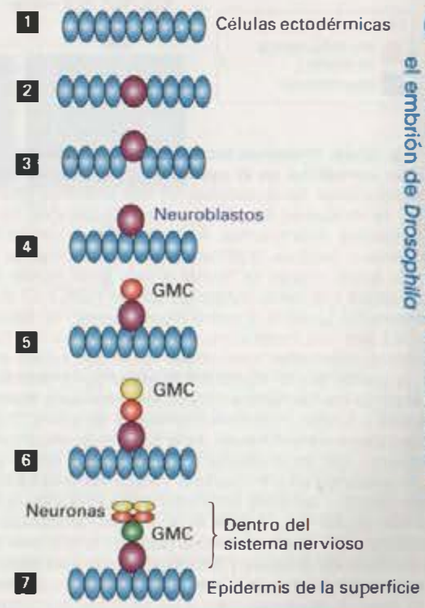
la progenitora, a ésta se le agota en gran parte el mRNA del *ASH1* y por lo tanto puede cambiar el tipo de apareamiento en el siguiente G_1 antes de que se produzca mRNA de *ASH* adicional y antes de la replicación del DNA en la fase S.

Las levaduras en brotación emplean un mecanismo relativamente simple para crear diferencias moleculares entre las dos células formadas por división. En los organismos superiores, la polarización de la célula progenitora involucra muchos más participantes, y además, como en la levadura, el huso mitótico debe estar orientado de forma tal que cada célula hija reciba su propio conjunto de componentes citoplasmáticos. Para ilustrar estas complejidades, nos centramos en la división asimétrica de los neuroblastos en *Drosophila*. Los estudios genéticos en *C. elegans* y *Drosophila* revelaron los participantes clave, un primer paso para comprender cómo se regula la división celular en los organismos multicelulares a nivel molecular.

En los extremos opuestos de los neuroblastos en división en *Drosophila* se localizan proteínas críticas reguladoras de la asimetría

Los neuroblastos, que son células madre, se originan de una capa de células ectodérmicas que tiene el espesor de una célula. Al igual que en los vertebrados, el ectodermo de *Drosophila* forma tanto la epidermis como el sistema nervioso y muchas células ectodérmicas tienen el potencial de asumir el destino neuronal o el epidérmico. Bajo el control de los genes que se activan sólo en ciertas células, algunas de ellas se incrementan en tamaño y comienzan a desligarse de la capa ectodérmica. En este punto, las células delaminantes utilizan la señalización Notch para mediar la inhibición lateral de sus vecinos, haciendo que retengan el destino epidérmico (véanse figs. 14-29 y 15-36). Las células delaminantes se mueven hacia adentro y se convierten en neuroblastos esféricos, mientras que las células epidérmicas prospectivas permanecen detrás y se aproximan para formar una lámina tensa.

Una vez formados, los neuroblastos sufren divisiones asimétricas, que se recrean a sí mismas en cada división y producen una *célula madre ganglionar (GMC)* en el lado basal del neuroblasto (fig. 22-23). Un único neuroblasto producirá varias GMC; cada GMC a su vez forma dos neuronas. Según dónde se forman en el embrión y los eventos reguladores consiguientes, los neuroblastos pueden formar más o menos

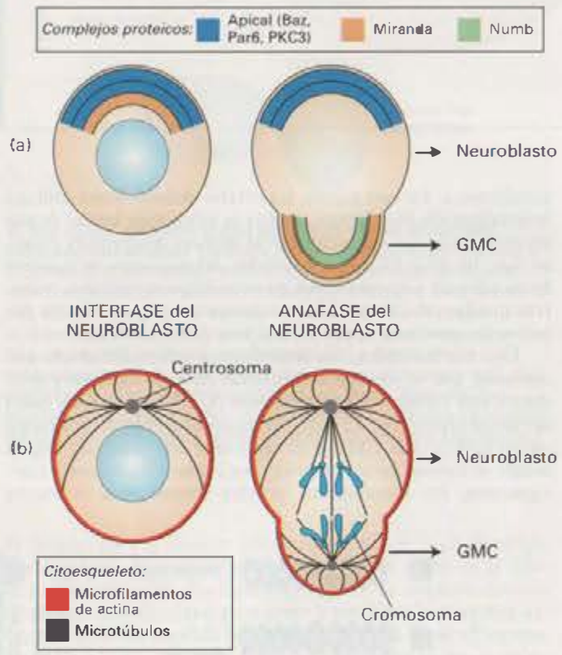


TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Divisiones celulares ectodérmicas en el embrión de *Drosophila*

▶ **Fig. 22-23. División celular asimétrica durante la neurogénesis de *Drosophila*.** El brote ectodérmico (1) del embrión temprano da origen a las células epidérmicas y neuronales. Los neuroblastos, las células madre del sistema nervioso, se forman cuando las células del ectodermo aumentan de tamaño, se separan del epitelio ectodérmico y se mueven hacia el interior del embrión (2–4). Cada neuroblasto que se origina se divide asimétricamente para recrearse a sí mismo y producir una célula madre ganglionar (GMC) (5). Las divisiones posteriores de un neuroblasto producen más GMC, creando una pila de estas células precursoras (6). Cada GMC se divide una vez para dar origen a dos neuronas (7). Los neuroblastos y sus GMC descendientes pueden tener diferentes destinos según su localización.

GMC. Los neuroblastos y las GMC en diferentes localizaciones exhiben patrones distintos de expresión génica, un indicador de sus destinos. El análisis de los mutantes de la mosca condujo al descubrimiento de proteínas clave que participan en la creación de neuroblastos específicos, inhibiendo la conversión de las células epidérmicas a neuroblastos y dirigiendo los neuroblastos para que se dividan asimétricamente.

Complejo apical Baz/Par6/aPKC. Un complejo ternario de proteínas, denominado *complejo apical*, se localiza en el extremo del neuroblasto de mosca que se volverá el "nuevo"



▲ Fig. 22-24. Proteínas localizadas que controlan la división celular asimétrica en el neuroblasto de *Drosophila*. (a) El complejo apical (azul), consiste en tres proteínas (Baz, Par6 y PKC), se localiza en las células ectodérmicas y en los neuroblastos delaminantes. A medida que un neuroblasto comienza a dividirse, la proteína Miranda (naranja) se acumula en el lado apical y luego se mueve al lado basal, donde será incorporada a la célula madre ganglionar (GMC). El segundo componente basal, la proteína Numb (verde), se detecta sólo en forma basal. Las mutaciones en los genes que codifican las proteínas polarizadas interrumpen la división celular asimétrica. (b) Se piensa que el transporte mediado por proteínas motoras a lo largo de los filamentos citoesqueléticos ubica los complejos apicales y basales. Los microfilamentos de actina (rojo) yacen inmediatamente por debajo de la superficie celular en todo momento. Los microtúbulos (azul) se irradian desde el centrosoma durante la interfase y luego se ensamblan en el huso mitótico, adherido a los centrosomas duplicados, durante la división celular. Nótese que en la división neuroblasto-GMC el centrosoma se descentra ubicándose en el extremo del neuroblasto de la célula y los cromosomas (gris claro) se diagraman alineados en la parte superior del huso. (Adaptado de C. Q. Doe y B. Bowerman, 2001, *Curr. Opin. Cell Biol.* 13:68.)

neuroblasto en el proceso de división. Este complejo todavía está localizado en un extremo de todas las células ectodérmicas. Se queda en el extremo apical a medida que un nucleoblasto prospectivo se delamina a partir de la lámina ectodérmica (fig. 22-24a, *izquierda*). Tres proteínas componen el complejo apical; Baz, Par6 y aPKC; este último es una isoforma de la proteincinasa C. El complejo Baz/Par6/aPKC persiste en el extremo apical de la interfase desde la interfase tardía (etapa G_2) hasta la anafase tardía en la mitosis y luego se dispersa o es destruido (véase fig. 20-29 para las etapas mitóticas). Después de cada división del neuroblasto, el complejo se vuelve a formar en el extremo apical del neuroblasto de la progenie en la siguiente interfase. Aún es incierto cómo la información de polaridad se preserva a través de la telofase, puesto que no se encontró ninguna proteína conocida durante ese tiempo. Como ya se dijo, la primera división celular de *C. elegans* luego de la fertilización es asimétrica, se forman una célula AB y una célula P1, que tienen destinos bastante diferentes (véase fig. 22-9). Notablemente, un complejo proteico, como el Baz/Par6/aPKC de la mosca, controla la asimetría de la división de P1-AB; complejos proteicos similares existen también en los mamíferos.

Dos mecanismos controlan la localización apical del complejo Baz/Par6/aPKC de *Drosophila*: el primero funciona en el ectodermo antes de la delaminación del neuroblasto; el segundo está activo durante las divisiones repetidas de los neuroblastos delaminados. El primer mecanismo involucra al menos tres proteínas, Scribble (Scrib), Discs-large (Dlg) y Larva gigante letal (Lgl). Estas proteínas se encuentran en la región cortical de las células del ectodermo (p. ej., la región inmediatamente debajo de la membrana plasmática), pero no están polarizadas a lo largo del eje apical-basal de estas células. Por lo tanto, a pesar de ser necesarias para la localización apical del complejo Baz/Par6/aPKC, las proteínas Scrib/Dlg/Lgl tal vez no sean suficientes. Una vez que un neuroblastoma se ha separado del ectodermo, la subunidad G_o de la proteína heterotrimérica G y otras dos proteínas denominadas Inscuteable y Compañera de Inscuteable se unen al complejo Baz/Par6/aPKC y forman un complejo de seis proteínas. Estas dos proteínas adicionales probablemente estabilizan el complejo Baz/Par6/aPKC. El reensamblaje de todo el complejo en el extremo apical que sigue a la división de cada neuroblasto requiere los microfilamentos de actina (fig. 22-24b). En general, la segregación asimétrica de las proteínas requiere actina pero no tubulina, lo que sugiere que el transporte, mediado por proteínas motoras, de estas proteínas a lo largo de microfilamentos cumple un papel en su localización apical.

Proteínas basales. En un neuroblasto en división dos proteínas basales se encuentran en el extremo que formará una célula madre del ganglio (GMC) en la división (véase fig. 22-24a, *derecha*). La ubicación de estas proteínas, incluidas Miranda y Numb, en el extremo basal de los neuroblastos requiere el complejo apical Baz/Par6/aPKC. Las proteínas apicales establecen una polaridad durante la interfase y la maquinaria que transporta a Numb y Miranda a la mitosis lee e interpreta esa polaridad. La proteína Numb se localiza a lo largo y ancho de la célula durante la interfase; en la profase se localiza basalmente. Por el contrario, Miranda inicialmente se ensambla en el extremo apical; luego se mueve al extremo basal en la profase. El complejo apical Baz/Par6/aPKC se forma aun cuando falta cada una de las proteínas basales debido a mutaciones. Sin embargo, las mutaciones en cualquiera de los componentes del complejo apical evitan que las proteínas Miranda y Numb se muevan a la región basal. En cambio, se acumulan alrededor de la región cortical o en masa a través de toda la célula. La idea más simple, que los complejos basales se forman dondequiera que el complejo apical esté ausente, está tal vez equivocada, puesto que parte de las células no contienen ninguno de estos complejos.

Las moléculas ubicadas basalmente incluyen la proteína Prospero, un factor de transcripción que contiene un homeodominio de unión al DNA; la proteína Miranda, que tiene una estructura en espiral; Staufen, una proteína de unión al RNA y el mRNA *prospero*. Durante cada ciclo de división del neuroblasto se forman nuevas proteínas Prospero durante la interfase y se incorporan a la región basal, que es distribuida a la GMC en el momento del corte. En ausencia de Prospero, las GMC no transcriben los genes apropiados y no se desarrollan en neuronas normales. La localización de un factor de transcripción en el citoplasma provee una conexión entre la asimetría del citoplasma y la determinación de los destinos celulares ulteriores, lo que puede explicar cómo un factor de transcripción se distribuye preferentemente a una de las dos células hijas.

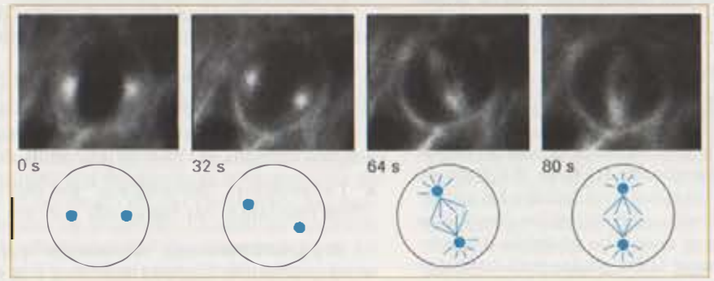
La orientación del huso mitótico está vinculada a los factores de asimetría celular citoplasmática

Para que los complejos proteicos se incorporen en forma diferencial a dos células hijas, se necesita que el plano de la división celular esté orientado apropiadamente. En los neuroblastos de la mosca en división, el huso mitótico primero se alinea en forma perpendicular al eje apical-basal y luego gira 90° para alinearse con éste al mismo tiempo que los complejos basales comienzan a localizarse en el lado basal (fig. 22-25). El complejo apical, que ya está en su lugar antes de la rotación del huso, controla la orientación final de éste. Esto está sustentado por el hallazgo de que mutaciones en cualquiera de los componentes del complejo apical eliminan la coordinación del huso con polaridad apical-basal, lo que vuelve aleatoria la orientación del huso.

La orientación del huso está regulada por proteínas relacionadas con la actina y la miosina. La Par6 de los mamíferos, un componente del complejo apical, puede unir dos pequeñas proteínas GTPasa, Cdc42 y Rac1, que controlan la disposición de los microfilamentos de actina en el citoesqueleto (véase fig. 19-29). La proteína Larva gigante letal (Lgl), un componente de la vía de asimetría Scrib/Dlg/Lgl, ayuda a ubicar basalmente a Miranda en los neuroblastos de la mosca.

Lgl se une a la miosina II, que actúa en la citocinesis (véase fig. 19-20). La misma Lgl se localiza uniformemente alrededor de la corteza. Lgl es fosforilada por el complejo apical y puede ser inactivada sobre el lado apical para permitir la acumulación basal de Miranda. Dos proteínas de las levaduras relacionadas con Lgl también se unen a la miosina II; han estado implicadas en la exocitosis y la secreción, específicamente en la unión de vesículas posGolgi con la membrana plasmática (cap. 17). Las mutaciones en las dos proteínas de las levaduras suprimieron mutaciones en el gen de la *miosina II*. Esta observación permite interpretar que la función de la miosina II en la orientación del huso es opuesta a la de las proteínas similares a Lgl: la reducción de la función de una proteína se mejora mediante la reducción de la otra, restableciendo una semejanza con el balance normal. Por lo tanto, en este caso la miosina y la Lgl probablemente actúan en direcciones opuestas: la miosina II moviendo a Miranda u otros materiales para controlar la orientación del huso y Lgl restringiéndola.

Evidencia adicional de la importancia de la miosina en la orientación del huso proviene del hallazgo de que otro pariente



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 22-25 La secuencia temporal de imágenes por fluorescencia revela la rotación del huso mitótico en los neuroblastos en división asimétrica. Se inyectaron embriones tempranos de *Drosophila* con un gen híbrido compuesto del gen que codifica la proteína fluorescente verde (GFP) fusionada con el gen que codifica Tau, una proteína que se une a los microtúbulos. En la parte superior se ve la secuencia temporal de imágenes de un único neuroblasto en división en un embrión vivo. El lado basal se encuentra en la parte superior y el lado apical en la parte inferior. En el momento 0, equivalente a la profase, los dos centrosomas son visibles en lados opuestos de la célula. Esto funciona como los polos del huso; a medida que se produce la mitosis, los microtúbulos que forman el huso mitótico se ensamblan desde los polos (véase fig. 20-29). En imágenes sucesivas (en 32, 64 y 80 segundos), se puede ver formarse el huso bipolar y rotar 90 grados para alinearse con el eje basal-apical, como se representa esquemáticamente en la parte inferior. (De J. A. Kaltschmidt et al., 2000, *Nature Cell Biol.* 2:7-12; cortesía de J. Kaltschmidt y A. H. Brand, Wellcome/CRC Institute, Cambridge University.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Asimetría del huso mitótico en la división celular neuroblástica en *Drosophila*

de la miosina, la miosina VI, se une directamente a Miranda. Además, las mutaciones en la miosina VI de las moscas evitan el direccionamiento basal de Miranda y simultáneamente bloquean la orientación apropiada del huso. Estos hallazgos nos dan una idea de cómo los complejos proteicos localizados están coordinados con la división celular, de manera que cada célula hija reciba las cantidades apropiadas de diversos complejos.

Al menos algunos de los reguladores de la división celular asimétrica descubiertos en las moscas y los gusanos están presentes en los vertebrados y tienen papeles similares allí. Por ejemplo, la Numb de los mamíferos es necesaria para que mantenga la población de células madre neuronales. La conservación evolutiva de proteínas y mecanismos facilita el progreso rápido de la investigación.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 22.4

Regulación de la división celular asimétrica

- La división celular asimétrica requiere la polarización de la célula en división, que suele implicar la localización de algunos componentes citoplasmáticos y luego la distribución desigual de estos componentes a las células hijas (véase fig. 22-20).
- En la división asimétrica de las levaduras en brotación, un sistema de transporte dependiente de la miosina transporta el mRNA de *ASH1* al brote (véase fig. 22-22).
- La proteína Ash1 se produce en las células hijas poco después de la división y evita la expresión de la endonucleasa HO, que es necesaria para la conversión del tipo de apareamiento. Por lo tanto, una célula hija no puede alterar el tipo de apareamiento, mientras que sí puede hacerlo la célula progenitora de la cual surge (véase fig. 22-21).
- La división celular asimétrica en los neuroblastos de *Drosophila* depende de la localización del complejo proteico apical (Baz/Par6/PKC3) y de dos grupos de proteínas basales. Las proteínas basales son incorporadas en la célula madre ganglionar (GMC) y contienen proteínas que determinan el desarrollo celular esperado (véase fig. 22-24).
- El complejo apical Baz/Par6/aPKC controla además la división celular asimétrica en *C. elegans* y quizá también en los mamíferos.
- Los factores de asimetría ejercen su influencia al menos en parte controlando la orientación del huso mitótico, de manera que las proteínas y las estructuras localizadas asimétricamente se incorporen diferencialmente en las dos células hijas. Las proteínas miosina se unen a las proteínas que controlan los factores de asimetría de las células para controlar la orientación del huso.

22.5 Muerte celular y su regulación

La muerte celular programada es un destino celular, un extraño tipo de destino celular, pero no obstante, esencial. La muerte celular evita que nuestras manos tengan membranas, que persistan nuestras colas embrionarias, que el sistema inmunitario responda a nuestras propias proteínas y que nuestro cerebro se llene de conexiones eléctricas inútiles. De hecho, la mayoría de las células generadas durante el desarrollo cerebral mueren durante el desarrollo.

Las interacciones celulares regulan la muerte celular en dos formas fundamentales. Primero, en los organismos multicelulares la mayoría de las células, si no todas, requieren señales para mantenerse vivas. En ausencia de estas señales de supervivencia, denominadas **factores tróficos**, las células activan un programa de "suicidio". Segundo, en algunos contextos de desarrollo, incluido el sistema inmunitario, señales específicas inducen un programa de "asesinato" que mata a las células. Ya sea que las células cometan suicidio por carencia de señales de supervivencia o sean eliminadas por medio de señales exterminadoras de otras células, los estudios recientes sugieren que la muerte está mediada por una vía molecular común. En esta sección, primero distinguimos la muerte celular programada de la muerte debida al daño tisular, luego consideramos el papel de los factores tróficos en el desarrollo neuronal y por último describimos la vía efectora conservada evolutivamente que conduce al suicidio o al asesinato celular.

La muerte celular programada tiene lugar por apoptosis

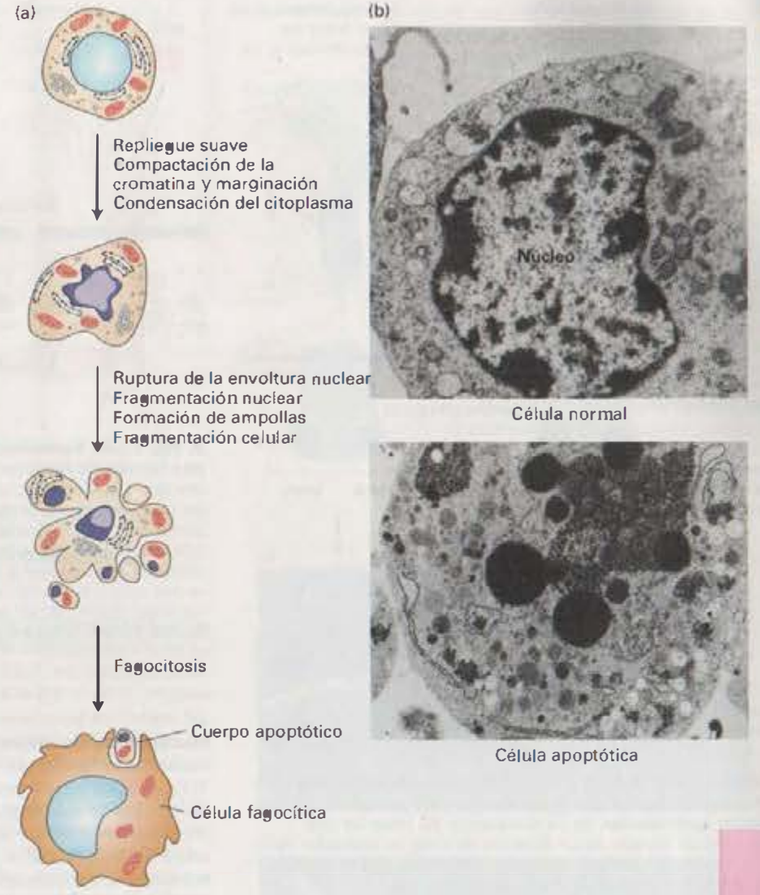
El fallecimiento de las células mediante la muerte celular programada está marcado por una secuencia bien definida de cambios morfológicos, denominados en forma colectiva **apoptosis**, palabra griega que significa "declive" o "caída", como una hoja de un árbol. Las células moribundas disminuyen de tamaño, se condensan y luego se fragmentan, liberando pequeños cuerpos apoptóticos limitados por membranas, que generalmente son absorbidos por otras células (fig. 22-26; véase también fig. 1-19). El núcleo se condensa y el DNA se fragmenta. Más importante aún, los constituyentes celulares no se liberan al medio extracelular donde podrían traer efectos nocivos a las células circundantes. Los cambios tan estereotipados que acompañan la apoptosis sugirieron a los primeros investigadores que este tipo de muerte estuvo bajo el control de un programa estricto. Este programa es crítico durante la vida embrionaria y la adulta para mantener el número y la composición normal de células.

Los genes involucrados en el control de la muerte celular codifican proteínas con tres funciones diferentes:

- Las proteínas "asesinas" se necesitan para que una célula comience el proceso apoptótico.
- Las proteínas "destructivas" o de "destrucción" que digieren, por ejemplo, el DNA en una célula moribunda.
- Las proteínas "devoradoras" son necesarias para que una célula moribunda sea fagocitada por otra célula.

A primera vista esta "devoración" parece ser simplemente un proceso de limpieza posterior a la muerte, pero cierta evidencia sugiere que es una parte de la decisión final de muerte. Por ejemplo, mutaciones en los genes asesinos siempre evitan que las células inicien la apoptosis, mientras que las mutaciones que bloquean la devoración a veces permiten que sobrevivan células que normalmente mueren. Es decir, las células con mutaciones en el gen devorador pueden iniciar la apoptosis, pero luego a veces se recuperan.

A diferencia de la apoptosis, las células que mueren en respuesta al daño tisular exhiben cambios morfológicos muy diferentes, denominados **necrosis**. Típicamente, las células que atraviesan este proceso se dilatan, estallan y liberan sus contenidos intracelulares, que pueden dañar las células circundantes y suelen causar inflamación.



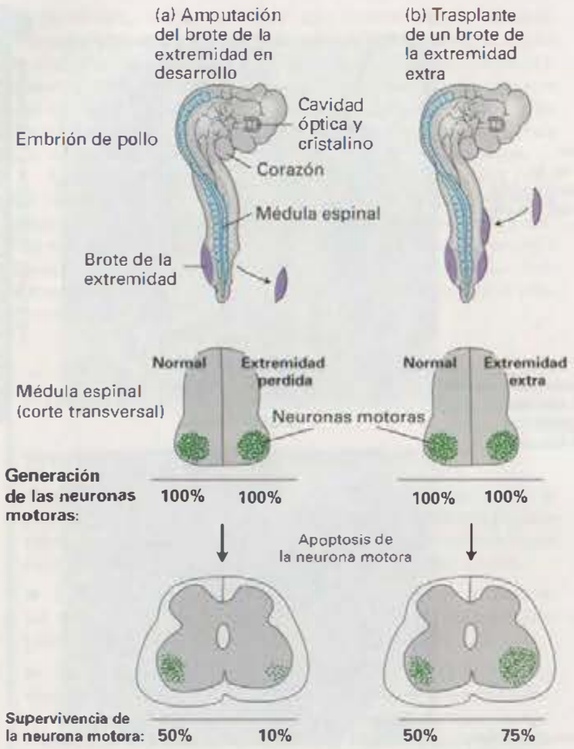
▶ Fig. 22-26. Características de la muerte celular por apoptosis en la observación con el microscopio electrónico. (a) Esquemas que ilustran la progresión de los cambios morfológicos observados en las células apoptóticas. Al comienzo de la apoptosis, se produce una densa condensación cromosómica en la periferia nuclear. También disminuyen en tamaño las células del cuerpo, aunque la mayoría de los orgánulos permanecen intactos. Posteriormente se fragmentan tanto el núcleo como el citoplasma y forman los cuerpos apoptóticos, que son fagocitados por las células circundantes. (b) Microfotografías que comparan una célula normal (*arriba*) y una célula apoptótica (*abajo*). En esta última se ven claramente esferas densas de cromatina compactada a medida que el núcleo comienza a fragmentarse. [Parte (a) adaptada de J. Kuby, 1997, *Immunology*, 3d ed., W. H. Freeman & Co., p. 53. Parte (b) de M. J. Arends y A. H. Wyllie, 1991, *Int'l. Rev. Exp. Pathol.* 32:223.]

Las neurotrofinas estimulan la supervivencia de las neuronas

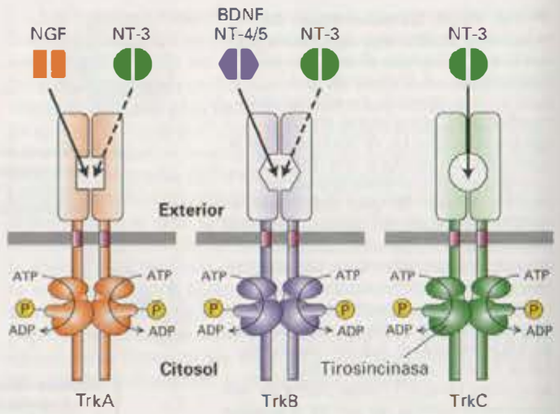
Los primeros estudios que demostraron la importancia de factores tróficos en el desarrollo celular provinieron del análisis del sistema nervioso en desarrollo. Cuando las neuronas crecen estableciendo conexiones con otras neuronas o con los músculos, a veces a través de distancias considerables, crecen más células de las que finalmente sobrevivirán. Las que hacen conexiones prevalecen y sobreviven; las que fallan en conectarse, mueren.

A comienzos de 1900 se demostró que la cantidad de neuronas que inervaban la periferia dependía del tamaño del tejido al cual se conectarían, el denominado "campo diana". Por ejemplo, la extirpación de los esbozos de las extremidades del embrión de pollo en desarrollo produjo una disminución de la cantidad de neuronas sensitivas y de motoneuronas que los inervaban (fig. 22-27). En forma contraria, el injerto de tejido ectópico de extremidades inducía un incremento de la cantidad de neuronas en las regiones correspondientes de la espina dorsal y de los ganglios sensitivos. De hecho, los incrementos graduales de tamaño en el campo diana se acompañan por incrementos graduales en la cantidad de neuronas que lo inervan. Se descubrió que esta relación es el resultado de la supervivencia selectiva de neuronas más que de cambios en su diferenciación o proliferación. La observación de que muchas neuronas motoras y sensitivas mueren luego de alcanzar su campo diana periférico sugirió que estas neuronas compiten por factores de supervivencia producidos por el tejido diana.

Posteriormente a estas primeras observaciones, los científicos descubrieron que el trasplante de un sarcoma murino a un pollo producía un aumento notable de la cantidad de ciertos tipos de neuronas. Este hallazgo implicaba que el tumor era una fuente rica en el supuesto factor trófico. Para aislar y purificar este factor, conocido simplemente como factor de crecimiento nervioso (NGF), los científicos emplearon un ensayo in vitro en el cual se midieron las prolongaciones de las neuritas de los ganglios sensitivos (nervios). Las neuritas son extensiones del citoplasma celular que pueden crecer para convertirse en los extensos cables del sistema nervioso, los axones y las dendritas (véase fig. 7-29). El descubrimiento



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 22-27 La supervivencia de las neuronas motoras depende del tamaño del campo diana muscular que inervan.** (a) La eliminación del brote de una extremidad de un lado de un embrión de pollo de alrededor de dos días y medio da como resultado una disminución importante de la cantidad de neuronas motoras sobre el lado afectado. En un embrión amputado, se generan cantidades normales de neuronas motoras sobre ambos lados (*centro*). Más tarde en el desarrollo, muchas menos neuronas motoras permanecen sobre el lado de la médula espinal con el miembro perdido que sobre el lado normal (*abajo*). Nótese que sólo sobreviven normalmente alrededor del 50% de las neuronas motoras que originalmente se generaron. (b) El trasplante de un brote de una extremidad extra a un embrión temprano de pollo produce el efecto opuesto, más neuronas motoras sobre el lado con tejido diana adicional que sobre el lado normal. (Adaptado de D. Purves, 1988, *Body and Brain*: A Trophic Theory of Neural Connections [Cambridge, MA: Harvard University Press], y E. R. Kandel, J. H. Schwartz y T. M. Jessell, 2000, *Principles of Neural Science*, 4th ed. (New York: McGraw-Hill, p. 1054, fig. 43-11.)

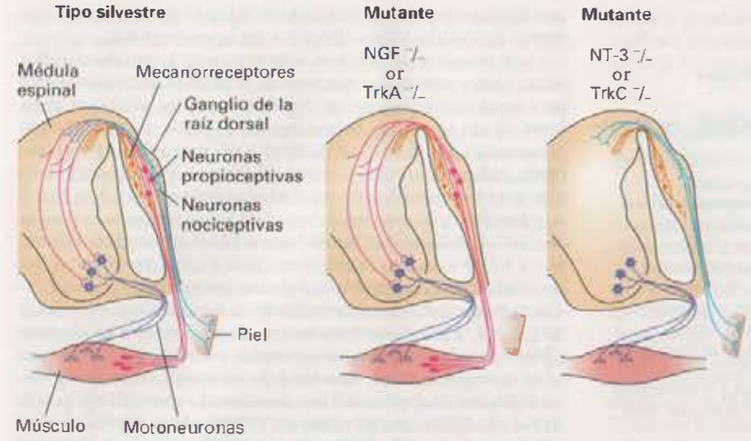


▲ **Fig. 22-28. Especificidad de las neurotrofinas para los Trks, una familia de receptores tirosincinasas.** Cada neurotrofina se une con alta afinidad a uno de los receptores Trk indicados por la flecha entera desde el ligando al receptor. NT-3 también puede unirse con menor afinidad tanto a TrkA como a TrkB, como se indica por medio de la flecha discontinua. Además, las neurotrofinas se unen a un receptor distinto denominado $p75^{NTR}$, ya sea solo o en combinación con Trk. NGF: factor de crecimiento nervioso; BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro; NT-3: neurotrofina-3. (Adaptado de WD. Snider, 1994, *Cell* 77:627.)

posterior de que la glándula submaxilar del ratón también produce grandes cantidades de NGF permitió a los bioquímicos purificarlo hasta lograr la homogeneidad y secuenciarlo. Es un homodímero de dos polipéptidos de 118 residuos, que pertenece a una familia de factores tróficos estructural y funcionalmente relacionados denominados *neurotrofinas*. El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y la neurotrofina-3 (NT-3) también son miembros de esta familia proteica.

Receptores de neurotrofina. Las neurotrofinas se unen y activan una familia de receptores tirosincinasas denominada *Trks*. (La estructura general de los receptores tirosincinasas y de las vías de señalización intracelular que activan se aborda en el cap. 14.) Como se muestra en la figura 22-28, NGF se une a TrkA; a BDNF, a TrkB; y NT-3, a TrkC. La unión de estos factores a sus receptores proporciona una señal de supervivencia para diferentes clases de neuronas. Un segundo tipo de receptores denominados $p75^{NTR}$ (NTR: receptor de neurotrofina) también se unen a las neurotrofinas, pero con menor afinidad. Sin embargo, la $p75^{NTR}$ forma complejos heteromultidiméricos con los diferentes receptores Trk; esta asociación incrementa la afinidad de los Trk por sus ligandos. Algunos estudios indican que la fijación de NGF a $p75^{NTR}$ en ausencia de TrkA puede inducir la muerte celular más que impedirla.

***Knockout* de neurotrofinas y sus receptores.** Para determinar con exactitud el papel de las neurotrofinas en el desarrollo, los científicos produjeron ratones con mutaciones *knockout* (de desactivación) en cada una de las neurotrofinas y sus receptores. Estos estudios revelaron que se necesitan las diferentes neurotrofinas y sus correspondientes receptores para la supervivencia de diferentes clases de neuronas sensoriales, que transportan señales desde los sistemas sensoriales periféricos hasta el cerebro (fig. 22-29). Por ejemplo, las neuronas sensibles al dolor (nociceptivas) que expresan TrkA, se pierden selectivamente del ganglio de la raíz dorsal de ratones *knockout* que carecen de NGF o de TrkA, mientras que las neuronas que expresan Trk-B y Trk-C no se afectan en tales inactivaciones. Como contraste, en el ganglio de la raíz dorsal en los mutantes *TrkC* y *NT-3* faltan las neuronas propioceptivas que expresan TrkC, que detectan la posición de las extremidades.



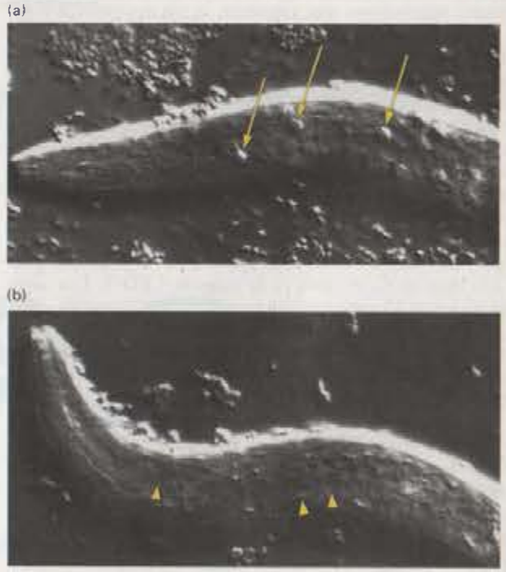
◀ **FIGURA EXPERIMENTAL 22-29 Diferentes clases de neuronas sensoriales están ausentes en los ratones *knockout* carentes de diferentes factores tróficos o de sus receptores.** En los animales que carecen del factor de crecimiento nervioso (NGF) o de su receptor TrkA, faltan las pequeñas neuronas (azul) nociceptivas (sensibles al dolor) que inervan la piel. Estas neuronas expresan el receptor TrkA e inervan los sitios productores de NGF. En los animales que carecen ya sea de neurotrofina-3 (NT-3) o de su receptor TrkC, faltan las grandes neuronas propioceptivas (rojo) que inervan los husos musculares. El músculo produce NT-3 y las neuronas propioceptivas que expresan TrkC. Los mecanorreceptores (marrón), otra clase de neuronas sensoriales en el ganglio de la raíz dorsal, no están afectados en estos mutantes. (Adaptado de W. D. Snider, 1994, *Cell* 77:627)

Una cascada de proteínas caspasas actúan en una vía apoptótica

La profundización de los mecanismos moleculares que regulan la muerte celular provinieron de estudios genéticos en *C. elegans*. Como se vio en la sección 22.1, los científicos rastrearon el linaje de todas las células somáticas en *C. elegans* desde el huevo fecundado hasta el gusano maduro (véase fig. 22-9). De las 947 células somáticas generadas durante el desarrollo de la forma adulta hermafrodita, 131 células mueren en forma programada.

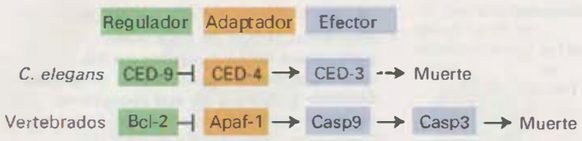
Mediante mutaciones específicas se han identificado diversos genes cuyas proteínas codificadas desempeñan un papel esencial en el control de la muerte celular programada durante el desarrollo de *C. elegans*. Por ejemplo, la muerte celular programada no tiene lugar en los gusanos que llevan mutaciones con pérdida de función en el gen *ced-3* o el *ced-4*; como resultado, las células 131 "condenadas" sobreviven (fig. 22-30). CED-4 es un factor activador de la proteasa que causa el autocorte de la proteína precursora CED-3, creando una proteasa CED-3 activa que inicia la muerte celular (fig. 22-31). Por el contrario, en los mutantes *ced-9*, todas las células mueren durante la vida embrionaria, de forma tal que la célula adulta nunca se desarrolla. Estos estudios genéticos indican que se necesitan las proteínas CED-3 y CED-4 para la muerte celular, que CED-9 suprime la apoptosis y que la vía apoptótica puede activarse en todas las células. Más aún, el hallazgo de que la muerte celular no ocurre en los dobles mutantes *ced-9*/*ced-3* indica que CED-9 actúa "corriente arriba" respecto de CED-3 para suprimir la vía apoptótica.

La confluencia de estudios genéticos en gusanos y estudios en células cancerosas humanas sugirió por primera vez que una vía conservada a lo largo de la evolución interviene en la apoptosis. El primer gen apoptótico clonado, *bcl-2*, se aisló de los linfomas foliculares humanos. Una forma mutante de este gen, creada en las células de linfoma mediante un reordenamiento cromosómico, demostró actuar como un oncogén que estimula la supervivencia más que la muerte celular (cap. 23). La proteína Bcl-2 humana y la proteína CED-9 de los gusanos son homólogas y un transgén *bcl-2*



▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 22-30 Las mutaciones en el gen *ced-3* bloquean la muerte celular programada en *C. elegans*.** (a) Larvas recién nacidas portadoras de una mutación en el gen *ced-1*. Como las mutaciones en este gen impiden la fagocitosis de células muertas, se acumulan células muertas altamente refractarias (flechas), lo que facilita su visualización. (b) Larva recién nacida con mutaciones en los genes *ced-1* y *ced-3*. La ausencia de células muertas refractarias en estos dobles mutantes indica que no hubo muerte celular. Así, la proteína CED-3 se requiere para la muerte celular programada. (De H. M. Ellis y H. R. Horovitz, 1986, *Cell* 91:818; cortesía de Hilary Ellis.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Video: Muerte celular programada en el desarrollo embrionario de *C. elegans*



▲ Fig. 22-31. Panorama general de la vía apoptótica conservada a lo largo de la evolución en *C. elegans* y en los vertebrados. En esta vía conservada son esenciales tres tipos generales de proteínas. Los reguladores estimulan o suprimen la apoptosis; dos reguladores ortólogos que se muestran aquí, CED-9 y Bcl-2, inhiben la apoptosis en presencia de factores tróficos. Los adaptadores interactúan tanto con los reguladores como con los efectores; en ausencia de factores tróficos, estimulan la activación de los efectores. Las proteasas llamadas caspasas sirven como proteínas efectoras; su activación conduce a la degradación de diversos sustratos intracelulares y finalmente a la muerte celular. (Adaptada de D. L. Vaux y S. J. Korsemeyer, 1999, *Cell* 96:245.)

puede bloquear la muerte celular de gran alcance hallada en los gusanos mutantes *ced-9*. Por lo tanto, ambas proteínas actúan como reguladores que suprimen la vía apoptótica (véase fig. 22-31). Además, ambas proteínas contienen un único dominio transmembrana y se localizan en las membranas externas de la mitocondria, del núcleo y del retículo endoplasmático, donde sirven como sensores que controlan la vía apoptótica en respuesta a estímulos externos. Como se verá más adelante, otros reguladores estimulan la apoptosis.

Las *proteínas efectoras* en la vía apoptótica son enzimas denominadas caspasas en los vertebrados, llamadas así porque contienen un residuo cisteína clave en el sitio catalítico y cortan selectivamente proteínas en los sitios inmediatos en dirección C-terminal a los residuos aspartato. La principal proteasa efectora en *C. elegans* es la caspasa CED-3. Los seres humanos tienen 15 caspasas diferentes, todas las cuales están constituidas inicialmente como procaspasas que deben cortarse para volverse activas. Este proceso proteolítico de proproteínas se usa repetidamente en la coagulación de la sangre, la generación de enzimas digestivas y la generación de hormonas (cap. 17). Las caspasas iniciadoras (p. ej., la caspasa-9) se activan por autoproteólisis inducida por otros tipos de proteínas (CED-4 en los gusanos, por ejemplo), que ayuda a los iniciadores a aglomerarse. Las caspasas iniciadoras activadas cortan caspasas efectoras (p. ej., caspasa-3) y por lo tanto amplifican rápidamente el nivel total de actividad caspasa en la célula moribunda. Las diversas caspasas efectoras reconocen y cortan secuencias aminoacídicas cortas en muchas proteínas diana. Difieren en sus secuencias diana preferidas. Sus dianas intracelulares específicas incluyen proteínas de la lámina nuclear y del citoesqueleto cuya escisión conduce a la defunción de una célula. Se lograron siete líneas de ratones ***knockout***, cada uno carente de una función de caspasa en particular. Algunos homocigotos mueren como embriones; otros son viables, pero con defectos sutiles. Sorprendentemente, algunos exhiben una cantidad excesiva de neuronas (p. ej., hiperplasia neuronal), lo que reafirma la importancia de la muerte celular en el desarrollo del sistema nervioso; otros mutantes tienen células resistentes a la apoptosis.

Mientras que las caspasas son críticas para muchos procesos apoptóticos, también tiene lugar la apoptosis independiente de la caspasa. El factor inductor de la apoptosis (AIF; una flavoproteína) y la endonucleasa G son dos proteínas que matan las células al ser liberadas de la mitocondria.

Los estudios en cultivos celulares han aportado detalles importantes acerca de un grupo de *proteínas adaptativas* que coordinan la acción de los reguladores y los efectores para controlar la apoptosis (véase fig. 22-31). Por ejemplo, la expresión de CED-4 de *C. elegans* en una línea celular renal humana induce la apoptosis rápida. Esto puede bloquearse mediante la coexpresión del regulador negativo CED-9 (o Bcl-2 de mamífero), lo que indica que CED-9 se opone a la acción de CED-4. Además, se mostró que CED-9 se une directamente a CED-4 y la mueve desde el citosol a las membranas intracelulares. Por lo tanto, la función proapoptótica de CED-4 se suprime directamente mediante la función antiapoptótica de CED-9. CED-4 también se une directamente a la caspasa CED-3 (y a las caspasas relacionadas de mamífero) y favorece la activación de su actividad de proteasa, como ya se dijo. Estudios bioquímicos han demostrado que CED-4 puede unirse simultáneamente tanto a CED-9 como a CED-3. Estos resultados son compatibles con la genética que muestra que la ausencia de CED-9 no tiene ningún efecto si también falta CED-3 (los dobles mutantes *ced-3/ced-9* no tienen muerte celular, como los mutantes *ced-3*).

Los reguladores proapoptóticos permiten la activación de caspasa en ausencia de factores tróficos

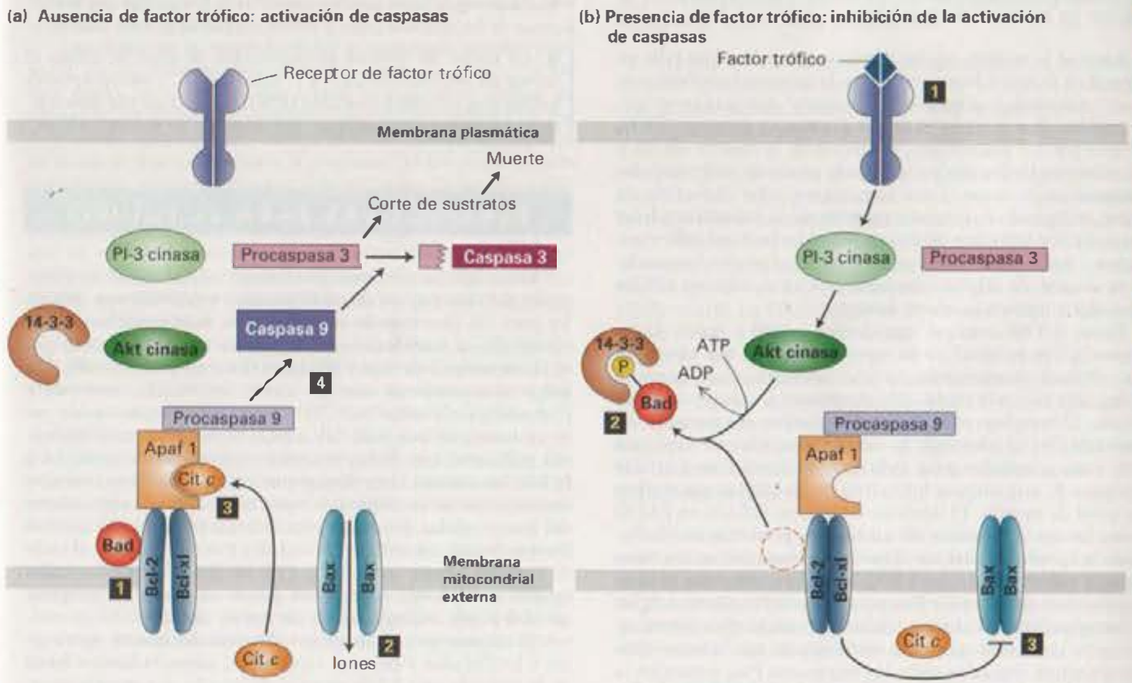
Habiendo introducido los principales participantes de la vía apoptótica, veremos ahora cómo se activan las caspasas efectoras en las células de los mamíferos. Aunque la función normal de CED-9 o Bcl-2 es suprimir la vía de muerte celular, otras proteínas reguladoras intracelulares promueven la apoptosis. El primer regulador proapoptótico en ser identificado, denominado Bax, se encontró asociado con Bcl-2 en extractos de células que expresaban altos niveles de Bcl-2. El análisis de secuencia demostró que la secuencia de Bax está relacionada con la de CED-9 y Bcl-2, pero la sobreproducción de Bax induce la muerte celular en lugar de proteger las células de la apoptosis, como lo hacen CED-9 y Bcl-2. Por lo tanto, esta familia de proteínas reguladoras comprenden miembros *antiapoptóticos* (p. ej., CED-9, Bcl-2) y miembros *proapoptóticos* (p. ej., Bax). Todos los miembros de esta familia, la familia Bcl-2, son proteínas transmembrana de paso único y pueden participar en interacciones oligoméricas. En los mamíferos, seis miembros de la familia Bcl-2 evitan la apoptosis y nueve la promueven. Por consiguiente, el destino de una célula dada –supervivencia y muerte– puede reflejar el espectro particular de los miembros de la familia Bcl-2 presentes en esa célula y las vías de señalización intracelulares que las regulan.

Algunos miembros de la familia Bcl-2 preservan o rompen la integridad de las mitocondrias, controlando por ende la liberación de proteínas mitocondriales como el citocromo *c*. En las células sanas normales el citocromo *c* se localiza entre la membrana mitocondrial interna y la externa, pero en las células que sufren apoptosis, el citocromo *c* se libera al citosol. Esta liberación se puede bloquear mediante la sobreproducción de Bcl-2; por otra parte, la sobreproducción de Bax favorece la liberación del citocromo *c* al citosol y la apoptosis. Más aún, la inyección de citocromo *c* en el citosol de las células induce la apoptosis. Diversos estímulos inductores de muerte hacen que los monómeros Bax se muevan desde el citosol a la membrana mitocondrial externa donde se oligomerizan. Los homodímeros Bax, pero no los homodímeros Bcl-2 o los heterodímeros Bcl-2/Bax, permiten el ingreso de iones a través de la membrana mitocondrial. Se desconoce cómo este ingreso de iones desencadena la liberación de citocromo *c*. Una vez que el citocromo *c* se libera al citosol, se une a la proteína adaptadora Apaf-1 (el homólogo de mamíferos de la CED-4) y estimula la activación de una cascada de caspasas que conducen a la muerte celular (fig. 22-32a). La Bax puede causar la muerte celular mediante una segunda vía que desencadena la disfunción mitocondrial independientemente de cualquier acción de las caspasas, al menos estimulando en parte la despolarización mitocondrial.

Los experimentos de desactivación de genes *(knockout)* confirmaron notablemente la importancia de los miembros de la familia Bcl-2 proapoptóticos y antiapoptóticos en el desarrollo neuronal. Los ratones que carecen del gen *bcl-xl*, que codifican una proteína antiapoptótica, presentan defectos masivos en el desarrollo del sistema nervioso con muerte celular ampliamente generalizada en la médula espinal, el ganglio de la raíz dorsal y el cerebro de embriones en desarrollo. Por el contrario, los ratones *bax knockouts* exhiben un incremento sustancial de neuronas en algunas regiones del sistema nervioso. Estos *knockouts* también demuestran que los efectos de los miembros de la familia Bcl-2 son casi siempre específicos para tejidos.

Algunos factores tróficos inducen la desactivación de un regulador proapoptótico

Hemos visto que las neurotrofinas como el factor de crecimiento nervioso (NGF) protegen las neuronas de la muerte celular. Las vías de señalización intracelular que conectan estos factores de supervivencia para inactivar la maquinaria de muerte celular son bastante elaboradas. El hallazgo de que los factores tróficos parecen actuar en gran medida independientemente de la síntesis de proteína sugirió que estas señales externas condujeron a cambios en las actividades de proteínas preexistentes más que a la activación de la expresión génica. Los científicos demostraron que en ausencia de factores tróficos, la forma no fosforilada de Bad está asociada con Bcl-2/Bcl-xl en la membrana mitocondrial (véase fig. 22-32a). La unión de Bad inhibe la función antiapoptótica de Bcl-2/Bcl-xl, y promueve



▲ Fig. 22-32. Vías intracelulares propuestas que llevan a la muerte celular por apoptosis o a la supervivencia celular mediada por factores tróficos en las células de los mamíferos. (a) En ausencia de un factor trófico, Bad, una proteína proapoptótica soluble, se une a las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xl, insertas en la membrana mitocondrial (1). La unión de Bad impide que las proteínas antiapoptóticas interactúen con Bax, una proteína proapoptótica unida a la membrana. Como consecuencia, Bax forma canales homooligoméricos en la membrana que median el flujo de iones (2). A través de un mecanismo aún desconocido, esto conduce a la liberación del citocromo *c* al citosol, donde se une a la proteína adaptadora Apaf-1 (3), estimulando una cascada de caspasas que lleva a la muerte celular (4). (b) En algunas células, la unión de un factor trófico (p. ej., NGF) estimula la actividad cinasa de PI-3, que conduce a la activación de la cinasa Akt corriente abajo, que a su vez fosforila a Bad (1). Luego Bad fosforilada forma un complejo con la proteína 14-3-3 (2). Con Bad secuestrada en el citosol, las proteínas antiapoptóticas Bcl-2/Bcl-xl pueden inhibir la actividad de Bax (3), evitando así la liberación de citocromo *c* y la activación de la cascada de caspasas. (Adaptado de B. Pettman y C. E. Henderson, 1998, *Neuron* 20:633.)

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación focalizada: Apoptosis

así la muerte celular. Sin embargo, Bad fosforilada no se puede unir a Bcl-2/Bcl-xl y se encuentra en el citosol formando un complejo con la proteína de unión a fosfoserina 14-3-3. Por lo tanto, las vías de señalización que conducen a la fosforilación de Bad podrían ser candidatas muy atractivas para transmitir señales de supervivencia.

Se ha demostrado que diversos factores tróficos incluido NGF desencadenan la vía de señalización de la PI-3 cinasa, que a su vez lleva a la activación corriente abajo de una cinasa denominada PKB (véase fig. 14-27). La PKB activa fosforila a Bad en sitios que se sabe que inhiben su actividad proapoptótica. Más aún, una forma constitutivamente activa de PKB puede rescatar neuronas privadas de neurotrofinas, que de otra manera sufrirían apoptosis y morirían. Estas observaciones avalan el mecanismo para la acción de supervivencia de los factores tróficos representado en la figura 22-32b. En otros tipos celulares, diferentes factores tróficos pueden favorecer la supervivencia mediante modificaciones postraduccionales de otros componentes de la maquinaria de muerte celular.

El factor de necrosis tumoral y las señales de muerte relacionadas estimulan la muerte celular al activar a caspasas

Aunque la muerte celular puede surgir como una falla en ausencia de factores de supervivencia, la apoptosis también puede ser estimulada por *señales "de muerte"* que actúan en forma positiva. Por ejemplo, el *factor de necrosis tumoral (TNF)*, liberado por los macrófagos, desencadena la muerte celular y la destrucción de los tejidos observada en ciertas enfermedades inflamatorias crónicas. Otra importante señal inductora de muerte, el *ligando Fas*, es una proteína de la superficie celular expresada por linfocitos citolíticos naturales (*natural killers*) activados y linfocitos T citotóxicos. Esta señal puede desencadenar la muerte de células infectadas por virus, algunas células tumorales e injertos celulares foráneos.

Tanto el TNF como el ligando Fas actúan a través de los receptores "de muerte" de la superficie celular que tienen un único dominio transmembrana y se activan cuando la unión del ligando trae tres moléculas receptoras a una proximidad cercana. El complejo receptor trimérico atrae una proteína denominada FADD (dominio de muerte asociado con Fas), que sirve como adaptador para reclutar y en cierta forma activar la caspasa-8, una caspasa iniciadora en las células que reciben una señal de muerte. El dominio de muerte hallado en FADD es una secuencia presente en numerosas proteínas involucradas en la apoptosis. Una vez activada, la caspasa-8 activa otras caspasas y comienza la cascada de amplificación. Para evaluar la capacidad del receptor Fas para inducir la muerte celular, los investigadores incubaron células con anticuerpos contra receptor. Se descubrió que estos anticuerpos, que unen y establecen enlaces cruzados entre los receptores Fas, estimulan la muerte celular, lo que indica que la activación del receptor Fas es suficiente para desencadenar la apoptosis.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 22.5

Muerte celular y su regulación

- Todas las células necesitan factores tróficos para prevenir la apoptosis y por lo tanto sobrevivir. En ausencia de esos factores, las células se suicidan.
- Los estudios genéticos en *C. elegans* han definido una vía apoptótica conservada a lo largo de la evolución con tres componentes principales: proteínas reguladoras, proteínas adaptadoras y proteasas efectoras denominadas caspasas en los vertebrados (véase fig. 22-31).
- Una vez activadas, las proteasas apoptóticas cortan sustratos intracelulares específicos que conducen a la defunción de la célula. Las proteínas adaptadoras (p. ej., Apaf-1), que unen proteínas reguladoras y caspasas, son necesarias para la activación de la caspasa.
- Las proteínas reguladoras proapoptóticas (p. ej., Bax, Bad) estimulan la activación de la caspasa y los reguladores antiapoptóticos (p. ej., Bcl-2) suprimen la activación. Las interacciones directas entre las proteínas proapoptóticas y las antiapoptóticas conducen a la muerte celular en ausencia de factores tróficos. La unión de factores tróficos extracelulares puede desencadenar cambios en estas interacciones, lo que da como resultado la supervivencia celular (véase fig. 22-32).
- La familia Bcl-2 contiene proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas; ambas son proteínas transmembrana de paso único y están involucradas en las interacciones entre proteínas. Las moléculas Bcl-2 pueden controlar la liberación de citocromo *c* de las mitocondrias y desencadenar la muerte celular.
- La unión de señales extracelulares de muerte, como el factor de necrosis tumoral y el ligando Fas, a sus receptores activa una proteína asociada (FADD) que a su vez desencadena la cascada de caspasas que conduce la muerte celular.

PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO

El nacimiento, el linaje y la muerte celular yacen en el corazón del crecimiento de un organismo y también son centrales para los procesos de enfermedades, más notablemente el cáncer. Pocas transformaciones parecen más asombrosas que el florecimiento de tipos celulares durante el desarrollo. Un linaje que comienza con un óvulo fecundado, una esfera ("chaucha de vanilla") de 200 µm, produce neuronas de casi un metro de longitud, las células musculares multinucleadas pulsantes, las células retinales exquisitamente sensibles a la luz, los voraces macrófagos que reconocen y fagocitan gérmenes, y los otros cientos de tipos celulares. Los reguladores del linaje celular producen esta rica variedad con el control de dos decisiones críticas: 1) cuándo y dónde activan el ciclo de división celular (cap. 21) y 2) si las dos células hijas serán iguales o diferentes. Una célula puede ser como sus progenitoras o puede embarcarse en un nuevo camino.

El nacimiento celular suele estar cuidadosamente restringido a localidades y tiempos específicos, como la lámina basal de la piel o la raíz del meristema. El hígado se regenera cuando es dañado, pero el cáncer de hígado se evita restringiendo el crecimiento innecesario en otros momentos. El linaje celular es modelado por la distribución asimétrica de reguladores clave en las células hijas de una división. Algunos de estos reguladores son intrínsecos a la célula progenitora y se distribuyen asimétricamente durante la polarización de la célula; otros son señales externas que alcanzan diferencialmente las células hijas. La asimetría de las células se convierte en asimetría de tejidos y de organismos completos. Nuestras manos izquierda y derecha difieren sólo como resultado de la asimetría celular.

Algunas células persisten durante toda la vida del organismo, pero otras, como la sangre y las células intestinales, recambian rápidamente. Muchas células viven durante algún tiempo y luego son programadas para morir y ser reemplazadas por otras que se originan de una población de células madre. La muerte celular programada también es la base de la eliminación minuciosa de células potencialmente dañinas, como las del sistema inmunitario autorreactivas, que atacan las propias células del cuerpo, o las neuronas que fallaron en conectarse apropiadamente. Los programas de muerte celular también evolucionaron como defensa contra la infección, y las células infectadas por virus son asesinadas selectivamente en respuesta a señales de muerte. Los virus, a su vez, dedican gran parte de sus esfuerzos a evadir las defensas del huésped. Por ejemplo, p53, un factor de transcripción que sensa el estrés y los daños celulares y activa la transcripción de miembros proapoptóticos de la familia de genes *bcl*-2, es inhibido por la proteína E1B adenoviral. Se estima que alrededor de un tercio del genoma de los adenovirus está dirigido a evadir defensas de los huéspedes. La muerte celular es importante para los químicos tóxicos al igual que para las infecciones virales; las malformaciones debidas a los venenos a menudo se originan por el exceso de apoptosis.

Las fallas en la muerte celular programada pueden provocar un crecimiento descontrolado canceroso (cap. 23). De este modo las proteínas que evitan la muerte de células de cáncer se convierten en posibles diana de las drogas. Un tumor puede contener una mezcla de células, algunas capaces de sembrar nuevos tumores o continuar el crecimiento descontrolado, y algunas capaces sólo de crecer en lugares o durante un tiempo limitado. En este sentido, el tumor tiene sus propias células madre, y deben encontrarse y estudiarse para que se vuelvan vulnerables para nuestra medicina. Una opción es manipular la vía de la muerte celular según nuestro propio provecho, para enviar las señales que harán que las células cancerosas se destruyan a sí mismas.

Ahora se está prestando mucha atención a la regulación de células madre en un esfuerzo por entender cómo se crean y mantienen las poblaciones de células en división. Esto tiene claras implicaciones para la reparación de tejidos; por ejemplo, para ayudar a los ojos dañados, cartílagos rotos, tejido cerebral en degeneración u órganos endebles. Una importante posibilidad es que algunas poblaciones de células madre con el potencial de generar o regenerar tejidos sean eliminadas normalmente mediante muerte celular durante el desarrollo tardío. De ser así, encontrar formas para bloquear selectivamente la muerte de estas células podría mejorar la posibilidad de regeneración. La eliminación de esas células durante el desarrollo de los mamíferos ¿podría ser la diferencia entre un anfibio capaz de regenerar un miembro y un mamífero que no puede hacerlo?

PALABRAS CLAVE

β-catenina *903*
apoptosis *924*
caspasas *928*
célula madre del ganglio (GMC) *921*
células madre *899*
células madres embrionarias (ES) *901*
células progenitoras/precursoras *899*
células somáticas *899*
complejo apical *922*
conversión del tipo de apareamiento *920*
determinación *914*
diferenciación *899*
división celular asimétrica *900*
ectodermo *906*
endodermo *906*
factor de apareamiento *912*
factores reguladores musculares (MRF) *915*
factores tróficos *924*
familia Bcl-2 *928*
linaje celular *899*
línea germinal *906*
locus *MAT* *910*
meristemas *905*
mesodermo *906*
micro RNA (miRNA) *909*
mutantes heterocrónicos *908*
neurotrofinas *926*
pluripotencial *900*
señales "de muerte" *930*

REVISIÓN DE CONCEPTOS

1. ¿Qué dos propiedades definen una célula madre? Distinga entre una célula madre totipotencial, una célula madre pluripotencial y una célula progenitora.

2. ¿Dónde se encuentran las células madre en las plantas? ¿Dónde se encuentran las células madre en los animales adultos? ¿Cómo difiere el concepto de células madre entre los sistemas animales y vegetales?

3. En 1997, la oveja Dolly fue clonada mediante una técnica llamada transferencia nuclear de una célula somática. Se transfirió el núcleo de una célula de un mamífero adulto a un óvulo al cual se le había extraído el núcleo. Al óvulo se le permitió dividirse varias veces en cultivo, luego se transfirió el embrión a una madre sustituta que dio a luz a Dolly. Dolly murió en 2003 luego de aparearse y dar a luz a una prole viable. ¿Qué nos dice la creación de Dolly acerca del potencial del material nuclear derivado de una célula adulta completamente diferenciada? ¿La creación de Dolly nos dice algo acerca del potencial de una célula adulta intacta completamente diferenciada? Nombre tres tipos de información que actúa para preservar el tipo celular. ¿Cuáles de estos tipos de información mostró ser reversible gracias al experimento de Dolly?

4. El nematodo *C. elegans* ha demostrado ser un valioso organismo modelo para estudios de nacimiento, linaje y muerte celular. ¿Qué propiedades de *C. elegans* lo hacen tan apropiado para estos estudios? ¿Por qué tanta información de los experimentos de *C. elegans* es útil para los investigadores interesados en el desarrollo de los mamíferos?

5. En la levadura *S. cerevisiae* en brotación, ¿cuál es el papel de la proteína MCM1 en lo siguiente?

a. transcripción de genes específicos de a en células a

b. bloqueo de la transcripción de genes específicos de α en células a

c. transcripción de genes específicos de α en células α

d. bloqueo de la transcripción de genes específicos de a en células α

6. En *S. cerevisiae*, ¿qué asegura que las células a y α se aparcen mutuamente más que con las células del mismo tipo (p. ej., a con a o α con α)?

7. La exposición de las células C3H 10T½ a la 5-azacitidina, un análogo de nucleótido, es un sistema modelo para la diferenciación muscular. ¿Cómo se utilizó el tratamiento de 5-azacitidina para aislar los genes involucrados en la diferenciación muscular?

8. A través de los experimentos con las células C3H 10T½ tratadas con 5-azacitidina, se identificó a MyoD como un factor de transcripción clave en la regulación de la diferenciación muscular. ¿A qué clase general de proteínas de unión al DNA pertenece MyoD? ¿Cómo afectan a la función de MyoD las interacciones con las siguientes proteínas? a) E2A, b) MEF, c)Id.

9. Los mecanismos que regulan la diferenciación muscular en los mamíferos y la diferenciación neuronal en *Drosophila* (y también probablemente en los mamíferos) guardan notables similitudes. ¿Qué proteínas funcionan en forma análoga al MyoD, la miogenina, el Id y la E2A en la diferenciación celular neuronal en *Drosphila?* Basado en estas analogías, prediga el efecto de la microinyección de mRNA de MyoD sobre el desarrollo de embriones de *Xenopus*.

10. Prediga el efecto de las siguientes mutaciones sobre la capacidad de las células madre e hija de *S. cerevisiae* para sufrir la conversión del tipo de apareamiento tras la división celular:

a. mutación con pérdida de función en la endonucleasa HO

b. mutación con ganancia de función que deja al gen de la endonucleasa HO expresado constitutivamente independiente de SWI/SNF

c. mutación con ganancia de función en SWI/SNF que lo deja insensible a Ash1

11. La división celular asimétrica a menudo cuenta con elementos del citoesqueleto para generar o mantener una distribución asimétrica de factores celulares. En *S. cerevisiae*, ¿qué factor se localiza en el brote por medio de miosina motora? En los neuroblastos de *Drosophila*, ¿qué factores se localizan en forma apical mediante los microtúbulos?

12. ¿De qué forma los estudios del desarrollo del cerebro en ratones *knockout* avalan la afirmación de que la apoptosis es una vía faltante en las células neuronales?

13 ¿Qué rasgos morfológicos distinguen la muerte celular programada y la muerte celular por necrosis? El TNF y el ligando Fas se unen a receptores de la superficie celular para desencadenar la muerte celular. Aunque la señal de muerte se genera fuera de la célula, ¿por qué consideramos la muerte inducida por estas moléculas apoptótica en lugar de necrótica?

14. Prediga los efectos de las siguientes mutaciones sobre la capacidad de una célula para sufrir apoptosis:

a. mutación en Bad de forma tal que no puede ser fosforilada por Akt

b. sobreexpresión de Bcl-2

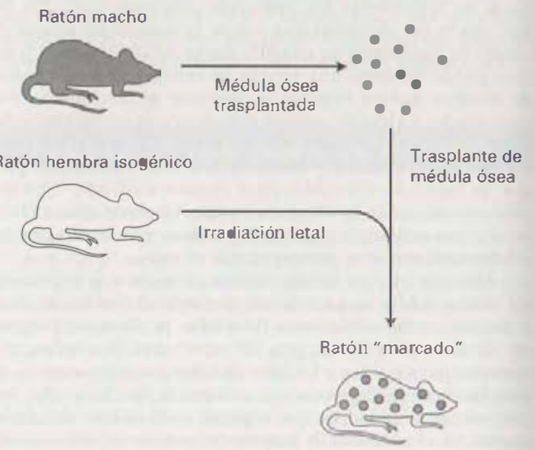
c. mutación en Bax de forma tal que no puede formar homodímeros

Una característica común de las células cancerosas es la pérdida de función en la vía apoptótica. ¿Cuál de las mutaciones listadas esperaría encontrar en algunas células cancerosas?

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Para comprender mejor el potencial de las células madre adultas para diferenciarse en diversos tipos celulares, se realizaron los siguientes estudios.

Se recolectó médula ósea de ratones macho adultos y luego se los trasplantó en ratones receptores isogénicos hembra que fueron tratados con un nivel de radiación suficiente para destruir sus propias células madre hematopoyéticas (véase figura). Aunque la dosis de radiación dada fue letal para los ratones que no recibieron un trasplante, la mayoría de los ratones receptores que recibieron el trasplante sobrevivieron. Después de cuatro semanas, se analizó la sangre periférica de los ratones receptores. La composición de la sangre era normal con respecto a todos los tipos celulares. Se determinó que cada célula sanguínea examinada era positiva para la presencia del cromosoma Y.



a. ¿Cuál era el propósito de usar ratones macho como donantes de médula ósea y ratones hembra como receptores? ¿Habría dado resultado el experimento inverso (hembras donantes, machos receptores)?

b. ¿Cuál fue el propósito de irradiar los ratones receptores antes del trasplante? ¿Qué resultado esperaría si las células de la médula ósea se trasplantaran a los ratones no irradiados?

c. ¿Qué método podría haberse utilizado para purificar células madre hematopoyéticas de la médula ósea antes de trasplantar estas células en el ratón receptor? ¿Cómo podría haber afectado un paso de purificación el resultado del experimento?

Después de 8 semanas, se sacrificaron algunos de los ratones receptores y se realizaron análisis histoquímicos sobre secciones de tejido de diversos órganos. En el hígado, músculo esquelético y cerebro se encontraron ocasionales células con cromosomas Y positivos. Además, las células con cromosoma Y positivo resultaron positivas para los marcadores de hepatocitos del hígado, células del músculo esquelético y neuronas (albúmina, distrofina, y NeuN, respectivamente).

d. ¿Qué indican la aparición de células positivas para los cromosomas Y en órganos múltiples y la expresión de marcadores específicos de los órganos acerca de la localización de células derivadas de la médula ósea? ¿Acerca de su potencial de diferenciación? ¿Acerca de su función?

BIBLIOGRAFÍA

El nacimiento de las células

Aurelio, O., T. Boulin, and O. Hobert. 2003. Identification of spatial and temporal cues that regulate postembryonic expression of axon maintenance factors in the C. *elegans* ventral nerve cord. Development 130:599-610.

Bach, S. P., A. G. Renehan, and C. S. Potten. 2000. Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. Carcinogenesis 21:469-476.

Clark, S. E. 2001. Cell signalling at the shoot meristem. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2:276-284.

Edenfeld, G., J. Pielage, and C. Klambt. 2002. Cell lineage specification in the nervous system. Curr. Opin. Genet. Devel. 12:473-477.

Gerlach, M., et al. 2002. Current state of stem cell research for the treatment of Parkinson's disease. J. Neurol. 249(Suppl. 3): III33-III35.

Hori, Y., et al. 2002. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 99:16105-16110.

Huelsken, J., et al. 2001. β-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. Cell 105:533-545.

Ivanova, N. B., et al. 2002. A stem cell molecular signature. Science 298:601-604.

Lee, R. C., and V. Ambros. 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. Science 294:862-864.

Lohmann, J. U., et al. 2001. A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. Cell 105:793-803.

Marshman, E., C. Booth, and C. S. Potten. 2002. The intestinal epithelial stem cell. Bioessays 24:91-98.

Mills, J. C., and J. I. Gordon. 2001. The intestinal stem cell niche: there grows the neighborhood. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 98:12334-12336.

Niemann, C., and F. M. Wart. 2002. Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis. Trends Cell Biol. 12:185-192.

Okabe, M., et al. 2001. Translational repression determines a neuronal potential in *Drosophila* asymmetric cell division. Nature 411:94-98.

Olsen, P. H., and V. Ambros. 1999. The *lin-4* regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. Devel. Biol. 216:671-680.

Orkin, S. H. 2000. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. Nature Rev. Genet. 1:57-64.

Pasquinelli, A. E., and G. Ruvkun. 2002. Control of developmental timing by micro RNAs and their targets. Ann. Rev. Cell Devel. Biol. 18:495-513.

Phillips, R. L., et al. 2000. The genetic program of hematopoietic stem cells. Science 288:1635-1640.

Reinhart, B. J., et al. 2000. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. Nature 403:901-906.

Smith, A. G. 2001. Embryo-derived stem cells: of mice and men. Ann. Rev. Cell Devel. Biol. 17:435-462.

Thummel, C. S. 2001. Molecular mechanisms of developmental timing in C. *elegans* and *Drosophila*. Devel. Cell 1:453-465.

Verfaillie, C. M. 2002. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. Trends Cell Biol. 12:502-508.

Zaret, K. S. 2001. Hepatocyte differentiation: from the endoderm and beyond. Curr. Opin. Genet. Devel. 11:568-574.

Especificación del tipo de célula en las levaduras

Bagnat, M., and K. Simons. 2002. Cell surface polarization during yeast mating. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 99:14183-14188.

Dittmar, G. A., C. R. Wilkinson, P. T. Jedrzejewski, and D. Finley. 2002. Role of a ubiquitin-like modification in polarized morphogenesis. Science 295:2442-2446.

Dohlman, H. G., and J. W. Thorner. 2001. Regulation of G protein-initiated signal transduction in yeast: paradigms and principles. Ann. Rev Biochem. 70:703-754.

Hall, I. M., et al. 2002. Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. Science 297:2232-2237.

Lau, A., H. Blitzblau, and S. P. Bell. 2002. Cell-cycle control of the establishment of mating-type silencing in *S. cerevisiae*. Genes Devel. 16:2935-2945.

Miller, M. G., and A. D. Johnson. 2002. White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. Cell 110:293-302.

Takizawa, P. A., and R. D. Vale. 2000. The myosin motor, Myo4p, binds Ash1 mRNA via the adapter protein, She3p. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 97:5273-5278.

Especificación y diferenciación del músculo

Bailey, P., T. Holowacz, and A. B. Lassar. 2001. The origin of skeletal muscle stem cells in the embryo and the adult. Curr. Opin. Cell Biol. 13:679-689.

Buckingham, M. 2001. Skeletal muscle formation in vertebrates. Curr. Opin. Genet. Devel. 11:440-448.

Gustafsson, M. K., et al. 2002. Myf5 is a direct target of longrange Shh signaling and Gli regulation for muscle specification. Genes Devel. 16:114-126.

McKinsey, T. A.; C. L. Zhang, and E. N. Olson. 2002. Signaling chromatin to make muscle. Curr. Opin. Cell Biol. 14:763-772.

Perry, R. L., M. H. Parker, and M. A. Rudnicki.2001. Activated MEK1 binds the nuclear MyoD transcriptional complex to repress transactivation. Mol. Cell 8:291-301.

Puri, P. L., et al. 2001. Class I histone deacetylases sequentially interact with MyoD and pRb during skeletal myogenesis. Mol. Cell 8:885-897.

Wang, D. Z., et al. 2001. The Mef2c gene is a direct transcriptional target of myogenic bHLH and MEF2 proteins during skeletal muscle development. Development 128:4623-4633.

Yan, Z., et al. 2003. Highly coordinated gene regulation in mouse skeletal muscle regeneration. J. Biol. Chem. 278:8826-8836.

Regulación de la división celular asimétrica

Adler, P. N., and J. Taylor. 2001. Asymmetric cell division: plane but not simple. Curr. Biol. 11:R233-236.

Ben-Yehuda, S., and R. Losick. 2002. Asymmetric cell division in *B. subtilis* involves a spiral-like intermediate of the cytokinetic protein FtsZ. Cell 109:257-266.

Betschinger, J., K. Mechtler, and J. A. Knoblich. 2003. The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. Nature 422:326-330.

Bilder, D., M. Li, and N. Perrimon. 2000. Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. Science 289:113-116.

Cayouette, M., and M. Raff. 2002. Asymmetric segregation of Numb: a mechanism for neural specification from *Drosophila* to mammals. Nature Neurosci. 5:1265-1269.

Chia, W., and X. Yang. 2002. Asymmetric division of *Drosophila* neural progenitors. Curr. Opin. Genet. Devel. 12:459-464.

Deng, W., and H. Lin. 2001. Asymmetric germ cell division and oocyte determination during *Drosophila* oogenesis. Int'l. Rev. Cytol. 203:93-138.

Doe, C. Q., and B. Bowerman. 2001. Asymmetric cell division: fly neuroblast meets worm zygote. Curr. Opin. Cell Biol. 13: 68-75.

Helariutta, Y., et al. 2000. The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. Cell 101:555-567.

Horvirz, H. R., and I. Herskowitz. 1992. Mechanisms of asymmetric cell division: two B,s or not two B,s, that is the question. Cell 68:237-255.

Knoblich, J. A. 2001. Asymmetric cell division during animal development. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2:11-20.

Lin, D., et al. 2000. A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. Nature Cell Biol. 2:540-547.

Mahonen, A. P., et al. 2000. A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. Genes Devel. 14:2938-2943.

Ohno, S. 2001. Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity. Curr. Opin. Cell Biol. 13:641-648.

Petritsch, C., et al. 2003. The *Drosophila* myosin VI Jaguar is required for basal protein targeting and correct spindle orientation in mitotic neuroblasts. Devel. Cell 4:273-281.

Plant, P. J., et al. 2003. A polarity complex of mPar-6 and atypical PKC binds, phosphorylates and regulates mammalian Lgl. Nature Cell Biol. 5:301-308.

Roegiers, F., S. Younger-Shepherd, L. Y. Jan, and Y. N. Jan. 2001. Two types of asymmetric divisions in the *Drosophila* sensory organ precursor cell lineage. Nature Cell Biol. 3:58-67.

Sawa, H., H. Kouike, and H. Okano. 2000. Components of the SWI/SNF complex are required for asymmetric cell division in C. *elegans*. Mol. Cell 6:617-624.

Shapiro, L., H. H. McAdams, and R. Losick. 2002. Generating and exploiting polarity in bacteria. Science 298:1942-1946.

Muerte celular y su regulación

Aderem, A. 2002. How to eat something bigger than your head. Cell 110:5-8.

Baehrecke, E. H. 2002. How death shapes life during development. Nature Rev Mol. Cell Biol. 3:779-787.

Benedict, C. A., P. S. Norris, and C. F. Ware. 2002. To kill or be killed: viral evasion of apoptosis. Nature Immunol. 3:1013-1018.

Bergmann, A. 2002. Survival signaling goes BAD. Devel. Cell 3:607-608.

Cheng, E. H., et al. 2001. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. Mol. Cell 8:705-711.

Cory, S., and J. M. Adams. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. Nature Rev. Cancer 2:647-656.

Jacks, T., and R. A. Weinberg. 2002. Taking the study of cancer cell survival to a new dimension. Cell 111:923-925.

Marsden, V. S., and A. Strasser. 2003. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. Ann. Rev. Immunol. 21:71-105.

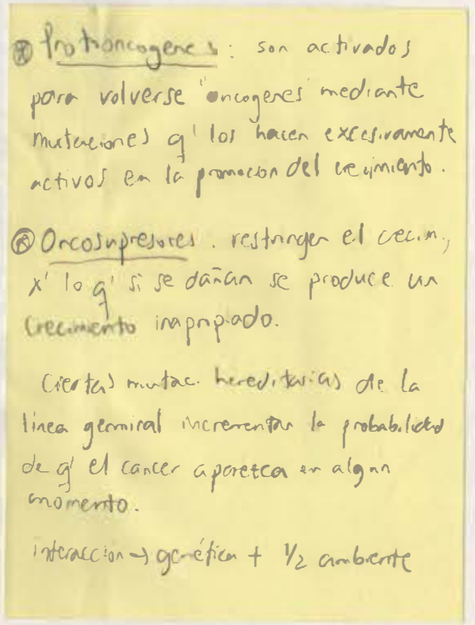
Martin, S. J. 2002. Destabilizing influences in apoptosis: sowing the seeds of IAP destrucrion. Cell 109:793-796.

Penninger, J. M., and Kroemer, G. 2003. Mitochondria, AIF, and caspases—rivaling for cell death execution. Nature Cell Biol. 5:97-99.

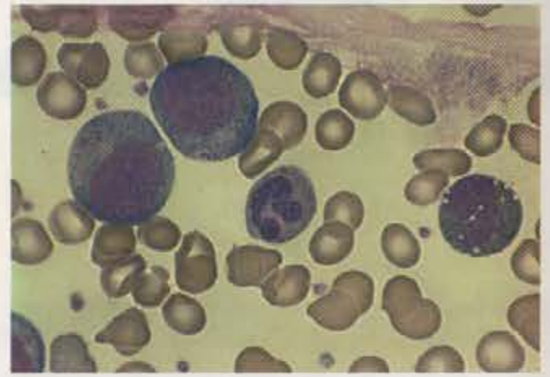
Ranger, A. M., B. A. Malynn, and S. J. Korsmeyer. 2001. Mouse models of cell death. Nature Genet. 28:113-118.

Vaux, D. L., and S. J. Korsmeyer. 1999. Cell dearh in development. Cell 96:245-254.

Zuzarte-Luis, V., and J. M. Hurle. 2002. Programmed cell death in the developing limb. Int'l. J. Devel. Biol. 46:871-876.



23 CÁNCER



Frotis de una persona con leucemia mieloide aguda. Las células gigantes con núcleo violeta de forma irregular son células leucémicas. Las células circulares de color gris rojizo son glóbulos rojos normales. (Margaret Cubberly/Phototake.)

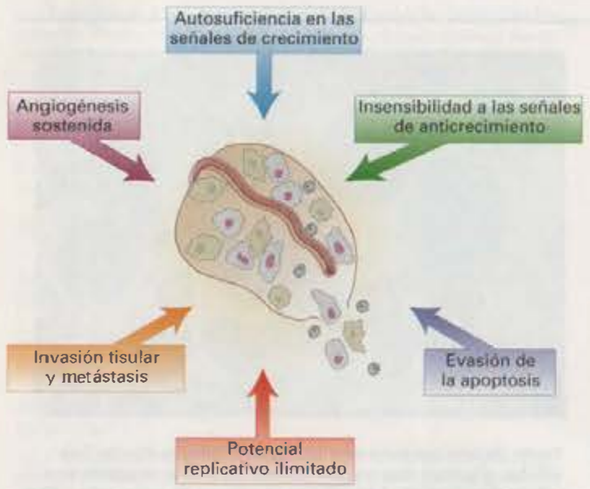
El cáncer provoca alrededor de un quinto de las muertes anuales en los Estados Unidos. En el mundo, entre 100 y 350 de cada 100.000 personas mueren por su causa cada año. El cáncer se debe a fallas en los mecanismos que controlan el crecimiento y la proliferación celular. Durante el desarrollo normal y a través de la vida adulta, intrincados sistemas de control genéticos regulan el balance entre el nacimiento y la muerte celular en respuesta a señales de crecimiento, de inhibición del crecimiento y de muerte. Las tasas de nacimiento y muerte celular determinan el tamaño corporal adulto y la velocidad de crecimiento para alcanzar ese tamaño. En algunos tejidos adultos la proliferación celular tiene lugar como una estrategia de renovación constante de los tejidos. Las células epiteliales intestinales, por ejemplo, viven apenas algunos días y son reemplazadas; ciertos glóbulos blancos también son reemplazados con rapidez y las células de la piel sobreviven sólo durante 2-4 semanas antes de desprenderse. Sin embargo, las células en muchos tejidos adultos no suelen proliferar excepto en los procesos de curación. Dichas células estables (p. ej., los hepatocitos, las células musculares cardíacas, las neuronas) pueden permanecer funcionales durante largos períodos o incluso todo el tiempo de vida de un organismo.

Las pérdidas de regulación celular que dan origen a la mayoría o a todos los casos de cáncer se deben a daños genéticos (fig. 23-1). En la aparición del cáncer se han implicado mutaciones en dos amplias clases de genes: los protooncogenes y los genes supresores de tumores. Los protooncogenes son activados para volverse oncogenes mediante mutaciones que los hacen excesivamente activos en la promoción del crecimiento. La expresión genética incrementada o la producción de un producto hiperactivo promueven ese crecimiento. Los genes supresores de tumores normalmente restringen el crecimiento, por lo que si se dañan se produce un crecimiento inapropiado. Muchos de los genes en ambas clases codifican proteínas que ayudan a regular el nacimiento celular (p. ej., la entrada y la progresión a través del ciclo celular) o la muerte celular mediante apoptosis; otros codifican proteínas que participan en la reparación del DNA dañado. El cáncer suele ser el resultado de mutaciones que aparecen en el curso de la vida durante una exposición a los carcinógenos, que incluyen ciertos químicos y radiación ultravioleta. Las mutaciones que lo causan ocurren principalmente en las células somáticas, no en las células de la línea germinal y estas mutaciones no se transmiten a la siguiente generación. En cambio, ciertas mutaciones hereditarias de la línea germinal incrementan la probabilidad de que el cáncer aparezca en algún momento. En una asociación destructiva, las mutaciones somáticas pueden combinarse con mutaciones hereditarias para causar cáncer.

Por lo tanto, los procesos de formación de cáncer, denominados oncogénesis o tumorigénesis, son una interacción entre la genética y el medio ambiente. La mayoría de los cánceres aparecen luego de que los genes son alterados por carcinógenos o por errores en el copiado y reparación de genes. Aun si el daño genético tiene lugar sólo en una célula somática, la división de esta célula lo transmitirá a las células hijas y dará origen a un clon de células alteradas. Sin embargo, es poco común que mutaciones en un único gen conduzcan a la aparición de cáncer. Más a menudo, una serie de mutaciones en múltiples genes crea un tipo celular que prolifera de modo progresivo más rápidamente, escapa a las restricciones normales del crecimiento y genera una oportunidad para mutaciones adicionales. Por último, el clon de células crece y forma un **tumor**. En algunos casos, las células del tumor primario migran hacia nuevos sitios (*metástasis)* donde producen tumores secundarios que con frecuencia tienen el más alto impacto sobre la salud.

CONTENIDO

23.1 Células tumorales e inicio del cáncer
23.2 Bases genéticas del cáncer
23.3 Mutaciones oncogénicas en las proteínas que promueven la proliferación celular
23.4 Mutaciones que provocan pérdida de inhibición del crecimiento y controles del ciclo celular
23.5 Papel de los carcinógenos y reparación del DNA en el cáncer



▲ Fig. 23-1. Generalidades de los cambios en las células que causan cáncer. Durante la carcinogénesis, se alteran seis propiedades celulares fundamentales, como se muestra aquí, para dar origen al fenotipo completo del cáncer más destructivo. Tumores menos peligrosos surgen cuando sólo se producen algunos de estos cambios. En este capítulo analizamos los cambios genéticos que dan origen a estas propiedades celulares alteradas. (Adaptado de D. Hanahan y R. A. Weinberg, 2000, *Cell* 100:57.)

La metástasis es un proceso complejo con muchos pasos. La invasión de nuevos tejidos no es aleatoria y depende de la naturaleza de la célula y del tejido invadido. La metástasis se facilita si las células tumorales producen factores de crecimiento y de angiogénesis (inductores del crecimiento de vasos sanguíneos). Las células deformables, móviles, invasivas y que se agregan son las más peligrosas. Los tejidos atacados son más vulnerables si producen factores de crecimiento y hacen crecer rápidamente nuevas vasculaturas. Son más resistentes si producen factores antiproliferativos, inhibidores de enzimas proteolíticas y factores antiangiogénesis.

Las investigaciones sobre las bases genéticas de un tipo particular de cáncer suelen comenzar con la identificación de uno o más genes que están mutacionalmente alterados en las células tumorales. Es importante conocer si un gen alterado es una causa que contribuye al tumor o es un episodio colateral irrelevante. Dichas investigaciones suelen emplear múltiples enfoques: comparaciones epidemiológicas de la frecuencia con la cual el cambio genético se asocia con un tipo de tumor, análisis de las propiedades de crecimiento de las células en cultivo que poseen la mutación en particular y el ensayo de modelos de la enfermedad en ratones para ver si la mutación puede estar implicada. Un análisis más detallado es posible cuando se sabe que el gen alterado codifica un componente de una vía molecular particular (p. ej., una vía intracelular de señalización). En este caso es posible alterar otros componentes de la misma vía y ver si aparece el mismo tipo de cáncer.

Dado que las múltiples mutaciones que conducen a la formación de un tumor pueden requerir muchos años para acumularse, la mayoría de los cánceres no se presentan en etapas tempranas de la vida. Su aparición después de la edad reproductiva puede ser una de las razones por las que las restricciones evolutivas no hayan desarrollado otras formas para suprimirlo. El requerimiento de múltiples mutaciones también disminuye la frecuencia del cáncer en comparación con la que se daría si la tumorigénesis fuese desencadenada por una única mutación. Sin embargo, gran cantidad de células están, en esencia, mutadas y su proliferación alterada se mantiene controlada durante nuestra vida, lo que constituye un tipo de selección evolutiva para las células que proliferan. Por fortuna, el tumor en sí no se hereda.

23.1 Células tumorales e inicio del cáncer

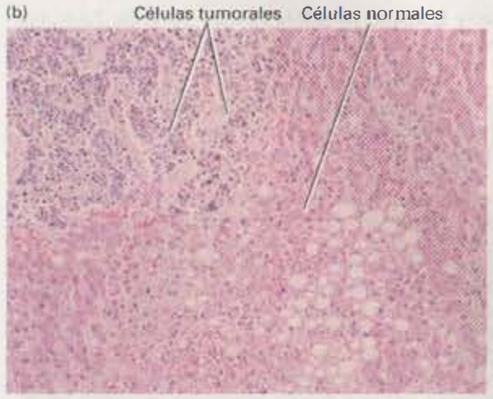
Antes de examinar en detalle las bases genéticas del cáncer, consideraremos las propiedades que distinguen las células tumorales de las células normales y el proceso general de oncogénesis. Los cambios genéticos que subyacen a la oncogénesis alteran varias propiedades fundamentales de las células, les permiten evadir los controles de crecimiento normal y les confirieren el fenotipo de cáncer completo (véase fig. 23-1). Las células cancerosas adquieren un impulso para proliferar que no requiere una señal inductora externa; no logran percibir las señales que restringen la división celular y continúan viviendo cuando deberían morir. A menudo cambian su adhesión a las células circundantes o a la matriz extracelular y se sueltan para dividirse más rápidamente. Una célula cancerosa puede, hasta cierto punto, asemejarse a un tipo particular de célula normal de división rápida, pero ella y su progenie exhiben una inmortalidad inapropiada. Para alcanzar cierto tamaño, los tumores deben obtener irrigación sanguínea y suelen lograrla mediante la señalización que induce el crecimiento de vasos. A medida que el cáncer avanza, el tumor se convierte en un "órgano" anormal, cada vez mejor adaptado para el crecimiento y la invasión de los tejidos circundantes.

Las células tumorales metastásicas son invasoras y pueden diseminarse

Los tumores aparecen con gran frecuencia, en especial en las personas de edad avanzada, pero la mayoría conlleva escaso riesgo para el huésped porque están localizados y son de tamaño pequeño. A estos tumores se los denomina **benignos**; un ejemplo son las verrugas, un tumor benigno de la piel. Las células que componen los tumores benignos se asemejan a las células normales y pueden funcionar como ellas. Las moléculas de adhesión celular que mantienen juntos los tejidos mantienen las células tumorales benignas, al igual que las células normales, localizadas en los tejidos donde se originaron. Por lo general, una cápsula fibrosa delimita la extensión de un tumor benigno y lo convierte en un blanco fácil para un cirujano. Estos tumores sólo representan un problema médico grave si, por su tamaño, interfieren en las funciones normales o secretan cantidades excesivas de sustancias con actividad biológica, como las hormonas. La acromegalia, el crecimiento excesivo de la cabeza, manos y pies; por ejemplo, puede producirse cuando un tumor hipofisario benigno causa la sobreproducción de la hormona del crecimiento.

En cambio, las células que componen un tumor **maligno**, o **cáncer**, crecen y se dividen más rápidamente que las normales, no mueren en el tiempo previsto (p. ej., la leucemia linfocítica crónica, un tumor de los glóbulos blancos), o invaden tejidos cercanos sin un cambio significativo en su velocidad de





▲ Fig. 23-2. Vistas macroscópica y microscópica de un tumor invasor de tejido hepático normal. (a) Morfología macroscópica de un hígado humano en el cual prolifera un tumor metastásico de pulmón. Las prominencias blancas sobre la superficie del hígado son las masas tumorales. (b) Microfotografía óptica de una sección del tumor presentado en (a), que muestra áreas de células tumorales pequeñas intensamente teñidas que invaden una región de células hepáticas normales, más claras y más grandes. (Cortesía de J. Braun.)

proliferación (p. ej., tumores de las células gliales menos dañinos). Algunos tumores malignos, como los de los ovarios o las mamas, permanecen localizados y encapsulados al menos durante algún tiempo. Cuando estos tumores progresan, las células invaden los tejidos circundantes, ingresan en el sistema circulatorio y establecen áreas secundarias de proliferación, un proceso denominado **metástasis**. La mayoría de las células malignas adquieren finalmente la capacidad de metastatizar. En consecuencia, las principales características que diferencian los tumores metastásicos (o malignos) de los benignos son la invasividad y la diseminación.

Las células cancerosas se distinguen de las normales en el examen microscópico. Por lo general, son menos diferenciadas que las células normales o las de los tumores benignos. En un tejido específico, las células malignas suelen exhibir las características de las células de crecimiento rápido, es decir, una relación núcleo-citoplasma elevada, un núcleo prominente y una estructura relativamente poco especializada. La presencia de células invasoras en una sección de tejido que por lo demás sería normal es usada para diagnosticar la malignidad (fig. 23-2).

Las células normales se restringen a su lugar en un órgano o tejido mediante la adhesión entre sí y por barreras físicas como la lámina basal, subyacente a las capas de células epiteliales y que también rodea las células endoteliales de los vasos sanguíneos (cap. 6). Las células cancerosas tienen una relación compleja con la matriz extracelular y la lámina basal: deben degradar la lámina basal para penetrarla y efectuar la metástasis, pero en algunos casos pueden migrar a lo largo de la lámina. Muchas células tumorales secretan una proteína (activador del plasminógeno) que convierte la proteína sérica plasminógeno en la proteasa activa plasmina. La mayor actividad de la plasmina promueve la metástasis al contribuir a la digestión de la lámina basal, permitiendo por lo tanto su penetración por células tumorales. A medida que la lámina basal se desintegra, algunas células tumorales ingresarán en la sangre, pero menos de 1 de cada 10.000 células que escapan del tumor primario sobreviven para colonizar otro tejido y formar un tumor metastásico secundario. Además de escapar al tumor original y entrar en la sangre, las células que sembrarán nuevos tumores deben luego adherirse a una célula endotelial que reviste un capilar y migrar a través de ella hacia el tejido subyacente. Los múltiples cruzamientos de capas de tejido que subyacen a la malignidad a menudo involucran proteínas de superficie nuevas o variantes producidas por las células malignas.

Además de cambios importantes en las proteínas de la superficie celular, ocurren modificaciones drásticas en el citoesqueleto durante la formación de las células tumorales y la metástasis. Estas alteraciones pueden resultar de cambios en la expresión de genes que codifican Rho y otras GTPasas pequeñas que regulan el citoesqueleto de actina (cap. 19). Por ejemplo, se descubrió que las células tumorales sobreexpresan el gen *RhoC* y que el incremento de esta actividad estimula la metástasis.

Los cánceres suelen originarse en células en proliferación

Para que la mayoría de las mutaciones oncogénicas induzcan cáncer, se deben producir en células en proceso de división de manera que la mutación se pase a muchas células de la progenie. Cuando esas mutaciones ocurren en células que no se dividen (p. ej., neuronas y células musculares), casi nunca inducen cáncer; por esta razón los tumores de las células musculares y nerviosas son raros en los adultos. No obstante, se puede producir cáncer en tejidos compuestos principalmente de células diferenciadas que no se dividen, como los eritrocitos y la mayoría de los leucocitos, las células absortivas que revisten el intestino delgado y las células queratinizadas que forman la piel. Las células que inician los tumores no son las células diferenciadas sino sus células precursoras. Las células completamente diferenciadas por lo general se dividen. A medida que mueren o se agotan son reemplazadas por proliferación y diferenciación de las **células madre** *(stem cells)*, células capaces de transformarse en tumorales.

En el capítulo 22 se dijo que las células madre se perpetúan a sí mismas y dan origen a células que se diferencian y pueden regenerar un tejido en particular durante la vida de un organismo (véase fig. 22-2). Por ejemplo, muchas células diferenciadas tienen períodos cortos de vida y son continuamente reabastecidas a partir de células madre hematopoyéticas

(que forman la sangre) en la médula ósea (véase fig. 22-5). Las poblaciones de las células madre en el intestino, el hígado, la piel, los huesos y otros tejidos de igual forma dieron origen a todos o a muchos de los tipos celulares en estos tejidos, reemplazando células muertas o envejecidas mediante vías análogas a la hematopoyesis en la médula ósea. De manera similar, dentro de un tumor deben existir sólo ciertas células con capacidad para dividirse de modo incontrolable y generar nuevos tumores; estas células son células madre tumorales.

Debido a que las células madre pueden dividirse continuamente a lo largo de la vida de un organismo, las mutaciones oncogénicas en su DNA pueden acumularse y transformarlas por último en células cancerosas. Las células que han adquirido estas mutaciones tienen una capacidad proliferativa anormal y no pueden experimentar procesos normales de proliferación. Muchas mutaciones oncogénicas, como las que evitan la apoptosis o generan una señal que promueve el crecimiento inapropiado, también pueden producirse en células progenitoras más diferenciadas, pero que aún se replican. Dichas mutaciones en células progenitoras hematopoyéticas pueden conducir a diversos tipos de leucemia.

Las células animales normales a menudo se clasifican de acuerdo con sus tejidos embrionarios de origen y la denominación de los tumores obedece a la misma regla. Los tumores malignos se clasifican como *carcinomas* si derivan del endodermo (epitelio intestinal) o del ectodermo (epitelio neural o de la piel) y *sarcomas* si derivan del mesodermo (precursores de los músculos, la sangre o el tejido conectivo). Las *leucemias*, una clase de sarcomas, crecen como células individuales en la sangre, mientras que la mayoría de otros tumores son masas sólidas. (La palabra *leucemia* deriva del latín "sangre blanca": la proliferación masiva de las células leucémicas puede provocar que la sangre del paciente parezca lechosa).

El crecimiento tumoral requiere la formación de nuevos vasos sanguíneos

Los tumores, ya sean primarios o secundarios, necesitan el reclutamiento de nuevos vasos sanguíneos para crecer hasta formar una gran masa. En ausencia de suministro de sangre, un tumor puede crecer para formar una masa de alrededor de 10^6 células, aproximadamente una esfera de 2 mm de diámetro. En este punto, la división de las células en el exterior de la masa tumoral está balanceada por la muerte de las del centro debido a un abastecimiento inadecuado de nutrientes. Dichos tumores, a menos que secreten hormonas, ocasionan pocos problemas. Sin embargo, la mayoría de los tumores inducen la formación de nuevos vasos sanguíneos que invaden el tumor y lo alimentan, un proceso llamado *angiogénesis*. Este proceso complejo requiere varios pasos: la degradación de la lámina basal que rodea un vaso capilar cercano, la migración de las células endoteliales que revisten el vaso capilar hacia el tumor, la división de estas células endoteliales y la formación de una nueva membrana basal alrededor de los vasos recién elongados.

Muchos tumores producen factores de crecimiento que estimulan la angiogénesis; otros tumores de alguna forma inducen a las células normales circundantes a sintetizar y secretar esos factores. El factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), el factor transformador del crecimiento α (TGFα) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), que son secretados por muchos tumores, tienen todos propiedades angiogénicas. Los nuevos vasos sanguíneos nutren el tumor en crecimiento, le permiten aumentar de tamaño y, por lo tanto, se incrementa la probabilidad de que se produzcan mutaciones dañinas adicionales. La presencia de un vaso sanguíneo adyacente también facilita el proceso de metástasis.

MEDICINA

Diversas proteínas naturales que inhiben la angiogénesis (p. ej., la angiogenina y la endostatina) o los antagonistas del receptor VEGF despertaron gran interés como posibles agentes terapéuticos. Aunque durante el desarrollo embrionario la formación de vasos sanguíneos es constante, en los adultos se forman pocos, excepto en caso de una herida. Por lo tanto, un inhibidor específico de la angiogénesis no sólo debe ser eficaz contra muchos tipos de tumores sino que también debe tener escasos efectos secundarios. ▮

(a)



(b)



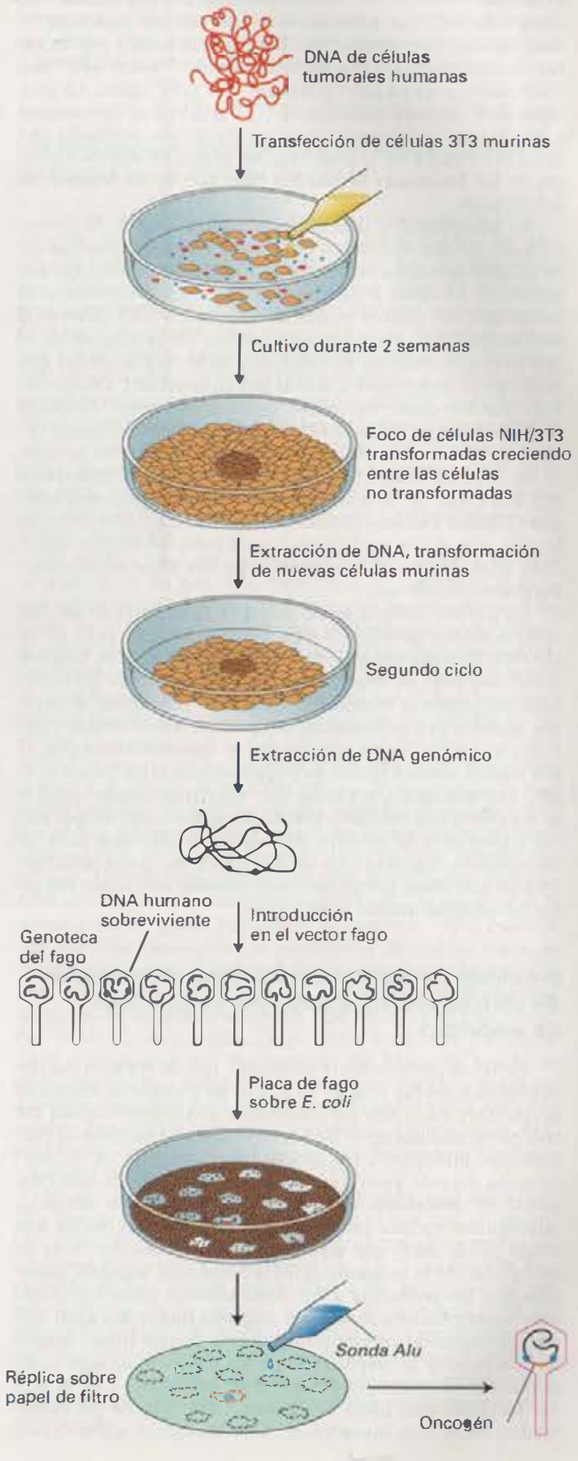
▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 23-3 Las microfotografías electrónicas de barrido revelan las diferencias organizacionales y morfológicas entre las células 3T3 normales y las transformadas.** (a) Las células normales 3T3 son alargadas, están alineadas y estrechamente empaquetadas en forma ordenada. (b) Las células 3T3 transformadas por un oncogén codificado por el virus del sarcoma de Rous son redondeadas y están cubiertas con pequeñas prolongaciones filiformes y otras con forma de bulbo. Las células transformadas han perdido la organización lateral de las células normales y crecen encimadas. Estas células presentan muchas propiedades similares a las de las células malignas. Se observan cambios similares en las células transfectadas con DNA de cánceres humanos que contienen el oncogén *ras*^{D} (Cortesia de L.-B. Chen.)

Las células cultivadas pueden ser transformadas en células tumorales

La morfología y las propiedades de crecimiento de las células tumorales difieren claramente de las de sus contrapartes normales; algunas de estas diferencias también son evidentes cuando las células se cultivan. Que las mutaciones causan estas diferencias se estableció en forma concluyente mediante experimentos de transfección con una línea de fibroblastos murinos cultivados, denominados células 3T3. Estas células normalmente crecen sólo cuando se adhieren a la superficie plástica de una placa de cultivo y se mantienen a baja densidad celular. Dado que las células 3T3 detienen su proliferación cuando entran en contacto con otras células, forman finalmente una monocapa de células bien ordenadas que detienen la proliferación y permanecen en la fase de reposo G_0 del ciclo celular (fig. 23-3a).

Cuando se agrega DNA de células de carcinoma vesical humano a las células 3T3 en cultivo, alrededor de una célula en un millón incorpora un segmento particular del DNA exógeno que produce un cambio fenotípico distintivo. La progenie de la célula afectada es más redondeada y se adhiere menos a otras células y a la placa que las células circundantes normales y forma un cúmulo tridimensional de células (un foco) que puede reconocerse en el examen microscópico (fig. 23-3b). Dichas células, que continúan creciendo cuando las células normales dejaron de hacerlo, han sufrido transformación oncogénica. Las células transformadas tienen propiedades similares a las de las células de los tumores malignos, incluidos cambios en la morfología celular, capacidad para crecer sin adherirse a una matriz extracelular, menores requerimientos de factores de crecimiento, secreción de activador del plasminógeno y pérdida de microfilamentos de actina.

En la figura 23-4 se esquematiza el procedimiento para transformar células 3T3 con DNA de un carcinoma vesical humano y la clonación de segmentos específicos de DNA que inducen la transformación. Fue notable descubrir una pequeña porción de DNA con esta capacidad; si hubieran sido necesarias más de una porción, el experimento habría fracasado. Estudios posteriores demostraron que el segmen-



▶ **FIGURA EXPERIMENTAL 23-4 La transformación de células murinas con DNA de una célula cancerosa humana permite la identificación y clonación molecular del oncogén *ras*^{D}.** El agregado de DNA proveniente de un carcinoma vesical humano a un cultivo de células 3T3 murinas hace que aproximadamente una célula en un millón se divida de forma anómala y forme un foco, o clon, de células transformadas. Para clonar el oncogén responsable de la transformación, se saca ventaja del hecho de que la mayoría de los genes humanos tiene secuencias repetidas de DNA cercanas denominadas secuencias *Alu*. Se aísla el DNA del foco inicial de las células murinas transformadas y se separa el oncogén del DNA humano adventicio mediante una transferencia secundaria a células murinas. Luego se clona en un bacteriófago λ el DNA total de una célula murina transfectada; sólo el fago que recibe el DNA humano se hibrida con una sonda *Alu*. El fago hibridante debería contener parte o todo el oncogén transformador. Este resultado esperado puede probarse mediante la demostración de que el DNA del fago puede transformar células (si el oncogén fue clonado en su totalidad) o que la parte clonada del DNA siempre está presente en las células transformadas por el DNA transferido de la célula dadora original.

to clonado incluye una versión mutante del gen celular *ras*, designado *ras*^{D}. La proteína Ras normal, que participa en muchas vías de transducción de señales activada por factores de crecimiento, varía entre un estado "inactivado" con GDP unido y un estado "activado" con GTP unido. La proteína Ras^{D} mutada hidroliza el GTP unido muy lentamente y por lo tanto se acumula en el estado activo, enviando una señal promotora de la proliferación al núcleo aun en ausencia de las hormonas necesarias para activar su función de señalización.

La producción y la activación constitutiva de la proteína Ras^{D} no son suficientes para producir la transformación de células normales en un cultivo primario de fibroblastos humanos, de ratón o de rata. Sin embargo, a diferencia de las células del cultivo primario, las células 3T3 cultivadas han sufrido una mutación con pérdida de la función en el gen *p16*, que codifica un inhibidor de la ciclina cinasa que restringe la progresión a través del ciclo celular. Dichas células pueden crecer en cultivo durante un tiempo ilimitado si se las diluye y se las abastece con nutrientes en forma periódica, lo cual las células normales no pueden hacer (véase fig. 6-37b). Estas células 3T3 inmortales se transforman por completo en células tumorales sólo cuando producen una proteína Ras constitutiva activa. Por esta razón, la transfección con el gen *ras*^{D} puede transformar en células tumorales a las células 3T3, pero no a los fibroblastos primarios normales en cultivos.

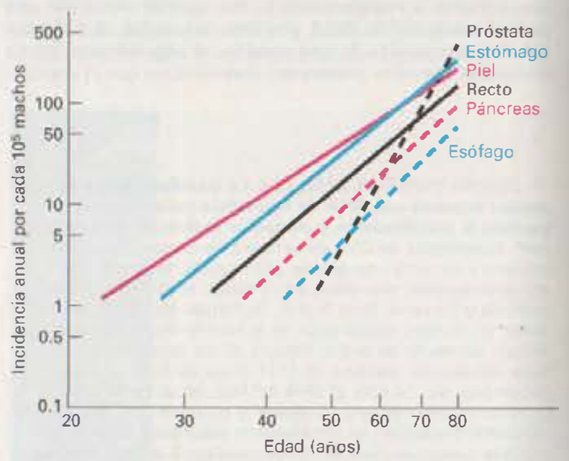
Un gen *ras* mutante se encuentra en la mayoría de los cánceres humanos de colon, vejiga y otros cánceres, pero no en el DNA humano normal; por consiguiente, se debe originar como resultado de una mutación somática en una de las células progenitoras tumorales. Cualquier gen, como el *ras*^{D}, que codifica una proteína capaz de transformar células cultivadas o inducir cáncer en animales se denomina oncogén. El gen celular normal que le da origen se denomina protooncogén. Los oncogenes portados por virus que causan tumores en los animales a menudo derivan de protooncogenes que fueron capturados del genoma del huésped y alterados para ser oncogénicos. Cuando esto se descubrió, fue asombroso encontrar que estos peligrosos virus estaban volviendo los genes propios del animal contra ellos.

El modelo de incidencias múltiples de inducción de cáncer está sustentado por varias líneas de evidencia

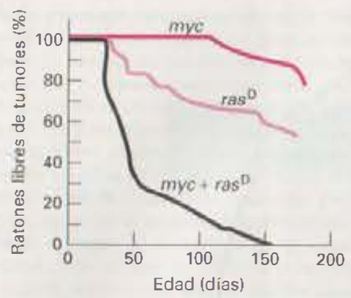
Como se notó antes y se ilustró por la transformación oncogénica de las células 3T3, por lo general se necesitan mutaciones múltiples para convertir una célula normal del cuerpo en una maligna. De acuerdo con este modelo de "incidencias múltiples", los cánceres evolutivos (o de "supervivencia del más apto") surgen por un proceso de selección clonal no demasiado diferente de la selección de animales individuales en una gran población. Una mutación en una célula puede darle una leve ventaja de crecimiento. Una de las células de la progenie sufriría luego una segunda mutación que les permitiría a sus descendientes crecer de modo más incontrolable y formar un pequeño tumor benigno; una tercera mutación en una célula dentro de este tumor le permitiría superar el crecimiento de las demás y las restricciones impuestas por el microambiente del tumor, y su progenie formaría una masa de células, cada una de las cuales tendría estas tres mutaciones. Una mutación adicional en una de estas células permitiría a su progenie escapar hacia la sangre y establecer colonias hijas en otros sitios, la marca característica del cáncer metastásico. Este modelo hace dos predicciones fácilmente analizables.

Primero, todas las células en un tumor dado deben contener al menos algunas alteraciones genéticas en común. Los análisis sistemáticos de las células de tumores humanos individuales sustentan la predicción de que todas derivan de un único progenitor. Cabe recordar que durante la vida fetal de un ser humano femenino cada célula inactiva uno de los dos cromosomas X. Una mujer es un mosaico genético; la mitad de las células tienen un X inactivado y las restantes tienen el otro X inactivado. Si un tumor no surgiera de un único progenitor, estaría compuesto de una mezcla de células con uno u otro X inactivado. De hecho, las células del tumor de una mujer tienen el mismo cromosoma X inactivo. Los diferentes tumores pueden estar compuestos de células con el X paterno o con el materno inactivo. Segundo, la incidencia del cáncer debería incrementarse con la edad debido a que a las mutaciones múltiples requeridas les toma décadas producirse. Si se acepta que la velocidad de mutación es aproximadamente constante durante un período de vida, entonces la incidencia de la mayoría de los tipos de cáncer sería independiente de la edad si sólo fuera necesaria una mutación para convertir una célula normal en una maligna. Como indica la información en la figura 23-5, la incidencia de muchos tipos de cánceres humanos se incrementa drásticamente con la edad.

La evidencia más directa de que se necesitan múltiples mutaciones para la inducción tumoral proviene de los ratones transgénicos que portan tanto el oncogén *ras*^{D} como el



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 23-5 La incidencia de cáncer humano aumenta en función de la edad. El incremento de la incidencia con la edad es compatible con el modelo de incidencias múltiples de la inducción del cáncer. Nótese que se grafica el logaritmo de la incidencia anual en función del logaritmo de la edad. (De B. Vogelstein y K. Kinzler, 1993, *Trends Genet.* 9:101.)



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 23-6 La cinética de la aparición de tumores en ratones hembra portadoras de uno o dos transgenes oncogénicos muestra la naturaleza cooperativa de las mutaciones múltiples en la inducción del cáncer. Los transgenes fueron dirigidos por el promotor, específico de células mamarias, del virus de tumor mamario murino (MMTV). La estimulación hormonal asociada con el embarazo activó la sobreexpresión de los transgenes. El gráfico muestra el curso temporal de la tumorigénesis en los ratones que transportan los transgenes *myc* o *ras*^{D} al igual que en la progenie de una cruza de portadores *myc* con portadores *ras*^{D} que contienen ambos transgenes. Los resultados demuestran con claridad los efectos cooperativos de múltiples mutaciones en la inducción del cáncer (Véase E. Sinn et al., 1987, *Cell* 49:465.)

protooncogén c-*myc* controlado por un promotor/amplificador de un retrovirus específico de las células mamarias. Cuando está unido a este promotor, el gen normal c-*myc* se sobreexpresa en el tejido mamario debido a que el promotor es inducido por niveles hormonales endógenos y reguladores específicos de los tejidos. Esta transcripción intensificada de c-*myc* imita las mutaciones oncogénicas que elevan la transcripción de c-*myc*, y convierten al protooncogén en un oncogén. Por sí mismo, el transgén c-*myc* causa tumores sólo luego de 100 días y entonces sólo en algunos ratones; está claro que sólo una fracción minúscula de las células mamarias que sobreproducen la proteína Myc se vuelven malignas. De manera similar, la producción de la proteína mutante Ras^{D} sola causa tumores más temprano, pero aún lentamente y con alrededor del 50% de eficiencia durante 150 días. Sin embargo, cuando los *c-myc* y *ras*^{D} transgénicos se cruzan en forma tal que todas las células mamarias producen tanto Myc como Ras^{D}, los tumores aparecen más rápidamente y todos los animales sucumben al cáncer (fig. 23-6). Dichos experimentos destacan los efectos sinérgicos de múltiples oncogenes. También sugieren que la larga latencia de la formación de tumores, aun en los ratones transgénicos dobles, se debe a la necesidad de adquirir mutaciones somáticas adicionales.

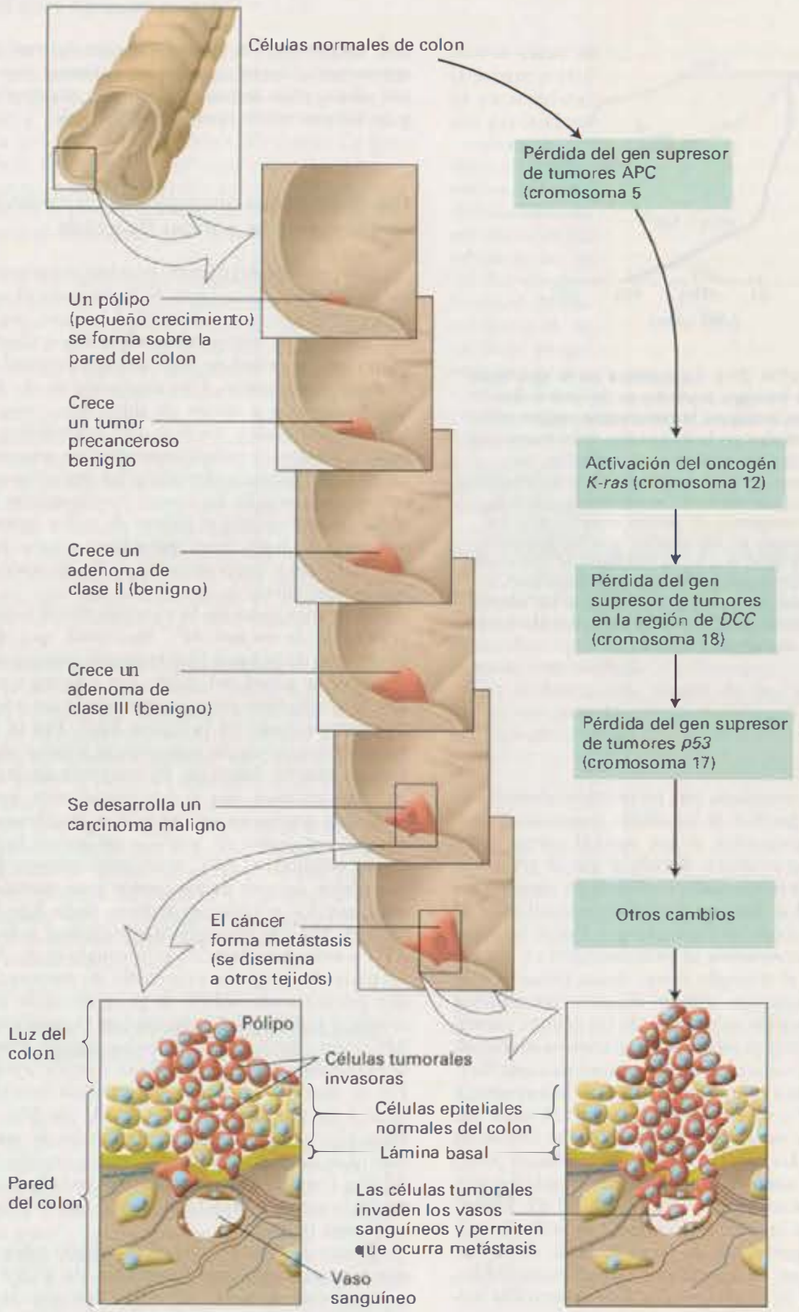
En células cultivadas pueden verse efectos cooperativos similares entre los oncogenes. La transfección de fibroblastos normales con c-*myc* o *ras*^{D} activado no es suficiente para la transformación oncogénica, mientras que cuando son transfectados juntos, los dos genes cooperan para transformar las células. Los niveles desregulados de c-*myc* sólo inducen la proliferación, pero también sensibilizan los fibroblastos a la apoptosis y la sobreexpresión del *ras*^{D} sólo induce la senescencia. Cuando los dos oncogenes se expresan en la misma célula, estas respuestas celulares negativas se neutralizan y las células sufren transformación.

Las mutaciones oncogénicas sucesivas pueden rastrearse en el cáncer de colon

Los estudios del cáncer de colon proporcionan la evidencia más convincente hasta la fecha para el modelo de incidencias múltiples de inducción de cáncer. Los cirujanos pueden obtener muestras puras de muchos cánceres humanos, pero la etapa exacta de la progresión tumoral no puede identificarse y analizarse. Una excepción es el cáncer de colon, que evoluciona a través de diferentes etapas morfológicas bien caracterizadas. Estas etapas intermedias –pólipos, adenomas benignos y carcinomas– pueden aislarse mediante una cirugía, permitiendo identificar las mutaciones que se producen en cada una de las etapas morfológicas. Numerosos estudios muestran que el cáncer de colon aparece a partir de una serie de mutaciones que suelen producirse en un orden bien definido y proporcionan un fuerte sostén al modelo de incidencias múltiples.

El primer paso en la carcinogénesis involucra siempre la pérdida de un gen *APC* funcional, que se traduce en la formación de pólipos (crecimientos precancerosos) en el interior de la pared del colon. Sin embargo, no todo cáncer de colon adquiere estas mutaciones o las adquiere en el orden representado en la figura 23-7. Por lo tanto, diferentes combinaciones de mutaciones pueden dar como resultado el mismo fenotipo. La mayoría de las células en un pólipo contienen una o dos mutaciones iguales en el gen *APC* que provocan su pérdida o inactivación; por consiguiente son clones de la célula en la cual tuvo lugar la mutación original. El *APC* es un gen supresor de tumor y ambos alelos del gen deben portar una mutación inactivante para que los pólipos se formen, dado que las células con un gen *APC* de tipo silvestre expresan suficiente proteína APC como para funcionar normalmente. Al igual que la mayoría de los genes supresores de tumores, *APC* codifica una proteína que inhibe la progresión de ciertos tipos de células a lo largo del ciclo celular. De este modo la proteína APC evita que la vía de transducción de señales *Wnt* active la expresión de protooncogenes que incluyen el gen c-*myc*. Por lo tanto, la ausencia de proteína funcional APC conduce a la producción inapropiada de Myc, un factor de transcripción que induce la expresión de muchos genes requeridos para la transición desde la fase G_1 a la S del ciclo celular. Las células homocigóticas para las mutaciones *APC* proliferan a una velocidad mayor que las formas normales y forman pólipos.

Si una de estas células en un pólipo sufre otra mutación, esta vez una mutación activadora, en el gen *ras*, su progenie se divide de modo aún más descontrolado y forma un adenoma de mayor tamaño (véase fig. 23-7). La pérdida mutacional de una región cromosómica en particular (el gen relevante aún no se conoce), seguida de la inactivación del gen *p53* conduce a la pérdida gradual de la regulación normal y la consiguiente formación de un carcinoma maligno. Alrededor de la mitad de todos los tumores humanos portan mutaciones en el *p53*, el cual codifica un regulador transcripcional.



▲ Fig. 23-7. Desarrollo y metástasis del cáncer colorrectal humano y su base genética. Una mutación en el gen supresor de tumores APC en una única célula epitelial induce la división de la célula, aunque las células circundantes no lo hagan, formando una masa de células tumorales benignas localizadas o pólipo. Mutaciones posteriores que inducen la expresión de una proteína Ras constitutivamente activa y la pérdida de dos genes supresores de tumores –un gen no identificado en las cercanías del *DDC* y *p53*– generan una célula maligna que porta las cuatro mutaciones. Esta célula continúa dividiéndose y la progenie invade la lámina basal que rodea el tejido. Algunas células tumorales se diseminan hacia los vasos sanguíneos que las distribuyen y proliferan en sitios distantes; se dice que un paciente con ese tumor tiene cáncer. (Adaptado de B. Vogelstein y K. Kinzler, *Trends Genet.* 9:101.)

El DNA de diferentes carcinomas de colon humano generalmente contiene mutaciones en todos estos genes –mutaciones de pérdida de función en los supresores tumorales *APC* y *p53*, el todavía gen misterioso y una mutación activadora (ganancia de función) en el oncogén dominante *K-ras*– lo que establece que se necesitan mutaciones múltiples en la misma célula para que se forme el cáncer. Algunas de estas mutaciones parecen conferir ventajas de crecimiento en una etapa temprana del desarrollo tumoral, mientras que otras promueven las últimas etapas, incluidas la invasión y la metástasis, necesarias para el fenotipo maligno. El número de mutaciones requeridas para la progresión del cáncer de colon al principio puede parecer sorprendente, aparentemente una barrera eficaz contra la tumorigénesis. Sin embargo, nuestros genomas están bajo ataques constantes. Estimaciones recientes indican que los pólipos que aparecen esporádicamente tienen alrededor de 11.000 alteraciones genéticas en cada célula, aunque es muy probable que sólo algunas de ellas sean relevantes para la oncogénesis.

El carcinoma de colon proporciona un ejemplo excelente del cáncer de modalidad de incidencias múltiples. El grado en el cual este modelo se aplica al cáncer recién se está aprendiendo, pero está claro que múltiples tipos de cáncer involucran múltiples mutaciones. El advenimiento de la tecnología de las **micromatrices** de DNA permite un examen más detallado de las propiedades tumorales al monitorizar el espectro de las moléculas de mRNA de decenas a miles de genes, y datos recientes proporcionaron algunos desafíos al modelo de incidencias múltiples. No es sorprendente que los tumores primarios a menudo puedan distinguirse de los metastásicos por el patrón de la expresión génica. Más interesante aún, se encontró que un subgrupo de tumores primarios sólidos tiene características más típicas de los tumores metastásicos, lo que indica que puede ser posible identificar los tumores primarios con mayor probabilidad de volverse metastásicos. Esto también eleva la posibilidad de que, al menos para algunos tipos de cáncer, los acontecimientos iniciales de los tumores primarios puedan establecer el curso hacia la metástasis. Esta hipótesis puede plantearse a partir de que, dentro del tumor primario emerja un escaso subgrupo de células que adquieran una serie necesaria de mutaciones adicionales.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 23.1

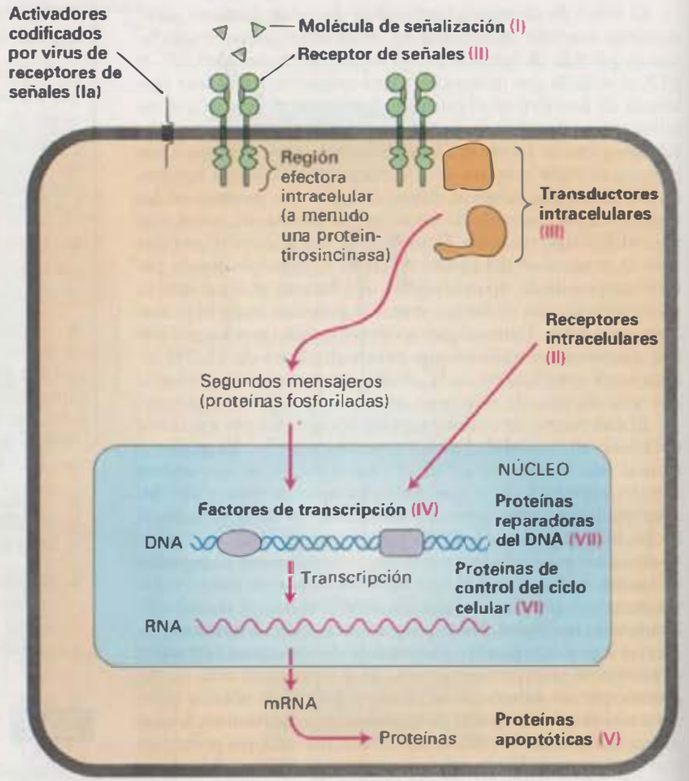
Células tumorales e inicio del cáncer

- El cáncer es una aberración fundamental en el comportamiento celular que afecta a muchos aspectos de la biología celular molecular. La mayoría de los tipos celulares del organismo pueden dar origen a células de tumores malignos (cáncer).
- Por lo general, las células cancerosas provienen de células madre y de otras células proliferantes y poseen mayor semejanza con estas células que con tipos celulares más diferenciados.
- Las células cancerosas se pueden multiplicar en ausencia de al menos algunos de los factores estimuladores de crecimiento necesarios para la proliferación de las células normales y son resistentes a señales que normalmente programan la muerte celular (apoptosis).
- Ciertas células cultivadas transfectadas con DNA de células tumorales también se transforman (véase fig. 23-4). Dichas células transformadas comparten ciertas propiedades con las células tumorales.
- Las células cancerosas a veces invaden tejidos circundantes, a menudo atravesando la lámina basal que define los límites de los tejidos y diseminándose en todo el organismo para establecer áreas secundarias de crecimiento, un proceso denominado metástasis. Los tumores metastásicos suelen secretar proteasas, que degradan la matriz extracelular circundante.
- Tanto los tumores primarios como los secundarios requieren angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos, para crecer hasta alcanzar una masa grande.
- El modelo de incidencias múltiples, que propone que se necesitan múltiples mutaciones para causar cáncer, es compatible con la homogeneidad genética de las células de un tumor dado, el incremento observado en la incidencia de los cánceres humanos con la edad avanzada y los efectos cooperativos de los transgenes oncogénicos sobre la formación de tumores en ratones.
- La mayoría de las mutaciones oncogénicas se producen en las células somáticas y no están contenidas en el DNA de la línea germinal.
- El cáncer de colon se desarrolla a través de diferentes etapas morfológicas que por lo general están asociadas con mutaciones en genes supresores de tumores específicos y en protooncogenes (véase fig. 23-7).

23.2 Bases genéticas del cáncer

Como hemos visto, las mutaciones en dos amplias clases de genes –los protooncogenes (p. ej., *ras*) y los genes supresores de tumor (p. ej., *APC*)– desempeñan un papel clave en la inducción del cáncer. Estos genes codifican muchos tipos de proteínas que contribuyen a controlar el crecimiento y la proliferación celular (fig. 23-8). Casi todos los tumores humanos tienen mutaciones inactivadoras en los genes que usualmente actúan en diversos puntos clave del ciclo celular para detener la progresión de una célula a través del ciclo celular si un paso previo se efectuó de modo incorrecto o si se dañó el DNA. Por ejemplo, la mayoría de los cánceres tienen mutaciones inactivadoras en los genes que codifican una o más proteínas que normalmente restringen la progresión a través del estadio G_1 del ciclo celular. De igual manera, se encuentra una *Ras* activa constitutiva u otra proteína de transducción de señales activada en diversos tipos de tumores humanos que tienen diferentes orígenes. Por lo tanto, la malignidad y los intrincados procesos para controlar el ciclo celular tratados en el capítulo 21 son dos caras de la misma moneda. En la serie de eventos que conducen al crecimiento de un tumor, los oncogenes se combinan con mutaciones supresoras de tumores para dar origen al espectro completo de propiedades celulares descritas en la sección previa (véase fig. 23-7).

En esta sección consideramos los tipos generales de mutaciones que son oncogénicas y vemos cómo ciertos virus pueden causar cáncer. También explicamos por qué algunas mutaciones hereditarias incrementan el riesgo de cánceres particulares y consideramos la relación entre el cáncer y los genes importantes desde el punto de vista del desarrollo. Concluimos con una breve explicación de cómo se utilizan los métodos genómicos para caracterizar y clasificar los tumores.



▶ Fig. 23-8. Siete tipos de proteínas que participan en el control del crecimiento y la proliferación celular. El cáncer puede producirse por la expresión de formas mutantes de estas proteínas. Las mutaciones que cambian la estructura o la expresión de proteínas que normalmente promueven el crecimiento celular suelen dar origen a oncogenes activos dominantes. En esta categoría se encuentran muchas, pero no todas, las moléculas de señalización extracelular (I), receptores de señales (II), proteínas de transducción de señales (III) y factores de transcripción (IV). Las proteínas de control del ciclo celular (VI) que operan restringiendo la proliferación celular y las proteínas de reparación del DNA (VII) están codificadas por genes supresores de tumores. Las mutaciones en estos genes actúan en forma recesiva e incrementan enormemente la probabilidad de que las células mutantes se vuelvan tumorales o de que se produzcan las mutaciones en otras clases. Las proteínas apoptóticas (V) incluyen supresores de tumores que promueven la apoptosis y oncoproteínas que promueven la supervivencia celular. Las proteínas codificadas por virus que activan los receptores de señales (Ia) también pueden inducir cáncer.

Las mutaciones con ganancia de función convierten protooncogenes en oncogenes

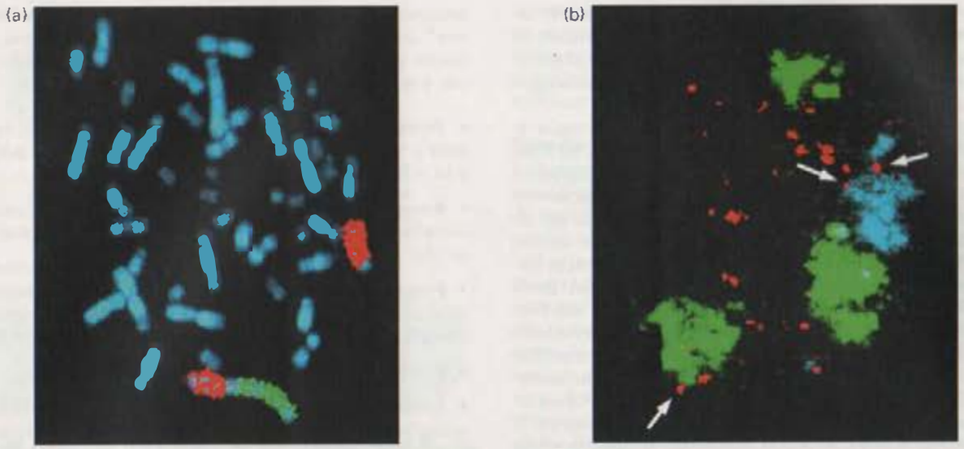
Cabe recordar que un oncogén es cualquier gen que codifica una proteína capaz de transformar células en cultivo o inducir cáncer en los animales. De los numerosos oncogenes conocidos, todos excepto unos pocos derivan de genes celulares normales (o sea, protooncogenes) cuyos productos promueven la proliferación celular. Por ejemplo, el gen *ras* ya analizado es un protooncogén que codifica una proteína intracelular de transducción de señales; el gen ras^{D} derivado mutante de *ras* es un oncogén cuya proteína codificada provee una señal estimulante del crecimiento excesivo o descontrolado. Otros protooncogenes codifican moléculas señales estimulantes del crecimiento y sus receptores, proteínas antiapoptóticas (supervivencia celular) y algunos factores de transcripción.

La conversión o activación de un protooncogén a un oncogén por lo general involucra una mutación con *ganancia de función*. Al menos cuatro mecanismos pueden producir oncogenes de los correspondientes protooncogenes:

- *Mutaciones puntuales* (es decir, cambio en un único par de bases) en un protooncogén que deriva en un producto proteico activo en forma constitutiva.
- *Translocación cromosómica* que fusiona dos genes juntos para producir un gen híbrido que codifica una proteína quimérica cuya actividad, a diferencia de la de las proteínas progenitoras, a menudo es constitutiva.
- *Translocación cromosómica* que ubica un gen regulador del crecimiento bajo el control de un promotor diferente que causa la expresión inadecuada del gen.
- *Amplificación* (es decir, la replicación anormal de DNA) de un segmento de DNA que incluye un protooncogén, de manera que existan numerosas copias, lo que conduce a la sobreproducción de la proteína codificada.

Un oncogén formado por cualquiera de los primeros dos mecanismos codifica una "oncoproteína" que difiere de la proteína normal codificada por el protooncogén correspondiente. Por el contrario, los otros dos mecanismos generan oncogenes cuyos productos proteicos son idénticos a las proteínas normales; su efecto oncogénico se debe a la producción en niveles superiores a los normales o en células donde normalmente no se producen.

La amplificación localizada de DNA para producir tanto como 100 copias de una región dada (por lo general, una región que se extiende cientos de kilobases) es un cambio genético común en los tumores. Esta anomalía puede tomar cualquiera de las dos formas: el DNA duplicado puede estar organizado en forma de tándem en un único sitio en un cromosoma o puede existir como pequeñas estructuras independientes similares a minicromosomas. El primer caso mencionado conduce a una región con tinción homogénea (HSR) visible con el microscopio óptico en el sitio de la amplificación; el último caso causa cromosomas "extradiminutos", separados de los cromosomas normales que parecen granos de pimienta en una preparación cromosómica teñida (fig. 23-9).



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 23-9 Las amplificaciones de DNA en los cromosomas teñidos toman dos formas visibles con el microscopio óptico. (a) Regiones con tinción homogénea en un cromosoma humano de una célula de neuroblastoma. Los cromosomas están teñidos de manera uniforme con un colorante azul para que pueda verse todo. Se detectaron secuencias específicas de DNA empleando hibridación fluorescente in situ (FISH) en la cual clones de DNA marcados con fluorescencia se hibridan a DNA desnaturalizado en los cromosomas. El par 4 de cromosomas está marcado (rojo) por hibridación in situ con un gran clon de DNA cósmido que contiene el oncogén N-*myc*. En uno de los cromosomas del par 4 se observa una región con tinción homogénea (verde) después de la coloración para secuencias enriquecidas. (b) Secciones ópticas provenientes de un núcleo de una célula de neuroblastoma humano que contiene cromosomas minúsculos dobles. Los cromosomas normales son las estructuras azules y verdes; los cromosomas minúsculos dobles son los numerosos puntos rojos pequeños. Las flechas indican minúsculos dobles asociados con la superficie o el interior de los cromosomas normales. [Partes (a) y (b) de I. Solovei et al., 2000, *Genes Chromosomes Cancer* 29:297-308, figs. 4 y 17.]

La amplificación génica puede involucrar un pequeño número de genes, como el gen N-*myc* y su vecino *DDX1* que están amplificados en el neuroblastoma o una región cromosómica que contiene muchos genes. Puede ser difícil determinar los genes amplificados, un primer paso para establecer cuál gen causó el tumor. Las micromatrices de DNA ofrecen un poderoso método para encontrar las regiones amplificadas de cromosomas. Más que para observar la expresión génica, la aplicación de micromatrices que describimos antes, estos experimentos implican buscar secuencias de DNA anormalmente abundantes. El DNA genómico de las células cancerosas se emplea para sondear micromatrices que contienen fragmentos de DNA genómico y los puntos con DNA amplificado dan señales más fuertes que los puntos control. Entre los genes amplificados, los candidatos más fuertes para los genes relevantes también pueden ser identificados midiendo la expresión génica. Se analizó sistemáticamente una línea celular de carcinoma de mama, con cuatro regiones cromosómicas amplificadas, en busca de genes amplificados, y los niveles de expresión de esos genes también fueron estudiados sobre las micromatrices. Se encontraron cincuenta genes amplificados, pero sólo cinco también se expresaron en mayor proporción. Estos cinco son nuevos candidatos como oncogenes. ■

Como quiera que surjan, las mutaciones con ganancia de función que convierten protooncogenes en oncogenes son genéticamente dominantes; es decir, las mutaciones en sólo uno de los dos alelos son suficientes para la inducción del cáncer.

Los virus causantes de cáncer contienen oncogenes o activan protooncogenes celulares

Los estudios pioneros de Peyton Rous que comenzaron en 1911 condujeron al reconocimiento inicial de que un virus podía causar cáncer cuando se lo inyectaba en un animal huésped apropiado. Muchos años después los biólogos moleculares demostraron que el virus del sarcoma de Rous (RSV) es un retrovirus cuyo genoma RNA se transcribe en forma inversa a DNA, que se incorpora en el genoma de una célula huésped (véase fig. 4-43). Además de los genes "normales" presentes en todos los retrovirus, los virus transformadores oncogénicos como el RSV contienen el gen v-*src*. Estudios posteriores con formas mutantes de RSV demostraron que sólo el gen v-*src*, no los otros genes virales, era necesario para la inducción del cáncer.

Al final de la década de 1970, los científicos se sorprendieron al encontrar que las células normales de los pollos y otras especies contienen un gen que está estrechamente relacionado con el gen v-*src* RSV. Este gen celular normal, un protooncogén, se distingue del gen viral mediante el prefijo "c" (c-*src*). Se cree que RSV y otros virus portadores de oncogenes surgieron al incorporar, o transducir, un protooncogén celular normal a su genoma. Mutaciones posteriores en el gen transducido lo convirtieron luego en un oncogén

dominante activo que puede inducir la transformación celular en presencia del protooncogén normal c-*src*. Dichos virus se denominan *retrovirus transductores* porque sus genomas contienen un oncogén derivado de un protooncogén celular transducido.

Debido a que su genoma porta el potente oncogén v-*src*, el RSV transductor induce tumores en cuestión de días. Por el contrario, la mayoría de los retrovirus oncogénicos inducen cáncer sólo después de meses o años. Los genomas de estos *retrovirus de acción lenta* difieren de los de los virus transductores en un aspecto crucial: carecen de un oncogén. Todos los retrovirus de acción lenta, o "latencia larga", parecen producir cáncer integrándose al DNA de la célula huésped cerca de un protooncogén celular y activando su expresión. Las secuencias de repeticiones terminales largas (LTR) en el DNA retroviral integrado pueden actuar como un amplificador o promotor de un gen celular cercano, estimulando en consecuencia su transcripción. Por ejemplo, en las células de tumores causados por el virus de la leucosis aviaria (ALV), el DNA retroviral se inserta cerca del gen c-*myc*. Estas células sobreproducen la proteína c-Myc; como ya se dijo, la sobreproducción de c-Myc causa una proliferación de células anormalmente rápida. Los virus de acción lenta actúan así por dos razones: la integración cerca de un protooncogén celular (p. ej., c-*myc*) es un suceso aleatorio raro y se tienen que producir mutaciones adicionales antes de que un tumor en pleno desarrollo se vuelva evidente.

En poblaciones naturales de aves y ratones, los retrovirus de acción lenta son mucho más frecuentes que los retrovirus que contienen oncogenes como el virus del sarcoma de Rous. Por lo tanto, la activación por inserción protooncogénica es probablemente el principal mecanismo mediante el cual los retrovirus causan cáncer. Aunque pocos tumores humanos se asocian con cualquier retrovirus, la gran inversión para estudiar los retrovirus como modelo de cáncer humano saldó las deudas con el descubrimiento de los oncogenes celulares y con la sofisticada comprensión de los retrovirus, que luego aceleró el progreso del HIV que causa SIDA.

Unos pocos virus de DNA también son oncogénicos. A diferencia de la mayoría de los virus de DNA que infectan las células animales, los virus de DNA oncogénicos integran sus DNA virales al genoma de la célula huésped. El DNA viral contiene uno o más oncogenes, que permanentemente transforman las células infectadas. Por ejemplo, muchas verrugas y otros tumores benignos de las células epiteliales son causados por papilomavirus que contienen DNA. En contraposición con los oncogenes retrovirales, que derivan de genes celulares normales y no tienen función para el virus excepto permitir su proliferación en los tumores, los oncogenes conocidos de los virus de DNA son parte integral del genoma viral y son necesarios para la replicación viral. Como se tratará más adelante, las oncoproteínas expresadas a partir del DNA viral integrado en células infectadas actúan de diversas formas para estimular el crecimiento y la proliferación celular.

Las mutaciones con pérdida de función en genes supresores de tumores son oncogénicas

Los genes supresores de tumores codifican proteínas que de una u otra forma inhiben la proliferación celular. Las mutaciones con *pérdida de función* en uno o más de estos "frenos" contribuyen al desarrollo de muchos cánceres. Se reconocen cinco clases amplias de proteínas codificadas por genes supresores de tumores:

- Proteínas intracelulares que regulan o inhiben la progresión a través de un estadio específico del ciclo celular (p. ej., p16 y Rb).
- Receprores o transductores de señales para hormonas secretadas o señales de desarrollo que inhiben la proliferación celular (p. ej., TGFβ, el receptor hedgehog).
- Proteínas de control de puntos clave que detienen el ciclo celular si el DNA está dañado o los cromosomas son anómalos (p. ej., p53).
- Proteínas que estimulan la apoptosis.
- Enzimas que participan en la reparación del DNA.

Si bien las enzimas de reparación del DNA no inhiben directamente la proliferación celular, las células que perdieron la capacidad de reparar errores, hrechas o extremos quebrados del DNA acumulan mutaciones en muchos genes, incluidos los que son críticos para controlar el crecimiento y la proliferación celular. En consecuencia, las mutaciones con pérdida de función en los genes que codifican enzimas reparadoras del DNA evitan que las células corrijan mutaciones que inactivan genes supresores de tumores o activen oncogenes.

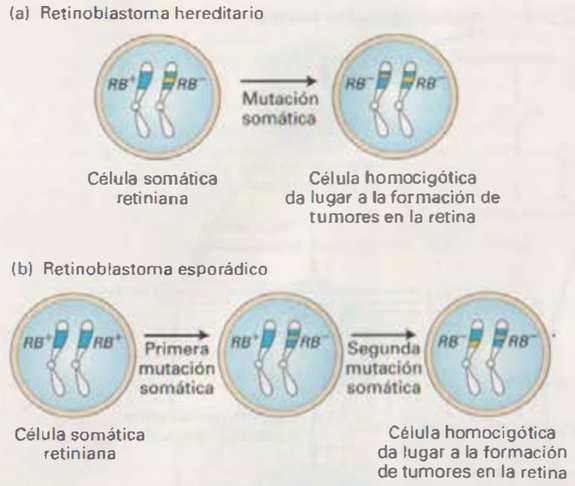
Puesto que suele bastar una copia de un gen supresor de tumor para controlar la proliferación celular, ambos alelos de un gen supresor de tumor deben perderse o inactivarse para estimular el desarrollo tumoral. En consecuencia, las mutaciones oncogénicas con pérdida de función en los genes supresores de tumores son genéticamente recesivas. En muchos cánceres, los genes supresores de tumores tienen eliminaciones o mutaciones puntuales que evitan la producción de cualquier proteína o conducen a la producción de una proteína no funcional. Otro mecanismo para inactivar los genes supresores de tumores es la metilación de residuos de citosina en el promotor u otros elementos de control. Tal metilación se encuentra casi siempre en las regiones no transcriptas del DNA.

Las mutaciones hereditarias en los genes supresores de tumores incrementan el riesgo de cáncer

Las personas con mutaciones hereditarias en los genes supresores de tumores tienen una predisposición para ciertos cánceres. Estas personas suelen heredar una mutación de la línea germinal en un alelo del gen; una mutación somática del segundo alelo facilita la progresión tumoral. Un caso clásico es el retinoblastoma, que es causado por la pérdida de la función del RB, el primer gen supresor de tumor que fue identificado. Como se verá más adelante, la proteína codificada por *RB* ayuda a regular la progresión a través del ciclo celular.

Retinoblastoma hereditario versus esporádico. Los niños con retinoblastoma hereditario heredan una única copia defectuosa del gen *RB*, que en ocasiones se detecta como una pequeña deleción en una de las copias del cromosoma 13. Los niños desarrollan tumores en la retina al comienzo de la vida y casi siempre en ambos ojos. Un evento esencial en el desarrollo del tumor es la deleción o la mutación del gen *RB* normal en el otro cromosoma, lo que da origen a una célula que no produce proteína Rb funcional (fig. 23-10). Por el contrario, las personas con retinoblastoma esporádico heredan dos alelos *RB* normales, cada uno de los cuales ha sufrido una mutación somática con pérdida de función en una única célula retiniana. Debido a que la pérdida de dos copias del gen *RB* es mucho menos probable que la pérdida de una, el retinoblastoma esporádico es infrecuente, se desarrolla a edad avanzada y por lo general sólo afecta a un ojo.

Si los tumores de la retina se extirpan antes de que se vuelvan malignos, los niños con retinoblastoma hereditario a menudo sobreviven hasta la adultez y tienen hijos. Dado que sus células germinales contienen un alelo *RB* normal y uno mutante, estos individuos, en promedio, pasarán el alelo mutante a la mitad de sus hijos y el alelo normal a la otra mitad. Los niños que heredan el alelo normal son normales si su otro progenitor tiene dos alelos *RB* normales. Sin embargo, quienes heredan el alelo mutante tienen la misma predisposición aumentada a desarrollar tumores de la retina como su progenitor afectado, aunque hereden un alelo *RB* normal del otro progenitor normal. En consecuencia, la tendencia a desarrollar retinoblastoma se hereda como un rasgo dominante. Como se verá más adelante, muchos tumores humanos (no sólo los tumores retinianos) contienen alelos mutantes; la mayoría de éstos se originan como resultado de mutaciones somáticas.

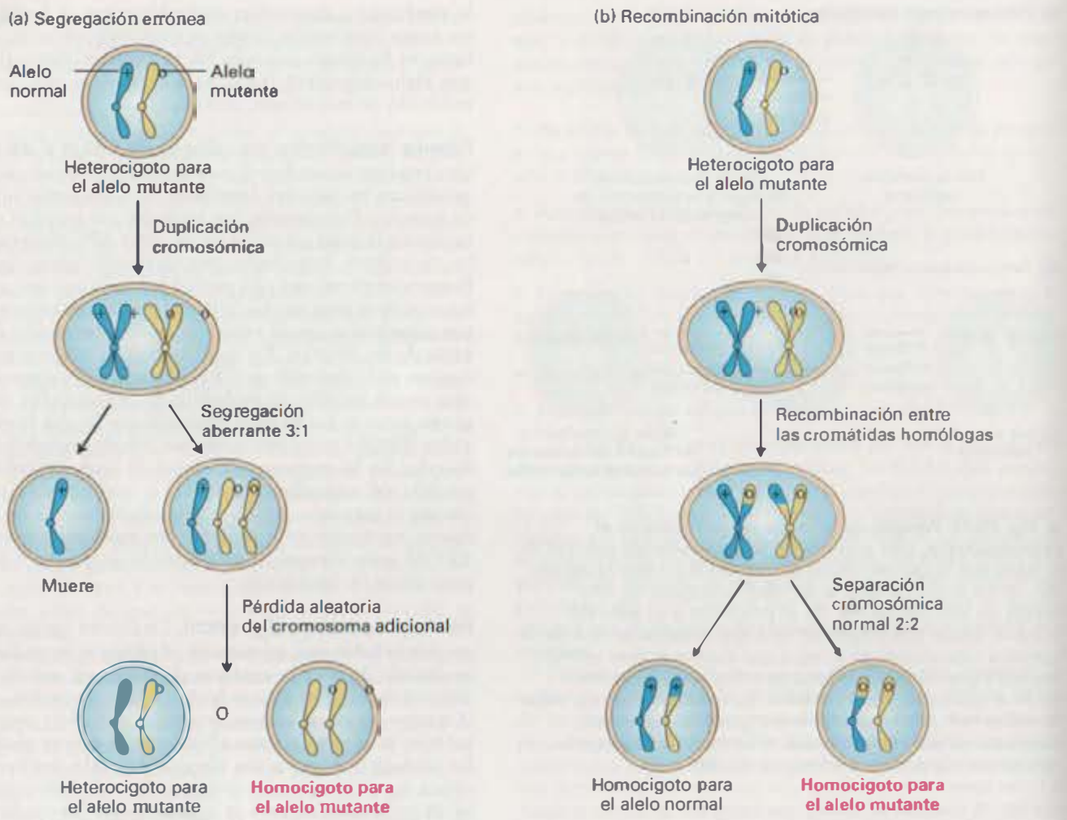


▲ Fig. 23-10. Función de la mutación somática en el retinoblastoma. Esta enfermedad se caracteriza por tumores de la retina que surgen de células que portan dos alelos mutantes *RB*⁻. (a) En el retinoblastoma (familiar) hereditario, un niño hereda un alelo normal *RB*⁺ de un progenitor y un alelo *RB*⁻ mutante *RB* del otro progenitor. Una sola mutación en una célula somática heterocigota de la retina que inactiva el alelo normal producirá una célula homocigota para dos alelos mutantes. (b) En el retinoblastoma esporádico, los niños heredan dos alelos normales *RB*⁺. Son necesarias dos mutaciones somáticas separadas en una célula retiniana en particular o su progenie para producir una célula homocigota *RB*⁻/*RB*⁻.

Formas hereditarias de cáncer de colon y de mama. Una predisposición hereditaria similar para otros cánceres se asoció con mutaciones heredadas en otros genes supresores de tumores. Por ejemplo, las personas que heredan una mutación en la línea germinal en un alelo *APC* desarrollan miles de pólipos intestinales precancerosos (véase fig. 23-7). Puesto que existe una alta probabilidad de que uno o más de estos pólipos progrese hacia la malignidad, estas personas están expuestas a mayor riesgo de desarrollar cáncer de colon antes de los 50 años. De igual forma, las mujeres que heredan un alelo mutante de *BRCA1*, otro gen supresor de tumor, tienen un 60% de probabilidad de desarrollar cáncer de mama antes de los 50 años, mientras que las que heredan dos alelos *BRCA1* normales tienen un 2% de probabilidades de hacerlo. En las mujeres con cáncer de mama hereditario, la pérdida del segundo alelo *BRCA1*, junto con otras mutaciones, es necesaria para que una célula normal de los conductos mamarios se transforme en maligna. Sin embargo, *BRCA1* generalmente no está mutado en el cáncer de mama esporádico no hereditario.

Pérdida de heterocigosidad. Está claro entonces que es posible heredar una propensión al cáncer si se recibe un alelo dañado de un gen supresor de tumor de uno de los padres; es decir, se es heterocigoto para la mutación. Eso por sí mismo no causa cáncer, puesto que el alelo normal restante evita el crecimiento aberrante; el cáncer es recesivo. La pérdida o inactivación ulterior del alelo normal en una célula somática, denominada *pérdida de heterocigosidad*, es un prerrequisito para la aparición del cáncer. Un mecanismo frecuente para esa pérdida comprende la *separación errónea* de los cromosomas portadores del gen supresor de tumores durante la mitosis (fig. 23-11a). Este proceso, también denominado *no disyunción*, es causado por la falla del control de la formación del huso mitótico, que evita que una célula metafásica con un huso mitótico anómalo complete la mitosis (véase fig. 21-32, 2). Otro mecanismo posible es la recombinación mitótica entre la cromátida portadora del alelo de tipo silvestre y una cromátida homóloga portadora de un alelo mutante. Como se ilustra en la figura 21-11b, la segregación cromosómica posterior puede generar una célula hija que es homocigota para el alelo mutante supresor de tumores. Un tercer mecanismo es la deleción o mutación de la copia normal del gen supresor de tumores; dicha eliminación puede comprender una extensa región cromosómica y no necesita ser una deleción precisa de sólo un gen supresor de tumores.

Los cánceres hereditarios constituyen alrededor del 10% de los cánceres humanos. Sin embargo, cabe recordar que la sola mutación hereditaria en la línea germinal no es suficiente para causar el desarrollo del tumor. En todos los casos, el alelo normal supresor de tumores heredado no sólo debe perderse o inactivarse, sino que las mutaciones que afectan otros genes también son necesarias para la aparición del cáncer. Por lo tanto, una persona con una mutación genética recesiva supresora de tumores puede ser excepcionalmente susceptible a mutágenos del medio ambiente como la radiación.

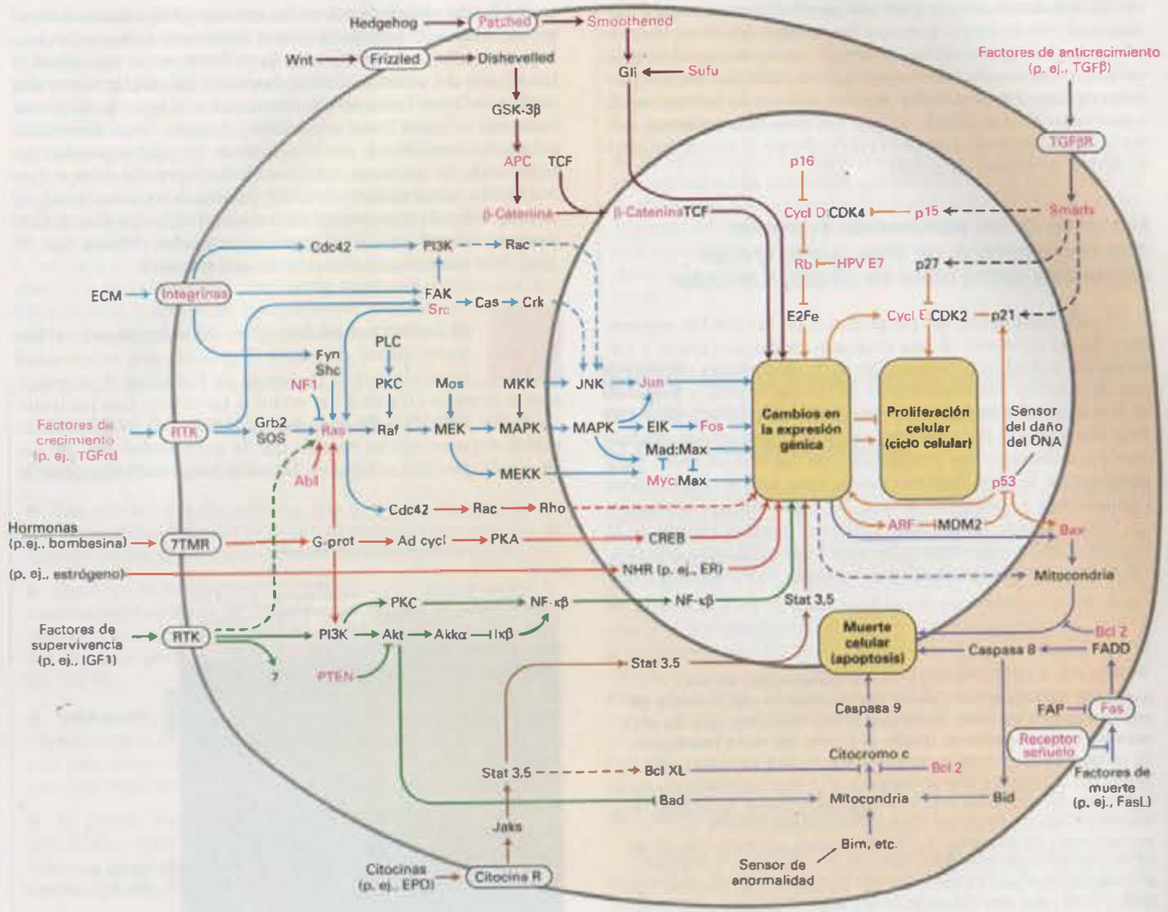


▲ Fig. 23-11. Dos mecanismos para la pérdida de heterocigosidad de los genes supresores de tumores. Por lo general, una célula que contiene un alelo normal y uno mutante de un gen supresor de tumores es normal desde el punto de vista fenotípico. (a) Si la formación del huso mitótico es defectuosa, entonces los cromosomas duplicados portadores de los alelos normal y mutante se pueden separar en una relación 3:1. Una célula hija que recibe tres cromosomas de un tipo casi siempre perderá uno, restableciendo así el número de cromosomas 2*n*. A veces, la célula resultante contendrá un alelo normal y uno mutante, pero otras será homocigótica para el alelo mutante. Hay que notar que tal aneuploidía (constitución cromosómica anormal) suele ser dañina o letal para las células que tienen que desarrollarse en las numerosas y complejas estructuras de un organismo, pero a menudo puede ser tolerada en clones de células que tienen tareas y destinos limitados. (b) La recombinación mitótica entre un cromosoma con un alelo de tipo silvestre y un alelo mutante, seguida por segregación cromosómica, puede producir una célula que contiene dos copias del alelo mutante.

Las aberraciones en las vías de señalización que controlan el desarrollo están asociadas con muchos cánceres

Durante el desarrollo normal las señales secretadas como Wnt, TGFβ y Hedgehog (Hh) se utilizan con frecuencia para dirigir células a destinos particulares para el desarrollo, que pueden incluir la propiedad de la mitosis rápida. Los efectos de dichas señales deben ser regulados de manera tal que el crecimiento se limite al tiempo y lugar apropiados. Entre los mecanismos disponibles para frenar los efectos de poderosas señales de desarrollo se encuentran los antagonistas intracelulares inducibles, los bloqueantes de receptores y las señales contrapuestas/competentes (cap. 15). Las mutaciones que evitan que estos mecanismos restrictivos funcionen son probablemente oncogénicas y causan el crecimiento inapropiado o canceroso.

La señalización Hh, que se utiliza repetidamente durante el desarrollo para controlar los destinos celulares, es un buen ejemplo de una vía de señalización implicada en la inducción del cáncer. En la piel y el cerebelo una de las proteínas humanas Hh, Sonic hedgehog, estimula la división celular mediante la unión e inactivación a una proteína de membrana denominada Patched1 (Ptc1) (véase fig. 15-31). Las mutaciones con pérdida de función en *ptc1* permiten la proliferación celular en ausencia de una señal Hh; por consiguiente, *ptc1*



▲ Fig. 23-12. Circuito celular afectado por mutaciones causantes de cáncer. El control del crecimiento y el ciclo celular, el corazón del cáncer, están influidos por muchos tipos de señales y los aportes externos se integran a medida que la célula decide si se divide o continúa dividiéndose. Las vías del desarrollo dan a las células su identidad, y junto con ella la obligación de proliferar o no. Los genes que se sabe que mutan en las células cancerosas se resaltan en rojo. Las vías establecidas con menor firmeza se muestran con líneas discontinuas. (De D. Hanahan y R. A. Weinberg, 2000, *Cell* 100:57.)

es un gen supresor de tumores. No sorprende que se encontraran mutaciones en *ptc1* en tumores de la piel y el cerebelo en ratones y seres humanos. Las mutaciones en otros genes en la vía de señalización Hh también están asociadas con el cáncer. Algunas de ellas crean oncogenes que activan inadecuadamente los genes diana Hh; otras son mutaciones recesivas que afectan a reguladores negativos, como Ptc1. Al igual que lo que sucede en diversos genes supresores de tumores, la pérdida completa de la función de Ptc1 conduciría a la muerte fetal temprana, puesto que es necesaria para el desarrollo, por lo que sólo las células tumorales son homocigotas *ptc1/ptc1*.

Muchas de las vías de señalización descritas en otros capítulos controlan el desarrollo embrionario y la proliferación celular en los tejidos adultos. En los últimos años las mutaciones que afectan los componentes de la mayoría de estas vías de señalización se asociaron con el cáncer (fig. 23-12). En efecto, una vez que un gen en una vía de desarrollo ha sido asociado con un tipo de cáncer humano, el conocimiento de las vías, recabado a partir de organismos modelos como los gusanos, las moscas o los ratones, permite investigar la posible participación de genes de vías adicionales en otros casos de cáncer. Por ejemplo, ahora se sabe que *APC*, el primer gen crítico mutado en el camino hacia el carcinoma de colon, es parte de la vía de señalización Wnt, que condujo al descubrimiento de las mutaciones de la *ß-catenina* involucradas en el cáncer de colon. Mutaciones en los genes del desarrollo supresores de tumores promueven la formación de tumores en

los tejidos donde el gen afectado normalmente ayuda a restringir el crecimiento, y no en las células donde la función primaria del regulador del desarrollo es controlar el destino celular, pero no el crecimiento. Las mutaciones en los protooncogenes del desarrollo pueden inducir la formación de tumores en tejidos donde un gen afectado normalmente estimula el crecimiento o en otro tejido donde el gen se ha vuelto activo de forma aberrante.

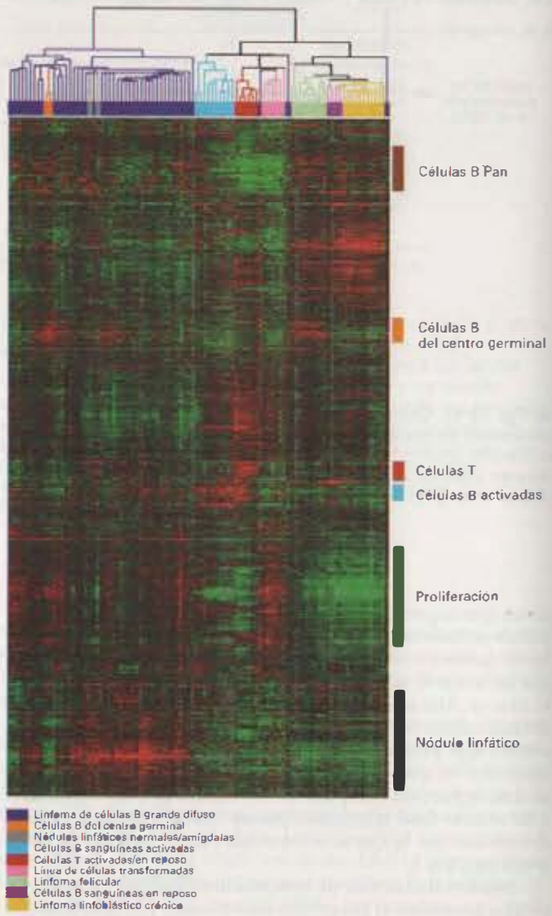
El análisis de los patrones de expresión con micromatrices de DNA puede revelar diferencias sutiles entre las células tumorales

Tradicionalmente, las propiedades de las células tumorales y de las normales se han evaluado mediante tinción y observación con el microscopio. Se pudo determinar el pronóstico de muchos tumores, dentro de ciertos límites, a partir de su histología. Sin embargo, la apariencia de células aisladas limita el contenido de la información y se requieren mejores formas para discernir las propiedades de las células tanto para comprender la tumorigénesis como para arribar a decisiones significativas y acertadas acerca del pronóstico y la terapia.

Como vimos, los estudios genéticos pueden identificar la mutación única iniciadora o las series de mutaciones que causan la transformación de células normales en tumorales, como en el caso del cáncer de colon. Sin embargo, luego de estos eventos iniciales las células de un tumor sufren una catarata de cambios que reflejan la interacción entre los eventos iniciadores y las señales del exterior. Como resultado, las células tumorales pueden volverse bastante diferentes, aun si surgen de la misma mutación o mutaciones iniciadoras. Aunque estas diferencias pueden no reconocerse por el aspecto de las células, pueden detectarse de los patrones celulares de la expresión génica. Los análisis de micromatrices de DNA pueden determinar la expresión de miles de genes simultáneamente, lo que permite definir fenotipos complejos a nivel genético molecular. (Véanse figs. 9-35 y 9-36 para una explicación de esta técnica.)

MEDICINA

El análisis con micromatrices ha sido aplicado al linfoma difuso de célula B grande, una enfermedad marcada por la presencia de linfocitos B anormalmente grandes en todos los nódulos linfáticos. Los pacientes afectados tienen resultados muy variables, por lo que se sospechó durante mucho tiempo que la enfermedad era, de hecho, múltiples enfermedades. El análisis con micromatrices de los linfomas de diferentes pacientes reveló dos grupos diferenciados por sus patrones de expresión génica (fig. 23-13). No se halló un criterio morfológico o visible que pudiera distinguir ambos tipos de tumores. Los pacientes con un tipo de tumor definido por la información de las micromatrices sobrevivieron mucho más que aquellos con el otro tipo. Los linfomas cuya expresión génica es similar a la de los linfocitos B en las etapas iniciales de diferenciación tienen un mejor pronóstico; los linfomas cuya expresión génica es más cercana a la de los linfocitos B más diferenciados tienen uno peor. Es más probable que análisis similares de los patrones de expresión génica, o "sellos", de otros tumores mejoren la clasificación y el diagnóstico, y permitan tomar decisiones informadas acerca de los tratamientos, además de proporcionar una mayor comprensión de las propiedades de las células tumorales. ■



▶ FIGURA EXPERIMENTAL 23-13 Diferencias en los patrones de expresión génica determinadas por análisis de micromatrices pueden distinguir entre linfomas que de otra manera serían similares desde el punto de vista fenotípico. Se extrajeron muestras de mRNA de linfocitos normales en diferentes etapas de diferenciación y de linfocitos malignos obtenidos de pacientes con tres tipos de linfoma. El análisis de micromatrices de DNA del RNA extraído determinó la transcripción de alrededor de 18 000 genes por cada una de las 96 muestras experimentales de linfocitos normales y malignos en relación con una muestra control de referencia. (Véanse figs. 9-35 y 9-36 para una descripción del análisis de micromatrices.) El diagrama que se muestra aquí incluye la información de un conjunto selecto de genes cuya expresión difiere de la mayoría en las diversas muestras del linfocito. El color rojo intenso indica que las células experimentales transcriben el gen representado por un punto de DNA particular, a un nivel mucho mayor que las células de referencia; el verde intenso señala lo opuesto. El negro indica los niveles de transcripción similares en las muestras comparadas; el gris indica información perdida o excluida. Cada columna vertical contiene la información para una muestra particular de linfocitos (véase la tonalidad de muestra). Cada hilera horizontal contiene información para un gen individual. Los genes se agruparon de acuerdo con sus patrones similares de hibridación. Por ejemplo, los genes indicados por la barra verde sobre la derecha son activos en las células en proliferación, como las células cultivadas transformadas (barra rosa en la parte superior) o células del linfoma (barra violeta en la parte superior). Las diferentes muestras de células (a lo largo de la parte superior del diagrama) también fueron agrupadas de acuerdo con sus patrones de expresión similares. El dendrograma resultante (tres diagramas) indica que las muestras de pacientes con un linfoma difuso de células B grande (muestras violetas) se encuentran dentro de dos grupos. Un grupo es similar a los linfocitos B relativamente no diferenciados en los centros germinales (muestras anaranjadas); el otro es similar a las células B más diferenciadas (muestras rojo violáceas). (De A. A. Alizadeh et al., 2000, *Nature* 403:505.)

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 23.2

Bases genéticas del cáncer

- Las mutaciones dominantes con ganancia de función en los protooncogenes y las mutaciones recesivas con pérdida de función en los genes supresores de tumores son oncogénicas.
- Entre las proteínas codificadas por los protooncogenes se encuentran proteínas de señalización promotoras del crecimiento y sus receptores, proteínas de transducción de señales, factores de transcripción y proteínas apoptóticas (véase fig. 23-8).
- Una mutación activadora de uno de los dos alelos de un protooncogén lo convierte a un oncogén. Esto puede ocurrir por una mutación puntual, una amplificación génica y una translocalización génica.
- El primer oncogén humano en ser identificado codifica una forma constitutiva activa de Ras, una proteína transductora de señales. Este oncogén fue aislado de un carcinoma vesical humano (véase fig. 23-4).
- Los retrovirus de acción lenta pueden causar cáncer al integrarse cerca de un protooncogén de forma tal que la transcripción del gen celular se activa de manera continua e inapropiada.
- Los genes supresores de tumores codifican proteínas que directa o indirectamente enlentecen la progresión a través del ciclo celular, las proteínas de puntos de control que detienen el ciclo celular, componentes de vías de señalización inhibidoras del crecimiento, proteínas que estimulan la apoptosis y enzimas reparadoras del DNA.
- El primer gen supresor de tumores en ser reconocido, el *RB*, se encuentra mutado en el retinoblastoma y algunos otros tumores.
- La herencia de un único alelo mutante de *Rb* incrementa enormemente la probabilidad de que se desarrolle un tipo específico de cáncer, como es el caso de muchos otros genes supresores de tumores (p. ej., *APC* y *BRCA1*).
- En los individuos nacidos heterocigotos para un gen supresor de tumores, una célula somática puede sufrir la pérdida de la heterocigosidad por recombinación mitótica, segregación errónea de cromosomas, mutaciones o deleciones (véase fig. 23-11).
- Muchos genes que regulan los procesos normales de desarrollo codifican proteínas que participan en diversas vías de señalización (véase fig. 23-12). Sus funciones normales para regular dónde y cuándo se produce el crecimiento se reflejan en la característica de los tumores que surgen cuando los genes están mutados.
- El análisis con micromatrices de DNA puede identificar diferencias en la expresión génica entre tipos de células tumorales que son indistinguibles por criterios tradicionales. Algunas células tumorales parecen estar relacionadas con tipos específicos de células normales en ciertos estadios del desarrollo sobre la base de similitudes en sus patrones de expresión.

23.3 Mutaciones oncogénicas en las proteínas que promueven la proliferación celular

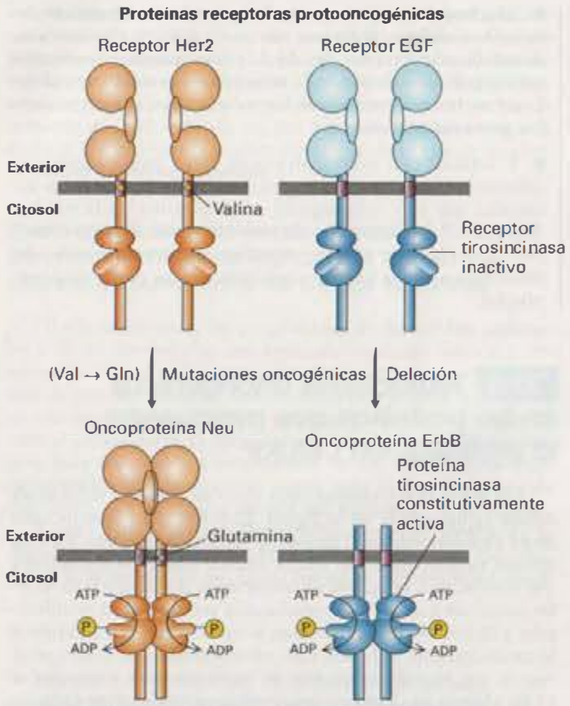
Los genes que codifican cada clase de proteína reguladora celular representada en la figura 23-8 han sido identificados como protooncogenes o genes supresores de tumores. En esta sección examinamos con mayor detalle cómo las mutaciones que conducen a la actividad constitutiva no regulada de ciertas proteínas o en su sobreproducción promueven la proliferación y la transformación celular, y contribuyen por lo tanto a la carcinogénesis. En cada caso vemos cómo una célula poco común que ha sufrido un tipo de mutación muy particular se torna abundante debido a una proliferación descontrolada.

Los receptores oncogénicos pueden promover la proliferación en ausencia de factores de crecimiento externos

Aunque la oncogénesis teóricamente puede surgir de mutaciones en los genes que codifican moléculas de señalización promotoras del crecimiento, esto sucede rara vez. De hecho, sólo se ha descubierto uno *sis* de tales oncogenes que se suscitan naturalmente. El oncogén *sis*, que codifica un tipo de factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), puede autoestimular en forma aberrante la proliferación de células que normalmente expresan el receptor PDGF.

En cambio, los oncogenes que codifican receptores de superficie celular que transducen las señales que estimulan el crecimiento fueron asociados con varios tipos de cáncer. Los receptores para muchos de estos factores de crecimiento tienen una actividad intrínseca de proteintirosincinasa en sus dominios citosólicos, una actividad que está latente hasta que se activa. La fijación del ligando a los dominios externos de estos receptores **tirosincinasas (RTK)** conduce a su dimerización y activación de su actividad cinasa e inicia una vía intracelular de señalización que en última instancia promueve la proliferación.

En algunos casos, una mutación puntual modifica un RTK normal en uno que dimeriza y que está activo constitutivamente en ausencia del ligando. Por ejemplo, una única mutación puntal convierte el receptor normal Her2 en la oncoproteína Neu, que es un iniciador de ciertos cánceres murinos (fig. 23-14, *izquierda*). De manera similar, los tumores humanos denominados neoplasia endocrina múltiple tipo 2 producen un receptor del factor neurotrófico deriva-



▲ Fig. 23-14. Efectos de las mutaciones oncogénicas en los protooncogenes que codifican los receptores de superficie celular. *Izquierda:* Una mutación que altera un único aminoácido (valina por glutamina) en la región transmembrana del receptor Her2 produce la dimerización del receptor, aun en ausencia del ligando normal relacionado con EGF, transformando la oncoproteína Neu en una cinasa constitutivamente activa. *Derecha:* Una deleción que causa la pérdida del dominio extracelular de unión al ligando en el receptor EGF conduce, por razones desconocidas, a una activación constitutiva de la actividad cinasa de la oncoproteína ErbB resultante.

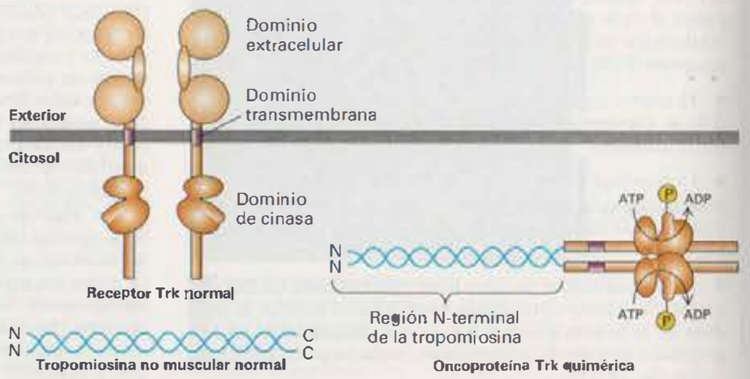
do del Glia (GDNF) dimérico y activo constitutivamente, que es el resultado de una mutación puntual en el dominio extracelular. En otros casos, la deleción de gran parte del dominio extracelular de unión al ligando produce un receptor oncogénico constitutivamente activo. Por ejemplo, la deleción del dominio extracelular del receptor EGF normal lo convierte en la oncoproteína ErbB dimérica (fig. 23-14, *derecha*).

Mutaciones que conducen a la superproducción de un RTK normal también pueden ser oncogénicas. Por ejemplo, muchos cánceres de mama humanos sobreproducen un receptor Her2 normal. Como resultado, las células son estimuladas a proliferar en presencia de concentraciones muy bajas de EGF y hormonas relacionadas, concentraciones demasiado bajas para estimular la proliferación de células normales.

MEDICINA

Un anticuerpo monoclonal específico para Her2 ha sido un tratamiento nuevo notablemente exitoso para el subgrupo de cánceres de mama que sobreproducen Her2. La inyección intravenosa de anticuerpo contra Her2, reconoce Her2 y hace que sea internalizado, matando selectivamente las células cancerosas sin efecto aparente sobre las células mamarias (y otras) normales que expresan niveles moderados de Her2. ▮

Otro mecanismo para la generación de un receptor oncogénico se ilustra mediante el oncogén humano *trk*, que fue aislado de un carcinoma de colon. Este oncogén codifica una proteína quimérica como resultado de una translocación cromosómica que reemplazó las secuencias que codifican la mayor parte del dominio extracelular del receptor Trk normal por las secuencias que codifican los aminoácidos N-terminales de la tropomiosina no muscular (fig. 23-15). El segmento de tropomiosina translocado puede mediar la dimerización del receptor quimérico Trk mediante la formación de una estructura espiralada y conducir a la activación de los dominios cinasa en ausencia de ligando. La proteína Trk normal es un receptor tirosincinasa de la superficie celular que une un factor de crecimiento nervioso (cap. 22). Por el contrario, la oncoproteína Trk activa constitutivamente se localiza en el citosol, dado que se ha eliminado la secuencia señal N-terminal que la dirige hacia la membrana.

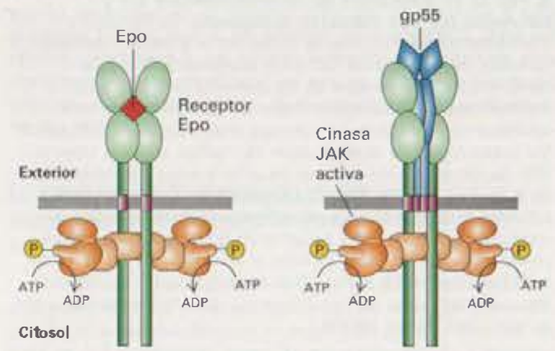


▶ Fig. 23-15. Estructuras de dominio de la tropomiosina normal, el receptor Trk normal y la oncoproteína Trk quimérica. Una translocación cromosómica lleva al reemplazo de la mayor parte del dominio extracelular de la proteína Trk humana normal, una tirosincinasa receptora, con el dominio N-terminal de la tropomiosina no muscular. Dimerizada por el segmento de tropomiosina, la oncoproteincinasa Trk es constitutivamente activa. A diferencia de la Trk normal, que se localiza en la membrana plasmática, la oncoproteína Trk se encuentra en el citosol. (Véase F. Coulier et al., 1989, *Mol. Cell Biol.* 9:15.)

Los activadores virales de los receptores del factor de crecimiento actúan como oncoproteínas

Los virus emplean sus propios trucos para causar cáncer, presumiblemente para incrementar la producción de virus de las células cancerosas infectadas. Por ejemplo, un retrovirus denominado SFFV (virus productor de focos esplénicos) induce eritroleucemia (un tumor de progenitores eritroides) en ratones adultos mediante la manipulación de una señal de desarrollo normal. La proliferación, supervivencia y diferenciación de los progenitores eritroides en glóbulos rojos maduros requiere critropoyetina (Epo) y el receptor Epo correspondiente (véase fig. 14-7). Una glucoproteína de la envoltura mutante SFFV, denominada gp55, es responsable de los efectos oncogénicos de los virus. Si bien gp55 no puede actuar como una proteína de envoltura retroviral normal en la gemación e infección viral, ha adquirido la notable capacidad para unirse a los receptores Epo en la misma célula y activarlos (fig. 23-16). Al estimular la proliferación de progenitores eritroides en forma inapropiada y continua, gp55 induce la formación excesiva de eritrocitos. Los clones malignos de progenitores eritroides emergen varias semanas después de la infección por SFFV como resultado de mutaciones posteriores en estas células con proliferación aberrante.

Otro ejemplo de este fenómeno lo proporciona el papilomavirus humano (HPV), un virus de DNA que provoca verrugas genitales. Una proteína de papilomavirus designada E5, que contiene sólo 44 aminoácidos, atraviesa la membrana plasmática y forma un dímero o trímero. Cada polipéptido E5 puede formar un complejo estable con un receptor endógeno para PDGF, aglomerando así dos o más receptores PDGF dentro del plano de la membrana plasmática. Esto imita la dimerización del receptor mediada por hormonas y provoca la activación sostenida del receptor y finalmente la transformación celular.



▲ Fig. 23-16. Activación del receptor de eritropoyetina (Epo) mediante el ligando natural, Epo, o una oncoproteína viral. La unión de Epo dimeriza el receptor e induce la formación de eritrocitos a partir de células progenitoras eritroides. Normalmente los cánceres tienen lugar cuando las células progenitoras infectadas con el virus formador de focos esplénicos producen el receptor Epo y la gp55 viral, ambos localizados en la membrana plasmática. Los dominios transmembrana de gp55 dimérico se unen específicamente al receptor Epo, dimerizando y activando el receptor en ausencia de Epo. (Véase S. N. Constantinescu et al., 1999 *EMBO J.* 18:3334.)

Muchos oncogenes codifican proteínas transductoras de señales activas constitutivamente

Numerosos oncogenes derivan de protooncogenes cuyas proteínas codificadas ayudan a transducir señales de un receptor activado hacia un blanco celular. Describimos varios ejemplos de estos oncogenes; cada uno se expresa en muchos tipos de células tumorales.

Componentes de la vía de Ras. Entre los oncogenes mejor estudiados en esta categoría están los genes *ras*D, los primeros oncogenes no virales reconocidos. Una mutación puntual que sustituye glicina en la posición 12 por cualquier aminoácido en la secuencia de Ras puede convertir la proteína normal en una oncoproteína activa constitutivamente. Esta mutación simple reduce la actividad de GTPasa de la proteína y mantiene así a Ras en el estado activo unido a GTP. Muchos tipos de tumores humanos, incluidos los carcinomas de vejiga, colon, mama, piel y pulmón, además de neuroblastomas y leucemias, producen oncoproteínas Ras activas constitutivamente.

Como vimos en el capítulo 14, Ras es un componente clave para transducir señales desde receptores activados hacia una cascada de proteincinasas. En la primera parte de esta vía, una señal proveniente de un RTK activado se transporta mediante dos proteínas adaptadoras hacia Ras, convirtiéndola en la forma activa unida al GTP (véase fig. 14-16). En la segunda parte de la vía, la Ras activada transmite la señal a través de dos proteincinasas intermediarias a MAP cinasa. Luego la MAP cinasa activada fosforila una cierta cantidad de factores de transcripción que inducen la síntesis de importantes proteínas específicas del ciclo celular y la diferenciación (véase fig. 14-21). Las mutaciones activadoras de Ras establecen un cortocircuito en la primera parte de esta vía y hace innecesaria la activación corriente arriba desencadenada por la fijación del ligando al receptor.

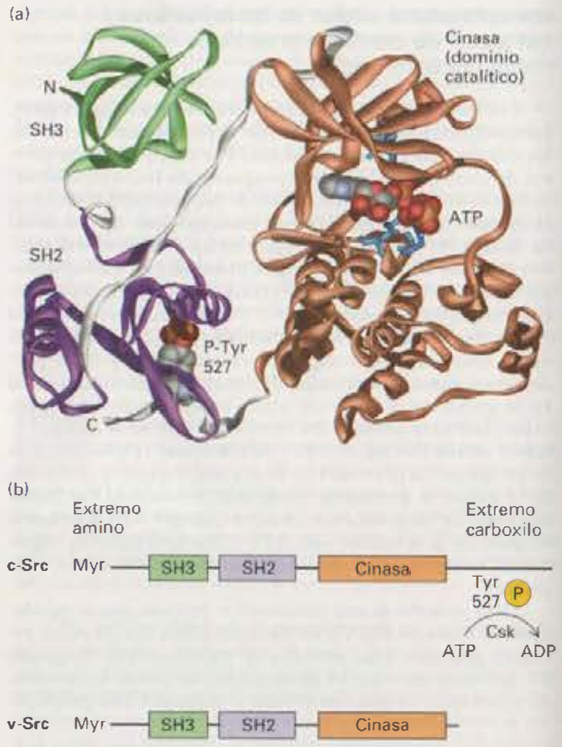
También se han identificado los oncogenes que codifican otros componentes alterados de la vía RTK-Ras-MAP-cinasa. Un ejemplo que se encuentra en ciertos retrovirus murinos transformantes codifica una Raf serina/treonina cinasa activa en forma constitutiva, que se halla en la vía entre la Ras y la MAP cinasa. Otro es el oncogén *crk* (pronunciado "crack") hallado en el virus del sarcoma aviario, que produce ciertos tumores cuando se expresa en exceso. La proteína Crk, que contiene un dominio SH2 y dos dominios SH3, es similar a la proteína adaptadora GRB2 que actúa entre una RTK y una Ras (véase fig. 14-16). Los dominios SH2 y SH3 en GRB2 y otras proteínas adaptadoras median la formación de agregados proteicos específicos que normalmente sirven como unidades señalizadoras para los procesos celulares. La sobreproducción de Crk conduce a la formación de agregados proteicos que transducen señales inapropiadamente, promoviendo así las capacidades

metastásicas y de crecimiento características de las células cancerígenas.

La activación constitutiva de Ras puede surgir de una mutación recesiva con pérdida de función en una proteína aceleradora de GTPasa (GAP). La función normal de GAP es acelerar la hidrólisis de GTP y la conversión de la RAS activa unida a GTP, a Ras inactiva unida a GDP (véase fig. 3-29). La pérdida de GAP conduce a la activación sostenida de las proteínas transductoras de señales corriente abajo de Ras. Por ejemplo, la neurofibromatosis, un tumor benigno de las células de la vaina que rodea los nervios, es causada por la pérdida de ambos alelos *NF1*, que codifican una proteína de tipo GAP. Los individuos con neurofibromatosis heredaron un único alelo mutante *NF1*; una mutación somática posterior en el otro alelo conduce a la formación de neurofibromas. Por lo tanto, *NF1*, al igual que *RB*, es un gen supresor de tumores, y la neurofibromatosis, al igual que el retinoblastoma hereditario, se hereda como un rasgo autosómico dominante.

Proteincinasa Src. Diversos oncogenes, algunos identificados inicialmente en tumores humanos, otros en retrovirus transformantes, codifican proteincinasas citosólicas que normalmente transducen señales en diversas vías de señalización intracelulares. En efecto, el primer oncogén descubierto, el v-*src* del retrovirus del sarcoma de Rous, codifica una proteintirosincinasa activa constitutivamente. Al menos ocho protooncogenes de mamífero codifican una familia de tirosincinasas no receptoras relacionadas con la proteína v-Src. Además de un dominio catalítico, estas cinasas contienen dominios de interacción proteína-proteína SH2 y SH3. La actividad cinasa de la Src celular y proteínas relacionadas normalmente es anulada mediante fosforilación del residuo de tirosina en la posición 527, que se encuentra a seis residuos del extremo C-terminal (fig. 23-17a, b). La hidrólisis de la fosfotirosina 527 por una enzima fosfatasa específica normalmente activa la c-Src. La tirosina 527 a menudo está ausente o alterada en las oncoproteínas Src que tienen una actividad cinasa constitutiva; es decir que no requieren activación por una fosfatasa. En el virus del sarcoma de Rous, por ejemplo, el gen *src* ha sufrido una deleción que elimina los 18 aminoácidos C-terminal de c-Src; en consecuencia, la v-Src cinasa está activa constitutivamente (fig. 23-17b). La fosforilación de proteínas diana por oncoproteínas Src aberrantes contribuye a la proliferación anormal de muchos tipos de células.

Proteincinasa Abl. Otro oncogén que codifica una proteincinasa no receptora citosólica es generado por una translocación cromosómica que fusiona una parte del gen c-*abl*, que codifica una tirosincinasa, con parte del gen *bcr*, cuya función se desconoce. La proteína c-Abl normal promueve la ramificación de filamentos de actina y la extensión de procesos celulares, por lo que puede actuar principalmente para controlar el citoesqueleto y la forma celular. Las oncoproteínas quiméricas codificadas por el oncogén *bcr-abl* forman un tetrámero que exhibe actividad Abl cinasa no regulada y continua. (Esto es similar a la dimerización y activación de la oncoproteína Trk quimérica que se muestra en la figura 23-15.) Bcr-Abl puede fosforilar y por lo tanto activar muchas proteínas intracelulares de transducción de señales; al menos algunas de estas proteínas no son sustratos normales de Abl. Por ejemplo, Bcr-Abl puede activar la cinasa JAK2 y el factor de transcripción STAT5,



▲ Fig. 23-17. Estructura de las tirosincinasas Src y activación por una mutación oncogénica. (a) Estructura tridimensional de Hck, una de varias Src cinasas en mamíferos. La unión de fosfotirosina 527 a los dominios SH2 induce cambios conformacionales en los dominios SH3 y cinasa, distorsionando el sitio activo cinasa de manera tal que esté catalíticamente inactivo. La actividad cinasa de la proteína celular Src activa mediante la eliminación del fosfato sobre la tirosina 527. (b) Estructura del dominio de c-Src y v-Src. La fosforilación de la tirosina 527 por Csk, otra tirosincinasa celular, inactiva la actividad cinasa de Src. La oncoproteina transforma v-Src codificada por el virus del sarcoma de Rous carece de los 18 aminoácidos C-terminales incluida la tirosina 527 y por lo tanto es constitutivamente activa. [Parte (a) de F. Sicheri et al., 1997, *Nature* 385:602. Véase también T. Pawson, 1997, *Nature* 385:582, y W. Xu et al., 1997, *Nature* 385:595.]

normalmente activados mediante la unión de factores de crecimiento (p. ej., eritropoyetina) a los receptores de la superficie celular (véase fig. 14-12).

La translocación cromosómica que forma *bcr-abl* genera el *cromosoma Filadelfia*, descubierto en 1960 (véase fig. 10-29). La identidad de los genes involucrados se descubrió mediante la clonación molecular de la "unión" de translocación relevante, lo que permitió el estudio bioquímico de la oncoproteína Bcr-Abl. Si esta translocalización tiene lugar en una célula hematopoyética en la médula ósea, la actividad del oncogén quimérico *bcr-abl* da como resultado la fase inicial de la leucemia mieloide crónica humana (LMC), caracterizada por una expansión en la cantidad de glóbulos blancos. Una segunda mutación en una célula que porta *bcr-abl* (p. ej., en *p53*) conduce a la leucemia aguda, que a menudo produce la muerte del paciente. La translocación del cromosoma LMC fue sólo la primera de una larga serie de translocaciones distintivas o identificativas conectadas a formas particulares de leucemia. Cada una representa una oportunidad para un mayor entendimiento de la enfermedad y para nuevas terapias. En el caso de la LMC, ya se ha dado ese segundo paso hacia una terapia exitosa.

MEDICINA

Tras una búsqueda minuciosa se identificó un inhibidor de la cinasa Abl llamado STI-571 (Gleevec®) como posible tratamiento para la LMC a comienzos de la década de 1990. El STI-571 es altamente letal para las células de la LMC mientras que tiene piedad por las células normales. Luego de que pruebas clínicas mostraron que el STI-571 es notablemente eficaz para tratar la LMC a pesar de algunos efectos colaterales, en 2001 la FDA aprobó el primer fármaco dirigido a una proteína de transducción de señales única para células tumorales. La STI 571 inhibe otras diversas tirosincinasas implicadas en diferentes cánceres y asimismo ha sido exitosa en las pruebas para tratar estas enfermedades. Existen 96 tirosincinasas codificadas en el genoma humano, por lo que los fármacos relacionados con Gleevec pueden ser útiles para controlar las actividades de todas estas proteínas. ∎

La historia de Gleevec ilustra cómo la genética –el descubrimiento del cromosoma Filadelfia y el oncogén crítico que crea, junto con la bioquímica, el descubrimiento de la acción molecular de la proteína Abl– puede conducir a una poderosa terapia nueva. En general, cada diferencia entre las células cancerosas y las células normales proporciona una oportunidad para identificar un agente específico que mate sólo las células cancerosas o al menos detenga su crecimiento descontrolado.

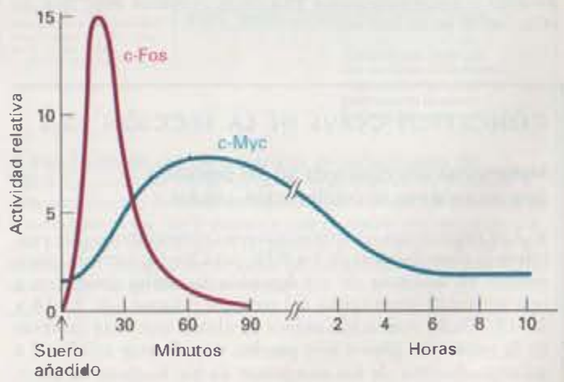
La producción inapropiada de factores nucleares de transcripción puede inducir la transformación

Mediante un mecanismo u otro, las proteínas codificadas por todos los protooncogenes y los oncogenes producen finalmente cambios en la expresión génica. Esto se refleja en las diferencias entre las proporciones de diferentes mRNA en células proliferativas y de células quiescentes, al igual que las diferencias similares entre las células tumorales y sus contrapartes normales. Como se analiza en la última sección, ahora es posible medir esas diferencias en la expresión de miles de genes con las micromatrices de DNA (véase fig. 23-13).

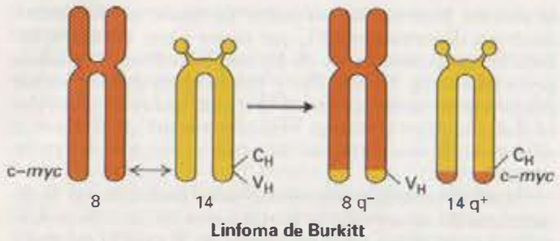
Puesto que el efecto más directo sobre la expresión génica es ejercido por los factores de transcripción, no sorprende que muchos oncogenes codifiquen factores de transcripción. Dos ejemplos son *jun* y *fos*, identificados inicialmente en retrovirus transformantes y que luego se encontró que se sobreexpresaban en algunos tumores humanos. Los protooncogenes *c-jun* y *c-fos* codifican proteínas que a veces se asocian para formar un factor de transcripción heterodimérico, denominado AP1, que se une a una secuencia hallada en los promotores y en los amplificadores de muchos genes (véase fig. 11-24). Fos y Jun también pueden actuar independientemente activando la transcripción de genes clave que codifican proteínas estimulantes del crecimiento o inhibiendo la transcripción de genes represores del crecimiento.

Muchas proteínas protooncogénicas nucleares son inducidas cuando se estimula la proliferación de las células normales, lo que indica su papel directo en el control del crecimiento. Por ejemplo, el tratamiento con PDGF de células 3T3 quiescentes induce un incremento de ≈50 veces en la producción de c-Fos y c-Myc, los productos normales de los protooncogenes *fos* y *myc*. Existe al principio un aumento transitorio de c-Fos y luego un incremento más prolongado de c-Myc (fig. 23-18). Los niveles de ambas proteínas declinan en el curso de pocas horas, un efecto regulador que puede, en las células normales, ayudar a evitar el cáncer. Como se trató en el capítulo 21, c-Fos y c-Myc estimulan la transcripción de genes que codifican proteínas que promueven la progresión a través de la fase G_1 del ciclo celular y la transición de G_1 a S. En los tumores, las formas oncogénicas de éste y otros factores de transcripción suelen expresarse en niveles elevados y no regulados.

En células normales, los mRNA de c-Fos y c-Myc y las proteínas que codifican son intrínsecamente inestables, lo que conduce a su rápida pérdida después de la inducción de los genes. Algunos de los cambios que convierten *c-fos* de un gen normal en un oncogén involucran deleciones genéticas de secuencias que tornan más corta la vida media del mRNA y de la proteína Fos. La conversión del protoon-



▲ FIGURA EXPERIMENTAL 23-18 La adición de suero a las células en reposo 3T3 produce un incremento notable en la actividad de dos productos protooncogénicos: c-Fos y c-Myc. El suero contiene factores como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) que estimula el crecimiento de células en reposo. Uno de los primeros efectos de los factores de crecimiento es inducir la expresión de *c-fos* y *c-myc*, cuyas proteínas codificadas son factores de transcripción. (Véase M. E. Greenberg y E. B. Ziff, 1984, *Nature* 311:433.)



▲ Fig. 23-19. Translocación cromosómica en el linfoma de Burkitt. Como resultado de una translocación entre los cromosomas 8 y 14, el gen c-*myc* se ubica adyacente al gen para parte de la cadena pesada de los anticuerpos (C_H), lo que conduce a la sobreproducción del factor de transcripción Myc en los linfocitos y por lo tanto a su evolución hacia un linfoma.

cogén *c-myc* en un oncogén puede ocurrir mediante varios mecanismos diferentes. En las células del tumor humano conocido como *linfoma de Burkitt*, el gen *c-myc* es translocado a un sitio cercano a los genes de las cadenas pesadas de los anticuerpos, normalmente activos en los glóbulos blancos productores de anticuerpos (fig. 23-19). La translocación de *c-myc* es una aberración rara de los reordenamientos normales de DNA que tienen lugar durante la maduración de las células productoras de anticuerpos. El gen *myc* translocado, regulado por el amplificador génico del anticuerpo, se expresa continuamente, haciendo que la célula se transforme en cancerosa. La amplificación localizada de un segmento de DNA que contiene el gen *myc*, que ocurre en varios tumores humanos, también causa una producción inapropiadamente alta de la proteína Myc que de otra forma sería normal.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 23.3

Mutaciones oncogénicas en las proteínas que promueven la proliferación celular

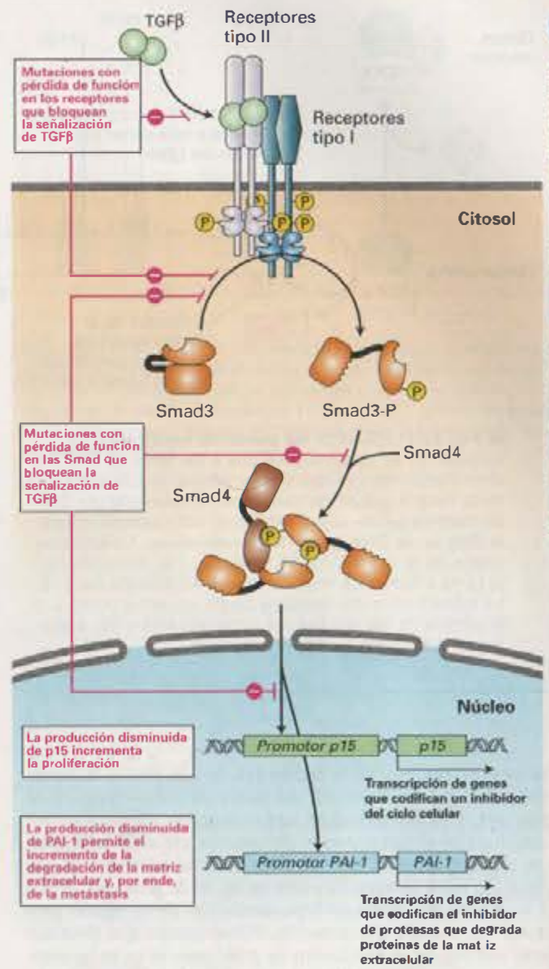
- Las mutaciones o translocaciones cromosómicas que permiten la dimerización de los RTK para los factores de crecimiento en ausencia de sus ligandos normales conducen a una actividad constitutiva del receptor (véanse figs. 23-14 y 23-15). Dicha activación induce en última instancia cambios en la expresión génica que pueden transformar células. La sobreproducción de los receptores de los factores de crecimiento puede tener el mismo efecto y conducir a la proliferación celular anormal.
- Ciertas proteínas codificadas por virus pueden unirse a receptores de factores de crecimiento de la célula huésped y activarlos estimulando la proliferación celular en ausencia de señales normales.
- La mayoría de las células tumorales producen formas constitutivamente activas de una o más proteínas de transducción de señales intracelulares, dando lugar a señales estimuladoras del crecimiento en ausencia de factores de crecimiento normales.
- Una única mutación puntual en Ras, una proteína transductora clave en muchas vías de señalización, reduce su actividad GTPasa, manteniéndola en un estado activado.
- La actividad de Src, una proteintirosincinasa transductora de señales, normalmente es regulada por fosforilación reversible y desfosforilación de un residuo de tirosina cerca del C-terminal (véase fig. 23-17). La actividad no regulada de las oncoproteínas Src que carecen de esta tirosina promueve la proliferación anormal de muchas células.
- El cromosoma Filadelfia es el resultado de una translocación cromosómica que produce el oncogén quimérico *bcr-abl*. La actividad Abl cinasa no regulada de la oncoproteína Bcr-Abl es responsable de este efecto oncogénico. Un inhibidor de Abl cinasa (Gleevec) es eficaz en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC) y puede funcionar en contra de otros cánceres.
- La producción inapropiada de factores de transcripción nucleares como Fos, Jun y Myc, puede inducir la transformación. En las células del linfoma de Burkitt, *c-myc* es translocado cerca de un gen de anticuerpo, lo que conduce a la sobreproducción de c-Myc (véase fig. 23-19).

23.4 Mutaciones que provocan pérdida de inhibición del crecimiento y controles del ciclo celular

El crecimiento y el desarrollo normales dependen de un balance finamente ajustado y bien regulado entre las vías de estimulación de la proliferación e inhibición del crecimiento. Las mutaciones que alteran este balance pueden conducir al cáncer. La mayoría de las mutaciones abordadas en la sección anterior causan una actividad inapropiada de las vías de estimulación del crecimiento. Tan críticas son las mutaciones que disminuyen la actividad de las vías inhibidoras del crecimiento cuando se necesitan.

Por ejemplo, el factor transformador de crecimiento beta (TGFβ), a pesar de su nombre, inhibe la proliferación de muchos tipos celulares, incluida la mayoría de las células epiteliales y del sistema inmune. La unión de TGFβ a su receptor induce la activación de los factores de transcripción Smad citosólicos (véase fig. 14-2). Después de ser translocados al núcleo, *Smad* pueden estimular la expresión del gen codificador de p15, que hace que las células se detengan en G_1. La señalización de TGFβ también promueve la expresión de genes que codifican proteínas de la matriz extracelular y el inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1), que reduce la degradación de la matriz catalizada por plasmina. Así, las mutaciones con pérdida de función en cualquiera de los receptores de TGFβ o en Smad estimulan la proliferación celular y probablemente contribuyan a la invasividad y metástasis de células tumorales (fig. 23-20). De hecho, se hallaron estas mutaciones en diversos cánceres humanos, como describimos en el capítulo 14.

Los mecanismos complejos para regular el ciclo celular eucarionte son blancos primordiales para las mutaciones oncogénicas. Tanto las proteínas de acción positiva como negativa controlan con precisión la entrada de las células en el ciclo celular y su progresión en él, que consiste en cuatro fases principales: G_1, S, G_2 y mitosis (véase fig. 21-2). Este sistema regulatorio asegura la coordinación apropiada de la proliferación celular durante G_1 y G_2, la síntesis de DNA durante la fase S y la segregación cromosómica y la división celular durante la mitosis. Además, las células que han sufrido daños continuos en su DNA suelen detenerse antes de que éste se replique. Tal detención da tiempo para que se repare el daño del DNA; alternativamente, las células detenidas son dirigidas a que cometan suicidio a través de la muerte celular programada. Todo el sistema de control del ciclo celular funciona para evitar que las células se tornen cancerosas. Como podría esperarse, las mutaciones en este sistema a menudo conducen al desarrollo anormal o contribuyen al cáncer.



▲ Fig. 23-20. Efecto de la pérdida de señalización de TGFβ. La unión del TGFβ, un factor anticrecimiento, produce la activación de los factores de transcripción Smad. En ausencia de la señalización de TGFβ debido a una mutación del receptor o a una mutación SMAD, se incrementa la proliferación celular y la invasión de la matriz extracelular de los alrededores (Véase X. Hua et al., 1998, *Genes & Develop.* 12:3084.)

Las mutaciones que producen el pasaje desregulado desde la fase G_1 a la S son oncogénicas

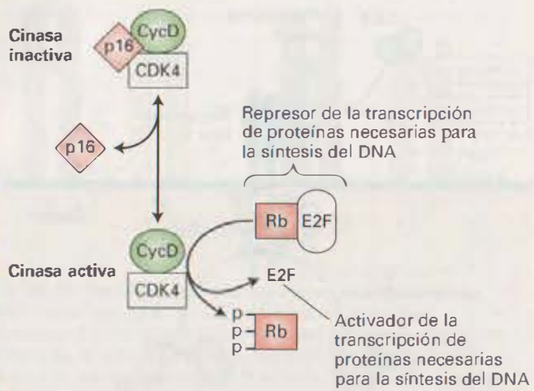
Una vez que una célula progresa más allá de un cierto punto en la fase G_1 tardía, denominado **punto de restricción**, se ve irreversiblemente obligada a entrar en la fase S y replicar su DNA (véase fig. 21-28). Las ciclinas tipo D, las cinasas dependientes de ciclina (CDK) y la proteína Rb son elementos del sistema de control que regulan el pasaje a través del punto de restricción.

La expresión de los genes de ciclina de tipo D es inducida por muchos factores de crecimiento extracelulares, o mitógenos. Estas ciclinas se ensamblan con sus contrapartidas CDK4 y CDK6 para generar complejos ciclina-CDK catalíticamente activos, cuya actividad de cinasa estimula la progresión más allá del punto de restricción. La caída de mitógeno antes del pasaje por el punto de restricción produce la acumulación de p16. Al igual que p15, ya mencionado, p16 se une específicamente a CDK4 y CDK6, inhibe así su actividad de cinasa y causa la detención en G_1. En circunstancias normales, la fosforilación de la proteína Rb se inicia a mitad de camino a través de G_1 por los complejos activos ciclina D-CDK4 y ciclina D-CDK6. La fosforilación de Rb es completada por otros complejos ciclina-CDK en el G_1 tardío, lo que permite la activación de los factores de transcripción E2F, que estimulan la transcripción de genes que codifican proteínas necesarias para la síntesis de DNA. La fosforilación completa de Rb compromete irreversiblemente a la célula a la síntesis de DNA. La mayoría de los tumores contienen una mutación oncogénica que produce la sobreproducción o pérdida de uno de los componentes de esta vía de manera tal que las células son impulsadas hacia la fase S en ausencia de las señales de proliferación extracelular apropiadas (fig. 23-21).

Los niveles elevados de ciclina D1, por ejemplo, se encuentran en muchos cánceres humanos. En ciertos tumores de linfocitos B productores de anticuerpos, por ejemplo, el gen de *ciclina D1* es translocado de manera tal que su transcripción está bajo control de un amplificador de gen-anticuerpo, lo que causa la producción elevada de ciclina D1 a través de todo el ciclo celular, sin tomar en cuenta las señales extracelulares. (Este fenómeno es análogo a la translocación *c-myc* en las células del linfoma de Burkitt ya explicada.) Que la ciclina D1 puede funcionar como una oncoproteína quedó demostrado por estudios con ratones transgénicos en los cuales el gen *ciclina D1* se colocó bajo control de un amplificador específico para células de los conductos mamarios. Al principio las células de los conductos experimentaron una hiperproliferación y finalmente provocaron la aparición de tumores de mama en estos ratones. La amplificación del gen de *ciclina D1* y la superproducción concomitante de la proteína ciclina D1 son comunes en el cáncer de mama humano.

Las proteínas que funcionan como inhibidores de ciclina-CDK cumplen una función importante en la regulación del ciclo celular (cap. 12). En particular, las mutaciones con pérdida de función que evitan que p16 inhiba la actividad de la ciclina D-CDK4/6 cinasa son comunes en varios cánceres humanos. Como la figura 23-21 deja claro, la pérdida de p16 imi-

TEMAS EN MULTIMEDIA
Animación general: Control del ciclo celular



▲ **Fig. 23-21. Control del punto de restricción.** La proteína Rb no fosforilada se une a los factores de transcripción denominados colectivamente E2F y por lo tanto evita la activación transcripcional mediada por E2F de muchos genes cuyos productos son necesarios para la síntesis de DNA (p. ej., DNA polimerasa). La actividad cinasa de la ciclina D-CDK4 fosforila a Rb, activando por lo tanto a E2F; esta actividad cinasa es inhibida por p16. La sobreproducción de ciclina D, un regulador positivo, o la pérdida de los reguladores negativos p16 y Rb, suelen tener lugar en los cánceres humanos.

ta la superproducción de la ciclina D1, lo que lleva a la hiperfosforilación y a la liberación del factor de transcripción E2F activo. Así, p16 normalmente actúa como un supresor de tumores. Aunque el gen supresor de tumores *p16* está delecionado en algunos cánceres humanos, en otros la secuencia *p16* es normal. En estos últimos cánceres (p. ej., el de pulmón), el gen *p16* es inactivado mediante hipermetilación de su región promotora, que evita la transcripción. No se conoce qué promueve este cambio en la metilación de *p16*, pero evita la producción de esta importante proteína de control del ciclo celular.

Ya hemos visto que las mutaciones inactivantes en ambos alelos *Rb* produce el retinoblastoma infantil, un tipo de cáncer bastante raro. Sin embargo, la pérdida de función del gen *Rb* también se halla en cánceres más comunes que surgen tarde en la vida (p. ej., carcinomas de pulmón, mama y vejiga). Es más probable que estos tejidos, a diferencia del tejido retiniano, produzcan otras proteínas cuya función es redundante con la de Rb y, por lo tanto, la pérdida de Rb no es tan crítica. Se sabe que varias proteínas están relacionadas en estructura y probablemente en función con Rb. Además de las mutaciones inactivadoras, la función de Rb puede eliminarse mediante la unión de una proteína inhibidora, designada E7, codificada por el papilomavirus humano (HPV). La codificación de esta proteína es otro mecanismo dañino viral para crear tejidos productores de virus.

Los tumores con mutaciones inactivantes en Rb suelen producir niveles normales de ciclina D1 y proteínas p16 funcionales. Por el contrario, las células tumorales que sobreproducen ciclina D1 o perdieron la función de p16 retienen la Rb de tipo silvestre. De este modo, la pérdida de sólo un componente de este sistema regulador para controlar el pasaje a través del punto de restricción es todo lo necesario para subvertir el control de proliferación normal y preparar el terreno para el cáncer.

Las mutaciones con pérdida de función que afectan a las proteínas remodeladoras de la cromatina contribuyen a los tumores

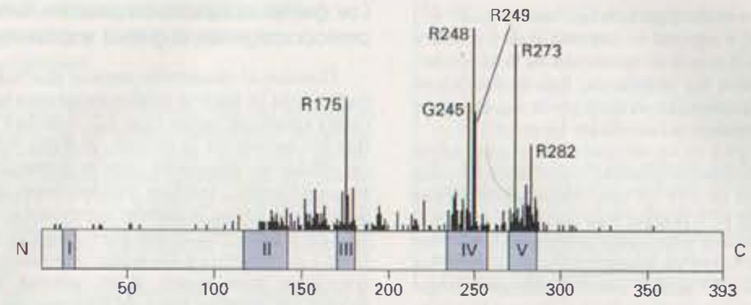
Las mutaciones pueden socavar el control del crecimiento al inactivar los genes supresores de tumores, pero estos genes también pueden silenciarse por medio de estructuras represivas de la cromatina. En los últimos años la importancia de las maquinarias remodeladoras de la cromatina, como el complejo Swi/Snf, en el control transcripcional se ha vuelto cada vez más clara. Estos grandes y diversos complejos multiproteicos tienen en sus centros una helicasa dependiente de ATP y a menudo controlan la acetilación de histonas. Al ocasionar cambios en las posiciones o estructuras de los nucleosomas, los complejos Swi/Snf hacen los genes accesibles o inaccesibles a las proteínas de unión al DNA que controlan la transcripción (cap. 11). Si un gen es normalmente activado o reprimido por los cambios de cromatina mediados por Swi/Snf, las mutaciones en los genes que codifican las proteínas Swi o Snf producirán cambios en la expresión del gen diana.

Nuestro conocimiento de los genes diana regulados por Swi/Snf y otros complejos similares es incompleto, pero el objetivo evidentemente incluye algunos genes reguladores de la proliferación. Por ejemplo, los estudios con ratones transgénicos sugieren que Swi/Snf cumple un papel en reprimir los genes *E2F*, inhibiendo así la progresión a través del ciclo celular. Las relaciones entre los genes que codifican las proteínas Swi/Snf y el gen *E2F* se descubrieron en los experimentos genéticos con moscas. Se diseñaron moscas transgénicas para sobreexpresar *E2F*, que produjeron defectos de proliferación moderados. Una búsqueda de mutaciones que incrementa el efecto de la sobreexpresión en estas moscas identificó tres componentes del complejo Swi/Snf. Que la pérdida de función de estos genes incremente los efectos proliferativos de E2F indica que Swi/Snf normalmente neutraliza la función del factor de transcripción E2F. Por lo tanto, la pérdida de función del Swi/Snf, al igual que la pérdida de función de Rb, puede conducir al crecimiento excesivo y tal vez al cáncer. En efecto, en los ratones, la proteína Rb recluta proteínas Swi/Snf para reprimir la transcripción del gen *E2F*.

Con los complejos remodeladores de la cromatina involucrados en tantos casos de control transcripcional, se espera que los complejos Swi/Snf y otros similares estén relacionados con muchos cánceres. En los seres humanos, por ejemplo, se encontraron mutaciones en *Brg1*, que codifica la subunidad catalítica de Swi/Snf, en los tumores de próstata, pulmón y mama. Se descubrió además que los componentes del complejo Swi/Snf también se asocian con BRCA1, una proteína nuclear que ayuda a suprimir el cáncer de mama humano. BRCA-1 se vincula con la reparación de las rupturas del DNA bicatenario (tema tratado en la sección final de este capítulo) y en el control de la transcripción, de manera que el complejo Swi/Snf puede asistir a BRCA-1 en estas funciones.

La pérdida de p53 anula el punto de control del DNA dañado

Un rasgo crítico del control del ciclo celular es el punto de control G_1, que evita que las células con DNA dañado entren

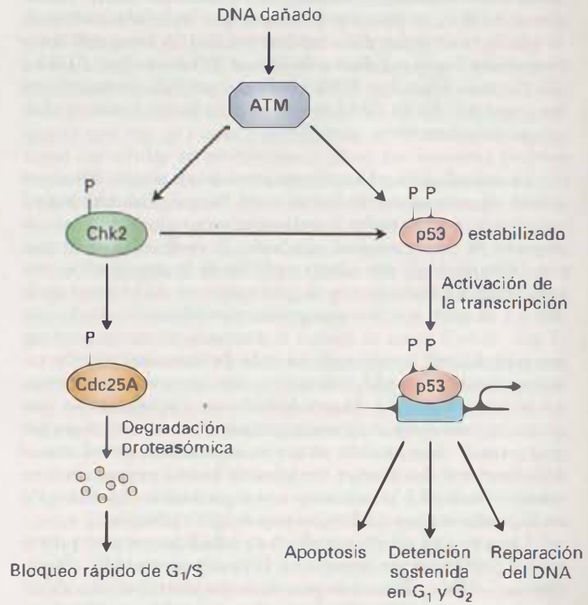


▲ **FIGURA EXPERIMENTAL 23-22 Las mutaciones en tumores humanos que inactivan la función de la proteína p53 están muy concentradas en pocos residuos.** Los segmentos marcados representan secuencias en el gen *p53* muy conservadas en la evolución. Las líneas verticales representan la frecuencia a la cual se encuentran las mutaciones puntuales en cada residuo en diversos tumores humanos. Estas mutaciones se agrupan en regiones conservadas II-V. Las localizaciones de las mutaciones puntuales que se presentan más a menudo se marcan en la secuencia proteica. R: arginina; G: glicina. (Adaptado de C. C. Harris. 1993, *Science* 262:1980, y L. Ko y C. Prives, 1996, *Genes & Develop.* 10:1054.)

en la fase S (véase fig. 21-32, paso 4a). La proteína p53 es un sensor esencial para la regulación del punto de control que detiene células con DNA dañado en G_1. Aunque p53 cumple varias funciones, su capacidad para activar la transcripción de ciertos genes es más significativa para su función de supresión de tumores. Virtualmente todas las mutaciones p53 eliminan su capacidad para unirse a secuencias específicas de DNA y activar la expresión génica. Las mutaciones en el gen supresor de tumores *p53* tienen lugar en más del 50% de los cánceres humanos (fig. 23-22).

Las células con p53 funcional se detienen en G_1 cuando se las expone a radiación prejudicial para el DNA, lo que no ocurre en las células que carecen de p53 funcional. A diferencia de otras proteínas del ciclo celular, p53 está presente en niveles muy bajos en las células normales por su extrema inestabilidad y su rápida degradación. Los ratones carentes de p53 son viables y saludables, a excepción de una predisposición a desarrollar múltiples tipos de tumores. La expresión del gen *p53* se intensifica sólo en situaciones estresantes, como irradiación con rayos ultravioleta o gamma, calor y bajos niveles de oxígeno. El daño del DNA por la radiación gamma o por otros factores causantes de estrés de alguna manera lleva a la activación de ATM, una serina cinasa que fosforila y por ende estabiliza el p53 y conduce a un incremento importante de su concentración (fig. 23-23). El p53 estabilizado activa la expresión del gen que codifica $p21^{CIP}$, que se une e inhibe los complejos de ciclina-CDK de G_1. En consecuencia, las células con DNA dañado se detienen en G_1, dándole tiempo a la reparación del DNA por medio de mecanismos tratados más adelante. Si la reparación es exitosa, los niveles de p53 y $p21^{CIP}$ descenderán y las células pueden avanzar hacia la fase S.

Cuando el punto de control p53 G_1 no funciona de manera apropiada, el DNA dañado puede replicarse, perpetuar las mutaciones y los reordenamientos del DNA que se pasan a una célula hija, con lo que contribuye a la transformación en células de tipo metastásicas. Además, $p21^{CIP}$ y otras dos proteínas inducidas por la p53 inhiben el complejo ciclina B-CDK1 necesario para entrar en la mitosis,



▲ **Fig. 23-23. Detención en G_1 en respuesta al daño del DNA.** La actividad cinasa de ATM se activa en respuesta al daño del DNA debido a diversas agresiones (p. ej., radiación UV, calor). Luego la ATM activada desencadena dos vías que conducen a la detención en G_1. La fosforilación de p53 lo estabiliza y permite la expresión activada por p53 de genes que codifican proteínas que (1) producen la detención en G_1 y en algunos casos en G_2, (2) estimulan la apoptosis, o (3) participan en la reparación del DNA. En la otra vía la Chk2 fosforilada fosforila a su vez a Cdc25A, marcándola para la degradación y bloqueando su función en la activación de CDK2. Para más detalles véase el texto.

haciendo que las células se detengan en G_2 (véase fig. 21-32, paso 4a). Además, p53 reprime la expresión de los genes que codifican la ciclina B y la topoisomerasa II, también necesarias para la transición $G_2 \rightarrow$ mitosis. Así, si el DNA se daña luego de su replicación, la detención en G_2 inducida por p53 evita su transmisión a las células hijas.

La forma activa de p53 es un tetrámero de cuatro subunidades idénticas. Una mutación puntual con sentido erróneo en uno de los dos alelos de *p53* en una célula puede anular casi toda la actividad de p53 porque casi todos los oligómeros contendrán al menos una subunidad defectuosa y no pueden funcionar como un factor de transcripción. Por ende, las mutaciones oncogéncias *p53* actúan como dominantes negativos, con mutaciones en un único alelo que causan la pérdida de función. Como se vio en el capítulo 9, las mutaciones dominantes negativas pueden tener lugar en las proteínas cuyas formas activas son multiméricas o cuya función depende de las interacciones con otras proteínas. En cambio, las mutaciones de pérdida de función en otros genes supresores de tumores (p. ej., *RB*) son recesivas porque las proteínas codificadas funcionan como monómeros y la mutación de un único alelo tiene pocas consecuencias funcionales.

En condiciones de estrés, la cinasa ATM también fosforila y por ende activa Chk2, una proteincinasa que fosforila la proteinfosfatasa Cdc25A y la marca para la destrucción mediada por ubicuitina. Esta fosfatasa elimina el fosfato inhibidor en CDK2, un prerrequisito para que las células entren en la fase S. Los niveles disminuidos de Cdc25A bloquean así la progresión hacia y a través de la fase S (véanse figs. 23-23 y 21-32, paso 4b). Las mutaciones con pérdida de función en los genes *ATM* o en *Chk2* tienen en gran parte el mismo efecto que las mutaciones en *p53*.

La actividad de p53 suele mantenerse en niveles bajos por acción de una proteína denominada *Mdm2*. Cuando Mdm2 está unida a p53 inhibe la capacidad activadora de la transcripción de p53 y cataliza la adición de moléculas de ubicuitina, dirigiendo de este modo a p53 hacia la degradación proteasómica. La fosforilación de p53 mediante ATM desplaza la Mdm2 de p53, con su consiguiente estabilización. Dado que el gen *Mdm2* es en sí mismo transcripcionalmente activado por p53, Mdm2 funciona en un ciclo de retroalimentación autorregulatorio con p53, evitando quizás normalmente el exceso de función de p53. El gen *Mdm2* está amplificado en muchos sarcomas y otros tumores humanos que contienen un gen *p53* normal. Aun cuando estas células tumorales producen el p53 funcional, los niveles elevados de Mdm2 reducen la concentración de p53 lo suficiente como para anular la detención en G_1 inducida por p53 en respuesta a la radiación.

La actividad de p53 también es inhibida por una proteína del papilomavirus humano (HPV) denominada E6. Por lo tanto, el HPV codifica tres proteínas que contribuyen a su capacidad para inducir transformaciones estables y mitosis en diversas células cultivadas. Dos de ellas –E6 y E7– se unen e inhiben a los supresores de tumores p53 y Rb respectivamente. Al actuar en conjunto, E6 y E7 son suficientes para inducir la transformación en ausencia de mutaciones en las proteínas reguladoras celulares. La proteína HPV E5, que produce una activación sostenida del receptor PDGF, amplifica la proliferación de las células transformadas.

La actividad de p53 no está limitada a inducir la detención del ciclo celular. Además, este supresor de tumores multipropósito estimula la producción de proteínas proapoptóticas y enzimas de reparación del DNA (véase fig. 23-23).

Los genes apoptóticos pueden funcionar como protooncogenes o genes supresores de tumores

Durante el desarrollo normal muchas células están diseñadas para la muerte celular programada, también conocida como apoptosis (véase cap. 22). Muchas alteraciones, incluidos los errores en la mitosis, el daño del DNA y un exceso de células no necesarias para el desarrollo de un órgano en funcionamiento, también pueden desencadenar la apoptosis. En algunos casos, la muerte parece ser la situación por defecto, con señales requeridas para asegurar la supervivencia celular. Las células pueden recibir instrucciones para vivir e instrucciones para morir, y un sistema regulador complejo integra los diversos tipos de información.

Si las células no se mueren cuando debieran y continúan proliferando, se puede formar un tumor. Por ejemplo, la leucemia linfoblástica crónica (LLC) se produce porque las células sobreviven cuando deberían morir. Las células se acumulan de manera lenta y la mayoría no está dividiéndose activamente, pero no mueren. Estas células tienen translocaciones cromosómicas que activan un gen denominado *bcl2*, que ahora se sabe es un bloqueante crítico de la apoptosis (véase fig. 22-31). La sobreproducción inapropiada resultante de la proteína Bcl-2 evita la apoptosis normal y permite la supervivencia de estas células tumorales. Por lo tanto, los tumores LLC son atribuibles a una falla de la muerte celular. Otra docena de protooncogenes que suelen participar en la regulación negativa de la apoptosis han sido mutados para convertirse en oncogenes. La sobreproducción de sus proteínas codificadas evita la apoptosis aun cuando es necesario detener la proliferación de las células cancerosas.

Por el contrario, los genes cuyos productos proteicos estimulan la apoptosis se comportan como supresores de tumores. Un ejemplo es el gen *PTEN*, tratado en el capítulo 14. La fosfatasa codificada por este gen desfosforila el fosfatidilinositol 3, 4, 5–trifosfato, un segundo mensajero que participa en la activación de la proteincinasa B (véase fig. 14-27). Las células que carecen de fosfatasa PTEN tienen niveles elevados de fosfatidilinositol 3, 4, 5–trifosfato y una proteincinasa B activa, que estimula la supervivencia celular y evita la apoptosis mediante diversas vías. De este modo, PTEN actúa como un supresor de tumores proapoptótico mediante la disminución de los efectos antiapoptóticos de la proteincinasa B.

El gen supresor de tumores proapoptótico más común implicado en los cánceres humanos es *p53*. Entre los genes activados por p53 se encuentran varias proteínas proapoptóticas como Bax (véase fig. 22-32). Cuando la mayoría de las células sufren un gran daño del DNA, la expresión de proteínas proapoptóticas inducida por p53 lleva a su rápida defunción (véase fig. 23-23). Mientras esto puede parecer una respuesta drástica al daño del DNA, evita la proliferación de células que probablemente acumularán múltiples mutaciones.

MEDICINA

Cuando la función de p53 se pierde, la apoptosis no puede inducirse y la acumulación de mutaciones necesarias para el desarrollo del cáncer se vuelve más probable. Los tumores marcados por la pérdida de *p53* u otro gen necesario para la apoptosis son difíciles de tratar con quimioterapia o radioterapia, ya que el daño del DNA resultante no se traslada a la muerte celular programada. ■

La falla del punto de control del ciclo celular también puede conducir a la aneuploidía en las células tumorales

Se ha sabido durante mucho tiempo que las anomalías cromosómicas abundan en las células tumorales. Ya hemos encontrado varios ejemplos de oncogenes que están formados por translocación, amplificación o ambos (p. ej., *c-myc*, *bcr-abl*, *bcl-2* y *ciclina D1*). Otra anomalía cromosómica característica de casi todas las células tumorales es la aneuploidía, la presencia de un número aberrante de cromosomas; por lo general, en exceso.

Las células con una cantidad anormal de cromosomas se forman cuando ciertos puntos de control del ciclo celular son no funcionales. Como se explicó en el capítulo 21, el punto de control del DNA no replicado normalmente evita la entrada en la mitosis salvo que todos los cromosomas hayan replicado completamente su DNA; el punto de control de ensamblaje del huso evita la entrada en la anafase a menos que todos los cromosomas replicados se adhieran apropiadamente al aparato mitótico metafásico; y el punto de control de la segregación cromosómica evita la salida de la mitosis y la citocinesis si los cromosomas se segregan de manera inapropiada (véase fig. 21-32, pasos 1-3). A medida que se avance en la identificación de proteínas que detectan estas irregularidades y median en la detención del ciclo celular, se tornará cada vez más clara la base molecular de los defectos funcionales que conducen a la aneuploidía en las células tumorales.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 23.4

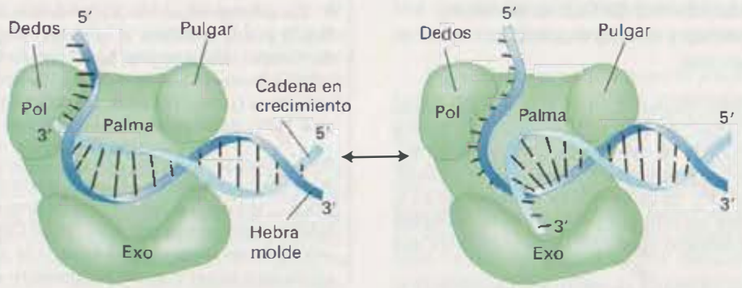
Mutaciones que provocan pérdida de inhibición del crecimiento y controles del ciclo celular

- La pérdida de señalización por TGFβ, un regulador negativo del crecimiento, promueve la proliferación celular y el desarrollo de malignidad (véase fig. 23-20).
- La sobreexpresión del protooncogén que codifica la ciclina D1 o la pérdida de los genes supresores de tumores que codifican p16 y Rb pueden producir el pasaje inapropiado, no regulado a través del punto de restricción en el G_1 tardío. Estas alteraciones son comunes en los tumores humanos.
- La p53 es una proteína supresora de tumores multipropósito que promueve la detención en G_1 y G_2, la apoptosis y la reparación de DNA en respuesta al DNA dañado (véase fig. 23-23). Las mutaciones con pérdida de función en el gen *p53* tienen lugar en más del 50% de los cánceres humanos.
- La sobreproducción de Mdm2, una proteína que normalmente inhibe la actividad de p53, tiene lugar en varios cánceres (p. ej., sarcomas) que expresan la proteína p53 normal.
- El papilomavirus humano (HPV) codifica tres proteínas oncogénicas: E6 (inhibe p53), E7 (inhibe Rb) y E5 (activa el receptor PDGF).
- Las mutaciones que afectan el complejo remodelador de la cromatina, Swi/Snf, que participa en el control de la transcripción, están asociadas con diversos tumores. En algunos casos, la interacción del complejo Swi/Snf con una proteína supresora de tumores nuclear puede tener un efecto represor en la expresión génica.
- La sobreproducción de proteínas antiapoptóticas (p. ej., Bcl-2) puede conducir a la supervivencia celular inapropiada y está asociada con la leucemia linfoblástica crónica y otros cánceres. La pérdida de proteínas que estimulan la apoptosis (p. ej., el factor de transcripción p53 y la fosfatasa PTEN) tiene un efecto oncogénico similar.
- La mayoría de las células tumorales son aneuploides, contienen un número anormal de cromosomas (por lo general, en exceso). La falla de los puntos de control del ciclo celular que normalmente detectan el DNA no replicado, el ensamblaje inapropiado del huso o la segregación errónea de cromosomas permiten el surgimiento de células aneuploides.

23.5 Papel de los carcinógenos y reparación del DNA en el cáncer

En esta sección final veremos cómo aparecen alteraciones en el genoma que pueden conducir al cáncer y cómo las células intentan corregirlas. El daño del DNA es inevitable y surge mediante escisión espontánea de los enlaces químicos en el DNA, mediante reacción con químicos genotóxicos en el ambiente o con ciertos subproductos químicos del metabolismo celular normal, y de agentes ambientales como la radiación ultravioleta e ionizante. Los cambios en la secuencia de DNA también pueden resultar de errores de copiado introducidos por las DNA polimerasas durante la replicación y por errores cometidos cuando la DNA polimerasa intenta leer de un molde dañado. Si la secuencia de DNA cambia, cualquiera que sea su causa o naturaleza, se dejan sin corregir y tanto las células en proliferación como las inactivas podrían acumular tantas mutaciones que ya no podrían funcionar con propiedad. Además, el DNA en las células germinales podría incurrir en demasiadas mutaciones como para que se forme una descendencia viable. Por ello, la prevención de los errores en la secuencia de DNA en todos los tipos de células es importante para la supervivencia y varios mecanismos celulares han evolucionado para reparar el DNA dañado y corregir los errores de secuencia.

Como demostró nuestro análisis previo, las alteraciones en el DNA que conducen a la producción reducida de proteínas supresoras de tumores funcionales y a la producción aumentada o activación no regulada de oncoproteínas son la causa subyacente a la mayoría de los cánceres. Estas mutaciones oncogénicas en genes clave reguladores del crecimiento y del ciclo celular incluyen inserciones, deleciones y mutaciones puntuales, al igual que amplificaciones cromosómicas y translocaciones. La mayoría de las células cancerosas carecen de uno o más sistemas de reparación del DNA, lo cual explicaría la gran cantidad de mutaciones que acumulan. Más aún, algunos mecanismos de reparación introducen por sí mismos errores en la secuencia nucleotídica; dichas reparaciones proclives a los errores también contribuyen a la oncogénesis. La incapacidad de las células tumorales para mantener la integridad genómica lleva a la formación de una población heterogénea de células malignas. Por esta razón, la quimioterapia dirigida hacia un único gen o incluso un grupo de genes probablemente sea ineficaz para aniquilar todas las células malignas. Este problema suma interés por las terapias que interfieren en el abastecimiento de sangre a los tumores o que actúan de otras maneras sobre múltiples tipos de células tumorales.

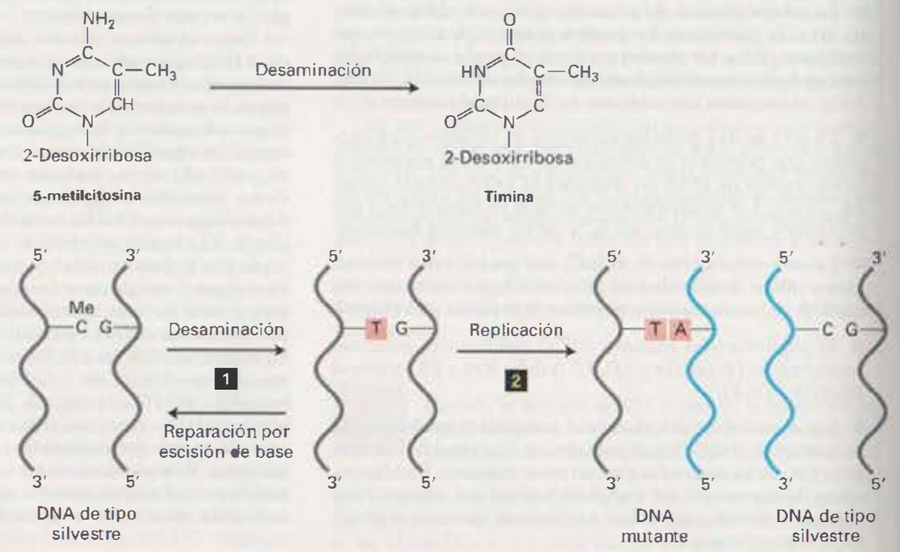


▲ Fig. 23-24. Esquema de la función correctora de las DNA polimerasas. Todas las DNA polimerasas tienen una estructura tridimensional similar, la cual se asemeja a una mano derecha semiabierta. Los "dedos" unen el segmento de hebra simple de la hebra molde y la actividad catalítica (Pol) yace en la unión entre los dedos y la palma. Mientras los nucleótidos correctos se añaden al extremo 3′ de la hebra en crecimiento, este extremo permanece en el sitio de la polimerasa. La incorporación de una base incorrecta en el extremo 3′ causa la disociación del extremo recién formado del dúplex. Como resultado, la polimerasa hace una pausa, y el extremo 3′ de la hebra molde se transfiere al sitio exonucleasa 3′ → 5′ (Exo) a unos 3 nm de distancia, donde se elimina la base mal apareada y probablemente otras bases. El extremo 3′ regresa entonces al sitio polimerásico y se reanuda el proceso de alargamiento. (Adaptado de C. M. Joyce y T. T. Steitz, 1995, *J. Bacteriol.* 177:6321, y S. Bell y T. Baker, 1998, *Cell* 92:295.)

La DNA polimerasa introduce errores de copiado y también los corrige

La primera línea de defensa para prevenir las mutaciones es la propia DNA polimerasa. En ocasiones, cuando las DNA polimerasas replicativas progresan a lo largo de la hebra molde de DNA, se añade un nucleótido incorrecto al extremo 3′ creciente de la hebra molde (véase fig. 4-34). Las DNA polimerasas de *E. coli*, por ejemplo, introducen alrededor de 1 nucleótido incorrecto cada 10^4 nucleótidos polimerizados. Aún así la frecuencia de mutación medida en las células bacterianas es mucho menor: cerca de un error en 10^9 nucleótidos incorporados en hebras en crecimiento. Esta notable precisión se debe en gran medida a la función *correctora* de las DNA polimerasas de *E. coli*.

La corrección (*proofreading*) depende de la actividad de exonucleasa 3′→ 5′ de algunas DNA polimerasas. Cuando durante la síntesis de DNA se incorpora una base incorrecta, la polimerasa se detiene, luego transfiere el extremo 3′ de la cadena en crecimiento al sitio con la actividad de exonucleasa, en donde se elimina la base mal apareada (fig. 23-24). El extremo 3′ se transfiere luego de regreso al sitio con actividad de polimerasa en donde esta región se copia correctamente. Las tres DNA polimerasas de *E. coli* tienen actividad correctora, como la tienen las dos DNA polimerasas, δ y ε, utilizadas para la replicación del DNA en las células animales. Parece probable que esta función correctora sea indispensable para que todas las células eviten las mutaciones excesivas.



▶ Fig. 23-25. Formación de una mutación puntual espontánea por desaminación de 5-metilcitosina (C) para formar timina (T). Si el par de bases T·G resultante no es restaurado al par de bases C·G normal por los mecanismos de escisión-reparación de bases (**1**), conducirá a un cambio permanente en la secuencia tras la replicación del DNA (p. ej., una mutación) (**2**). Luego de un ciclo de replicación, una molécula hija de DNA tendrá el par de bases mutante T·A y el otro tendrá el par de bases C·G de tipo silvestre.

El daño químico al DNA puede conducir a las mutaciones

El DNA está continuamente sujeto a un aluvión de reacciones químicas lesivas; las estimaciones del número de sucesos de daño del DNA en una única célula humana abarcan desde 10^4 a 10^6 por día. Aun si el DNA no estuviera expuesto a químicos lesivos, es inherentemente inestable. Por ejemplo, el enlace que conecta una base de purina a una desoxirribosa es proclive a la hidrólisis y deja un azúcar sin una base adherida. De esta forma, la información codificada se pierde, y esto puede conducir a una mutación durante la replicación del DNA. Las reacciones celulares normales, incluidos el movimiento de electrones a lo largo de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria y la oxidación de lípidos en el peroxisoma, producen diversos químicos que reaccionan con el DNA y lo dañan, incluidos los radicales hidroxilo y superóxido (O_2^-). Esto también puede causar mutaciones como las que conducen al cáncer.

Muchas mutaciones espontáneas son mutaciones puntuales, que implican un cambio en un único par de bases en la secuencia de DNA. Una de las mutaciones puntuales más frecuentes proviene de la *desaminación* de una base citosina (C), que la convierte en una base uracilo (U). Además, la base común modificada 5-metilcitosina forma timina cuando es desaminada. Si estas alteraciones no se corrigen antes de que el DNA se replique, la célula utilizará la hebra que contiene U o T como molde para formar un par de bases U·A o T·A, creando de esta forma un cambio permanente en la secuencia de DNA (fig. 23-25).

Algunos carcinógenos están asociados con cánceres específicos

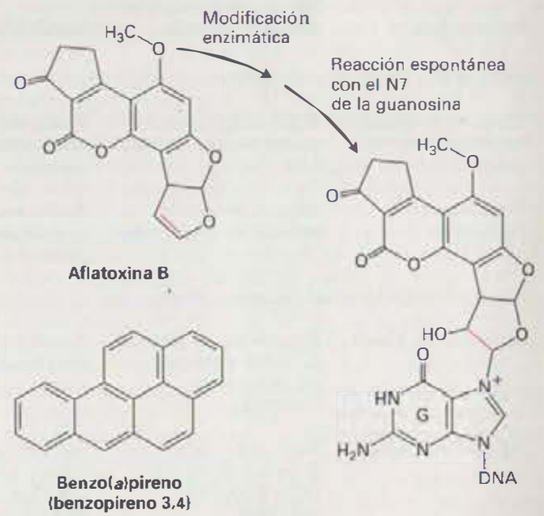
Las sustancias químicas ambientales se asociaron originalmente con el cáncer mediante estudios experimentales con animales. Un experimento clásico consiste en pintar repetidamente el dorso de un ratón con una sustancia de prueba y observar el desarrollo de tumores tanto locales como sistémicos. De igual forma, la capacidad de la radiación ionizante para causar cáncer en el hombre, en especial leucemia, quedó demostrada en forma espectacular por el aumento de la incidencia de leucemia entre los sobrevivientes de las bombas atómicas arrojadas en la segunda guerra mundial y, más recientemente, por la mayor frecuencia de melanoma (cáncer de piel) en las personas expuestas a un exceso de luz solar (radiación UV).

Se puede dar cuenta de la capacidad de los carcinógenos químicos y físicos para inducir cáncer por el daño que provocan en el DNA y por los errores introducidos en éste durante los esfuerzos de las células para reparar este daño. Por ello, todos los carcinógenos también son mutágenos. La evidencia más fuerte de que los carcinógenos actúan como mutágenos proviene de la observación de que el DNA celular alterado por la exposición de las células a los carcinógenos puede cambiar células cultivadas, como las células 3T3, en células de tipo cancerígenas que proliferan con rapidez (véase fig. 23-4). El efecto mutagénico de los carcinógenos es aproximadamente proporcional a su capacidad para transformar células e inducir cáncer en los animales.

Aunque las sustancias identificadas como carcinógenos químicos tienen un espectro estructural muy amplio sin rasgos unificadores, pueden clasificarse en dos categorías generales. Los *carcinógenos de acción directa*, de los cuales hay sólo unos pocos, son principalmente reactivos electrófilos (componentes que buscan y reaccionan con centros de carga negativa en otros compuestos). Al reaccionar químicamente con los átomos de nitrógeno y oxígeno en el DNA, estos componentes pueden modificar las bases en el DNA de manera tal de distorsionar el patrón normal del apareamiento de bases. Si estos nucleótidos modificados no fuesen reparados permitirían la incorporación de un nucleótido incorrecto durante la replicación. Este tipo de carcinógeno incluye sulfonato de etilmetano (EMS), dimetilsulfato (DMS) y mostaza de nitrógeno.

Por el contrario, los *carcinógenos de acción indirecta* son compuestos no reactivos insolubles en agua que pueden actuar como potentes inductores de cáncer sólo después de la introducción de centros electrófilos. En los animales, las *enzimas del citocromo P-450* localizadas en el retículo endoplasmático de las células hepáticas actúan añadiendo centros electrófilos a químicos foráneos, como ciertos insecticidas y fármacos terapéuticos, para solubilizarlos de manera que puedan ser excretados del cuerpo. Pero las enzimas P-450 también pueden convertir en carcinógenos otros químicos inofensivos.

Aunque se cree que los carcinógenos químicos son factores de riesgo para muchos cánceres humanos, sólo en algunos casos se estableció una conexión directa para cánceres específicos, el más importante de los cuales es el cáncer de pulmón. Los estudios epidemiológicos indicaron primero que fumar cigarrillos era la principal causa de cáncer de pulmón, pero por qué esto era así fue poco claro hasta que se descubrió que alrededor del 60% de los cánceres de pulmón humanos contienen mutaciones inactivantes en el gen *p53*. El químico *benzo(a)pireno* (fig. 23-26), hallado en el humo del cigarrillo, sufre la activación metabólica en el hígado para convertirse en un



▲ Fig. 23-26. Dos carcinógenos químicos que causan mutaciones en *p53*. Al igual que todos los carcinógenos de acción indirecta, la benzo(*a*)pireno y la aflatoxina deben sufrir una modificación catalizada por enzimas antes de que puedan reaccionar con el DNA. En la aflatoxina el enlace doble coloreado reacciona con un átomo de oxígeno, lo que le permite reaccionar químicamente con el átomo N-7 de una guanosina en el DNA y formar una molécula voluminosa. Ambos compuestos mutan el gen supresor de tumores *p53* y son factores de riesgo conocidos para el cáncer humano.

potente mutágeno que ocasiona principalmente la conversión de bases de guanina (G) en timina (T), una mutación por transversión. Cuando se aplica a células epiteliales bronquiales, el benzo(*a*)pireno induce mutaciones inactivantes en los codones 175, 248 y 273 del gen *p53*. Estas mismas posiciones son importantes puntos mutacionales calientes en el cáncer de pulmón humano (véase fig. 23-22). Por ese motivo, existe una fuerte correlación entre un carcinógeno químico definido en el humo del cigarrillo y el cáncer humano; es probable que otros químicos en el humo del cigarrillo induzcan mutaciones en otros genes, en igual medida. De manera similar, la exposición al asbesto está claramente relacionada con el mesotelioma, un tipo de cáncer epitelial.

El cáncer de pulmón no es el único cáncer humano importante para el cual se identificó un factor de riesgo. La *aflatoxina*, un metabolito fungoideo hallado en granos mohosos, induce cáncer de hígado (véase fig. 23-26). Luego de modificaciones químicas por enzimas del hígado, la aflatoxina se conecta a residuos G en el DNA e induce transversiones de G a T. También produce una mutación en el gen *p53*. La exposición a otros químicos se correlacionó con cánceres menores. Hay evidencia insuficiente en lo que concierne a factores de riesgo ambientales y dietarios que nos ayudarían a evitar otros cánceres comunes (p. ej., el de mama, el de colon, el de próstata y las leucemias).

La pérdida de sistemas de escisión-reparación del DNA de alta fidelidad puede conducir al cáncer

Además de la corrección, las células tienen otros sistemas de reparación para evitar mutaciones debidas a errores de copiado y exposición a mutágenos. Se estudiaron bien varios sistemas de escisión-reparación del DNA que normalmente funcionan con alto grado de precisión. Estos sistemas fueron dilucidados por primera vez por una combinación de estudios genéticos y bioquímicos en *E. coli*. En los eucariontes, desde las levaduras hasta los seres humanos, existen homólogos de las proteínas bacterianas clave que indican que estos mecanismos libres de errores surgieron al principio de la evolución para proteger la integridad del DNA. Cada uno de estos sistemas funciona en forma similar: se escinde un segmento de la hebra de DNA dañada y la brecha es rellenada por una DNA polimerasa y ligasa empleando la hebra de DNA complementaria como molde.

La pérdida de estos sistemas se correlaciona con un riesgo acrecentado de cáncer. Por ejemplo, las personas que heredaron mutaciones en los genes que codifican una proteína crucial de escisión-reparación o de reparación de aparcamientos incorrectos tienen una probabilidad mucho mayor de padecer ciertos cánceres (cuadro 23-1). Sin una reparación apropiada del DNA, las personas con xerodermia pigmentosa o con cáncer colorrectal hereditario no poliposo tienen una propensión a acumular mutaciones en muchos otros genes, incluidos los que son críticos para controlar el crecimiento y la proliferación celular.

CUADRO 23-1 Algunas enfermedades humanas hereditarias y cánceres asociados con defectos de la reparación del DNA

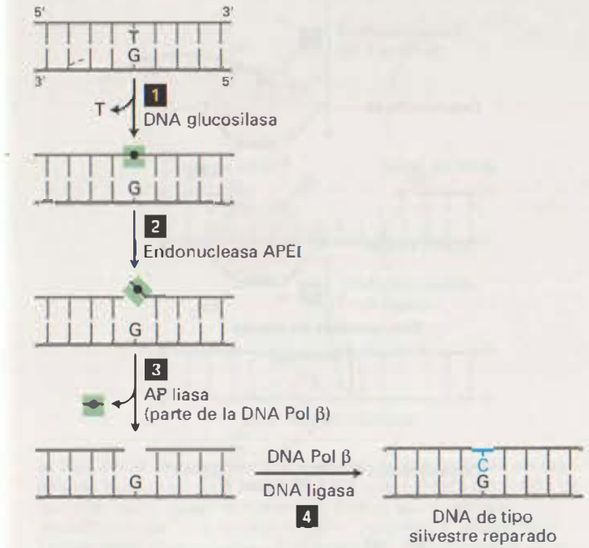
Enfermedad	Sistema de reparación de DNA afectado	Sensibilidad	Susceptibilidad al cáncer	Síntomas
PREVENCIÓN DE MUTACIONES PUNTUALES, INSERCIONES Y DELECIONES				
Cáncer colorrectal hereditario no polipósico	Reparación de mal apareamiento del DNA	Radiación UV, mutágenos químicos	Colon, ovario	Desarrollo temprano de tumores
Xerodermia pigmentosa	Reparación por escisión de nucleótidos	Radiación UV, mutaciones puntuales	Carcinomas de piel, melanomas	Fotosensibilidad dérmica y ocular, queratosis
REPARACIÓN DE ROTURAS DE HEBRA DOBLE				
Síndrome de Bloom	Reparación de roturas de hebra doble por recombinación homóloga	Agentes alquilantes suaves	Carcinomas, leucemias, linfomas	Fotosensibilidad, telangiectasias faciales, alteraciones cromosómicas
Anemia de Fanconi	Reparación de roturas de hebra doble por recombinación homóloga	Agentes que forman enlaces cruzados del DNA, químicos oxidantes reactivos	Leucemia mieloide aguda, carcinomas de células escamosas	Anomalías del desarrollo incluidas infertilidad y deformidades del esqueleto; anemia
Cáncer de mama hereditario, deficiencia en BRCA-1 y BRCA-2	Reparación de roturas de hebra doble por recombinación homóloga		Cáncer de mama y de ovario	Cáncer de mama y de ovario

FUENTES: Modificada de A. Kornberg y T. Baker, 1992, *DNA Replications*.2d ed., W. H. Freeman and Company, p. 788; J. Hoeijmakers, 2001, *Nature* 411:366; y L. Thompson y D. Schild, 2002, *Mutation Res.* 509:49

Ahora nos centramos en una mirada más cercana a algunos de los mecanismos de reparación del DNA, que van desde la reparación de mutaciones de una sola base a la reparación de roturas del DNA a lo largo de ambas hebras. Algunos de ellos efectúan la reparación con gran precisión; otros son menos precisos.

La escisión de bases se utiliza para reparar bases dañadas y apareamientos incorrectos de una sola base

En los seres humanos, el tipo de mutaciones puntuales más común es de una C a una T, que se produce por desaminación del 5-metil C a T (véase fig. 23-25). El problema conceptual con la *reparación por escisión de base* es determinar cuál es la hebra de DNA normal y cual la mutante, y reparar esta última de modo que pueda aparearse de manera adecuada con la hebra normal. Pero puesto que un mal apareamiento G · T se produce casi invariablemente por conversión química de C a U o de 5-metil C a T, el sistema de reparación "sabe" eliminar la T y reemplazarla con una C. El apareamiento incorrecto G · T es reconocido por una DNA glucosilasa que elimina la base de timina fuera de la hélice y luego hidroliza el enlace que la conecta a la cadena de azúcar fosfato del DNA. Tras esta incisión inicial, el segmento de la hebra dañada que contiene la desoxirribosa sin base es escindido por una endonucleasa AP que corta la hebra de DNA cerca del sitio sin base. Una DNA polimerasa sustituye la brecha monocatenaria en la hebra dañada y una DNA ligasa la sella y restablece así el par de bases G · C original.



▲ **Fig. 23-27. Reparación por escisión de bases de un apareamiento G·T incorrecto.** Una DNA glucosilasa específica para el apareamiento G·T incorrecto, que suele formarse por desaminación de residuos de 5-metil C (véase fig. 23-25), elimina la timina fuera de la hélice, luego la corta del esqueleto de azúcar-fosfato del DNA (paso 1) y deja sólo la desoxirribosa (punto negro). Después, una endonucleasa específica para el sitio sin bases resultante corta el esqueleto de DNA (paso 2) y una endonucleasa asociada con la polimerasa β de DNA elimina la desoxirribosa fosfato (paso 3). Luego la brecha es llenada por una DNA Pol β y sellada por una DNA ligasa (paso 4) y se restablece el par de bases G·C original. (Según O. Schärer, 2003, *Angewandte Chemie*, en prensa.)

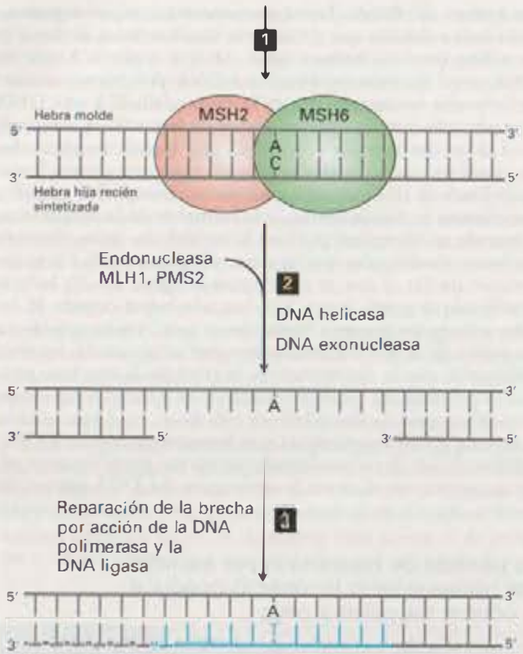
Las células humanas contienen una batería de glucosilasas, cada una de las cuales es específica para un grupo distinto de bases de DNA modificadas químicamente. Por ejemplo, una elimina la 8-oxiguanina, una forma oxidada de guanina, y permite su reemplazo por una G no dañada; otras eliminan las bases modificadas por agentes alquilantes. Mediante un proceso similar al que se muestra en la figura 23-27, la base modificada se corta (paso 1); luego la hebra dañada se repara usando las enzimas "centrales o *core*" representadas en los pasos 2 a 4. Un mecanismo similar repara las lesiones producidas por la *despurinación*, la pérdida de una base guanina o adenina del DNA producto de la hidrólisis del enlace glucosílico entre la desoxirribosa y la base. La despurinación ocurre de manera espontánea y es bastante común en los mamíferos. Si los sitios resultantes sin purina no se reparan generan mutaciones durante la replicación del DNA porque no pueden especificar la base apropiada para el apareamiento.

La pérdida de reparación por escisión del apareamiento incorrecto conduce a cáncer de colon y otros

Otro proceso, también conservado desde la bacteria al hombre, elimina principalmente los apareamientos incorrectos de pares de bases, deleciones e inserciones introducidos accidentalmente por las polimerasas durante la replicación. Al igual que con la reparación por escisión de la base de una T en un apareamiento incorrecto T · G, el problema conceptual con la *reparación por escisión del apareamiento incorrecto* es determinar cuál es la hebra de DNA normal y cuál la mutante y reparar esta última. No se conoce con certeza cómo sucede esto en las células humanas. Se cree que las proteínas que se unen al segmento de DNA incorrectamente apareado distinguen las hebras molde e hija; luego el segmento mal apareado de la hebra hija –la que tiene el error de replicación– se corta y repara para convertirse en el complemento exacto de la hebra molde (fig. 23-28).

El cáncer colorrectal hereditario no polipósico, que surge de una predisposición hereditaria común al cáncer, es el resultado de una mutación con pérdida de función heredada en un alelo del gen *MLH1* o del *MSH2*; las proteínas MSH2 y MLH1 son esenciales para la reparación del apareamiento incorrecto del DNA (véase fig. 23-28). Las células con al menos una copia funcional de cada uno de estos genes exhiben reparación normal. Sin embargo, las células tumorales suelen originarse de células que experimentaron una mutación somática en el segundo alelo y, por lo tanto, perdieron el sistema de reparación de apareamiento incorrecto. Las mutaciones somáticas inactivadoras en estos genes también son comunes en formas no hereditarias de cáncer de colon.

Un gen frecuentemente mutado en los cánceres de colon debido a la ausencia de reparaciones de apareamientos incorrectos codifica el receptor tipo II del TGFβ (véanse fig 23-20 y cap. 14). El gen que codifica este receptor contiene una secuencia de 10 adeninas en una hilera. Como la DNA polimerasa "resbala" durante la replicación, esta secuencia a menudo muta a una secuencia que contiene 9 u 11 adeninas. Si el sistema de reparación de aparcamientos incorrectos no arregla la mutación, el corrimiento del marco de lectura resultante en la secuencia codificadora de proteínas anula la producción de la



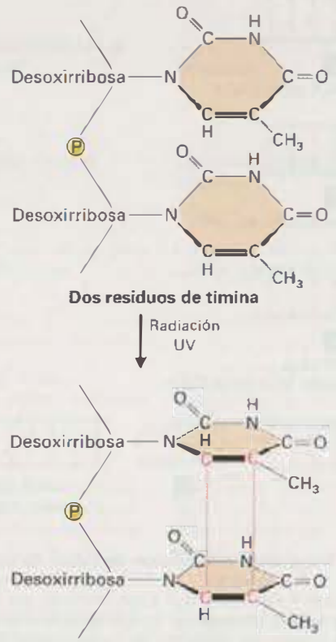
▲ Fig. 23-28. Reparación por escisión de un apareamiento incorrecto de DNA recién replicado en células humanas. Un complejo de proteínas MSH2 y MSH6 se une a un segmento de DNA con apareamiento incorrecto de forma tal de distinguir entre el molde y las hebras hijas recién sintetizadas (paso 1). Esto desencadena la unión de la endonucleasa MLH1, al igual que otras proteínas como PMS2, implicada en la oncogénesis a través de mutaciones por reparación incorrecta, aunque su función específica es poco clara. Una DNA helicasa desenrolla la hélice y corta la hebra hija; después, una exonucleasa elimina varios nucleótidos, incluida la base mal apareada (paso 2). Por último, al igual que con la reparación por escisión de base, la brecha es llenada por una DNA polimerasa (Pol δ, en este caso) y sellada por una DNA ligasa (paso 3).

proteína receptora normal. Como ya se vio, estas mutaciones inactivadoras hacen a las células resistentes a la acción inhibitoria del crecimiento de TGFβ y contribuyen al crecimiento no regulado característico de estos tumores. Este hallazgo certifica la importancia de la reparación de apareamientos incorrectos en la corrección de daños genéticos que de otra forma podrían conducir a una proliferación celular desenfrenada.

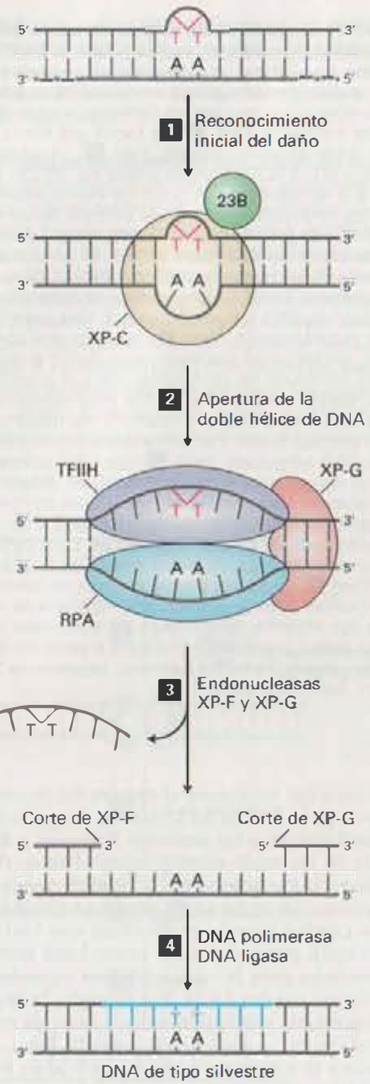
La reparación por escisión de nucleótidos se dilucidó mediante el estudio de la xerodermia pigmentosa, una predisposición hereditaria a los cánceres de piel

Las células utilizan la *reparación por escisión de nucleótidos* para restaurar regiones del DNA que contienen bases químicamente modificadas, a menudo denominadas aductos químicos *(chemical adducts)*, que distorsionan localmente la forma normal del DNA. Una clave de este tipo de reparación es la capacidad de ciertas proteínas para deslizarse a lo largo de la superficie de una molécula de DNA de doble hebra buscando protuberancias u otras irregularidades en la forma de la doble hélice. Por ejemplo, este mecanismo repara los *dímeros de timina (timina-timina)*, un tipo común de daño producido por la luz UV (fig. 23-29); estos dímeros interfieren tanto en la replicación como en la transcripción del DNA. La reparación por escisión de nucleótidos también puede corregir regiones del DNA que contienen bases alteradas por la adhesión de carcinógenos como el benzo(*a*)pireno y la aflatoxina (véase fig. 23-26), que producen transversiones de G a T.

En la figura 23-30 se ilustra cómo el sistema de reparación por escisión de nucleótidos repara el DNA dañado. Unas 30 proteínas están involucradas en este proceso de reparación, la primera de las cuales fue identificada mediante un estudio de defectos en la reparación del DNA en células cultivadas de individuos con xerodermia pigmentosa, una enfermedad hereditaria asociada con una predisposición al cáncer. Los individuos afectados suelen desarrollar cánceres de piel denominados melanomas y carcinomas celulares escamosos si se exponen a los rayos UV de la luz solar. Las células de estos pacientes carecen de un sistema funcional de escisión-reparación de nucleótidos. Las mutaciones en cualquiera de al menos siete genes diferentes, denominadas *XP-A* a *XP-G*, conducen a la inactivación del sistema de reparación y causan la enfermedad; todos producen el mismo fenotipo y tienen idénticas consecuencias.



▲ Fig. 23-29. Formación de dímeros timina-timina. El tipo más común de daño al DNA producido por radiación UV, la formación de dímeros timina-timina, se puede subsanar por un mecanismo de reparación por escisión.



▲ Fig. 23-30. Reparación por escisión de nucleótidos en las células humanas. Una lesión de DNA que provoca distorsión de la doble hélice, como el dímero de timina, es reconocida inicialmente por un complejo del XP-C (proteína *C* xerodermia pigmentosa) y las proteínas 23B (paso 1). Este complejo luego recluta al factor de transcripción TFIIH, cuya subunidad helicasa, impulsada por la hidrólisis de ATP, desenrolla parcialmente la doble hélice. Las proteínas XP-G y RPA se unen entonces al complejo y estabilizan y desenrollan la hélice aún más hasta que se forma una burbuja de ≈25 bases (paso 2). Luego la XP-G (ahora actuando como una endonucleasa) y la XP-F, una segunda endonucleasa, cortan la hebra dañada en puntos separados por 24-32 bases a cada lado de la lesión (paso 3). Esto libera el fragmento de DNA con las bases dañadas, que es degradado a mononucleótidos. Por último la DNA polimerasa llena la brecha exactamente como en la replicación del DNA (cap 4) y la DNA ligasa sella la muesca restante (paso 4). (Adaptado de J. Hoeijmakers, 2001, *Nature* 411:366, y O. Schärer, 2003, *Angewandte Chemie*, en prensa.)

Ahora se comprenden bien los papeles de la mayoría de estas proteínas XP en la reparación por escisión de nucleótidos (véase fig. 23-30).

Notablemente, se necesitan cinco subunidades polipeptídicas de TFIIH, un factor general de transcripción, para la reparación por escisión en las células eucariontes, incluidas dos con homología a las helicasas, como se muestra en la figura 23-30. En la transcripción, la actividad de helicasa de TFIIH desenrolla la hélice de DNA en el sitio de inicio, permitiéndole comenzar a la RNA polimerasa II (véase fig. 11-27). Parece que la naturaleza ha utilizado un ensamblaje proteico similar en dos procesos celulares diferentes que necesitan la actividad helicasa.

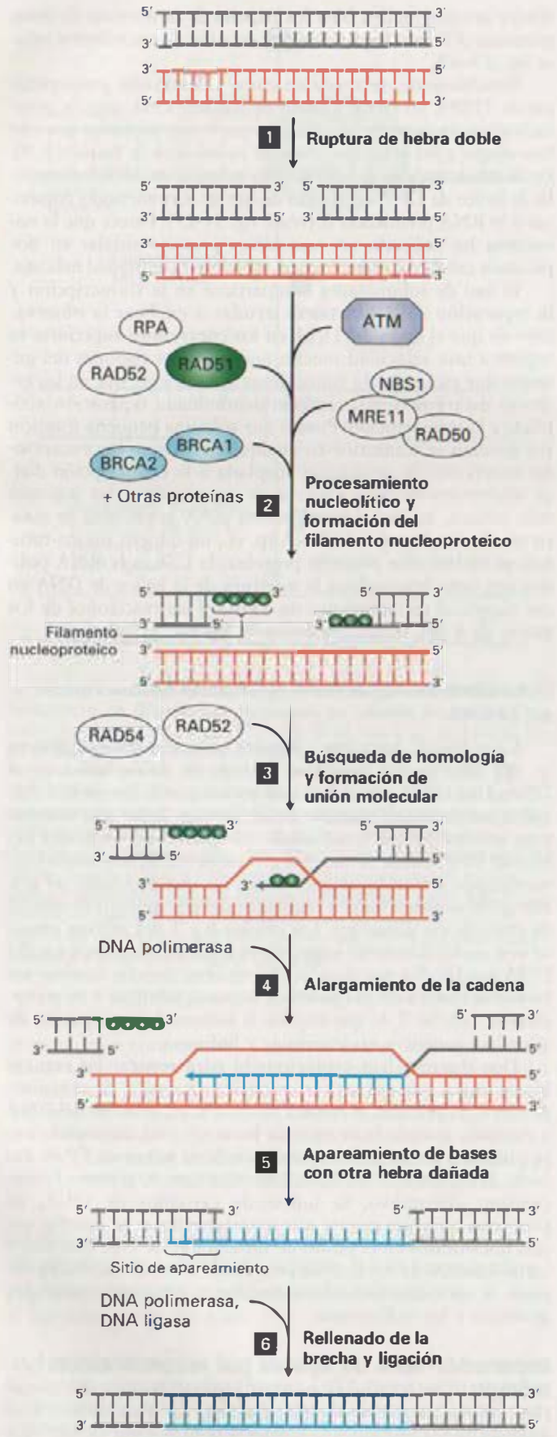
El uso de subunidades compartidas en la transcripción y la reparación del DNA puede ayudar a explicar la observación de que el daño del DNA en los eucariontes superiores se repara a una velocidad mucho mayor en las regiones del genoma que están siendo transcriptas activamente que en las regiones no transcriptas, también denominada reparación acoplada a la transcripción. Puesto que sólo una pequeña fracción del genoma se transcribe en cualquier célula en los eucariontes superiores, la reparación acoplada a la transcripción dirige eficientemente los esfuerzos de reparación a las regiones más críticas. En este sistema, si una RNA polimerasa se atasca en una lesión sobre el DNA (p. ej., un dímero timina-timina), se recluta una pequeña proteína, la CSB, a la RNA polimerasa; esto desencadena la apertura de la hélice de DNA en ese punto, el reclutamiento de TFIIG y las reacciones de los pasos 2 a 4, representados en la figura 23-30.

Dos sistemas reparan las roturas de doble hélice en el DNA

La radiación ionizante y algunas fármacos antineoplásicos (p. ej., bleomicina) producen roturas de doble hélice en el DNA. Una célula que sufrió una rotura particular de la doble hélice contiene casi siempre otras roturas. Estas son lesiones muy severas porque la acción de reconexión de las dobles hebras de DNA puede conducir a grotescos reordenamientos cromosómicos y translocaciones como las que producen un gen híbrido o someten un gen regulador del crecimiento al control de promotores diferentes. Las células B y T del sistema inmune son particularmente susceptibles a los reordenamientos del DNA producidos por roturas bicatenarias creadas durante los reordenamientos de sus genes de inmunoglobulina o de receptores de células T, lo que explica la frecuente participación de estos loci genéticos en leucemias y linfomas.

Dos sistemas han evolucionado para reparar las roturas bicatenarias: *recombinación homóloga* y *unión de extremos de DNA*. El primero se emplea durante la replicación del DNA y después, cuando la cromátida hermana está disponible para utilizarse como patrón para reparar la hebra de DNA dañada; la recombinación homóloga está libre de errores. El mecanismo alternativo, la unión de extremos de DNA, es propenso a errores puesto que invariablemente se pierden varios nucleótidos en el punto de reparación. Se cree que este y otros sistemas de reparación propensos a errores median gran parte, si no todos, los efectos carcinogénicos de las sustancias químicas y las radiaciones.

Reparación libre de errores por recombinación homóloga. Las levaduras pueden reparar roturas bicatenarias inducidas por radiación gamma. El aislamiento y el análisis de los mutantes sensibles a la radiación (*RAD*) que son deficientes en este sistema de reparación por recombi-



◀ Fig. 23-31. Reparación de roturas de hebra doble por recombinación homóloga. Durante la fase S, las células copian cada cromosoma para crear dos cromátidas hermanas idénticas que luego se segregan en células hijas. Los DNA rojos y negros representan secuencias homólogas sobre estas cromátidas hermanas. Paso 1: Se forma una rotura de DNA de hebra doble en las cromátidas. Paso 2: La rotura de la hebra doble activa la ATM cinasa (véase fig. 23-23); esto conduce a la activación de un grupo de exonucleasas que eliminan los nucleótidos en la rotura primero desde el extremo 3′ y luego desde el 5′ de ambas hebras rotas, creando finalmente extremos 3′de hebra simple. En un proceso dependiente de las proteínas BRCA1 y BRCA2, al igual que otras, la proteína Rad51 (óvalos verdes) se polimeriza sobre una hebra simple de DNA con un extremo 3′ libre, para formar un filamento nucleoproteico. Paso 3: Ayudado aún por otras proteínas, un filamento nucleoproteico Rad51 busca la secuencia homóloga de DNA doble sobre la cromátida hermana, luego invade el DNA doble para formar una molécula unida en la cual el extremo 3′ de hebra simple está apareado por sus bases a la hebra complementaria sobre la hebra de DNA homóloga. Paso 4: Las DNA polimerasas replicativas alargan este extremo 3′ del DNA dañado (hebra verde), utilizando como molde las secuencias complementarias en el segmento de DNA homólogo no dañado. Paso 5: A continuación este extremo 3′ reparado del DNA dañado se aparea con el extremo 3′ de hebra simple de la otra hebra dañada. Paso 6: Cualquier brecha restante es llenada por una DNA polimerasa y ligasa (verde claro), regenerando una doble hélice de tipo silvestre en la cual se ha regenerado un segmento entero (verde claro y oscuro) a partir del segmento homólogo sobre la cromátida hermana. (Adaptado de D. van Gant et al., 2001, *Nature Rev. Genet.* 2:196.)

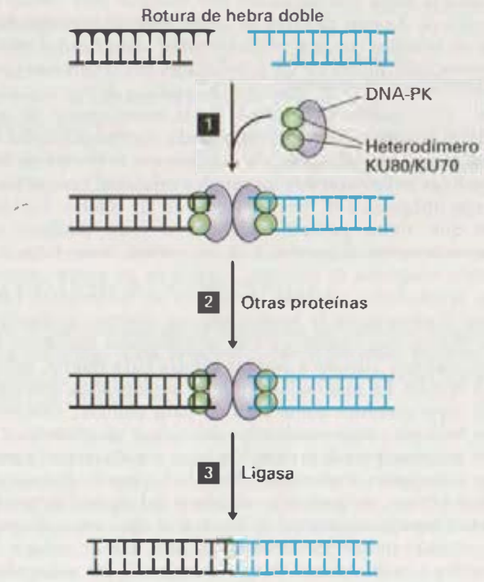
nación homóloga facilitaron el estudio del proceso. Casi todas las proteínas Rad de las levaduras tienen homólogos en el genoma humano, y las proteínas humanas y de levaduras funcionan de un modo esencialmente idéntico (fig. 23-31). En un momento se pensó que la recombinación homóloga era un proceso de reparación menor en las células humanas. Esto cambió cuando se encontró que varios cánceres humanos están potenciados por mutaciones hereditarias en genes esenciales para la reparación por recombinación homóloga (véase cuadro 23-1). Por ejemplo, la gran mayoría de las mujeres con susceptibilidad al cáncer de mama tienen una mutación en un alelo de los genes BCRA-1 o BCRA-2. La pérdida o la inactivación del segundo alelo inhibe la vía de reparación por recombinación homóloga y por lo tanto tiende a inducir cáncer en las células epiteliales mamarias u ováricas.

La reparación de una brecha de doble hélice por recombinación homóloga implica reacciones entre tres moléculas de DNA: los dos extremos de DNA y las hebras de DNA intactas de la cromátida hermana (véase fig. 23-31). En este proceso, los DNA de hebra simple con extremos 3′ se forman de los extremos de los DNA rotos y luego se cubren con la proteína Rad51. Un filamento nucleoproteico Rad51 realiza una búsqueda de la secuencia dual de DNA en la cromátida hermana. Luego la DNA polimerasa alarga este extremo 3′ (verde en la fig. 23-31) utilizando como molde la hebra complementaria en el DNA homólogo. Cuando la hebra individual está lo suficientemente larga, se aparea por sus bases con el extremo 3′ de hebra simple

del otro DNA roto, y la DNA polimerasa y la DNA ligasa llenan las brechas. Este proceso regenera una doble hélice de tipo silvestre con la secuencia correcta y en general no se induce ninguna mutación durante la reparación por recombinación homóloga.

Reparación propensa a errores par unión de los extremos. En los organismos multicelulares, el mecanismo predominante para reparar roturas bicatenarias implica reconectar los extremos no homólogos de dos moléculas de DNA. Aun si los fragmentos de DNA unidos provienen del mismo cromosoma, el proceso de reparación lleva a la pérdida de varios pares de bases en el punto de unión (fig. 23-32). La formación de tal deleción posiblemente mutagénica es un ejemplo de cómo la reparación del daño del DNA puede introducir mutaciones.

Puesto que el movimiento del DNA dentro del núcleo denso en proteínas es prácticamente mínimo, los extremos correctos casi siempre se reconectan, aunque con la pérdida de pares de bases. Sin embargo, en ocasiones los extremos rotos



▲ Fig. 23-32. Reparación de roturas de hebra doble mediante la unión de extremos. En general, se confrontan secuencias nucleotídicas que no se yuxtapusieron en el DNA intacto. Estos extremos de DNA suelen pertenecer al mismo locus cromosómico y cuando se conectan se pierden varios pares de bases. En ocasiones, se unen accidentalmente los extremos de cromosomas diferentes. Un complejo de dos proteínas, Ku y una proteincinasa dependiente de DNA, se une a los extremos de una rotura de la cadena de hebra doble (1). Después de la formación de una sinapsis, los extremos son procesados aún más mediante nucleasas, lo que lleva a la eliminación de unas cuantas bases (2) y las dos moléculas bicatenarias se ligan entre sí (3). Como consecuencia, la rotura de hebra doble queda reparada, pero varios pares de bases en el sitio del corte se han perdido. (Adaptado de G. Chu, 1997, *J. Biol. Chem.* 272:24097; M. Lieber et al., 1997, *Curr. Opin. Genet. Devel.* 7:99; y D. van Gant et al., 2001, *Nature Rev. Genet.* 2:196.)

de diferentes cromosomas se conectan y se produce la translocación de pedazos de DNA de un cromosoma a otro. Como vimos, tales translocaciones pueden generar oncogenes quiméricos o colocar un protooncogén junto a un promotor de otro gen y, por lo tanto, bajo el control inapropiado de éste. Los efectos devastadores de las roturas de doble hélice las convierten en los "cortes más despiadados de todos", parafraseando a Shakespeare en *Julio César*.

La expresión de la telomerasa contribuye a la inmortalización de las células cancerosas

Los telómeros, los extremos físicos de los cromosomas lineales, consisten en disposiciones en tándem de una secuencia corta de DNA, TTAGGG en los vertebrados. Los telómeros proporcionan la solución al problema del final de la replicación: la incapacidad de las DNA polimerasas para replicar la totalidad del extremo de una molécula de DNA de doble hebra. La *telomerasa*, una transcriptasa inversa que contiene una hebra molde de RNA, añade repeticiones TTAGGG a los extremos de los cromosomas para alargar o mantener las regiones de 5 a 20 kb que decoran los extremos de los cromosomas humanos (véase fig. 10-34) Las células de la línea germinal y las células somáticas en rápida división, (p. ej. las células madre) producen telomerasa, pero la mayoría de las células somáticas humanas carecen de ella. Como resultado, sus telómeros se acortan con cada ciclo celular. La pérdida completa de telómeros conduce a fusiones de cromosomas en un extremo y otro y a la muerte celular. El acortamiento extenso de telómeros se detecta como un tipo de daño del DNA, con la consecuente estabilización y activación de la proteína p53, lo que lleva a la apoptosis desencadenada por p53.

La mayoría de las células tumorales, a pesar de su rápida velocidad de proliferación, supera este destino expresando telomerasa. Muchos investigadores creen que la expresión de telomerasa es esencial para que una célula tumoral se torne inmortal, y se sugirieron inhibidores específicos de telomerasa como agentes terapéuticos contra el cáncer. La introducción de transgenes productores de telomerasa en células humanas cultivadas que carecen de la enzima puede extender la duración de su tiempo de vida en más de 20 duplicaciones mientras mantiene la longitud del telómero. Fue sorprendente el hallazgo inicial de que los ratones homocigóticos para una deleción de la subunidad de RNA del gen de la telomerasa son viables y fértiles. Sin embargo, después de cuatro a seis generaciones los defectos comenzaron a aparecer en los ratones carentes de telomerasa a medida que sus telómeros muy largos (40-60 kb) se volvieron significativamente más cortos. Los defectos incluyeron reducción de tejidos que requieren altos índices de división celular, como la piel y los intestinos, e infertilidad.

Cuando se trataron con carcinógenos, los ratones carentes de telomerasa desarrollaron tumores en forma menos rápida que los ratones normales. Por ejemplo, los papilomas inducidos por una combinación de carcinógenos químicos se suscitan con una frecuencia 20 veces menor en los ratones carentes de telomerasa funcional que en los ratones normales. Los ratones con una mutación *APC* normalmente desarrollan tumores de colon, y éstos también se reducen si los ratones carecen de telomerasa. Algunos otros tumores son menos afectados por la pérdida de telomerasa. Estos estudios demostraron la relevancia de la telomerasa para la división celular ilimitada y hacen a la enzima una posible diana para la quimoterapia.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 23.5

Papel de los carcinógenos y reparación del DNA en el cáncer

- Los cambios en la secuencia de DNA son resultado de errores de copiado y de los efectos de diversos agentes químicos o carcinógenos. Todos los carcinógenos son mutágenos; es decir, alteran uno o más nucleótidos en el DNA.
- Muchos errores de copiado que tienen lugar durante la replicación del DNA son corregidos mediante la función correctora de las DNA polimerasas que pueden reconocer bases incorrectas (mal apareadas) en el extremo 3′ de la cadena en crecimiento y luego eliminarlas mediante una actividad inherente de exonucleasa 3′ → 5′ (véase fig. 23-24).
- Los carcinógenos indirectos, el tipo más común, deben ser activados antes de que puedan dañar el DNA. En los animales, la activación metabólica tiene lugar a través del sistema citocromo P-450, una vía empleada por las células para librarse de químicos extraños nocivos.
- El benzo(*a*)pireno, un componente del humo del cigarrillo, produce mutaciones inactivantes en el gen *p53* en las mismas posiciones que están mutadas en muchos tumores humanos de pulmón.
- Las células eucariontes tienen tres sistemas de reparación por escisión para corregir las bases apareadas incorrectamente y para eliminar los dímeros de timina inducidos por UV o grandes aductos químicos del DNA. La reparación por escisión de bases, la reparación por apareamiento incorrecto y la reparación por escisión de nucleótido funcionan con alta precisión y en general no introducen errores.
- Los defectos hereditarios en la vía de reparación por escisión de nucleótido, como en las personas con xerodermia pigmentosa, las predisponen al cáncer de piel. El cáncer de colon hereditario suele asociarse con formas mutantes de proteínas esenciales para la vía de reparación de apareamientos incorrectos.
- La reparación libre de errores de las roturas de doble hebra del DNA se logra mediante recombinación homóloga empleando la cromátida hermana no dañada como molde.
- Los defectos en la reparación por recombinación homóloga están asociados con la herencia de un alelo mutante del gen BCRA-1 o BCRA-2 y predispone al cáncer de mama.
- La reparación de las roturas de doble hebra mediante la vía de unión de extremos puede unir segmentos de DNA de diferentes cromosomas y formar posiblemente una translocación oncogénica. El mecanismo de reparación también produce una pequeña deleción, incluso cuando se juntan segmentos del mismo cromosoma.
- Los defectos hereditarios en otros procesos de reparación del DNA que se encuentran en ciertas enfermedades humanas están asociados con una susceptibilidad incrementada a ciertos cánceres (véase cuadro 23-1).
- Las células cancerosas, al igual que las células germinales y las células madre, pero a diferencia de las células más diferenciadas, producen telomerasa, que evita el acortamiento de cromosomas durante la replicación y puede contribuir a su inmortalización. La ausencia de telomerasa está asociada con la resistencia a la generación de ciertos tumores.

PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO

El reconocimiento de que el cáncer es fundamentalmente una enfermedad genética ha abierto enormes oportunidades para su prevención y tratamiento. Ahora es posible evaluar los carcinógenos por sus efectos sobre pasos conocidos en el control del ciclo celular. Los defectos genéticos en el punto clave de control para detectar el DNA dañado y en los sistemas para repararlo pueden reconocerse con facilidad y utilizarse para explorar los mecanismos del cáncer. Los numerosos cambios que deben producirse para que una célula se convierta en un tumor peligroso presentan múltiples oportunidades de intervención. Identificar los genes mutados asociados con el cáncer señala directamente las proteínas hacia las cuales pueden dirigirse los fármacos.

La medicina diagnóstica se está transformando gracias a nuestra recién descubierta capacidad para controlar un gran número de características celulares. Los métodos tradicionales para evaluar posibles células tumorales, principalmente mediante el examen microscópico de células teñidas, se incrementarán o serán reemplazados por técnicas para medir la expresión de decenas de miles de genes, centrados particularmente en aquellos cuyas actividades están identificadas como poderosos indicadores de las propiedades del crecimiento celular y el pronóstico del paciente. El análisis de micromatrices de DNA permite la medición de la transcripción de genes. En el futuro, las técnicas para medir sistemáticamente la producción, la modificación y la localización de proteínas, todas medidas importantes de los estados celulares, nos proporcionarán imágenes aún más perfectas de las células. Los tumores que ahora parecen idénticos o muy similares se reconocerán como diferentes y se los tratará como tales. La detección temprana de tumores, basada en un mejor control de las propiedades celulares, permitirá un tratamiento más exitoso. Centrarse en la metástasis, ese proceso particularmente destructivo, conducirá a la identificación adecuada de los mecanismos utilizados por las células para migrar, adherirse e invadir. La manipulación de la angiogénesis continúa siendo esperanzadora como método para eliminar tumores.

La biología celular molecular del cáncer abre caminos a nuevas terapias, pero la prevención sigue siendo crucial y preferible a cualquier tratamiento. Evitar el contacto con carcinógenos obvios, en particular el humo del cigarrillo, puede disminuir significativamente la incidencia del cáncer de pulmón y quizá también de otros tipos. Más allá de reducir la exposición a carcinógenos como el humo o la luz solar, ahora son factibles ciertos enfoques específicos. Los nuevos conocimientos acerca de la participación del papiloma virus 16 humano en la mayoría de los cánceres cervicales mantiene vigente la posibilidad de desarrollar una vacuna contra el cáncer a través de la prevención de la acción viral. Los anticuerpos contra los marcadores de superficie característicos de las células cancerosas son fuente de gran esperanza, sobre todo después de los éxitos con el uso clínico de anticuerpos monoclonales contra el receptor EGF (Her2) humano, una proteína involucrada en ciertos casos de cáncer de mama humano. Los pasos futuros deben aunar la medicina y la ciencia. La comprensión de la biología celular del cáncer es un primer paso crítico hacia la prevención y la curación, pero los pasos siguientes son difíciles. El éxito logrado con imatinib (Gleevec®, STI-571) contra la leucemia es excepcional; muchos cánceres son difíciles de tratar y provocan un enorme sufrimiento. Puesto que *cáncer* es el término utilizado para un grupo de enfermedades muy diversas, las intervenciones que obtienen resultados satisfactorios en un tipo pueden no ser útiles para otras. A pesar de esta desalentadora realidad, estamos comenzando a cosechar los beneficios de décadas de investigación en la exploración de la biología molecular de la célula. Esperamos que muchos de los lectores de este libro ayuden a superar los obstáculos que quedan.

PALABRAS CLAVE

aflatoxina *964*
aneuploidía *961*
benigno *936*
carcinógenos *935*
carcinomas *938*
cromosoma Filadelfia *954*
desaminación *963*
dímeros timina-timina *966*
gen supresor de tumores *935*
leucemias *938*
linfoma de Burkitt *956*
malignidad *936*
metástasis *937*
mutágenos *963*
no disyunción *947*
oncogén *940*
pérdida de heterocigosidad *947*
proteína p53 *959*
protooncogén *935*
retrovirus de acción lenta *946*
retrovirus transductores *946*
sarcomas *938*
sistemas de escisión-reparación *964*
transformación *939*
unión de los extremos de DNA *967*

REVISIÓN DE CONCEPTOS

1. ¿Qué características distinguen los tumores benignos de los malignos? Con respecto a las mutaciones génicas, ¿qué distingue a los pólipos benignos de colon del carcinoma maligno de colon?

2. El 90% de las muertes por cáncer son causadas por tumores metastásicos más que por tumores primarios. Defina *metástasis*. Explique el fundamento de los siguientes nuevos tratamientos contra el cáncer: a) batimastat, un inhibidor de metaloproteinasas de la matriz y del receptor activador de plasminógeno, b) los anticuerpos que bloquean la función de las integrinas, las proteínas integrales de membrana que median la adhesión de células a la lámina basal y las matrices extracelulares de diversos tejidos y c) bifosfonato, que inhibe la función de los osteoclastos que digieren huesos.

3. Debido a los requerimientos de oxígeno y nutrientes, las células en los tejidos deben residir dentro de los 100 μm de un vaso sanguíneo. Sobre la base de esta información, explique por qué muchos tumores malignos a menudo poseen mutaciones con ganancia de función en uno de los siguientes genes: *bFGF, TGFa* y *VEGF*.

4. ¿Qué hipótesis explica las observaciones de que la incidencia de los cánceres humanos se incrementan exponencialmente con la edad? Dé un ejemplo de información que confirme esta hipótesis.

5. Distinga entre protooncogenes y genes supresores de tumores. ¿Los protooncogenes y los genes supresores de tumores sufren mutaciones con ganancia o pérdida de funciones para volverse promotores de cáncer? Clasifique los siguientes genes como protooncogenes o genes supresores de tumores: *p53, ras, Bcl-2, telomerasa, jun* y *p16*.

6. El retinoblastoma hereditario suele afectar a los niños en ambos ojos, mientras que el retinoblastoma espontáneo tiene lugar durante la edad adulta sólo en un ojo. Explique la base genética de la distinción epidemiológica entre estas dos formas de retinoblastoma. Explique la aparente paradoja: las mutaciones de pérdida de función en los genes supresores de tumores actúan recesivamente, pero el retinoblastoma hereditario se hereda como autosómico dominante.

7. Explique el concepto de pérdida de heterocigosidad ¿Por qué la mayoría de las células cancerosas exhiben esa pérdida en uno o más genes? ¿Cómo la falla del control de la formación del huso mitótico *(spindle assembly checkpoint)* conduce a la pérdida de heterocigosis?

8. Muchos tumores malignos se caracterizan por la activación de uno o más receptores de factores de crecimiento. ¿Cuál es la actividad catalítica asociada con los receptores transmembrana de factores de crecimiento como el receptor EGF? Describa cómo los siguientes eventos conducen a la activación del receptor del factor de crecimiento pertinente: a) expresión de la proteína viral gp55, b) translocación que reemplaza el dominio extracelular del receptor Trk con la región N-terminal de la tropomiosina, c) mutación puntual que convierte una valina a glutamina dentro de la región transmembrana del receptor Her2.

9. Describa el evento transductor de señales común que es perturbado por mutaciones inductoras de cáncer en los genes que codifican Ras y NF-1. ¿Por qué las mutaciones en Ras se hallan más comúnmente en los cánceres que las mutaciones en NF-1?

10. ¿Cuál es la distinción estructural entre las proteínas codificadas por c-*src* y v-*src*? ¿Cómo esta diferencia convierte oncogénico al v-*src*?

11. Describa el hecho mutacional que produce el oncogén *myc* en el linfoma de Burkitt. ¿Por qué el mecanismo particular para generar *myc* oncogénico se da en un linfoma más que en otro tipo de cáncer? Describa otro mecanismo para generar *myc* oncogénico.

12. Los cánceres pancreáticos a menudo poseen mutaciones con pérdida de función en el gen que codifica la proteína SMAD4. ¿Cómo esta mutación promueve la pérdida de la inhibición del crecimiento y el fenotipo altamente metastásico de los tumores pancreáticos?

13. La pérdida de función de p53 tiene lugar en la mayoría de los tumores humanos. Nombre dos formas en las cuales la pérdida de función de p53 contribuye al fenotipo maligno. Explique el mecanismo mediante el cual los siguientes agentes provocan la pérdida de la función de p53: a) papilomavirus humano y b) benzo(*a*)pireno.

14. Los sistemas de reparación del DNA son responsables de mantener la fidelidad genómica en las células normales a pesar de la alta frecuencia con la cual ocurren los sucesos mutacionales. ¿Qué tipo de mutación de DNA se genera por a) radiación UV y b) radiación ionizante? Describa el sistema responsable de reparar cada uno de estos tipos de mutaciones en las células de mamíferos. Postule por qué una pérdida de función en uno o más sistemas de reparación del DNA tipifica muchos cánceres.

15. ¿Qué tipos celulares humanos poseen actividad de telomerasa? ¿Qué característica del cáncer se promueve mediante la expresión de telomerasa? ¿Qué cuestiones plantea esto para las terapias médicas que involucran células madre?

ANÁLISIS DE LOS DATOS

En un estudio reciente de Elizabeth Snyderwine y col. se utilizaron perfiles de micromatrices de cDNA para comparar los perfiles de expresión de 6.900 genes en tejidos de mama normales y malignos de ratas. Se extrajo RNA de los siguientes tejidos:

a. Tejido de mama de ratas vírgenes

b. Tejido de mama de ratas preñadas

c. Tejido de mama de ratas lactantes

d. Carcinoma de mama inducido por el carcinógeno derivado de la carne PhIP

e. Carcinoma de mama inducido por el carcinógeno experimental DMBA

Luego de hibridar las micromatrices con los cDNA marcados derivados de estas cinco poblaciones de RNA, se analizó la información mediante varias comparaciones diferentes.

En la comparación 1, los tejidos a, b, y c se agruparon como muestras de tejidos "normales", y d y e se agruparon como muestras de "carcinoma". Se determinaron los genes que fueron inducidos (un incremento de más de dos veces en la expresión) o reprimidos (una disminución de más de dos veces en la expresión) en ambas muestras de carcinomas relativas a las tres muestras normales. Un listado parcial de genes expresados diferencialmente se muestra a continuación.

Genes inducidos

Genes relacionados con la proliferación y el ciclo celular

Cadena A del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-A)

Cinasa 4 dependiente de ciclina (Cdk4)

Ciclina D

Genes relacionados con la transducción de señales y la transcripción

STAT5a

Genes reprimidos

Genes de la matriz extracelular

Colágeno tipo V alfa 1

Fibronectina 1

Desmina

1. ¿Cuál era el propósito de analizar el tejido mamario de ratas preñadas y lactantes?

2. ¿Qué características del cáncer se fomentan por la sobreexpresión de PDGF-A, Cdk4 y ciclina D?

3. ¿Qué característica del cáncer podría promoverse mediante la represión de los genes de la matriz extracelular?

4. STAT5 es un factor de transcripción que regula la expresión de ciclina D, Bcl-X_L y otros genes. ¿Por qué es posible para estos carcinomas que no suceda ninguna mutación en el gen de la ciclina D a pesar de su sobreexpresión? ¿Por qué en las células cancerosas comúnmente se encuentran mutaciones en los genes de factores de transcripción como STAT5a?

En la comparación 2, se compararon los perfiles de la expresión de los carcinomas inducidos por PhIP y DMBA. En este análisis, se hallaron algunas diferencias, pero el número de genes expresados en forma diferencial fue mucho menor que el número de genes identificado cuando se comparaban las muestras agrupadas "normales" (a, b y c) con las muestras agrupadas de "carcinoma" (d y e).

5. Sobre la base de esta información, ¿qué se puede generalizar acerca del perfil molecular de los carcinomas de mama?

6. ¿Anticiparía mayores o menores diferencias en la expresión génica si dos tipos distintos de cáncer (p. ej., el carcinoma de mama o el linfoma de célula B) inducidos por el mismo carcinógeno se compararan mediante el análisis de micromatrices?

BIBLIOGRAFÍA

Células tumorales e inicio del cáncer

Fidler, I. J., 2002. The pathogenesis of cancer metastasis: the "seed and soil" hypothesis revisited. Nature Rev. Cancer 3:1-6.

Folkman, J. 2002. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. Semin. Oncol. 29:15-18.

Hanahan, D., and R. A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. Cell 100:57-70.

Jain, M., et al. 2002. Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC. Science 297:102-104.

Kinzler, K. W., and B. Vogelstein. 1996. Lessons from hereditary colo-rectal cancer. Cell 87:159-170.

Klein, G. 1998. Foulds, dangerous idea revisited: the multistep development of tumors 40 years later. Adv. Cancer Res. 72:1-23.

Rafii, S., et al. 2002. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? Nature Rev. Cancer 2:826-835.

Ramaswamy, S., et al. 2003. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. Nature Genet. 33:49-54.

Trusolino, L., and P. M. Comoglio. 2002. Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. Nature Rev. Cancer 2:289-300.

Yancopoulos, G., M. Klagsburn, and J. Folkman. 1998. Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. Cell 93:661-664.

Bases genéticas del cáncer

Bienz, M., and H. Clevers. 2000. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. Cell 103:311-320.

Clark, J., et al. 2002. Identification of amplified and expressed genes in breast cancer by comparative hybridization onto microarrays of randomly selected cDNA clones. Genes Chrom. Cancer 34:10114.

Classon, M., and E. Harlow. 2002. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. Nature Rev. Cancer 2:910-917.

Hesketh, R., ed. 1997. The Oncogene and Tumor Suppressor Gene Facts Book, 2d ed. Academic Press.

Hunter, T. 1997. Oncoprotein networks. Cell 88:333-346.

Moon, R. T., et al. 2002. The promise and perils of Wnt signaling through beta-carenin. Science 296:1644-1646.

Nevins, J. R. 2001. The Rb/E2F pathway and cancer. Hum. Mol. Genet. 10:699-703.

Polakis, P. 2000. Wnt signaling and cancer. Genes Devel. 14:1837-1851.

Sasaki, T., et al. 2000. Colorectal carcinomas in mice lacking the catalytic subunit of PI(3)Kgamma. Nature 406:897-902.

Sherr, C. J., and F. McCormick. 2002. The RB and p53 pathways in cancer. Cancer Cell 2:103-112.

Taipale, J., and P. A. Beachy. 2001. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. Nature 411:349-354.

van 't Veer, L. J., et al. 2002. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. Nature 415:530-536.

West, M., et al. 2001. Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 98:11462-11467.

White, R. 1998. Tumor suppressor pathways. Cell 92:591-592.

Mutaciones oncogénicas en las proteínas que promueven la proliferación celular

Capdeville, R., et al. 2002. Glivec (ST1571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. Nature Rev Drug Discov. 1:493-502.

Downward, J. 2003. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. Nature Rev. Cancer 3:11-22.

Rowley, J. D. 2001. Chromosome translocations: dangerous liaisons revisited. Nature Rev. Cancer 1:245-250.

Sahai, E., and C. J. Marshall. 2002. RHO-GTPases and cancel. Nature Rev. Cancer 2:133-142.

Shaulian, E., and M. Karin. 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. Nature Cell Biol. 4:E131-E136.

Shawver, L K., D. Slamon, and A. Ullrich. 2002. Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. Cancer Cell 1:117-123.

Mutaciones que provocan pérdida de inhibición del crecimiento y controles del ciclo celular

Chau, B. N., and J. Y. Wang. 2003. Coordinated regulation of life and death by RB. Nature Rev. Cancer 3:130-138.

Malumbres, M., and M. Barbacid. 2001. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. Nature Rev. Cancer 1:222-231.

Marhon, N. F., and A. C. Lloyd. 2001. Cell senescence and cancer. Nature Rev. Cancer 1:203-213.

Paulovich, A. G., D. P. Toczyski, and L. H. Hartwell.1997. When checkpoints fail. Cell 88:315-321.

Planas-Silva, M. D., and R. A. Weinberg. 1997. The restriction point and control of cell proliferation. Curr. Opin. Cell Biol. 9:768-772.

Sherr, C. J. 2000. Cell cycle control and cancer. Harvey Lect. 96:73-92.

Westphal, C. H.1997. Cell-cycle signaling: Atm displays its many talents. Curr. Biol. 7:R789-R792.

Zhang, L., et al. 2000. Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. Science 290:989-992.

Papel de los carcinógenos y reparación del DNA en el cáncer

Batty, D., and R. Wood. 2000. Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. Gene 241:193-204.

D'Andrea, A., and M. Grompe. 2003. The Fanconi anemia/BRCA pathway. Nature Rev. Cancer 3:23-34.

Fishel, R. 1998. Mismatch repair, molecular switches, and signal transduction. Genes Devel. 12:2096-2101.

Flores-Rozas, H., and R. Kolodner. 2000. Links between replicarion, recombination and genome instability in eukariotes. Trends Biochem. Sci. 25:196-200.

Friedberg, E.2003. DNA damage and repair. Nature 421:436 440.

Friedberg, E., G. Walker, and W. Siede. 1995. DNA Repair and Mutagenesis. ASM Press.

Hoeijmakers, J. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature 411:366-374.

Lindahl, T. 2001. Keynote: past, present, and future aspects of base excision repair. Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 68:xvii-xxx.

Muller, A., and R. Fishel. 2002. Mismatch repair and the hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome (HNPCC). Cancer Invest. 20:102-109.

Scharer, O. 2003. Chemistry and biology of DNA repair. Angewandte Chemie, in press.

Scharer, O., and J. Jiricny. 2001. Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. Bioessays 23:270-281.

Somasundaram, K. 2002. Breast cancer gene 1 (BRCA1): role in cell cycle regulation and DNA repair—perhaps through transcription. J. Cell Biochem. 88:1084-1091.

Thompson, L., and D. Schild. 2002. Recombinational DNA repair and human disease. Mut. Res. 509:49-78.

van Gant, D., J. Hoeijmakers, and R. Kanaar. 2001. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. Nature Rev. Genet. 2:196-205.

GLOSARIO

Los términos en negrita dentro de una definición también están definidos en este glosario. Las figuras y los cuadros que ilustran términos definidos se escriben entre paréntesis.

Acetil CoA. Metabolito hidrosoluble pequeño que consta de un grupo acetilo unido a la coenzima A (CoA); se forma durante la oxidación de piruvato, ácidos grasos y aminoácidos. Su grupo acetilo es transferido al citrato en el ciclo del **ácido cítrico** (fig. 8-8).

Acetilcolina (ACh). Neurotransmisor que actúa en las uniones neuromusculares de los vertebrados y en diversas sinapsis entre neuronas del cerebro y del sistema nervioso periférico.

Ácido. Cualquier compuesto que puede donar un protón (H^+). Los grupos carboxilo y fosfato son los principales grupos ácidos en las macromoléculas biológicas.

Ácido desoxirribonucleico. Véase **DNA.**

Ácido graso. Cualquier cadena hidrocarbonada larga con un grupo carboxilo en un extremo; una de las principales fuentes de energía durante el metabolismo y un precursor de la síntesis de fosfolípidos, triglicéridos y ésteres de colesterol (fig. 2-18 y cuadro 18-1).

Ácido nucleico. Polímero de nucleótidos unidos mediante enlaces **fosfodiéster**. El DNA y el RNA son los principales ácidos nucleicos de las células.

Ácidos biliares. Derivados del **colesterol**, producidos en el hígado y secretados a la bilis, que ayudan a emulsionar las grasas dietarias para la digestión y absorción en el intestino; se reciclan a través de la **circulación enterohepática** (fig. 5-2).

Actina. Proteína estructural abundante en las células eucariontes que interactúa con muchas otras proteínas. La forma globular monomérica (actina G) se polimeriza para formar filamentos de actina (actina F). En las células musculares, la actina F interactúa con la **miosina** durante la contracción. Véase también **Microfilamentos** (fig. 19-3).

Activador. Factor de transcripción que estimula la **transcripción.**

Adenililciclasa. Enzima ligada a membrana que cataliza la formación de AMP cíclico (**cAMP**) a partir de ATP; también se denomina *adenilatociclasa*. La unión de determinados ligandos a sus receptores en la superficie de la célula produce la activación de la adenililciclasa y el aumento de cAMP intracelular (fig. 13-14).

Adrenalina. Catecolamina secretada por la glándula suprarrenal y algunas neuronas en respuesta al estrés; también llamada *epinefrina*. Funciona como una hormona y como un neurotransmisor, mediando respuestas de "lucha o huída" que incluyen el incremento de los niveles de glucosa en sangre y la frecuencia cardíaca (fig. 7-42).

Aerobio. Se refiere a una célula, organismo o proceso metabólico que utiliza oxígeno gaseoso (O_2) o que puede crecer en presencia de O_2.

Agonista. Molécula, a menudo sintética, que imita la función biológica de una molécula natural. Suele utilizarse en referencia a un análogo de una hormona que se une al receptor de la hormona e induce la respuesta normal.

Alelo. Una de dos o más formas alternativas de un gen. Las células diploides contienen dos alelos de cada gen, localizados en el sitio correspondiente (locus) sobre cromosomas homólogos.

Almidón. Polisacárido ramificado, muy largo, compuesto exclusivamente de unidades de glucosa, que es el principal hidrato de carbono de almacenamiento en las células vegetales.

Alostérico. Referente a proteínas y procesos celulares regulados por **alosterismo.**

Alosterismo. Cambio en la estructura terciara, cuaternaria o ambas de una proteína inducido por la unión de una molécula pequeña a un sitio regulador específico, que causa un cambio en la actividad de la proteína. Muchas proteínas multisubunidades exhiben regulación alostérica.

Aminoácido. Componente orgánico que contiene al menos un grupo amino y un grupo carboxilo. En los aminoácidos, que son los **monómeros** que forman las proteínas, el grupo amino y el grupo carboxilo están unidos a un átomo de carbono central, el carbono **α**, al que se une una cadena lateral variable (figs. 2-12 y 2-13).

Aminoacil-tRNA. Forma activada de un aminoácido que se utiliza en la síntesis de proteínas; consiste en un aminoácido unido a través de un enlace éster de alta energía al grupo 3′ hidroxilo de una molécula de tRNA (fig. 4-21).

AMP cíclico (cAMP). Segundo mensajero producido en respuesta a la estimulación hormonal de ciertos receptores asociados con la proteína G que activa la proteincinasa A (fig. 13-7).

Amplificador. Secuencia reguladora del DNA eucarionte que puede estar ubicada a gran distancia del gen que controla o aun dentro de la secuencia codificadora. La fijación de proteínas específicas a un amplificador modula la velocidad de transcripción del gen asociado (fig. 11-12).

Amplificosoma. Gran complejo nucleoproteico que se ensambla a partir de **factores de transcripción** (activadores y represores) a medida que se unen en forma cooperativa a sus múltiples sitios de unión en un **amplificador** con la asistencia de proteínas que curvan el DNA (fig. 11-26).

Anaerobio. Se refiere a una célula, organismo o proceso metabólico que funciona en ausencia de oxígeno gaseoso (O_2).

Anafase. Estadio de la mitosis durante el cual las cromátidas hermanas (o pares homólogos en la meiosis I) se separan y se alejan (se segregan) hacia los polos del huso (fig. 20-29).

Análisis de placas. Técnica utilizada para determinar el número de partículas virales infecciosas en una muestra mediante el cultivo de una muestra diluida sobre una capa de células hués-

ped susceptibles y el posterior recuento de las áreas claras correspondientes a las células lisadas (placas) que se forman (fig. 4-39).

Aneuploidía. Cualquier desviación del número diploide normal de cromosomas en la cual están presentes copias extra de uno o más cromosomas o falta una de las copias normales; es una aberración cromosómica frecuente en las células cancerosas.

Anfipática. Se refiere a una molécula o estructura que tiene tanto una parte hidrófoba como una hidrófila.

Antagonista. Una molécula, a menudo sintética, que bloquea la función biológica de una molécula natural. Suele utilizarse en referencia a un análogo de una hormona que se une al receptor de la hormona, pero no induce respuesta; al evitar la unión de la hormona normal, el antagonista reduce su efecto fisiológico habitual.

Anticodón. Secuencia de tres nucleótidos en un tRNA que es complementaria de un codón en un mRNA. Durante la síntesis proteica, el apareamiento de bases entre un codón y un anticodón alinea el tRNA portador del aminoácido correspondiente para agregarlo a la cadena polipeptídica en crecimiento.

Anticuerpo monoclonal. Anticuerpo producido por la progenie de una célula B única y por tanto una proteína homogénea que reconoce un único antígeno. Puede producirse experimentalmente mediante el uso de un hibridoma (fig. 6-38).

Anticuerpo. Proteína (inmunoglobina) que interactúa con un sitio particular (epítopo) sobre un antígeno y facilita la eliminación de éste a través de diversos mecanismos (fig. 3-15).

Antígeno. Cualquier sustancia (por lo general extraña) que induce la producción de un anticuerpo, al que se une en forma específica.

Antiporte. Véase Cotransporte bidireccional.

Aparato mitótico. Estructura temporaria especializada, presente en las células eucariontes durante la mitosis, que captura los cromosomas y luego los empuja y los tracciona hacia sitios opuestos de la célula en división. Consiste en un haz central de microtúbulos con simetría bilateral con una forma global similar a una pelota de rugby (huso mitótico) y dos haces de microtúbulos (ásteres), uno en cada polo del huso (fig. 20-31).

Apical. En referencia a la punta (ápice) de una célula, un órgano u otra estructura corporal. En el caso de las células epiteliales, la superficie apical está expuesta al exterior del cuerpo o a una cavidad interna (p. ej., la luz intestinal, un conducto) (fig. 6-4).

Apoptosis. Proceso regulado que conduce a la muerte celular mediada por una cascada de caspasas y marcada por una serie de cambios morfológicos bien definidos; también se denomina *muerte celular programada* (figs. 22-26 y 22-32a).

Archaea. Clase de procariontes que constituyen uno de los tres linajes evolutivos diferenciados de los organismos actuales; también se denominan *arqueobacterias* y *archaeans*. En cierta manera, estos procariontes son más similares a los eucariontes que a las denominadas bacterias verdaderas (eubacterias) (fig. 1-3).

Áster. Estructura compuesta de microtúbulos (fibras astrales) que se irradian hacia afuera desde un centrosoma durante la mitosis (fig. 20-31).

Átomo de carbono asimétrico. Átomo de carbono unido a cuatro átomos o grupos químicos diferentes; también denominado *átomo de carbono quiral*. Los enlaces se pueden disponer de dos maneras diferentes y producir esteroisómeros que son imágenes especulares entre sí (fig. 2-12).

ATP (adenosín 5′-trifosfato). Nucleótido que constituye la molécula más importante para la captación y transferencia de energía libre en las células. La hidrólisis de cada uno de los dos enlaces fosfoanhidridos de alta energía del ATP libera gran cantidad de energía libre que se utiliza para conducir procesos celulares que requieren energía (figs. 1-14 y 2-24).

ATP sintasa. Complejo proteico multimérico unido a la membrana mitocondrial interna, a la membrana tilacoide de los cloroplastos y a la membrana plasmática bacteriana, que cataliza la síntesis de ATP durante la fosforilación oxidativa y la fotosíntesis; también denominada *complejo* F_0F_1 (fig. 8-24).

ATPasa. Una de las muchas enzimas de un gran grupo que catalizan la hidrólisis de ATP para producir ADP y fosfato inorgánico con la liberación de energía libre. Véase también ATPasa y bombas de Na^+/K^+.

Autocrino. Referido a un mecanismo de señalización por el que se unen una célula y una molécula de señalización (p. ej., factor de crecimiento) que es producida por ella misma y a la cual la célula responde.

Autorradiografía. Técnica para visualizar moléculas radiactivas en una muestra (p. ej., un corte de un tejido o gel electroforético) a través de la exposición de una película o emulsión fotográfica a la muestra. La película expuesta se denomina autorradiograma o autorradiografía.

Autosoma. Cualquier cromosoma diferente del sexual.

Axón. Prolongación larga que se extiende desde el cuerpo celular de una neurona, con capacidad para conducir un impulso eléctrico (potencial de acción) generado en la unión con el cuerpo celular hacia el extremo distal ramificado (la terminal axónica) (fig. 7-29).

Axonema. Haz de microtúbulos y proteínas asociadas presentes en los cilios y flagelos y que son responsables de sus movimientos (fig. 20-25).

Bacteriófago (fago). Cualquier virus que infecta células bacterianas. Algunos bacteriófagos tienen amplia aplicación como vectores de clonación de DNA.

Base. Cualquier compuesto, que generalmente contiene nitrógeno, que puede aceptar protones (H^+). Se suele usar para denotar las purinas y las pirimidinas del DNA y del RNA.

Basolateral. En referencia a la base y el lateral de una célula, un órgano u otra estructura del cuerpo. En el caso de las células epiteliales, la superficie basolateral linda con las células adyacentes y la lámina basal subyacente (fig. 6-5).

Benigno. Referido a un tumor que contiene células que se asemejan a las células normales. Los tumores benignos permanecen en el tejido donde se originan. Véase también Maligno.

Bicapa fosfolipídica. Estructura de dos capas, que es la base de todas las biomembranas, en la cual los grupos cabeza polares de los fosfolípidos están expuestos al medio acuoso sobre cada lado, mientras que las cadenas hidrocarbonadas no polares de los ácidos grasos se encuentran en el centro (fig. 2-11).

Bicapa. Véase Bicapa fosfolipídica.

Biomembrana. Barrera de permeabilidad que rodea células u orgánulos, que consiste en una bicapa de fosfolipídos y proteínas de membrana asociadas, así como de colesterol y glucolípidos en muchos casos (fig. 5-2).

Bomba. Cualquier proteína transmembrana que tiene una actividad de ATPasa y asocia la hidrólisis de ATP con el transporte activo de un ion o una molécula pequeña a través de una biomembrana en contra de su gradiente electroquímico (fig. 7-6).

Buffer (amortiguador). Solución de la forma ácida (HA) y básica (A^-) de un compuesto que experimenta poca variación de pH cuando se añaden pequeñas cantidades de un ácido o una base fuertes.

Cadena respiratoria. Conjunto de cuatro complejos multiproteicos grandes en la membrana mitocondrial interna más el citocromo *c* difundible en el espacio intermembrana y la coenzima Q, a través de la cual fluyen los electrones desde donadores de electrones reducidos (p. ej., NADH) hacia el O_2. Cada miembro de la cadena contiene unidos uno o más transportadores de electrones que aceptan y donan electrones en forma secuencial (fig. 8-17 y cuadro 8-2). Cadena de transporte de electrones.

Cadherinas. Familia de moléculas de adhesión celular diméricas que se agrupan en las uniones de adherencia y los desmosomas y median interacciones homófilas intercelulares dependientes del Ca^{2+} (fig. 6-2).

Caja TATA. Secuencia conservada en el promotor de muchos genes eucariontes codificadores de proteínas donde se ensambla el complejo de iniciación de la transcripción (fig. 11-9).

Calmodulina. Proteína reguladora citosólica pequeña que une cuatro iones Ca^{2+}. El complejo calmodulina/Ca^{2+} se une a muchas proteínas y las activa o las inhibe (fig. 3-28).

Caloría. Unidad de calor (energía térmica). Una caloría es la cantidad de calor necesaria para elevar 1° C la temperatura de un gramo de agua. La *kilocaloría* (kcal) suele utilizarse para indicar el contenido energético de los alimentos y la energía libre de un sistema.

Canales del K^+ en reposo. Canales iónicos de K^+ no regulados en la membrana plasmática que, junto con la concentración citosólica elevada de K^+ producida por la ATPasa de Na^+/K^+, son los responsables principales de la generación en las células animales de un potencial de membrana en reposo con el interior negativo.

Cáncer. Término general para denotar cualquiera de los diversos tumores malignos, cuyas células crecen y se dividen más rápidamente de lo normal, invaden el tejido que las rodea y suelen diseminarse (metástasis) hacia otros sitios.

Cápside. Cubierta proteica externa de un virus formada por múltiples copias de una o más subunidades proteicas que rodean el ácido nucleico viral.

Cara citosólica. Cara de la membrana celular dirigida hacia el citosol (fig. 5-4).

Cara exoplasmática. Cara de todas las membranas celulares orientada en dirección opuesta al citoplasma. La cara exoplasmática de la membrana plasmática se orienta hacia el exterior de la célula, mientras que la cara exoplasmática de los orgánulos rodeados por una única membrana (p. ej., retículo endoplasmático, lisosoma, vesículas de transporte) se orienta hacia la luz (fig. 5-4).

Carcinógeno. Cualquier agente químico o físico capaz de producir cáncer cuando las células u organismos se exponen a ellos.

Carioferina. Proteína perteneciente a una familia de proteínas de transporte nuclear que actúa como importina, exportina o, en ocasiones, como ambas. Cada carioferina se une a una secuencia señal específica en las proteínas "carga".

Cariotipo. Número, forma y tamaño del conjunto completo de cromosomas en metafase de una célula eucarionte (fig. inicial del cap. 10).

Caspasa. Una de varias enzimas de los vertebrados que degradan proteínas (proteasas) e intervienen en la muerte celular programada (fig. 22-32).

Catabolismo. Degradación celular de moléculas complejas a moléculas más simples acompañada casi siempre por liberación de energía. El anabolismo es el proceso inverso en el cual la energía se emplea para sintetizar moléculas complejas a partir de otras más simples.

Catalizador. Sustancia que incrementa la velocidad de una reacción química sin sufrir un cambio permanente en su estructura. Las enzimas son catalizadores proteicos en la mayoría de las reacciones bioquímicas, aunque algunos RNA tienen actividad catalítica.

CDK. Véase Cinasa dependiente de ciclina.

cDNA (DNA complementario). Molécula de DNA copiada de una molécula de mRNA por la transcriptasa inversa, por lo que carece de los intrones presentes en el DNA del genoma. La secuenciación de un cDNA permite deducir la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada; la expresión de cDNA clonados puede utilizarse para producir in vitro grandes cantidades de las proteínas que ellos codifican.

Cebador (*primer*). Secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3′-hidroxilo libre que forma pares de bases con una hebra molde complementaria y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde.

Célula madre (*stem cell*). Célula que se autorrenueva, capaz de dividirse simétricamente para dar origen a dos células hijas con un potencial de desarrollo idéntico al de la célula madre progenitora o asimétricamente para generar una célula madre hija y una con un potencial de desarrollo más restringido que la célula progenitora (fig. 22-2).

Célula polarizada. Cualquier célula marcada por asimetrías funcionales y estructurales. En las células epiteliales, por ejemplo, las regiones apical y basolateral de la membrana plasmática tienen diferentes composiciones lipídicas, contienen diferentes grupos de proteínas y asumen formas diferentes.

Célula somática. Cualquier célula vegetal o animal diferente de una célula germinal o precursora de una célula germinal.

Células madre embrionarias (ES). Línea de células cultivadas derivadas de embriones muy tempranos que pueden diferenciarse en un amplio rango de tipos celulares ya sea in vitro o después de la reinserción en un embrión huésped (fig. 22-3).

Celulosa. Polisacárido estructural compuesto de unidades de glucosa unidas entre sí por enlaces glucosídicos β(1→4). Forma

largas microfibrillas, que son los principales componentes de las paredes celulares vegetales (fig. 6-33).

Centríolo. Cualquiera de las dos estructuras cilíndricas dentro del centrosoma de las células animales y que contiene nueve grupos de microtúbulos triples; estructuralmente similar a un cuerpo basal (fig. 20-13b).

Centro organizador de microtúbulos. Véase MTOC.

Centrómero. Secuencia de DNA necesaria para la segregación adecuada de cromosomas durante la mitosis y la meiosis; región de los cromosomas mitóticos donde se forma el cinetocoro y que parece una constricción (figs. 10-27, 10-28 y 10-32b).

Centrosoma (centro celular). Estructura localizada cerca del núcleo de las células animales y vegetales que es el principal centro de organización de los microtúbulos (MT●C); en los animales contiene un par de centríolos incrustados en una matriz proteica. Se divide durante la mitosis y forma los polos del huso.

Cepa celular. Población de células cultivadas, de origen animal o vegetal, que tiene un tiempo de vida finito y finalmente muere, casi siempre después de 25 a 50 generaciones.

Chaperona. Término colectivo para dos tipos de proteínas que impiden el plegamiento erróneo de proteínas diana o que facilitan activamente su plegamiento adecuado (fig. 3-11).

Ciclina. Cualquiera de las diversas proteínas relacionadas cuya concentración aumenta y disminuye durante el curso del ciclo celular eucarionte. Las ciclinas forman complejos con las cinasas dependientes de ciclina, activando y determinando la especificidad del sustrato de estas enzimas.

Ciclo celular. Secuencia ordenada de eventos en los cuales una célula eucarionte duplica sus cromosomas y se divide en dos; normalmente consta de cuatro fases; G_1 antes de que tenga lugar la síntesis de DNA; S cuando se replica el DNA; G_2 luego de la síntesis de DNA; y M cuando tiene lugar la división celular, para dar dos células hijas. En ciertas condiciones, las células abandonan el ciclo celular durante G_1 y permanecen en el estado G_0 como células que no se dividen (fig. 21-1).

Ciclo de Calvin. Principal vía metabólica para fijar el $C●_2$ en carbohidratos durante la fotosíntesis; también se denomina *fijación del carbono*. Es directamente dependiente de la luz pero puede presentarse tanto en la oscuridad como en la luz (fig. 8-42).

Ciclo de Krebs. Véase Ciclo del ácido cítrico.

Ciclo del ácido cítrico. Conjunto de nueve reacciones acopladas que tienen lugar en la matriz de la mitocondria, donde se oxidan los grupos acetilo derivados de las moléculas de alimento y generan $C●_2$ e intermediarios reducidos que suelen producir ATP; también se denomina *ciclo de Krebs* y *ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA)* (fig. 8-9).

Ciclo del ácido tricarboxílico Véase Ciclo del ácido cítrico.

Cigoto. Óvulo fecundado; célula diploide resultante de la fusión de un gameto masculino y uno femenino.

Cilio. Estructura corta rodeada por membrana que se extiende desde la superficie de las células eucariontes y que contiene un haz central de microtúbulos. Los cilios suelen encontrarse en grupos y golpean rítmicamente para mover la célula (p. ej., organismos unicelulares) o para mover partículas pequeñas o líquidos a lo largo de la superficie (p. ej., células de la tráquea). Véase también Axonema y Flagelo.

Cinasa. Enzima que transfiere el grupo fosfato (γ) terminal del ATP a un sustrato. Las proteincinasas, que fosforilan residuos específicos de serina, treonina o tirosina en proteínas diana, cumplen un papel esencial en la regulación de la actividad de muchas proteínas celulares. Véase también Fosfatasas (fig. 3-30).

Cinasa dependiente de ciclinas (C●K). Proteincinasa que es catalíticamente activa sólo cuando está unida a una ciclina. Diversos complejos CDK-ciclina desencadenan la progresión a través de diferentes etapas del ciclo celular eucarionte mediante la fosforilación de proteínas diana específicas (fig. 21-28).

Cinesina. Clase de proteínas motoras que utilizan la energía liberada por la hidrólisis de ATP para moverse hacia el extremo (+) de un microtúbulo. Las cinesinas pueden transportar vesículas y orgánulos, y cumplen un papel clave en el movimiento de los cromosomas durante la mitosis (fig. 20-20 y cuadro 20-2).

Cinetocoro. Estructura proteica multicapa ubicada en el centrómero de cada cromosoma mitótico o cerca de él, desde el cual se extienden los microtúbulos hacia los polos del huso de la célula; desempeña un papel activo en el movimiento de los cromosomas hacia los polos durante la anafase (fig. 20-32).

Circulación enterohepática. Recorrido de los ácidos biliares desde el hígado al intestino (a través de los conductos biliares) y de regreso al hígado (a través de la sangre). Esta circulación está fuertemente regulada y cumple un papel primordial en la homeostasis lipídica (fig. 18-11).

Cisternas. Compartimiento plano rodeado por membranas, como el que se encuentra en el complejo de Golgi y en el retículo endoplasmático.

Citocina. Cualquiera de las numerosas proteínas secretadas (p. ej., eritropoyetina, G-CSF, interferones, interleucinas) que se unen a receptores de la superficie celular sobre ciertas células para inducir su diferenciación o proliferación.

Citocinesis. División del citoplasma tras la mitosis para generar dos células hijas, cada una con un núcleo y orgánulos citoplasmáticos.

Citocromo. Grupo de proteínas coloreadas que contienen hemo y que funcionan como transportadores de electrones durante la respiración celular y la fotosíntesis (fig. 8-15a).

Citoesqueleto. Retículo de elementos fibrosos que consisten principalmente de microtúbulos, microfilamentos de actina y filamentos intermedios, que se encuentran en el citoplasma de las células eucariontes. El citoesqueleto provee sostén estructural para la célula y permite el movimiento dirigido de orgánulos, cromosomas y de la propia célula (fig. 5-29).

Citoplasma. Contenido viscoso de una célula que está localizado dentro de la membrana plasmática pero, en las células eucariontes, fuera del núcleo.

Citosol. Fase acuosa no estructurada del citoplasma que excluye orgánulos, membranas y componentes citoesqueléticos insolubles.

Clatrina. Proteína fibrosa que con el auxilio de proteínas de ensamblaje se polimeriza y produce un retículo similar a un enrejado en regiones específicas sobre la cara citosólica de una membrana, de manera que se forma una invaginación (fosita) recubierta de clatrina que brota para formar una vesícula (figs. 17-18 y 17-19).

Clon. 1) Población de células u organismos genéticamente idénticas que descienden de un ancestro común. 2) Múltiples copias idénticas de un gen o fragmento de DNA generado y mantenido a través de la clonación de DNA.

Clonación de DNA. Técnica de DNA recombinante en la cual fragmentos específicos de cDNA o fragmentos de ●NA genómico se insertan en un vector de clonación, que luego se incorpora a las células huésped cultivadas (p. ej., células de *E. coli*) y se mantienen durante el crecimiento de las células huésped; también se denomina *clonación génica* (figs. 9-13 y 9-15).

Clonación de genes. Véase clonación de ●NA.

Clorofilas. Grupo de pigmentos de porfirina que absorben luz; son críticos en la fotosíntesis (fig. 8-31).

Cloroplasto. ●rgánulo especializado de las células vegetales rodeado de una membrana doble que contiene membranas internas con clorofila (tilacoides) donde tienen lugar las reacciones de la fotosíntesis que absorben la luz (fig. 8-30).

Código genético. Conjunto de reglas por las cuales los tripletes de nucleótidos (codones) en el DNA o RNA especifican aminoácidos en las proteínas (cuadro 4-1).

Codón. Secuencia de tres nucleótidos en el DNA o el mRNA que especifica un aminoácido en particular durante la síntesis de proteínas; también llamado *triplete*. De los 64 codones posibles, tres son codones de detención, que no especifican aminoácidos y provocan la terminación de la síntesis (cuadro 4-1).

Coenzima A (CoA). Véase Acetil CoA.

Colágeno. Glucoproteína triple helicoidal rica en glicina y prolina, que es uno de los principales componentes de la matriz extracelular y de los tejidos conectivos. Los numerosos subtipos difieren en su distribución tisular y en los componentes extracelulares y proteínas de la superficie celular con las cuales se asocian (cuadro 6-1).

Colesterol. Lípido que contiene la estructura esteroide de cuatro anillos con un grupo hidroxilo en un anillo; es un componente de muchas membranas eucariontes y el precursor de las hormonas esteroides, los ácidos biliares y la vitamina D (figs. 18-6 y 18-7).

Combinación de exones (*exon shuffling*). Proceso evolutivo para crear genes nuevos (es decir, nuevas combinaciones de exones) a partir de los preexistentes, por recombinación entre secuencias repetidas intercaladas dentro de intrones de dos genes separados o por transposición de elementos móviles de DNA (figs. 10-17 y 10-18).

Complejo de corte/poliadenilación. Gran complejo multiproteico que cataliza el corte del pre-mRNA en el sitio 3′ poli (A) y la adición inicial de residuos de adenilato (A) para formar la cola de poli (A) (fig. 12-4).

Complejo de Golgi. Pilas de compartimientos (cisternas) interconectados delimitados por membrana en las células eucariontes que actúan en el procesamiento y la clasificación de proteínas y lípidos destinados a otros compartimientos celulares o para la secreción; también llamado *aparato de Golgi* (fig. 5-23).

Complejo de poro nuclear (NPC). Estructura multiproteica grande, compuesta principalmente por nucleoporinas, que se extiende a través de la envoltura nuclear. Los iones y moléculas pequeñas se difunden libremente a lo largo de los NPC; las proteínas grandes y las partículas de ribonucleoproteínas son transportadas selectivamente a través de los NPC con la ayuda de proteínas solubles que se unen a las macromoléculas y también interactúan con ciertas nucleoporinas (fig. 12-18).

Complejo de preiniciación. Complejo de RNA polimerasa II, factores generales de transcripción y DNA promotor (fig. 11-27).

Complejo de reconocimiento a lo largo del exón. Gran ensamblaje que incluye proteínas SR de unión al RNA y otros componentes que ayudan a reconocer a los exones en los pre-mRNA de los eucariontes superiores y asegura el corte y empalme correcto (*splicing*) del RNA (fig. 12-11).

Complejo F_0F_1. Véase ATP sintasa.

Complejo silenciador inducido por RNA (RISC). Gran complejo multiproteico asociado con un RNA corto de hebra simple que media la degradación o la represión traduccional de un mRNA complementario o casi complementario (fig. 12-27).

Complementación genética. Restablecimiento de una función de tipo silvestre en las células diploides heterocigóticas generadas a partir de células haploides, cada una de las cuales porta una mutación en un gen diferente cuya proteína codificada es requerida en la misma vía bioquímica. Si dos mutantes con el mismo fenotipo mutante (p. ej., la incapacidad para proliferar sobre galactosa o para dividirse) pueden complementarse, sus mutaciones se encuentran en genes diferentes (fig. 9-7).

Complementación, funcional. Procedimiento de búsqueda en una genoteca de DNA para identificar el gen de tipo silvestre que restablece la función de un gen defectuoso en un mutante en particular (fig. 9-20).

Complementariedad molecular. Encaje de tipo llave y cerradura entre las formas, cargas, hidrofobicidad y otras propiedades físicas de dos moléculas o porciones de ellas que permite la formación de múltiples interacciones no covalentes a corta distancia (fig. 2-10).

Complementario. 1) En referencia a dos secuencias de ácidos nucleicos o hebras que pueden formar pares de bases perfectos entre sí. 2) Describe regiones sobre dos moléculas en interacción (p. ej., una enzima y su sustrato) que coinciden en forma similar a un candado y su llave.

Conexina. Miembro de una familia de proteínas transmembrana que forman las uniones de hendidura en los vertebrados.

Conformación. Forma precisa de una proteína o de otra macromolécula en tres dimensiones resultante de la localización espacial de los átomos de la molécula. Un pequeño cambio en las conformaciones de algunas proteínas afecta considerablemente su actividad.

Constante de asociación (K_a). Véase Constante de equilibrio.

Constante de disociación (K_d). Véase Constante de equilibrio.

Constante de equilibrio (K). Cociente de las constantes de velocidad directa e inversa para una reacción. Para una reacción de unión, $A + B \rightleftharpoons AB$, es igual a la constante de asociación, K_a; cuanto más alta sea la K_a, más fuerte será la unión entre A y B. El recíproco de K_a es la constante de disociación, K_d; cuanto más alta sea la K_d, más débil será la unión entre A y B.

Constante de Michaelis. Véase K_m.

Constitutiva. En referencia a la producción o la actividad continua de una molécula celular o el funcionamiento continuado de

un proceso celular (p. ej., secreción constitutiva) que no está regulada por señales externas o internas.

Control genético. Todos los mecanismos implicados en la regulación de la **expresión génica.** El más común es la regulación de la transcripción, aunque los mecanismos que influyen en el procesamiento, la estabilización y la **traducción** de los mRNA contribuyen a controlar la expresión de algunos genes.

Control respiratorio. Mecanismo por el cual la oxidación mitocondrial de NADH y $FADH_2$ depende del suministro de ADP y P_i para la síntesis de ATP. Se produce por el acoplamiento obligatorio del transporte de electrones a lo largo de la cadena respiratoria con el transporte de protones a través de la membrana mitocondrial interna.

Cooperatividad. Propiedad exhibida por algunas proteínas con múltiples sitios de unión al ligando por la cual la fijación de una molécula de ligando incrementa (cooperatividad positiva) o disminuye (cooperatividad negativa) la afinidad de unión para sucesivas moléculas de ligando.

Corriente abajo. Eventos que tienen lugar en una etapa posterior en una secuencia de pasos (p. ej., vías de señalización). Véase también **Corriente arriba.**

Corriente arriba. Eventos que tienen lugar al comienzo de una cascada de pasos (p. ej., vía de señalización). Véase también **Corriente abajo.**

Corte y empalme (*splicing*) del RNA. Proceso que resulta en la eliminación de los intrones y la unión de los exones de los pre-mRNA. Véase también **Empalmosoma** (fig. 12-7).

Cotransporte. Transporte mediado por proteínas de un ion o molécula pequeña a través de una membrana, contra un gradiente de concentración, impulsado por el acoplamiento del movimiento de una segunda molécula a favor de su gradiente de concentración en la misma dirección (**cotransporte unidireccional** o **simporte**) o en la opuesta (**cotransporte bidireccional** o **antiporte**) (cuadro 7-1 y fig. 7-2).

Cotransporte bidireccional. Tipo de cotransporte en el cual una proteína de membrana (antiportador) transporta dos moléculas o iones diferentes a través de una membrana celular, en direcciones opuestas. Véase también **Simporte.**

Cotransporte unidireccional. Tipo de cotransporte en el cual una proteína de membrana (simportador) transporta dos moléculas o iones diferentes a través de una membrana celular en la misma dirección. Véase también **Antiporte.**

Cremallera de leucina. Tipo de espiral enrollado de dos hélices α que forma homodímeros u heterodímeros específicos. Motivo común en muchos factores de transcripción eucariontes.

Cristalografía de rayos X. Técnica utilizada con mayor frecuencia para determinar la estructura tridimensional de macromoléculas (particularmente proteínas y ácidos nucleicos) al pasar rayos X a través de un cristal de las moléculas purificadas y analizar el patrón de difracción de puntos separados que resulta (fig. 3-38).

Cromátida. Copia de un cromosoma replicado formado durante la fase S del ciclo celular, que está unida por el centrómero a la otra copia; también denominada *cromátida hermana*. Durante la **mitosis,** las dos cromátidas se separan y cada una se convierte en un cromosoma de una de las dos células hijas (fig. 10-27).

Cromatina. Complejo de DNA, histona y proteínas no histonas a partir de la cual se forman los cromosomas eucariontes. La condensación de la cromatina durante la mitosis produce los cromosomas visibles en la metafase (figs. 10-19 y 10-24).

Cromatografía líquida. Grupo de técnicas bioquímicas para la separación de mezclas de moléculas sobre la base de su masa (cromatografía de filtración en gel), carga (cromatografía de intercambio iónico) o la capacidad de unirse específicamente a otras moléculas (cromatografía de afinidad). Estas técnicas suelen utilizarse para separar y purificar proteínas (fig. 3-34).

Cromosoma homólogo. Una de las dos copias de cada tipo morfológico de cromosoma presente en una célula **diploide;** también denominado *homólogo*. Cada homólogo deriva de un progenitor diferente.

Cromosoma politénico. Cromosoma agrandado compuesto de numerosas copias paralelas de sí mismo formadas por múltiples ciclos de replicación del DNA sin separación cromosómica. Los cromosomas politénicos, que tienen patrones de bandas altamente reproducibles, se encuentran en las glándulas salivales y algunos otros tejidos de *Drosophila* y otros insectos dípteros (figs. 10-30 y 10-31).

Cromosomas. En los eucariontes, unidad estructural del material genético que consiste en una única molécula de DNA lineal de hebra doble y las proteínas asociadas. En la mayoría de los procariontes, una única molécula de DNA circular de hebra doble constituye la mayor parte del material genético. Véase también **Cariotipo** y **Cromatina.**

Cuerpo basal. Estructura de la base de los cilios y flagelos desde donde se irradian los microtúbulos que componen el axonema; estructuralmente similares a un centríolo.

DAG. Véase **Diacilglicerol.**

Dalton. Unidad de masa molecular equivalente a la masa de un átomo de hidrógeno ($1{,}66 \times 10^{-24}$ g).

Dedos de cinc. Varios motivos de unión al DNA relacionados, compuestos de estructuras secundarias plegadas alrededor de un ion de cinc; presentes en numerosos factores de **transcripción** eucariontes (figs. 3-6b y 11-21).

Dendrita. Prolongación que se extiende desde el cuerpo celular de una neurona, es relativamente corta, presenta ramificaciones y recibe señales desde los axones de otras neuronas (fig. 7-29).

Desacoplante. Agente que disipa la **fuerza protón-motriz** a través de la membrana mitocondrial interna o membrana tilacoide de los cloroplastos, inhibiendo de esta forma la síntesis de ATP.

Desarrollo. Proceso global que implica el crecimiento y la **diferenciación** por medio del cual un huevo fecundado da origen a una planta o a un animal adulto, incluida la formación de los distintos tipos celulares, tejidos y órganos.

Desmosomas. Véase **Uniones de anclaje.**

Desnaturalización. Alteración drástica de la **conformación** de una proteína o un ácido nucleico debido a la rotura de diversos enlaces no covalentes causados por el calentamiento o la exposición a ciertos compuestos químicos; casi siempre produce la pérdida de la función biológica.

Despolarización. Cambio del potencial eléctrico negativo de la cara citosólica que suele existir a través de la membrana plasmática de una célula en reposo y da como resultado un **potencial de membrana** menos negativo.

Determinación. En la embriogénesis, modificación sufrida por una célula que la compromete a una vía de desarrollo particular (destino celular).

Diacilglicerol (DAG). Segundo mensajero unido a la membrana producido por la escisión de **fosfoinosítidos** en respuesta a la estimulación de ciertos receptores de la superficie celular (figs. 13-7 y 13-28).

Diferenciación. Proceso que suele involucrar cambios en la expresión génica mediante el cual una célula precursora se convierte en un tipo celular especializado.

Difusión facilitada. Transporte asistido por proteínas de un ion o molécula pequeña a través de una membrana celular a favor de su gradiente de concentración a una velocidad superior a la obtenida por **difusión** pasiva; también denominada *transporte facilitado*. Los transportadores de glucosa (GLUT) son ejemplos bien estudiados de proteínas que median la difusión facilitada (fig. 7-3).

Difusión pasiva (simple). Desplazamiento neto de una molécula a través de una membrana a favor de su gradiente de concentración a una velocidad proporcional al gradiente y a la permeabilidad de la membrana.

Dineínas. Clase de proteínas motoras que utilizan la energía liberada por la hidrólisis de ATP para desplazarse hacia el extremo (−) de los **microtúbulos.** Las dineínas pueden transportar vesículas y orgánulos, son responsables de los movimientos de cilios y flagelos, y cumplen un papel en el movimiento de los cromosomas durante la mitosis (fig. 20-22 y cuadro 20-2).

Diploide. En referencia a un organismo o célula que tiene dos conjuntos completos de **cromosomas homólogos** y por lo tanto dos copias (**alelos**) de cada gen o locus genético. Las células somáticas contienen el número diploide de cromosomas ($2n$) característico de una especie. Veáse también **Haploide.**

Disacárido. Pequeño hidrato de carbono (**azúcar**) compuesto de dos monosacáridos unidos en forma covalente por **enlaces glucosídicos.** Son ejemplos comunes la lactosa (azúcar de leche) y la sacarosa, uno de los principales productos fotosintéticos de las plantas superiores (fig. 2-17).

División celular asimétrica. Cualquier división celular en la que las dos células hijas reciben los mismos genes, pero heredan componentes diferentes (p. ej., mRNA, proteínas) de la célula progenitora (fig. 22-20).

División celular. Separación de una célula en dos células hijas. En los eucariontes superiores comprende la división del núcleo (**mitosis**) y del citoplasma (**citocinesis**); a menudo se utiliza el término mitosis para referirse tanto a la división nuclear como a la citoplasmática.

DNA (ácido desoxirribonucleico). Largo polímero lineal, compuesto de cuatro tipos de nucleótidos de desoxirribosa, que es el portador de la información genética. En su estado nativo, el DNA es una doble hélice de dos hebras antiparalelas mantenidas juntas mediante enlaces de hidrógeno entre bases de purina y pirimidina complementarias (fig. 4-3).

DNA complementario (cDNA). Véase **cDNA.**

DNA de doble hélice. Estructura tridimensional más común para el DNA celular en el cual las dos hebras de polinucleótidos son antiparalelas y se entrelazan una alrededor de la otra con bases complementarias unidas por enlaces de hidrógeno (fig. 4-3).

DNA de secuencia simple. Secuencias cortas repetidas en tándem que se encuentran en los centrómeros y telómeros al igual que en otras localizaciones cromosómicas y que no se transcriben.

DNA dúplex. Véase **DNA de doble hélice.**

DNA genómico. Todas las secuencias de DNA que componen el genoma de una célula o de un organismo. Véase también **cDNA.**

DNA ligasa. Enzima que une el extremo 3′ de un fragmento de DNA con el extremo 5′ de otro y forma una hebra continua.

DNA polimerasa. Enzima que copia una hebra de DNA (la hebra molde) para formar la hebra complementaria, que compone una nueva molécula de DNA de hebra doble. Todas las DNA polimerasas añaden desoxirribonucleótidos de a uno por vez en la dirección 5′→3′ al extremo 3′ de un cebador corto preexistente de DNA o RNA.

DNA recombinante. Cualquier molécula formada in vitro por la unión de fragmentos de DNA provenientes de fuentes diferentes. Comúnmente producido al cortar moléculas de DNA con **enzimas de restricción** y luego unir los fragmentos resultantes de diferentes fuentes con la DNA ligasa.

Dominante. En genética se refiere al alelo de un gen que se expresa en el **fenotipo** de un heterocigoto; el alelo no expresado es **recesivo.** También se refiere al fenotipo asociado con un alelo dominante. Las mutaciones que producen alelos dominantes suelen dar como resultado una ganancia de función (fig. 9-2).

Dominante negativo. En genética, alelo que actúa de manera **dominante,** pero produce un efecto similar al de una pérdida de función; en general es un alelo que codifica una proteína mutante que bloquea la función de la proteína normal al unirse a ella o a una proteína ubicada **corriente arriba** o **corriente abajo,** si forma parte de una vía metabólica o de señalización.

Dominio. Región de una proteína con estructura terciaria distintiva (p. ej., globular o en forma de bastón) y actividad característica; puede haber dominios homólogos en diferentes proteínas.

Dorsal. Relacionado con el dorso de un animal o la superficie superior de una estructura (p. ej., hoja, ala).

Ectodermo. La más externa de las tres capas celulares primarias del embrión animal; da origen a los tejidos epidérmicos, el sistema nervioso y los órganos sensoriales externos. Véase también **Endodermo** y **Mesodermo** (fig. 22-7).

Edición de RNA. Tipo inusual de procesamiento del RNA en el cual se altera la secuencia de un pre-mRNA.

Efecto hidrófobo. Tendencia de las moléculas o partes de moléculas no polares para asociarse entre sí en soluciones acuosas; muy importante en la estabilización de la bicapa fosfolipídica. Se lo suele denominar *interacción* o *enlace hidrófobo* (fig. 2-9).

Electroforesis. Cualquiera de diversas técnicas para la separación de macromoléculas basada en su migración en un gel u otro medio sometido a un fuerte campo eléctrico (fig. 3-32).

Elemento móvil de DNA. Cualquier secuencia de DNA que no está presente en la misma localización cromosómica en todos los individuos de una especie y puede moverse a una nueva posición mediante **transposición**; también llamado *elemento transponible* y *repetición interacalada* (cuadro 10-1).

Elemento P. Transposón de DNA en *Drosophila* que se utiliza experimentalmente en la producción de moscas transgénicas.

Elemento proximal al promotor. Cualquier secuencia reguladora en el DNA eucarionte que se encuentra dentro de los ≈200 pares de bases del lugar de inicio de la transcripción. La transcripción de muchos genes está controlada por múltiples elementos proximales al promotor (fig. 11-12).

Embriogénesis. Desarrollo temprano de un individuo a partir de un óvulo fecundado (cigoto). En los animales, luego de la escisión del cigoto, se establecen los ejes principales durante el estadio de *blástula*; en el estadio ulterior de *gástrula*, el embrión temprano se invagina y adquiere tres capas celulares.

Empalmosoma. Complejo de ribonucleoproteínas de gran tamaño que se ensambla sobre un pre-mRNA y lleva a cabo el proceso de corte y empalme de RNA (fig. 12-9).

En dirección 3'. Para un gen, la dirección en que se mueve la RNA polimerasa durante la transcripción, la cual es hacia el extremo con un grupo hidroxilo 5' de la hebra molde de DNA. Por convención, la posición +1 de un gen es el primer nucleótido transcripto; los nucleótidos en dirección 3' de la posición +1 se designan +2, +3, etc. Véase también **En dirección 5'**.

En dirección 5'. Para un gen, la dirección opuesta a la cual se mueve la RNA polimerasa durante la transcripción. Por convención, la posición +1 en un gen es la primera base transcripta; los nucleótidos en dirección 5' de la posición +1 se denominan −1, −2, etc. 2) Véase también **En dirección 3'**.

Endocitosis mediada por receptor. Incorporación de materiales extracelulares unidos a receptores de superficie celular por invaginación de la membrana plasmática para formar una vesícula pequeña delimitada por membrana (endosoma temprano) (fig. 17-28).

Endocrino. Mecanismo de señalización por el cual células secretorias especializadas, generalmente presentes en glándulas (p. ej., hipófisis, tiroides) liberan una hormona hacia la sangre, alcanzan células diana que se encuentran a distancia y producen una respuesta en éstas.

Endodermo. La más interna de las tres capas celulares primarias del embrión animal; da origen al intestino y a la mayor parte del aparato respiratorio. Véase Ectodermo y Mesodermo (fig. 22-7).

Endosoma tardío. Compartimiento delimitado por membrana que participa en la clasificación de enzimas lisosómicas y en el reciclado de receptores endocitados de la membrana plasmática. El pH ácido interno de los endosomas tardíos hace que los ligandos se disocien de sus proteínas receptoras unidas a la membrana (figs. 17-1 y 17-28).

Endotelio. Capa de células altamente aplanadas que forma el revestimiento interior de todos los vasos sanguíneos y regula el intercambio de materiales entre el torrente sanguíneo y los tejidos circundantes; presenta una **lámina** basal subyacente.

Energía de activación. Suministro de energía requerido para que, superadas las barreras energéticas, se inicie una reacción química. A través de la disminución de la energía de activación, una enzima incrementa la velocidad de una reacción (fig. 3-16).

Energía libre (G). Medida de la energía potencial de un sistema, que es una función de la **entalpía** (*H*) y la **entropía** (*S*).

Enlace covalente. Fuerza química estable que mantiene unidos los átomos de las moléculas al compartir uno o más pares de electrones. Ese enlace tiene una fuerza de 50-200 kcal/mol, mucho mayor que la de las **interacciones no covalentes.**

Enlace de alta energía. Enlace covalente que libera gran cantidad de energía cuando se hidroliza en condiciones intracelulares normales. Los ejemplos incluyen los enlaces fosfoanhidridos en el ATP el enlace tioéster en el acetil CoA y diversos enlaces éster fosfato.

Enlace de hidrógeno. Interacción no covalente entre un átomo (comúnmente oxígeno o nitrógeno) portador de una carga parcial negativa y un átomo de hidrógeno portador de una carga parcial positiva. Particularmente importante para la estabilización de la estructura tridimensional de proteínas y la formación de pares de bases entre las hebras de ácidos nucleicos (fig. 2-6).

Enlace disulfuro (–S–S–). Enlace covalente común entre los átomos de azufre sobre dos residuos de cisteína en diferentes proteínas o en diferentes partes de la misma proteína; por lo general, se encuentra en las proteínas extracelulares o en los dominios proteicos y muy rara vez en las proteínas citosólicas.

Enlace fosfoanhidrido. Tipo de enlace de alta energía formado entre dos grupos fosfatos, como los fosfatos γ y β, y los fosfatos α y β del ATP (fig. 2-24).

Enlace fosfodiéster. Enlace químico entre nucleótidos adyacentes en el DNA y el RNA; en realidad consiste en dos enlaces fofoéster, uno en el lado 5′ del fosfato y otro en el lado 3′ (fig. 4-2).

Enlace glucosídico. Unión covalente entre dos residuos de monosacáridos formados por una reacción de deshidratación en la cual un carbono, por lo general el carbono-1, de un azúcar reacciona con un grupo hidroxilo sobre un segundo azúcar con la pérdida de una molécula de agua (fig. 2-11).

Enlace peptídico. Enlace amida covalente entre aminoácidos formado por la reacción de deshidratación entre el grupo amino de un aminoácido y el grupo carboxilo de otro con la liberación de una molécula de agua (fig. 2-11).

Ensayo de movilidad electroforética (EMSA). Método semicuantitativo para determinar las proteínas que se unen a secuencias específicas de DNA basado en la migración disminuida en electroforesis en gel de un fragmento de DNA marcado cuando está unido a una proteína (fig. 11-14).

Entalpía (H). Calor; en una reacción química la entalpía de los reactantes o productos es igual a la energía total de sus enlaces.

Entrecruzamiento (*crossing over*). Intercambio de material genético entre las cromátidas maternas y paternas durante la meiosis para producir cromosomas recombinados. Véase también **Recombinación** (fig. 9-45).

Entropía (S). Medida del grado de desorden o aleatoriedad de un sistema; cuanto más alta sea la entropía, mayor será el desorden.

Envoltura nuclear. Estructura de doble membrana que rodea el núcleo; la membrana externa se continúa con el retículo endoplasmático y las dos membranas están perforadas por **complejos de poro nuclear** (fig. 5-19).

Envoltura viral. Bicapa fosfolipídica que forma la cubierta externa de algunos virus (p. ej., influenza y virus de la rabia) derivada por brotación a partir de la membrana de una célula huésped y que contiene glucoproteínas codificadas por el virus (fig. 4-41).

Enzima de restricción (endonucleasa). Cualquier enzima que en las moléculas de DNA hebra doble reconoce y escinde una secuencia específica corta, el sitio de restricción. Estas enzimas están ampliamente difundidas en las bacterias y funcionan para degradar el DNA foráneo incorporado por una célula bacteriana. Se utilizan in vitro de manera habitual para producir DNA recombinante (cuadro 9-1 y fig. 9-10).

Enzima. Proteína que cataliza una reacción química que involucra un sustrato específico o un pequeño número de sustratos relacionados.

Epitelio. Cubierta parecida a una lámina compuesta de una o más capas de células fuertemente adheridas, sobre superficies del cuerpo externas e internas (fig. 6-4).

Epítopo. Parte de una molécula de antígeno que se une a un anticuerpo; también llamada *determinante antigénico*.

Equilibrio químico. Estado de una reacción química en el cual la concentración de todos los productos y reactantes es constante debido a que las velocidades de las reacciones directa e inversa son iguales.

Eritropoyetina (Epo). Citosina secretada por células del riñón en respuesta a bajos niveles sanguíneos de oxígeno que desencadena la producción de glóbulos rojos mediante la inducción de la proliferación y diferenciación de las células progenitoras eritroides en la médula ósea (figs. 14-7 y 22-5).

Esfingolípidos. Grupo principal de lípidos de membrana derivados de la esfingosina; contienen dos cadenas hidrocarbonadas largas y un grupo cabeza fosforilado (esfingomielina) o un grupo cabeza de carbohidratos (cerebrósidos, gangliósidos) (fig. 5-5).

Espiral enrollada. Motivo estructural proteico caracterizado por regiones α-helicoidales anfipáticas que pueden autoasociarse para formar proteínas oligoméricas estables con forma de bastón; suelen hallarse en las proteínas fibrosas y en ciertos factores de transcripción (fig. 3-6c).

Estado de equilibrio dinámico. En las vías metabólicas celulares, condición en la cual la velocidad de formación y la velocidad de consumo de una sustancia son iguales, de manera tal que su concentración permanece constante (fig. 2-21).

Esteroides. Grupo de hidrocarburos de cuatro anillos que incluyen el **colesterol** y compuestos relacionados. Muchas hormonas importantes (p. ej., estrógeno y progesterona) son esteroides.

Esteroisómeros. Dos compuestos con fórmulas moleculares idénticas cuyos átomos están conectados en el mismo orden, pero en disposiciones espaciales diferentes. En los isómeros ópticos, designados D y L, los átomos unidos a un átomo de carbono asimétrico se disponen en forma de imagen especular. Los isómeros geométricos incluyen las formas *cis* y *trans* de moléculas que contienen un enlace doble.

Esteroles. Esteroides con un grupo hidroxilo que componen las membranas eucariontes (fig. 18-6).

Estructura cuaternaria. Número y posiciones relativas de las cadenas polipeptídicas de las proteínas formadas por multisubunidades.

Estructura primaria. En las proteínas, disposición lineal (secuencia) de aminoácidos y ubicación de enlaces covalentes (principalmente enlaces disulfuro) dentro de una cadena polipeptídica.

Estructura secundaria. En las proteínas, plegamiento local de una cadena polipeptídica en estructuras regulares, incluidas la **hélice α**, la **lamina β**, los giros con forma de U y con bucles.

Estructura terciaria. En las proteínas, forma tridimensional general de una cadena polipetídica estabilizada por interacciones entre cadenas laterales.

Eubacteria. Clase de **procariontes** que constituye uno de los tres linajes evolutivos de los organismos actuales; también denominadas *bacterias verdaderas* o sólo *bacterias*. Filogenéticamente son distintas de **arquea** y de los **eucariontes** (fig. 1-3).

Eucariontes. Clase de organismos compuestos de una o más células que contienen un núcleo y orgánulos rodeados por membrana, que constituyen uno de tres linajes evolutivamente distintivos de los organismos actuales; también denominados *eucaria*. Incluye todos los organismos excepto los virus y los procariontes (fig. 1-3).

Eucromatina. Porciones de **cromatina** menos condensada, que incluyen la mayoría de las regiones que se transcriben presentes en los cromosomas en interfase. Véase también **Heterocromatina**.

Exocitosis. Liberación de moléculas intracelulares (p. ej., hormonas, proteínas de la matriz) contenidas dentro de una vesícula delimitada por membrana mediante fusión de la vesícula con la membrana plasmática de una célula. Éste es el proceso por el cual se secretan la mayoría de las moléculas de las células eucariontes.

Exón. Segmento de un gen eucarionte (o de su **transcripto** primario) que alcanza el citoplasma como parte de un mRNA maduro, rRNA o molécula de tRNA. Véase también **Intrón**.

Exosomas. Grandes complejos que contienen exonucleasa que degradan intrones descartados por el proceso de corte y empalme de intrones y pre-mRNA procesados inapropiadamente en el núcleo y mRNA con colas poli(A) acortadas en el citoplasma.

Exportador de mRNA. Proteína heterodimérica que se une a las partículas ribonucleoproteicas que contienen mRNA (mRNP) y dirige su salida del núcleo hacia el citoplasma interactuando transitoriamente con las **nucleoporinas** en el complejo del poro nuclear (fig. 12-24).

Exportina. Proteína que une una proteína "carga" en el núcleo y con la ayuda de Ran (un miembro de la **superfamilia de las GTPasa**) transportan la carga a través de un complejo de poro nuclear hasta el citoplasma. Véase también **Importina** (véase fig. 12-23).

Expresión génica. Proceso global mediante el cual se convierte la información codificada en un gen en un **fenotipo** observable (por lo general la producción de una proteína).

Expresión. Véase **Expresión génica**.

Factor de crecimiento. Molécula polipeptídica que se une a un receptor de la superficie celular y desencadena una vía de señalización intracelular que induce la proliferación de la célula.

Factor de crecimiento transformador beta (TGFβ). Familia de proteínas de señalización que se utilizan en el desarrollo de casi

todos los tejidos en la mayoría o la totalidad de los animales. El nombre refleja la forma en que se descubrió; las funciones son mucho más diversas. El TGFβ inhibe la proliferación más frecuentemente de lo que la estimula. Las mutaciones en los componentes de traducción de señales del TGFβ están involucradas en el cáncer humano, incluido el cáncer de mama.

Factores de crecimiento epidérmico (EGF). Familia de proteínas secretorias de señalización que se utilizan en el desarrollo de casi todos los tejidos en la mayoría o en todos los animales. El nombre refleja el modo de descubrimiento; las funciones son mucho más diversas. Los receptores son tirosincinasas. Las mutaciones en los componentes de transducción de señales de los EGF están implicadas en el cáncer humano, incluido el cáncer cerebral.

Factores de crecimiento de fibroblastos (FGF). Familia de proteínas de señalización que se utilizan en el desarrollo de casi todos los tejidos en la mayoría o en todos los animales. El nombre refleja el modo de descubrimiento; las funciones son mucho más diversas. Los FGF a menudo son angiogénicos o mitogénicos. Los receptores son tirosincinasas y algunas mutaciones receptoras están asociadas con defectos congénitos hereditarios.

Factor de elongación. Uno de un grupo de proteínas no ribosómicas necesarias para la **traducción** continua de mRNA (síntesis de proteínas) después de la iniciación (fig. 4-26).

Factor de iniciación. Una de un conjunto de proteínas que favorecen la asociación adecuada de los ribosomas y el mRNA que se requiere para la iniciación de la **traducción** (síntesis proteica) (fig. 4-25).

Factor de liberación. Uno de dos tipos de proteínas no ribosómicas que reconoce codones de terminación en el mRNA y promueve la liberación de la cadena polipeptídica completa, terminando de este modo la **traducción** (síntesis de proteínas) (fig. 4-29).

Factor de terminación. Véase **Factor de liberación**.

Factor de transcripción (TF). Término general para cualquier proteína, diferente de la RNA polimerasa, necesaria para iniciar o regular la transcripción en las células eucariontes. Los factores generales, necesarios para la transcripción de todos los genes, participan en la formación del complejo de preiniciación de la transcripción cerca del sitio de inicio. Los factores específicos estimulan (activadores) o inhiben (represores) la transcripción de genes en particular mediante la unión a sus secuencias reguladoras.

Factor general de transcripción (GTF). Véase **Factor de transcripción.**

Factor promotor de la mitosis. Véase **MPF.**

FAD (flavina adenina dinucleótido). Transportador de electrones difundible que acepta dos electrones de una molécula donadora y dos H^+ de la solución. En las mitocondrias, la forma reducida, $FADH_2$, transfiere electrones a los transportadores que actúan en la **fosforilación oxidativa** (fig. 2-26b).

Fago. Véase **Bacteriófago.**

Fagocitosis. Proceso por el cual las partículas relativamente grandes (p. ej., células bacterianas) son internalizadas específicamente por ciertas células eucariontes; diferente de la **endocitosis mediada por receptores** (fig. 5-20).

Familia Bcl-2. Familia de proteínas que por lo general se localizan en las mitocondrias y estimulan o inhiben la apoptosis.

Familia de genes. Conjunto de genes que surgieron por duplicación de un gen ancestral común y la posterior divergencia debido a pequeños cambios en la secuencia nucleotídica (fig. 9-32).

Familia de proteínas. Conjunto de proteínas homólogas codificadas por una **familia de genes**.

Fase M (mitosis). Véase **Ciclo celular.**

Fase S (síntesis). Véase **Ciclo celular.**

Fases G_0, G_1, G_2. Véase **Ciclo celular.**

Fenotipo. Características físicas y fisiológicas detectables de una célula u organismo determinadas por su genotipo; también, rasgo específico asociado con un **alelo** en particular.

Feromona. Molécula señal liberada por un individuo que puede alterar el comportamiento o la expresión génica de otros individuos de la misma especie. Los factores de tipo de apareamiento a y α de las levaduras son ejemplos bien estudiados.

Fibroblasto. Tipo común de célula del tejido conectivo que secreta colágeno y otros componentes de la **matriz extracelular**. Migra y prolifera durante la cicatrización de heridas y en el cultivo de tejidos.

Fibronectina. Véase **Proteínas multiadhesivas de la matriz.**

Fijación del carbono. Véase **Ciclo de Calvin.**

Filamento intermedio. Fibra del citoesqueleto (de 10 nm de diámetro) formada por polimerización de diversas clases de subunidades proteicas, incluyen queratinas, laminas y vimentinas. Los filamentos intermedios constituyen las principales proteínas estructurales de la piel y el pelo; forman el armazón que mantiene en su lugar los discos Z y las miofibrillas del músculo y proporcionan sostén a las membranas celulares (fig. 19-33).

FISH. Véase **Hibridación in situ con fluorescencia.**

Flagelo. Larga estructura locomotriz que se extiende desde la superficie de una célula eucarionte, cuyo movimiento de flexión, como un látigo, impulsa la célula hacia adelante y hacia atrás. En general solo hay un flagelo por célula (como en los espermatozoides). Los flagelos bacterianos son estructuras más pequeñas y mucho más simples. Véase también **Axonema** y **Cilio**.

Flipasa. Proteína que facilita el movimiento de lípidos de membrana de una hojuela a la otra de una bicapa fosfolipídica (figs. 7-12 y 18-4).

Fluorocromo. Molécula que absorbe luz a una longitud de onda y emite luz a otra (superior); también denominada *colorante fluorescente*. La fluoresceína, que emite luz verde, y la rodamina, que emite luz roja, son dos fluorocromos de uso frecuente.

***Footprinting* (huellas de DNA).** Técnica para identificar regiones de DNA o RNA de unión a proteínas, basada en la capacidad de una proteína unida a una región de DNA o RNA para proteger esa región de la digestión (fig. 11-13a).

Fosfatasa. Enzima que modifica un grupo fosfato de un sustrato por hidrólisis. Las fosfoproteinfosfatasas actúan con las proteincinasas para controlar la actividad de muchas proteínas celulares (fig. 3-30).

Fosfoglicéridos. Derivados anfipáticos de glicerol 3-fosfato que son los lípidos más abundantes en las biomembranas. Por lo general, consisten en dos cadenas de acilos grasos esterificadas a los grupos hidroxilo del glicerol y un grupo cabeza polar adherido al fosfato (fig. 5-5a).

Fosfoinosítidos. Grupo de lípidos unidos a membrana que contienen derivados fosforilados del inositol; algunos actúan como segundos mensajeros en diversas vías de transducción de señales (figs. 14-26 y 14-27).

Fosfolipasa. Una de varias enzimas que cortan diversos enlaces en el extremo hidrófilo de los **fosfolípidos**. La fosfolipasa C actúa sobre un derivado del fosfatidilinositol para generar dos segundos mensajeros: DAG e IP_3 (figs. 5-9 y 13-28).

Fosfolípidos. Clase principal de lípidos presente en las biomembranas, incluidos los fosfoglicéridos y la esfingomielina (fig. 5-5).

Fosforilación a nivel de sustrato. Formación de ATP a partir de ADP y P_i catalizada por enzimas citosólicas en reacciones que no dependen de una fuerza protón-motriz.

Fosforilación oxidativa. Fosforilación de ADP para formar ATP debido a la transferencia de electrones al oxígeno (O_2) en bacterias y mitocondrias. Este proceso implica la generación de una fuerza motriz de protones durante el transporte de electrones y su posterior utilización para impulsar la síntesis de ATP (fig. 8-7).

Fotorrespiración. Vía de reacción que compite con la fijación del CO_2 (ciclo de Calvin) por el consumo de ATP y la generación de CO_2, reduciendo en consecuencia la eficiencia de la fotosíntesis (fig. 8-43).

Fotosíntesis. Serie compleja de reacciones que tiene lugar en algunas bacterias y en los cloroplastos de las plantas, en la cual se utiliza la energía lumínica para generar hidratos de carbono a partir de CO_2, por lo general con consumo de H_2O y formación de O_2.

Fotosistemas. Complejos multiproteicos presentes en todos los organismos fotosintéticos que absoben la energía de la luz y la convierten en energía química. Un fotosistema está compuesto de complejos recolectores de luz que contienen **clorofilas** y un centro de reacción que contiene dos moléculas de clorofila donde tiene lugar el transporte fotoelectrónico.

Fragmento(s) de Okazaki. Fragmentos cortos de DNA de hebra simple que se forman durante la síntesis de la **hebra rezagada** durante la replicación del DNA, que es unido rápidamente por la DNA ligasa para formar una hebra de DNA continua (fig. 4-33).

Fragmento de restricción. Fragmento definido de DNA obtenido por la escisión realizada con una enzima de **restricción** en particular. Estos fragmentos se utilizan para la producción de moléculas de DNA recombinante y en la clonación del DNA.

Fuerza protón-motriz. Energía equivalente al gradiente de concentración de protones (H^+) y al gradiente del potencial eléctrico a través de una membrana; utilizada para impulsar la síntesis de ATP mediante la acción de la **ATP sintasa**, el transporte de moléculas contra su gradiente de concentración y el movimiento de los flagelos bacterianos (fig. 8-1).

GAG. Véase **Glucosaminoglucano.**

Gameto. Célula **haploide** especializada en la reproducción sexual (en los animales, espermatozoides u óvulo) producida por **meiosis** de células germinales; la unión de un espermatozoide y un óvulo inicia el desarrollo de un nuevo individuo.

Gen. Unidad física y funcional de herencia que transporta información de una generación a la siguiente. En términos moleculares, es la secuencia completa de DNA –incluidos exones, intrones y regiones no codificantes de control de la transcripción– necesaria para la producción de una proteína funcional o RNA. Véase también **Unidad de transcripción.**

Gen indicador (informador). Gen que codifica una proteína que se analiza fácilmente (p. ej., la β galactosidasa, la luciferasa). Los genes indicadores se utilizan en diversos tipos de experimentos para indicar la activación de un promotor al cual se los une.

Gen knockout. Desactivación selectiva de un gen específico al reemplazarlo con un alelo no funcional (desestabilizador) en un organismo que de otra forma sería normal.

Gen supresor de tumores. Cualquier gen que codifica proteínas que inhiben directa o indirectamente la progresión a través del ciclo celular y en el cual una mutación con pérdida de función es oncogénica. La herencia de un único alelo mutante de muchos genes supresores de tumores (p. ej., *RB*, *APC* y *BRCA1*) incrementa enormemente el riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer.

Genes de polaridad de segmento. En *Drosophila*, grupo de genes (p. ej., ***engrailed***, ***hedgehog***, ***wingless***) que actúan en los eventos de determinación del patrón final dentro de los segmentos del cuerpo al comienzo de la embriogénesis. El patrón de expresión de estos y otros genes de determinación inicial confiere destinos celulares exclusivos a lo largo del eje anteroposterior (fig. 15-24).

Genes gap. En *Drosophila*, grupo de genes (p. ej., ***hunchback***, ***Krüppel***, ***knirps***) que se activan en el embrión temprano por factores de transcripción producidos a partir de mRNA maternos presentes en el cigoto; todos codifican factores de transcripción que actúan en el modelado temprano a lo largo del eje anteroposterior (fig. 15-22a).

Genes Hox. Grupo de genes importantes desde la perspectiva evolutiva que codifican factores de transcripción que contiene homeodominios y ayudan a determinar el diseño corporal de los animales. Las mutaciones en los genes Hox a menudo producen **homeosis.**

Genes *pair-rule*. En *Droshopila*, grupo de genes (p. ej., ***evenskipped***, ***fushi tarazu*** y ***paired***) que se expresan en bandas alternas a lo largo del eje anteroposterior de los embriones tempranos de *Drosophila*. Todos codifican factores de transcripción y actúan, junto con los genes gap y los genes de polaridad de segmento, en la determinación de los segmentos corporales de las moscas (fig. 15-24).

Genoma. Total de la información genética transportada por una célula o un organismo.

Genómica. Análisis comparativo de las secuencias genómicas completas de diferentes organismos; se utiliza para evaluar las relaciones evolutivas entre las especies y predecir la cantidad y los tipos generales de proteínas producidas por un organismo.

Genoteca. Colección de moléculas de DNA clonadas, compuestas de fragmentos de la totalidad del genoma (***genoteca genómica***) o de copias de DNA de todos los mRNA producidos por un tipo celular (***genoteca de cDNA***) insertados en un vector de clonación apropiado.

Genotipo. Constitución genética completa de una célula individual u organismo, en la que generalmente se destacan alelos particulares en uno o más locus específicos.

Glucagón. Hormona peptídica producida por las células α del páncreas que desencadena la conversión hepática de glucógeno en glucosa; actúa en combinación con la **insulina** para controlar los niveles de glucosa en sangre.

Glucógeno. Polisacárido ramificado muy largo, compuesto exclusivamente de unidades de glucosa, constituye el principal hidrato de carbono de almacenamiento en los animales. Se encuentra principalmente en las células musculares y hepáticas.

Glucolípidos. Cualquier lípido al cual está unido en forma covalente una cadena corta de carbohidratos; suele hallarse en la membrana plasmática.

Glucólisis. Vía metabólica en la cual los azúcares se degradan anaeróbicamente a lactato o piruvato en el citosol con la producción concomitante de ATP (fig. 8-4).

Glucoproteína. Cualquier proteína a la cual están unidas en forma covalente una o más cadenas de oligosacáridos. La mayoría de las proteínas secretadas y muchas proteínas intermembrana son glucoproteínas.

Glucosa. Monosacárido de seis carbonos (azúcar), principal combustible metabólico en la mayoría de las células. Los principales polímeros de la glucosa, glucógeno y almidón, se utilizan para almacenar energía en las células animales y vegetales, respectivamente.

Glucosaminglucano (GAG). Largo polímero lineal, altamente cargado, de un disacárido repetido, en el cual un miembro del par suele ser un azúcar ácido (ácido urónico) y el otro es un aminoazúcar. Generalmente muchos residuos suelen estar sulfatados. Los GAG son uno de los componentes principales de la matriz extracelular, por lo general como componentes de **proteoglucanos** (figs. 6-17 y 6-19).

GMP cíclico (cGMP). Segundo mensajero que abre canales de cationes en los bastones de la retina y activa la proteincinasa G en células del músculo liso vascular y de otro tipo (fig. 13-7).

Gradiente electroquímico. Fuerza conductora que determina la dirección energéticamente favorable del transporte de un ion (o molécula cargada) a través de la membrana. Representa la influencia combinada del gradiente de concentración del ion a través de la membrana y del potencial de membrana.

Grupo sulfhidrilo (-SH). Grupo sustituto presente en el aminoácido cisteína y otras moléculas que consiste en un átomo de hidrógeno unido en forma covalente a un átomo de azufre; también llamado *grupo tiol*.

GTP (guanosín 5-trifosfato). Nucleótido precursor en la síntesis de RNA que también cumple un papel especial en la síntesis de proteínas, las vías de transducción de señales y el ensamblaje de microtúbulos.

Haploide. En referencia a un organismo o célula que tiene sólo un miembro de cada par de **cromosomas homólogos** y por lo tanto sólo una copia (**alelo**) de cada gen o locus genético. Los gametos y las células bacterianas son haploides. Véase también **Diploide.**

Haz contráctil. Haces de **actina** y **miosina** en las células no musculares que actúan en la adhesión celular (p. ej., fibras de tensión) o en el movimiento celular (anillo contráctil de las células en división).

Hebra conductora. Una de las dos hebras de DNA formadas en una **horquilla de replicación** mediante síntesis continua en dirección 5′ → 3′. La dirección de la síntesis de la hebra conductora es la misma que el movimiento de la horquilla de replicación. Véase también **Hebra rezagada** (fig. 4-33).

Hebra rezagada. Una de las dos hebras de DNA hijas formadas en una **horquilla de replicación** como segmentos cortos discontinuos (fragmentos de Okazaki), que luego se unen. Aunque la síntesis global de hebras rezagadas tiene lugar en la dirección 3′ → 5′, cada segmento se sintetiza en la dirección. 5′ → 3′. Véase también **Hebra conductora** (fig. 4-33).

Hedgehog (Hh). Familia de proteínas de señalización secretadas que se usan en el desarrollo de muchos tejidos de la mayoría o de casi todos los animales. Las proteínas Hh inicialmente se sintetizan como precursores más largos. La parte C-terminal del precursor tiene actividad autoproteolítica y corta la molécula para liberar la mitad N-terminal de señalización. En este proceso una molécula de colesterol se une en forma covalente al extremo carboxilo del péptido de señalización. Las mutaciones en los componentes de transducción de señales Hh están implicadas en el cáncer humano y en los defectos de nacimiento. El receptor es la proteína transmembrana Patched.

Helicasa. Cualquier enzima que se desplaza a lo largo de un dúplex de DNA utilizando la energía liberada por la hidrólisis de ATP para separar (desenrollar) las dos hebras. Necesaria para la replicación de DNA.

Hélice alfa (α). Estructura secundaria frecuente de las proteínas, en la cual la secuencia lineal de aminoácidos se pliega en una espiral con giro hacia la derecha estabilizada mediante enlaces de hidrógeno entre los grupos carboxilo y amida del esqueleto aminoacídico (fig. 3-3).

Hélice-bucle-hélice. Motivo estructural conservado que se encuentra en muchas proteínas de unión al Ca^{2+} y en factores de transcripción diméricos de eucariontes (figs. 3-6a y 11-22b).

Hélice-bucle-hélice básico (bHLH). Motivo estructural conservado del dominio de unión al DNA de una clase de **factores de transcripción** diméricos de los eucariontes (fig. 11-22b).

Hemidesmosoma. Véase **Unión de anclaje.**

Heterocigoto. En referencia a una célula u organismo diploide que tiene dos alclos diferentes de un gen en particular.

Heterocromatina. Regiones de la **cromatina** que permanecen muy condensadas y transcripcionalmente inactivas durante la interfase.

Hexosa. Monosacárido de seis carbonos.

Hialuronano. Glucosaminoglucano grande altamente hidratado (GAG) que es el principal componente de la matriz extracelular; también se lo denomina *ácido hialurónico* y *hialuronato*. Imparte rigidez y elasticidad al igual que una cualidad lubricante a muchos tipos de tejidos conectivos (fig. 6-17).

Hibridación in situ con fluorescencia (FISH). Cualquiera de diversas técnicas relacionadas para detectar secuencias específicas de DNA o RNA en células y tejidos mediante el tratamiento de las muestras con **sondas** fluorescentes que se hibridan a la secuencia de interés y la observación de las muestras con un microscopio de fluorescencia.

Hibridación in situ. Cualquier técnica para detectar secuencias de DNA o RNA específicas en células y tejidos al tratar muestras con **sondas** de RNA o DNA de hebra simple que se hibridan a la secuencia de interés (fig. 15-3).

Hibridación. Asociación de dos hebras de ácidos nucleicos complementarias para formar moléculas de hebra doble, que pueden contener dos hebras de DNA, dos hebras de RNA o una hebra de DNA y otra de RNA. Empleada experimentalmente en diversas formas para detectar secuencias específicas de DNA o de RNA.

Hibridoma. Clon de células híbridas inmortales que producen **anticuerpos monoclonales;** formados por fusión de linfocitos B normales, productores de anticuerpos, con células de mieloma (fig. 6-38).

Hidrato de carbono. Término general para ciertos polihidroxialdheidos, polihidroxicetonas o compuestos derivados de éstos que generalmente tienen la fórmula $(CH_2O)_n$. Principal tipo de compuesto empleado para almacenar y abastecer de energía a las células animales (fig. 2-16).

Hidrófilo. Que interactúa efectivamente con el agua. Véase también **Polar.**

Hidrófobo. Que no interactúa efectivamente con el agua; en general, poco soluble o insoluble en agua. Véase también **No polar.**

Hipertónico. En referencia a una solución externa cuya concentración de solutos es lo suficientemente elevada para inducir el desplazamiento del agua hacia el exterior de las células por ósmosis.

Hipotónico. En referencia a una solución externa cuya concentración de solutos es lo suficientemente baja para inducir el desplazamiento del agua hacia el interior de las células por ósmosis.

Histonas. Una de varias pequeñas proteínas básicas altamente conservadas, que se encuentran en la **cromatina** de todas las células eucariontes, que se asocian con DNA en el **nucleosoma** (figs. 10-20 y 10-21).

Homeodominio. Motivo de unión al DNA conservado que se encuentra en muchos factores de transcripción importantes desde el punto de vista del desarrollo.

Homeosis. Transformación de una parte del cuerpo en otra que se presenta a causa de una mutación en ciertos genes críticos para el desarrollo o una mala expresión de éstos.

Homocigoto. En referencia a una célula diploide u organismo con dos **alelos** idénticos de un gen en particular.

Homología. Similitud en las características (p. ej., secuencias de proteína y de ácidos nucleicos o la estructura de un órgano) que reflejan un origen evolutivo común. Las moléculas o secuencias que muestran homología se denominan homólogas. En cambio, se denomina analogía a la similitud en la estructura o función que no refleja un origen evolutivo común.

Homólogos. Proteínas o genes que exhiben **homología.**

Hormona. Término general para cualquier sustancia extracelular que induce respuestas específicas en las células diana; específicamente, las moléculas de señalización que circulan en la sangre y median la señalización **endocrina.**

Horquilla de crecimiento. Véase **Horquilla de replicación.**

Horquilla de replicación. Sitio en el cual se separan las dos hebras del DNA de hebra doble, que son utilizadas como molde para la formación de una hebra complementaria mediante adición de desoxirribonucleótidos sobre cada una de ellas; también llamada *horquilla de crecimiento* (fig. 4-33).

Huso mitótico. Véase **Aparato mitótico.**

IgCAM. Familia de **moléculas de adhesión celular** que contienen múltiples dominios de inmunoglobulina (Ig) y median las interacciones intercelulares independientes del Ca^{2+}. Las IgCAM se producen en diversos tejidos y son componentes de las **uniones estrechas** (fig. 6-2).

Importinas. Proteínas que unen una proteína "carga" en el citoplasma y la transportan a través del complejo de poro nuclear al núcleo. El regreso de las importinas al citoplasma requiere la asistencia de Ran (un miembro de la superfamilia de las **GTPasas**) Véase también **Exportina** (fig. 12-21).

In vitro. Denota un reacción o proceso que tiene lugar en un extracto libre de células aislado; en ocasiones se emplea para distinguir las células que crecen en cultivo de las que se encuentran en un organismo.

In vivo. En una célula u organismo íntegros.

Incorporación lipídica selectiva. Entrada en las células, dependiente de receptores, de componentes específicos (p. ej., ésteres de colesterol) de ciertas lipoproteínas; se distingue de la **endocitosis mediada** por receptores de partículas lipoproteicas enteras (fig. 18-16).

Inducción. 1) En embriogénesis, un cambio en el destino evolutivo de una célula o tejido causado por la interacción directa con otra célula o tejido o con una molécula de señalización extracelular. 2) En metabolismo, incremento en la síntesis de una enzima o conjunto de enzimas mediado por una molécula específica (inductor).

Inhibición lateral. Proceso de desarrollo importante en el cual la señal Notch u otro tipo de señalización causa que células adyacentes, equivalentes o casi equivalentes asuman destinos diferentes (fig. 15-36).

Inmunohistoquímica. Tinción de células y tejidos con un anticuerpo marcado con un fluorocromo específico para una proteína en particular; técnica común para localizar proteínas específicas en muestras fijadas (fig. 5-45).

Inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). Segundo mensajero intracelular producido por escisión de fosfoinosítidos en respuesta a la estimulación de ciertos receptores de la superficie celular. IP_3 desencadena la liberación del Ca^{2+} almacenado en el retículo endoplasmático (figs. 13-7 y 13-29).

Insulina. Hormona proteica producida por las células β del páncreas que estimula la captación de glucosa en las células musculares y lipídicas; actúa con el **glucagón** para contribuir a regular los niveles de glucosa en sangre. La insulina también funciona como factor de crecimiento para muchas células.

Integrinas. Gran familia de proteínas transmembrana heterodiméricas que favorecen la adhesión de células a la matriz extracelular o a la superficie de otras células (cuadro 6-2).

Interacción iónica. Interacción no covalente entre un ion cargado positivamente (catión) y un ion cargado negativamente (anión); por lo general se lo denomina *enlace iónico*.

Interacción no covalente. Cualquier interacción química relativamente débil que no involucre compartir electrones. Las interac-

ciones múltiples no covalentes a menudo estabilizan la conformación de las macromoléculas y median la unión altamente específica entre proteínas (p. ej., un antígeno y un anticuerpo).

Interacciones de Van der Waals. Interacción no covalente débil debida a una pequeña distribución asimétrica de electrones de naturaleza transitoria alrededor de los átomos (dipolos).

Interfase. Largo período del ciclo celular, incluidas las fases G_1, S, G_2, entre una fase M (mitótica) y la siguiente (fig. 21-1).

Interferencia del RNA (RNAi). Inactivación funcional de un gen específico por introducción experimental de un RNA de hebra doble correspondiente, que induce la degradación del mRNA de hebra simple codificado por el gen, pero no de aquellos mRNA con una secuencia diferente (figs. 9-43 y 12-27).

Interferones (IFN). Pequeño grupo de citocinas que se unen a los receptores de la superficie celular sobre células diana que inducen cambios en la expresión génica y conducen a un estado antiviral u otras respuestas celulares importantes en las funciones del sistema inmune.

Intrón. Parte de un transcripto primario (o el DNA que lo codifica) que se elimina por corte y empalme durante el procesamiento del RNA y que no está incluido en el mRNA, rRNA o tRNA funcional maduro.

Ionóforo. Cualquier molécula pequeña soluble en lípidos que se une selectivamente a un ion específico y lo transporta a través de membranas que de otra forma serían impermeables.

IP_3. Véase **Inositol 1,4,5-trifosfato.**

Isoelectroenfoque. Técnica para separar moléculas mediante electroforesis en gel, en un gradiente de pH sometido a un campo eléctrico. Una proteína migra hasta el pH en el cual su carga neta total es cero.

Isoforma. Una de varias formas de la misma proteína cuya secuencia de aminoácidos difiere poco y con actividades casi siempre similares. Las isoformas pueden estar codificadas por diferentes genes o por un único gen cuyo transcripto primario sufre corte y empalme alternativo.

Isotónico. En referencia a una solución cuya concentración de solutos es tal que no produce un movimiento neto de agua hacia el interior o el exterior de las células.

K_m. Parámetro que describe la afinidad de una enzima por su sustrato y equivale a la concentración del sustrato a la que la reacción ocurre a la mitad de la velocidad máxima; también se denomina *constante de Michaelis*. Un parámetro similar describe la afinidad de una proteína transportadora por la molécula transportada o la afinidad de un receptor por su ligando (fig. 3-19).

Lámina basal. Retículo laminar delgado compuesto de matriz extracelular que subyace en la mayor parte del epitelio animal y otros grupos celulares organizados (p. ej., músculo), a los que separa del tejido conectivo u otras células (fig. 6-13).

Lámina beta (β). Estructura secundaria plana de proteínas, creada por enlaces de hidrógeno entre los átomos pertenecientes al esqueleto de dos cadenas polipeptídicas diferentes o segmentos de una misma cadena plegada (fig. 3-4).

Lámina nuclear. Retículo fibroso sobre la superficie interna de la envoltura nuclear compuesta de filamentos intermedios de lamina (fig. 21-16).

Laminas. Grupo de proteínas de filamentos intermedios que conforman un retículo fibroso, la **lámina nuclear**, sobre la superficie interna de la envoltura nuclear.

Laminina. Véase **Proteína multiadhesiva de la matriz.**

Lectina. Cualquier proteína que se une fuertemente a azúcares específicos. Las lectinas pueden usarse en la cromatografía de afinidad para purificar glucoproteínas o como reactivos para detectarlos in situ.

Ligamiento. En genética, tendencia de dos locus diferentes sobre el mismo cromosoma a ser heredados juntos. Cuanto más cercanos sean dos locus, menor será la frecuencia de recombinación entre ellos y mayor será su unión.

Ligando. Cualquier molécula distinta del sustrato de una enzima que se fija con fuerza y en forma específica a una macromolécula, casi siempre una proteína y forma un complejo macromolécula-ligando.

Línea celular. Población de células cultivadas, de origen animal o vegetal, que han sufrido una modificación genética que les permite dividirse indefinidamente. Las líneas celulares pueden ser consecuencia de la transformación viral o química y se dice que son inmortales.

Línea germinal. Linaje de células germinales que dan origen a los gametos y, por lo tanto, participan en la formación de la siguiente generación de organismos; también el material genético transmitido de una generación a la siguiente a través de los gametos.

Linfocitos. Dos clases de glóbulos blancos que pueden reconocer moléculas extrañas (antígenos) y median las respuestas inmunes. Los linfocitos B son responsables de la producción de anticuerpos; los linfocitos T son responsables de destruir células infectadas con virus y bacterias, células extrañas y células cancerosas.

Lípido. Cualquier molécula orgánica poco soluble o virtualmente insoluble en agua pero soluble en solventes orgánicos no polares. Las clases principales incluyen ácidos grasos, fosfolípidos, esteroides, polisoprenoides y triglicéridos.

Lipofílico. Véase **Hidrófobo.**

Lipoproteínas. Grandes complejos de lípidos y proteínas solubles en agua que actúan en la transferencia masiva de lípidos a través del cuerpo. La capa exterior es una monocapa fosfolipídica que contiene colesterol y una o más moléculas proteicas denominadas apolipoproteínas (p. ej., apoA, apoB); el núcleo contiene triglicéridos, ésteres de colesterol y pequeñas cantidades de otras sustancias hidrófobas, como vitaminas solubles en agua (fig. 18-12 y cuadro 18-3).

Lipoproteína de alta densidad (HDL). Clase de lipoproteínas cuyo principal componente proteico es la apolipoproteína A, que es generada extracelularmente y transporta colesterol desde los tejidos al hígado, tejidos productores de esteroides y otras lipoproteínas. El nivel plasmático de HDL está inversamente relacionado con el riesgo de enfermedad aterocoronaria; por ende, se lo conoce popularmente como "colesterol bueno" (cuadro 18-3 y fig. 18-13c).

Lipoproteína de baja densidad (LDL). Clase de lipoproteína que contiene la apolipoproteína B-100, que es un transportador primario de colesterol en la forma de ésteres de colesterol. Se genera en forma extracelular a partir de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y transporta colesterol entre los tejidos, especialmente al hígado. Los niveles de colesterol LDL plasmático están directamente relacionados con el riesgo de enfermedad de las arterias coronarias; por ello, popularmente se lo llama "colesterol malo" (cuadro 18-3 y fig. 18-13a).

Lipoproteína de muy baja densidad (VLDL). Clase de lipoproteínas secretada por las células del hígado que transporta triglicéridos desde el hígado a los tejidos extrahepáticos y sirve como precursor para la síntesis de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (cuadro 18-3 y fig. 18-13a).

Liposoma. Bicapa fosfolipídica esférica artificial con un interior acuoso que se forma in vitro a partir de fosfolípidos y puede contener proteínas de membrana (fig. 7-5).

Lisis. Destrucción de una célula por rotura de la membrana plasmática y liberación de su contenido.

Lisogenia. Fenómeno en el cual el DNA de un virus bacteriano (bacteriófago) es incorporado al genoma de la célula huésped y se replica junto con el DNA bacteriano, pero no se expresa. La activación posterior del virus conduce a la replicación y la expresión del DNA viral y a la formación de nuevas partículas virales, que finalmente provocan la lisis de la célula.

Lisosoma. Orgánulo pequeño que tiene un pH interno de 4-5 y contiene enzimas hidrolíticas.

Locus. En genética, sitio específico de un gen sobre un cromosoma. Todos los alelos de un gen en particular ocupan el mismo locus.

Luz. Espacio dentro de una estructura tubular (p. ej., una vesícula o el intestino) o volumen interior de un compartimiento rodeado por una membrana dentro de una célula.

Macromolécula. Cualquier molécula grande, por lo general, polimérica (p. ej., proteína, ácido nucleico, polisacárido) con una masa molecular mayor de algunos miles de daltons.

Maligno. En referencia a un tumor o células tumorales que pueden invadir tejidos normales circundantes, sufrir metástasis o ambos. Véase también Benigno.

MAP cinasa. Proteincinasa que se activa en respuesta a la estimulación celular mediante muchos factores de crecimiento diferentes y que media las respuestas celulares fosforilando factores de transcripción específicos y otras proteínas diana.

Marca. Grupo químico o átomo radiactivo incorporado a una molécula con la finalidad de ubicarla en forma espacial o de rastrearla a través de una reacción o programa de purificación. Como verbo, marcar es agregar este grupo o átomo a una célula o molécula.

Marcadores genéticos. Alelos asociados con un fenotipo fácilmente detectable que se utilizan experimentalmente para identificar o seleccionar un gen asociado, un cromosoma, una célula o un individuo. Las secuencias de DNA no codificantes que varían entre los individuos *(polimorfismos de DNA)* pueden servir como marcadores genéticos.

Marco abierto de lectura (ORF). Región de DNA secuenciado que no está interrumpido por codones de terminación en uno de los marcos de lectura de tripletes. Un ORF que comienza con un codón de inicio y se extiende por al menos 100 codones tiene alta probabilidad de codificar una proteína.

Marco de lectura. Secuencia de tripletes de nucleótidos (codones) en un mRNA que transcurre desde un codón de iniciación de la traducción hasta un codón de terminación. Algunos mRNA pueden traducirse a diferentes polipéptidos a través de la lectura en dos marcos de lectura diferentes (fig. 4-20).

Matriz extracelular. Red generalmente insoluble que consiste en polisacáridos, proteínas fibrosas y proteínas adhesivas que son secretadas por células animales. Provee sostén estructural a los tejidos y puede afectar el desarrollo y las funciones bioquímicas de la célula.

Mediador. Complejo multiproteico muy grande que forma un puente molecular entre los activadores transcripcionales unidos a un amplificador y la RNA polimerasa II unida a un promotor; funciona como un coactivador de la estimulación de la transcripción (figs. 11-35 y 11-36)

Meiosis. En los eucariontes, tipo especial de división celular que tiene lugar durante la maduración de las células germinales; comprende dos divisiones sucesivas, nuclear y celular, con solo un ciclo de replicación nuclear que conduce a la producción de cuatro células haploides genéticamente no equivalentes (gametos) a partir de una célula diploide inicial (fig. 9-3).

Membrana Véase **Biomembrana.**

Membrana plasmática. Membrana que rodea una célula separándola de su medio externo; consiste en una bicapa fosfolipídica y lípidos y proteínas de membrana asociados.

Meristema. Grupo organizado de células no diferenciadas, en división, que se mantienen en las puntas de tallos y raíces en crecimiento de las plantas. Todas las estructuras adultas surgen de los meristemas.

Mesénquima. Tejido conectivo mesodérmico embrionario inmaduro de los animales derivado ya sea del mesodermo o del ectodermo.

Mesodermo. La intermedia de las tres capas celulares primarias del embrión animal, ubicada entre el ectodermo y el endodermo; da origen al notocordio, al tejido conectivo, los músculos, la sangre y otros tejidos (fig. 22-7).

Metabolismo. Suma de procesos químicos que tienen lugar en un organismo.

Metafase. Estadio de la mitosis en el cual los cromosomas están completamente condensados y adheridos al huso mitótico pero aún no comenzaron a segregarse hacia los polos opuesto del huso (fig. 20-29).

Metástasis. Diseminación de las células cancerosas desde su sitio de origen y su establecimiento en otras áreas de crecimiento secundario.

Micela. Agregado hidrosoluble esférico de fosfolípidos u otras moléculas anfipáticas, que se forma espontáneamente en solución acuosa (fig. 2-20).

Microfilamento. Fibra citoesquelética (≈7 nm de diámetro) formada por polimerización de actina globular (G); también denominada *filamento de actina*. Los microfilamentos cumplen un papel importante en la contracción muscular, la citocinesis, el desplazamiento celular, y otras funciones y estructuras celulares (fig. 19-3).

Micromatriz (*microarray*) de DNA. Conjunto ordenado de miles de diferentes secuencias de nucleótidos dispuestas sobre un portaobjetos u otra superficie sólida. Una micromatriz correspondiente a diferentes genes puede utilizarse para determinar el patrón de expresión génica de una población celular en particular mediante hibridación con cDNA marcado con fluorescencia preparado a partir del mRNA total aislado de las células (figs. 9-35 y 9-36).

Micromatriz de proteínas. Portaobjetos u otra superficie sólida a la cual se fijan pequeñas muestras de proteínas purificadas; también se llama *chip proteómico*. Las micromatrices de proteínas se utilizan para examinar asociaciones entre proteínas de manera análoga al uso de micromatrices de DNA para controlar la expresión génica (fig. 15-4).

MicroRNA (miRNA). Pequeño RNA, de 21-23 nucleótidos, que se asocia con múltiples proteínas en un complejo de silenciamiento inducido de RNA (RISC) y reprime la traducción de un mRNA diana específico mediante hibridación con su región 3′ no traducida (fig. 12-27).

Microtúbulo. Fibra citoesquelética (≈ 24 nm de diámetro) formada por polimerización de monómeros de α,β-tubulina con polaridad estructural y funcional. Los microtúbulos son componentes importantes de los cilios, los flagelos, el huso mitótico y otras estructuras celulares (fig. 20-1).

Microvellosidades. Prolongaciones pequeñas cubiertas por membrana sobre la superficie de una célula animal que contienen un centro de filamentos de actina. Se encuentran numerosas microvellosidades sobre la superficie absorbente de las células epiteliales intestinales, incrementando el área superficial para el transporte de nutrientes (fig. 5-28).

Miosinas. Clase de proteínas motoras con actividad de ATPasa estimulada por actina. Las miosinas se mueven a lo largo de los microfilamentos de actina durante la contracción muscular y la citocinesis y también median la translocación vesicular. La región de la cola determina la función de una miosina en particular (fig. 3-24 y cuadro 19-3).

Mitocondria. Orgánulo de gran tamaño rodeado por dos membranas de bicapa fosfolipídica, que contiene DNA, y lleva a cabo la fosforilación oxidativa, por lo que produce la mayor parte del ATP en las células eucariontes (figs. 5-26 y 8-6).

Mitógeno. Cualquier molécula extracelular, como un factor de crecimiento, que favorece la proliferación celular.

Mitosis. En las células eucariontes, proceso por el cual el núcleo se divide para producir dos núcleos hijos genéticamente equivalentes con número diploide de cromosomas. Véase también Citocinesis y Meiosis (fig. 20-29).

Molécula señal. Término general para cualquier molécula extracelular o intracelular implicada en la mediación de la respuesta de una célula a su medio ambiente o a otras células.

Moléculas de adhesión celular (CAM). Proteínas de la membrana plasmática de las células que se unen a proteínas similares de otras células, mediando por lo tanto la adhesión intercelular. Las cuatro principales clases de CAM son las cadherinas, las selectinas, los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) y las integrinas, que también actúan en las interacciones entre la célula y la matriz (fig. 6-2).

Monomérica. Las proteínas que contienen una única cadena polipeptídica.

Monómero. Cualquier molécula que puede unirse químicamente con otras del mismo tipo para formar un polímero. Los ejemplos incluyen aminoácidos, nucleótidos y monosacáridos.

Monosacárido. Cualquier azúcar simple con la fórmula $(CH_2O)_n$ donde n = 3–7.

Morfógeno. Molécula que especifica la identidad celular durante el desarrollo, a menudo en función de su concentración.

Motivo. En las proteínas, estructura conservada corta, que puede reconocerse por la secuencia primaria de aminoácidos. Por lo general, un motivo es indicativo de una arquitectura tridimensional y se asocia con una propiedad funcional específica. Por ejemplo, un motivo de cremallera de leucina indica la presencia de un dominio de espiral enrollado con capacidad de unir DNA.

MPF (factor promotor de la mitosis). Proteína heterodimérica compuesta de una ciclina mitótica y una cinasa dependiente de ciclina (CDK), que desencadena la entrada de una célula en la mitosis al fosforilar múltiples proteínas específicas, lo que da como resultado la condensación cromosómica, el ensamblaje del aparato mitótico y la rotura de la envoltura nuclear (excepto en los hongos).

mRNA (RNA mensajero). Cualquier RNA que especifica el orden de los aminoácidos en una proteína (es decir, la estructura primaria). Es producido por transcripción del DNA mediante la RNA polimerasa. En los eucariontes, el producto inicial de RNA (transcripto primario) sufre el procesamiento para producir mRNA funcional. Véase también Traducción (fig. 4-14).

MTOC (centro organizador de microtúbulos). Término general para cualquier estructura (p. ej., el centrosoma) que organiza microtúbulos en células no mitóticas (interfase) (figs. 5-33 y 20-14).

Muerte celular programada. Véase Apoptosis.

Multimérica. Referido a las proteínas que contienen varias cadenas polipeptídicas (o subunidades).

Mutación. En genética, modificación hereditaria permanente de la secuencia de nucleótidos de un cromosoma, por lo general en un único gen; suele producir una alteración en la función del producto génico.

Mutación letal sintética. Mutación que incrementa el efecto fenotípico de otra mutación en el mismo gen o en uno relacionado (fig. 9-9b,c).

Mutación puntual. Cambio de un único nucleótido en el DNA, especialmente en una región que codifica proteínas; puede dar lugar a la formación de un codón que especifica un aminoácido diferente o a un codón de terminación. La adición o delección de un único nucleótido ocasionará un cambio en el marco de lectura.

Mutación sensible a la temperatura (ts). Mutación que produce un fenotipo de tipo silvestre a una temperatura (la temperatura permisiva) y un fenotipo mutante a otra temperatura (la temperatura no permisiva). Este tipo de mutación es especialmente útil para la identificación de genes esenciales para la vida.

Mutación supresora. Mutación que invierte el efecto fenotípico de una segunda mutación. Las mutaciones supresoras se utilizan a menudo para identificar genes que codifican proteínas interactuantes (fig. 9-9a).

Mutágeno. Agente químico o físico que induce mutaciones.

Na^+/K^+ ATPasa. Bomba iónica de clase P presente en la membrana plasmática de todas las células animales que acopla la hidrólisis de una molécula de ATP a la salida de tres iones Na^+ y la entrada de dos iones K^+. Esta bomba es responsable en gran parte de mantener las concentraciones intracelulares normales de Na^+ (baja) y K^+ (alta) en las células animales (fig. 7-9).

NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleótido). Transportador electrónico muy utilizado que acepta dos electrones de una molécula donadora y un H^+ de la solución. En las mitocondrias, la forma reducida, NADH, transfiere electrones a los transportadores que actúan en la fosforilación oxidativa (fig. 2-26a).

$NADP^+$ (nicotina adenina dinucleótido fosfato). Forma fosforilada de NAD^+ utilizada ampliamente como transportador electrónico en las vías biosintéticas y durante la fotosíntesis.

Necrosis. Muerte celular que resulta del daño tisular u otra patología; por lo general, está marcada por la hinchazón y la rotura de las células con liberación de su contenido. Contrastar con la apoptosis.

Neurofilamentos (NF). Clase de filamentos intermedios que se encuentra sólo en las neuronas y que determina el diámetro de los axones (fig. 19-32).

Neurona (célula nerviosa). Cualquiera de las células conductoras de impulsos del sistema nervioso. Una neurona típica contiene un cuerpo celular; múltiples prolongaciones cortas, ramificadas (dendritas) y una prolongación larga (axón) (fig. 7-29).

Neurotransmisor. Molécula señal extracelular liberada por la neurona presináptica en la sinapsis química y que transmite la señal a la célula postsináptica. La respuesta generada por el neurotransmisor, excitadora o inhibidora, está determinada por su receptor ubicado sobre la célula postsináptica (fig. 7-42).

No polar. En referencia a una molécula o estructura que carece de una carga eléctrica neta o de una distribución asimétrica de cargas positivas y negativas. Por lo general, las moléculas no polares son insolubles en agua.

Northern blot. Técnica para detectar RNA específicos separados por electroforesis mediante hibridación con una sonda de DNA marcada. Véase también ***Southern blot*** (fig. 9-27).

Núcleo. Orgánulo grande limitado por membrana de las células eucariontes que contiene DNA organizado en cromosomas; la síntesis y el procesamiento del RNA y el ensamblaje ribosómico tienen lugar en el núcleo.

Nucleocápside. Cápside viral más el ácido nucleico que encierra.

Nucléolo. Gran estructura en el núcleo de las células eucariontes donde tienen lugar la síntesis y el procesamiento de rRNA y donde se ensamblan las subunidades ribosómicas (fig. 5-25).

Nucleoporinas. Grandes grupos de proteínas que constituyen el complejo del poro nuclear. Una clase de ellas (las nucleoporinas FG) participan en la incorporación y la salida de material del núcleo.

Nucleósido. Molécula pequeña compuesta de una base purina o pirimidina unida a una pentosa (ya sea ribosa o desoxirribosa) (cuadro 2-2).

Nucleosoma. Unidad estructural de la cromatina que consiste en un centro con forma de disco de proteínas histonas, alrededor de las cuales se enrolla un segmento de 147 pb de DNA (figs. 10-20 y 10-21).

Nucleótido. Nucleósido con uno o más grupos fosfatos unidos a través de un enlace éster a un azúcar, por lo general al átomo de carbono 5′. Los polímeros de DNA y RNA son polímeros de nucleótidos que contienen desoxirribosa y ribosa respectivamente (fig. 2-14 y cuadro 2-2).

Oligosacáridos N-ligados. Cadenas de oligosacáridos unidas al grupo amino de la cadena lateral de los residuos de asparagina de las glucoproteínas. La síntesis de todos los oligosacáridos *N*-ligados comienza con la unión de un precursor preformado de 14 residuos a una proteína naciente en el retículo endoplasmático. Véase también Oligosacáridos O-ligados (figs. 16-16 y 16-18).

Oligosacáridos O-ligados. Cadenas de oligosacáridos unidas a los grupos hidroxilo de la cadena lateral de los residuos de serina o treonina de las glucoproteínas. Véase también Oligosacáridos N-ligados.

Oncogén. Gen cuyo producto está involucrado tanto en transformar células en cultivo como en la inducción de cáncer en los animales. La mayoría de los oncogenes son formas mutantes de genes normales (**protooncogenes**) que codifican proteínas que participan en el control del crecimiento o la división celular.

Oncoproteínas. Proteína codificada por un oncogén que induce proliferación celular anormal; puede ser una forma mutante no regulada de una proteína normal o una proteína normal producida en exceso o en el momento o lugar equivocado en un organismo.

Ovocito. Célula huevo inmadura (óvulo).

Operador. Secuencia de DNA corta de un genoma bacteriano o de un bacteriófago que se une a una proteína receptora y controla la transcripción de un gen adyacente (fig. 4-16).

Operón. En el DNA bacteriano, grupo de genes contiguos transcriptos a partir de un promotor que da origen a un mRNA que contiene secuencias codificantes para múltiples proteínas (fig. 4-12a).

ORF (*open reading frame*). Véase Marco abierto de lectura.

Orgánulo. Cualquier estructura subcelular limitada por membrana que se encuentra en las células eucariontes (fig. 5-19).

Origen de replicación. Segmentos de DNA únicos presentes en el genoma de un organismo donde comienza la replicación del DNA. El cromosoma eucarionte contiene múltiples orígenes, mientras que los cromosomas bacterianos y los plásmidos, por lo general, contienen sólo uno.

Ósmosis. Desplazamiento neto de agua a través de una membrana semipermeable desde una solución de menor concentración de soluto a una de mayor concentración. La membrana debe ser permeable al agua, pero no a las moléculas del soluto.

Oxidación aerobia. Metabolismo de azúcares y ácidos grasos en presencia de oxígeno, que culmina con la formación de CO_2 y H_2O y está acoplado con la síntesis de ATP.

Oxidación. Pérdida de electrones de un átomo o molécula como ocurre cuando un átomo de hidrógeno es eliminado de una molécula o cuando se añade oxígeno. Lo opuesto de la **reducción**.

Par de bases. Asociación de dos nucleótidos complementarios en una molécula de DNA o RNA estabilizado por enlaces de hidrógeno entre las bases. La adenina se aparea con timina o uracilo (A·T, A·U) y la guanina se aparea con citosina (G·C) (fig. 4-3b).

Paracrina. Referido al mecanismo de señalización por el cual una molécula señal (p. ej., un factor de crecimiento) producida por una célula se difunde hasta una célula diana cercana que responde a esa molécula. La señalización paracrina es importante durante el desarrollo, en el que la respuesta de las células diana a una señal particular varía con la distancia desde el origen de la señal.

Pared celular. Matriz extracelular rígida especializada ubicada a continuación de la membrana plasmática, que protege a la célula y mantiene su forma. Se destaca en la mayoría de los hongos, las plantas y los procariontes, pero falta en la mayoría de los animales multicelulares (fig. 6-33).

Partícula de reconocimiento de señal (SRP). Partícula ribonucleoproteica que se une a la secuencia señal para el RE de una proteína secretoria naciente y entrega el complejo ribosoma/cadena naciente a la membrana del RE donde se completa la síntesis de la proteína y la translocación al interior del RE (fig. 16-5).

Patch clamping. Técnica para determinar el flujo de iones a través de una canal iónico aislado o a través de la membrana de una célula entera mediante el uso de una micropipeta cuya punta se aplica a un pequeña porción de la membrana celular (fig. 7-17).

PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Técnica para amplificar un segmento específico de DNA en una mezcla compleja mediante múltiples ciclos de síntesis de DNA a partir de oligonucleótidos cebadores cortos, seguidos por un breve tratamiento con calor para separar las hebras complementarias (fig. 9-24).

Pentosa. Monosacárido de cinco carbonos. Las pentosas ribosa y desoxirribosa están presentes en el RNA y el DNA respectivamente.

Péptido. Polímero pequeño que suele contener menos de 30 aminoácidos conectados por enlaces peptídicos.

Peroxisoma. Orgánulo pequeño que contiene enzimas para degradar ácidos grasos y aminoácidos mediante reacciones que generan peróxido de hidrógeno, que a su vez se convierte en agua y oxígeno mediante la catalasa.

pH. Medida de la acidez o alcalinidad de una solución, definida como el logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno en moles por litro: $pH = -\log [H^+]$. La neutralidad es equivalente a un pH de 7; los valores por debajo de éste son ácidos y los superiores son alcalinos.

pI. Véase **Punto isoeléctrico.**

Pirimidinas. Clase de compuestos nitrogenados que contienen un anillo heterocíclico. Dos pirimidinas, la citosina (C) y la timina (T), son las bases pirimídicas componentes de los nucleótidos que se encuentran en el DNA; en el RNA, el uracilo (U) reemplaza a la timina. Véase también **Par de bases** (fig. 2-15).

Placa aterosclerótica. Deposición bien demarcada en una pared arterial que consiste en sus etapas iniciales en células macrofágicas espumosas y matriz extracelular y en sus etapas tardías, en un núcleo necrótico de lípidos, sales de calcio y matriz extracelular recubierta de una capa fibrosa de células musculares lisas y matriz. En la aterosclerosis avanzada, una placa puede bloquear por completo una arteria o inducir la formación de un coágulo de sangre oclusivo (fig. 18-19).

Plásmido. Pequeña molécula circular de DNA extracromosómico capaz de replicarse de manera autónoma en una célula. Se lo suele utilizar como vector en la clonación de DNA.

Plasmodesmo. Uniones celulares con forma de tubo que interconectan los citoplasmas de células vegetales adyacentes y son análogos funcionales a las uniones de hendidura (*gap junctions*) de las células animales (fig. 6-34).

Polar. Referido a una molécula o estructura con una carga eléctrica neta o distribución asimétrica de las cargas positivas y negativas. Por lo general, las moléculas polares son solubles en agua.

Polaridad. En biología celular, presencia de diferencias funcionales, estructurales o ambas, en distintas regiones de una célula o de un componente celular.

Polímero. Cualquier molécula grande compuesta de múltiples unidades similares o idénticas (**monómeros**) conectadas por enlaces covalentes.

Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción Véase **RFLP**.

Polipéptido. Polímero lineal de aminoácidos conectados por enlaces peptídicos. Una proteína es un gran polipéptido plegado en una forma tridimensional distintiva.

Polirribosoma. Complejo que contiene diversos ribosomas, todos los cuales traducen un único RNA mensajero; también llamado *polisoma* (fig. 4-31).

Polisacárido. Polímero lineal o ramificado de monosacáridos, conectados por enlaces glucosídicos, por lo general con más de 15 residuos. Los ejemplos incluyen el glucógeno, la celulosa y los glucosaminoglucanos (GAG).

Porinas. Proteínas transmembrana presentes en la membrana externa de mitocondrias, cloroplastos y bacterias gramnegativas a través de las cuales moléculas pequeñas solubles en agua pueden cruzar la membrana. La estructura de un monómero de porina consiste en hebras (β) dispuestas de manera tal que forman un cilindro con forma de barril con un poro central (fig. 5-14).

Potencial de acción. Actividad eléctrica rápida, transitoria, que sigue la ley del todo o nada y que se propaga por la membrana plasmática de las células excitables (p. ej., las neuronas y las células musculares) como resultado de la apertura y el cierre selectivo de los canales del Na^+ y K^+ regulados por voltaje (figs. 7-30 y 7-35).

Potencial de membrana. Diferencia de voltaje a través de una membrana debido al exceso leve de iones positivos (cationes) sobre un lado e iones negativos (aniones) sobre el otro.

Potencial de oxidación. Cambio de voltaje cuando un átomo o molécula pierde un electrón, medida de la tendencia de una molécula a perder un electrón.

Potencial de reducción (E). Cambio de voltaje que se produce cuando un átomo o molécula gana un electrón.

Pre-mRNA. Precursor del RNA mensajero; transcripto primario e intermedios del procesamiento del RNA (fig. 12-2).

Pre-rRNA. Precursor de RNA ribosómico de gran tamaño, sintetizado en el nucléolo de las células eucariontes y procesado para producir tres de los cuatro RNA presentes en los ribosomas (fig. 12-34).

Presión osmótica. Presión hidrostática que se debe aplicar a la solución más concentrada para detener el flujo neto de agua a través de una membrana semipermeable que separa soluciones de diferente concentración (fig. 7-24).

Primasa. RNA polimerasa especializada que sintetiza tramos cortos de RNA utilizados como cebadores para la síntesis de DNA.

Procariontes. Clase de organismos, incluidas eubacterias y arqueas, que carecen de un verdadero núcleo limitado por membrana y otros orgánulos. Véase también **Eucariontes.**

Procesamiento de RNA. Diversas modificaciones producidas dentro del núcleo por muchos, pero no todos los transcriptos primarios para producir moléculas de RNA funcionales en los eucariontes. Los pre-mRNA sufren tres eventos de procesamiento principales: adición del casquete en el extremo 5′, corte y poliadenilación en el extremo 3′, y corte y empalme del RNA (fig. 12-2).

Profase. Estadio más temprano en la mitosis, durante el cual se condensan los cromosomas, los centríolos comienzan a moverse hacia los polos del huso y la envoltura nuclear se desensambla (excepto en los hongos) (fig. 20-29).

Promotor. Secuencia de DNA que determina el sitio de iniciación de la **transcripción** para la RNA polimerasa.

Proteasoma. Complejo de proteasa multifuncional de gran tamaño, localizado en el citosol, que degrada las proteínas intracelulares marcadas para la destrucción mediante la adhesión de múltiples moléculas de **ubicuitina** (fig. 3-13).

Proteína. Polímero lineal que suele contener 50 o más aminoácidos conectados entre sí por enlaces peptídicos y plegado en una forma tridimensional característica (conformación). Las proteínas constituyen los elementos estructurales clave de las células y participan en casi todas las actividades celulares.

Proteína asociada con microtúbulos (MAP). Cualquier proteína que se fija a los microtúbulos en una proporción constante y determina las propiedades únicas de tipos diferentes de microtúbulos (cuadro 20-1).

Proteínas de membrana ancladas por lípidos. Cualquier proteína conectada a una membrana celular mediante uno o más grupos lipídicos embebidos en la bicapa fosfolipídica a los que se une en forma covalente (fig. 5-15).

Proteína de transporte de membrana. Término colectivo para cualquier proteína integral de membrana que media el movimiento de uno o más iones específicos o moléculas pequeñas a través de una membrana celular sin importar el mecanismo de transporte.

Proteína extrínseca. Véase **Proteína de membrana periférica.**

Proteína G monomérica (pequeña). Véase **Superfamilia GTPasa.**

Proteína G, trimérica (grande). Cualquiera de las numerosas proteínas heterotriméricas de unión a GTP que actúan en las vías de señalización intracelular; activadas, por lo general, mediante la unión de un ligando a un receptor acoplado sobre la superficie celular que atraviesa siete veces la membrana. Véase también **Superfamilia de las GTPasa** (cuadro 13-1).

Proteína integral de membrana. Cualquier proteína que contiene uno o más segmentos hidrófobos embebidos en el núcleo de la bicapa fosfolipídica y que pueden eliminarse de la membrana sólo mediante la interacción con detergentes; también llamada *proteína intrínseca de membrana*. Sobre el retículo endoplasmático se sintetizan cuatro clases principales que difieren en la cantidad y orientación de los segmentos que atraviesan la membrana (fig. 16-10).

Proteína motora. Cualquier miembro de una clase específica de enzimas mecanoquímicas que utilizan energía de la hidrólisis de ATP para generar movimiento lineal o rotacional. Véase también **Dineínas, Cinesinas y Miosinas** (cuadro 3-2; figs. 3-22 y 3-23).

Proteína p53. Producto de un gen supresor de tumores que cumple un papel crítico en la detención del ciclo de las células con DNA dañado, previniendo así la perpetuación de las mutaciones u otras anomalías cromosómicas en las células hijas. Las mutaciones inactivantes del gen *p53* se hallan en muchos cánceres humanos (figs. 21-23 y 23-23).

Proteína periférica de membrana. Cualquier proteína que se asocia con la cara citosólica o exoplasmática de una membrana pero no penetra en el centro hidrófobo de la bicapa fosfolipídica; también llamada proteína extrínseca. Véase **Proteína integral de membrana** (fig. 5-11).

Proteína Ras. Proteína monomérica de unión a GTP unida a la membrana plasmática mediante un ancla lipídica que actúa en las vías de señalización intracelulares. La activación de Ras está inducida por la unión de un ligando a un **receptor tirosincinasa** y a algunos otros receptores de superficie celular. Véase también **Superfamilia de las GTPasa** (figs. 14-16 y 14-20).

Proteínas COP. Dos grupos de proteínas que forman las cubiertas alrededor de las vesículas de transporte en la vía secretoria. Las vesículas recubiertas de COPII movilizan proteínas desde el retículo endoplasmático al Golgi; las vesículas recubiertas de COPI movilizan proteínas desde el Golgi al retículo endoplasmático y desde las cisterna del Golgi anteriores hacia las posteriores (fig. 17-18).

Proteínas intrínsecas. Véase **Proteína integral de membrana.**

Proteínas multiadherentes de la matriz. Grupo de proteínas flexibles largas que se unen a otros componentes de la matriz extracelular (colágeno, polisacáridos) y a los receptores de superficie celular, interconectando de esta forma los componentes de la matriz con la membrana celular. Los ejemplos incluyen laminina, un componente fundamental de la lámina basal, y fibronectina, presente en muchos tejidos (fig. 6-16 y 6-23).

Proteincinasa A (PKA). Proteincinasa citosólica que se activa por **AMP cíclico (cAMP)** y actúa para fosforilar y por lo tanto regular la actividad de numerosas proteínas celulares; también se llama *proteincinasa dependiente de cAMP*. La PKA suele activarse en respuesta a un aumento del nivel de cAMP debido a la estimulación de ciertos **receptores asociados con proteína G** (fig. 13-32).

Proteincinasa B (PKB; también llamada Akt). Proteincinasa citosólica reclutada hacia la membrana plasmática y activada posteriormente por fosfoinosítidos inducidos por señales (fig. 14-27).

Proteincinasa C (PKC). Enzima citosólica reclutada hacia la membrana plasmática en respuesta a un aumento del Ca^{2+} citosólico inducido por señales y activada por el segundo mensajero diacilglicerol (DAG) unido a la membrana (fig. 13-29).

Proteincinasa dependiente de cAMP. Véase **Proteincinasa A.**

Proteoglucanos. Grupo de glucoproteínas que contienen una proteína central a la cual se adhieren uno o más **glucosaminoglucanos**. Se encuentran en casi todas las matrices extracelulares animales y algunas son proteínas integrales de membrana (fig. 6-22).

Proteoma. Complemento entero de proteínas producidas por una célula.

Proteómica. Análisis integral de la identidad, interacciones y localizaciones de proteínas dentro de una célula.

Protooncogén. Gen celular normal que codifica una proteína que, por lo general, interviene en la regulación de la proliferación o la diferenciación celular y que puede mutar a un oncogén, ya sea por modificación del segmento codificador de la proteína o por alteración de su expresión.

Pulso y caza. Tipo de experimento en el cual una molécula radiactiva pequeña se añade a una célula durante un período breve (el pulso) y luego se la reemplaza con un exceso de la forma no marcada de la misma molécula (la caza). Se utiliza para detectar cambios en la ubicación celular de una molécula o su destino metabólico con el transcurso del tiempo (fig. 3-36).

Punto control. Cualquiera de varios puntos del **ciclo celular** eucarionte en el que se puede detener la progresión de una célula hacia el próximo estadio hasta que las condiciones sean las adecuadas (fig. 21-32).

Punto de restricción. Punto hacia el final de G_1 del ciclo celular en el cual las células de los mamíferos se comprometen a ingresar en la fase S y completar el ciclo aun en ausencia de factores de crecimiento; funcionalmente equivalente al START de las levaduras (fig. 21-28).

Punto isoeléctrico (pI). pH de una solución al cual una proteína disuelta u otra molécula potencialmente cargada tiene una carga neta cero y por lo tanto no se mueve en un campo eléctrico.

Purinas. Clase de compuestos nitrogenados que contienen dos anillos heterocíclicos. Dos purinas, adenina (A) y guanina (G), son las bases púricas componentes de los nucleótidos que se encuentran en el DNA y el RNA. Véase también **Par de bases** (fig. 2-15).

Queratinas. Grupo de proteínas de los filamentos intermedios de las células epiteliales que se ensamblan para formar filamentos heteropoliméricos.

Quiescente. Referido a una célula que abandonó el **ciclo celular** y se encuentra en el estado G_0.

Quilomicrón. Clase de **lipoproteína** secretada por las células epiteliales intestinales y que transporta triglicéridos dietarios (grasa) y colesterol desde el intestino hacia otros tejidos (cuadro 18-3 y fig. 18-13b).

Quimera. 1) Animal o tejido compuesto de elementos derivados de individuos genéticamente distintos; un híbrido. 2) Una proteína molecular que contiene segmentos derivados de diferentes proteínas.

Quimioósmosis. Proceso por el cual se utiliza un gradiente electroquímico de protones (pH más potencial eléctrico) a través de una membrana para impulsar un proceso que requiere energía como la síntesis de ATP o el transporte de moléculas a través de una membrana contra el gradiente de concentración; también se llama *acoplamiento quimioósmótico* (fig. 8-1).

Quimiotaxis. Movimiento de una célula u organismo acercándose o alejándose de ciertos compuestos.

Radioisótopo. Forma inestable de un átomo que emite radiación a medida que decae. Varios radioisótopos son de uso habitual como marcas en las moléculas biológicas (cuadro 3-3).

Rafts lipídicos (balsas lipídicas). Microdominios en la membrana plasmática enriquecidos en colesterol, esfingomielina y ciertas proteínas (fig. 5-10).

Reacción en cadena de la polimerasa. Véase **PCR.**

Receptor. Cualquier proteína que une en forma específica a otra molécula para mediar la señalización entre célula y célula, la adhesión, la endocitosis u otro proceso celular. Por lo general, es una proteína localizada en la membrana plasmática o en el citoplasma que se activa mediante la fijación de una molécula señal (ligando) extracelular específica, iniciando de esta forma una respuesta celular. Véase también **Receptor de adhesión** y **Endocitosis mediada por receptores** (cuadro 14-1).

Receptor acoplado a proteínas G (GPCR). Miembro de una extensa clase de receptores de señales presentes en la superficie celular, incluidos aquellos para adrenalina, glucagón, ACTH, serotonina y factores de apareamiento (levadura). Todos los GPCR contienen siete hélices α transmembrana. La unión del ligando conduce a la activación de una proteína G trimérica e inicia así las vías de señalización intracelular (fig. 13-11).

Receptor de adhesión. Proteína de la membrana plasmática de las células animales que se une a componentes de la **matriz extracelular**, mediando de esta forma la adhesión entre célula y matriz. Las integrinas son los principales receptores de la adhesión (fig. 6-1).

Receptores de citosina. Miembros de una clase importante de receptores de señales de la superficie celular que incluyen aquellos para la eritropoyetina, hormona del crecimiento, interleucinas e interferones. La fijación de ligandos conduce a la dimerización del receptor y a la activación de cinasas JAK citosólicas asociadas con el dominio intracelular del receptor, iniciando por lo tanto las vías de señalización intracelular (fig. 14-12).

Receptor nuclear. Miembro de una clase de receptores intracelulares que unen moléculas solubles en lípidos (p. ej., hormonas esteroides, ácidos biliares); también denominada *superfamilia de receptores esteroides*. Tras la unión del ligando, el complejo receptor-hormona esteroide se transloca hacia el núcleo y actúa como un activador de la transcripción. Otros receptores nucleares se unen a sus elementos de respuesta en el DNA nuclear, en ausencia de ligando represor de la transcripción, y cuando se unen a su ligando se convierten en activadores (fig. 11-44).

Receptor tirosincinasa (RTK). Miembro de una clase extensa de receptores de superficie celular que incluyen los de la insulina y muchos factores de crecimiento. La fijación de ligandos conduce a la dimerización de receptores y a la activación de la actividad proteincinasa específica de tirosina en el dominio citosólico del receptor, iniciando por lo tanto las vías de señalización intracelular (fig. 14-16).

Recesivo. En genética, referido al alelo de un gen que no se expresa en el **fenotipo** cuando el alelo **dominante** está presente. También se refiere al fenotipo de un individuo (homocigoto) que transporta dos alelos recesivos. Por lo general, las mutaciones que producen alelos recesivos dan como resultado una pérdida de función (fig. 9-2).

Recombinación. Cualquier proceso por el cual los cromosomas o las moléculas de DNA se cortan y los fragmentos se vuelven a unir para dar nuevas combinaciones. Sucede naturalmente en las células durante la meiosis como resultado del intercambio (**entrecruzamiento**) de secuencias de DNA entre las cromátidas materna y paterna; también se lleva a cabo in vitro con DNA purificado y enzimas.

Red trans-Golgi (TGN). Red compleja de membranas y vesículas que sirve como un punto importante de ramificación de la **vía secretoria**. Las vesículas que brotan desde este compartimiento más distal del Golgi transportan proteínas solubles y de membrana a la superficie celular o a los lisosomas (fig. 17-1).

Reducción. Ganancia de electrones por un átomo o molécula como sucede cuando se añade un átomo de hidrógeno a una molécula o cuando se elimina oxígeno. Lo opuesto a la **oxidación**.

Región de control de la transcripción. Término colectivo para todas las secuencias reguladoras de DNA que regulan la transcripción de un gen en particular.

Repeticiones terminales largas (LTR). Secuencia repetida directa, que contiene hasta 600 pares de bases, que flanquean la región de codificación de DNA retroviral integrado y **retrotransposones virales**.

Represor. Factor de **transcripción** que inhibe la transcripción.

Resolución. Capacidad de un aparato óptico para distinguir la distancia mínima entre dos objetos; también denominada *poder de resolución*.

Respiración celular. Término general para cualquier proceso celular que implica la incorporación de oxígeno (O_2) asociada con la producción de dióxido de carbono (CO_2).

Retículo endoplasmático (RE). Red de estructuras membranosas interconectadas dentro del citoplasma de las células eucariontes contigua a la membrana nuclear externa. El RE rugoso, que está asociado con ribosomas, actúa en la síntesis y el procesamiento de proteínas secretadas y de membrana; el RE liso, que carece de ribosomas, actúa en la síntesis de lípidos (fig. 5-19).

Retículo sarcoplasmático. Red de membranas en el citoplasma de una célula muscular que secuestra iones de Ca^{2+}. La estimulación de una célula muscular induce la liberación de iones de Ca^{2+} hacia el citosol y desencadena la contracción coordinada a lo largo de toda la célula.

Retrotransposón. Tipo de **elemento móvil de DNA** eucarionte cuyo desplazamiento en el genoma está mediado por un intermediario de RNA e implica un paso de transcripción inversa. Véase también **Transposón** (fig. 10-8).

Retrovirus. Tipo de virus que contiene un genoma de RNA que se replica en las células eucariontes haciendo primero una copia de DNA a partir del RNA. Este DNA proviral se inserta en el DNA cromosómico celular y da origen a RNA genómico adicional así como a los mRNA de las proteínas virales (fig. 4-43).

RFLP (polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción). Diferencias entre individuos en la secuencia de DNA genómico que crea o destruye sitios reconocidos por determinadas **enzimas de restricción**. Los RFLP detectados como diferencias en la longitud de los fragmentos producidos cuando el DNA genómico es digerido con una **enzima de restricción**, son uno de los varios tipos de diferencias de secuencias entre individuos que pueden servir como marcadores genéticos en los estudios de **linaje** en los seres humanos (fig. 9-46).

Ribosoma. Complejo grande que comprende varias moléculas de **rRNA** diferentes y más de 50 proteínas organizadas en una gran subunidad y pequeñas subunidades; lugar de la **traducción** (síntesis de proteínas) (figs. 4-27 y 4-28).

Ribozima. Molécula de RNA con actividad catalítica.

RNA (ácido ribonucleico). Polímero lineal de hebra simple, compuesto de **nucleótidos** de ribosa. Tres tipos de RNA celular –mRNA, rRNA, y tRNA– cumplen diferentes papeles en la síntesis de proteínas (fig. 4-19).

RNA de transferencia. Véase **tRNA.**

RNA mensajero. Véase **mRNA.**

RNA nuclear pequeño. Véase **snRNA.**

RNA polimerasa. Enzima que copia una hebra de DNA (la hebra molde) para formar la hebra de RNA **complementaria** utilizando como sustratos ribonucleótidos trifosfatos (fig. 4-10).

RNA ribosómico. Véase **rRNA.**

rRNA (RNA ribosómico). Cualquiera de varias moléculas de RNA que son componentes estructurales y funcionales de los ribosomas. A menudo denominados por sus coeficientes de sedimentación: rRNA 28S, 18S, 5,8S y 5S en los eucariontes superiores (fig. 4-24).

Sarcómero. Unidad estructural repetitiva del músculo estriado (esquelético) compuesta por la superposición organizada de filamentos finos (actina) y filamentos gruesos (**miosina**), y que se extiende desde un disco Z a otro adyacente; se acorta durante la contracción (figs. 19-22 y 19-23).

Secuencia activadora corriente arriba (en dirección 5') (UAS). Cualquier secuencia del DNA de levaduras y otros eucariontes simples, reguladora de unión a proteínas, necesaria para la máxima expresión génica; equivalente a un elemento amplificador o promotor proximal en los eucariontes superiores (fig. 11-12).

Secuencia señal. Secuencia de aminoácidos relativamente corta que dirige una proteína a una localización específica dentro de la célula; también llamada *péptido señal* y *secuencia de marcado para la captación* (cuadro 16-1).

Secuencia silenciadora. Secuencia del DNA eucarionte que promueve la formación de estructuras de cromatina condensadas en una región localizada, bloqueando de esta forma el acceso de las proteínas necesarias para la transcripción de genes en un rango de varios cientos de pares de bases de la secuencia silenciadora; también llamada simplemente *silenciador*.

Secuencias topogénicas. Segmentos dentro de una proteína cuya secuencia, número y disposición dirige la inserción y orientación de diversas clases de proteínas transmembrana dentro de la membrana del retículo endoplasmático (fig. 16-13).

Segregación. Proceso que distribuye un complemento igual de cromosomas a las células hijas durante la mitosis y la meiosis.

Segundo mensajero. Molécula intracelular pequeña cuya concentración se incrementa (o disminuye) en respuesta a la unión de una señal extracelular y que actúa en la transducción de señales. Los ejemplos incluyen cAMP, cGMP, Ca^{2+}, DAG, IP_3 y varios fosfoinosítidos.

Selectinas. Familia de moléculas de adhesión celular que median las interacciones heterófilas dependientes de Ca^{2+} con oligosacáridos específicos de las glucoproteínas y los glucolípidos presentes en la superficie de células adyacentes. Las selectinas actúan en las interacciones entre los leucocitos y las células endoteliales y también en la unión de glucoproteínas extracelulares a las células.

Señal de clasificación. Secuencia de aminoácidos relativamente pequeña que dirige una proteína a determinadas vesículas de transporte a medida que brotan de una membrana donadora de la vía endocítica o secretoria (cuadro 17-2).

Seudogenes. Secuencias de DNA similares a los genes funcionales, pero que no expresan un producto funcional; probablemente surgieron por la deriva de secuencias de genes duplicados.

Simporte. Véase Contraporte unidireccional.

Sinapsis. Región especializada entre la terminación axónica de una neurona y una neurona adyacente u otra célula excitable (p. ej., célula muscular) a través de la cual se transmiten los impulsos. En una sinapsis química, el impulso es conducido por un neurotransmisor; en una sinapsis eléctrica, la transmisión del impulso tiene lugar a través de las uniones de hendidura que conectan las células presinápticas y postsinápticas (fig. 7-31).

Sincitio. Masa multinucleada de citoplasma rodeada por una única membrana plasmática.

Sindecanos. Tipo de proteoglucanos que son proteínas integrales de membrana. Actúan en la adhesión entre célula y matriz, interactúan con el citoesqueleto y pueden unirse a señales externas, participando por lo tanto en la señalización entre célula y célula.

Sistema de dos híbridos de levaduras. Técnica experimental muy utilizada para identificar genes cuya proteína codificada interactúa con una proteína específica de interés (fig. 11-39).

Sistema de reparación por escisión. Uno de diversos mecanismos para la reparación del DNA dañado por despurinación o desaminación espontánea o por exposición a los carcinógenos. Estos sistemas de reparación suelen funcionar con alto grado de fidelidad y su pérdida está asociada con un riesgo mayor de desarrollar ciertos cánceres (cuadro 23-1).

Sitio activo. Región específica sobre la superficie de una enzima que une una molécula de sustrato y promueve un cambio químico en el sustrato al que se une (fig. 3-17).

Sitio hipersensible a la DNasa. Región en la cromatina inusualmente sensible a la digestión por DNasa I cuando los núcleos aislados se tratan con la enzima. Indica generalmente una región donde se unen factores de transcripción.

Smads. Clase de factores citosólicos de transcripción que se activan por fosforilación tras la unión de hormonas de la superfamilia del factor de crecimiento transformador β (TGFβ) a receptores serincinasas de la superficie celular (fig. 14-2).

SNARE. Proteínas integrales de membrana y citosólicas que promueven la fusión de vesículas con membranas diana. La interacción de las v-SNARE sobre una vesícula con las t-SNARE correspondientes sobre una membrana diana forma complejos muy estables y coloca a la vesícula y a la membrana diana en estrecha yuxtaposición (fig. 17-11).

snRNA (RNA nuclear pequeño). Uno de varios RNA estables pequeños localizados en el núcleo. Cinco snRNA componen el empalmosoma y actúan en el proceso de corte y empalme del pre-mRNA (figs. 12-8 y 12-9).

Sonda. Fragmento definido de RNA o DNA, marcado en forma radiactiva o química, que se utiliza para detectar secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante hibridación.

Southern blot. Técnica para detectar secuencias de DNA específicas separadas por electroforesis mediante hibridación con una sonda de ácido nucleico marcado (fig. 9-26).

SPF (factor promotor de la fase S). Proteína heterodimérica, compuesta de una ciclina G_1 y una cinasa dependiente de ciclina (CDK), que desencadena la entrada de una célula eucarionte en la fase S del ciclo celular mediante la fosforilación de proteínas específicas, induciendo por lo tanto la expresión de proteínas necesarias para la replicación del DNA y el pasaje a través de la fase S.

SREBP (proteína de unión a SRE). Factor de transcripción que se activa por movimiento intracelular y proteólisis en respuesta a niveles bajos de colesterol celular y estimula la expresión de genes que codifican proteínas necesarias para la síntesis y la entrada de colesterol y la síntesis de ácidos grasos, fosfolípidos y triglicéridos (figs. 18-17 y 18-18).

START. Punto en la etapa G_1 del ciclo celular de las levaduras que controla la entrada de las células en la fase S; funcionalmente equivalente al punto de restricción de las células de los mamíferos. El pasaje de una célula a través de START la compromete a proceder a través del resto del ciclo celular (fig. 21-25).

STAT. Clase de factores de transcripción que se activan en el citosol tras la unión de un ligando a los receptores de citocinas (fig. 14-12).

Superfamila de las GTPasa. Grupo de proteínas interruptoras intracelulares que alternan entre un estado inactivo con GDP unido y un estado activo con GTP unido. Estas proteínas regulan diversos procesos celulares e incluyen la subunidad G_α de las proteínas G triméricas (grandes) y de las proteínas G monoméricas (pequeñas) como Ras, Rab, Ran y Rac, al igual que ciertos factores de elongación empleados en la síntesis de proteínas (fig. 3-29).

Superfamilia ABC. Grupo grande de proteínas integrales de membrana que a menudo actúan como proteínas transportadoras de membrana impulsadas por ATP para movilizar diversas moléculas (p. ej., fosfolípidos, colesterol, azúcares, iones, péptidos) a través de las membranas celulares (fig. 7-11 y cuadro 18-2).

Supervisión de mRNA. Término colectivo para varios mecanismos celulares que ayudan a evitar la traducción de moléculas de mRNA procesadas de manera inapropiada.

Sustrato. Molécula que sufre una modificación en una reacción catalizada por una enzima.

Telofase. Estadio final de la mitosis durante el cual se vuelve a formar la envoltura nuclear alrededor de dos conjuntos de cromosomas separados, los cromosomas se descondensan y se completa la división del citoplasma (citocinesis) (fig. 20-29).

Telómero. Región en cada extremo de un cromosoma eucarionte que contiene múltiples repeticiones en tándem de una secuencia telomérica (TEL) corta. Los telómeros se necesitan para una segregación cromosómica apropiada y se replican por un proceso especial, contrarrestando por lo tanto la tendencia de los cromosomas a acortarse durante cada ciclo de replicación del DNA (fig. 10-34).

Tilacoides. Sacos membranosos aplanados de un cloroplasto que están dispuestos en pilas y contienen los pigmentos fotosintéticos (fig. 8-30).

Tinción fluorescente. Técnica general para visualizar componentes celulares mediante el tratamiento de células o tejidos con un agente marcado con fluorocromo (p. ej., un anticuerpo) que se une en forma específica a un componente de interés y la observación de las muestras con un microscopio de fluorescencia.

Tipo silvestre. Forma normal no mutante de un gen, proteína, célula u organismo.

Traducción. Producción mediada por ribosomas de un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos está especificada por la secuencia de nucleótidos en un mRNA (fig. 4-19).

Transcitosis. Mecanismo para transportar ciertas sustancias a través de una lámina epitelial que combina la endocitosis mediada por receptor y la exocitosis (fig. 17-34).

Transcripción. Proceso en el cual se utiliza una hebra de una molécula de DNA como molde para la síntesis de RNA complementario mediante la RNA polimerasa (figs. 4-9 y 4-10).

Transcriptasa inversa. Enzima que se encuentra en los retrovirus que cataliza una reacción compleja en la cual se sintetiza un DNA de hebra doble a partir de un molde de RNA de hebra simple (fig. 10-13).

Transcripto primario. En los eucariontes, producto inicial del RNA, que contiene intrones y exones, producido por transcripción del DNA. Muchas transcriptos primarios son sometidos al procesamiento del RNA para formar las especies de RNA fisiológicamente activas.

Transducción de señal. Conversión de una señal de una forma química o física en otra. En biología celular por lo general se refiere al proceso secuencial iniciado mediante la unión de una señal extracelular a un receptor y la culminación en una o más respuestas celulares específicas.

Transfección. Introducción experimental de DNA foráneo a células en cultivo, seguida en general por la expresión de genes del DNA introducido (fig. 9-29).

Transformación. 1) Alteración permanente hereditaria en una célula que resulta de la captación e incorporación de un DNA foráneo dentro del genoma de la célula huésped; también llamada *transfección estable.* 2) Conversión de una célula de mamífero "normal" en una célula con propiedades similares a las cancerosas por lo general inducida por el tratamiento con un virus u otro agente oncogénico.

Transgén. Gen clonado que se introduce y se incorpora en forma estable en una planta o animal y se pasa a sucesivas generaciones.

Transgénico. En referencia a cualquier planta o animal portador de un transgén.

Translocación cotraduccional. Transporte simultáneo de una proteína secretoria al retículo endoplasmático a la vez que continúa la síntesis de la proteína naciente unida al ribosoma (fig. 16-6).

Translocón. Complejo multiproteico en la membrana del retículo endoplasmático a través del cual entra una proteína secretoria naciente en la luz del RE a medida que es sintetizada (fig. 16-6).

Transportador de electrones. Cualquier molécula o átomo que acepta electrones de moléculas donadoras y los transfiere a moléculas aceptoras en reacciones de reducción y oxidación. Tanto los pequeños grupos que contienen metales o iones (p. ej., hemo, cobre, agrupaciones de hierro y sulfuro) asociados con proteínas de unión a las membranas como las moléculas de difusión (p. ej., NAD^+, FAD, y ubicuinona (coenzima Q) funcionan como transportadores de electrones.

Transporte activo. Movimiento de un ion o una molécula pequeña a través de la membrana en contra de su gradiente de concentración o de su gradiente electroquímico, impulsado por el acoplamiento con la hidrólisis del ATP (fig. 7-2).

Transporte de electrones. Flujo de electrones a través de una serie de transportadores de electrones desde donadores de electrones reducidos (p. ej., NADH) al O_2 en la membrana mitocondrial interna, o desde H_2O o $NADP^+$ en la membrana tilacoide de los cloroplastos vegetales (fig. 8-13).

Transporte fotoelectrónico. Transporte de electrones impulsado por la luz que involucra las clorofilas del centro de reacción y que constituye el principal evento de la fotosíntesis. Este proceso genera la separación inicial de cargas a través de la membrana tilacoide que conduce los eventos posteriores de la fotosíntesis.

Transposición. Movimiento de un elemento móvil de DNA dentro del genoma; se produce a través de un mecanismo de corte y pegado o de copiado y pegado según el tipo de elemento (fig. 10-8).

Transposón de DNA. Elemento móvil de DNA presente en procariontes y eucariontes que se mueve en el genoma mediante un mecanismo que implica la síntesis y transposición de DNA. Véase también retrotransposón (fig. 10-8).

Triacilglicerol. Véase Triglicérido.

Triglicérido. Forma principal en la cual se almacenan y se transportan los ácidos grasos en los animales; consiste en tres cadenas de acilos grasos esterificadas con una molécula de glicerol (fig. 18-2).

tRNA (RNA de transferencia). Grupo de moléculas de RNA pequeñas que actúan como donadoras de aminoácidos durante la síntesis de proteínas. Cada tRNA se une en forma covalente a un aminoácido en particular y forma un aminoacil-tRNA (figs. 4-21 y 4-22).

Tubulina. Familia de proteínas globulares del citoequeleto que se polimerizan para formar microtúbulos (fig. 20-3).

Tumor. Masa de células, derivadas en general de una única célula, que surge debido a la pérdida de los reguladores normales del crecimiento celular; puede ser benigno o maligno.

Ubicuitina. Proteína pequeña altamente conservada que se une en forma covalente a los residuos de lisina de otras proteínas intracelulares. Marcar una proteína con una molécula de ubicuiti-

na añadida en forma covalente puede hacer que la proteína sea degradada por un **proteasoma**, puede alterar la función de la proteína o puede hacer que una proteína de membrana sea enviada hacia los lisosomas (fig. 3-13).

Unidad de transcripción. Región del DNA limitada por un sitio de iniciación (inicio) y un sitio de terminación, que se transcribe a un único **transcripto primario.**

Uniones celulares. Regiones especializadas sobre la superficie celular a través de las cuales se unen las células entre sí o con la matriz extracelular (fig. 6-5).

Uniones de anclaje. Regiones especializadas de la superficie celular que contienen **moléculas de adhesión celular** o **receptores de adhesión**, que interactúan con otras células o con la matriz extracelular y con fibras del citoesqueleto. Los principales tipos en las células epiteliales son las *uniones de adherencia* y *desmosomas*, que median la adhesión entre célula y célula, y los *hemidesmosomas*, que median la adhesión entre la célula y la matriz (figs. 6-7 y 6-8).

Uniones comunicantes. Véase **Uniones en hendidura.**

Uniones en hendidura (de tipo **gap**). Canal revestido de proteínas que conecta los citoplasmas de células animales adyacentes y permite el pasaje de iones y moléculas pequeñas entre las células (fig. 6-32).

Uniones estrechas. Tipo de uniones entre células epiteliales adyacentes que evita la difusión de macromoléculas y muchas moléculas y iones pequeños por el espacio entre las células y la difusión de componentes de membrana entre las regiones apical y basolateral (fig. 6-9).

Uniporte. Difusión facilitada mediada por proteína de una molécula pequeña a través de una membrana a favor de su gradiente de concentración. Los transportadores de glucosa (GLUT) son ejemplos bien estudiados de proteínas uniportes (fig. 7-4).

Vaina de mielina. Membrana celular especializada apilada que forma una capa aislante alrededor de los axones de los vertebrados e incrementa la velocidad de la conducción de los impulsos (figs. 7-39 y 7-40).

Variación de la energía libre (ΔG). Diferencia entre la energía libre total de las moléculas producto y de las moléculas iniciales (reactantes) en una reacción química. Un valor de ΔG muy negativo indica gran tendencia a que tenga lugar la reacción; es decir, en el equilibrio químico la concentración de productos será mucho mayor que la concentración de reactantes.

Vector. En biología celular, elemento genético de replicación autónoma utilizado para transportar un fragmento de cDNA o DNA a una célula huésped con el propósito de la clonación de genes. Por lo general, los vectores utilizados son plásmidos bacterianos y genomas de bacteriófagos modificados. Véase también **Vector de expresión** y **Vector lanzadera** (figs. 9-12 y 9-15).

Vector de clonación. Véase **Vector.**

Vector de expresión. Plásmido modificado o virus que transporta un gen o un cDNA a una célula huésped apropiada y allí dirige la síntesis de la proteína codificada. Los vectores de expresión pueden emplearse para analizar genotecas de DNA en busca de un gen de interés o para producir gran cantidad de una proteína a partir de su gen clonado (figs. 9-28 y 9-29).

Vector lanzadera (*shuttle*). Vector plasmídico capaz de propagarse en dos huéspedes diferentes (p. ej., en *E. coli* y levaduras, o en *E. coli* y células de mamíferos). Los vectores *shuttle* son útiles para hacer un rastreo en una genoteca de DNA de levaduras mediante complementación funcional y en sistemas de expresión basados en la transfección transitoria de células animales (figs. 9-19 y 9-29).

Ventral. Relacionado con la parte frontal de un animal o la superficie inferior de una estructura (p. ej., ala u hoja).

Vesícula de transporte. Compartimiento pequeño limitado por membrana que transporta proteínas "carga" solubles y de membrana en la dirección anterógrada o retrógrada de la vía secretoria. Las vesículas se forman por brotación en el orgánulo donador y liberan sus contenidos por fusión con la membrana diana.

Vesícula secretoria. Vesícula pequeña delimitada por membrana derivada del **retículo *trans*-Golgi** que contiene moléculas destinadas a ser liberadas de la célula.

Vía secretoria. Vía celular de síntesis y clasificación de proteínas solubles y de membrana localizada en el retículo endoplasmático, el Golgi y los lisosomas; en las proteínas de la membrana plasmática y en las proteínas secretadas finalmente de la célula (figs. 16-1 y 17-1).

Virión. Partícula viral individual.

Virus. Parásito intracelular pequeño compuesto de ácido nucleico (RNA o DNA) encerrado en una cubierta proteica que puede replicarse sólo en una célula huésped susceptible; ampliamente utilizado para la investigación en biología celular (figs. 1-25 y 4-37).

V_{max}. Parámetro que describe la velocidad máxima de una reacción catalizada por enzimas u otro proceso como el transporte de moléculas mediado por proteínas a través de una membrana (figs. 3-19 y 7-3).

Western blot. Técnica para detectar proteínas específicas separadas por electroforesis mediante el uso de anticuerpos marcados (fig. 3-35).

Wnt. Familia de proteínas de señalización secretadas utilizada en el desarrollo de casi todos los tejidos en la mayoría o en la totalidad de los animales. El nombre "Wnt" derivó de las primeras dos moléculas de su tipo descubiertas, Int-1 (para la integración de un virus de tumor mamario) y Wingless (un gen de *Drosophila*). Las proteínas Wnt están palmitoladas cerca del N-terminal. Las mutaciones en los componentes de la transducción de señales de Wnt intervienen en el cáncer humano. Los receptores son proteínas de clase Frizzled con siete segmentos transmembrana.

ÍNDICE ANALÍTICO

Los números de página seguidos por *f* indican una figura; los seguidos por *c* un cuadro.

A

Accidente cerebrovascular, 770. Véase también *Aterosclerosis*
Acetil CoA
  carboxilasa, 746
  en el ciclo del ácido cítrico, 309, 310*f*, 311*c*
  estructura, 309*f*
  funciones, 309
  oxidación a CO_2, 309, 310*f*
  síntesis, 77, 78*f*, 309
  en la síntesis
    de acetilcolina, 288
    de ácidos grasos, 746
Acetilación, 70, 70*f*
Acetilcolina, 287. Véase también *Neurotransmisor(es)*
  en la contracción muscular, 290, 291*f*
  inactivación, 290
  receptor nicotínico de, 291
  síntesis, 288
  en las uniones neuromusculares, 290
Acetilcolinesterasa, 290
achaete, 918
Acídicos, dominios de activación, 467, 467*f*
Acidificación, de la luz gástrica, 275. 276*f*
Ácido(s)
  acético, amortiguación (*buffering*), 48, 49*f*
  amortiguadores (*buffers*), 48
  ascórbico, en la formación del colágeno, 218
  aspártico, 38, 39*f*
  biliares, 750*f*, 752
    transporte, 755, 756, 756*f*
  D-glucurónico, 213, 213*f*, 214*f*
  desoxirribonucleico. Véase *DNA*
  disociación, 48, 49*f*
  fosfórico, amortiguación, 49, 49*f*
  gamma-aminobutírico (GABA). Véase también *Neurotransmisor(es)*
    estructura, 288*f*
  glutámico, 38, 39*f*
  graso(s), 43, 743. Véase también *Lípido(s); Lípidos de la membrana*
    CoA, 312*f*, 313, 747, 747*f*
    esterificación, 43
    estructura, 43, 43*c*, 746, 746*f*
    en fosfolípidos, 745, 746*f*
    incorporación a los lípidos de la membrana, 747, 747*f*
    insaturado, 43, 43*c*, 44*f*
    oxidación
      mitocondrial, 301, 308*f*, 309, 312, 312*f*
      peroxisómica, 168, 301, 312*f*, 313
    poliinsaturados, 43, 43*c*
    procesamiento, 747, 747*f*
    propiedades, 43
    proteínas de unión a los ácidos grasos, 746, 746*f*
    saturado, 43, 43*c*, 44*f*, 745
    síntesis, 747, 747*f*
    graso sintetasa, 746
      en el retículo endoplasmático, 168
      transporte, 755, 759. Véase también *Transporte lipídico*
  L-idurónico, 213, 213*f*
  láctico, en la contracción muscular, 306*f*, 307
  lisofosfatídico (LPA), 803
  nucleicos, 10, 101. Véase también *DNA; RNA*
    bases, 40, 40*f*, 41*c*. Véase también *Pares/apareamiento de bases*
    estructura, 10, 10*f*, 37*f*, 38, 40, 40*f*, 102, 103, 103*f*. Véase también *Hélice, DNA*
  ribonucleico. Véase *RNA*
Acil:colesterol acil transferasa (ACAT), 752
Acoplamiento metabólico, 230
Acortamiento, 521, 521*f*
Actina, 780. Véase también *Filamentos de actina*
  beta, 781
  cantidades celulares, 780
  conexión a filamento intermedio, 810
  conservación evolutiva, 781
  definición, 780
  despolimerización, 786
  equilibrio de monómero-polímero, 786
  estructura, 781, 781*f*
  F, 781, 781*f*, 782. Véase también *Actina; Filamentos de actina*
  forma
    ADP, 781
    alfa, 781
    ATP, 781
    beta, 781
    F, 781, 781*f*, 782. Véase también *Filamentos de actina*
    G, 781, 781*f*, 782
  concentración crítica, 785
  polimerización, 784, 784*f*
  G, 781, 781*f*
  concentración crítica, 785, 785*f*
  polimerización, 784, 784*f*
  unión a proteínas, 786, 787
  isoformas, 781, 781*f*
  en movilidad celular, 789, 789*f*, 790*f*
  en la orientación del huso, 923
  polimerización, 523, 524*f*, 784, 784*f*
    en el movimiento celular, 801, 801*f*
    regulación, 786
Activador(es), 17, 115, 116, 117, 448, 448*f*, 449, 461, 461*f*, 462*f*
  en la acetilación de histonas, 475, 475*f*
  acídico, 467, 467*f*
  y coactivadores, 467, 476
  corte y empalme, 507-508
  dominios de unión al DNA, 461, 461-465*f*, 462
  EGR-1, 463, 463*f*, 478
  en el ensamblaje del complejo de preiniciación, 478, 479*f*
  estructura, 461, 461*f*, 462*f*, 463*f*, 467, 467*f*
  y mediadores, 471
  del plasminógeno, secreción a partir de tumor, 937
  tisular del plasminógeno (TPA), 65, 65*f*
  transcripcional(es), 17, 115, 116, 117
Actividad de corrección, 123, 962, 962*f*
Activinas, 574, 623
Acuaporinas, 160, 164, 164*f*, 272*f*, 273, 273*f*
  en las células del riñón, 274
  defectos causantes de enfermedades, 274
  estructura, 273, 273*f*
  en la membrana del eritrocito, 273, 273*f*
  subtipos, 274
Adaptación visual, 560, 560*f*, 561*f*
Adenililciclasa, 545*c*, 548
  activación, 549, 550*f*
  estructura, 549, 549*f*
  y proteínas G, 548, 549, 549*f*
  en la regulación
    de cAMP, 549, 550*f*
    del glucógeno, 619
Adenina, 40, 40*f*, 41*c*
  en la doble hélice, 103, 104*f*, 105*f*. Véase también *Pares apareamiento de bases; Doble hélice*

Adenina *(Cont.)*
estructura, 103, 103*f*
Adenosina
difosfato. Véase *ADP (adenosindifosfato)*
monofosfato (AMP), 40, 40*f*, 41*c*, 53
cíclico. Véase *cAMP*
monofosfaro cíclico. Véase *cAMP*
trifosfato. Véase *ATP (adenosintrifosfato)*
Adhesina estigma/estilo rica en cisteína, 234, 234*f*
Adhesión(es)
célula-matriz, 198, 198*f*, 201
celular, 198*f*, 200, 201, 203*f*. Véase también *Uniones celulares*
hematopoyéticas, 226
integrinas, 199*f*, 208, 221, 222*f*, 224*f*, 225, 225*f*
modulación, 225
y movimiento celular, 801*f*, 802, 802*f*
en el tejido epitelial, 198, 198*f*, 199*f*, 201, 208
intercelular, 198
en cadherinas, 204, 204*f*, 205*f*
definición, 199
dependiente de Ca^{2+}, 204
formación, 200, 200*f*
fuerza, 200
heterotípica, 200
homotípica, 200
integrinas, 208
leucocito, 227, 228*f*
mecanismos, 198*f*
neural, 227
panorama general, 198*f*, 199
en las plantas, 234, 234*f*
proteínas adaptadoras, 200, 200*f*
receptores, 199, 199*f*
y señalización, 198*f*, 200, 612
uniones celulares, 200, 203, 203*f*
3D, 223, 224, 224*f*
fibrilares, 223
focales, 223, 224*f*, 796
ADP (adenosindifosfato), 41*c*, 53
y control respiratorio, 330
liberación del sitio activo, 76
en el plegamiento de proteínas, 69*f*, 70
síntesis, 53
en la síntesis de ATP, 330
Adrenalina. Véase también *Neurotransmisor(es)*
estructura, 288*f*
en la hipertrofia cardíaca, 567
en el metabolismo del glucógeno, 547, 551, 553
receptores, 535, 547
en la señalización, 535, 547
Adrenoleucodistrofia, 168, 259, 313
ligada al cromosoma X, 168, 259, 313
Aducina, 176*f*, 177
Aequorea victoria, proteínas fluorescentes, 188
Afinidad
molecular, 36, 36*f*
proteína-ligando, 73
constante de Michaelis (K_m), 76, 77*f*
Afinidad molecular, 36, 36*f*
Aflatoxina, y cáncer de hígado, 964
Agrecan, y hialuronano, 219, 220*f*
Agregados de proteoglucanos, 219, 220*f*
Agricultura, bioingeniería, 270, 442
Agrina, 214
en las células musculares, 227
unión del distroglucano, 226*f*, 227
Agua
como producto de la respiración, 315, 318. Véase también *Cadena respiratoria*
disociación, 47
efecto hidrófobo, 35
enlaces de hidrógeno, 32, 32*f*, 33, 34
flujo osmótico, 271
en las células vegetales, 170
concentración iónica, 164, 164*f*
presión osmótica, 271, 271*f*
interacciones electrostáticas, 33, 33*f*
permeabilidad de la membrana, 271, 271*f*, 273*f*
AKAP15, 554
Alanina, 38, 39*f*. Véase también *Aminoácido(s)*
Albúmina, 755
Alcohol deshidrogenasa III, direccionamiento, 686, 688*f*
Alelo(s), 22. Véase también *Gen(es)*
autosómico
dominante, 395, 395*f*
recesivo, 395, 395*f*
cepas puras (verdaderas), 355
definición, 352
dominante, 353
negativos, 353, 584, 960
en la inactivación génica, 392, 392*f*
oncogénicos, 960
segregación, 355, 355*f*, 356*f*
mutante. Véase *Mutación(es)*
recesivo, 353
ligado al X, 395, 395*f*
de tipo silvestre, 352
Alfa
actina, 781
actinina, 782, 783*c*
cetoglutarato deshidrogenasa, en el ciclo del ácido cítrico, 310, 310*f*
SNAP en la fusión vesicular, 713, 736, 737*f*
$_1$-antitripsina, en enfisema, 679
Algas, 2*f*. Véase también *Cianobacteria(s); Procarionte(s)*
flujo citoplasmático, 795, 795*f*
Algas
verdes, 2*f*
verdeazuladas, 2*f*. Véase también *Cianobacteria; Procariontes*
Algoritmos
detección
de genes, 383, 383*f*
de proteínas, 380, 381*f*
Almidón, 42, 331, 331*f*, 347
glucólisis, 347
de la hoja, 331, 331*f*
Alosterismo
en la regulación proteica, 83
en la síntesis de ATP, 314
Alprenolol, 539
Alternancia cinasa/fosfatasa, 85, 85*f*
Amebas, movimiento, 803
Aminoácido(s), 9. Véase también *Proteína(s)*
acetilación, 70, 70*f*
activación, 122*f*, 123
átomo de carbono alfa, 38, 39*f*
cadenas laterales, 38, 38*f*, 39*f*
carga eléctrica, 38
clasificación, 38, 39*f*
en el código genético, 119, 120*c*, 121*f*
en el colágeno, 211, 211*f*
combinación. Véase *Secuencias de aminoácidos*
diversidad, 70
ensamblaje, 11, 11*f*, 68. Véase también *Traducción*
estructura, 38, 39*f*
química, 37*f*
fosforilación, 70, 70*f*
hidrófilos, 38, 39*f*
hidrófobos, 38, 39*f*
isómeros, 38, 39*f*, 74
longitud de la cadena, 61
en medio de cultivo, 236
neurotransmisor, 288, 288*f*
péptidos, 61, 62*f*
peso molecular, 61
polipéptido, 61
propiedades, 38
radiomarcado, 93, 94*f*
solubilidad, 38
transporte transepitelial, 274, 274*f*
unión al tRNA, 122*f*, 123
Aminoacil
tRNA, 121, 122*f*
actividad de corrección, 123
Aminolevulinato sintetasa, 523
Amortiguadores (*buffers*), 48
AMP (adenosinmonofosfato), 40, 40*f*, 41*c*, 53
cíclico. Véase *cAMP*
Amplificación. Véase *Amplificación de DNA*
deDNA
cromosomas politénicos, 433, 433*f*
de gen marcado, 376
mediante
clonación, 364*f*
reacción en cadena de la polimerasa, 375, 375*f*, 376*f*
en la oncogénesis, 944
génica, en cáncer, 944
de señales, 552
Amplificador(es)
corte y empalme de exón, 501, 502*f*
genes, 17, 117, 406, 457*f*, 468, 468*f*, 634, 635
del interferón beta, 468, 468*f*
SV40, 456, 457*f*
Amplificosomas, 468
AMPPNP, en el transporte axonal, 831
Anaerobios
facultativos, 305
obligados, 305
Anafase, 838, 839*f*, 845, 846*f*, 854, 856. Véase también *Ciclo celular*
iniciación, 870, 871*f*, 872*f*
prematura, 887, 888
Análisis
de las cadenas nacientes, 448
de complementación genética, 357, 358*f*, 408
de deleción 5', del control transcripcional, 450, 450*f*
genéticos, 22, 352. Véase también *Mutación(es)*
en cáncer, 936
cepas puras, 355
clonación, 361. Véase también *Clones/clonación*
de complementación, 357, 358*f*
funcional, 369, 369*f*, 370*f*
cruzamientos genéticos, 355, 355*f*, 356*f*
genoteca de cDNA, 365, 365*f*
mutaciones
letales sintéticas, 360, 360*f*
sensibles a la temperatura, 22, 356, 356*f*
supresoras, 359, 360*f*
mutantes dobles, 358, 359*f*
organismos
diploides, 353
experimentales
diploides, 353
haploides, 353
de tipo silvestre, 352
prueba de hibridación sobre membrana, 367, 367*f*
rastreo o screening genético, 356
de los sistemas de señalización, 621, 622*f*
sondas de DNA, 367, 367*f*, 368*f*
genómico, 613
de iniciación de la transcripción *(run-on transcription analysis)*, 448, 449*f*
de micromatrices
de DNA, 22, 23*f*, 385, 385*f*, 614, 615, 616*f*
análisis de grupo (cluster), 386, 386*f*
de células tumorales, 943, 950
del desarrollo muscular, 913
de la meiosis, 892
de la transcripción de levadura, 910
de proteínas, 615, 616*f*
de mutaciones rastreadoras de ligadores
de elementos de control de la transcripción, 455
de sitios de unión de represores, 462
de retardo en gel, 459, 460*f*
Anclas
GPI, 160, 161*f*, 670, 671*f*
de membrana
API, clasificación apical-basolateral, 726*f*, 727
glucosilfofatidilinositol, 160, 161*f*
clasificación apical-basolateral, 726*f*, 727
prenilo, 160, 161*f*, 177
proteínas de membrana, 161, 161*f*
Anemia
falciforme, 13, 394*c*, 395
de Fanconi, 964*c*
Angina, 769
Angiogénesis, 620
en cáncer, 938
inducción recíproca, 644, 645*f*
Anhidrasa carbónica, 269
en la acidificación gástrica, 275, 276*f*
Anillo
contráctil, 796
del plasmodesmo, 233, 233*f*
Aniones, 33
Aniridia, 27*f*
Anquirina, 177
Antagonistas
de hormonas, 651
inducible, en la señalización, 651
no inducido, en la señalización, 651
Antennapedia, 635*f*, 636
Anticodones, 119, 121
apareamiento de bases con codones, 122, 123*f*
Anticuerpos. Véase también *Inmunoglobulina(s)*
anti-Sm, 499*f*
antígenos unidos, 73, 74*f*
especificidad, 74
específicos de orgánulos, 181, 182*f*
estructura, 73, 74*f*
fluorescentes, 20, 20*f*
monoclonales
en la cromatografía de afinidad, 91*f*. 92,239
específicos de orgánulos, 181, 182*f*
producción, 237, 238*f*
usos, 239
producción
in vitro, 238, 238*f*
in vivo, 237
producción en vivo, 237
transcitosis, 735, 735*f*
Antidepresivos, 290
Antígenos, 238
estructura, 73, 74*f*
grupo sanguíneo, 161, 162*c*, 162*f*
T grande, en la replicación, 134, 134*f*, 135, 136*f*
unión, 73, 74*f*
Antiportadores, 247, 247*f*, 268, 269, 270, 270*f*
3-Na^+Ca^{2+}, 269
ATP/ADP, 329, 329*f*
direccionamiento, 688*f*, 690
de aniones, 268, 269
AE1, 268
de aspartato/glutamato, 311, 311*f*
de bicarbonato de sodio-cloruro, 269
de cationes, en las células del músculo cardíaco, 269
en células parietales, 275, 276*f*
Cl^-/HCO_3^-, 269, 270*f*
cloruro/bicarbonato, en las células parietales, 275, 276*f*
hidrógeno/acetilcolina, 288
en la lanzadera malato-aspartato, 311, 311*f*
neurotransmisor, 287
en las plantas, 270, 270*f*
de protones-sacarosa, 270, 270*f*
de sodio-hidrógeno, 268, 269, 270*f*
en plantas transgénicas, 270
Antitrombina III, activación de heparina, 215, 215*f*
Aparato
mitótico, 838, 839, 841*f*, 854. Véase también *Asteres; Huso mitótico*
en levaduras, 840
nuclear/mitótico, 834
APC, en el cáncer colorrectal, 941, 942*f*, 949
apoB, isoformas, edición del RNA, 508, 508*f*
ApoB-100, 729
Apolipoproteína A-1, en aterosclerosis, 771
Apoptosis, 18, 19*f*, 900, 924, 930
Bcl-2, 927, 928*f*
en *C. elegans*, 927, 927*f*, 928*f*
en cáncer, 960
características ultraestructurales, 924*f*
caspasas, 927, 928*f*, 929*f*, 930
CED, 927
definición, 924
y eritropoyetina, 584
factor de necrosis tumoral, 930
y factores tróficos, 929
ligando Fas, 930
proteínas, 924
adaptadoras, 928, 928*f*
antiapoptóticas, 928, 929*f*
efectoras, 928, 928*f*
proapoptóticas, 928, 929*f*
supresoras, 927, 928*f*
regulación, 924
señales de muerte, 930
vías intracelulares, 929*f*
vs. necrosis, 924
Apotransferrina, 732
APP, escisión proteolítica, 604, 604*f*
Aprendizaje, control traduccional, 520
Arabidopsis thaliana
como organismos experimentales, 24,25*f*

Arabidopsis thaliana (Cont.)
complejidad genómica, 384, 384*f*
desarrollo floral, 637, 638*f*
destinos de células meristémicas, 905, 905*f*
fotosíntesis, 344
proteínas de tipo adhesivas, 234, 234*f*
señalización, 632
Araquidonato, 746*f*, 747
Arco reflejo, 294, 294*f*
ARF, en la formación de vesículas recubiertas, 709, 709*c*, 710*f*
Arginina, 38, 39*f*. Véase también *Aminoácido(s)*
Armadillo, 642
Armazón cromosómico, 427, 427*f*, 428*f*
Arqueobacteria, 2*f*, 4
Arrestina, 554, 554*f*, 560, 567
Artritis reumatoidea, 607
Asense, 918
ASH1, en conversión del tipo de apareamiento, 920, 921*f*
Asociaciones proteína-proteína, 615
Asparagina, 38, 39*f*. Véase también *Aminoácido(s)*
Aspartato, 38, 39*f*. Véase *Aminoácido(s)*
Ásteres, 840, 841*f*
plano de separación, 847*f*, 848, 874
Ataxia espinocerebelosa, 412
Aterosclerosis, 767
comienzo y progresión, 768*f*
formación de placas, 768*f*, 769
hipercolesterolemia familiar, 730
inflamación, 768, 768*f*
terapia farmacológica, 771, 772*f*
ATF6, respuesta a las proteínas desplegadas, 679
Átomo(s)
de carbono, 30, 31*c*, 31*f*
alfa, 38, 39*f*
asimétrico, 31, 31*f*
enlaces, 30, 31*c*, 31*f*
quiral, 31, 31*f*
electronegatividad, 32
ATP (adenosintrifosfato), 9, 41*c*, 301
ADP, 330
ATP sintasa, 79, 302, 325, 325*f*, 326*f*, 327*f*, 328*f*
como fuente de energía, 9, 14, 14*f*, 30*f*, 52
para movimiento celular, 79, 79*f*, 80*c*, 81, 81*f*, 82*f*, 793, 801*f*, 802
enlace fosfoanhídrido, 52, 52*f*
en fijación de carbono, 53
hidrólisis, 30*f*, 52
en disociación del complejo SNARE, 713
en ensamblaje de los filamentos de actina, 782, 785
en movimiento
celular, 79, 79*f*, 80*c*, 80*f*, 81, 81*f*, 793, 801*f*, 802
de cincsina, 833
de dineína, 837, 838*f*
de miosina, 79, 80*c*, 80*f*, 81, 82*f*, 793
rítmico flagelar, 837, 837*f*, 838*f*
en transporte
axonal, 830, 830*f*
de membrana, 247, 247*f*. Véase también *Bombas impulsadas por ATP*
síntesis, 14, 14*f*
en oxidación de acetil CoA, 310, 310*f*
en translocación de proteínas, 665
en bacteria, 680, 681*f*
en cloroplastos, 691, 692*f*
en mitocondria, 684*f*, 685*f*, 686
en peroxisomas, 693, 694*f*
unión proteincinasa, 75, 76*f*
en metabolismo acrobio, 304, 305*f*, 306*f*, 307, 308*f*
en metabolismo anaerobio, 305, 306*f*
acoplada, 302, 303*f*
aspectos evolutivos, 302
en cadena respiratoria, 310
en ciclo ácido cítrico, 309, 310*f*
en complejo f0F1, 79
en control respiratorio, 331
en dirección de flujo de protones, 302, 303*f*
energía libre, 329
en fotosíntesis, 9, 14, 53, 172, 333
en fuerza protón-motriz, 302, 302*f*, 308, 308*f*, 309, 325
en gradiente de concentración de protones, 302, 303*f*
hipótesis endosimbionte, 304
incorporación de electrones del NADH citosólico, 311, 311*f*
en lanzadera malato-aspartato, 311, 311*f*
en mecanismo de cambio de afinidad de unión, 327, 328*f*
en metabolismo de la glucosa, 301, 304, 313
mitocondrial, 171
orientación en la membrana, 302, 303*f*
en oxidación de ácidos grasos, 301, 308*f*, 312, 312*f*
en oxidación de piruvato, 304, 305*f*, 306*f*, 307, 309, 314, 314*f*
en potencial de membrana, 302, 303*f*
en quimioósmosis, 302, 302*f*, 326
en reacción química, 301
en respiración celular, 306*f*, 307, 309
sintasa, 302, 307*f*
activación de actina, 81
estructura, 326*f*
en fotosíntesis, 333, 337*f*, 338
en movimiento celular, 79, 80*c*, 81, 81*f*
sobre la cara citosólica de la membrana, 302, 303*f*
en translocación de protones, 317, 322, 329
en vía glucolítica, 304, 305*f*, 310, 311*c*
ATPasas
activación de la actina, 81
Ca^{2+}
membrana plasmática, 256, 256*f*
músculo, 254, 254*f*, 255*f*
subunidad alfa catalítica, 255, 255*f*, 256
en el transporte de membrana, 252*f*, 253, 254, 254*f*, 255*f*. Véase también *Bomba de calcio*
H^+, 252*f*, 253, 257, 258*f*
H^+/K^+, 257
en células parietales, 275, 276*f*
miosina, 81, 81*f*, 82*f*
en movimiento celular, 80*c*, 81, 81*f*, 82*f*
Na^+/K^+, 252*f*, 253, 256, 256*f*
en transporte iónico, 247, 247*f*, 252*f*, 253. Véase también *Bombas impulsadas por ATP*
Atrofia muscular espinal, 501
Audición, células ciliadas, 507, 507*f*
Autoeliminación, 71, 107, 502, 527
Autofagia, 167
Autorradiografía, 93, 93*c*, 703
Autorrenovación, celular, 901
Autosomas, 18, 431
definición, 395
Auxinas, 232
Axón(es), 276, 277*f*
cono de crecimiento, 817*f*
crecimiento, 925
entrecruzamiento neurofilamento-microtúbulo, 806*f*, 810
Axonema, 836, 836*f*

B

B DNA, 104, 104*f*, 105*f*
Bacteria, 2. Véase también *Escherichia coli; Procarionte(s)*
aparato de secreción, 681, 682*f*
citoesqueleto, 174*c*, 175
como organismos experimentales, 24, 25*f*
control génico, 115, 116*f*, 118*f*, 448
evolución, 4, 4*f*, 302, 683
flagelo, 682
fotosíntesis, 302, 331, 335, 336, 336*f*, 337*f*
funciones, 4
marinas, energética celular, 302
membrana, 680, 681
celular, 147
movimiento, 79, 79*f*
actina, 789, 789*f*
pared celular, 680
patogénicas, 4
reproducción, 18
síntesis proteica, 680
traducción, 128*f*
transcripción, 111, 112*f*, 115, 116*f*, 118*f*
sistemas de dos componentes, 117, 118*f*
translocación proteica, 661, 662*f*, 680, 681*f*, 682*f*
transporte mediado por permeasa, 258
Bacteriófagos, 7*f*, 137
atemperados, 141
Bacteriorrodopsina, como proteína transmembrana multipaso, 158, 159*f*
Balsas lipídicas. *Véase Raft lipídicos*
Banda(s)
cromosoma, 431, 431*f*
marginal, 791
G, 431, 431*f*
R, 431, 431*f*
satélite, 412
Base(s), 10, 48
ácido nucleico, 40, 40*f*, 41*c*. Véase también *Pares, apareamiento de bases*
de datos genómica, 380, 381*f*
secuencia de proteínas, 380, 381*f*
amortiguadores, 48
Bax, en apoptosis, 928, 929*f*
Bax/Par6/complejo PKC3, 922, 922*f*
Bcl-2, en apoptosis, 927, 928*f*
Bcl-x, 584
Beta
arrestina, 554, 554*f*, 560, 567
catenina, 642, 642*f*
en el crecimiento de células madre, 642*f*, 643, 903
glucano, 575
sisterolemia, 757
Betabloqueantes, 295, 539
Bicapa fosfolipídica, 13, 13*f*, 149. Véase también *Membrana(s)*
caras hidrófilas, 13, 45, 148*f*, 149
en la cubierta viral, 138, 138*f*
curvatura, 154*f*, 155
espesor, 154, 154*f*
estabilidad, 149
esteroides, 13, 13*f*, 151, 151*f*, 154, 154*f*
estructura, 37*f*, 38, 45, 45*f*, 148*f*
forma
fluida, 154, 154*f*
de gel, 154, 154*f*
hojuelas, 45
lipídica. Véase *Bicapa fosfolipídica*
movimiento lipídico/proteico, 152, 152*f*
núcleo hidrófobo, 13, 45, 148*f*, 149
permeabilidad, 149, 246, 246*f*
proteínas, 157, 158*f*. Véase también *Proteínas de membrana*
tamaño, 45
viscosidad, 153, 154, 154*f*
BimC, 833, 833*c*, 843, 843*f*
Bioingeniería, 193. Véase también *Tecnología del DNA recombinante*
en organismos experimentales, 25
en plantas, 442
Biología del desarrollo, 23
Biomembranas. Véase *Membrana(s)*
Bioquímica, vs. química de solución típica, 36
Biotecnología. Véase *Tecnología del DNA recombinante*
BiP
en el plegamiento de proteínas, 677, 678*f*, 679, 679*f*
en la translocación
cotraduccional, 677, 678*f*
postraduccional, 665, 665*f*
transporte vesicular, 717
BLAST, 380, 381*f*
Blastodermo, 625, 626*f*
Blástula, 623
Bloqueantes de los canales del calcio, 295
para la enfermedad coronaria, 269
Blotting (transferencia)
Northern, 377, 377*f*, 614
en enfermedades genéticas, 398
Southern, 376*f*, 377
Western, 614
BMP2/4
en modelado, 629
en neurogénesis, 652
BMP7, 574
Bombas. Véase *Bombas impulsadas por ATP; Proteínas de transporte de membrana*
de calcio, 252*f*, 253, 254, 254*f*, 255*f*. Véase también *Bombas impulsadas por ATP*
del músculo, 254, 254*f*, 255*f*
de hidrógeno, 252*f*, 253, 257, 258*f*
en plantas, 252*f*, 263
potasio, 257
en células parietales, 275, 276*f*
de sodio-potasio, 252*f*, 253, 254, 256, 256*f*. Véase también *Bombas impulsadas por ATP*
agrupamiento, 286
en nodos de Ranvier, 286
potencial de acción, 274*f*, 275
en la regulación del volumen celular, 272
en el transporte transepitelial, 274*f*, 275
impulsadas por ATP, 247, 247*f*. Véase también *Proteínas de transporte de membrana*
Ca^{2+}, 252*f*, 253, 254, 254*f*, 255*f*
clase
F, 252*f*, 253
como ATP sintasa, 302, 303*f*
en la síntesis de ATP, 302, 303*f*
P, 252, 252*f*, 254*f*, 255*f*, 256*f*
V, 252*f*, 253, 257, 258*f*, 270
electrogénicas, 257
y flipasa, 259, 259*f*, 260*f*
funciones, 253
H^+, 252*f*, 253, 257, 258*f*
en plantas, 252*f*, 263
H^+/K^+, 257
hidrógeno, 252*f*, 253, 257, 258*f*
en plantas, 252*f*, 263
hidrógeno-potasio, 257
MDR1, 258
modelos operacionales, 254, 254*f*, 256*f*, 257
Na^+/K^+, 252*f*, 253, 254, 256, 256*f*
pequeñas moléculas ABC, 252*f*, 253, 258
en plantas, 252*f*, 257, 270, 270*f*
protón, 252*f*, 253, 257, 258*f*
en regulación del volumen celular, 272
subunidades catalíticas, 255, 255*f*, 256
superfamilia ABC, 252*f*, 253
de iones, 252. Véase también *Bombas impulsadas por ATP*
Ca^{2+}, 252*f*, 253, 254, 254*f*, 255*f*
de clase P, 252, 252*f*. Véase también *Bombas impulsadas por ATP*
Ca^{2+}, 252*f*, 253, 254, 254*f*, 255*f*
Na^+/K^+, 252*f*, 253, 254, 256, 256*f*
subunidades alfa catalíticas, 255, 255*f*, 256
$Na2^+/K^+$, 252*f*, 253, 254, 256, 256*f*
de protones
clase
V, 252*f*, 253, 257, 258*f*. Véase también *Bombas impulsadas por ATP*
F, 252*f*, 253
ATP sintasa, 302
en la síntesis de ATP, 302, 303*f*
V, 252*f*, 253, 257, 258*f*. Véase también *Bombas impulsadas por ATP*
en plantas, 252*f*, 257, 270, 270*f*
en el transporte de vesículas sinápticas, 288
en vegetales, 252*f*, 256, 270, 270*f*
de la superfamilia ABC, 252*f*, 253, 258
Borde ondulado, 803
de la membrana, 803
Bordetella pertusiss, 548
Botulismo, 737
Brazo(s)
externo de la dineína, 833*c*, 836, 836*f*
del vector lambda, 366
BRCA1, en cáncer de mama, 947, 958
Brg1, mutación oncogénica, 958
Bromodominio, 476
Brotes vesiculares, 708*f*, 709
en el complejo trans-Golgi, 719, 719*f*
desprendimiento, 721, 721*f*
en la endocitosis mediada por receptores, 733
formación, 707, 708*f*, 719, 719*f*, 720*f*, 721*f*, 738
sináptica, 738
Bucle de DNA, 117, 117*f*
en la activación de la transcripción, 478
Burbujas
de replicación, 135*f*
de transcripción, 110, 110*f*

C

c-fos, 595, 595*f*, 883
c-jun, 955

Ca, trazado de la cadena principal, 62, 63*f*
Cadena
liviana reguladora de miosina, 799, 799*f*
respiratoria, 310. Véase también *Transporte de electrones; Fuerza protón-motriz*
complejo citocromo *c* oxidasa, 320, 320*f*, 321, 321*f*, 322
complejos transportadores de electrones, 320, 320*f*
CoQH2-citocromato *c* reductasa, 320, 320*f*, 322
grupos prostéticos, 318, 318*c*
NADH-CoQ reductasa, 320, 320*f*, 322, 323
succinato-CoQ reductasa, 320, 320*f*
transportadores de electrones, 318
potenciales de reducción, 321
GAG, 43, 213, 213*f*, 215*f*, 644
defectos causantes de enfermedades, 220
hialuronano como, 213*f*, 214, 219
modificaciones, 215, 215*f*
Cadherinas, 199, 199*f*, 204
en la adhesión intercelular, 204, 204*f*, 205*f*
adhesividad, 204
y Ca^{2+}, 204
clásica, 204, 204*f*
desmosómica, 205, 205*f*
en la diferenciación tisular, 204
distribución, 205
diversidad, 204
E, 204, 204*f*. Véase también *Cadherinas*
en melanoma, 205
funciones, 204
P, 204, 204*f*
propiedades de unión, 205
Caenorhabditis elegans
apoptosis, 927, 927*f*, 928*f*
como organismo experimental, 24, 25*f*
complejidad genómica, 384, 384*f*, 613
corte y empalme trans, 501
desarrollo precoz, 908, 909*f*
división celular, 907, 908*f*, 909*f*, 922
genes únicos vs. comunes, 613, 613*f*
inhibición lateral, 646, 646*f*
linaje celular, 907, 908*f*
proteína Notch, 604
señalización, 601. 604
inductiva, 601, 624, 624*f*
transcripción
análisis
de interferencia de RNA, 616
de micromatrices de DNA, 615
Caja
DEAD, 382*c*
de destrucción, 863, 871*f*, 872, 883
de la ciclina B, 863, 871*f*, 872, 883
E, 916
P, 911
Q, 911
RGG, 495
TATA, 454, 455*f*, 457, 458*f*, 470, 474
Calmodulina, 793
como segundo mensajero, 256, 563, 564*f*
en la contracción muscular, 800
estructura, 84, 84*f*
en la glucógeno fosforilasa cinasa, 618
en micromatrices de proteínas, 615, 616*f*
en la regulación proteica, 84
en el transporte de Ca^{2+}, 256
Calnexina, en el plegamiento de proteínas, 677, 678*f*
Caloría, 51
Calreticulina, en plegamiento de proteínas, 677, 678*f*
cAMP
acción localizada, 554, 555*f*
como segundo mensajero, 541, 541*f*, 545*c*, 564
funciones, 537
en el metabolismo del glucógeno, 550, 552*f*, 553
y proteincinasa A, 83, 84*f*, 550, 552*f*
síntesis, 537
en adenilciclasa, 549, 550*f*
amplificación de señales, 552
en la transcripción, 115, 116*f*, 566*f*, 567
Canales
del calcio, y proteínas de anclaje, 554
de cationes regulados por acetilcolina, en la contracción muscular, 290
del ion
calcio
apertura/cierre, 290
en célula bastón, 557, 558*f*
estructura, 282
en la secreción de neurotransmisores, 289
cloruro, 290
regulados por ligando, 287, 573*c*. Véase también *Receptores de neurotransmisores*
sodio. Véase también *Canales iónicos*
agrupamiento, 286
apertura/cierre, 279, 280*f*
en célula bastón, 557, 558*f*
densidad, 282
estructura, 282, 283*f*
filtro de selectividad, 265
inactivación, 279, 280*f*, 284, 284*f*
mutaciones, 295
en nodos de Ranvier, 286, 286*f*
potencial de membrana, 261
en la propagación del potencial de acción, 278, 278*f*, 280*f*, 281*f*, 283*f*
segmento inactivador del canal, 279, 283*f*, 284
iónicos
análisis de expresión de ovocitos, 266, 266*f*
calcio
apertura/cierre, 290
en célula bastón, 557, 558*f*
estructura, 282
en la secreción de neurotransmisores, 289
en célula bastón, 557, 558*f*
cloruro, 290
como proteínas
efectoras, 545*c*, 555, 561
transmembrana multipaso, 158
defectos causantes de enfermedades, 266
estructura, 263, 263*f*
filtro de selectividad, 263, 263*f*, 264*f*
no regulados, 262
potasio
apertura/cierre, 279, 280*f*, 282, 283
bacterianos, 263
en célula bastón, 557, 558*f*
en la despolarización de la membrana, 278*f*, 279, 280*f*
estructura, 263, 263*f*, 282, 283*f*
filtro de selectividad, 263, 263*f*, 264*f*
inactivación, 279, 280*f*, 284, 284*f*
en el potencial de membrana en reposo, 262, 263*f*, 264*f*
en la propagación del potencial de acción, 278*f*, 279, 280*f*, 281, 283*f*
putativo, caracterización, 266, 266*f*
receptores muscarínicos para acetilcolina en el músculo cardíaco, 556, 556*f*
en reposo, 262, 263*f*, 264*f*
putativo, caracterización, 266, 266*f*
en el receptor de acetilcolina nicotínico, 291, 292*f*
en la regulación del volumen celular, 164, 164*f*
regulados
por acetilcolina, en la contracción muscular, 290, 291*f*
por cGMP, en la activación de la rodopsina, 558, 558*f*
por ligando, 287, 573*c*. Véase también *Receptores de neurotransmisores*
por voltaje, 276
segmentos P, 263, 263*f*
sodio
agrupamiento, 286
apertura/cierre, 279, 280*f*, 282, 283
en célula bastón, 557, 558*f*
densidad, 282
estructura, 282, 283*f*
filtro de selectividad, 265
inactivación, 279, 280*f*, 284, 284*f*
modelo operacional, 279, 280*f*
mutaciones, 295
en los nodos de Ranvier, 286, 286*f*
potencial de membrana, 261
en la propagación del potencial de acción, 278, 278*f*, 280*f*, 281*f*, 283*f*
segmento de inactivación del canal, 279, 283*f*, 284
subunidades, 263, 263*f*
técnica de *patch clamp*, 265, 265*f*, 279, 280*f*
en el transporte de la membrana, 247, 247*f*, 262
de K^+ en reposo, 262, 263*f*, 264*f*
de translocación, 659
Cáncer, 935
amplificación génica, 944
análisis
genético, 936
de micromatrices del DNA, 615, 943, 950
angiogénesis, 620, 938
anormalidades en el cromosoma, 946, 948*f*, 955, 961
apoptosis, 938, 960
aspectos evolutivos, 936
y carcinógenos, 963, 964
cervical, papiloma virus humano, 143
clasificación, 938
de colon, 941, 942*f*
hereditario, 947, 964*c*
mutacionesl, 941,942f
y reparación defectuosa del DNA, 965
colorrectal
hereditario, 947, 964*c*
mutaciones, 941, 942*f*
reparación de DNA defectuoso, 965
crecimiento
celular, 935, 936
tumoral, 938
en la telomerasa, 437
y daño del DNA, 958, 959*f*, 961, 964, 969
desregulación del ciclo celular, 943, 944*f*, 956
factor
beta de crecimiento y transformación, 577
estimulador de colonia de granulocitos, 581
de crecimiento, 938, 951
de transcripción, 955, 956*f*
filamentos intermedios, 808
y genes supresores de tumores, 884
hepático, 964*c*
hereditario, 884, 946, 964, 964*f*
colorrectal, 947, 964*c*, 965
de mama, 947, 958, 964*c*
retinoblastoma, 884, 946, 958
de hígado, 964, 964*c*
incidencia relacionada con la edad, 940
inducción, modelo de incidencias múltiples, 940, 940*f*, 942*f*
de mama, 947, 958, 964*c*
anticuerpo para Her2, 952
receptor Her2, 952
metástasis, 937
mutaciones, 935, 943, 944*f*
en cáncer
de colon, 941, 942*f*
de mama, 947, 958
causantes de la desregulación del ciclo celular, 943, 944*f*, 956
en células madre, 938
correctora de prueba, 962, 962*f*
ganancia de función, 944, 944*f*, 945*f*
hedgehog, 642
herencia, 946
múltiple, 940, 940*f*
pérdida de función, 946, 959-960
proteínas afectadas, 944*f*
en las proteínas estimuladoras de la proliferación, 951
puntual, 944, 944*f*, 945, 945*f*, 962*f*, 963
ras, 588, 939*f*, 940, 941
RB, 946-947
en los receptores codificadores de protooncogenes, 951
y reparación del DNA defectuoso, 961, 964, 964*c*
en retinoblastoma, 946, 947*f*, 958
y oncoproteínas, 953, 954*f*
de piel
cadherina E, 205
reparación de DNA defectuoso, 964*c*, 966
origen, 935
panorama general, 935-936, 936*f*
pérdida de la regulación celular, 935, 936*f*
piel, 964*c*, 966
E-cadherina, 205
de pulmón, 963
renal, 462, 463*f*
y retrovirus, 142, 945
de riñón, 462, 463*f*
y Smads, 577
en la telomerasa, 969
tirosincinasas receptoras, 587
transformación maligna, 589, 938*f*, 939
trasplante de médula ósea, 905
tumor
de Wilms, 462, 463*f*
que expresa MDR, 259
CAP, en la transcripción, 115, 116*f*
Capacidad amortiguadora (*buffering*), 48
Capacitor, como membrana semipermeable, 262
Capas germinales, destinos celulares, 906, 906*f*
Cápside, 66, 137
viral, 137
Cara
citosólica, 150, 150*f*
exoplasmática, 150, 150*f*
Carbohidratos. Véase también *Oligosacáridos; Polisacáridos*
estructura, 37*f*, 41, 41*f*
plantas, 42
producción fotosintética, 333
síntesis y procesamiento
en bacterias marinas, 302
en las plantas. Véase *Fotosíntesis*
en el retículo endoplasmático, 673, 673*f*
Carboxilación gamma, 70, 70*f*
Carcinógenos, 935, 963
químicos, 963, 963*f*
Carcinoma, 938
Cardiolipina
mitocondrial, 308
síntesis, 754
Carioferinas, 513, 514
Cariómeros, 873, 873*f*
Cariotipo, 12*f*, 430
Carotenoides, 333, 334*f*
Cartílago
agregado de proteoglucanos, 219, 220*f*
colágeno, 218*f*, 219
presión de turgencia, 219
propiedades similares al gel, 219, 220
Cascada
de cinasas, 66*c*, 593, 593*f*
en levadura, 596, 596*f*
MAP, 593
en el metabolismo de la glucosa, 619
proteínas plataforma *(scaffold)* Ras, 596*f*, 597
Ras, 593
de transcripción, en el desarrollo, 633, 637
Caspasas, en apoptosis, 927, 928*f*, 929*f*, 930
Casquete 5', 112, 113*f*
adición, 493, 504
eliminación, 521, 521*f*, 522
en la traducción, 126, 127
Catabolismo aerobio, 54
Catalasa, peroxisómica, 168, 313, 693, 694*f*
Catálisis, 74, 75*f*
Catalizadores, 10, 46
Cationes, 33
Caveolina, 543
CBP, 467, 476
CBP/300, 567
CD36 transportador de ácido graso, 755, 757
Cdc, mutantes, 357, 358, 358*f*, 857, 864
Cdc13, 865, 866, 866*f*
Cdc14 fosfatasa, 879
Cdc2, 810, 864, 865, 865*f*, 875
Cdc20, 872, 888
Cdc25 fosfatasa, 865, 866, 866*f*, 867
Cdc25A, 885, 889
Cdc25C, 885
Cdc28, 875
Cdc45, 880, 880*f*
Cdh1, 863, 873, 877
inactivación, 878, 879
CDK1, 883, 883*f*, 885
CDK2, 866, 867*f*, 883, 883*f*
CDK4, 883, 883*f*
CDK6, 883, 883*f*

cDNA, 365
  genotecas, 365, 366*f*
Cebado, en la señalización, 648*f*, 649
Cebador
  de DNA, 436
  de RNA, 436
  en la replicación, 133
CED-3, 927, 927*f*, 928
CED-4, 927, 927*f*, 928
Célula(s)
  3T3, transformación oncogénica, 938, 939*f*, 940
  a/alfa
    conversión celular, 596, 920, 920*f*, 921*f*
    especificación, 910, 911*f*, 912*f*
    haploide/diploide, 355, 355*f*
    producción, 912, 912*f*
  acinares pancreáticas, retículo endoplasmático rugoso, 168, 659*f*, 660
  acompañantes, 346*f*, 347
  alfa, 596
    especificación, 910, 911*f*, 912*f*
  aneuploides, 237
    en cáncer, 948*f*
    animal, 15
  B. Véase también *Linfocitos*
    en la producción de hibridomas, 238
  bastón
    en la adaptación visual, 560, 560*f*, 561*f*
    estructura, 557*f*
    receptores acoplados a la proteína G, 556. Véase también *Rodopsina*
  beta, pancreáticas, 618, 618*f*
  cancerosas
    análisis de micromatrices de DNA, 615, 943, 950
    aneuploidía, 961
    características, 936, 937*f*, 938*f*
    cultivo, 939, 939*f*
    y lámina basal, 937
    movimiento, 937
    proliferación, 935, 936
    transformación, 938*f*, 939
  cebadas, en la señalización, 648*f*, 649
  ciliadas, 507, 507*f*
  del citoesqueleto. Véase *Citoesqueleto*
  clasificación, 197
  como fábricas químicas, 14
  componentes principales, 147, 148*f*
  comunicación. Véase *Señalización*
  contenido proteico, 10, 147. Véase también *Proteína(s)*
  contenidos, 147
  diferenciadas que no se dividen, 907
  diploide, 18, 18*f*
  endoteliales
    superficie
      abluminal, 202
      luminal, 202
  epiteliales, 2*f*
    microvellosidades, 198*f*, 202, 203*f*, 274*f*
    modelo de célula rinón canino Madin-Darby, 204*f*, 205
    polaridad, 201, 207, 274
    superficie
      apical, 201, 202*f*
      basolateral, 202, 202*f*
    transporte de la membrana, 274, 274*f*, 276*f*
    uniones estrechas, 274
  espumosas, en aterosclerosis, 768*f*, 769, 769*f*, 770
  estructura(s), 3, 3*f*, 15, 15*f*, 147*f*, 148*f*
    eucariote, 3, 3*f*
    típicas, 166*f*
  evolución, 4, 4*f*
  forma, 15, 176
  funciones, 13
  fundadoras, 907
  germinales, 899
    definición, 899
    en meiosis, 355. Véase también *Meiosis*
  gliales, 918
    formadora de mielina, 285
  haploide, 18, 18*f*
  hematopoyéticas
    adhesión a la matriz, 226
    cultivo, 236
  híbridas, 238
    aislamiento, 239
    producción, 237, 238*f*
  hijas, 854
    en la división celular simétrica vs. la asimétrica, 900
  huevo (ovocitos), poliadenilación citoplasmática, 519, 520*f*
  inmortal, 236, 237*f*
  en interfase, inductores de la mitosis, 856, 857*f*
  L, cadherinas, 204, 204*f*
  de la línea germinal, 13, 906
  madre, 18, 900
    autorrenovación, 901
    definición, 899
    diferenciación, 901, 901*f*
    división, 900, 901*f*. Véase también *División celular*
      asimétrica, 900, 900*f*, 901, 901*f*
      simétrica, 900, 900*f*, 901, 901*f*
    embrionaria, 8, 901, 902*f*
      cultivadas, 901, 901*f*
      ratón, 26
        knockout, 389, 389*f*
      murinas, 26, 902
      en la producción de ratones knockout, 389, 389*f*
    hematopoyéticas
      adhesión a la matriz, 226
      cultivo, 236
    hematopoyéticas pluripotenciales, 904, 904*f*
    de la línea germinal, 906
    linfoides, 904, 904*f*
    mieloides, 904, 904*f*
    murinas, 26
    mutaciones oncogénicas, 937
    en plantas, 905, 905*f*
    pluripotentes, 900, 901. Véase también *Células madre*
    hematopoyéticas, 904, 904*f*
    preservación, 903
    producción, 903
    en la regeneración de tejidos, 902, 903*f*, 904*f*
    totipotenciales, 901
    trasplante, 902, 905
    tumor, 937
    unipotenciales, 900
    uso terapéutico, 902, 905
  matriz extracelular. Véase *Matriz extracelular*
  mesófilas, en la fotorrespiración, 345, 345*f*, 346*f*
  metafase, uso experimental, 825
  mieloma, en la producción de anticuerpos monoclonales, 238
  microclima, 14
  moléculas, 8
  morfología, 1, 2*f*
  en el movimiento celular, 800
  muerte
    necrótica, 924
    programada, 18, 19*f*, 900, 924. Véase también *Apoptosis*
  musculares
    bombas de Ca^{2+}, 254, 254*f*, 255*f*
    cardíacas
      antiportador de cationes, 269
      proteínas de anclaje, 554, 555*f*
      receptores muscarínicos para acetilcolina, 556, 556*f*
    desminas, 807, 807*c*, 811, 811*f*
    distrofina, 226, 226*f*
    especificación y diferenciación, 913. Véase también *Miogénesis*
    estructura, 797
    formación, 913. Véase también *Miogénesis*
    potencial de acción. Véase *Potencial de acción*
    retículo sarcoplasmático, 253, 254, 254*f*, 799
    señalización, 227
  nacimiento, 899*f*, 900
  nerviosas. Véase *Neurona(s)*
  neurales, 227
  núcleo. Véase *Núcleo*
  observación, 20, 20*f*
  orgánulos, 147
  oxínticas, 275, 276*f*
  pancreáticas beta, secreción de insulina, 618, 618*f*
  parietales
    del estómago, 275, 276*f*
    de plantas, 2*f*
    en la división celular, 919
  plasmáticas, retículo endoplasmático, 168
  polaridad, 7, 153
  posmitóticas, 854
  postsinápticas, 277, 278*f*, 736
  precursoras/progenitoras, 899
  presinápticas, 277, 278*f*, 736
  procariontes
    contenidos, 147
    estructura, 2, 3*f*, 147
    membrana, 147. Véase también *Membrana(s)*
  progenitoras. Véase *Células precursoras/progenitoras*
  purificación, 178. Véase también *Purificación celular*
  de Purkinje, 2*f*
  R7, en *Drosophila*, proteínas Ras, 590, 590*f*
  en reposo, 883
  respuesta a los cambios medioambientales, 16. Véase también *Control génico*
  de riñón canino Madin-Darby, 204*f*, 205, 237
    clasificación proteica, 726, 726*f*
  de riñón, acuaporinas, 274
  sanguíneas, 2*f*. Véase también *Eritrocito(s); Leucocito(s); Linfocito(s); Plaqueta(s)*
    origen, 904, 904*f*
  de Schwann, 285
  de señalización, 533
  somática(s), 13
    definición, 899
    genoma completo, 906
    transposición, 414
  T. Véase *Linfocitos*
    activación, 564
    citometría de flujo, 179, 179*f*, 180
    epidérmicas, en la curación de heridas, 904
  tipos, 2, 2*f*, 197
  totipotenciales, 901
  del tubo criboso, 346*f*, 347
  turgencia, 170
  de la vaina fascicular, en fotorrespiración, 345, 345*f*
  vegetales, 2*f*
    celulosa, 42
    elongación, 232
    estructuras típicas, 166*f*
    interconexiones, 15
    meristemáticas, 232
    orgánulos, 170, 170*f*, 172, 172*f*
    proteínas adhesivas, 234, 234*f*
  Celulosa, 42, 164
    sintetasa, 232
  CENP-E, 833, 833*c*, 841, 842*f*, 844*f*, 846
  Centimorgan (cM), 396
  Centrifugación, 86
    diferencial, 87, 88*f*, 181
    gradiente de densidad, 181
      en equilibrio, 181
      de los orgánulos, 181, 181*f*
      por zonas de velocidad, 87, 88*f*
  Centro
    hidrófobo, membrana, 149
    organizador de microtúbulos (MTOC), 177, 178*f*, 817, 823, 825, 826*f*
    en plantas, 848
    de reacción
      en la bacteria violeta, 336, 336*f*, 337*f*
      en los fotosistemas, 333
  Centrómeros, 838
    definición, 413
    DNA satélite, 413, 841
  Centrosoma(s), 825, 826*f*
    duplicación, 841, 842*f*
    en la formación del huso, 843
    microtúbulos, 177
    separación y migración, 841, 843*f*
  Cepa(s)
    celular, 236
    puras, 355
  Cerberus, 652
  Cesta nuclear, 509*f*, 510
  cGMP
    en la activación de la rodopsina, 558, 558*f*
    como segundo mensajero, 541, 541*f*, 545*c*, 558, 558*f*, 564, 564*f*
    fosfodiesterasa, 558
      como segundo mensajero, 541, 541*f*
    óxido nítrico, 564, 564*f*
    en la relajación muscular, 564, 564*f*
    síntesis, 564*f*, 565
  Chaperonas, 69, 69*f*, 70, 129
    en el plegamiento de proteínas, 69, 69*f*, 677, 678*f*, 679
    en la translocación
      cotraduccional, 677
      postraduccional, 665, 665*f*
    en el transporte
      de proteínas
        bacterianas, 682, 682*f*
        de cloroplastos, 691, 692*f*
        mitocondriales, 685, 685*f*, 686, 690
  Chaperoninas, 66*c*, 69*f*, 70, 686
    en el plegamiento de proteínas, 69*f*, 70
  Chironomous tentans, anillos de Balbiani, 515, 516*f*
  Chk2, 889, 890
  Chlamydomonas, movimiento rítmico flagelar, 837, 837*f*
  Choque térmico, genes, transcripción, 486
    ciclina
      A, 885
      B, 860*f*, 861, 862*f*, 863*f*, 885
      de fase S, 877, 878*f*
      mitótica, 860, 860*f*, 862*f*, 863*f*
    complejo promotor de la anafase (APC), 855*f*, 856, 862, 872, 872*f*, 878
    complejos
      CDK-ciclina, 855, 855*f*, 857, 858*c*
      Cln3-CDK, 876, 877*f*
    degradación/fosforilación de proteínas, 855
  despolimerización de laminina, 868*f*, 869, 869*f*
  estudios experimentales. Véase *Estudios del ciclo celular*
  factores
    E2F, 884, 885*f*
    promotor
      de la fase S, 876, 876*f*
      de la mitosis (MPF), 859, 859*f*, 860, 860*f*, 861, 862*f*, 863*f*, 865, 866*f*
  fosforilación de la nucleoporina, 870
  genes
    de respuesta
      retardada, 883, 884*f*
      temprana, 883, 884*f*
  inhibidor de la fase S, 878, 878*f*, 879
  en mamíferos, 881, 882*f*, 886
  mecanismo molecular, 868
  panorama general, 855, 855*f*
  pasos, 855*f*
  proteínas
    de control, 856
    inhibidoras de CDK, 885, 886
    Rb, 884, 885*f*, 886
  puntos de control, 886, 887*f*
  señalización, 882
  separación de cromátidas, 870, 871*f*, 872*f*
  traduccional, 884
  transcripcional, 883, 884*f*
  ubicuitina, 863
  en *S. cerevisiae*, 874, 875*f*
  en *S. pombe*, 864, 864*f*, 865*f*, 866*f*, 867*f*, 875
  en *Xenopus*, 858, 859*f*, 860*f*, 863*f*, 865
  replicación
    celular, 881
    del centrosoma, 839*f*
    cromosómica, 853
    del DNA, 854, 854*f*, 856, 878, 879
      en las células de mamífero, 883
      ciclina A, 885
      en levaduras, 878, 879
  salida de la célula, 854
  separación
    del centrosoma, 839*f*, 841, 843*f*
    cromosómica, 20, 20*f*, 839*f*, 846, 846*f*
  telofase, 873, 873*f*
    iniciación, 879
  Ci, 641, 641*f*
  Cianobacteria, 2. Véase también *Procarionte(s)*
    flujo citoplasmático, 795, 795*f*
    fotosíntesis, 335
  Cicatrización de heridas
    células T, 904
    señalización, 803
  Ciclina(s)
    A, 883,883f,885
    A-CDK2, 866, 867*f*
    B. Véase también *Ciclina(s) mitótica(s)*

Ciclina(s) *(Cont.)*
en las células de mamíferos, 883, 883*f*, 885
en *Xenopus*, 861, 862*f*, 863*f*, 885
en las células de mamíferos, 883, 883*f*
como factores promotores de la fase S, 875, 876*f*, 877*f*
concentración, 855
D, 883, 883*f*, 884
D1, en cáncer, 957
degradación, 72, 862, 862*f*, 879, 883
en la diferenciación muscular celular, 917
en la fase S, 877, 878*f*
fosforilación, 72
G_1, 855, 855*f*, 876
como factores promotores de la fase S, 875, 876*f*, 877*f*
en meiosis, 891
en levadura, 858*c*
en la meiosis, 891
mitótica(s), 860, 860*f*, 862*f*, 863*f*
ciclina B, 861
degradación, 862, 863*f*
en la regulación del factor promotor de la mitosis, 860
en *S. pombe*, 865, 866, 866*f*
en la regulación del ciclo celular, 855, 855*f*, 857, 858*c*
en *S. cerevisiae*, 877, 878*f*, 879*f*
T, complejo antiterminación, 485, 485*f*
tipos, 858*c*
en vertebrados, 858*c*
tipo B, 861, 863, 863*f*, 877, 878*f*, 883
degradación, 879
Ciclo
del ácido
cítrico, 78, 309, 310*f*, 311*c*
tricarboxílico, 309, 310*f*
de Calvin, 342, 343*f*
celular, 17, 17*f*, 853
alineación cromosómica, 839*f*, 841, 856
anafase, 838, 839*f*, 845, 846*f*, 854, 856
iniciación, 870, 871*f*, 872*f*, 887, 888
captura cromosómica, 841, 842*f*, 843
células
hijas, 854
en reposo, 883
citocinesis, 873
condensación cromosómica, 20, 20*f*, 839*f*, 845
definición, 853
descondensación cromosómica, 854, 862, 870, 871*f*, 872*f*
direccionalidad, 856
duplicación del centrosoma, 841, 842*f*
duración, 854, 883
estabilización cromosómica, 844*f*, 845
estudio, experimentos de fusión celular, 856
en eucariontes, 17, 17*f*
fase
G0, 854*f*, 883, 883*f*, 885
G1, 17, 17*f*, 854, 854*f*, 874
G2, 17, 17*f*, 854, 854*f*, 874. Véase también *Mitosis*
M, 17, 17*f*, 838, 854, 854*f*. Véase también *Mitosis*
S, 17, 17*f*, 854, 854*f*, 883
entrada, 874, 883
fases, 854, 854*f*
entrada prematura, 886
interfase, 839*f*, 854
meiosis, 890, 891*f*
migración del centrosoma, 839*f*
y mutaciones sensibles a la temperatura, 357
diferenciación celular terminal, 917
y mutaciones *cdc*357
orígenes de replicación, 133, 135, 433, 856, 879, 880*f*
panorama general, 854
punto
de restricción, 855*f*, 856
en levaduras, 874
en mamíferos, 882, 882*f*
de control, 886, 887*f*
reensamblaje de la envoltura nuclear, 873, 873*f*
regulación
en cáncer, 943, 944*f*, 956
Cdc28, 875
Cdh1, 863, 877
CDK1, 885
del centríolo, 841
del centrosoma, 841
de crecimiento lítico, de virus, 139, 140*f*, 141*f*
de Krebs, 309, 310*f*
de los puentes cruzados, 798, 798*f*
Q, 323, 323*f*, 324*f*
en la fotosíntesis, 339
Ciclopia, 642
Cigoto, 7, 18, 624, 625*f*
destinos celulares, 906
división celular, 901
Cilios, 818, 818*f*
dineínas axonémicas, 835, 836*f*
movimiento rítmico, 829, 837
Cimógenos, 72
activación, en la regulación de proteínas, 85
Cinasa(s). Véase también *tipos específicos*
activadora de CDK (CAK), 866, 866*f*
asociadas a la pared, 234
dependientes de ciclina (CDK), 810, 825, 853
en cáncer, 957, 958*f*
en la diferenciación de las células musculares, 917
estructura, 866, 867*f*
en el factor promotor de la mitosis, 876
en levaduras, 858*c*
en mamíferos, 883, 883*f*
en la regulación del ciclo celular, 855, 855*f*, 857, 858*c*
en la replicación del DNA, 136
en *S. cerevisiae*, 878-879,878f,879f
en *S. pombe*, 865, 866*f*, 867*f*
en seres humanos, 866, 867*f*
en vertebrados, 858*c*, 866, 867*f*, 883, 883*f*
JAK, 578
como moléculas de señalización, 582, 582*f*
identificación, 582, 582*f*
inactivación
por proteínas SOCS, 586
por SHP1, 586
del receptor beta-adrenérgico (BARK), 553
activación mediada por arrestina, 567
asociadas a la pared, 234
en la señalización, 543
Cinesina(s), 831, 833*c*
citosólica, 832, 833*c*
dominios
de cabeza, 831, 832*f*
de cola, 831, 832*f*
del cuello, 833
estructura, 831, 832*f*
fuerzas generadas, 833
hacia los extremos (+/-), 832
largo del paso, 833
mitótica, 833, 833*c*, 843, 843*f*
en la formación del huso, 844*f*, 845
en el movimiento celular, 79, 80*c*, 80*f*, 82, 791, 834, 835*f*
direccionalidad, 79, 80*c*, 80*f*, 82, 791, 834
miosina, 835, 835*f*
procesividad, 833
secuencia tetratricopeptídica, 833
subfamilias, 832
en el transporte anterógrado, 832
Cinetocoro, 435, 840, 841, 841*f*, 842*f*, 854
casquete del microtúbulo, 845
CIP, 885, 886
Circulación enterohepática, 756
11-*cis*-retinal, 556
Cisteína, 38, 39*f*, 40. Véase también *Aminoácido(s)*
Cisternas, 166*f*, 168
cis-Golgi, 701, 702*f*. Véase también *Complejo de Golgi*
medial-Golgi, 701, 702*f*
trans-Golgi, 701, 702*f*
Citocalasina D, 786
Citocinas inflamatorias, en la activación de N-kB, 602, 602*f*
Citocinesis, 847, 854, 873
actividad de la fosfatasa constitutiva, 873
anillo contráctil, 796, 848
definición, 847, 854
etapas, 839*f*
localización de la miosina, 796, 796*f*
plano de escisión, 847*f*, 848, 874
en las plantas, 848, 849*f*
Citocromos, 318, 319*f*
b_2, direccionamiento, 688*f*, 690, 690*f*
c, 321
en la apotosis, 929
potencial de reducción, 321
c hemo liasa, direccionamiento, 688*f*, 690
Citoesqueleto, 15, 15*f*, 173, 779
adhesión de la matriz extracelular, 223
en la distrofia muscular, 226, 226*f*
adhesión
de la membrana, 176, 176*f*
de moléculas de adhesión celular, 200, 203
de proteínas adaptadoras, 204*f*, 205
de receptores de adhesión celular, 200, 203
de uniones celulares, 204*f*, 205
en bacterias, 174*c*, 175
de las células cancerosas, 937
conexión
a la matriz extracelular, 222*f*, 223
de la membrana proteica, 162, 173*f*, 176
conservación evolutiva, 175
definición, 147, 173, 779
eritrocito, 176, 176*f*, 177, 791
estructura, 148*f*
filamentos, 15, 15*f*, 147, 174, 174*c*, 411, 779
actina, 173*f*, 174, 174*c*, 175*f*, 176*f*, 780. Véase también *Filamentos de actina*
como familia proteica, 411
haces, 176, 282, 283, 283*f*, 782, 783*f*, 796, 796*f*
intermedios, 173*f*, 174, 174*c*, 175*f*, 177*f*
microtúbulos, 173*f*, 174, 174*c*, 175*f*, 177, 178*f*
organización, 176
retículo, 176
en las uniones celulares, 177, 203, 203*f*
función, 147, 148*f*
movimiento de la proteína motora, 79, 79*f*, 82*f*
organización en forma de rayos y ejes, 176*f*, 177
plaquetas, 790, 790*f*
proteínas. Véase *Citoesqueleto, filamentos*
Citometría de flujo, 178, 179*f*
Citoplasma, 3, 3*f*
definición, 147
Citoqueratinas, 807, 807*c*. Véase también *Filamentos intermedios*
Citosina, 40, 40*f*
desaminación, 963
en la doble hélice, 103, 104*f*, 105*f*. Véase también *Pares de bases/apareamiento de bases; Doble hélice*
eritropoyéticas, 581
estructura, 581, 581*f*
expresión "en estallidos", 521
funciones, 580
en la hematopoyesis, 905
inflamatorias, en la activación de NF-κB, 602, 602*f*
producción terapéutica, 377
Citosol, 3
concentración
iónica, 253*c*
de proteínas, 173
constituyentes, 173
definición, 147
degradación proteica, 679
filamentos del citoesqueleto, 173, 173*f*
glucólisis, 304, 305*f*, 310, 311*c*, 314, 314*f*
orgánulos, 165, 166*f*
pH, regulación de bombas. Véase *Bombas impulsadas por ATP*
Citrato en el ciclo del ácido cítrico, 309, 310*f*
Cl^-. Véase *Iones cloruro*
Clasificación
de proteínas. Véase *Direccionamiento de proteínas*
de señales, 708*f*, 711*c*, 716, 717, 717*f*, 729. Véase también *Señalización*
diacídica, 711*c*, 716
KDEL, 711*c*, 717, 717*f*
KKXX, 711*c*, 717
en lipoproteínas de baja densidad, 729
LL, 711*c*
manosa-6-fosfato, 711*c*, 722*f*, 723
NPXY, 711*c*, 730
YXXö, 711*c*, 720, 730
Clasificador celular activado por fluorescencia (FACS), 178, 179*f*, 180
Clatrina
complejo proteínas adaptadoras, 720, 720*f*
estructura, 720, 720*f*
Claudina-1, 206*f*, 207
defectos causantes de enfermedades, 208
Clb1, 878, 879*f*
Clb2, 878, 879*f*
Clb3, 878, 879*f*
Clb4, 878, 879*f*
Clb5, 877, 879*f*
Clb6, 877, 879*f*
CLIP170, 824, 824*c*
Clonación
de animales, 8, 8*f*
en cáncer, 935, 936
de cDNA, en la producción de proteínas, 377
celular, 235, 235*f*
hibridoma, 238, 238*f*
DNA, 361, 364
en la construcción de genoteca de cDNA, 365, 366*f*
cromosomas artificiales de levadura, 437
ensayo de hibridación de membrana, 367, 367*f*
enzimas
de modificación, 361
de restricción, 361, 361*f*, 362*c*
genes causantes de enfermedades, 398
en genoteca de cDNA, 365, 366*f*
ligasa, 362, 363*f*
modificación de enzimas, 361
pasos, 361
secuenciación, 372, 372*f*, 373*f*
separación, 371, 372*f*
sondas. Véase *Sondas de DNA de oligonucleótidos*, 368
subclonamiento, 371
vectores, inserción de fragmento de DNA, 362
transferencia nuclear, 8, 906
vectores, inserción de fragmentos de DNA, 362
virus, 139
Clon viral, 139
Clorofila, 333, 334, 334*f*
absorción lumínica, 332
en el centro de reacción, 335, 335*f*
en complejos recolectores de luz, 333, 335, 335*f*
estructura, 332*f*
en fotosistemas PSI/PSII, 338, 338*f*
transporte fotoelectrónico, 334, 334*f*
Cloroplasto(s), 166*f*, 172, 172*f*
crecimiento y división, 683
direccionamiento de proteínas, 683, 683*c*
secuencia señal, 683, 683*c*
DNA, 442
edición del RNA, 508
estructura, 332*f*, 442, 683
evolución, 302, 303*f*, 438, 683
fijación del carbono, 342
fotosíntesis, 302
fotosistemas, 338, 338*f*
membrana, 172, 172*f*, 683
síntesis
de ATP, 14
de proteínas, 683
transformación, en bioingeniería, 442
cmyc, 956
Coactivadores, 467, 476
CBP/300, 567
complejo
histona acetilasa, 477, 477*f*, 478*f*
SWI/SNF, 476, 477*f*, 478, 479*f*
en el ensamblaje del complejo de preiniciación, 478, 479*f*
Coatómeros, 716
Código
genético, 11, 119, 120*c*, 121*c*, 121*f*
degeneración, 120, 380
desviaciones, 121, 121*c*

Código *(Cont.)*
marco de lectura, 120, 121*f*
mitocondrial, 441, 441*c*
naturaleza universal, 26
de histona, 476, 476*f*
de tripletes. Véase *Código genético*
Codón(es), 119, 120*c*, 121*c*, 121*f*
apareamiento de bases anticodones, 122, 123*f*
definición, 119
de inicio, 120, 121*f*, 125, 126*f*
AUG, 120, 120*c*, 125, 126*f*
en marco de lectura, 120, 121*f*
reconocimiento del tRNA, 121
de terminación, 120, 121*c*, 523
Coeficiente de partición (*K*), 246
Coenzima
en la oxidación de piruvato/ácido graso, 309
Q, 319, 319*f*, 320*f*, 321
Cofilina, 787, 788*c*, 801*f*, 802, 803
Cohesinas
en la meiosis, 891, 892, 892*f*
en la mitosis, 840, 872, 892*f*
Cola poli (A), 112
Colágeno, 15, 209
de anclaje y formador de láminas, 216*c*, 217
asociada con fibrillas, 216*c*, 217, 218, 218*f*
cadenas proalfa, 217, 218
en el cartílago, 218*f*, 219
clasificación, 216*c*
defensa del huésped, 216*c*, 217
enlaces cruzados, 217*f*, 218, 219
estructura, 211, 211*f*, 212*f*, 216*c*
fibrilar, 216*c*, 217, 218*f*. Véase también *Fibrillas de colágeno*
en los huesos, 218
en la lámina basal, 210*f*, 211, 211*f*, 212*f*
en la matriz extracelular, 201
en la membrana basc, 198*f*, 211
procolágeno, 217, 217*f*
proteoglucanos, 217, 218, 218*f*, 219
síntesis, 217, 217*f*
en los tendones, 218, 218*f*
tipos, 211, 216*c*
IV. Véase *Colágeno*
transmembrana, 216*c*, 217
trastornos, 218, 219
triple hélice, 211, 211*f*, 212
defectos, 219
Colas de histonas
desacetilación, 474, 474*f*, 475*f*
fosforilación, 476
hiperacetilación, 475, 475*f*
hipoacetilación, 473
modificación, y condensación de la cromatina, 425*f*, 426, 471, 476
Colcemida, 825
Colchicina, 825
Cólera, 208, 548
Colesterol, 13, 13*f*, 151, 151*f*, 154, 154*f*, 743, 745*c*, 750. Véase también *Lípido(s); Lipoproteína(s); Lípidos de membrana*
en aterosclerosis, 768
Colesterol bueno, 759. Véase también *Lipoproteína(s) de alta densidad (HDL)*
como precursor biosintético, 750*f*, 752
dietario, 756
estructura, 750*f*
hepático, 756
malo, 759. Véase también *Lipoproteína(s) de baja densidad (LDL)*
de membrana, 13, 13*f*, 151*f*, 152, 154, 154*f*. Véase también *Lípidos de membrana*
y fluidez de la membrana, 151*f*, 152
propiedades, 750
regulación, 751
por retroalimentación, 763, 764*f*, 765*f*
proteínas de unión al SRE, 764, 764*f*, 765*f*
síntesis, 750*f*
transporte. Véase también *Transporte lipídico*
endocitosis mediada por receptores, 728, 728*f*, 729*f*, 760, 761*f*, 762*f*
incorporación mediada por SR-BI, 762, 762*f*
intercelular, 744*f*, 745*c*, 755
intracelular, 744*f*, 745*c*, 752
inverso, 770, 771*f*
por proteínas ABC, 755, 756*f*
Combinación de exones (*exon shuffling*), 422, 422*f*, 423*f*, 503
Competencia celular, y señalización, 648
Complejo
en anillo de gamma-tubulina, 827, 827*f*
anticuerpo-fluorocromo, 187
de antiterminación, 485, 485*f*
AP, en el direccionamiento de proteínas, 709, 709*c*, 720, 721*f*, 722*f*
apical, 922, 922*f*
Arp2/3, 788, 788*c*, 789*f*, 801*f*, 802, 804
basales, 922, 922*f*
bf, 339, 341, 341*f*
Ca^{2+}/calmodulina en la señalización, 563, 564*f*, 565
CAP-cAMP, 115, 116*f*
en la transcripción, 115, 116*f*
captadores de luz, 333, 335, 335*f*, 338, 340, 341*f*
de carga
bimolecular, 510, 511*f*
trimolecular, 513
ciclina
CDK
en las células de mamíferos, 883, 883*f*, 885
en la fase S, 855*f*, 856, 857
mitóticas CDK, 855*f*, 856
tipo B CDK, inactivación, 879
cinesina-dinactina, 834
de citocromo *c* oxidasa, 320, 320*f*, 321, 321*f*, 322
Cln1-CDK, 878, 878*f*, 879*f*
Cln2-CDK, 878, 878*f*, 879*f*
Cln3-CDK, 876, 878, 879*f*
CoQH2-citocromo *c* reductasa, 320, 320*f*
en el ciclo Q, 323, 323*f*, 324*f*
estructura, 324*f*
dineína-dinactina, 834, 834*f*
de escisión/poliadenilación, 496*f*, 497, 520
ESCRT, 733, 734*f*
F_0F_1, 302, 307*f*
bacteriana, 326
estructura, 326*f*
en la fotosíntesis, 333, 337*f*, 338
movimiento celular, 79
rotación de la subunidad, 326*f*, 327, 328*f*
en la síntesis de ATP, 79, 325, 325*f*
focales, 223
G alfa
GDP, 547
GTP, 546, 546*f*, 547
glucoproteico distrofina (DCG), 226*f*, 227
de Golgi, 15, 166*f*, 169, 170*f*
direccionamiento de proteínas
procesamiento proteolítico de proteínas, 70, 71*f*, 603, 724, 725*f*
región *trans*, 169, 170*f*, 701, 702*f*
agregación de proteínas, 724
gemación de vesículas, 719, 719*f*, 720*f*
vesículas
COPI/II, 708, 709*c*, 716, 717*f*, 719*f*
recubiertas de clatrina/AP, 708, 720, 720*f*, 721*f*, 722*f*
microtúbulos, 828
progresión cisternal, 701, 702*f*, 718, 718*f*
región
cis, 169, 170*f*, 701, 702*f*
medial, 169, 170*f*, 701, 702*f*
síntesis del colágeno, 217*f*
transporte
lipídico, 744*f*, 752
vesicular, 701, 702*f*, 718, 718*f*
$G_s\alpha$-GTP
adenilciclasa, 549, 549*f*
adenililciclasa, 549, 549*f*
en el cólera, 548
histona
acetilasa, 475, 475*f*, 479, 479*f*
desacetilasa, 474, 474*f*, 475*f*
de iniciación, en la traducción, 126, 126*f*
JAK-receptor de eritropoyctina
vías de señalización activadas, 581, 582*f*
mediador, 471, 477, 477*f*, 478*f*, 479, 479*f*
Miranda, 922, 922*f*
multiproteico mediador, 477, 477*f*
NADH-CoQ reductasa, 320, 320*f*, 322, 323
NELF, en la transcripción, 486
nuclear de unión al casquete, 504
Numb, 922, 922*f*
del poro nuclear, 66*c*, 509, 509*f*
Polycomb, 474
de preiniciación
en la traducción, 126, 126*f*
transcripción, 469, 470*f*, 471, 478
de preiniciación de la transcripción, 66, 66*c*, 67*f*, 469, 470*f*, 478
ensamblaje, 471, 478, 479*f*
de preiniciación de la transcripción Pol II, 469, 470*f*, 478, 479*f*
de prerreplicación, 856, 885
del DNA, 856
productor de oxígeno, 339, 339*f*
promotor de la anafase (APC), 855*f*, 856, 862, 863*f*, 878
actividad ligasa de la ubicuitina, 863, 863*f*
en la replicación del DNA, 856, 881
en la separación de las cromátidas, 872, 872*f*
QH_2-citocromo *c* oxidasa, 322
Ras
GDP, 85, 85*f*, 588, 589, 589*f*, 592, 592*f*
GTP, 588, 589, 589*f*, 592, 592*f*
en la activación de la cascada de cinasas, 593*f*, 594
de reconocimiento
del origen (ORC), 879
a través del exón, 501, 502*f*
de remodelación de la cromatina, 476, 477*f*, 916, 920
receptor-ligando
constante de disociación, 537
disociación, 730, 730*f*, 731*f*. Véase también *Endocitosis mediada por receptores*
especificidad del efector, 536, 536*f*
regulación recíproca, 605
remodelador de la cromatina SWI/SNF, 476, 477*f*, 478, 479*f*, 916, 920
mutaciones oncogénicas, 958
ribonucleoproteico mensajero(mRNP), 509
transporte nuclear, 514, 514*f*
Sec61
en la translocación
cotraduccional, 663, 664*f*
postraduccional, 665
Sec63, en la translocación postraduccional, 665, 665*f*
silenciador inducido por RNA (RISC), 518, 519*f*
succinato-CoQ reductasa, 320, 320*f*, 322
transducina GTP, rodopsina, 559, 559*f*, 560
tropomiosina-troponina, en la contracción muscular, 798*f*, 799
en vertebrados, 858*c*
de unión de exones, 515, 523
degradación mediada por mutaciones sin sentido, 523
Complementación funcional, 369, 583
Complementariedad, 36, 36*f*, 73
molecular, 36, 36*f*, 73
Componentes iónicos, 33
Concentración
crítica
de actina, 785
micelar, 182
de tubulina, 820
iónica
citosólicos, 253*c*
en los invertebrados, 253*c*
permeabilidad de la membrana, 164, 164*f*
en la sangre, 253*c*
valores normales, 253*c*
en vertebrados, 253*c*
de proteínas, regulación, 86
Condensina, 870
Condroitín sulfato, 213*f*, 214
síntesis, 214
Conducta saltona, 845
Conexinas, 231
mutaciones, 231
Conformación, 21, 60, 62, 63*f*, 68, 69*f*. Véase también *Plegamiento de proteínas*
cambios, en la regulación de proteínas, 83
determinación, 95, 96*f*
nativa, 68
Cono de crecimiento, 817*f*
Conos, 556
microscopia de barrido confocal, 189, 189*f*
Conservación, evolutiva, 27, 27*f*
Constante
de disociación, 47
de complejo receptor-ligando, 537
de Michaelis (K_m), 76, 77*f*
de sedimentación, 87
Construcción interruptora, 387, 388, 388*f*
Contactos focales, 223
Contador
de centelleo, 93
Geiger, 93
Contracción(es)
cortical en el movimiento celular, 802, 802*f*
definición, 791
en el movimiento celular, 802, 802*f*
muscular, 797
Ca^{2+}, 253, 254, 254*f*, 799, 799*f*
cadenas livianas reguladoras de la miosina, 799, 799*f*
canales de cationes regulados por acetilcolina, 290
cardíacas, receptores muscarínicos para acetilcolina, 556, 556*f*
ciclo de los puentes cruzados, 798, 798*f*
complejo tropomiosina-troponina, 798*f*, 799
despolarización de la membrana, 291, 291*f*
factor natriurético auricular, 565
fermentación de la glucosa, 305
filamentos de actina, 797, 797*f*, 798*f*
iones calcio, 254, 254*f*, 255*f*
miosina, 81, 81*f*, 791, 797, 797*f*
LC cinasa, 799, 799*f*
modelo de filamento deslizante, 798, 798*f*
en el músculo
esquelético, 797, 797*f*, 798*f*
liso, 799, 799*f*
óxido nítrico, 227, 564, 564*f*
proteínas de unión a la actina, 798, 798*f*
señalización, 800
no muscular, 791, 796, 799
Control
génico, 12, 16, 115
acetilación de histonas, 427
activadores, 116
amplificadores, 17
en bacterias, 17, 115, 116*f*, 448
sistemas de dos componentes, 117, 118*f*
combinatorial, 465
en el desarrollo temprano, 625, 628, 635, 635*f*
en dirección
3', 449
5', 449
específicos del tipo celular, 479, 480
estudio experimental
en hibridación in situ, 614, 614*f*
interferencia por RNA, 616
micromatrices
de DNA, 614, 615, 616*f*
de proteínas, 615, 616*f*
Northern blotting (transferencia Northern), 614
Western blotting (transferencia Western), 614
en eucariontes, 447
evolución de elementos reguladores, 468
factores
sigma, 116, 117*f*
de transcripción, 11, 66, 66*c*, 67*f*, 110, 429, 449
transporte, 513
funciones, 17
heterocromatina, 471
hormonas, 17
inductores, 116
mediado por la cromatina, 429, 471, 473*f*, 474*f*

Control *(Cont.)*
operón
lac, 115, 116*f*
trp, 116
panorama general, 447, 448*f*, 454
pasos, 448, 448*f*
postranscripcional, 493. Véase también *Traducción*
complejo silenciador inducido por RNA, 518, 519*f*
corte y empalme, 497
interferencia de RNA, 518, 519*f*
en mamíferos, 503, 503*f*
mecanismos citoplasmáticos, 518
poliadenilación ciroplasmática, 519, 520*f*
procesamiento
de pre-mRNA, 493
mecanismos, 493
regulación, 504
de pre
rRNA, 525, 525*f*, 526*f*
tRNA, 528, 528*f*
proteínas de unión al RNA, 522, 522*f*
represión traduccional mediada por miRNA, 518, 519*f*
traduccional mediado por proteínas, 519, 520*f*
transporte
de factores de transcripción, 513
nuclear, 509
vigilancia del mRNA, 523
proteínas de unión al DNA, 463, 463*f*
RNA polimerasa, 116, 117*f*
silenciadores, 17
transcripcional, 447. Véase también *Iniciadores transcripcionales*
unidireccionalidad, 448
respiratorio, 330
transcripcional de la expresión génica. Véase *Control génico; Iniciadores transcripcionales*
Conversión del tipo de apareamiento de levadura, 596, 920, 920*f*, 921*f*
Cooperatividad, 83
CoQ, 319, 319*f*, 320*f*
Cordina, 652, 652*f*
Correpresores, 468
Correspondencia inducida, 75
Corte y empalme, 107, 113, 113*f*, 497
alternativo, 113, 114*f*, 201, 505
en la diferenciación sexual de *Drosophila*, 505, 506*f*
en la función neuronal, 507, 507*f*
isoformas proteicas, 201, 505, 507
en las neuronas retinales de *Drosophila*, 508
anormal, en enfermedades genéticas, 501
apareamiento de bases snRNA-pre-mRNA, 499, 499*f*
autoeliminación, 107, 502, 527
función neuronal, 507
en mamíferos, 503
maturasas, 503
mediado por empalmosomas, 499, 500*f*, 527, 527*f*
pasos, 500, 500*f*
de pre
rRNA, 527, 527*f*
tRNA, 528, 528*f*
en el procesamiento del pre-mRNA, 494*f*, 497
promotores, 507
proteínas SR, 501, 502*f*
punto de ramificación, 498, 498*f*, 499*f*
reacciones de transesterificación, 498, 498*f*
regulación, 505
remoción de intrones, 497*f*, 498
represores, 507
salteo de exones, 501, 523
snRNA, 499, 499*f*, 502, 503*f*
snRNP, 499, 501, 502*f*, 503
en trans, 501
Corteza visual, 556
CoSmads, 575, 576
Costal-2, 641, 641*f*
Cotransportadores, 247, 248*c*
Cotransporte, 247, 248*c*, 268, 269*f*, 270*f*
antiportadores, 268
simportadores, 268, 269*f*
CoxVA, direccionamiento, 688, 688*f*
Crecimiento y división, 17, 900*f*. Véase también *Ciclo celular; división celular*
Cresta, 171, 172*f*, 307, 307*f*, 308, 309
Crick, Francis, 103, 414
Criptas, 903, 903*f*
Cristalografía de rayos X, 21, 95, 96*f*
Cromagranina A/B, 724
Cromátidas, 854
entrecruzamiento, 872
hermanas, 430, 430*f*, 838, 854
entrecruzamiento, 872
separación, 870, 871*f*, 872*f*
separación, 870, 871*f*, 872*f*
Cromatina, 424, 471
apariencia de perlas en un collar, 424, 425*f*
armazón
de cromosomas, 427, 427*f*, 428*f*
de proteínas, 427, 427*f*, 428*f*
bucles, 427, 428*f*
cerrada, 471
condensada, 425, 425*f*, 426, 426*f*, 471, 476. Véase también *Heterocromatina*
definición, 424
y factores de transcripción, 429, 472*f*, 473*f*
forma extendida, 424, 425*f*
formación, 424
histonas, 425*f*, 426, 471, 476, 476*f*
nucleosomas, 426, 426*f*, 471
proteínas no histona, 429
Cromatografía, 90
de afinidad, 91*f*, 92, 239
de anticuerpos, 91*f*, 92
para receptores, 540
por filtración en gel, 90, 91*f*
por intercambio iónico, 90, 91*f*
líquida, 90
de afinidad, 91*f*, 92
para receptores, 540
con secuencia específica de DNA, 459, 460*f*
Cromocinesina, 833*c*, 844*f*
Cromodominio, 476
Cromosoma(s), 11
adhesión a microtúbulos, 839*f*, 841, 842*f*
alineamiento, 839*f*, 841, 856
anafase, 838, 839*f*, 845, 846*f*
artificiales de la levadura, 437
autosoma, 18
captura del cinetocoro, 841, 842*f*, 843
cariotipo, 12*f*, 430
condensación, 20, 20*f*, 430, 430*f*, 839*f*, 845
conducta saltona, 845
cromatina, 424
descondensación, 854, 862, 870, 871*f*, 872*f*
diploides, 854
elementos funcionales, 433, 434*f*
estabilización, 844*f*, 845
estructura, 406*f*
eucarionte
estructura, 424, 425*f*
morfología y elementos funcionales, 430
eucromatina, 433
Filadelfia, 955
formación de patrón de bandas, 431, 431*f*
haploides, 854
heterocromatina, 433
hijo, formación, 838, 839*f*. Véase también *Mitosis*
y red de salida de la mitosis, 871*f*, 872, 872*f*, 888
segregación, 870, 871*f*, 872*f*, 971*f*
en meioisis, 890, 891*f*
en mitosis, 870, 871*f*, 872*f*, 888
histonas, 424, 425*f*
homólogos, 355
en la meiosis, 891, 891*f*
segregación, 355
interfase
bucles de cromatina, 428, 428*f*
dominios nucleares, 429, 429*f*
levadura artificial, 437
en la meiosis, 890, 891*f*
membrana doble alrededor, 873, 873*f*
metafásicos, 424
captura del cinetocoro, 841, 842*f*, 843
coloración, 431, 431*f*, 432*f*
condensación, 20, 20*f*, 430, 430*f*
estabilización, 844*f*, 845
estructura, 430, 430*f*
migración, 20, 20*f*, 839*f*, 845, 846*f*. Véase también *Mitosis*
en la mitosis, 20, 20*f*, 838. Véase también *Mitosis*
no disyunción, 887, 887*f*
en cáncer, 947
número
diploide, 854
haploide, 854
observación, 20, 20*f*
orígenes de replicación, 433, 434*f*
plumulado, 493*f*
politénico, 433, 433*f*
profase, 838, 839*f*, 843, 843*f*, 854
recombinación, 890
secuencias
del centrómero (CEN), 434*f*, 435, 435*f*
de replicación autónomas (ARS), 433, 434*f*
teloméricas (TEL), 434*f*, 435
segregación, 870, 871*f*, 872*f*
en la meiosis, 890, 891*f*
en la mitosis, 870, 871*f*, 872*f*, 888
red de salida de la mitosis, 871*f*, 872, 872*f*, 888
separación, 20, 20*f*, 839, 839*f*, 846, 846*f*
sexuales, 12, 18, 18*f*
telofase, 854
X, 12, 18, 18*f*
Y, 12, 18, 18*f*
Cruzas genéticas, segregación, 355, 355*f*, 356*f*
Cubierta
anfipática, de lipoproteínas, 757, 758*f*
viral, 138, 138*f*, 141, 141*f*
fusión de la membrana, 713, 714*f*
Cubitis interruptus, 641, 641*f*
Cuerpo(s)
de Barr, 12
basal, axonema, 836
polares del huso, 840
Cultivos celulares, 235
adherencia celular, 236
animales, 235, 235*f*
para anticuerpos monoclonales, 237
células
hematopoyéticas, 236
transformadas, 236, 237*f*
clones, 235, 235*f*
colonias, 236
congelación, 236
etapas, 237*f*
factores de crecimiento, 236
medio, 235
HAT, 238, 239
selección, 238
preparación celular, 236
primario, 236
senectud celular, 236, 237*f*
tiempo de vida, 236, 237*f*
transfección, 378, 379*f*
ventajas y desventajas, 235

D

Dalton, 61
DDK, 880, 880*f*, 881
Decaimiento mediado por sin sentido, 523
Dedo de cinc C_2H_2, 464
Deficiencia en la adhesión leucocitaria, 229
Degradación
de Edman, 95
lisosómica, 732, 732*f*
transporte vesicular, 732, 732*f*
de proteínas
dependiente de fosforilación, 603
de proteínas plegadas de manera errónea, 679
Delta G (variación de la energía libre), 51
en el transporte de membrana, 267, 267*f*, 268
Dendritas, crecimiento, 925
Densidad vs masa, 87
Deoxicolato de sodio, 182, 183*f*
Depósito de grasas en aterosclerosis, 768*f*, 769
Depresión, fármacos, 290
Derivados isoprenoides, 752
Desacoplantes, 330
Desadenilación, del mRNA, 521, 521*f*
Desaminación, de citosina, y mutaciones puntuales, 963
Desarrollo
cascada trancripcional, 633, 637
control
traduccional, 630, 631*f*
transcripcional, 628, 628*f*, 635, 635*f*
creación de límites
por combinación de factores de transcripción, 632
por señales extracelulares, 639
destino celular, 621, 635, 635*f*, 906
diferenciación de tejidos, cadherinas, 204
en *Drosophila*. Véase *Drosophila melanogaster, desarrollo en*
embrionario, 7, 7*f*. Véase también *Desarrollo*
modelado
anteroposterior, 629, 630*f*, 631*f*
dorsoventral, 627, 627*f*, 628*f*
grupos de equivalencia, 624
inducción, 621, 621*f*, 643
recíproca, 644, 645*f*
inhibición lateral, 644, 646, 646*f*, 647*f*
modelado anteroposterior, 629, 630*f*, 631*f*, 633*f*
neuronal, 647, 647*f*
NF-κB, 603
del ojo, en *Drosophila*, proteína Ras, 590, 590*f*, 591*f*
en organismos multicelulares, 913
ovogénesis, 624, 625*f*
patrón
dorsoventral, 625, 627*f*, 628*f*
de tejidos, 625
precoz, 908, 909*f*
repeticiones con variaciones, 634, 634*f*, 635*f*
retardado, 908
señalización, 16, 624. Véase también *Señalización*
cantidades de señal graduada, 621
combinación de factores de transcripción, 632
extracelular, 639
inductiva, 621, 643
integrada, 648, 650*f*
morfógeno, 623, 624
potencia/duración de la señal, 649
en vertebrados, 643, 643*f*
del tubo neural, 643, 643*f*
Desensibilización
homóloga, en la señalización, 553
de receptores, 544
Desequilibrio de ligamiento, 398
Desmielinización, en la esclerosis múltiple, 286
Desminas, 174, 174*c*, 807, 807*c*, 811, 811*f*. Véase *Filamentos intermedios*
Desmocolina, 205*f*, 206
Desmosomas, 177, 203, 203*f*, 811
cadherinas, 205, 205*f*
definición, 203
puntuales, 198*f*, 203, 203*f*
Desmotúbulos, de plasmodesmos, 233, 233*f*
Desnaturalización, 68
de DNA, 105, 106*f*
Desoxirribonucléosido trifosfato (dNTP), en secuenciación de DNA, 372, 372*f*, 373*f*
Desoxirribosa, 40, 40*f*
Despolarización de la membrana, 277, 277*f*
canales
de K^+, 278*f*, 279, 280*f*
de Na^+, 278, 278*f*, 280*f*
en la contracción muscular, 291, 291*f*
hélice alfa S4, 283, 283*f*
en la propagación del potencial de acción, 277, 277*f*, 278*f*, 280, 281*f*, 293, 293*f*
Desviación de la secuencia, 411
Detergentes, 182, 183*f*
en extracción de protcínas, 182, 183*f*
iónico, 182, 183*f*
no iónico, 182, 183*f*
Determinación del destino celular, 621, 635, 635*f*, 906
en capas germinales, 906, 906*f*
en el desarrollo, 621, 635, 635*f*, 906
en cigoto, 906, 906*f*
en *Drosophila*, 625
en meristemas, 905, 905*f*
restrictiva, 906

Determinación del destino celular *(Cont.)*
sexual, 18, 18*f*
en el tubo neural, 643, 643*f*
Diabetes
insípida, 274
mellitus, 619
Diacilglicerofosfolípidos, 747, 747*f*
1,2-Diacilglicerol (DAG), como segundo mensajero, 541, 541*f*, 561, 562*f*, 598, 601
en el metabolismo del glucógeno, 617*f*, 618
Dictiostelium, quimiotaxis, 804
Dietilurea, velocidad de difusión, 246
Diferenciación
celular, 899, 900*f*
definición, 899
especificación del tipo, 910
en levaduras, 910, 911*f*, 912*f*
sexual, en *Drosophila*, 505, 506*f*
terminal, 899, 900, 901*f*
y ciclo celular, 917
Difusión, 152, 152*f*. Véase también *Transporte de membrana*
energía, 246
facilitada, 247, 248, 248*c*
pasiva, 246, 246*f*, 248, 248*c*
simple, 246
uniones estrechas, 207, 207*f*
velocidad, 246
Dihidrofolato reductasa (DHFR), en el direccionamiento de la proteína mitocondrial, 686, 687*f*
Dihidroubicuinona, 319, 319*f*
Dímeros de timina-timina, reparación, 966, 966*f*
Dimetilalil pirofosfato (DMPP), 751
Dinamina, en gemación de vesículas, 721, 721*f*, 737*f*
Dineína(s), 833, 833*c*
axonémicas, 833*c*, 834, 836*f*
brazo
externo, 833*c*, 836, 836*f*
interno, 833*c*, 836, 836*f*
citosólicas, 833*c*, 834
en elongación de huso mitótico, 846*f*, 847
formación de huso mitótico, 843, 844*f*
en movimiento celular, 79, 80*c*, 80*f*, 82, 791, 834
2,4-Dinitrofenol (DNP), 330
Dipolos eléctricos, 32, 32*f*
en las interacciones de van der Waals, 34, 35*f*
Direccionamiento de proteínas, 657. Véase también *Translocación de proteínas*
agregación de proteínas, 724
bacteriana, 661, 662*f*, 680, 681*f*, 682*f*
basolateral/apical, 726,726*f*
en cloroplastos, 658*f*, 683, 683*c*, 691, 692*f*
definición, 657
endocitosis mediada por receptor, 727
experimentos de marcación con pulso, 660, 660*f*
GTP, 661, 663*f*
hacia lisosomas, 721, 732, 732*f*
de lipoproteínas, 759, 759*f*
manosa-6-fosfato, 721, 722*f*
a la membrana apical/basolateral, 726, 726*f*
a la mitocondria, 658*f*, 683, 684*f*, 685*f*, 687*f*
chaperonas, 685, 685*f*, 686
al espacio intermembrana, 688*f*, 690, 690*f*
estudios de proteínas quiméricas, 686, 687*f*
fuentes de energía, 685*f*, 686
hacia la membrana interna, 687, 688*f*, 689*f*
a la matriz, 685, 685*f*, 687*f*
a la membrana externa, 688*f*, 691
pasos, 684, 685*f*
poro de importación general, 685, 685*f*
proteínas
Tim, 685*f*, 686
Tom, 685, 685*f*
receptores de importación, 685, 685*f*
secuencias
de captación-direccionamiento, 683, 683*c*, 684*f*
de direccionamiento, 687, 688*f*, 690, 690*f*
de la matriz, 683*c*, 684, 685, 685*f*, 687*f*, 688, 688*f*, 690, 690*f*
sitios de contacto, 686, 687*f*
translocones, 684, 685
panorama general, 657, 658*f*
partícula de reconocimiento de la señal, 661, 662*f*
pasos, 658*f*, 663*f*, 702*f*
peroxisómicas, 658*f*, 683, 683*c*, 693, 694*f*, 695*f*
en la matriz vs. proteínas de membrana, 694, 695*f*
PTS1/2, 693, 694*f*
vías para, 693, 694*f*
vs. direccionamiento de proteínas nucleares, 696
progresión cisternal, 701, 702*f*
proteínas
cubierta, 710
integrales, 667
de membrana, 657
nacientes, 659
Rab, 702*f*, 711
secretorias, 658, 658*f*
al retículo endoplasmático, 658, 658*f*
translocación cotraduccional, 661, 661*f*
secuencias de señalización, 658*f*, 659, 660, 660*f*, 661, 661*f*
señalización, 717, 717*f*, 720, 729. Véase también *Señal(es) de clasificación*
en sistemas libres de células, 661, 661*f*
transcitosis, 727, 735, 735*f*
en el transporte vesicular, 702*f*, 710, 711*c*, 712*f*, 724. Véase también *Transporte vesicular*
vía de clasificación lisosómica, 722*f*, 723
vías, 658*f*
endocítica, 702*f*
regulada, 724
secretoria, 658, 658*f*, 702*f*, 703
Disacáridos, 42, 42*f*
Disco(s) Z, 788, 788*c*, 788*f*, 797*f*, 798, 811*f*
imaginales, 626*f*
Dishevelled, 642*f*, 643
Disposiciones repetidas en tándem, 410*c*, 411
en el DNA satélite, 410*c*, 412
Distrofia
miotónica, microsatélites, 412
muscular, de Duchenne, 226, 226*f*, 394*c*
herencia, 395, 395*f*, 396
Distrofina, 226, 226*f*, 783, 783*c*
mutaciones, 227
Distroglucano, 226
Diversidad combinatoria, 208, 221
División celular. Véase *Ciclo celular*
asimétrica, 900, 900*f*, 901, 901*f*, 919
en *C. elegans*, 922
características generales, 920*f*
en embriogénesis, 919
en levadura, 920, 920*f*
orientación del huso, 923, 923*f*
polarización, 919
regulación, 910
en *Drosophila*, 921, 921-923*f*
en *C. elegans*, 907, 908*f*, 909*f*
células
fundadoras, 907
madre, 8, 899, 900, 901*f*
precursoras, 901, 901*f*
en cigotos, 901
en el desarrollo
embrionario, 7, 7*f*, 624
humano, 7
y gemelos, 8
meióticas, 354*f*, 355, 890, 891*f*, 892*f*, 893*f*. Véase también *Mitosis*
mitóticas, 354*f*, 355, 838
regulación, 24
simétricas, 900, 900*f*, 901, 901*f*
tiempo, 909, 909*f*
DNA, 101
A, 104, 105*f*
aislación directa, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, 375
bases, 40, 40*f*, 41*c*, 103, 103*f*
bucle, 117, 117*f*
en la activación de la transcripción, 478

cantidades, diferencias de especie, 408, 409*f*
centromérico, 841
circular, 106, 107*f*
de los cloroplastos, transcripción, 488
clonado. Véase *Clones/clonación de DNA*
complementario. Véase *cDNA*
conector, 424, 425*f*
corrección de pruebas, 962, 962*f*
desenrollamiento, 105, 106*f*, 133, 133*f*. Véase también *Replicación del DNA*
desnaturalización, 105, 106*f*, 110, 110*f*
en la reacción en cadena de la polimerasa, 375
direccionalidad, 103, 103*f*
doble hélice, 10, 10*f*, 103, 104*f*, 105*f*. Véase también *DNA, estructura*
dúplex, 131
egoísta, 414. Véase también *Elementos móviles*
elongación, telomerasa, 436, 436*f*
empaquetamiento, 406, 406*f*
enlaces fosfodiéster, 103
escisión, mediante enzimas de restricción, 361*f*, 362*c*
espaciador, 410*c*
estructura, 10, 10*f*, 102, 103, 103*f*, 104*f*, 105*f*, 107*f*
apareamiento de bases, 10, 10*f*, 103, 104*f*
cerrada como cremallera, 10
hebras complementarias, 10, 10*f*, 104
hélices dobles, 10, 10*f*, 103, 104*f*, 105*f*
química, 37*f*, 104*f*
surco mayor/menor, 104, 104*f*
variaciones, 104, 105*f*
eucarionte, clasificación, 409, 410*c*
forma(s)
A, 104, 105*f*
B, 104, 104*f*
Z, 104, 105*f*
variantes, 104, 105*f*
fusión, 105, 106*f*, 110, 110*f*
en el genoma, 12
herencia, 12
ligasas, 133
en la tecnología del DNA recombinante, 361
longitud, 405
mitocondrial, 12, 438
cantidades celulares, 438
capacidad de codificación, 439, 440*f*
código genético, 441, 441*c*
en *D. melanogaster*, 441, 441*c*
diferentes especies, 439
en enfermedaes genéticas, 441
evolución, 440
herencia, 12
citoplasmática, 438, 439*f*
en levaduras, 441, 441*c*
en mamíferos, 441, 441*c*
mutaciones, 441
en *Neurospora*, 441, 441*c*
en plantas, 438, 440, 441, 441*c*
productos génicos, 440
proteínas codificadas, 439, 440
replicación, 438
secuenciación, 438
tamaño, 439, 440*f*
tipo silvestre, 441
toma de imágenes, 438, 438*f*
transcripción, 488
de RNA, 438, 439, 440
modelo, 104*f*
moderadamente repetido, 414. Véase también *Elementos móviles*
móvil. Véase *Elementos móviles*
muescas, 106, 107*f*
mutaciones, 13
nativo, 103
no codificador, 13, 405, 406*f*
cantidades, 408, 409*f*
diferencias de especies, 408, 409*f*
mutaciones, 13
no replicado, 888
en los nucleosomas, 424, 425*f*
orgánulos, 438. Véase también *DNA mitocondrial*
plasmídico, 363
polimerasa(s)
control de pruebas, 962, 962*f*
en el movimiento celular, 80*c*
en la replicación, 12, 133, 134, 134*f*
promotor, 109, 111*f*
recombinante, 361
renaturalización, 106, 106*f*
reparación, 887*f*, 889
repeticiones intercaladas o dispersas, 410*c*, 414. Véase también *Transposones de DNA; Elementos móviles; Retrotransposones*
repetitivo, 405, 410*c*, 412
rupturas de la doble hélice, reparación 946c, 967
satélite, 410*c*, 412, 412*f*, 435, 435*f*
funciones, 413
en huellas dactilares del DNA *(fingerprinting)*, 413, 413*f*
localización cromosómica, 412, 412*f*
longitud, 413, 413*f*
microsatélite, 397, 412
minisatélite, 413, 413*f*
secuencias
de nucleótidos, 409, 410*c*
simple (satélite), 410*c*, 412, 412*f*, 435, 435*f*
funciones, 413
en huellas dactilares de DNA *(fingerprint)*, 413, 413*f*
localización cromosómica, 412, 412*f*
longitud, 413, 413*f*
microsatélite, 397, 412
minisatélite, 413, 413*f*
separación
electroforética, 371
de las hebras, 105, 106*f*
síntesis. Véase *Replicación del DNA*
sitios de restricción, 361
superenrollamiento, 106, 107*f*
SV40, replicación 133,134f
transposiciones, 414, 415. Véase también *Elementos móviles*
unión, 11*f*, 105, 105*f*, 111
de proteínas, 105, 105*f*
variación de la secuencia, 405
vector, 361
Z, 104, 105*f*
Doble hélice, 10, 10*f*, 103, 104*f*, 105*f*
curvatura, 105, 105*f*
descubrimiento, 103
desenrollamiento, 105, 106*f*
con giro hacia
la derecha, 104
la izquierda, 104, 105*f*
orientación antiparalela, 103
pares de bases, 103, 104*f*, 105*f*
surco mayor/menor, 104, 104*f*
Dogma
central, 101
de la biología, 101
Dolicol, en la síntesis de oligosacáridos, 673, 674*f*
Dominio(s)
de activación, 461. 461f,462f,467,467*f*
acídicos, 467, 467*f*
y coactivador, 467
y complejo mediador, 477-478,478*f*
CREB, 467, 476
definición, 461
en la descondensación de la cromatina, 477, 477*f*
estructura, 467, 467*f*
la RNA polimerasa II se une a, 477, 478*f*
secuencia de aminoácidos, 467, 467*f*
de unión al ligando del receptor nuclear, 467, 467*f*
C2, 163, 163*c*
carboxilo terminal, de la RNA polimerasa II, 452, 452*f*, 494, 501, 501*f*
carnada, 480, 480*f*
CTD, en la RNA polimerasa II, 452, 452*f*
de direccionamiento a la membrana, 163, 163*c*
de esfera y cadena, en el canal del K^+, 284, 284*f*
del factor de crecimiento epidérmico, 65, 65*f*
FERM, 163, 163*c*
de homología con la pleckstrina, 163, 163*c*
de inmunoglobulina, 227
lectina, 227
LG, 212, 213*f*
PDZ, 543, 544*f*
pez, 480, 480*f*

Dominio(s) *(Cont.)*
PH, 163, 163*c*
unión de PI 3-fosfato, 599
proteicos, 64, 65*f*. Véase también *Tipos específicos*
activación, 461, 461*f*, 462*f*, 467, 467*f*. Véase también *Dominios de activación*
direccionamiento a la membrana, 163, 163*c*
represión, 462, 463*f*, 467, 467*f*
unión
al DNA, 461, 461*f*
al RNA, 495, 495*f*
PTB, 579, 580*f*, 584
de repetición de anquirina, 163, 163*c*
sensor
de esteroles, 751
de lípidos, 766
SH2, 579, 580*f*, 584, 585*f*
SH3, 544*f*, 591
Src de homología 2 (SH2), 579, 580*f*, 584
de unión
al DNA
en activadores, 461, 461*f*, 462*f*
en factores de transcripción heterodiméricos, 465, 466*f*
motivos, 463, 463-465*f*
en represores, 462
tipos, 463
al RNA, 495, 495*f*
Dopamina. Véase también *Neurotransmisor(es)*
estructura, 288*f*
Drosophila melanogaster
complejidad genómica, 384, 384*f*, 613
cromosomas politénicos, 433, 433*f*
desarrollo, 624
cascadas transcripcionales, 633
control
morfogénico, 624, 625*f*
traduccional, 630, 631*f*
transcripcional, 628, 628*f*, 632, 635, 635*f*
determinación del destino celular, 625
embriogénesis, 624, 626*f*
estadios principales, 625, 626*f*
expresión génica, 635, 635*f*
genes
gap, 633, 633*f*
Hox, 636, 636*f*
maternos, 634, 635*f*
pair-rule, 633*f*, 634, 635*f*
de polaridad segmentaria, 635
inhibición lateral, 646, 646*f*
modelado
anteroposterior, 629, 630*f*, 631*f*
dorsoventral, 627, 627*f*, 628*f*, 651
del músculo, 649
neuronal, 647, 647*f*
ovogénesis, 624, 625*f*
proteínas Ras, 590, 590*f*, 591*f*
segmentación, 635
señalización
extracelular, 639
de Hedgehog, 639, 640*f*, 641*f*
integrada, 649, 650*f*
wnt, 642, 642*f*
desarrollo de los ojos, y proteínas Ras, 590, 590*f*, 591*f*
diferenciación sexual, 505, 506*f*
división celular asimétrica, 921, 921*f*
DNA mitocondrial, 441, 441*c*
elemento(s)
móviles, 416, 422
P, 416
expresión génica diferencial, 23, 23*f*
factor de transcripción NF-κB, 573*c*, 602
formación de bandas cromosómicas, 431*f*
genes
causantes de enfermedad, 28
del shock térmico, transcripción, 486
únicos vs. comunes, 613, 613*f*
identificación, 383, 383*f*
inducción, 622*f*
láminas, 807
MAP cinasa, 598
metabolismo lipídico, 766
mutaciones
espontáneas, 416, 422
letales, 357
shaker, y defectos en los canales del K^+, 282
neuronas retinales, corte y empalme alternativo, 508
neurogénesis, 918, 918*f*, 921, 921*f*
organismos experimentales, 24, 25*f*
proteínas Polycomb, 474
Smad, 575
transcripción, análisis de micromatrices de DNA, 615, 616*f*
dsRNA, en interferencia de RNA, 393, 393*f*
Duplicación génica, 382

E

E2A, 916
Ectodermo, 623
destinos celulares, 906, 906*f*
Ectoplasma, en movimiento ameboide, 803
Ecuación
de Henderson-Hasselbalch, 48
de Nernst, 262, 317
Edición del RNA, 508, 508*f*
Helicasas de RNA, en la transcripción, 469, 504
RNAi, 393, 393*f*
Efecto
Emerson, 338
hidrófobo, 35, 35*f*
Pasteur, 619
Efrinas, en la angiogénesis, 645, 645*f*
Eicosanoides, 747
eIF1A, en la traducción, 126, 126*f*
eIF3, en la traducción, 126, 126*f*
eIF5, en la traducción, 126, 126*f*
Electroforesis, 87, 89*f*, 90*f*
bidimensional en gel, 88, 90*f*
gel
bidimensional, 88, 90*f*
en dos dimensiones, 88, 90*f*
SDS-poliacrilamida, 87, 89*f*
en la separación de clones, 371, 372*f*
en Western blotting (transferencia Western), 92*f*, 93
Electrón(es)
carga, 33, 33*f*, 34*f*
en enlaces covalentes, 34, 34*f*
polares, 32, 32*f*
ganancia/pérdida, 54, 54*f*
en las interacciones de van der Waals, 34, 35*f*
Electronegatividad, 32
Electroporación, 378
Elemento(s)
Ac, 416
activadores (Ac), 416
Alu, 421
de control de la transcripción, 454
amplificadores, 456, 457*f*, 458*f*
caja TATA, 454, 455*f*, 457, 458*f*, 470, 474
definición, 454
identificación, 455, 456*f*
localización, 458, 458*f*
múltiples, 457
mutaciones, 407, 407*f*
de disociación (Ds), 416
dispersos
cortos (SINE), 410*c*, 420, 421
largos (LINE), 410*c*, 420, 420*f*, 421*f*
Ds, 416
iniciadores, 454, 455*f*
IS, transposición, 415, 415*f*, 416, 416*f*
móviles, 13, 376, 405, 406*f*, 414
acumulación, 414
en bacterias, 415, 415*f*, 416*f*
clasificación, 410*c*
copia, 416, 422
definición, 414
descubrimiento, 414
en eucariontes, 416, 417
función, 422
genes duplicados, 422
importancia evolutiva, 422, 422*f*, 423*f*
inserción de mutaciones, 376
LINE, 420, 420*f*, 421*f*

móviles en el maíz, 416
proximales del promotor, 455, 456*f*, 457, 458*f*
recombinación, 422, 422*f*, 423*f*
repeticiones directas cortas, 416, 416*f*
retrotransposones
LTR (viral), 415, 415*f*, 417, 417*f*, 419*f*
no viral, 420, 420*f*, 421*f*
secuencias
Alu, 421
de inserción bacterianas, 415, 415*f*, 416*f*
SINE, 420, 421
tipos, 410*c*
transposición, 414, 415*f*
como intermediario de DNA, 414, 415*f*
vía intermediario de RNA, 414, 415*f*
transposones de DNA, 410*c*, 414, 415*f*
en *Drosophila*, 416, 422
P, 416
mutaciones de inserción, 376
de poliadenilación citoplásmica (CPE), 520, 520*f*
promotor en dirección 3', 471
proximales del promotor, 455, 456*f*, 457, 458*f*
en genes del shock térmico, 486
reguladores de esterol, 764
de respuesta, 483
de repetición
a cAMP, 567
directa, 483, 483*f*
al hierro (IRE), 522
invertida, 483, 483*f*
sérica (SRE), 595, 595*f*
transponibles. Véase *Elementos móviles*
de transporte constitutivo (CTE), 516
Ty, 417, 419*f*
Copia, 417
Embriogénesis, definición, 919
Embrión, expresión génica, 520
Encefalopatía espongiforme, 72
transmisible, 72
Endocitosis, 165, 703
definición, 728
mediada por receptor, 522, 544, 605, 728
en la clasificación de proteínas, 727
complejos ESCRT, 733, 734*f*
definición, 728
disociación receptor-ligando dependiente del pH, 730, 731*f*
endosomas multivesiculares, 733, 734*f*
de enzimas lisosómicas, 728
de lipoproteínas de baja densidad, 728, 728*f*, 729*f*, 754*f*, 760, 761*f*, 762*f*
pasos, 729*f*
señalización, 729
tipos de ligando, 728
en el transporte
de hierro, 731, 731*f*
vesicular, 732, 732*f*
ubicuitina, 730
velocidad, 730
vesículas autofágicas, 733
pinocitocis, 728
vesículas sinápticas, 290
virus con cubierta, 713, 714
Endodermo, 623
destinos celulares, 906, 906*f*
Endogamia, mutaciones, 357
Endonucleasa HO, en la conversión del tipo de apareamiento, 920
Endoplasma, movimiento ameboide, 803
Endoproteasas, 72
en procesamiento de proteínas, 726
Endosimbiontes, 438
Endosoma(s), 165, 166*f*, 167*f*
bombas de hidrógeno, 257
multivesicular, 733
tardío, 703, 731
disociación receptor-ligando, 730, 730*f*, 731*f*
Endotelio
activación, extravasación de leucocitos, 228, 228*f*
adhesión leucocitaria, 228, 228*f*
vascular, 767, 768*f*
en aterosclerosis, 767, 768*f*, 769*f*
Energética bioquímica, 50
Energía
de acoplamiento, 53
de activación, 74, 75*f*
cinética, 50
conversión, 50
libre, 51
para transporte de iones, 267, 267*f*, 268
mecánica, 50
para movimiento celular, 79, 80*c*
potencial, 50
química, 50
radiante, 50
unidades, 51
para el transporte de iones, 267, 267*f*, 268
Enfermedad(es)
por almacenamiento lisosómico, 723
de Alzheimer, 72, 72*f*
placa amiloide, 72, 72*f*, 73, 604, 604*f*
presenilina 1, 604, 604*f*
proteínas plegadas de manera errónea, 72, 72*f*
autoinmunes, defectos en colágeno, 212
bacterianas, 4
cardíaca
aterosclerótica, 770
bloqueantes de canales del calcio, 269
cardiovascular, 767. Véase también *Aterosclerosis*
de células I, 723
coronaria
aterosclcótica, 770. Véase también *Ateroesclerosis*
bloqueantes de canales del calcio, 269
desmielinizante, 286
fungoides, 6
genética, 394
autosómica
dominante, 394*c*
recesiva, 394*c*
corte y empalme anormal, 501
defectos
genéticos múltiples, 398
en el reconocimiento de exones, 501
ejemplos, 394*c*
gen candidato, 399
heterogeneidad genética, 398
identificación génica, 396
mapas de conexión, 396
marcadores, 395, 396
microsatélites, 412
monogenéticas, 398
mutaciones, 13, 28
de DNA mitocondrial, 441
patrones de herencia, 395, 395*f*
poligénicos, 399
portadores, 395
recesivas ligadas al X, 394*c*
reparación de DNA defectuoso, 470, 964*c*
transposiciones de LINE/SINE, 420
de los huesos quebradizos, 219
de Huntington, 394*c*, 395, 395*f*
neurodegenerativas, proteínas plegadas de manera incorrecta, 72, 72*f*
neuromuscular, microsatélites, 412
de Parkinson, 72, 902
poliquística del riñón, 266
protozoarias, 5, 5*f*
de Tangiers, 259, 758
de Tay-Sachs, 167, 394*c*
de la vaca loca, 72
virales, 6, 7*f*. Véase también *Virus*
Enfisema, deficiencia alfa1-antitripsina, 679
Enfoque isoeléctrico, 89
Enlace(s)
de alta energía, 53
atómicos, 30, 30*f*, 31*c*. Véase también *Enlace(s) del azufre, 31, 31c*
de carbono, 30, 31*c*, 31*f*
covalente, 30, 30*f*, 31*c*, 34*f*, 37
distribución de electrones, 34, 34*f*
energía, 32, 32*f*
en estructuras grandes, 37, 37*f*
monómero, 37, 37*f*
no polar, 32
efecto hidrófobo, 35, 35*f*
orientación geométrica, 31, 31*f*
péptido, 37, 37*f*
polar, 32

Enlace(s) *(Cont.)*
reacción de deshidratación, 37
en las reacciones químicas, 47
tipos, 31, 31*c*
disulfuro, 38
formación, 675, 676*f*, 677*f*
energía relativa, 32, 32*f*
fosfoanhídrido, 52, 52*f*
fosfodiéster, 38, 103, 103*f*
formación, 109, 109*f*
del fósforo, 31, 31*c*
glucosídico, 38, 42, 42*f*
hidrógeno, 30*f*, 33, 34*f*
en proteínas, 61, 61*f*, 62*f*
iónico (electrostático), 30*f*, 32*f*, 33, 33*f*
de nitrógeno, 31, 31*c*
no covalente, 30*f*, 34, 35*f*, 36*f*. Véase también *Interacciones no covalentes*
no polar, 32
efecto hidrófobo, 35, 35*f*
interacciones de van der Waals, 35
orientación geométrica, 31, 31*f*
del oxígeno, 31, 31*c*
péptido, 61*f*
polar, 32, 32*f*
y solubilidad, 35
químicos, 30
Ensamblajes macromoleculares, 66, 66*c*
Ensayo(s)
de anticuerpos, 95
péptidos sintéticos, 95
para proteínas, 92, 92*f*, 95
de cambio de banda, 459, 460*f*
de competición, 539, 539*f*
de complementación genética, 357, 358*f*, 408
enzimáticos, 92, 92*f*
cromogénicos, 92, 92*f*
de expresión
funcional, para receptores, 540, 540*f*
con ovocitos, 266, 266*f*, 860
de extinción de la fluorescencia, 749, 749*f*
de fijación, 538. 538f,539f
de filamentos deslizantes, 793, 793*f*, 794
de fusión de liposoma, 713
de hibridación sobre membrana, 367, 367*f*
de huellas, 125, 458, 459*f*
con DNasa, 125, 458, 459*f*
en placas, 138, 139*f*, 364
con proteínas, 92, 92*f*
de retardo de la movilidad electroforética, 458, 459, 460*f*
Entactina, 210*f*, 211
Entalpía, 51
Entrecruzamiento, 396, 396*f*, 890, 891*f*
desigual, longitud de DNA de secuencia simple, 413, 413*f*
Entropía, 51
Envoltura nuclear, 509, 509*f*
fragmentación, 862, 868, 868*f*, 869*f*
reensamblaje, 873
Enzima(s), 10, 59, 73. Véase también *Proteína(s)*
acción catalítica, 10, 74, 75*f*, 76, 77*f*
activación, 71, 71*f*
del ciclo de Calvin, en cloroplastos, 691
conjugadoras de ubicuitina, 863
constante de Michaelis, 76, 77*f*
digestivas, escisión proteolítica, 85
distribución, 74
en la escisión proteolítica, 70, 71*f*, 85, 601, 725
especificidad, 36, 74
en la fosforilación, 70, 70*f*, 72, 76, 77*f*
formadora del casquete, en la degradación de mRNA, 521, 521*f*, 522
glucolíticas, 304, 305*f*, 310, 311*c*, 313, 314, 314*f*
liberación alostérica, 83, 84*f*
lisosómicas, 14, 167
deficiencias, 723
direccionamiento, 722*f*, 723
endocitosis mediada por receptores, 728
mecanoquímico, 79, 80*c*
modificación, 361
multidominio, multifuncional, 78, 78*f*
propiedades de unión, 36
restricción, 361, 361*f*, 362*c*
similitud entre cruza de especies, 26
sitio activo, 75
soluble en agua, unión de la interfaz, 163, 163*f*
unión del sustrato, 75, 76*f*
vacuolar, 170
vía en común, 76, 78*f*
V_{max}, 76, 77*f*
Epidermis, 903
Epidermólisis ampollar simple, 811, 812*f*
Epimerasas, 42
Epinefrina. Veáse *Adrenalina*
Epitelio, 198*f*, 201
cilíndrico simple, 202, 202*f*
definición, 201
escamoso simple, 202, 202*f*
estratificado, 202, 202*f*
estructura, 198*f*, 201, 202*f*
filamentos intermedios, 811
funciones, 202
intestinal. Véase también *Epitelio*
absorción de sal/glucosa, 275
regeneración, 903, 903*f*
vía transcelular, 207
lámina basal, 202, 202*f*, 210, 210*f*
matriz extracelular, 209
morfología, 202
regeneración, 903, 903*f*
tipos, 202, 202*f*
transicional, 202, 202*f*
uniones celulares, 198*f*, 201, 203*f*, 274
Epítopo, 73, 74*f*, 379
Equilibrio constante, 46
para ácidos, 48
Equilibrio químico, 46, 47*f*
eRF1, como factor de liberación, 129
eRF3, como factor de liberación, 129
Ergosterol, 750*f*
Eritrocito(s). Véase también *Células sanguíneas*
adhesión endotelial, 179*f*, 180
apoptosis, 19, 19*f*
citoesqueleto, 176, 176*f*, 177, 791
citometría de flujo, 179, 179*f*
concentración, regulación, 586
extravasación, 227, 228*f*
producción, 580*f*, 581, 583, 583*f*, 904, 904*f*
Eritropoyesis, 580*f*, 581, 583, 904, 904*f*
citocinas, 581, 583, 583*f*
hematocrito, 586
Eritropoyetina (EPO), 580*f*, 581, 905
como amplificador del rendimiento, 586
estructura, 581, 581*f*
en hipoxia, 619, 620*f*
Erizos de mar, ciclina mitótica, 860, 860*f*, 861
Ero1, enlaces disulfuro, 675, 677*f*
Escherichia coli, 4. Véase también *Bacteria; Procarionte(s)*
como fábricas proteicas, 377
control génico en procariontes, 17, 115, 116*f*
estructura, 3*f*
histidinpermeasas, 258
porinas, 160, 160*f*
transcripción, 17, 115, 116*f*
Escisión
en el procesamiento de pre-mRNA, 496, 496*f*
y poliadenilación, 496, 496*f*
de proteínas, inducida por señales, 601
proteolítica, 70, 71, 71*f*, 85, 601, 725, 725*f*
de secuencias de señalización N-terminales, 667, 667*f*, 668*f*, 673
Escorbuto, 218
Esfingolípidos, 151, 151*f*, 745*c*. Véase también *Lípidos de membrana*
ácidos grasos, 745, 746*f*
estructura, 746*f*
síntesis, 747
transporte, 748
intracelular, 745*c*
Esfingomielina, 151, 151*f*, 748. Véase también *Lípidos de membrana*
Esfingosina, 747
Especiación, 382
Especificación del tipo celular
en las levaduras, 910, 913
en los músculos, 913
en los nervios, 918, 918*f*, 919*f*
en *Drosophila*, 918, 918*f*, 919*f*
Especificidad
miogénica, 913, 918
proteína-ligando, 73, 74
Especímenes
microscopia, fijación y tinción, 185, 186*f*, 190, 191*f*

titulares, fijación y tinción, 185, 186*f*
Espectrina, 173*f*, 176*f*, 177, 783, 783*c*
Espectrometría
absorción en picosegundos, 336
de masa, 94, 94*f*
RM, 96
Espectrometría de masa, 94, 94*f*
con desorción láser, 94
Espectroscopia
por RM, 96
Espermatozoides, 18, 18*f*
Esplicosoma, 66*c*, 499, 500*f*, 527, 527*f*
pre-mRNA, retención en el núcleo, 515
Estadios de pupas, 625, 626*f*
Estatmina, 824*c*, 825
Estator, en el movimiento bacteriano, 79, 79*f*
Ésteres de colesterol, incorporación, mediada por SR-BI, 762, 762*f*
Esterificación de ácidos grasos, 43
Esteroisómeros, 31
Esterol(es), 750, 750*f*
Estigmasterol, 750*f*
Estrógeno, en el metabolismo óseo, 606
Estroma, cloroplasto, 172, 172*f*
Estructura(s)
adhesivas que contienen integrinas, 223, 224*c*, 224*f*, 225*f*
cuaternaria, proteína, 65*f*, 66
con forma de lazo, de intrones, 498, 498*f*
primaria, proteína, 60, 61*f*
secundaria, proteína, 61, 61*f*
terciaria, proteína, 62, 64, 65*f*
Estudios
del ciclo celular, 856
bioquímicos, 857
extractos celulares, 857
mutantes *cdc*, 857, 857*f*
en células de mamíferos, 882, 882*f*
genéticos, 864, 864*f*, 874
en *S. cerevisiae*, 874, 875*f*
en *S. pombe*, 864, 864*f*
en *Xenopus*, 858, 860*f*, 862*f*, 863*f*
FRAP, 152*f*, 153
Etanol, de la fermentación, 305, 306*f*
Etapas larvales del desarrollo, 625, 626*f*
Etilmetanosulfonato, 353
Eubacteria, 2*f*, 4, 4*f*. Véase también *Bacteria*
Eucariontes, 3, 3*f*
células, 3, 3*f*
control génico, 447
evolución, 4, 4*f*
Eucromatina, 433, 471
código de aminoácidos, 476, 476*f*
Euglena gracilis, DNA mitocondrial, 438, 438*f*
even-skipped, 634, 634*f*, 635*f*, 636, 649
eve, 649, 650*f*
Evolución, 26
celular, 4, 4*f*
combinación de exones (*exon shuffling*), 422, 422*f*, 423*f*, 503
conservación génica reguladora, 613
desviación de la secuencia, 411
duplicación de genes, 382
elementos móvil de DNA, 13
especiación, 382
hipótesis endosimbionte, 304
mutaciones, 13, 27
perspectiva genómica, 26
de proteínas, 65, 67
similitud en la cruza de especies, 27
Exocitosis, de vesículas sinápticas, 288
Exón(es), 111, 405,406*f*
definición, 111
mutaciones, 407*f*
pares de bases, 409
repetidos, 114
unión. Véase *Corte y empalme*
Exonucleasa
3'-5', 521, 521*f*
5'-3', 521, 521*f*
en el procesamiento de pre-mRNA, 504
Exopeptidasas, 72
Exosomas, 504
Experimento(s)
de cruzas de cepas, segregación de mutación, 354, 355*f*
de interferencia de RNA, 393, 393*f*, 518, 519*f*, 616, 892
en *C. elegans*, 393, 393*f*, 518, 519*f*, 616
de Meselson-Stahl, 131, 132*f*
de pulso y seguimiento, 94, 94*f*
para la endocitosis mediada por receptores de lipoproteínas de baja densidad, 760, 762*f*
para proteínas secretorias, 703, 705*f*
para la regeneración de tejido epitelial, 903, 903*f*
de trampa óptica, 793, 794*f*, 833
Exportador de mRNA, 514, 514*f*
Exportinas, 512, 513, 513*f*
Expresión
constitutiva, 462, 574
génica, 16. Véase también *Transcripción*
análisis, 22, 23*f*
de cluster (grupo), 386, 386*f*
de micromatrices de DNA, 22, 23*f*, 385, 385*f*, 386*f*
en células tumorales, 950
clonación, 377, 378
constitutiva, 462, 574
control transcripcional. Véase *Control génico; Transcripción*
definición, 101, 447
diferencial, 23, 23*f*
en levadura, 910, 911*f*, 912
regulación. Véase *Control génico*
transfección, 378, 379*f*
vectores de expresión, 377, 378*f*
Extensina, 232
Extravasación, leucocito, 227
Extremo
3, escisión y poliadenilación, 496, 496*f*, 504
de la transcripción del RNA, 110, 504
5', del transcripto de RNA, 110, 504
hidrófilo, de fosfolípidos, 13, 45, 150, 151*f*
hidrófobo, de fosfolípidos, 13, 45, 70, 150, 151*f*
eyeless, 27*f*

F

Factor(es)
activador de plaquetas (PAF), 747
en la extravasación de leucocitos, 228, 228*f*
alfa de necrosis tumoral (TN-α), 574
amplificadores de miocitos (MEF), 915, 915*f*
de apareamiento, levaduras, 596, 912, 912*f*
asociados al TBP, 469, 470
del complejo ternario (TCF), 595, 595*f*
de crecimiento
básico de fibroblastos, en angiogénesis de tumores, 938
en el cáncer, 951
epidérmico (EGF) en la hipertrofia cardíaca, 567
de fibroblastos, 650, 650*f*, 651
hepatocitos, en la migración de los mioblastos, 917, 918
hormona de crecimiento, unión del receptor, 536, 536*f*
en medio de cultivo, 236
mitogénico, 856
en el movimiento celular, 803, 804*f*
nervioso (NGF), 925, 930
queratinocito, 904
en transformación
alfa, angiogénesis tumoral, 938
beta. Véase también *TGFbeta*
en cáncer, 577, 956, 957*f*
estructura, 574, 575*f*
funciones, 574
isoformas, 574
síntesis, 574, 575*f*
de dispersión, 804
en la migración de mioblastos, 917
de escisión, 496*f*, 497
de especificidad
APC, 863
de escisión y poliadenilación (CPSF), 496*f*, 497, 520
estimulador
de la colonia de granulocitos (G-CSF), producción, 377, 378
de la escisión (CStF), 496*f*, 497
E2F
en cáncer, 958
en regulación del ciclo celular, 884, 885*f*
inducido por hipoxia 1 (HIF-1), 619, 620*f*

Factor(es) *(Cont.)*
de iniciación, en la traducción, 126
de intercambio
de nucleótidos de guanina (GEF), 512, 542
en la activación Ras, 591
en el ciclo de Ras, 588
de Ran-nucleótido guanina, 512, 513
de liberación, 129
natriurético auricular (ANF), 565
de necrosis
tumoral, 930
alfa (TN-α), en la activación del NF-κB, 602, 602*f*
neurotrófico derivado del cerebro, 926
promotor
de la fase S, 876, 876*f*
de la maduración (MPF). Véase también *Factor promotor de la mitosis (MPF)*
actividad de la cinasa, 861
ciclina B, 861, 862*f*, 863*f*
en *S. pombe*, 865, 866*f*
en *Xenopus*, 859, 859*f*, 860*f*, 865
de la mitosis (MPF), 848*f*
ciclina B, 860f,861,862f,863f, 886
correlato de levadura, 865
en la descondensación cromosómica, 862, 870, 871*f*, 872*f*
en la despolimerización de la lamina, 868, 868*f*, 869*f*
fosforilación proteica, 868, 868*f*, 869*f*
inactivación, 873, 879
en la maduración de ovocitos, 859, 859*f*
regulación, 865, 868*f*, 886
de la ciclina mitótica, 861
en *S. pombe*, 865, 866*f*
subunidad catalítica, 860, 865, 865*f*, 876
subunidades, 860, 876
en *Xenopus*, 860, 861, 862*f*, 863*f*, 865, 867
reguladores musculares (MRF), 915, 915*f*, 916
de respuesta sérica (SRF), 595, 595*f*
de transcripción, 11, 66, 66*c*, 67*f*, 110, 449. Véase también *Factores específicos*
activación, 534*f*, 535, 567, 571, 572*c*, 573*c*
activador, 911
bacterianos, 463, 463*f*
bZip, 465
en el cáncer, 955, 956*f*
codificados por oncogenes, 953
en el complejo de preiniciación de la transcripción de la Pol II, 469, 470*f*, 478
cremallera
básica, 465
de leucina, 464, 465, 465*f*
cromatina, 429, 471
dedos de cinc, 382*c*, 463, 464, 464*f*, 482, 482*f*
dominios
de activación, 461, 461*f*, 462*f*, 467, 467*f*
de activación acídicos, 467, 467*f*
de represión, 462, 463*f*, 467, 467*f*
de unión
al DNA, 461, 461*f*, 462*f*, 463, 463*f*
al ligando de receptores nucleares, 467, 467*f*
en la especificación del tipo celular, 910, 911*f*, 912*f*
espiral enrollada, 465
GAL4, 461, 461*f*
generales, 469
genes de respuesta temprana, 595
hélice-bucle-hélice básica, 465
heterodiméricos, 465, 466*f*
homeodominio, 463
identificación
cromatografía con secuencia específica de DNA, 459, 460*f*
ensayo
de huellas *(footprinting)* con DNasa, 458, 459*f*
de retardo de la movilidad electroforética, 459, 460*f*
de la transfección in vivo, 460, 460*f*
interacción, 465, 572*c*, 573*c*, 574, 595
en el desarrollo, 632, 637
liberación secuencial, en el desarrollo, 633, 637
localización, 449
MADS, 638
en la especificación del tipo celular, 910, 911*f*
MBF, 877
miogénica, 914, 915*f*
motivos de unión al DNA, 462, 463*f*
proteínas HMG, 429
receptor nuclear, 464, 467, 467*f*, 482, 482*f*
regulación, 481, 483, 484*f*
complejo Ca^{2+}/calmodulina, 564
unión de la hormona, 483, 484*f*
represor, 912
SBF, 877
STAT, 572*c*, 582*f*, 583, 584*f*
dominios SH2, 579, 580*f*, 584*f*
transporte nuclear, 513
Tubby, activación, 565, 566*f*
unión cooperativa, 466, 466*f*, 912*f*
velocidad de expresión, 521
FAD (flavinadenina dinucleótido)
como transportador de electrones, 54*f*, 55
reducción, en la síntesis de ATP, 309, 310, 310*f*, 311*c*
FADD, 930
FADH2
en la cadena respiratoria, 315
producción, 309, 310, 310*f*, 311*c*
transferencia de electrones, 317, 318*f*
Fago(s), 7*f*, 137, 140*f*. Véase también *Virus*
atemperados, 141
Fagocitosis, 167, 167*f*, 728
Faloidina, 786
Falta de oxígeno, respuesta celular, 619, 620*f*
Falla renal, 212
Familia(s)
de factores transformadores del crecimiento beta, 613
génicas, 201, 382, 410, 410*c*, 411*f*, 613
evolución, 613
de proteínas, 10, 410, 613
evolución, 382, 382*f*, 613
Fármacos
agonistas/antagonistas, 539
antiangiogénesis, 938
antidepresivos, 290
betabloqueantes, 295, 539
bloqueantes de canales, 269, 295
estatina, 772*f*, 773
Fascina, 782, 783, 783*c*
Fase
G1, 17, 17*f*, 854, 854*f*, 874. Véase también *Ciclo celular*
G2, 17, 17*f*, 854, 854*f*, 874. Véase también *Ciclo celular*
G_0, 854*f*, 855, 883, 883*f*. Véase también *Ciclo celular*
M, 17, 17*f*. Véase también *Ciclo celular*
S, 17, 17*f*, 854, 854*f*, 874. Véase también *Ciclo celular*
en células de mamífero, 883
entrada, 874, 883
en levadura, 874
Fenilalanina, 38, 39*f*. Véase también *Aminoácido(s)*
Fenilcetonuria, 394*c*
Fenotipo, 22, 353
definición, 352
efectos de mutaciones recesivas vs. dominantes, 353
Fermentación
alcohólica, 306*f*
de la glucosa, 305
Feromonas, 533, 912
Ferritina, 522
Ferrotransferrina, 732
Fertilización in vitro, 8
Ffh, en la translocación proteica, 661, 662*f*, 680
Fibras
de colágeno, 217, 218
de elastina, 217
de tensión, 222*f*, 223, 224*f*, 796, 803
Fibrillas de colágeno, 217, 217*f*, 218
en el colágeno de tipo
I, 218, 218*f*
II, 218*f*, 219
Fibrohlasto(s), 217
cultivados, estructuras adhesivas que contienen integrina, 224, 224*c*, 224*f*
en cultivos celulares, 236, 237*f*
movimiento, 803, 804*f*
Fibronectinas, 217, 220, 407
corte y empalme alternativo, 114, 114*f*
estructura, 220, 221*f*
funciones, 220
integrinas, 221, 222*f*
isoformas, 220, 505, 507
en la matriz extracelular, 201, 220, 221*f*, 222*f*
región de unión a células, 221, 221*f*, 222*f*
secuencia RDG, 221, 221*f*, 222, 222*f*
tipos, 221, 221*f*
Fibrosis cística, 394*c*
herencia, 395, 395*f*
modelo de ratones *knockout*, 390
Fijación
del carbono, 53, 332, 333, 342. Véase también *Fotosíntesis*
ciclo de Calvin, 342, 343*f*
rubisco, 342, 342*f*, 344
sitio, 342
vía C_3, 342, 343*f*
vía C_4, 345, 345*f*
de los especímenes de microscopio, 186
Filagrina, 811
Filamentos. Véase *Citoesqueleto*
de actina, 15, 15*f*, 173*f*, 174, 174*c*, 175*f*, 176*f*, 780*f*. Véase también *Actina; citoesqueleto*
en la activación de la ATP sintetasa, 81
en el borde director, 789*f*, 801
en la contracción muscular, 797, 797*f*, 798*f*
en la corriente citoplasmática, 795, 795*f*
decoración, 782, 782*f*
despolimerización, 786
disociación, 786, 801*f*, 802
ensamblaje, 782
concentración crítica, 785, 785*f*
etapas, 801*f*
fases, 784
fuerzas producidas, 801*f*
intercambio de ADP-ATP, 785, 785*f*
polimerización de actina G, 784, 784*f*
profilina, 787, 787*f*
proteínas de enlace cruzado de actina, 782, 783*f*
ramificación, 788, 789*f*
regulación, 786
reversibilidad, 782
timosina $beta_4$, 786, 787*f*
en las fibras de tensión, 222*f*
fijación a grupos de proteínas de membrana, 543
en los haces contráctiles, 796, 796*f*
haces y retículos, 176, 782, 783*f*, 790*f*, 796
transiciones sol-gel, 803, 805
e integrinas, 222*f*, 223
longitud, 787
mecanismo de cinta rodante, 786, 786*f*
movimiento
celular a lo largo de, 79, 79*f*
de miosina a lo largo de, 79, 80*c*, 80*f*, 81, 81*f*, 82*f*, 793, 793*f*, 794*f*, 795*f*
vesicular a lo largo de, 794, 795*f*
polaridad, 782, 782*f*
polimerización, 784, 784*f*
y morfología celular, 789, 790*f*, 801
en el movimiento celular, 789, 790*f*, 801*f*
regulación, 786
ramificados, 788, 789*f*
recubrimiento, 787, 788*f*, 801*f*, 802
en el sarcómero, 797, 797*f*
y tropomiosina, 176*f*, 177, 798*f*, 799
en las uniones celulares, 203, 203*f*
velocidades de crecimiento desiguales, 785, 785*f*
delgados, en el sarcómero, 797, 797*f*
gruesos, en el sarcómero, 797, 797*f*
intermedios, 15, 15*f*, 173*f*, 174, 174*c*, 175*f*, 177, 177*f*, 779, 780*f*, 805
adhesión a la membrana, 806*f*, 810
cantidades celulares, 805
desminas, 174*c*, 807, 807*c*, 811, 811*f*
distribución, 806, 806*f*, 807, 811
enlaces cruzados, 810, 810*f*
ensamblaje, 806, 806*f*, 808, 808*f*, 809
estabilidad, 809
estructura, 806, 806*f*, 808, 808*f*
fosforilación/desfosforilación, 810
funciones, 805, 810
heteropoliméricas, 809
homopoliméricas, 809
incorporación al citoesqueleto, 809, 809*f*
interconexiones, 177
en la lámina nuclear, 810
laminas, 171, 174, 174*c*, 177, 177*f*, 806, 807*c*
mutaciones, 809, 811, 812*f*
naturaleza dinámica, 809, 809*f*
propiedades, 806, 806*f*
queratinas, 173*f*, 174, 174*c*, 177, 177*f*, 807, 807*c*
redes, 806*f*, 810, 811*f*
subunidades, 809
tamaño, 806
tipos, 806, 807*c*
III, 807, 807*c*
en tumores, 808
unión
a la actina, 810
a microtúbulos, 806*f*, 810, 810*f*, 824
en las uniones celulares, 177, 203, 203*f*
Filamina, 783, 783*c*, 801*f*, 802, 803
Filopodios, 800, 803
Filtro de selectividad de iones, 263, 263*f*, 264*f*
Fimbrina, 782, 783*c*
FISH (hibridación in situ con fluorescencia)
DNA satélite, 413
multicolor, 431, 432*f*
múltiple, 12*f*
Flagelo, 79, 80*c*, 818, 818*f*
bacteriano, 682
dineínas axonémicas, 835, 836*f*
espermático, movimiento rítmico, 837, 837*f*
movimiento rítmico, 829, 837, 837*f*
rotación, fuerza protón-motriz, 302*f*, 326
Flavina adenina dinucleótido (FAD)
como transportador de electrones, 54*f*, 55
reducción, en la síntesis de ATP, 309, 310, 310*f*, 311*c*
Flipasa(s), 155, 747*f*, 748
ensayo de extinción de la fluorescencia, 749, 749*f*
lípido de *E. coli*, 259, 259*f*
en el transporte mediado por ABC, 259, 259*f*, 748, 749*f*, 756
Floema, 346*f*, 347
Flores, 231
desarrollo, 637, 637*f*, 638*f*
Flujo citoplasmático, 795, 795*f*, 803
Fluorocromos, 187
FMR1, mutaciones, 519
Forkhead, 600
Formación
de ampollas, 811, 812*f*
y cadherinas, 206
de coágulo, 226
Fos, 595, 595*f*, 883, 955
Fosfatasa alcalina placentaria (PLAP), en *"rafts"* lipídicos, 156*f*, 161
Fosfatasas
en la fosforilación proteica, 85, 85*f*
en la señalización, 543
Fosfatidilinositol (PI), 561, 562*f*
3-cinasa, 599, 599*f*, 600*f*
4,5-hifosfato, 562*f*
4-fosfato, 562*f*
Fosfatidilserina. Véase también *Lípidos de membrana*
distribución, 155
Fosfato, inorgánico, en la síntesis de ATP, 301
Fosfodiesterasa cAMP, 553, 564
Fosfoenolpiruvato carboxilasa, 345*f*, 346
Fosfofructocinasa-1, en la glucólisis, 314, 314*f*

Fosfoglicéridos, 150, 151*f*. Véase también *Lípidos de membrana*
estructura, 44, 44*f*
Fosfoinosítidos, como segundos mensajeros, 541, 561, 562*f*, 598
Fosfolipasa(s), 155, 155*f*, 161, 163
C, 561, 562*f*, 598, 618
gen *tubby*, 565, 566*f*
funciones, 163
mecanismo de acción, 163, 163*f*
Fosfolípido(s), 13, 44, 150, 151*f*. Véase también *Lípido(s); Lípidos de membrana*
ácidos grasos, 745, 746*f*
agregación, 154
estructura, 37*f*, 44, 44*f*, 746*f*
extremo
hidrófilo, 13, 45, 150, 151*f*
hidrófobo, 13, 45, 70, 150, 151*f*, 154
forma
liposómica, 45, 45*f*
de micela, 45, 45*f*
inositol, como segundo mensajero, 541
naturaleza anfipática, 45, 150, 151*f*
síntesis, 747, 747*f*
en el retículo endoplasmático, 168
tipos, 150, 151*f*
transporte, 748. Véase también *Transporte lipídico*
intercelular, 744*f*, 745*c*, 755
intracelular, 744*f*, 745*c*, 752
mediante proteínas ABC, 755, 756*f*, 757
Fosfoproteína fosfatasa, 552, 552*f*
Fosforilación, 70, 70*f*, 85, 85*f*, 543
en la activación de receptores, 578, 579*f*
de aminoácidos, 70, 70*f*
de las ciclinas, 72
en el ciclo celular, 856
enzimas, 70, 70*f*, 72, 76, 77*f*
fosfatasas, 85, 85*f*
del labio de activación, 578, 579*f*, 583
mediante la proteincinasa A, 75, 76, 76*f*, 77*f*
a nivel del sustrato, 304
de la opsina, 560, 560*f*
oxidativa, 316
definición, 316
fuerza protón-motriz, 316, 325
intercambio de ATP-ADP, fuerza protón-motriz, 329, 329*f*
en la síntesis de ATP, 316
en el tejido de grasa parda, 330
en el transporte de electrones, 316
velocidad, 330
proteica, función reguladora, 85, 85*f*
de proteínas, 70, 70*f*, 85, 85*f*, 543
de las receptores tirosincinasa, 587, 588*f*
en la regulación de proteínas, 85, 85*f*
en la replicación del DNA, 132, 133*f*, 135, 856
de tirosinas, en la vía JAK-STAT, 583, 584, 584*f*
Fosfotirosina, dominios SH2, 579, 580*f*, 584, 585*f*
Fositas recubiertas de clatrina/AP, 165
en la endocitosis mediada por receptores, 728, 728*f*, 730
Fotones, 333
absorción, 335, 335*f*
Fotorreceptores
rodopsina, 556
en *Drosophila*, 590, 590*f*, 591*f*
Fotorrespiración, 345, 345*f*, 346*f*
Fotosíntesis, 301, 331
absorción lumínica, 332, 334*f*
ATP sintasa, 333
en bacterias, 331, 335, 336, 336*f*, 337*f*
catálisis, 332
ciclo Q, 339
en cloroplastos, 302
complejos de captación de luz, 333, 335, 335*f*
definición, 331
etapas, 332
fijación del carbono, 53, 332, 333, 342. Véase también *Fotosíntesis*
ciclo de Calvin, 342, 343*f*
rubisco, 342, 342*f*, 344
sitio, 342
vía
C_3, 342, 343*f*
C_4, 345, 345*f*
flujo de electrones, 333, 337, 337*f*, 338*f*, 339, 339*f*
cíclico, 337, 337*f*, 340, 341*f*
en el fotosistema
PSI, 338, 338*f*, 340, 341*f*
PSII, 338, 338*f*, 339*f*, 340*f*, 341*f*
lineal, 337, 338*f*, 339*f*, 341*f*
fotorrespiración, 345, 345*f*, 346*f*
fotosistemas. Véase *Fotosistema(s)*
fuerza protón-motriz, 333, 336, 337*f*, 338*f*, 339
inhibición de herbicida, 340
en la membrana tilacoide, 331, 332*f*
$NADP^+$, 333, 339
en procariontes, 302
producción
cuántica, 335
de oxígeno, 302, 331, 333, 339, 339*f*, 340*f*
de sacarosa, 342, 343*f*, 344
productos finales, 331
quimioósmosis, 302
reacción(es), 331
luminosas, 333
oscuras, 333
separación de cargas, 334, 336
síntesis de ATP, 14, 53
transporte fotoelectrónico, 334, 334*f*
Fotosistema(s), 66*c*, 333, 334*f*, 336
Fraccionamiento, 21, 21*f*
celular, 180, 180*f*
Fragmento(s)
de Okazaki, 133, 133*f*, 135, 362
de restricción, 362
ligación, 362, 363, 363*f*
Franja eve, 634, 634*f*
Frizbees, 652
Frizzled, 642, 642*f*, 652
Fructosa 1,6 bifosfato, en la glucólisis, 305*f*, 314, 314*f*
FtsZ, 174*c*, 175, 819
Fuerza protón-motriz, 308, 308*f*, 309, 315. Véase también *Transporte de electrones*
como calor, 330
componentes, 317
definición, 302
desacoplantes, 330
en el direccionamiento de proteínas mitocondriales, 687
ecuación, 317
en la fotosíntesis, 333, 336, 337*f*, 338*f*, 339
funciones, 325
generación, 302*f*
en el intercambio de ATP-ADP, 329, 329*f*
medición, 317
en la rotación de flagelo, 302*f*, 326
en la síntesis de ATP, 302*f*, 325
en el transporte
de membrana, 304
de metabolitos, 302*f*, 326
Funciones
cerebrales, orden más alto, redes neurales, 294
cognitivas, redes neurales, 294
Fura-2, Ca^+, 188, 188*f*, 189
Furina, 726
Fused, 641, 641*f*
Fusión celular, para la producción de anticuerpos monoclonales, 238, 238*f*
de la membrana, 712, 712*f*
proteínas SNARE, 712, 712*f*
viral, 713, 714*f*
FXR, en el metabolismo lipídico, 767

G

G (energía libre), 51
para el transporte de iones, 267, 267*f*, 268
GABA. Véase también *Neurotransmisor(es)*
estructura, 288*f*
Galactosa, estructura, 41*f*, 42
Gametos, 18, 355
Gamma-carboxilación, 70, 70*f*
Gangliósidos, 151
GDP (guanosina difosfato), 41*c*
estabilidad de microtúbulos, 823, 823*f*
proteínas interruptoras, 85, 85*f*
Ras, 85, 85*f*, 588, 589, 589*f*, 592, 592*f*
en la señalización, 85, 85*f*, 542, 542*f*, 588, 589, 589*f*, 592, 592*f*
en tubulina, 819, 819*f*, 823, 823*f*
GDP (difosfato de guanosina), en la señalización, 542, 542*f*, 588
Gelsolina, 787, 788*c*, 801*f*, 802
Gemación
vesícula, 707, 708*f*, 719, 719*f*, 720*f*, 721*f*
virus, 141, 141*f*, 733
Gemelos idénticos, 8
Gen(es), 11. Véase también *Proteína(s)*
amplificadores, 406
autosómico
dominante, 395, 395*f*
recesivo, 395, 395*f*
betaglobina, transcripción, 113*f*
candidato, en enfermedades genéticas, 399
causante de enfermedades. Véase también *Cáncer; Enfermedades genéticas*
en el DNA clonado, 398
herencia, 395, 395*f*
mapeo, 396, 397*f*. Véase también *Mapeo genético*
cdc, 857, 857*f*
choque térmico, transcripción, 486
codificadores de proteínas, 409, 410*c*, 411*f*
duplicados, 410, 410*c*, 411*f*
en eucariontes, 111, 112*f*
en procariontes, 111, 112*f*
secuencias reguladoras, 454
solitarios, 409, 410*c*
conservación evolutiva, 27, 27*f*
copias no funcionales, 411
cox II, 440
definición, 108
molecular, 406
en el desarrollo de *Drosophila*, 633, 633*f*, 635*f*
domésticos, 455
dominante negativo, en la inactivación génica, 392, 392*f*
double-sex, 505, 506*f*
duplicado, 410, 410*c*, 411*f*, 422
evolución, 422
específico del organismo, 613
estructura, 406*f*
gap, 630
en el desarrollo de *Drosophila*, 633, 633*f*, 635*f*
globina
como familia génica, 410, 411*f*
símil-beta, como familia de genes, 410, 411*f*
transcripción, 113*f*
haploinsuficiente, 353
heterocigosidad, 353
de histona, repeticiones, 410*c*, 411
HO, transcripción, 478, 479*f*
homeóticos (Hox), 27*f*, 636, 636*f*
homocigosidad, 353
Hox, 27*f*, 636, 636*f*
identidad del órgano floral, 637, 637*f*, 638*f*
identificación
análisis
de cluster, 386
de micromatrices de DNA, 385, 385*f*, 386*f*
construcciones interruptoras, 387, 388*f*
en enfermedades genéticas, 396
modelo del ratón, 384
secuenciación de proteínas, 26, 380, 381*f*
secuencias de DNA genómico, 383, 383*f*
técnicas de inactivación génica, 387
inactivación, 387, 389*f*, 390*f*, 615
alelos dominantes negativos, 392, 392*f*
gen *knockout*, 207, 389, 389*f*, 390*f*, 616, 902
interferencia de RNA, 393, 393*f*
promotores, 388
recombinación homóloga, 387, 388*f*
sistema de recombinación loxP-Cre, 391, 391*f*
transgenes, 392, 392*f*
indicador, 450, 582
informador lac Z, 461
lac Z, 378, 378*f*
de lisozima de pollo, 409
localización genómica, 111, 112*f*
maternos, 634, 635*f*
miogénicos, 914, 915*f*
notación, 864
número, complejidad del organismo, 613
ordenamiento funcional, 358
organización. Véase *Genoma(s)*
cromosómica, 408, 409*f*. Véase también *Cromosoma(s)*
pair-rule, 633*f*, 634, 635*f*
polaridad del segmento, 635
en *Drosophila*, 635
polycomb, 636
de pre-rRNA, repetidos, 412, 412*c*
recesivos ligados al X, 395, 395*f*
región(es)
regulatoria, 11
codificadoras, 11, 406, 406*f*
no codificadoras, 406
regulador
conservación evolutiva, 613
del desarrollo, conservación, 27
relacionados, 201
repetidos en tándem, 410*c*, 411
en DNA satélite, 410*c*, 412, 413*f*
de respuesta
retardada, 883, 884*f*
temprana, 595, 883, 884*f*
rRNA, 406
repetidos en tándem, 410*c*, 411
rhomboid, 628, 628*f*, 629
que saltan (transponen), 13. Véase también *Elementos*
selección, 27
single-minded, 628
slo, 507, 507*f*
snail, 628*f*, 629
solitarios, 409, 410*c*
supresores de tumores, 884, 935, 946. Véase también *Genes específicos*
inactivación, 946, 958
mutaciones
heredadas, 946
oncogénicas. Véase *Cáncer, mutaciones*
pérdida de heterocigosidad, 947, 948*f*, 960
proapoptóticas, 960
en el punto de control del daño del DNA, 889, 890
tolloid, 628
transformer, 505, 506*f*
trithorax, 636
tRNA, 406
repetidos, 410*c*, 411
TTR, transcripción, 479
únicos vs. comunes, en los seres humanos, 613, 613*f*
unidades transcripcionales, 407, 407*f*
móviles
Xbra, 623
Xgsc, 623
zerknüllt, 628
Genética
clásica, 351
para mutaciones sensibles a la temperatura, 356
rastreo o screening genético, 356
médica, 13, 28
Genoma, 12
en células somáticas, 906
comparación de especies, 384, 384*f*
complejidad, 384, 384*f*, 613
contenido génico, 384
copiado, 12. Véase también *Replicación del DNA*
elementos móviles de DNA, 13
en eucariontes, 111, 112*f*
en procariontes, 111, 112*f*
secuenciación, 22, 59, 95, 383, 383*f*. Véase también *Mapeo genético*
del HIV, transcripción, 485, 485*f*
Genómica, 22, 380
análisis de grupo, 386, 386*f*
bases de datos de secuencia de proteína, 380, 381*f*
definición, 353
homología de secuencia, 382, 382*f*
identificación proteína/gen, 380, 382*c*, 383
microamatrices de DNA, 385, 385*f*
relaciones evolutivas, 382
secuencia
aminoacídica, 380, 381*f*
consultada (query), 380
Genoteca. Véase *Genoteca de DNA; Genoteca genómica*
de cDNA de fagos, 365, 365*f*
screening, 367, 367*f*, 368*f*
sistema de híbrido de levaduras, 480, 480*f*

Genoteca *(Cont.)*
de DNA, 364, 365, 366*f*
definición, 352
rastreo (screening), 367, 367*f*, 368*f*
sistema de dos híbridos de levadura, 480, 480*f*
genómica, 365. Véase también *Genoteca de DNA*
levaduras, 369, 369*f*, 370*f*
rastreo o screening, 367, 367*f*, 368*f*
Genotipo, 21
definición, 352
fenotipo, 352
Gi, 556, 556*f*
giant, 633
Giros, 62
Gleevec, 955
Gliceraldehído 3-fosfato
deshidrogenasa, conversión a piruvato, 304, 305*f*, 314, 314*f*
en el ciclo de Calvin, 343*f*, 344
Glicina, 38, 39*f*. Véase también *Aminoácido(s); Neurotransmisores*
en el colágeno, 211, 211*f*, 219
estructura, 288*f*
Glioxisomas, 168
glnA, 117
Glóbulos
blancos. Véase *Leucocito(s); Linfocitos*
rojos. Véase *Eritrocito(s)*
Glucagón, 619
Glucoesfingolípidos, 748
Glucoforina A, 158, 159*f*, 177
Glucofosfatidilinositol (GPI), como ancla de la membrana, 670, 671*f*
Glucógeno, 16, 42, 250
fosforilasa, 551, 551*f*, 552, 552*f*, 617*f*
cinasa (GPK), 551, 552, 552*f*, 617, 617*f*, 618
metabolismo. Véase *Metabolismo de la glucosa/glucógeno*
síntesis, 551, 551*f*
sintasa, 551, 551*f*, 552*f*, 600, 617*f*
cinasa, 600
Glucogenólisis
adrenalina, 547
regulación, 617. Véase también *Metabolismo de la glucosa/glucógeno*
segundos mensajeros, 617, 617*f*
Glucolípidos, 151
transmembrana, orientación, 161
Glucólisis, 301, 304, 305*f*, 310, 311*c*. Véase también *Metabolismo de glucosa/glucógeno*
del almidón, 347
definición, 301
hipoxia, 619
en plantas, 309
Glucopiranosa, estructura, 41, 41*f*
Glucoproteínas
proteoglucano, 213, 213*f*, 214*f*, 215*f*
transmembrana, orientación, 161
Glucosa
1-fosfato, síntesis, 617*f*, 619
6-fosfato, en la glucólisis, 305*f*, 314, 551, 551*f*
catabolismo aerobio, 54
conversión a piruvato, 304, 305*f*
estructura, 41, 41*f*
fermentación, 305, 306*f*
transporte transepitelial, 274, 274*f*
Glucosaminoglucanos, 43, 213*f*, 215*f*, 644
defectos causantes de enfermedades, 220
hialuronano, 213*f*, 214, 219
modificaciones, 215, 215*f*
Glucosilación, 70, 70*f*, 673, 673*f*
Glucosilcerebrósidos, 151, 151*f*
Glucuroniltransferasa 1, en la adhesión de células vegetales, 234
Glued, 834
GLUT1, 248, 249*f*
perfil de hidropatía, 672, 672*f*
GLUT2, 250, 551
microscopia de inmunofluorescencia, 187*f*
en la secreción de insulina, 618*f*
en el transporte transepitelial, 274*f*, 275
GLUT4, 250
insulina, 618, 619*f*
vesículas que contienen, purificación de, 181
Glutamato, 38, 39*f*. Véase también *Aminoácido(s); Neurotransmisor(es)*
estructura, 288*f*
Glutamina, 38, 39*f*. Véase también *Aminoácido(s)*
GM1, en *rafts lipídicos* (balsas lipídicas), 156*f*
GMP (guanosina monofosfato), 41*c*
cíclica como segundo mensajero, 541, 541*f*
Gp1b-IX, 790*f*, 791
gp55,953
Gradiente
de concentración, 50
bombas iónicas, 253. Véase también *Bombas impulsadas por ATP*
canales iónicos, 260
definición, 50
en la fuerza protón-motriz, 302, 302*f*, 303*f*, 317, 326
de iones. Véase *Gradiente de concentración*
mediciones, 317
de protones (pH), en la fuerza protón-motriz, 302, 302*f*, 303*f*
en la fuerza protón-motriz, 302, 302*f*, 303*f*
en la señalización, 260
en la síntesis de ATP, 302, 302*f*, 303*f*
en el transporte de membrana, 50, 246, 247, 247*f*, 260
velocidad de difusión, 246
electroquímico, 246, 267
iónicos, regulación de bombas, 253
de pH. Véase *Gradiente de concentración*
de voltaje. Véase *Potencial de la membrana*
Grana, 172, 172*f*
Grasas
estructura, 37*f*
parda, 330
GRB2, en la activación del Ras, 589, 589*f*, 591
GroEL, en el plegamiento de proteínas, 69*f*, 70, 83
Grupo(s)
acilo, 43
en la bicapa fosfolipídica, 45
de equivalencia, 624
de hierro-azufre, 318*c*, 319, 319*f*
prostéticos, transportadores de electrones, 318, 318*c*, 319*f*, 320*f*
de proteínas de alta movilidad (HMG), 429
sanguíneo 0, 161, 162*c*, 162*f*
sulfhidrilo, 38
enlaces disulfuro, 675, 676*f*
tiol, enlaces disulfuro, 675, 676*f*
cadenas ácidos grasos, 43
en la bicapa fosfolipídica, 45, 150, 151*f*, 154, 154*f*, 160
como anclas de proteínas de membrana, 160, 161*f*
en la síntesis de lípidos de membrana, 747, 747*f*
GTP (guanosintrifosfato), 41*c*
estabilidad de los microtúbulos, 823, 823*f*
hidrólisis, 542, 542*f*
dinamina, 721, 721*f*
en la traducción, 126, 126*f*, 127*f*, 128, 129
proteínas interruptoras GTPasa, 542, 542*f*
Ras, 588, 589, 589*f*, 592, 592*f*
en la regulación de proteínas, 84
síntesis
en el ciclo del ácido cítrico, 310, 310*f*
direccionamiento de proteínas, 662, 663*f*
en la traducción, 662
en la tubulina, 819, 819*f*, 823, 823*f*
GTPasa(s)
inactivación, 392, 392*f*
tubulina, 819
Guanina, 40, 40*f*, 41*c*
en la doble hélice, 103, 104*f*, 105*f*. Véase también *Pares/apareamiento de bases; Doble hélice*
estructura, 103, 103*f*
Guanosina
monofosfato cíclico. Véase *cGMP*
trifosfato. Véase *GTP*
Gusano nematodo. Véase *Caenorhabditis elegans*

H

Hac1, en respuesta a la proteína desplegada, 679, 679*f*
Haces
contráctiles, 796, 796*f*
filamentos, 176, 782, 783*f*
no contráctiles, 796, 796*f*
vascular, 345*f*, 347
hairy, 635
HCO_3^-, concentraciones típicas, 253*c*
Hebra
conductora, 133, 133*f*, 134*f*
rezagada, 133, 133*f*, 134*f*
Hedgehog, colesterol, 752
Helicasas
en exosomas, 504
MCM, 880
en la replicación del DNA, 135, 136
en la replicación, 133, 135, 136*f*
en la transcripción, 469, 504
Hélice(s)
alfa, 61, 61*f*
en canal de ion potasio, 263, 263*f*
en la polarización de la membrana, 279, 283, 283*f*
en proteínas integrales de membrana, 158, 159*f*
multipaso, 669, 670*f*
en el represor bacteriano, 463, 463*f*
sensible al voltaje, 279, 283, 283*f*
DNA, 10, 10*f*, 103, 104*f*, 105*f*. Véase también *Doble hélice*
de lectura de secuencia, 463, 463*f*
M2, 292, 292*f*
reconocimiento, 463, 463*f*
reguladoras, 279, 283, 283*f*
S4, en la despolarización de la membrana, 279, 283, 283*f*
triple, de colágeno, 211, 211*f*, 212, 219
Hemaglutinina
de la influenza, fusión de la membrana, 714, 714*f*
estructura, 65*f*, 66
fusión de membrana, 714, 714*f*
plegamiento y ensamblaje, 678, 678*f*
Hematocrito, regulación, 586
Hematopoyesis, 580*f*, 581, 904, 904*f*
Hemicelulosa, 232
Hemidesmosomas, 177, 198*f*, 203, 203*f*, 223, 811
integrinas, 208, 223
Hemo, 318, 318*c*, 319*f*
Hemofilia, 394*c*
Hemoglobina
estructura, 67, 67*f*, 410
evolución, 65, 67, 67*f*
fetal, 410
genes globina símil beta, 410, 411*f*
unión de oxígeno, 83, 83*f*
Hendidura sináptica, 277, 278*f*
Heparansulfato, 213*f*, 214, 215
síntesis, 214
Heparina, activación antitrombina III, 215, 215*f*
Hepatocito(s)
cebado, 648*f*, 649
clasificación de proteína, 726*f*, 727
Her2, 587
Herbicidas, inhibición de fotosíntesis, 340
Hereditario, 947, 958, 964*c*
Herencia
citoplásmica, del DNA mitocondrial, 438, 439*f*
recesiva ligada al X, de enfermedades genéticas, 395, 395*f*
Heterocigosidad, 353
Heterocromatina, 171, 171*f*, 433, 471
código de aminoácido, 476, 476*f*
Heterogeneidad
en enfermedades genéticas, 398
genética, 398
Heteroplasmia, 441
Hexocinasa, en glucólisis, 314, 314*f*
Hialuronano, 213*f*, 214, 217, 219
como gel hidratado, 219
degradación, 219
estructura, 219
funciones, 219
movimiento celular, 219
presión de turgencia, 219
uniones celulares, 219
Hialuronidasa, 219
Hibridación, 10
definición, 367
DNA, 106, 367, 367*f*
en el screening de genoteca de DNA, 367, 367*f*
fluorescencia in situ, 12*f*
in situ, 393
con fluorescencia (FISH)
DNA satélite, 413
multicolor, 431, 432*f*
Híbrido de resonancia, 32
Hibridomas, 237, 238*f*
aislamiento, 238
Hidrocarburos, insolubilidad, 35
Hidrofobicidad
solubilidad de lípidos, 246
velocidad de difusión, 246
Hidrógeno, enlaces covalentes, 31, 31*c*
Hidrolasas ácidas, 167
Hidroxiprolina, en el colágeno, 211, 211*f*
5-Hidroxitriptamina, 288*f*. Véase también *Neurotransmisor(es)*
Hierro, intracelular, regulación, 522, 522*f*
Hígado
cáncer, 964*c*
graso, 766
regeneración, 648, 648*f*
transporte de colesterol inverso, 770, 771*f*
Hipercolesterolemia, 394*c*
familiar, 730, 760
Hipertrofia cardíaca, 567
Hipomagnesemia hereditaria, 208, 946, 958
Hipótesis endosimbionte, 304
Hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT), en las vías de rescate de nucleótidos, 238*f*, 239, 239*f*
Hipoxia, respuesta celular, 619, 620*f*
Histamina, estructura, 288*f*
Histidina, 38, 39*f*. Véase también *Aminoácido(s)*
permeasa, 258
Histona(s), 424, 471
acetilación, 426, 475, 475*f*, 479, 918
conformación, 424
en la cromatina, 424, 425*f*
definición, 424
desacetilación, 474, 474*f*, 475*f*, 483
en los nucleosomas, 424, 425*f*
secuencia de aminoácidos, 424
HMG-CoA reductasa, en la síntesis de colesterol, 751, 751*f*, 764, 766
fármacos estatinas, 772*f*, 773
hnRNP, 494, 495*f*
anillo de Balbiani, 515, 516*f*
estructura, 495
formación, 515, 516*f*
funciones, 496
motivos de unión al RNA, 495, 495*f*
en el procesamiento de pre-mRNA, 495
transporte nuclear, 512, 512*f*
Hoja
beta, 61, 62, 62*f*
en porinas, 160, 160*f*
estructura, 332*f*
plegada, 61, 62, 62*f*
Hojuela, de la membrana, 45, 149, 153*c*
Homeosis, 636
Homocigosidad, 353
Homología
proteica, 67*f*, 68
identificación, 380, 381*f*
de la secuencia, 383
Homólogos, 355
Hongos
funciones, 6
patogénicos, 6
potencial de membrana, 263
transporte de membrana, 252*f*, 263
Hormona(s), 9
en la bicapa fosfolipídica, 13, 13*f*, 151*f*, 152, 154, 154*f*
en el control génico, 17
degradación, 605
esteroides. Véase también *Hormonas*
en la bicapa lipídica, 13, 13*f*, 151*f*, 152, 154, 154*f*
en el control génico, 17
internalización, 605
en el metabolismo óseo, 606, 606*f*
secreción, 168, 169*f*
en la señalización, 16, 16*f*, 535

Hormona(s) *(Cont.)*
sintéticas, 539
en transcripción, 17, 482, 483*f*, 484*f*
unión de receptores, 17
Horquillas, 107, 108*f*
de crecimiento, 133, 133*f*, 134*f*, 436
direccionalidad, 133, 135, 136*f*
de replicación, 133, 133*f*, 134*f*, 436
direccionalidad, 133, 135, 136*f*
Hsc70
en direccionamiento de proteínas
del cloroplasto, 691
mitocondriales, 685*f*, 686
translocaciones proteicas, 389
HTLV (virus linfotrófico de células T humanas),142
Huella dactilar de la masa peptídica, 95
hunchback, 630, 631*f*, 634, 635*f*
Huso mitótico, 840, 841*f*
definición, 840
desensamblaje, 839*f*
elongación, 846, 847*f*
ensamblaje, 839*f*, 841, 844*f*
centrosomas, 843
ciclo del centríolo, 841, 842*f*
cinesinas, 844*f*, 845
dineínas, 843, 844*f*
entrada en la anafase, 888
inadecuado, 888
formación, 854
fuerzas atractivas, 840
en la metafase, 845, 845*f*
orientación, en la división celular asimétrica, 923, 923*f*
plano de escisión, 847*f*, 848, 874
separación de polos, 846, 847*f*
H^+. Véase *Iones hidrógeno*

I

I-kB-cinasa, 602, 602*f*
I-Smads, 575, 576, 577
Id, 916
Imágenes
fosforadas, 93
de microscopia digital, 192
Ime2, en meiosis, 891
Importinas, 510, 510*f*, 511*f*
Impulso(s)
de Merve, propagación. Véase *Potencial de acción*
nerviosos. Véase *Potencial de acción*
Incorporación selectiva de lípidos, 760, 762, 762*f*
Índice hidropático, 671
Inducción, 621, 621*f*
definición, 621
recíproca, 644, 645*f*
Inductores transcripcionales, 116
Inexinas, 231
Infarto del miocardio, 770. Véase también *Aterosclerosis*
Infección(s)
bacterianas, 4
extravasación de leucocitos, 227, 228*f*
fúngicas, 6
con HIV, 142
movimiento celular, 789, 789*f*
protozoarias, 5, 5*f*
virales, 6, 7*f*. Véase también *Virus*
proteínas de la superficie celular como sitios de entrada, 229
por virus de la inmunodeficiencia humana, 142
Inflamación
en aterosclerosis, 768, 768*f*
extravasación de leucocitos, 227, 228*f*
en las infecciones virales, 229
macrófagos, 768, 768*f*, 769*f*
Ingeniería genética, 193. Véase también *Tecnología del DNA recombinante*
en organismos experimentales, 25
en plantas, 270, 442
Inhibición lateral, 603, 644, 646, 646*f*, 647*f*, 921
Inhibidor(es)
de la fase S, 878, 878*f*, 879
de canales iónicos, farmacéuticos, 269, 295
de ciclina-CDK, 885, 886
de la recaptación de noradrenalina, 290
de la reincorporación de serotonina, 290
selectivos de la reincorporación de serotonina, 290
Inhibinas, 574
Iniciadores, transcripcionales, 454
INK4, 886
Inmunoblotting (inmunotransferencia), 92*f*, 93
Inmunoglobulinas. Véase también *Anticuerpos*
maternas, transcitosis, 735, 735*f*
como proteínas multiméricas, 678
transcitosis, 735, 735*f*
Inmunohistoquímica, 614
Inosina, apareamiento de bases no estándar, 123
Inositol 1,4,5-trifosfato. Véase IP_3
insig-1, 764
Insulina, 16, 600, 618, 618*f*
en diabetes mellitus, 619
secreción, 250, 618, 618*f*, 724
int-1, 642
Integrasa, 419
Integrina(s), 199, 199*f*, 208. Véase también *Moléculas de adhesión celular (CAMS)*
activación, 225, 225*f*, 228
actividades de unión de ligandos, interacciones célula-matriz, 225
en los agregados de estructuras adhesivas, 224, 224*c*, 224*f*
de alta afinidad, 225
de baja afinidad, 225
en el tejido
epitelial, 222*f*, 223
no epitelial, 223, 224*f*
conformaciones, 225
diversidad, 224*c*, 225
estructura, 199*f*, 209
estudios de genes knockout, 225
evolución, 225
en la extravasación de leucocitos, 228, 228*f*
en la formación de TGFbeta, 574
funciones, 225
en los hemidesmosomas, 208
en las interacciones adhesivas
agrupamiento, 223, 224*c*, 224*f*
en el tejido
epitelial, 199*f*, 208, 221, 222*f*
no epitelial, 223, 224*c*, 224*f*, 225*f*
ligandos, 224*c*, 225
en la morfogénesis, 225
en el movimiento celular, 225
población de la superficie celular, 226
en la señalización, 209, 225
unión
de fibronectina, 221, 222*f*
de la laminina, 212
en vertebrados, 224*c*
Interacciones
electroestáticas, 30*f*, 32*f*, 33, 33*f*
iónicas, 30*f*, 32*f*, 33, 33*f*
no covalentes, 30, 30*f*, 33, 34, 35*f*, 36*f*
complementariedad molecular, 36, 36*f*
efecto hidrófobo, 35, 35*f*
energía, 32, 32*f*
enlaces de hidrógeno, 30*f*, 33, 34*f*
estructura(s)
proteica, 61, 61*f*, 62*f*
grandes, 37*f*, 38
iónicas (electrostáticas), 30*f*, 32*f*, 33, 33*f*
en reacciones químicas, 47
de Van der Waals, 34, 35*f*
entre lípidos, 154
Intercambio de ADP-ATP, 329, 329*f*
en el movimiento celular, 787, 801*f*, 802
Interfase, 839*f*, 854, 856, 857*f*. Véase también *Ciclo celular*
en plantas, 848, 849*f*
Interferones, 581
Interleucina(s), 580
2, mutante, 605
en la activación NF-κB, 602, 602*f*
Interneuronas, en el arco reflejo, 294, 294*f*
Internexina, 807*c*
Intrón(es), 111, 405, 406*f*, 407
autocorte y empalme, 502, 503*f*, 527
definición, 111
escindidos, degradación, 500*f*, 504
del grupo
I, 502, 503*f*, 527
II, 502, 503*f*, 527
longitud, 409

múltiple, 114
mutaciones, 407*f*
Ion(es). Véase también *Iones específicos*
de calcio
en la adhesión intercelular, 204, 208
en las células musculares, 254, 254*f*, 255*f*
colorantes fluorescentes, 188, 188*f*
como segundo mensajero, 289, 290, 541, 557, 563, 564*f*
concentración
en el citosol, 253*c*, 256
en la sangre, 253*c*
en la contracción muscular, 253, 254, 254*f*, 798, 798*f*, 799*f*
en el músculo
esquelético, 798, 798*f*
liso, 799, 799*f*
exportación desde las células del músculo cardíaco, 269
en la extravasación de leucocitos, 228, 228*f*
en el metabolismo del glucógeno, 617*f*, 618
en el movimiento celular, 798, 805
regulación del IP3, 562
en la regulación
de la miosina, 793
proteica, 793
sinaptogamina y, 737
en la transmisión sináptica, 277, 278*f*
y uniones estrechas, 207
carga eléctrica, 33, 33*f*, 34*f*
cationes, 33
cloruro, concentraciones típicas, 253*c*
concentración, 33
dipolar (zwiterión), 48
hidrógeno, 257, 258*f*
en ácidos, 48
en bases, 48
colorantes fluorescentes, 188
pH, 47
potasio, concentraciones típicas, 253*c*
sodio
concentraciones típicas, 253*c*
magnitud del potencial de acción, 278
en el potencial de membrana, 261
en soluciones acuosas, 33, 33*f*
Ionóforo, 317
IP3, como segundo mensajero, 541, 541*f*, 545*c*, 561, 562*f*, 598
en el metabolismo del glucógeno, 617*f*, 618
DAG, 561, 562*f*, 572*c*, 598, 601
en el metabolismo del glucógeno, 617*f*, 618
Islas CpG, 455
Isletas de células de Langerhans, retículo endoplasmático rugoso, 168
Isocitrato, 78
Isoformas. Véase también *Tipos específicos*
definición, 201
Dscam, en neuronas retinales de *Drosophila*, 508
Isoleucina, 38, 39*f*. Véase también *Aminoácido(s)*
Isomerización, 78
Isómeros
aminoácidos, 38, 39*f*, 74
ópticos, 31
Isopentenil pirofosfato (IPP), 751, 751*f*, 752
Isoproterenol, 539
Isquemia, en la aterosclerosis, 769

J

Jasplacolinoda, 786
Jun, 955
cinasa N-terminal, 567, 597

K

K (coeficiente de partición), 246
Katanina, 824*c*, 825
knirps, 633, 635*f*
Km (constante de Michaelis), 76, 77*f*
Knockout (inactivación), gen, 207, 389, 389*f*, 390*f*, 616, 902
Krüppel, 633, 635*f*
Ksr, 598
K^+. Véase *Iones potasio*

L

Labio de activación, fosforilación, 578, 579*f*, 583
Lacrosa, 42, 42*f*
Lamelipodio, 523, 800, 801*f*
Lámina(s), 171, 174, 174*c*, 175*f*, 177, 806, 807*c*, 810. Véase *Filamentos intermedios*
basal, 15, 202, 202*f*, 210, 210*f*
en cáncer, 937
colágeno, 210*f*, 211, 211*f*, 212*f*
entactina, 210*f*, 211
estructura, 210, 210*f*
funciones, 210
lamininas, 210*f*, 212, 213*f*
en la membrana base, 198*f*, 211
perlecano, 210*f*, 211, 214
receptores de adhesión, 211
unión de distroglucano, 226*f*, 227
definición, 869
desensamblaje, 810
nuclear, 171, 177, 509*f*, 510, 806, 807*c*, 810, 868, 868*f*, 869*f*
definición, 869
desensamblaje, 810
reensamblaje, 873
Laminina, 210*f*, 211, 212, 213*f*
unión distroglucano, 226, 226*f*
Lanzadera malato-aspartato, 311, 311*f*
Latrunculina, 786
Lbx1, 917
Lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT), 758, 759*f*
Lectinas, en el plegamiento de proteínas, 677, 678*f*
Let-7 miRNA, 518
Letal of scute, 918
Leucemia, 938. Véase también *Cáncer*
cromosoma Filadelfia, 955
linfoblástica crónica, 960
mielogénica crónica, 955
cromosoma Filadelfia, 955
tratamiento, 955
Leucina, 38, 39*f*, 40. Véase también *Aminoácido(s)*
Leucocito(s)
adhesión endotelial, 227, 228*f*
apoptosis, 19, 19*f*
citometría de flujo, 179, 179*f*
extravasación, 227, 228
producción, 581, 904, 904*f*
Levadura(s). Véase también *Hongos; Sacharomyces cerevisiae; Schizosaccharomyces pompe*
aparato mitótico, 840
como organismos experimentales, 24, 25*f*
complejidad genómica, 384*f*
construcción interruptora, 387, 388*f*
DNA mitocondrial, 439, 441, 441*c*
elementos Ty, 417, 419*f*
especificación del tipo de célula a/alfa, 910, 911*f*, 912*f*
factores de apareamiento a/alfa, 596
fermentación, 305, 306*f*
funciones, 6
genes, identificación, 383, 383*f*
meiosis, 890, 891*f*
metabolismo anaerobio de la glucosa, 305, 306*f*
mutantes
cdc, 857, 864, 865*f*, 957*f*
sensibles a la temperatura, 857, 864
orígenes de replicación, 879, 880*f*
proteínas SNARE, 713
regulación del ciclo celular, 864, 864*f*, 874, 875*f*. Véase también *Ciclo celular, regulación*
reproducción, 6, 6*f*
RNA polimerasas, 451, 451*f*
secuencias activadoras en dirección 5', 457
segregación alélica, 355, 355*f*, 356*f*
señalización, 596, 596*f*, 597*f*
tipos celulares, 910, 911*f*
translocación proteica, 665
vías de la MAP cinasa, 507*f*, 596, 596*f*
Ligamento
definición, 396
genético, definición, 396
recombinación, 396
Ligando(s), 73. Véase también *Unión de proteínas; Unión receptor-ligando; Complejo receptor-ligando*
alostéricos, 83

Ligando(s) *(Cont.)*
disociación, 730, 730*f*, 731*f*. Véase también *Endocitosis mediada por receptor*
Fas, 930
internalización, 728. Véase también *Endocitosis mediada por receptor*
moléculas de señalización, 533
Ligasa, DNA, 362, 363*f*
Lignina, 232
lin-4 miRNA, 518
lin-14, división celular, 908, 909, 909*f*
Linaje(s) celular(es), 899, 900*f*
de *C. elegans*, 907, 908*f*
regulación traduccional, 909
LINE, 410*c*, 420, 420*f*, 421*f*
Línea(s)
celulares, 236, 237*f*
diferenciación, 237
HeLa, 236
HepG2, 237
inmortalizadas, 236, 237*f*
MDCK, 204*f*, 205
ovario de hámster chino, 237
germinal, 906
definición, 906
segregación, 906
Linfocitos
apoptosis, 19, 19*f*
citometría de flujo, 179, 179*f*
producción de hibridoma, 238
T
activación, 564
citometría de flujo, 179, 179*f*
epidérmicos, en la curación de heridas, 904. 04
receptores, 572*c*
Linfoma
análisis de micromatrices de DNA, 950, 950*f*
de Burkitt, 956
de células B, análisis de micromatrices de DNA, 950, 950*f*
Lípido(s). Véase también *Fosfolípido(s); Esfingolípidos*
almacenamiento en tejidos, 755
colesterol, 750, 751*f*, 753*f*
estructura, 37*f*
incorporación
mediada por SR-BI, 762, 762*f*
selectiva, 760, 762, 762*f*
de membrana, 13*f*, 14, 743. Véase también *Fosfolípido(s); Esfingolípido(s)*
alternan de posición (*flip-flop*) entre hojuelas, 748, 749
concentración, 754
distribución, 155, 745*c*, 747*f*, 748
esteroides, 13*f*, 14, 151, 151*f*, 154, 154*f*
estructura de la membrana, 154, 154*f*
fluidez de la membrana, 151*f*, 152
fosfoglicérido, 150, 151*f*
función de la membrana, 153
en las hojuelas citosólicas vs. exoplasmáticas
incorporación de los ácidos grasos, 747, 747*f*
mecanismos de entrada/salida, 745*c*, 755
movimiento, 152, 152*f*
uniones estrechas, 208
síntesis, 744*f*, 745, 745*c*, 747*f*
pasos, 744*f*
transporte
intercelular, 744*f*, 745*c*, 752, 755
intracelular, 744*f*, 745*c*, 752. Véase también *Transporte de lípidos; Proteínas de transporte de membrana*
en el retículo endoplasmático, 15
Lipólisis, adrenalina, 547
Lipoproteína(s), 757, 757*c*. Véase también *Lípido(s)*
de alta densidad, 757, 757*c*
como colesterol "bueno", 759, 770, 771*f*
efectos cardioprotectores, 759, 770, 771*f*
modificación, 758, 759*f*
transporte inverso de colesterol, 770, 771*f*
en la aterosclerosis, 759, 769*f*, 770
de baja densidad, 757, 757*c*
en la aterosclerosis, 759, 769*f*, 770
como colesterol "malo", 759
endocitosis mediada por receptor, 728, 728*f*, 729*f*, 754*f*, 760, 761*f*, 762*f*
estructura, 757, 758*f*
incorporación independiente del receptor, 769*f*, 770
oxidación, prevención mediante lipoproteínas de alta densidad, 771
clases, 757, 757*c*
cubierta anfipática, 757, 758*f*
definición, 757
de densidad intermedia, 758
endocitosis, 728, 728*f*, 729*f*, 754*f*, 760, 761*f*
mediada por receptor, 728, 728*f*, 729*f*, 754*f*, 760, 761*f*, 762*f*
estructura, 757, 758*f*
exocitosis, 758
incorporación, 759
independiente del receptor, 769*f*, 770
modificación, 758, 759*f*
de muy baja densidad (VLDL), 757, 757*c*. Véase también *Lípido(s)*
modificación, 758, 759*f*
síntesis, 758
salida, 758
síntesis, 758
Liposoma(s), 45, 45*f*
en estudios de transporte de proteínas, 251, 251*f*
fusión, 713
Lisina, 38, 39*f*, 40. Véase también *Aminoácidos(s)*
acetilación de colas de histonas, 426
Lisogenia, 141
Lisosoma, 14, 71, 165, 166*f*, 167*f*, 703
bombas de hidrógeno, 257
clasificación de proteínas, 723, 732, 732*f*
funciones, 732, 733
primario, 167, 167*f*
secundario, 167, 167*f*
Listeria monocytogenes, movimiento celular, 789, 789*f*
Locomoción celular, 15, 79, 800
actina, 79, 79*f*, 789, 789*f*, 790*f*. Véase también *Filamentos de actina*
adhesiones del sustrato celular, 801*f*, 802
ameboide, 803
ATPasas, 80*c*, 81, 81*f*
en el cáncer, 937
cinesina, 79, 80*c*, 80*f*, 82, 791, 831, 833*c*, 835*f*
citoesqueleto, 15. Véase *Filamentos*
en el complejo f0F1, 79
cooperativa, 834, 835*f*
desadhesión, 801*f*, 802
dincínas, 79, 80*c*, 80*f*, 82, 791, 833, 833*c*, 835*f*
direccionalidad, 803
extensión de la membrana, 789*f*, 801, 801*f*
en la extravasación de los leucocitos, 227, 228*f*
factores de crecimiento, 803
fibroblasto, 803, 804*f*
fuentes de energía, 79, 80*c*
hialuronano, 219
en infección, 789, 789*f*
integrina, 225
mecanismos, 79, 80*c*, 800
microtúbulos, 79, 79*f*, 817
miosina, 79, 80*c*, 80*f*, 81, 81*f*, 791
pasos, 801, 801*f*
polaridad celular, 800, 803
procesos generadores de fuerza, 801, 801*f*, 803
proteínas motoras, 59, 60*f*, 79, 79*f*, 80*c*, 779, 791
queratinocito, 789*f*, 801, 801*f*, 802*f*
quimotáctica, 804, 805*f*
ribosomas, 80*c*
señalización, 803, 804*f*, 805*f*
tipos, 791
transiciones sol-gel, 803, 805
translocación del cuerpo celular, 801*f*, 802
en el transporte
axonal, 829
de carga, 79, 80*f*
Locus MAT, 471
en la conversión del tipo de apareamiento, 920, 920*f*, 921*f*
en la especificación del tipo celular, 910, 911*f*

Longitud de onda, de luz, 333
Lrp, 642, 643
LTPB, 574
Luciferasa, ensayos enzimáticos, 92
Lumen del tilacoide, 331, 332*f*
Luz, 147
celular, 147
estomacal, acidificación, 275, 276*f*
propiedades, 333
LXR, en el metabolismo lipídico, 766

M

M6P (manosa 6-fosfato), en el direccionamiento de proteínas, 721, 722*f*, 728
Macrófago(s)
en aterosclerosis, 768, 768*f*, 769*f*
en la inflamación, 768
Macromoléculas, 9, 30*f*
Macronúcleo, 435
Mad2, 887*f*, 888
Maduración meiótica, de los ovocitos, 859, 859*f*
Maíz, elementos móviles, 416
mAKAP, 554
Malaria. Véase *Paludismo*
MAM1, 892
Manosa
estructura, 41*f*, 42
6-fosfato, en el direccionamiento de proteínas, 711*c*, 721, 722*f*, 728
MAP cinasa(s), 825
activación, 594, 594*f*, 597
en la cascada de cinasas, 66*c*, 593
estructura, 594*f*
en levadura, 596, 596*f*, 597*f*
proteínas
G, 596, 596*f*
plataforma (*scaffold*), 596*f*, 597
en la señalización, 572*c*, 594
en la superfamilia MAP, 597
en la transcripción, 595, 595*f*
MAP1, 824,824c,825
MAP2, 824,824c
MAP4, 824,824c,825
Mapa de ligamiento. Véase *Mapeo genético*
Mapeo genético, 396
de genes relacionados con enfermedades, 396, 398
polimorfismos de DNA, 396, 397*f*
Máquinas moleculares, 59, 66, 66*c*, 97
Marca de expresión de secuencia, 384
Marcación
de afinidad, de receptores, 539
con epítopos, 379, 380*f*
de genes mediante inserción de mutaciones, 376
con GFP, 188, 188*f*
Marcadores
genéticos, 395
moleculares, 396
Marcos de lectura, 120, 121*f*, 383, 388
abiertos (ORF), 383, 388
en LINE, 420, 420*f*, 421, 421*f*
Masa
celular interna, 906, 906*f*
vs. densidad, 87
Matriz
extracelular, 15, 198*f*, 199
colágeno, 210*f*, 211, 216, 216*c*, 217*f*, 218*f*
conexión al citoesqueleto, 222*f*, 223
estructura, 198*f*
evolución, 201
fibronectinas, 220, 221*f*, 222*f*
funciones, 201, 209, 224
glucosaminoglucanos, 213, 213*f*, 215*f*
hialuronano, 213*f*, 214, 217, 219, 220*f*
interacciones adhesivas. Véase también *Adhesión célula-matriz*
con el citoesqueleto, 223
en el tejido
epitelial, 198, 198*f*, 199*f*, 201, 208, 209, 214, 221
no epitelial, 223, 224*f*, 225*f*
lámina basal, 210, 210*f*
laminina, 210*f*, 211, 212, 213*f*
en las plantas, 234, 234*f*
proteínas, 201
multiadhesivas, 209, 210*f*, 211, 212, 213*f*, 220
proteoglucanos, 209, 210*f*, 213, 213*f*, 217, 218, 219, 220
receptores de adhesión, 211, 219, 222*f*, 223
en el tejido
conectivo, 217
epitelial, 209
no epitelial, 216
mitocondrial, 307, 307*f*, 309
nuclear, 503
peroxisómica, 683
Maturasas, 503
MCAK, 833*c*, 841, 842*f*, 846
McClintock, Barbara, 414, 416
MCM1, en la diferenciación del tipo celular, 910, 911*f*, 912*f*
Mdm2, p53, 960
MDR2, 259
Mecanismo
de acción de antibióticos, 441
de cambio de afinidad de unión, en la síntesis de ATP, 327, 328*f*
Medias reacciones, 55
Medio
HAT, 238
para aislamiento de células híbridas, 239
de selección, 238
de cultivo, 235
HAT, 238, 239
selección, 238
Medusa, proteínas fluorescentes, 188
Meiosis, 18, 18*f*, 890, 891*f*. Véase también *Ciclo celular*
entrecruzamiento, 396, 396*f*, 891, 891*f*
desigual, repetición de DNA de secuencia simple, 413, 413*f*
maduración de ovocitos, 859, 860*f*
pasos, 354*f*
recombinación, 396, 396*f*
represión de la replicación del DNA, 890
segregación, 355, 355*f*
sinapsis, 396, 396*f*
MEK cinasas, 503*f*, 593, 594, 597
Melanoma
cadherina E, 205
maligno, cadherina E, 205
Membrana(s), 147
acoplamiento/fusión de la vesícula, 711, 712*f*
apical, 153
distribución de proteína, 726, 726*f*
área de la superficie, 147, 148*f*
bacteriana, 680
basal, 198*f*, 211
colágeno, 211. Véase también *Colágeno*
glomerular, 212
lámina basal, 211
base glomerular, 212
basolateral, 153
distribución de proteína, 726, 726*f*
bicapa fosfolipídica, 13, 13*f*, 149
brotación de la vesícula, 707, 708*f*
cara
citosólica, 150, 150*f*
exoplasmática, 150, 150*f*
características generales, 147
celular. Véase *Membrana(s)*
cloroplasto, 172, 172*f*, 683
composición lipídica, 149, 153*c*. Véase también *Lípidos de membrana; Bicapa fosfolipídica*
conexiones a los microfilamentos, 176, 176*f*
degradación lisosómica, 167, 167*f*
difusión, 152, 152*f*. Véase también *Transporte de membrana*
energía, 50, 246
facilitada, 247, 248, 248*c*
pasiva (simple), 246, 246*f*, 248, 248*c*
uniones estrechas, 207, 207*f*
velocidad, 246
eritrocito, 176, 176*f*, 177
acuaporinas, 273
adhesiones citoesqueléticas, 176, 176*f*, 177, 791
propiedades funcionales, 251, 251*f*
transporte de glucosa, 248, 249*f*
estructura, 13, 13*f*, 149, 149*f*, 150*f*
extensión, en el movimiento celular, 801, 801*f*
fluidez, 14, 154, 154*f*
formas, 149, 149*f*
fusión vesicular, 712, 712*f*, 714*f*
de Golgi, 150*f*, 153, 153*c*, 169, 170*f*
componentes lipídicos, 153, 153*c*
superficies, 150, 150*f*

Membrana(s) *(Cont.)*
hojuelas, 45, 149, 153*c*
contenidos lipídicos, 155, 156*f*, 208
interno, 147, 148*f*, 165, 166*f*
de miclina, 149, 149*f*, 153*c*
mitocondrial, 150*f*, 153*c*, 171, 172*f*, 307, 307*f*, 683
componentes lipídicos, 153*c*
superficies, 150, 150*f*
nucleares, 150, 150*f*, 171, 509, 509*f*, 810
láminas, 810
superficies, 150, 150*f*
transporte a través, 509. Véase también *Transporte nuclear*
núcleo hidrófobo, 149
orgánulo, 147, 148*f*, 150, 165, 166*f*
en la síntesis de ácidos grasos, 747
permeabilidad, 149, 164, 164*f*, 246, 246*f*
al agua, 271, 271*f*, 273*f*
plasmática, 13, 13*f*, 147
componentes lipídicos, 153*c*. Véase también *Lípidos de membrana*
estructura, 13, 13*f*, 150, 150*f*
fositas (invaginaciones) recubiertas de clatrina, 165, 167*f*
funciones, 164
métodos de ruptura, 180
permeabilidad, 149, 164, 164*f*, 246, 246*f*, 271, 271*f*, 273*f*
en plantas, 164
síntesis, 747
en procariontes, 2, 3*f*, 147
superficies, 150, 150*f*, 153
uniones
celulares, 164
estrechas, 198*f*, 206, 207*f*
de hendidura, 229
retículo endoplasmático, 150*f*, 153, 153*c*, 168
semipermeable, como capacitor, 262
síntesis, mediante la expansión de la membrana, 745
soporte citoesquelético, 173, 173*f*. Véase también *Citoesqueleto*
superficie, 150, 150*f*, 153
apical, 153
clasificación de proteínas, 726, 726*f*
basolateral, 153
clasificación de proteínas, 726*f*, 727
tilacoide
como sitio de fotosíntesis, 331, 332*f*
estructura, 331, 332*f*
gradiente de pH, 333
transporte de proteínas, 691, 692*f*
tipos, 149, 153*c*
transporte de proteínas. Véase *Direccionamiento de proteínas; Transporte de proteínas*
vacuolar, 170, 252*f*, 257, 270, 270*f*
variabilidad, 149, 149*f*
viscosidad, 153, 154, 154*f*
Memoria, control traduccional, 520
Meristemas, 232, 234, 637
brote apical, 905, 905*f*
células madre, 905, 905*f*
destinos celulares, 905, 905*f*
Mesodermo, 623
destinos celulares, 906, 906*f*
Metabolismo
de glucosa/glucógeno, 16, 16*f*, 304, 313. Véase también *Glucólisis*
adrenalma, 547
aerobio, 301, 304, 305*f*, 306*f*, 307, 308*f*, 309, 310*f*
anaerobio, 305, 306*f*
cAMP, 550, 552*f*, 553
ciclo del ácido cítrico, 309, 310, 310*f*
en la contracción muscular, 305
en la diabetes mellitus, 619
fermentación, 305, 306*f*
glucagón, 619
glucólisis, 304, 305*f*, 310, 311*c*, 314, 314*f*
hipoxia, 619
insulina, 16, 600, 618, 618*f*
oxidación de NADH, 306*f*, 309, 311, 311*f*, 312
producción de NADH, 54*f*, 55, 304, 305, 309, 310, 311*f*
producción de piruvato, 304, 305, 305*f*, 314, 314*f*
receptor de insulina, 16, 600, 618, 618*f*
regulación, 617, 617*f*
enzimática, 314, 314*f*
hormonal, 314
proteinacmasa A, 550
segundos mensajeros, 617, 617*f*
respiración celular, 306*f*, 307, 309
señalización, 16, 551, 552*f*, 617, 617*f*
en la síntesis de ATP, 304, 313
velocidad, 313
lipídico
proteínas de unión a SER, 764, 764*f*, 765*f*
receptores nucleares, 766
regulación por retroalimentación, 763, 764*f*, 765*f*
vía insig-1(2)/SCAP/SREBP, 765, 766
en *Drosophila*, 766
óseo, 606, 606*f*
Metafase, 838, 839*f*, 843, 844*f*, 845*f*, 854
en plantas, 848, 849*f*
Metarodopsina II, 556
Metástasis, 937
Metilación, 70, 70*f*
Metionil-tRNA$_i^{Met}$, 125, 127
Metionina, 38, 39*f*, 40. Véase también *Aminoácido(s)*
codón de inicio AUG, 120, 120*c*, 125, 126*f*
Métodos
de purificación
para células, 178. Véase también *Purificación celular*
para las uniones de hendidura, 229
para proteínas, 86. Véase también *Purificación proteica*
de Sanger, 372, 373*f*
de terminación de la cadena o dideoxi, 372, 372*f*, 373*f*
Metotrexato, en el direccionamiento mitocondrial de proteínas, 686, 687*f*
Mevalonato, 751, 751*f*
Mg^{2+}, concentraciones típicas, 253*c*
Micelas, 45, 45*f*, 755
detergente, 182
Micro RNA (miRNA), 518, 909
Microfibrillas
de celulosa, en la pared celular de las plantas, 232, 232*f*
de colágeno, 218*f*, 219
Microfilamentos, 779, 805. Véase también *Filamentos de actina: Miosina*
Microsatélites, 397, 412
Microscopia
de barrido electrónico, 184*f*, 192, 192*f*. Véase también *Microscopia electrónica*
de campo brillante, 184, 185*f*, 187*f*
compuesta, 20
resolución, 184, 185*f*
de contraste
de fase, 186, 187*f*
de interferencia diferencial, 186, 187*f*
crioelectrónica, 95, 191. Véase también *Microscopia electrónica*
de deconvolución, 189, 190*f*
electrómca, 20, 184, 190, 191*f*
barrido, 192, 192*f*
crioelectrónica, 95, 191
obtención de imágenes digitales, 192
sombreado metálico, 192, 192*f*
tamaño de los objetos, 184*f*
tinción de especímenes, 190, 191*f*
transmisión, 190
epifluorescencia, 185*f*
fluorescencia, 184*f*, 185*f*, 187, 187*f*, 188*f*
confocal, 189, 189*f*
desconvolución, 189, 190*f*
marcación con GFP, 188, 188*f*
de proteínas VSV G, 704, 704*f*
de la vía secretoria, 704, 704*f*
de interferencia de Nomarski, 186, 187*f*
obtención de imágenes digitales, 192
óptica, 20, 184
de campo brillante, 184, 185*f*, 187*f*
de contraste
de fases, 186, 187*f*
por interferencia diferencial, 186, 187*f*
epifluorescencia, 185*f*
fluorescencia, 184*f*, 185*f*, 187, 187*f*, 188*f*
confocal, 189, 189*f*
deconvolución, 189, 190*f*
marcación con GFP, 188, 188*f*
de las proteínas G del VSV, 704, 704*f*
de la vía de secreción, 704, 704*f*
formación de imagen digital, 192
de interferencia de Normarski, 186, 187*f*
preparación de muestras, 185, 185*f*
resolución, 184
tamaño del objeto, 184, 184*f*
preparación de especímenes, 185, 185*f*
resolución, 184
tamaño del objeto, 184, 184*f*
Microscopios
componentes, 20, 184, 184*f*, 185*f*
electrónicos, 20, 190, 191*f*
resolución, 184
Microsomas rugosos, 660, 660*f*
Microtubulina, organización de la tubulina, 819, 819*f*
Microtúbulo(s), 15, 15*f*, 173*f*, 174, 174*c*, 175*f*, 178*f*, 817
acortamiento, 821, 822*f*, 845, 846*f*
adhesión cromosómica, 841, 842*f*
análisis microscópico, 818*f*
en el aparato mitótico, 838, 839, 841*f*
astrales, 840, 841*f*, 843, 843*f*
axonémico, 833*c*, 836, 836*f*
centríolo, 825, 826*f*
centrosoma, 825, 826*f*. Véase también *Centrosoma(s)*
de los cinetocoros, 840, 841, 841*f*
acortamiento, 845, 846*f*
adhesión de los cromosmas, 841, 842*f*, 845
captura de cromosomas, 841, 842*f*, 843
colchicina, 825
componentes, 819, 819*f*
crecimiento en una sola dirección, 821
definición, 817
desensamblaje, 820, 820*f*, 822*f*, 825, 845, 846*f*
ensamblaje, 820
pasos, 821, 821*f*
regulación, 823
entrecruzamiento con filamentos intermedios, 806*f*, 810, 810*f*
espaciamiento, 824, 824*f*
estabilidad, regulación, 823
estable, 819
estructura, 818, 818*f*, 819, 819*f*
en flagelos, 829, 835, 836*f*
formación del casquete, 845
haces y retículos, 824*c*, 825
huso, 819, 840, 840*f*, 843, 844*f*
inestabilidad dinámica, 819, 822, 822*f*, 844*f*, 845
inestable, 819, 821, 822*f*
en la mitosis, 20, 20*f*, 840, 840*f*, 843, 844*f*
movimiento celular, 79, 79*f*
en la organización
del complejo de Golgi, 828, 828*f*
organular, 828, 828*f*
vesicular, 828, 828*f*
orientación, 177, 820, 825, 826*f*
en plantas, 848
polar, 840, 843, 843*f*
en el huso mitótico, 843
polaridad, 177, 820, 821*f*, 829
polimerización/despolimerización, 817
proteínas
MAP, 823
motoras, 829. Véase también *Dineína(s); Cinesinas*
subunidades, 819, 819*f*
taxol, 825
transporte axónico, 829, 829*f*
en el transporte
de orgánulos, 828
vesicular, 716, 828
unión
cruzada, 824, 825
a los filamentos intermedios, 806*f*, 810, 810*f*, 824
velocidad de crecimiento, 821, 822, 822*f*
Microvellosidades, 173*f*
epiteliales, 198*f*, 202, 203*f*, 274
haces de actina, 176
Minisatélites, en huellas dactilares de DNA, 413, 413*f*
Mioblastos
determinación, 914, 914*f*, 917, 917*f*
diferenciación terminal, 916
localización de mRNA, 523
migración, 917, 917*f*
Miocitos. Véase *Células musculares*
Miofibras, 797, 797*f*. Véase también *Células musculares*
Miofibrillas, 797F
estructura, 797*f*
sarcómeros, 797, 797*f*
Miogénesis, 913
ciclinas, 917
cinasas dependientes de ciclina, 917
especificación celular y diferenciación, 913
etapas, 914, 914*f*
factores de transcripción, miogénico, 914, 915*f*
genes, 914, 915*f*
liso, contracción, 799, 799*f*
óxido nítrico, 564, 564*f*, 771
proteína Id, 916
remodelación de la cromatina, 916
señalización, 917, 917*f*
termogenina, 330
vs. neurogénesis, 918, 918*f*
en *Drosophila*, 649
Miogenina, 915, 918
Mioglobina
estructura, 67, 67*f*
evolución, 67, 67*f*
Miosina
activación mediada por Rho cinasa, 800
en la citocinesis, 796, 796*f*
en la contracción muscular, 81, 81*f*, 791, 797, 797*f*
definición, 780
dominios
cabeza, 81, 81*f*, 793
cola, 81, 81*f*, 792*f*, 793
del cuello, 81, 81*f*, 793, 794
estructura, 81, 81*f*, 791, 792*c*
factor promotor de la mitosis, 848*f*
en el flujo citoplasmático, 795, 795*f*
fosforilación, en la mitosis, 848, 848*f*
funciones, 791
en los haces contráctiles, 796, 796*f*
isoformas, 791
LC cinasa, 799, 799*f*
localización, 796, 796*f*
en el movimiento celular, 79, 80*c*, 80*f*, 81, 81*f*, 791
cinesinas, 835, 835*f*
movimiento a lo largo de los filamentos de actina, 79, 80*c*, 80*f*, 81, 81*f*, 793
en la orientación del huso, 923
en plantas, 791
que "caminan", 80*f*, 81, 82*f*, 793
regulación, del Ca^{2+}, 793
en sarcómeros, 797, 797*f*
tamaño del paso, 794
tasa de rendimiento, 795
en el transporte vesicular, 794, 795*f*
en las uniones celulares, 203, 203*f*
Miotomo, 914, 914*f*
Miotubos, 914, 914*f*
producción, 914, 914*f*
miRNA (micro RNA), 518, 909
Mitocondria, 166*f*, 171, 172*f*
en aves, 301*f*
crecimiento y división, 683
direccionamiento de proteínas, 658*f*, 683, 684*f*, 685*f*, 687*f*. Véase también *Direccionamiento de proteínas, a la mitocondria*
edición del RNA, 508
estructura, 307, 307*f*, 683
evolución, 302, 303*f*, 438, 683
oxidación
de ácidos grasos, 301, 308*f*, 309, 312, 312*f*
aerobia, 301, 308*f*, 309
respiración celular, 306*f*, 307, 309
síntesis
de ATP, 14, 301, 302, 308*f*, 309
de proteínas, 683
Mitógenos, en la regulación del ciclo celular, 882, 957
Mitosis, 17, 18, 20*f*, 838, 854. Véase también *Ciclo celular*
alineamiento del cromosoma, 839*f*, 841, 856
anafase, 838, 839*f*, 845, 846*f*, 854
aparato mitótico, 838, 839, 841*f*
captura del cromosoma, 841, 842*f*, 843
ciclo del centríolo, 841, 842*f*

Mitosis *(Cont.)*
cinesina, 833, 833*c*, 843, 843*f*
cinetocoro, 435, 840, 841, 841*f*, 842*f*
citocinesis, 839*f*, 847, 848, 854, 873
actividad constitutiva de la fosfatasa, 873
anillo contráctil, 796, 848
definición, 847, 854
etapas, 839*f*
localización de la miosina, 796, 796*f*
plano de escisión, 847*f*, 848, 874
en plantas, 848, 849*f*
condensación del cromosoma, 20, 20*f*, 839*f*, 845
definición, 838
descondensación del cromosoma, 854, 862, 870
despolimerización de lamina, 868*f*, 869, 869*f*
duplicación del centrosoma, 841, 842*f*
duración, 838, 854
entrada. Véase también *Ciclo celular, regulación*
Cdc25, 867
CDK1, 885
ciclina B, 860*f*, 861, 862*f*, 863, 863*f*, 865. Véase también *Factor promotor mitótico (MPF)*
errores, 839
estabilización de cromosomas, 844*f*, 845
etapas, 838, 839*f*
factor(es)
promotor de la mitosis (MPF)
prematuro, 886
en *S. pombe*, 865, 866*f*
Wee1, 867
difusibles inductores, 856, 857*f*
formación del huso, 839*f*, 843, 844*f*
fosforilación de la miosina, 848, 848*f*
fragmentación del envoltorio nuclear, 862, 868, 868*f*, 869*f*
interfase, 839*f*, 854, 856, 857*f*
en levaduras, 840
metafase, 838, 839*f*, 843, 844*f*, 845*f*
microtúbulos, 20, 20*f*, 840, 840*f*, 843, 844*f*
migración
del centrosoma, 839*f*
de cromosomas, 20, 20*f*, 839*f*, 845, 846*f*
movimiento en una sola dirección, 821, 844*f*, 845
observación, 20, 20*f*
pasos, 354*f*
en plantas, 848
profase, 838, 839*f*, 843, 843*f*
prometafase, 839*f*
regulación. Véase *Ciclo celular*
replicación del centrosoma, 839*f*
salida, 860*f*, 861, 862*f*, 863*f*, 888. Véase también *Ciclo celular*
cdc14, 879
ciclina B, 862
complejo promotor de la anafase, 855*f*, 856, 862, 863*f*, 872, 872*f*
separación del centrosoma, 839*f*, 841, 843*f*
telofase, 838, 839*f*
Modelado
anteroposterior, 629, 630*f*, 631*f*
dorsoventral, 627, 627*f*, 628*f*, 651
de tejido. Véase *Modelado*
Modelo
de cintas
de anticuerpos, 74*f*
de proteínas, 62, 63*f*, 74*f*
de esferas y barras, 62, 63*f*
de filamentos deslizantes, de la contracción muscular, 798, 798*f*
de propulsión elástica browniana, 801*f*, 802
modificación proteica, 673
Moho. Véase también *Hongos*
funciones, 6
Molécula(s)
de adhesión celular (CAM), 15, 198, 198*f*, 199*f*
aglomeración, 198, 198*f*, 200
análogos de plantas, 234, 234*f*
cadherinas, 199, 199*f*, 204
en cultivo celular, 236
diversidad, 201
dominios, 199*f*
evolución, 201
familias, 199, 199*f*
integrinas, 199, 199*f*, 208
interacciones, 200, 200*f*
intercelular, 227
interconexiones, 15
isoformas, 201
y oligosacáridos, 675
repetición, 200
selectinas, 199, 199*f*
superfamilia de las IgG, 199, 199*f*, 207, 227
unión
heterófila, 199*f*, 200
homófila, 199*f*, 200, 204
en las uniones celulares, 200
de agua, dipolares, 32, 32*f*
anfipáticas, 29, 63, 64*f*
celulares de adhesión neural, 227
de DNA, tamaño, 103
hidrófila, 29, 34
hidrófoba, 29, 35, 35*f*
de señalización, 16, 16*f*, 59, 60*f*, 533
acción integrada, 649
agrupamiento, 543
en caveolina, 543
como ligandos, 533
desactivación, 544
dominios
PTB, 579, 584
SH2, 579, 580*f*, 584, 585*f*
identificación, 574
intracelular, 542
oncogenes codificantes, 953
receptores, 533
segundos mensajeros, 541
solubilidad, 33
tamaño, 30*f*, 47
transporte, 53
unión, 36, 36*f*, 47
Monómeros, 9
unión, 37, 37*f*
Monopolina, 892
Monosacáridos, 37*f*, 41, 41*f*
Morfógeno, 623, 624
Moscas de la fruta. Véase *Drosophila*
Motivos, 63, 64*f*. Véase también *Tipos específicos*
bases de datos, 381
dedos de cinc, 463, 464*f*
en dominios de unión al DNA, 463
de espiral enrollada, 63, 64*f*, 465
hélice-bucle-hélice, 63, 64*f*, 84
hélice-giro-helice, 463
homeodominio, 463
KH, 495
proteicos, 63, 64*f*, 381, 382*f*. Véase también *Tipos específicos*
bases de datos, 381
en los dominios de unión al DNA, 463, 463*f*, 465*f*
en la secuenciación de proteínas, 381, 382*f*
de unión a lípidos, 162, 163*c*, 163*f*, 177
de reconocimiento del RNA (RRM), 495, 495*f*
RNP, 495, 495*f*
en la secuenciación de proteínas, 381, 382*f*
de unión
a lípidos, 162, 163*c*, 163*f*, 177, 754*f*
al RNA, 495, 495*f*
Motores
cápside viral, 80*c*
moleculares, 79, 80*c*
Movimiento browniano, 79
MPF cinasa, 859, 859*f*, 860*f*
ciclina B, 860*f*, 861, 862*f*, 863*f*
MreB, 174*c*, 175
mrf4, 915
mRNA. Véase *RNA mensajero (mRNA)*
circular, 130, 130*f*, 131*f*
materno, 629
monocistrónico, 406
policistrónico, 406
viral, transporte nuclear, 515, 516*f*
mRNP, 509
anillo de Balbiani, 509, 516*f*
exportación nuclear, 515, 516*f*
transporte nuclear, 514, 514*f*, 516*f*
MSP, 174*c*
mtDNA. Véase *DNA mitocondrial*
Muerte celular, 924
programada, 18, 19*f*, 900, 924, 930. Véase también *Apoptosis*
Muesca en el DNA, 106, 107*f*
Músculo
cardíaco
catión antiportador, 269
proteínas de anclaje, 554, 555*f*
receptores muscarínicos para acetilcolina, 556, 556*f*
desarrollo, 913. Véase también *Miogénesis*
esquelético. Véase *Músculo*
liso
arterial, relajación, óxido nítrico, 564-565, 564*f*
contracción, 799, 799*f*
metabolismo anaerobio de la glucosa, 305, 306*f*
Mutación(es)
Shaker, defectos en los canales del K^+, 282, 283
autosómicas
dominantes, causantes de enfermedad, 395, 395*f*
recesivas, causantes de enfermedad, 395, 395*f*
de células somáticas, 414
condicionales, 356
rastreo o screening, 356, 356*f*
de corrimiento del marco de lectura, 120, 353, 354
en los LINE, 421
específicas de genes, 22
de ganancia
de función, 353
en el cáncer, 944, 944*f*, 945*f*
indiferentes, 13
K-ras, en el cáncer de colon, 943
letales
identificación, 356, 356*f*
sintéticas, 360, 360*f*, 388
de la línea germinal, 13
NF1, en la neurofibromatosis, 381
oncogénicas. Véase *Cáncer, mutaciones*
de pérdida de función, 353
en el cáncer, 946
puntuales, 353, 962*f*, 963
en el cáncer, 944, 944*f*, 945*f*, 962*f*, 963
identificación, 398
recesivas, 353, 865
identificación, 357
prueba de complementación, 357, 358*f*
segregación, 355, 355*f*, 356*f*
sensibles a la temperatura, 22, 356, 356*f*, 857
sin sentido, 353
con sentido erróneo, 353
sintéticas letales, 360, 360*f*, 388
SMN1, en la atrofia muscular espinal, 501
supresoras, 359, 360*f*
wee, 864, 865, 866*f*
Mutágenos, 22, 352, 353
carcinógenos, 963
sulfonato de etileno, 353
Mutantes
bobbed, 412
dobles, en el análisis de la vía de señalización, 359, 359*f*
heterocrónicos, 908
mutaciones, 421
análisis genético, 22, 352
autosómicas
dominantes, 395, 395*f*
recesivas, 395, 395*f*
en cáncer, 944, 944*f*, 945*f*
causantes de enfermedades, 13, 28. Véase también *Enfermedades genéticas*
identificación, 396
en células somáticas, 13, 414
condicional, 356
búsqueda, 356, 356*f*
conservación evolutiva, 27
de corrimiento del marco de lectura, 120, 353
en LINE, 421
daño del DNA, 961
definición, 352
determinación del gen involucrado, 357, 358*f*, 408
doble, en el análisis genético, 358, 359*f*
dominante, 353, 865
negativo, 353, 584
oncogénico, 960
segregación, 355, 355*f*, 356*f*
efectos
evolutivos, 13
fenotípicos, 353, 353*f*
específicas de genes, 22
en los exones, 407, 407*f*
ganancia de función, 353
herencia, 13
indiferentes, 13
inserción, 376
en los intrones, 407, 407*f*
letales
identificación, 356, 356*f*
línea germinal, 13
mapeo, 396
oncogénicas. Véase *Cáncer, mutaciones*
pérdida de función, 353
en el cáncer, 946
pruebas de complementación, 357, 358*f*, 408
puntuales, 353, 962*f*, 963
en el cáncer, 944, 944*f*, 945*f*, 962*f*, 963
identificación, 398
rastreadoras de ligadores (*linker scanning mutations*), 455
rastreos genéticos, 356, 356*f*
recesivas, 353, 865
identificación, 357
pruebas de complementación, 357, 358
segregación, 355, 355*f*, 356*f*
en las regiones de control de la transcripción, 407, 407*f*
segregación, 355, 355*f*, 356*f*
sensible a la temperatura, 22, 356, 356*f*, 857
sin sentido, 353
con sentido erróneo, 353
sintéticas, 360, 360*f*, 388
supresoras, 359, 360*f*
sec, 706, 706*f*
de levadura, 706, 706*f*
de secreción (sec), en la vía secretoria, 706, 706*f*
shi, vesículas sinápticas, 738
singed, 783

N

myf5, 915
myoD, 915, 916
N-Acetilgalactosamina, 213, 213*f*
N-Acetilglucosamina, 213, 213*f*
NADH
en la cadena respiratoria, 310
en el ciclo del ácido cítrico, 310, 310*f*
formación, 306*f*, 309, 310*f*
oxidación a NAD^+, 306*f*, 309, 311, 311*f*
producción, 54*f*, 55, 304, 305, 309, 310*f*, 311*f*
transferencia de electrones, 317, 318*f*
$NADP^+$/NADPH, en la fotosíntesis, 333, 338*f*, 339
NAD^+
en el ciclo del ácido cítrico, 310, 310*f*
como transportadores de electrones, 54*f*, 55, 304
formación, 306*f*, 309, 310*f*
en la glucólisis, 304, 305*f*
producción, 306*f*, 309, 311, 311*f*
reducción a NADH, 306*f*, 309, 310*f*, 311*c*
Nanos, 631, 631*f*
Ncd, 833, 833*c*
Necrosis, 924
Nematodos. Véase *Caenorhabditis elegans*
Nervio(s)
especificación del tipo celular, 918, 918*f*, 919*f*
vaina de mielina, 284, 285*f*
Neuraminidasa, secuencia de señalización-anclaje, 669
Neurexinas, 226
Neuritas, 925
Neuroblastos, 918, 918*f*, 920, 920*f*
Neurofibromatosis, 381
Neurofilamentos, 806*f*, 807, 807*c*. Véase también *Filamentos intermedios*
unión a microtúbulos, 806*f*, 810, 810*f*
Neurogénesis, 918, 919*f*
células madre de los ganglios, 921, 921*f*, 923
complejo(s)
apical, 922, 922*f*
Bax/Par6/PKC3, 922, 922*f*

Neurogénesis *(Cont.)*
basales, 922, 922*f*
división celular asimétrica, 921, 921*f*
neuroblastos, 918, 918*f*, 920, 920*f*
señalización, 647, 651, 652*f*
en *Drosophila*, 921, 921*f*
Neurogenina, 918, 919*f*
Neuronas
adenilación citoplasmática, 520
axones, 276, 277*f*
control de traducción, 520
corte y empalme, 507, 507*f*
crecimiento, factores tróficos, 925
cuerpo celular, 276, 277*f*
dendritas, 277, 277*f*
desarrollo, 918, 918*f*, 919*f*
en la señalización, 647, 651, 652*f*
estructura, 276, 277*f*
mielinizadas, 284, 285*f*
morfología, 277*f*
potencial
de reposo, 276
de acción, 276. Véase también *Potencial de acción*
redes, 294
tamaño del campo de direccionamiento, 925, 926*f*
transporte axónico, 829, 829*f*
uniones de hendidura, 230
vaina de mielina, 149, 149*f*, 153*c*
Neuropatía óptica hereditaria de Leber, 442
Neuroespora, DNA mitocondrial, 441*c*
Neurotransmisor(es), 9, 276, 277, 287. Véase también *Neurotransmisores específicos*
agrupamiento, 543
aminoácidos, 288, 288*f*
exocitosis, 288, 736, 737*f*
inactivación, 290
nucleótidos, 288
receptores. Véase también *Receptor(es), superficie celular*
acoplados a la proteína G, 287
canales iónicos, 555
excitador, 293
inhibidor, 293
receptor nicotínico de acetilcolina como modelo, 287
reciclaje, 289
secreción, 288, 289*f*, 736
potencial de acción, 289, 736
regulada, 735, 737*f*
en la señalización, 290, 535. Véase también *Señalización*
transporte, 287, 288
en las vesículas sinápticas, 288
Neurotrofinas, 925, 926, 926*f*
estudios *knockout*, 926, 927*f*
receptores, 926, 926*f*, 927*f*
NF-κB, factor de transcripción, 573*c*, 574, 601, 602*f*
Nidógeno, 210*f*, 211
Niemann-Pick C1 (NPC1), 641, 753, 753*f*
No disyunción cromosómica, 887, 887*f*
en cáncer, 947, 948*f*
Nodos de Ranvier, 286, 286*f*
Noradrenalina. Véase también *Neurotransmisor(es)*
estructura, 288*f*
Northern blotting (Transferencia Northern) , 377, 377*f*, 614
en enfermedades genéticas, 398
NPC1, 641, 753, 753*f*
NSF, en la fusión vesicular, 713
NtrB/C, en la transcripción, 117, 118
Nucleares, 171
Núcleo, 166*f*, 171, 171*f*
del cigoto, 858
subestructura, 171, 172*f*, 503
Nucleocápside, 137
Nucléolo, 171, 171*f*
pre-rRNA, procesamiento, 525
Nucleoplasma, 171
Nucleoporinas, 509, 509*f*, 515
fosforilación, 870
Nucleoporinas FG, 510, 511*f*, 514, 515
Nucleósidos, 40, 41*c*
Nucleosomas, 471. Véase también *Cromatina*
en la cromatina
condensada, 425, 425*f*, 426*f*
de forma extendida, 424, 425*f*
definición, 424
estructura, 424, 425*f*
Nucleótido(s), 10, 10*f*, 40, 40*f*, 41*c*, 102. Véase también *Base(s)*
en el código genético. Véase *Código genético*
direccionalidad, 103, 103*f*
en el DNA mitocondrial, 441, 441*c*
enlaces fosfodiéster, 103, 103*f*
estructura química, 37*f*
neurotransmisor, 288
Nudo de cisteína, 575, 575*f*
NuMA, 834

O

Objetos biológicos, escala, 19*f*, 20
Ocludina, 206*f*, 207
Octilglucósido, 182, 183*f*
Oftalmoplejía, externa progresiva crónica, 442
Oleato, 44*f*
Oligodendrocitos, 285
Oligosacáridos
en la adhesión intercelular, 675
estabilidad proteica, 674
estructura, 673, 673*f*
funciones, 674
inmune, 675
en la glucosilación de proteínas, 673, 675
N-ligados, 214, 704
estructura, 673, 673*f*
funciones, 674
síntesis y procesamiento, 673, 673*f*, 675*f*, 704, 705*f*, 723
O-ligados, 226, 673, 675
en la glucosilación de proteínas, 673, 675
en el plegamiento de proteínas, 674, 674*f*
síntesis y procesamiento, 673, 673*f*, 704, 705*f*, 723
Oligosacariltransferasa, en la síntesis de oligosacáridos, 674
Omatidio, 590, 590*f*
Oncogén(es)
bcl-2, 927
bcr-abl, 954
codificantes
de factores de transcripción, 955
de proteínas transductoras de señales, 953
de receptores de factor de crecimiento, 951
cooperación, 941
crk, 953
definición, 940
formación, 944
fos, 955
jun, 955
mutaciones, 941. Véase también *Cáncer, mutaciones*
con ganancia de función, 944
heredadas, 946
con pérdida de función, 946
producción, 941, 944, 955, 956
ras, 939*f*, 940, 953
sis, 951
trk, 952, 952*f*
v-src, 945, 946
virales, 945
Oncogénesis, 935
Oncoproteínas, 944
abl, 954
como activadores virales de los receptores del factor de crecimiento, 953, 953*f*
Ras, 953
Smad, 577
Src, 954, 954*f*
Op 18, 824*c*, 825
Operador lac, 115, 116*f*
Operón, 111
lac, 115, 116*f*
transcripción, 111, 112*f*, 115, 116*f*
trp, 116
Opsina
activada, 556
fosforilación, 560, 560*f*
ORC, en la replicación del DNA, 135
ORF1/2, en LINE, 420, 420*f*, 421, 421*f*
Organismos
diploides, 353
experimentales, 24, 25*f*
haploides, 353
de tipo silvestre, 352
Órganos, definición, 197
Órgánulo(s), 3, 3*f*, 165
en células de plantas, 170, 170*f*, 172, 172*f*
definición, 147
degradación lisosómica, 167
destinatario, 707
direccionamiento de proteínas, 683
donador, 707
en eucariontes, 165
métodos de purificación, 180, 180*f*
microtúbulos, 828
similitudes entre especies, 26
tipos, 165, 166*f*
Orígenes de replicación, 133, 135, 433, 856, 879, 880*f*
una vez por ciclo, 856, 879
Ortología de la secuencia, 382*f*, 383
Oskar, 631
Ósmosis, 164, 164*f*, 271
definición, 271
en plantas, 170, 271
en la regulación del volumen celular, 164, 164*f*
soluciones
hipertónicas, 164, 164*f*, 272
hipotónicas, 164, 164*f*, 272
Osteoblastos, 606, 606*f*
Osteogénesis imperfecta, 219
Osteopetrosis, 606
Osteoporosis, 606
Osteoprotegerina (OPG), 606
Ovocito(s), 18, 18*f*
acuaporinas, 272*f*, 273
desarrollo, 624, 625*f*
en *Xenopus*, 858, 859*f*, 860*f*, 862*f*, 863*f*
poliadenilación citoplasmática, 519, 520*f*
de rana. Véase *Ovocito(s)*
Ovogénesis, 624, 625*f*, 627
modelado, 627, 627*f*
Óvulo, 18, 18*f*. Véase también *Ovocito(s)*
Oxa 1, en el transporte de proteínas, 688, 689*f*
Oxalacetato
en el ciclo del ácido cítrico, 309, 310*f*
en la lanzadera malato-aspartato, 311*f*, 312
Oxidación, 54, 54*f*
aerobia, 301
en el ciclo del ácido cítrico, 309, 310*f*
en la mitocondria, 301
en los peroxisomas, 301
quimioósmosis, 302
glucosa, 301
Oxidasas, peroxisómica, 168, 313
Óxido nítrico, 573*c*
cGMP, 564, 564*f*
en la contracción muscular, 227, 771
efectos vasculares, 771
en la hipoxia, 619, 620*f*
Oxígeno
citocromo *c* oxidasa reducido, 322, 322*f*, 323*f*.
hemoglobina, unión, 83, 83*f*
producción, en la fotosíntesis, 302, 331, 333, 339, 339*f*, 340*f*

P

P-selectina, en la extravasación de leucocitos, 227, 228*f*
P0, 286
p16, en cáncer, 957, 958*f*
p21CIP, 885, 886
p27 KIP1, 885, 886
p38 cinasas, 597
p53, 889
en cáncer, 941, 942*f*, 958, 963
P54, en la translocación proteica, 661, 662*f*
p57KIP2, 885, 886
P70, direccionamiento, 688*f*, 689*f*, 691
PABPI, 130
PABPII, 496*f*, 497, 504
Palade, G., 703
Palmitato, 44*f*, 746*f*
Palmitoil CoA, 746
Paludismo, 5, 5*f*, 353
Papiloma virus humano, 143
en cáncer, 953, 960
Paralogía de la secuencia, 382*f*, 383
Pared
celular
bacteriana, 680
vegetal, 164, 231
ablandamiento y estiramiento, para el crecimiento celular, 232
estructura, 232, 232*f*
extensina, 232
fuerza, 232
funciones, 232, 232*f*
hemicelulosa, 232*f*
lignina, 232
en los meristemas, 232
microfibrillas de celulosa, 232, 232*f*
pectina, 232
permeabilidad, 232
plasmodesmos, 233, 233*f*
presión de turgencia, 219, 272
Pares
apareamiento de bases, 10, 10*f*, 103, 104*f*
en el DNA
de balanceo, 122, 123, 123*f*
complementarias, 104
no estándar, 104, 122, 123*f*
en la replicación, 131, 133
de Watson-Crick, 104
en el RNA
en la traducción, 128, 129*f*
de Watson-Crick, 108, 108*f*
snRNA-pre-mRNA, en el corte y empalme, 499, 499*f*
de bases de Watson-Crick, 104
Partícula(s)
de reconocimiento de señales (SRP), 661, 662*f*
en el transporte de proteínas del cloroplasto, 691, 692*f*
ribonucleoproteicas heterogéneas (hnRNP). Véase *hnRNP*
de ribonucleoproteína. Véase *RNP*
nucleares pequeñas (snRNP), 499
en el corte y empalme, 499, 500*f*, 501, 502*f*, 503, 515
en empalmosomas, 499, 500*f*, 515
en el procesamiento del pre-rRNA, 526, 526*f*
Patch clamp, 265, 265*f*, 279, 280*f*
Patched, 641, 641*f*, 651
Patrón anteroposterior, 629, 630*f*, 631*f*, 633*f*
Pax3, 917
Pax6, 27*f*
PCNA en la replicación del DNA, 134, 134*f*
PDK1, 599, 600*f*
Pectina, 232, 234
síntesis, 234
Pénfigo vulgar, 206
Pentosas, 41, 41*f*
Peptidasas, 72
de señal, 664
en la translocación de proteínas, 663*f*, 664
Peptidil-prolil isomerasas, en el plegamiento de proteínas, 677, 678*f*
Péptido(s), 61, 61*f*. Véase también *Proteína(s)*
sintéticos
en el análisis de anticuerpos, 95
en los ensayos con anticuerpo, 95
Pérdida de heterocigosidad (LOH), en genes supresores de tumores, 947, 948*f*
Perfiles de hidropatía, 671, 672*f*
Periferina, 807, 807*c*. Véase también *Filamentos intermedios*
Perlecán, 210*f*, 211, 214
unión a distroglucano, 226, 226*f*
Permeasas, 258
Peroxisomas, 14, 166*f*, 168, 168*f*
matriz, 683
oxidación
de ácidos grasos, 301, 312*f*, 313
aerobia, 301
propiedades, 693
en el síndrome de Zellweger, 694
síntesis, 693, 694, 695*f*
translocación proteica, 693, 694*f*. Véase también *Proteínas peroxisómicas, direccionamiento*
Pertussis, 548
Peste bubónica, inyección proteica, 681, 682*f*
petite, herencia citoplásmica, 438
Pez cebra, como organismo experimental, 24, 25*f*
pH, 47
buffers, 48, 49*f*
citosólico, regulación de bombas, 253. Véase también *Bombas impulsadas por ATP*
regulación, 48, 49*f*
PhoR/B, en la transcripción, 117, 118*f*

Pigmentos que absorben luz, 333, 334*f*
Pinocitosis, 728
Pirimidinas, 40, 40*f*, 41*c*
  estructura, 40, 40*f*, 103, 103*f*
Piruvato
  cinasa, en la glucólisis, 314, 314*f*
  conversión
    a acetil CoA, 308*f*, 309
    a etanol, 305, 306*f*
    a lactato, 306*f*, 307
  deshidrogenasa, 77, 78*f*, 308*f*, 309
  oxidación
    aerobia, 306*f*, 307, 308*f*, 309
    anaerobia, 305, 306*f*
    en plantas, 309
  reducción
    a ácido láctico, 306*f*, 307
    en la síntesis de ATP, 304, 305*f*, 309
  síntesis glucolítica, 304, 305, 305*f*
  transporte, 307, 308*f*
PKB, en apoptosis, 930
Placa(s), 138, 139*f*, 364
  amiloide, en la enfermedad de Alzheimer, 72, 72*f*, 73
  ateroscleróticа, 768*f*, 769
  cribosas, 346*f*, 347
Plano de escisión, citocinético, 847*f*, 848, 874
Planta(s)
  almidón, 42, 331, 331*f*, 347
  biodiseños, 442
  bomba de protones, 252*f*, 257, 270, 270*f*
  células madre, 905, 905*f*
  citocinesis, 848, 849*f*
  cloroplastos, 166*f*, 172, 172*f*
  como organismos experimentales, 24, 25*f*
  crecimiento, elongación celular, 232
  C_3, 342, 343*f*, 346
  C_4, 345, 345*f*, 346*f*
  desarrollo, 637, 637*f*, 638*f*
  diseñadas genéticamente, 270, 442
  DNA mitocondrial, 438, 440, 441, 441*c*
  edición del RNA, 508
  estructura de la hoja, 332*f*
  flores, 231, 637, 637*f*, 638*f*
  flujo osmótico, 271
  fotorrespiración, 345, 345*f*, 346*f*
  fotosíntesis, 301, 331
  glucólisis, 309
  hojas, 231
  membrana plasmática, 164
  meristemas, 232, 234, 637
    brote apical, 905, 905*f*
    células madre, 905, 905*f*
    destinos celulares, 905, 905*f*
  microtúbulos, 848
  miosina, 791
  mitosis, 848
  oxidación de piruvato, 309
  pigmentos que absorben luz, 333, 334*f*
  potencial de membrana, 257, 258*f*, 263
  presión de turgencia, 272
  sacarosa
    síntesis, 342, 343*f*, 344
    transporte, 346*f*, 347
  sistema
    de raíz, 231
    de transporte, 346*f*, 347
    del órgano, 231
  tallo, 231
  transporte de membrana, 252*f*, 257, 258*f*, 263, 270, 270*f*
PLAP (fosfatasa alcalina placentaria), en "*rafts*" *lipídicos*, 156*f*, 161
Plaqueta(s), 581
  activación, 226
  cambios morfológicos, 790, 790*f*
Plaquinas, 810
Plasmalógenos, 151, 745*c*, 747. Véase también *Lípidos de membrana*
  estructura, 746*f*
  síntesis, 747
Plásmidos I.EU, elementos funcionales, 434*f*, 435
Plasmodesmos, 15, 233, 233*f*, 346*f*, 347
Plasmodium spp, 5, 5*f*
Plastocianina, 339, 341
Plastoquinonas, 339, 341
Plectina, 810, 810*f*
Plegamiento de proteínas, 63, 64*f*, 68, 69*f*
  anormal, 678, 679*f*
  catalizador, 677, 678*f*, 679, 679*f*
  curso temporal, 678
  errores, 68, 71, 72
    enfermedades, 72, 72*f*
  estado nativo, 68
  mediado por chaperona/chaperonina, 69, 69*f*, 677, 678*f*, 679, 686
  oligosacáridos, 674, 674*f*
  en proteínas multiméricas, 678
  respuesta a la proteína desplegada, 679, 679*f*
  translocación, 696
Pliegue ATPasa, 782
PMP22, 286
Podosomas, 223
Pol
  alfa, en la replicación del DNA, 134, 134*f*
  II. Véase *RNA polimerasa II*
Polaridad, celular, 7
  en la división celular asimétrica, 919
  en el movimiento celular, 800, 803
Polen, adhesión, 234, 234*f*
Poli (A) polimerasa, 112, 496*f*, 497
Poliadenilación
  citoplasmática, 520, 520*f*
  en el procesamiento del pre-mRNA, 496, 496*f*, 519, 520*f*
Poliligador, 363*f*, 364
Polimerasa e (Pol e), 881
Polímeros, 9, 37, 37*f*
Polimorfismos
  de DNA
    en el mapa genético, 396, 397*f*
    repetición de secuencia simple, 397
  de longitud en los fragmentos de restricción, 396, 397*f*
  de un solo nucleótido, 397
Polipéptidos, 61. Véase también *Proteína(s)*
  estructura química, 37*f*
Polirribosomas, 130, 131*f*
Polisacáridos, 9, 42
  estructura, 37*f*, 38, 42, 42*f*
Polisomas, 130, 131*f*
Politenización, 433
Poliubicuitinación
  de las ciclinas mitóticas, 863, 863*f*
  en la iniciación de la anafase, 870, 871*f*, 872*f*
Porinas
  bacterianas, 160, 160*f*, 258
  mitocondriales, 160, 307
    direccionamiento, 688*f*, 689*f*, 691
Poros
  entrada general, 685, 685*f*
  nuclear(es), 171, 509, 509*f*
    vía
      de exportación proteica, 512
      de importación proteica, 510
  selectividad de iones, 284*f*, 287
Posición de balanceo, 122, 123, 123*f*
Potencial
  de acción, 245, 276. Véase también *Potencial de membrana*
  definición, 276
  dirección, 281, 281*f*
  generación
    entre neuronas, 293
    frecuencia, 294
    potencial de umbral, 293
    todo o nada, 293, 293*f*
    en las uniones neuromusculares, 293
  en la liberación de neurotransmisores, 289, 736
  magnitud, 278, 294
  origen, 277
  propagación, 736
    sin ATP, 282
    en los axones mielinizados, 286, 286*f*
    canales de iones potasio, 278*f*, 279, 280*f*, 281, 283*f*
    canales de iones sodio, 278, 278*f*, 280*f*, 281*f*, 283*f*
    despolarización de la membrana, 277, 277*f*, 278*f*, 280, 281*f*
    direccionalidad, 281, 281*f*
    neurotransmisores, 277
    período refractario, 279, 280*f*, 284, 284*f*
    salto, 286, 286*f*
    a través de la sinapsis química, 277, 278*f*
    velocidad, 277, 284
  transmisión sináptica, 277, 278*f*
  velocidad de conducción, 277, 284
eléctrico, 50. Véase también *Potencial de membrana*
  transmembrana. Véase *Potencial de membrana*
de equilibrio. Véase también *Potencial de la membrana*
  ecuación de Nernst, 262
de membrana, 246
  de acción, 276. Véase también *Potencial de acción*
  axonal, 276, 277*f*. Véase también *Potencial de acción*
  cálculo, 262
  de la cara citosólica vs. la exoplasmática, 302
  despolarización, 277
  ecuación de Nernst, 262, 317
  en la fuerza protón-motriz, 302, 302*f*, 317
  generación, 261, 261*f*
  en hongos, 263
  magnitud, 262
  medida, 262*f*, 263, 317
  en plantas, 257, 258*f*, 263, 270
  repolarización, 277, 277*f*
  en reposo, 252*f*, 260, 261*f*, 277*f*
    iones potasio, 262, 263*f*, 264*f*
    en neuronas, 276, 277*f*
  en la síntesis de ATP, 302, 303*f*
  voltaje, 260, 276
de oxidación, 55
de reducción, 55, 321
  para transportadores de electrones, 321
de reposo, 252*f*, 260, 261*f*, 276, 277*f*. Véase también *Potencial de membrana*
  iones potasio, 262, 263*f*, 264*f*
  en las neuronas, 276, 277*f*
umbral, 293, 293*f*
Pre
  mRNA
    apareamiento de bases snRNA, en el corte y empalme, 499, 499*f*
    definición, 494
    en los empalmosomas, retención en el núcleo, 515
    proteínas hnRNP, 495, 495*f*, 496*f*
    transporte nuclear, 509, 516
  rRNA
    estructura, 525, 526*f*
    procesamiento, 525, 525*f*, 526*f*
    síntesis. Véase también *Transcripción* RNA polimerasa I, 450
  tRNA, procesamiento, 528, 528*f*
Precursor de órgano sensorial, 647, 647*f*
Presenilina 1
  en la activación del receptor Notch, 603, 603*f*
  en la enfermedad de Alzheimer, 604
Presión
  osmótica, 271, 271*f*
  de turgencia, 219, 272
Primasa, 133
Procariontes. Véase también *Bacterias; Cianobacteria*
  contenidos celulares, 147
  control génico, 115, 448
  corrientes citoplasmáticas, 795, 795*f*
  estructura celular, 2, 3*f*, 147
  evolución, 4, 4*f*
  fotosíntesis, 302, 331
  membrana celular, 147. Véase también *Membrana(s)*
  reproducción, 17
  traducción, 112
  transcripción, 111, 112*f*
  transposones, 415, 415*f*, 416*f*
Procesamiento
  de pre-mRNA, 110*f*, 112, 113*f*, 493
    amplificadores del corte y empalme exónico, 501, 502*f*
    complejo
      nuclear de umón al casquete, 504
      de reconocimiento a través del exón, 501, 502*f*
    corte y empalme, 494, 497
    en la diferenciación sexual de *Drosophila*, 505, 506*f*
    edición del RNA, 508, 508*f*
    elongación de la cadena, 501, 501*f*
    escisión y poliadenilación, 496, 496*f*
    exonucleasas, 504
    incompleto, 515
    en mamíferos, 503, 503*f*
    mecanismos, 493
    pasos, 494*f*
    proteínas SR, 501, 502*f*
    reconocimiento exónico, 501, 502*f*
    regulación, 504
    RNA polimerasa II, 501, 501*f*
    transporte nuclear, 509
  proteolítico de proteínas, 70, 71*f*, 85, 601
    posGolgi, 724, 725*f*
  de RNA, 110*f*, 112, 113*f*
    alternativo, 407*f*, 408
    panorama general, 102*f*
Procolágeno, 217, 217*f*
Producción de dióxido de carbono
  en el ciclo del ácido cítrico, 309, 310*f*, 311*c*
  en la oxidación
    de ácidos grasos, 301, 313
    de glucosa, 54, 301, 304, 311*c*
  a partir del ácido láctico, 307
Productos, de reacciones químicas, 46
Proenzimas, 724
Profago, 141
Profase, 838, 839*f*, 843, 843*f*. Véase también *Ciclo celular*
  en plantas, 848, 849*f*
Profilina, 787, 787*f*, 801*f*, 802, 803
Progresión cisternal, 701, 702*f*, 718, 718*f*
Proinsulina, procesamiento proteolítico, 725, 725*f*
Prolactina, 523, 580
Prolina, 38, 39*f*. Véase también *Aminoácido(s)*
  en el colágeno, 211, 211*f*
Promotor(es)
  corte y empalme, 507
  en la inactivación de genes, 388
  transcripcional, 66, 109, 111*f*, 116, 448, 449, 454
    caja TATA, 454, 455*f*
    débil, 116
    definición, 449
    fuerte, 116
    iniciadores, 454
    islas CpG, 455
    lac, 378
    en los vectores de expresión, 378, 378*f*
  de la caja TATA, 469, 470*f*
  GAL1, en la inactivación génica, 388
Proproteínas, 724
Próspero, 923
Proteasas, 72
  en el procesamiento de proteínas, 70, 72, 85, 602, 725
Proteasomas, 66*c*, 71, 71*f*, 586, 863
Proteína(s), 9, 59. Véase también *Gen(es) y proteínas específicas*
  ABC, 252*f*, 253, 258, 748, 748*c*, 755
  aceleradora
    de GTPasa (GAP), 511, 511*f*, 542
    en el ciclo de Ras, 588
    de la Ran GTPasa, 511, 511*f*, 512, 513
  acetilación, 70, 70*f*
  ácida fibrilar glial, 807, 807*c*. Véase también *Filamentos intermedios*
  activadora
    de carabolitos. Véase *Complejo CAP-cAMP*
    de GTPasa (GAP), 588
  adaptadora(s), 587
    en la adhesión intercelular, 198*f*, 200, 200*f*, 205
    en apoptosis, 928, 928*f*
    en el direccionamiento de proteínas, 708, 709*c*, 720, 721*f*. Véase también *Vesículas cubiertas de clatrina/AP*
    en dominios SH3, 591
    en las uniones celulares, 202, 204*f*, 205, 207
  adhesivas, en las uniones celulares, 202, 203*f*
  aislamiento. Véase *Purificación de proteínas*
  alfa-hélice, 61, 61*f*
  aminoácidos, 38, 39*f*, 40. Véase también *Aminoácido(s)*
  ancladas a lípidos, 157, 158*f*, 160, 161*f*. Véase también *Proteínas de membrana*
  de anclaje
    clasificación apical-basolateral, 726*f*, 727

Proteína(s) *(Cont.)*
en la señalización, 554, 555*f*
asociadas
a la cinasa A, 554, 555*f*
a filamentos intermedios, 810
a microtúbulos (MAP), 823, 824*c*, 824*f*
autocorte y empalme, 71
autorradiografía, 93, 93*c*
bacterianas, inyección dentro de células eucariontes, 681
Banda 4.1, 177
básica de mielina, 286
bicoid, 629, 629*f*, 630*f*, 634, 635*f*
BMP, en el desarrollo del tubo neural, 643, 643*f*
Boss, 590, 591*f*
canal(es). Véase *Canal de iones*
acuoso, 160, 164, 164*f*, 271, 272*f*, 273, 273*f*
en las células del riñón, 274
estructura, 273, 273*f*
en la membrana de los eritrocitos, 273, 273*f*
subtipos, 274
iónicos, secuencias topogénicas, 669, 670*f*
CapZ, 788, 788*c*, 788*f*
carboxilación, 70, 70*f*
carga, 510, 701. Véase también *Transporte vesicular*
eléctrica, 38
exportación, 512, 512*f*, 513*f*
importación, 510, 511*f*
procesamiento, 719
selección, 708, 709*c*, 710, 720
proteínas adaptadoras, 720
transporte
COPI, 716, 717*f*
COPII, 716
chaperona. Véase *Chaperonas*
chaperonina, 66*c*, 69*f*, 70, 686
del choque térmico, chaperona, 69
cinasa(s)
A (PKA), 75, 76*f*
activación, 83, 84*f*
cAMP, 83, 84*f*, 550, 552*f*
estructura, 550
fosforilación, 75, 76*f*, 543
localización, 554, 555*f*
en el metabolismo del glucógeno, 550, 551, 552*f*, 617, 617*f*
B (PKB), 599, 600, 600*f*
insulina, 600, 618
C (PKC)
activación mediada por DAG, 563, 563*f*, 598
funciones, 563
dependiente de AMP. Véase *Proteincinasa A (PKA)*
en la fosforilación proteica, 85, 85*f*, 543
G (PKG), 564, 564*f*, 565
heterodimérica, en la regulación del ciclo celular, 853, 855
en la señalización, 543
CIS, 585*f*, 586
de la cubierta, 708, 709*c*, 710*f*, 716, 716*f*
Sec, 709*c*, 710*f*, 716, 716*f*
del citoesqueleto. Véase *Citoesqueleto, filamentos*
clasificación, 60*f*
cognadas, identificación, 458
compartimentación, 86
concentración citosólica, 173
conformación, 21, 60, 62, 63*f*, 68, 69*f*, 76*f*. Véase también *Plegamiento de proteínas*
consultada, 380
CREB, 467, 476, 567
dominio de activación acídico, 467, 476
decapentaplégica (Dpp), 574, 629, 649
definición, 61
degradación, 71, 71*f*
regulación, 86
densidad, 87
desnaturalización, 68
determinación, 95, 96*f*
en el direccionamiento de proteínas, 710
disulfuro isomerasa (PDI), enlaces disulfuro, 675, 676*f*, 677
con dominio CH, 782, 783*c*
cruzado de actina, 782, 783*f*
dorsal, 628, 628*f*
Dpp, 574, 629, 649
endocitosis. Véase *Endocitosis*
enlaces
disulfuro, formación, 675, 676*f*, 677*f*
hidrógeno, 61, 61*f*, 62*f*
en ensamblajes macromoleculares, 66, 66*c*
ensayos
con anticuerpo, 92, 92*f*
enzimáticos, 92, 92*f*
enzima. Véase *Enzima(s)*
escisión, 70, 71*f*, 85, 603, 725, 725*f*
especialización, 59, 60*f*
estabilidad, oligosacáridos, 674
estructura, 21, 38, 39*f*, 60, 60*f*
conformacional, 60
correlatos funcionales, 67
cuaternaria, 65*f*, 66
de enrollamiento al azar, 61
primaria, 60, 61*f*
secundaria, 61, 61*f*
técnicas analíticas, 95, 97
terciaria, 62, 64, 65*f*
estructural, 59, 60*f*
evolución, 27, 67
expresión en estallido, 521
fijadoras de actina, 786, 787, 788*c*
en la contracción muscular, 798, 798*f*
de recubrimiento, 788, 788*c*, 788*f*, 802
seccionadoras, 787, 788*c*
fluorescente, 188, 188*f*
formas, 9*f*
fosforilación, 70, 70*f*, 85, 85*f*, 543
funciones, 10
correlatos estructurales, 60, 60*f*, 63, 67
G, 510, 542, 588
clasificación, 545*c*, 546
estimuladora, 548. Véase también G_s-*complejo GTP*
estructura, 533*f*
formas activa/inactiva, 542, 542*f*, 588. Véase también *Proteínas interruptoras de GTPasa*
funciones, 84
mecanismo cíclico, 542, 542*f*, 588
monoméricas, 542. Véase también *Ras*
en el movimiento celular, 804, 805*f*
receptor muscarínico para acetilcolina, 556, 556*f*
rodopsina, 556. Véase también *Rodopsina*
en la señalización, 542, 542*f*, 545, 546*f*, 547*f*. Véase también *Receptores asociados a la proteína G*
en la señalización
bucle C3, 548, 548*f*
en la cascada de cinasas, 66*c*, 596, 596*f*
en la señalización
dominios funcionales fundamentales, 548
proteínas efectoras, 545*c*, 546
subunidad alfa, 588
trimérica, 534, 542, 545*c*. Véase también *Superfamilia GTPasa*
en las vías de apareamiento de la levadura, 596, 596*f*
VSV, 703
G alfa, en la superfamilia GTPasa, 84, 85, 129, 542, 588
G_s, 548
rodopsina y, 556, 559, 559*f*, 560, 560*f*
Gag en la gemación de virus, 734, 734*f*
GEF, 542, 588
giros, 62
globinas
estructura, 67, 67*f*
evolución, 67, 67*f*
glucosilación, 70, 70*f*, 673, 673*f*
Gurken, 627, 628
hélice-bucle-hélice básico, 465, 465*f*, 629, 915
miogénicas, 915-916
neurogénicas, 918
hidroxilación, 70, 70*f*
HMG, 429
hoja beta, 61, 62, 62*f*
homólogas, 67*f*, 68, 380, 381*f*
Hsp70
como chaperonas, 69
transcripción, 486
identificación, 86
análisis, 92, 92*f*

de grupo, 386
de microtmatrices *(microarray)* de DNA, 385, 385*f*, 386*f*
construcción interruptora, 387, 388*f*
métodos de purificación. Véase *Purificación de proteínas*
modelo del ratón, 384
secuencias de DNA genómico, 385, 385*f*, 386*f*
técnicas de inactivación de genes, 387
inhibidoras de CDK (CIP), 885, 886
interruptoras, 84, 85*f*
GTPasa, 84, 85*f*, 129, 542, 542*f*, 588.
como subunidad receptora asociada a la proteína G, 545*c*, 546
en el ensamblaje de vesículas con cubierta, 709, 709*c*, 710*f*
formas activa/inactiva, 85, 85*f*, 588
mecanismos cíclicos, 85, 85*f*, 588
en el movimiento celular, 803
proteínas G, 84, 85*f*, 542, 542*f*
Ras, 84, 85*f*, 588. Véase también *Ras*
en la señalización, 542, 542*f*
inserción en el retículo endoplasmático, 666
interruptor, 84
GTPasa, 84, 85*f*, 129, 542, 542*f*
en señalización, 542, 542*f*
isoforma, 114, 201
corte y empalme alternativo, 505, 507
lanzaderas, exportación nuclear, 512
localización, del mRNA, 523, 524*f*
mano EF, 63, 64*f*, 84
marcación con epítopo, 379, 380*f*
masa, 87
mediciones, 94, 94*f*
medida, 94, 94*f*
matriz, 87
multiadhesiva, 209, 210*f*, 212, 213*f*
fibronectina, 220
laminina, 210*f*, 211, 212, 213*f*
de membrana, 13, 157
en la adhesión célula-célula, 200. Véase también *Moléculas de adhesión celular (CAM)*
agrupamiento, 543, 544*f*
ancladas a lípidos, 157, 158*f*, 160, 161*f*
de anclaje, 554, 555*f*
clasificación apical-basolateral, 726*f*, 727
en la señalización, 554, 555*f*
asociación con la bicapa fosfolipídica, 157, 158*f*
canal acuoso, 160, 164, 164*f*, 271, 272*f*, 273, 273*f*
cara exoplasmática, 666
clasificación. Véase *Direccionamiento de proteínas*
concentración, 157
direccionamiento, 657. Véase también *Direccionamiento de proteínas: Translocación de proteínas*
dominios, 157
funciones, 165
de la membrana, 164, 164*f*, 165
integrales (transmembrana), 157, 158*f*
con anclas de GPI, 671, 671*f*
anclas lipídicas, 670, 671*f*
bacterianas, 160, 160*f*, 258
en la brotación de vesículas, 708, 708*f*
canales de iones, 158, 159*f*
cara exoplasmática, 666
características, 666
como bombas, 252
en el complejo F0/F1, 326, 326*f*
dominios sensores de lípidos, 766
estructura, 158, 159*f*, 160*f*
inserción en la membrana, 666
mitocondrial, 160, 307
moléculas de adhesión celular, 198, 198*f*, 199, 199*f*
movilidad, 162
multipaso, 158, 159*f*, 667, 669, 670*f*
orientación, 161, 666, 667*f*, 668
porinas, 160, 160*f*
secuencias
de detención de transferencia-anclaje, 667, 668*f*, 670*f*
de señalización-anclaje, 668, 669*f*, 670*f*
topogénicas
identificación, 671, 672*f*
tipos, 666, 667, 668*f*
segmentos alfa helicoidales, 669, 670*f*
en la señalización, 535. Véase también *Señalización*
síntesis e inserción, 666, 668*f*, 669*f*
solubilización, 182, 183*f*
tipos, 666, 667*f*
topología, 666, 667*f*, 669
predicción, 671, 672*f*
de un solo paso, 158, 159*f*, 666, 667*f*, 668*f*, 669*f*
mecanismos de anclaje, 160
modificación, 673
movimiento, 152*f*, 153
periféricas, 157, 158*f*
procesamiento proteolítico, 724, 725*f*
propiedades generales, 157
purificación, 182, 183*f*
receptor, 165
síntesis, sobre el retículo endoplasmático rugoso, 166*f*, 168, 168*f*
solubilización, 182, 183*f*
topología, 666, 667*f*
transporte, 164, 164*f*
unión(es)
al citoesqueleto, 162, 173*f*, 176
estrechas, 206*f*, 207
metilación, 70, 70*f*
métodos de separación, 86. Véase también *Purificación proteica*
microsómica de transferencia, 758
miogénicas, 915, 916
básicas hélice-bucle-hélice, 915, 916
mitocondriales, síntesis, 439
factores de crecimiento mitogénico, 856
modelos, 62, 63*f*
generación, 95, 96*f*
modificaciones, 70, 70*f*
morfogénica ósea, 574
motoras, 59, 60*f*, 79, 79*f*, 80*c*, 779, 791, 817
acción cooperativa, 834, 835*f*
axonémicas, 833*c*
en las células no musculares, 796
cinesinas, 79, 80*c*, 80*f*, 82, 791, 831, 833*c*
citosólicas, 833*c*
en la contracción muscular, 81, 81*f*, 791
dineínas, 79, 80*c*, 80*f*, 829, 833, 833*c*
estructura, 81
lineales, 79, 79*f*
microtúbulos, 829. Véase también *Dineína(s); Cinesina(s)*
en la formación del huso mitótico, 844*f*, 845
en el movimiento rítmico ciliar, 837, 837*f*, 838*f*
en el transporte axónico, 829
miosina como modelo, 81, 81*f*. Véase también *Miosina*
mitóticas, 833*c*
rotatorias, 79, 79*f*
en el transporte axónico, 829
multidominio, multifuncional, 78, 78*f*
multiméricas, 66, 77, 78*f*
ensamblaje, 678
unión cooperativa, 83
multipaso, 667, 669, 670*f*, 672. Véase también *Proteínas integrales de membrana (transmembrana)*
célula madre multipotentes, 900
esclerosis múltiple, desmielinización, 286
hibridación in situ con fluorescencia múltiple, 12*f*
en la translocación de protones, 322, 322*f*
en el transporte de electrones, 318, 320*f*
Neu, 65, 65*f*
neurogénicas básicas hélice-bucle-hélice, 918
no glucosiladas, 675
notación, 865
Notch, 65, 603, 603*f*
número en las células, 10
observación con el microscopio, 20. Véase también *Microscopia*
ordenamiento funcional, 358

Proteína(s) *(Cont.)*
de paso único, 666, 667*f*, 668*f*, 669*f*. Véase también *Proteínas de membrana, integrales (transmembrana)*
peso molecular, 61
Pipe, 627, 627*f*
plataforma, 77, 78*f*
plegadas de manera errónea, 68, 71, 72
degradación, 679
en enfermedades, 72, 72*f*
precursora amiloide, escisión proteolítica, 604, 604*f*
procesamiento proteolítico, 70, 71*f*, 85, 602
posGolgi, 724, 725*f*
producción
clonación, 377, 378
transfección, 378, 379*f*
vectores de expresión, 377, 378*f*
purificación, 21, 21*f*
Rab
activación, 392
en el direccionamiento de proteínas, 702*f*, 711
Rae
activación, 392
en el movimiento celular, 803, 804*f*
radiomarcadas, 93, 93*c*
Raf, 593
mutantes, 593
Ras, 940, 941, 941*f*, 953
regulación, 82
alostérica, 83, 84*f*
cAMP, 83, 84*f*
reguladoras, 59, 60*f*
aguda esteroidogénica (StAR), 752
relacionadas
con la actina (Arp), 788, 788*c*, 789*f*, 801*f*, 802, 804
con Ras, en el movimiento celualar, 803, 804*f*
renaturalización, 68
Rev
del HIV, en el transporte de mRNA viral, 515, 516*f*
en el transporte de mRNA viral, 515, 516*f*
Rho
en el cáncer, 937
en el movimiento celular, 803, 804*f*
seccionadoras de actina, 787, 788*c*
secretorias
definición, 659
ensayos
in vitro, 706, 707*f*
in vivo, 703, 704*f*, 705*f*
modificación, 673
procesamiento proteolítico, 724, 725*f*
de señalización. Véase *Moléculas de señalización*
síntesis, 658*f*, 659, 660*f*. Véase también *Síntesis de proteínas*
sobre el retículo endoplasmático, 166*f*, 168, 168*f*
translocación, 659, 660*f*. Véase también *Direccionamiento de proteínas; Translocación de proteínas*
secuenciación, 95
sensora, 117
señalización. Véase *Señal(es); Moléculas señalizadoras*
shock térmico, 69
como chaperonas, 69
síntesis. Véase *Síntesis de proteínas*
mitocondrial, 439
SIR, en la represión de transcripción, 472, 473*f*
Ski y Smads, 577
SMC, 870, 872
SNARE, 708, 708*f*
disociación y regeneración, 713, 716
en la fusión vesícula-membrana, 712, 712*f*, 736, 737*f*
en el reensamblaje de la envoltura nuclear, 873, 873*f*
SOCS, 585*f*, 586
Sos, 590
en la activación Ras, 589, 589*f*, 591, 592*f*
SR, 501, 502*f*
en la diferenciación sexual de *Drosophila*, 506, 506*f*
en el transporte nuclear, 514
StAR, 752
superficie accesible a los solventes, 63, 63*f*
Sxl, 505, 506*f*, 507
tamaño, 9, 9*f*, 61
Tat, en la replicación del HIV, 485, 485*f*
tiempo de vida, 71
Tim, 685*f*, 686, 688, 689*f*, 690
Tom, 685, 685*f*, 688, 689*f*, 690
Tra, 505, 506*f*, 507
de transducción de señales. Véase *Moléculas señalizadoras*
transferencia de lípidos, 752, 755
de transferencia de ésteres de colesterol (CETP), 758, 759*f*
transferencia lipídica, 752
transportadora de resistencia a múltiples fármacos (MDR) de tipo 1, 258
flipasa, 259, 259*f*, 260*f*
tipo 2, 259
de unión
de ácidos biliares intestinales (I-BABP), 756
poli(A)
de tipo
I, 130
II, 496*f*, 497, 504
al TGFbeta latente (LTBP), 574
fluorescente verde (GFP), 20, 188
en los análisis del tráfico de proteínas, 704
verde de la medusa, en ensayos enzimáticos, 93
transporte. Véase *Proteínas de transporte de membrana*
de membrana. Véase *Proteínas de transporte de membrana*
transmembrana. Véase *Proteínas de membrana, integrales (transmembrana)*
transportadoras. Véase *Proteínas transportadoras de membrana*
de transporte
ABC, 252*f*, 253, 258, 748, 748*c*, 755
defectos causantes de enfermedades, 259
flipasa, 259, 259*f*, 260*f*, 748, 756
de ácidos grasos, 755
de membrana, 59, 60*f*, 164, 164*f*, 245, 754*f*
ABC, 252*f*, 253, 258, 748, 748*c*, 755, 756*f*
canal, 247, 247*f*. Véase también *Canal(es) de ion(es)*
acuoso, 160, 164, 164*f*, 271, 272*f*, 273, 273*f*. Véase también *Acuaporinas*
de carga. Véase *Proteínas carga*
en la difusión facilitada, 247, 248, 248*c*
enriquecidas, 250
estudios funcionales, 250, 251*f*
exportinas, 512, 513*f*
GLUT, 248, 249*f*
importinas, 510, 510*f*, 511*f*
impulsadas por ATP, 247, 247*f*. Véase también *Bombas impulsadas por ATP*
panorama general, 246, 247*f*
transportadoras, 247, 247*f*
en la vía transcelular, 207
unión, 36, 36*f*, 47
de ácido graso, 746, 746*f*
al Ca^{2+}, 84
de anticuerpo, 20
membrana-microfilamentos, 176, 176*f*
como las cadherinas, 205
a la caja TATA (TBP), 469, 470*f*
al CPE (CPEB), 520, 520*f*
al elemento de respuesta al hierro (IRE-BP), 522, 522*f*
a GTP, 126, 126*f*, 127*f*, 128, 129. Véase también *Proteínas interruptoras de GTPasa*
en el ensamblaje de las vesículas con cubierta, 709, 709*c*, 710*f*
de microfilamentos a la membrana, 176, 176*f*
unión
a nucleótidos de guanina, 84
al RNA
citosólicas, 495, 495*f*
nuclear, 514

en la traducción/degradación de mRNA, 523
al SER (SREBP), 764, 764*f*, 765*f*, 773
variedad, 9, 9*f*
vías biosintéticas, ordenamiento, 358
virales, degradación, 71*f*, 72
Proteoglucano(s), 209, 210*f*, 213, 213*f*
cadenas GAG, 213, 213*f*, 215*f*, 220
colágeno, 217, 218, 218*f*, 219
diversidad, 214
estructura, 214
hialuronano, 219, 220*f*
híbrido, 214
en la matriz extracelular, 201
en la señalización, 214
síntesis, 214
superficie celular, 214, 575
en la señalización, 644
Proteólisis
intramembrana regulada, 603, 765
regulada intermembranosa, 603, 679
Proteoma, 22, 60
chip, 615, 616*f*
Proteómica, 23
Protofilamenros
de tubulina, 820, 820*f*
citoesqueléticos, en microtúbulos, 820, 820*f*
Protón(es), 47
translocación
acoplada con el transporte de electrones, 322, 322*f*
en el ciclo Q, 323, 323*f*, 324*f*
energía libre, 329
rotación de la subunidad F0/F1, 326*f*, 327, 328*f*
en la síntesis de ATP, 329
Protooncogenes, 642, 935, 940, 945, 955
activación, 935, 944, 955
mediante virus, 945
conversión a oncogenes, 941, 944, 956
definición, 940
mutaciones, 940
Protozoo
funciones, 5
patogénico, 5, 5*f*
vacuola contráctil, 272
Provirus, 142, 142*f*
ptc1, mutaciones de pérdida de función, en el cáncer, 948
PTEN fosfatasa, 600
Punto
de control en el ciclo celular, 886, 887*f*
en el cáncer, 958, 959*f*, 961
daño del DNA, 887*f*, 889
DNA no replicado, 887*f*, 888
ensamblaje del huso, 887*f*, 888
mutaciones inactivantes, 943
segregación de cromosomas, 887*f*, 888, 889*f*
de control del daño de DNA, 887*f*, 889
en cáncer, 958, 959
de control
de DNA no replicado, 887*f*, 888
del ensamblaje del huso, 887*f*, 888
de la segregación cromosómica, 887*f*, 888, 889*f*
isoeléctrico (pI), 89
de ramificación, 498, 498*f*, 499*f*
de restricción, 855*f*, 856
en levadura, 874
en mamíferos, 882, 882*f*
pasaje no regulado a través, en el cáncer, 957, 958*f*
Purificación
celular
anticuerpos específicos de los orgánulos, 181, 182*f*
centrifugación, 181, 181*f*
citometría de flujo, 178, 179*f*
detergentes, 182, 183*f*
fraccionamiento, 180, 180*f*
proteica, 86
centrifugación, 86
cromatografía líquida, 90, 91*f*
detergentes, 182, 183*f*
electroforesis, 87, 89*f*, 90*f*
ensayos, 92, 92*f*
espectrometría de masa, 94, 94*f*
experimentos de pulso y caza, 94, 94*f*
huella dactilar de la masa peptídica, 95
con péptidos sintéticos, 95
radiomarcación, 93, 93*c*, 94*f*
Western blot, 92*f*, 93
Purinas, 40, 40*f*, 41*c*
estructura, 40, 40*f*, 103, 103*f*

Q

Queratansulfato, 213*f*, 214
síntesis, 214
Queratina(s), 173*f*, 174, 174*c*, 177, 177*f*, 807, 807*c*. Véase también *Filamentos intermedios*
desmososmas/hemidesmosomas, 203, 203*f*, 807, 807*c*
mutaciones, formación de ampollas, 811, 812*f*
Queratinocito, movimiento, 789*f*, 801, 801*f*, 802*f*. Véase también *Movimiento celular*
Química, solución típica, vs bioquímica, 36
Quimioatractantes, en el movimiento celular, 804, 805*f*
Quimioósmosis, 302, 302*f*, 326. Véase también *Fuerza motriz de protones*
Quimiotaxis, 804
Quimiocinas, 228
Quimotripsina, escisión proteolítica, 85
Quinonas, en la fotosíntesis, 336, 336*f*, 337*f*, 339, 340, 341
Quiralidad, 31
quiver, 808

R

R-Smads, 575, 576
Radioisótopos, 93, 93*c*
Raf cinasa
activación, 593*f*, 594
cascada de cinasas, 593, 593*f*
mutantes, 593
"Rafts"
de esfingomielina, 147*f*
lipídicos, 147*f*, 156, 156*f*, 161, 763
agrupamiento receptor/proteínas de señalización, 543
Ran
GAP, 511, 511*f*, 512
en la entrada y salida de proteínas, 510, 511, 511*f*
GEF, 512, 513
en el reensamblaje de la envoltura nuclear, 873
GTP
en la entrada y salida de proteínas, 510, 511, 511*f*, 512
en el reensamblaje de la envoltura nuclear, 873
en el transporte nuclear, 510, 511*f*
RANKL/RANK, 606, 606*f*
RAP1, en la represión de la transcripción, 472
Ras, 587
activación, 392, 588, 589, 589*f*
factores de intercambio de nucleótidos de guanina, 591
GRB2, 589, 589*f*, 591
proteína Sos, 589, 589*f*, 591, 592*f*
receptor del factor de crecimiento epidérmico, 589, 589*f*
en la cascada de cinasas, 593, 593*f*
cinasas MAP, 582*f*, 587, 593. Véase también *Map cinasa(s)*
como anclas lipídicas, 671
desactivación, 588
en el desarrollo del ojo de *Drosophila*, 590, 590*f*, 591*f*
estructura, 63*f*
formas activa/inactiva, 85, 85*f*, 588
funcionamiento corriente abajo, 589
funciones, 84
mecanismo de rotación, 85, 85*f*, 588
mutaciones, en cáncer, 589, 939*f*, 940
Raf cinasa, 593, 593*f*
en la señalización, 84, 85*f*, 542, 542*f*, 592
en la superfamilia GTPasa, 84, 129, 542, 588
unión del receptor de tirosincinasa, 589, 589*f*

Ratones
como organismos experimentales, 24, 25*f*, 26
en la identificación génica, 384
knockout, 389, 389*f*, 390*f*, 902
transgénicos, 392, 392*f*
RB
en los cánceres no oculares, 958
en la regulación del ciclo celular, 884, 885*f*, 886
en el retinoblastoma, 946, 947*f*, 958
Rbp1, en la diferenciación sexual de *Drosophila*, 505, 506*f*
RE hacia compartimiento intermedio del Golgi, 716
Reacción(es)
acopladas, 52
en cadena de la polimerasa (PCR), 375, 375*f*, 376*f*, 614
en la aislamiento directo del DNA genómico, 375, 375*f*
en huellas dactilares de DNA, 413
en la preparación de sondas, 376
en las técnicas de inactivación de genes, 387, 388*f*
de deshidratación, 37
de disociación para ácidos, 48
endotérmicas, 51
de estado estacionario, 46, 47*f*
exotérmicas, 51
peptidiltransferasa, 128
químicas, 46
acopladas, 52
catalizadores, 46, 74, 75*f*, 76, 77*f*
dirección, 51
endotérmicas, 51
energía, 50, 74, 75*f*
en equilibrio, 46, 47*f*
en estado estable, 46, 47*f*
exotérmicas, 51
extensión, 46
medias reacciones, 55
productos, 46
redox, 54
reversibilidad, 30*f*
transporte, 53, 247
redox, 54
de transesterificación, en el corte y empalme, 498, 498*f*
de transporte, 53, 247
de unión, 47
Reactivos químicos, 46
Reborde ectodérmico apical (AER), 650*f*, 651
Rec8, 892, 892*f*
Receptor(es)
de acetilcolina, 291
en estado abierto/cerrado, 292, 292*f*
estructura, 291, 292*f*
de ácido retinoico, 482*f*, 483
acoplados a la proteína G, 287, 534, 534*f*, 535, 572*c*
activados por luz, 556. Véase también *Rodopsina*
alfa2-adrenérgico, 548
betaadrenérgico, 548
canales iónicos, 555
desensibilización/resensibilización, 553
disociación de la proteína G, 546, 546*f*, 547*f*
dominios de función críticos, 548
en el metabolismo del glucógeno, 550, 551, 552*f*
en la activación de la fosfolipasa C, 561
en células bastón, 556. Véase también *Rodopsina*
en la represión/activación de la adenilciclasa, 548, 550*f*
en la transcripción, 565, 566*f*
en la vía MAP cinasa, 596
estructura, 545, 545*f*
modelo operacional, 546*f*
neurotransmisor, 555
proteínas efectoras, 545*c*, 546, 546*f*
receptor muscarínico para acetilcolina cardíaco, 556, 556*f*
secuencias topogénicas, 670, 670*f*
subunidad
alfa, 545*c*, 546
formas activa/inactiva, 546
beta, 545*c*, 546
gamma, 545*c*, 546
tipos, 545, 545*c*
transducción de señales, 546, 546*f*, 547*f*
unión a la adrenalina, 546*f*, 547, 547*f*
de adhesión, 198*f*, 199, 199*f*
como conexión entre matriz extracelular-citoesqueleto, 222*f*, 223
como distroglucano, 226
como integrina, 222*f*, 223
evolución, 201
de la lámina basal, 211
unión de hialuronano, 219
adrenérgicos, 548, 548*f*. Véase también *Receptores acoplados a la proteína G*
regulación, 553
alfa2-adrenérgico, 548
de asialoglucoproteína
en endocitosis, 731
perfil de hidropatía, 672, 672*f*
beta-adrenérgicos, 548, 548*f*. Véase también *Receptores acoplados a la proteína G*
regulación, 553
de cAMP, en el movimiento celular, 804, 805*f*
canal iónico, 573*c*
de células T, 572*c*
de citocina, 534*f*, 572*c*, 578
activación, 578, 579*f*
de la vía
IP3/DAG, 598
PI-3 cinasa, 598, 599*f*
estructura, 578, 579*f*, 581, 581*f*
clasificación, 572*c*, 573*c*
como matriz extracelular-citoesqueleto conexión, 222*f*, 223
delta, 573*c*, 603, 603*f*. Véase también *Vía Notch/delta*
disociación, 730, 730*f*, 731*f*. Véase también *Endocitosis mediada por receptores*
distroglucano, 226
de eliminación, 769*f*, 771
eph, 645, 645*f*
de eritropoyetina (EpoR), 581, 581*f*
cinasas JAK, 581, 582*f*, 583*f*
mutaciones, 586, 953
oncogénicas, 953, 953*f*
transducción de señales, 581, 582*f*, 584*f*
finalización, 585, 585*f*
de estrógeno, 482*f*, 483
evolución, 201
del factor de crecimiento
epidérmico, 578*f*, 601, 651. Véase también *Receptor tirosincinasa*
en la activación Ras, 589, 589*f*, 601
degradación, 605
de fibroblastos, estructura, 588*f*
en transformación beta. Véase *Receptores TGFbeta*
de fosfotirosina fosfatasa, 572*c*
para glucagón, 619
guanililciclasa, 565, 572*c*
Her2, en cáncer de mama, 952
hormonas, 17, 482, 482*f*
de crecimiento, SOCS-2 regulación corriente abajo, 586
desensibilización, 605
esteroides, 482, 482*f*, 484*f*
señuelo, 606, 606*f*
en la superfamilia de receptores nucleares, 482, 482*f*. Véase también *Receptor(s) nuclear*
de importación
mitocondrial, 685, 685*f*
nuclear, 510
de insulina, 600, 618
integrina, 222*f*, 223
internalización, en la endocitosis mediada por receptores, 728. Véase también *Endocitosis mediada por receptores*
KDEL, en transporte vesicular, 711*c*, 717, 717*f*
de la lámina basal, 211
de lipoproteína de baja densidad, 730
mutaciones, 730
unión dependiente de pH, 731, 731*f*
muscarínico de acetilcolina, 556, 556*f*
neurotransmisores. Véase también *Señalización*
síntesis, 288
transporte, 287
en las vesículas sinápticas, 288
nicotínico de acetilcolina, 291
estructura, 291, 292*f*
nucleares, 464, 482, 482*f*, 513, 633
dominios
de activación, 467, 467*f*
de represión, 467
elementos de respuesta, 483, 483*f*
estructura, 482, 482*f*
heterodimérico, 483
homodimérico, 483, 484*f*
en el metabolismo lipídico, 766
de somatotrofina humana, perfil de hidropatía, 672, 672*f*
oncogénicos, 951, 952*f*
Pex
en la biogénesis de los peroxisomas, 694, 695*f*
en el direccionamiento de proteínas peroxisómicas, 693, 694*f*
de progesterona, 482*f*, 483
purificación, 539
superficie celular
acoplados a la proteína G, 287, 534, 534*f*, 535, 545, 572*c*
activación, 534, 536, 536*f*, 537, 537*f*
agrupamiento, 543, 544*f*
citocina, 534*f*, 578
clases principales, 534*f*
clones de cDNA que codifican, 540
como activadores trasncripcionales, 17
degradación, 605
desensibilización, 544, 605
endocitosis, 538*f*, 544
ensayos
de expresión funcional, 540, 540*f*
de unión, 538, 538*f*, 539*f*
especificidad de unión, 536, 536*f*
funciones, 534*f*
internalización, 605
ligandos, 572*c*, 573*c*
marcación de afinidad, 539
membrana, 165
neurotransmisor. Véase *Receptores de neurotransmisores*
número involucrado en la señalización, 537*f*, 538
ocupados, 537, 537*f*
reciclamiento, 605
regulación en menos, 605, 606*f*
sensibilidad, 538
señuelo, 606, 606*f*, 607
sitios de acoplamiento, 579, 580*f*
tipos, 572*c*
usos terapéuticos, 607
en vías de señalización múltiple, 601
TGFbeta, 534*f*, 571, 572*c*, 574, 644
purificación, 575
Smad, 575, 576*f*, 577*f*
tipos, 575
tirosincinasas (RTK), 534*f*, 535, 572*c*, 574, 578, 587
activación, 578, 579*f*, 587
de la fosfolipasa C, 598
de la vía
IP3/DAG, 598
PI-3 cinasa, 598
Ras-MAP cinasa, 587
en cáncer, 587, 951
en la cascada de cinasas, 593*f*, 594
dimerización, 578, 578*f*
estructura, 578, 579*f*, 587
internalización, 605
mutaciones oncogénicas, 951
receptor factor de crecimiento epidérmico, 589, 589*f*
Sevenless, 590, 590*f*, 591*f*
transfosforilación, 587, 588*f*
unión
del ligando, 587, 588*f*
a las proteínas Ras, 589, 589*f*
en las vías de señalización múltiples, 601
de tiroxina, 482*f*, 483
unión del hialuronano, 219
wnt, 534*f*, 573*c*, 574
X del hígado (LXR), en el metabolismo lipídico, 766
Recombinación
célula somática, 390, 391*f*
entre elementos móviles, 422, 422*f*, 423*f*
en estudios de inactivación génica, 387, 388*f*
frecuencia, 396
homóloga
en la inactivación de genes, 387, 388*f*
en la producción de ratones knockout, 389, 389*f*
en la reparación de DNA, 967, 968
ligamiento, 396
meiótica, 396, 396*f*, 890, 891*f*
no homóloga, en la producción de un organismo/célula transgénica, 392, 392*f*
Recuperación de la fluorescencia luego de la fotodecoloración (FRAP), 152*f*, 153
Red
de filamentos, 176
neuronal, 294
de salida de la mitosis, 888
trans-Golgi, 701, 702*f*
brotación de vesículas, 719
Reducción, 54
Reemplazo de líquido, 275
Reflejo patelar, 294, 294*f*
Regeneración
hepática, 648, 648*f*
tisular, células madre, 902, 903*f*, 904*f*
Región(es)
de adhesión a la matriz (MAR), 428
asociadas con el armazón (SAR), 428
codificadoras, de genes, 406
de control de la transcripción, espaciamiento entre elementos reguladores, 468
determinantes de la complementariedad (CDR), 73
no traducidas (UTR), 113
en la regulación de la traducción, 518, 519, 520*f*, 521
en la represión de la traducción, 518, 519, 520*f*
Regulación
génica. Véase *Control génico*
proteica
alternación cinasa/fosfatasa, 85, 85*f*
cambios conformacionales, 83
compartimentación, 86
degradación/síntesis, 86
escisión proteolítica, 70, 71*f*, 85, 601, 725, 725*f*
mecanismos, 83, 83*f*, 84*f*, 85*f*
no alostérica, 85, 85*f*
de orden superior, 86
señalización, 86. Véase también *Señalización*
Regulador
de la fibrosis quística transmembrana (CFTR), 259
de la respuesta, 117
Remanentes de quilomicrón, 758. Véase también *Lipoproteína(s)*
Renaturalización, 68
Reparación del DNA
defectuosa, 470
en el cáncer, 961, 964, 964*c*
en las enfermedades genéticas, 964*c*
escisión
de apareamiento incorrecto, 965, 965*f*, 966*f*
de bases, 965, 965*f*
de nucleótido, 965*f*, 966
defectuosa, en cáncer, 966
mediante unión de extremos, 969, 969*f*
por recombinación homóloga, 967
de las roturas bicatenarias, 964*c*, 967
TFIIH, 469, 470, 470*f*, 967
Repeticiones
FG, 510, 511*f*, 514, 514*f*
heptad, 382*c*
invertidas, 415
de secuencia simple, 397
en tándem de DNA
en DNA satélite, 412, 413*f*
en fingerprinting de DNA, 413, 413*f*
terminales largas (LTR)
y retrotransposones, 410*c*, 417, 417*f*
Replicación
celular en el ciclo celular, 881. Véase también *Ciclo celular*
cromosómica
en la meiosis, 890, 891*f*
en la mitosis, 891. Véase también *Mitosis*
del DNA, 10*f*, 12, 131
antígeno T grande, 134, 134*f*, 135, 136*f*
apareamiento de bases, 131, 133. Véase también *Pares de bases*
centrómero, 433
en el ciclo celular, 854, 854*f*, 856
en las células de mamíferos, 883

Replicación *(Cont.)*
en la levadura, 878, 879
cinasas dependientes de ciclina, 136, 810, 825, 853, 855
desenrollamiento de hebras, 105, 106*f*, 107*f*, 133, 133*f*
deslizamiento de una hebra hija, microsatélites, 412
desnaturalización, 105, 106*f*
direccionalidad, 132, 133, 136*f*
DNA
mitocondrial, 438
polimerasas, 12, 133, 134, 134*f*
elementos funcionales, 433, 434*f*
formación de hebras, 131, 132*f*, 133, 135, 135*f*, 136*f*
fragmentos de Okazaki, 133, 133*f*, 135
hebra
conductora, 133, 133*f*, 134*f*
rezagada, 133, 133*f*, 134*f*
helicasas, 133, 135, 136*f*
horquilla de replicación, 133, 133*f*, 134*f*, 436
iniciación, 132, 133*f*, 135, 856
en levadura, 878, 879, 880*f*
en mitosis, 839*f*
modelo de DNA SV40, 133, 134*f*
molde, 10*f*, 12, 131
naturaleza semiconservadora, 131, 132*f*
nuclear, 171
panorama general, 102*f*
precursores, 132
primasa, 133, 134
renaturalización, 106, 106*f*
represión, en meiosis, 890
RPA, 134*f*, 135, 880
se limita a una vez por ciclo, 856, 879
sitios de iniciación, 133, 135, 433, 856
superenrollamiento, 106
topoisomerasas, 106
en virus, 139, 140*f*, 142
lisogenia, 141
Replisoma, 12, 66*c*
Repolarización, 277, 277*f*
de la membrana, 277, 277*f*
Represión, dominios, 462, 463*f*, 467, 467*f*
correpresores, 468
estructura, 467, 467*f*
secuencias de aminoácidos, 467
Represor(es)
corte y empalme, 507
lac, 115, 116*f*
transcripcionales, 115, 116, 116*f*, 448, 448*f*, 449, 462, 463*f*
bacterianos, 463
en la desacetilación de histonas, 474
dominios de unión al DNA, 462, 463*f*
estructura, 462, 463*f*, 467
mediadores, 471
Tumor de Wilm, 462
de la transcripción. Véase *Represores trp*, 116
Reproducción
asexual, 18
ciclo celular, 17. Véase también *Ciclo celular*
humana, 7
sexual, 18, 18*f*
Residuos de aminoácidos, modificaciones, 70, 70*f*
Resolución
microscópica, 184
óptica, 20
Respiración
celular, 306*f*, 307, 309
síntesis de ATP, 53
Respuesta a proteína desplegada, 679, 679*f*
Retículo
endoplasmático, 15, 166*f*, 168, 168*f*
direccionamiento de proteínas, 658, 658*f*
inserción proteica, 666
liso, 166*f*, 168, 168*f*
membrana. Véase *Membrana(s)*
componentes lipídicos, 153, 153*c*
superficie, 150, 150*f*
microtúbulos, 828, 828*f*
rugoso, 166*f*, 168, 168*f*, 659*f*, 660
modificaciones de proteínas, 673
síntesis
de oligosacáridos N-ligados y procesamiento, 704, 705*f*, 723
de proteínas, 658*f*, 659*f*, 660
translocación de proteínas a través, 659
transporte vesicular hacia y desde, 178*f*, 708, 709*c*, 716, 716*f*
unión de ribosomas. 659^,660
endoplasmático
hacia compartimiento intermedio del Golgi, 716
liso, 166*f*, 168, 168*f*. Véase también *Retículo endoplasmático*
rugoso, 166*f*, 168, 168*f*, 659*f*, 660. Véase también *Retículo endoplasmático*
modificación de proteínas, 673
síntesis
de oligosacáridos N-ligados y procesamiento, 704, 705*f*, 723
de proteínas, 658*f*, 659*f*, 660
sarcoplasmático
en la contracción muscular, 253, 254, 254*f*, 799
iones Ca^{2+}, 253, 254, 254*f*, 799
trans-Golgi. Véase *Complejo de Golgi, región trans*
Retina, fotorreceptores, 556, 561*f*
Retinitis pigmentaria, 399
Retinoblastoma
esporádico, 946, 947*f*
hereditario, 884, 946, 958
Retrotransposones, 410*c*, 417, 417*f*
LTR (viral), 417, 417*f*
en levadura, 417, 419*f*
en *Drosophila*, 417
no virales, 410*c*, 420, 420*f*, 421*f*
virales, 417, 417*f*
Retrovirus, 142, 142*f*. Véase también *Virus*
de acción lenta, 946
brotación, 733, 734*f*
ciclo vital, 142*f*, 418*f*, 419
como retrotrasposones, 415, 417
definición, 142
oncogénicos, 142, 945, 953
repeticiones terminales largas, 417, 417*f*, 418*f*
SFFV, 953
transcripción, 142*f*, 417, 417*f*
inversa, 142*f*, 418*f*, 419
en la transducción, 946
RF1/2, 129
Rfc, en la replicación de DNA, 134, 134*f*
Rho cinasa, en la activación de la miosina, 800
Ribonucleasa P, 528, 528*f*
Ribonucleósido trifosfato (rNTP), en la transcripción, 109, 110*f*
Ribonucleótidos, 124*f*
Ribosa, 40, 40*f*
Ribosomas, 66*c*, 119
bacterianos, 124
cambios conformacionales, en la traducción, 127*f*, 128, 129
ensamblaje, 127, 127*f*
estructura, 124, 124*f*, 129*f*
mitocondriales, 439
modelos, 129*f*
en el movimiento celular, 80*c*
pioneros, 523
reciclaje, 130, 131*f*
en el retículo endoplasmático rugoso, 168
similitud, 124
en la síntesis de proteínas, 123. Véase también *Síntesis, traducción*
subunidades, 124, 124*f*
ensamblaje, 526, 526*f*
transporte nuclear, 526
tamaño, 124
en la traducción, 11. Véase también *Traducción*
translocación, 125, 127, 127*f*, 128*f*
unidos al retículo endoplasmático, 658*f*, 659*f*, 660
Ribozimas, 107, 527
Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa (rubisco), 342, 342*f*, 344
en la fotorrespiración, 345, 345*f*
translocación, 691
Riñón, membrana basal glomerular, 212
RNA
apareamiento de bases, 107, 108*f*
asociado a proteínas, 528
catalítico, 107, 527
como ribozima, 527
conformación, 107, 108*f*
direccionalidad, 103, 103*f*
dominios, 107
estructura, 107, 108*f*
química, 37*f*
de hebra doble, en la interferencia de RNA, 393, 393*f*
heterogéneo nuclear, 495
de interferencia corta, 518
micro, 518, 909
nucleótidos, 40
pequeño
nuclear. Véase *snRNA (RNA nuclear pequeño)*
síntesis, 11. Véase también *Transcripción*
en la traducción, 119. Véase también *Traducción*
transferencia. Véase *tRNA*
RNA 5S, 526
RNA
de hebra doble, en interferencia del RNA, 393, 393*f*
de interferencia corta (siRNA), 518
mensajero (mRNA). Véase también *RNA*
casquete 5', 112, 113*f*
adición, 493, 504
degradación, 521, 521*f*, 522
en la traducción, 126, 126*f*, 127
circular, 130, 130*f*
codones, 119, 120*c*, 121*c*, 121*f*
concentración, 521
en el control génico, 16
copias genómicas no funcionales, 422
corte y empalme alternativo, 114, 114*f*
degradación, 521, 521*f*
mediada por mutaciones sin sentido, 523
desadenilación, 521, 522*f*
eliminación del casquete, 522, 522*f*
proteínas de unión
a elemento de respuesta al hierro, 522, 522*f*
al RNA, 522, 522*f*
estabilidad, 521
en genoteca de cDNA, 365, 366*f*, 368*f*
localización, 523
materno, 629
monocistrónico, 406
movimiento ribosómico, 125
policistrónico, 406
precursor, 112
procesado inapropiadamente, traducción, 523
procesamiento del pre-mRNA, 493. Véase también *Procesamiento de pre-mRNA*
regiones no traducidas, 113
en la represión de la traducción, 518, 519, 520*f*
síntesis, 66, 67*f*
sitios de inicio de la traducción, 406
en la traducción. Véase *Traducción*
transporte nuclear, 509
de unidades de transcripción simples vs. complejas, 407, 407*f*
vida media, 521
viral, transporte nuclear, 515, 516*f*
nuclear pequeño. Véase *snRNA (RNA nuclear pequeño)*
polimerasa
I, 450
estructura, 450, 451*f*, 452*f*
en la iniciación de la transcripción, 450, 486, 487*f*
en la terminación de la transcripción, 485
II
complejo mediador, 477, 478*f*
dominio carboxilo terminal, 452, 452*f*, 494, 501, 501*f*
elongación de la cadena, 501, 501*f*
estructura y función, 450, 451*f*, 452*f*
en la formación del casquete 5', 493
en la iniciación de la transcripción, 450, 451*f*, 469
complejo de preiniciación de la transcripción, 469, 470*f*, 471
factores generales de la transcripción, 469, 470*f*
proteína de unión a caja TATA, 469, 470*f*
en la transcripción
de genes del golpe térmico, 486
de genoma de HIV, 485, 485*f*
unión a dominio de activación, 477, 478*f*
III, 450
estructura, 450, 451*f*, 452*f*
en la iniciación de la transcripción, 450, 451*f*, 452*f*, 487, 487*f*
en la terminación de la transcripción, 485
ribosómico. Véase *rRNA*
de transferencia (tRNA). Veáse *tRNA*
RNasaP, 528, 528*f*
RNP
heterogéneos. Véase *hnRNP*
mensajeras. Véase *mRNP*
pequeñas
nucleares. Véase *snRNP*
nucleolares. Véase *snoRNP*
Rodopsina, 556
activación mediada por cGMP, 558, 558*f*
activado por luz, 556, 557*f*
adaptación visual, 560, 560*f*
cinasa, 560, 560*f*, 561*f*
estructura, 559*f*
Gt, 556, 559, 559*f*, 560, 560*f*
localización, 556, 557*f*
modelo operacional, 558*f*
RPA, en la replicación de DNA, 134*f*, 135, 880
rRNA (RNA ribosómico), 124, 124*f*. Véase también *RNA*
como catalistas, 128
genes codificadores repetidos en tándem, 410*c*, 412, 422
grande, 124
pequeños, 124
secuencias nucleotídicas, 124
síntesis. Véase también *Transcripción*
en el nucléolo, 171
RNA polimerasa III, 450
en la traducción, 119, 124, 124*f*, 128
Rubisco, 342, 342*f*, 344
en la fotorrespiración, 345, 345*f*
translocación, 691
runt, 635

S

SnoRNA, en las subunidades ribosómicas, 526, 526*f*
Sacáridos, estructura química, 37*f*
Sacarosa
estructura, 42, 42*f*
fotosíntesis
ciclo de Calvin, 342, 343*f*
fijación del carbono, 344
transporte, en plantas, 346*f*, 347
Saccharomyces cerevisiae. Véase también *Levaduras*
ciclinas, 877, 878*f*, 879*f*
cinasas dependientes de ciclina, 878, 878*f*, 879*f*
como organismos
experimentales, 24, 25*f*, 355
haploides vs diploides, 353, 355
complejidad genómica, 384, 384*f*
complejos ciclina-CDK, 858*c*
construcción interruptora, 387, 388*f*
DNA no codificante, 409, 409*f*
especificación del tipo celular, 910, 911*f*, 912*f*
genes, identificación, 383, 383*f*
huso mitótico, 840
meiosis, 890, 891*f*
mutaciones sensibles a la temperatura, 356, 358
orígenes de replicación, 879, 880*f*
proteoma, 60
regulación del ciclo celular, 874, 875*f*
replicación del DNA, 879, 880*f*
reproducción, 6, 6*f*
RNA polimerasas, 451, 451*f*
secuencias
de activación en dirección 5', 457
centroméricas, 435
segregación alélica, 355, 355*f*, 356*f*
transcripción, represión, 471, 472*f*, 473*f*

Saccharomyces cerevisiae (Cont.)
vías de MAP cinasa, 596, 596*f*, 597*f*
scute, 918
Schizosaccharomyces pombe, 857. Véase también *Levaduras*
complejos ciclina-CDK, 858*c*
mutantes
cdc, 857, 857*f*, 864, 865*f*
wee, 864, 865, 866*f*
regulación del ciclo celular, 864, 864*f*, 865*f*, 866*f*, 867*f*, 875. Véase también *Ciclo celular*
secuencias centroméricas, 435
Salteo de exones, 408, 523
enfermedades genéticas, 501
Sangre, concentración iónica, 253*c*
Sar1, en la formación de vesículas recubiertas, 709, 709*c*, 710*f*
Sarcoma, 938. Véase también *Cáncer*
Sarcómeros, 66*c*, 797, 811*f*
acortamiento, 797
discos Z, 788, 788*c*, 788*f*, 797*f*, 798, 811*f*
estructura, 797*f*
filamentos
delgados, 797, 797*f*
gruesos, 797, 797*f*
SCAP, en el metabolismo del colesterol, 764, 764*f*, 766
Scc1, 872, 892
SCF, en la regulación del ciclo celular, 878, 878*f*
Schleiden, Matthias, 184
Schwann, Theodore, 184
SecA, en la translocación proteica bacteriana, 680, 681*f*
Secreción
constitutiva, 703, 724
proteica
constitutiva, 702*f*, 724
regulada, 724
regulada, de neurotransmisores, 735, 737*f*
Secretogranina II, 724
Secuencia(s)
activadoras en dirección 5', 457
de aminoácidos, 11, 61, 61*f*
bases de datos, 380, 381*f*
en BLAST, 26
correlatos funcionales, 67, 380, 381*f*
determinación, 95, 97
identificación, 26
de anclaje de señales, 668, 669*f*, 670*f*
CEN, 434*f*, 435, 435*f*
centromérica de levadura (CEN), 434*f*, 435, 435*f*
del centrómero (CEN), 434*f*, 435, 435*f*
consultada ("query"), 380
de detención de transferencia-anclaje, 667, 668*f*, 670*f*
de direccionamiento
a la matriz, 683*c*, 684, 684*f*, 685, 685*f*, 686, 687*f*, 688, 688*f*, 690, 690*f*
peroxisómica, 693, 694*f*, 695*f*
al tilacoide, 683*c*, 691, 692*f*
de entrada en la estroma, 683*c*, 691
de incorporación
de C-terminales, en los peroxisomas, 683*c*
del direccionamiento. Véase *Secuencias señal*
de inserción, 415, 415*f*, 416*f*
bacteriana, 415, 415*f*, 416*f*
de Kozak, 126
ortólogas, 382*f*, 383
palindrómicas, sitio de restricción, 361
parálogas, 382*f*, 383
proteicas, 10
en BLAST, 26
correlatos funcionales, 67, 380
determinación, 95, 97
homóloga, 382*f*, 383
identificación, 26, 380, 381*f*
algoritmos, 380, 384
bases de datos, 380, 381*f*
marcos abiertos de lectura, 383, 383*f*
modelo del ratón, 384
motivos, 63, 64*f*, 163, 163*c*, 163*f*, 177
ortólogas, 382*f*, 383
parálogas, 382*f*, 383
de repetición directa, 416, 416*f*
de replicación autónoma (ARS), 433, 434*f*
RGD, 221, 221*f*, 222, 222*f*
señal, en el direccionamiento de proteínas, 658*f*, 659
en bacterias, 682
en cloroplastos, 683, 683*c*
en mitocondrias, 683, 683*c*, 684*f*
de proteínas
integrales, 667, 667*f*, 668*f*
secretorias, 658*f*, 659, 660, 660*f*, 661*f*
de señalización N-terminales. Véase *Secuencias señal*
silenciadoras, 17, 472
TAR, en el HIV, 485, 485*f*
TEL, 434*f*, 435
teloméricas, 434*f*, 435
topogénicas, en proteínas integrales, 666, 668*f*, 669, 669*f*, 670*f*, 672*f*
identificación, 671, 672*f*
tipos, 666, 668*f*, 669, 669*f*, 670*f*
tetratricopeptídica, 833
Secuenciación de proteínas, bases de datos, 380, 381*f*
Secuestrantes de ácidos biliares, 772*f*, 773
Segmento
inactivador del canal, 279, 283*f*, 284
P, en los canales de iones, 263, 263*f*, 282
Segregación
de cromosomas
en la meiosis, 355
en la mitosis, 853, 870, 871*f*, 872*f*
Segundo(s) mensajero(s), 230
1,2-diacilglicerol, 541, 541*f*, 561, 562*f*
amplificación de señales, 552
Ca^{2+}, 289, 541, 557, 563, 564*f*
calmodulina, 256, 563, 564*f*
cAMP, 541, 541*f*, 545*c*, 548, 550*f*, 564
cGMP, 541, 541*f*, 545*c*
fosfoinositol, 541, 561, 562*f*, 598
fosfolipasa C, 561
en la glucogenólisis, 617, 617*f*
inositol fosfolípidos, 541, 561
intracelular, 541, 541*f*
Segurina, 856, 872, 872*f*, 878
Selectinas, 199, 199*f*. Véase también *Moléculas de adhesión celular (CAMS)*
E, en la extravasación de leucocitos, 228, 228*f*
en la extravasación de leucocitos, 227, 228*f*
Semaforinas, 613
Semiquinona, 319, 319*f*
Señal(es)
clasificación, 708*f*, 711, 711*c*, 716, 717*f*, 729, 729*f*
diacídicas, 711*c*, 716
KDEL, 711*c*, 717, 717*f*
KKXX, 711*c*, 717
en lipoproteínas de baja densidad, 729
LL, 711*c*
manosa-6-fosfato, 711*c*, 721, 722*f*, 723
NPXY, 711*c*, 730
YXXö, 711*c*, 720, 730
graduadas, 623
tipos, 534, 534*f*
de clasificación
Leu Leu, 711*c*
LL, 711*c*
Lys-Asp-Glu-Leu, 711*c*, 717, 717*f*
Lys-Lys-X-X, 711*c*, 717
Try-X-X-ö, 711*c*
YXXö, 720, 730
de localización nuclear (NLS), 510, 510*f*, 513, 514, 576
poli (A) AAUAAA, 496*f*, 497, 520, 520*f*
Señalización, 16. Véase también *Unión del ligando al receptor*
en la activación del factor de la transcripción, 482, 484*f*, 534*f*, 535, 567, 571, 572*c*, 573*c*
adenilciclasa, 548, 550, 550*f*
adhesión intercelular, 198*f*, 200, 612
análisis genéticos, 621, 622*f*
en animales, 535
antagonistas
inducible, 651
no inducible, 651
en la apoptosis, 929, 929*f*
en el arco reflejo, 294, 294*f*
autocrina, 535
beta-arrestina, 554, 554*f*
bucles de retroalimentación negativa, 577, 577*f*
cambios proteicos funcionales/cuantitativos, 535
cascada de cinasas, 593, 593*f*
cebado, 648*f*, 649
en células musculares, 227
en la cicatrización de heridas, 803
de citocina
mediante proteínas SOCS, 585*f*, 586
regulación SHP1, 585
vía JAK-STAT, 582
en la clasificación de proteínas, 708*f*, 711, 716, 717, 717*f*, 720, 729
competencia celular, 648
en la contracción muscular, 227, 800
en el desarrollo, 16, 621. Véase también *Desarrollo*
cantidades de señal graduada, 621, 642
extracelular, 639
inductivo, 621, 621*f*, 644, 645*f*
morfógeno, 623, 624
desensibilización homóloga, 553
en el direccionamiento de proteínas, 658*f*, 659, 660, 660*f*, 661
duración/fuerza de la señal, 649
efectos
a corto plazo, 565
a largo plazo, 565
eliminación de un inhibidor, 559
en la endocitosis mediada por receptores, 729
endocrina, 16, 16*f*, 535
en el ensamblaje del citoesqueleto, 804*f*
escisión de proteínas, 601
estudio experimental
hibridación in situ, 614, 614*f*
interferencia por RNA, 616
micromatrices
de DNA, 614, 615, 616*f*
de proteínas, 615, 616*f*
Northern blot, 614
Western blot, 614
desde el exterior hacia el interior, 209
finalización, 544
fosfoinosítidos, 598
fosforilación, 602
proteica, 543
gradiente de concentración, 260
en hipoxia, 619, 620*f*
hormonas, 16, 16*f*
en la inducción del cáncer, 948, 949*f*
inductiva, 621, 621*f*, 643
análisis genético, 621, 622*f*
en *C. elegans*, 624, 624*f*
mecanismo
de gradiente, 623, 623*f*, 643
de retransmisión, 623, 623*f*, 643
recíproca, 644, 645*f*
en *Xenopus*, 623
inhibición lateral, 644, 646
integrada, 648, 650*f*
integrinas, 209, 226
interferencias, 574
desde el interior hacia el exterior, 209
iones calcio, 289, 541, 557
irreversible, 601
en levadura, 596, 596*f*, 597*f*
MAP cinasas, 594
en el metabolismo de la glucosa, 550, 551, 552*f*, 617, 617*f*
en el metabolismo óseo, 606, 606*f*
en la miogénesis, 917, 917*f*
en la neurogénesis, 647, 651, 652*f*
neuronal, 278. Véase también *Potencial de acción; Neurotransmisor(es)*
NF-κB, 573*c*, 601, 602*f*
panorama general, 533, 535
paracrina, 535
pasos, 534
en la producción de células madre, 903
propósitos, 214
proteínas, 16
adaptadoras, 554, 554*f*
de anclaje, 554, 555*f*
G, 542, 542*f*, 545, 546*f*
interruptoras de GTPasa, 84, 85*f*, 129, 542, 542*f*, 588
proteincinasa A, 550, 551, 552*f*
proteoglucanos, 214
de la superficie celular, 644
en la proteólisis regulada intramembrana, 603
receptores. Véase *Receptor(es)*
regulación, 605
en la regulación
del ciclo celular, 882
en menos, 605
del músculo cardíaco, 556, 556*f*, 564, 564*f*
respuesta celular, 535, 611, 612*f*, 615, 648
diversidad, 649
factores que afectan, 651
reversibilidad, 600, 601
segundos mensajeros, 230, 541, 541*f*
señales múltiples, 611
de la superficie celular, 533
supresión por retroalimentación, 553
terminología, 535
transducción de señales intracelulares, 541
en el transporte
nuclear, 510, 510*f*, 512, 513, 513*f*, 514
vesicular, 708*f*, 711, 711*c*, 716, 717*f*, 729
ubicuitinación, 602, 602*f*
uniones de hendidura, 230
vías. Véase *Vías de señalización*
abajo, 649
en la visión, 556
Separación de cargas, 334, 336
Separasa, 872, 872*f*, 892
Serina, 38, 39*f*, 40. Véase también *Aminoácido(s)*
Serotonina. Véase también *Neurotransmisor(es)*
estructura, 288*f*
procesados, 410*c*, 422
Seudogenes procesados, 410*c*, 422
Seudonudos, 107
Seudópodo, 803
Seudosustrato, 83
sevenless, 590, 591*f*, 594
Severina, 788*c*
sex-lethal, 505, 506*f*
SF/HGF, 917
Shh
en el desarrollo de extremidades, 650*f*, 651
en el tubo neural, 643
short gastrulation, 628
SHP1 fosfatasa, en la señalización de citocinas, 585
Sic1, 878, 878*f*, 879
SIDA. Véase *Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana*
Simportadores, 247, 247*f*, 268, 269*f*
de dos Na^+/una glucosa, 268, 269*f*, 274, 274*f*
en la inactivación de neurotransmisores, 290
de sodio
colina, 290
glucosa, 268, 269*f*, 274, 274*f*
Sinapsina, 736
Sinapsis, 277, 277*f*, 278*f*, 287, 396, 396*f*, 892
definición, 287, 736
interneurona, 293, 293*f*
química, 278*f*, 543
en las uniones neuromusculares, 290, 291*f*
Sinaptotagmina, 737
Sincitio, 625, 626*f*, 914
Sindecanos, 214
Síndrome
de Alport, 212
de Bloom, 964*c*
de Bruck, 218
de Cockayne, 470
de Ehlers-Danlos, 218
de fragilidad del X, 519
de Goodpasture, 212
de inmunodeficiencia adquirida. Véase *Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana*
Kearns-Sayre, 442
de Zellweger, 694
SINE, 410*c*, 420, 421
Sintaxina, 712, 712*f*, 736, 873. Véase también *Proteínas SNARE*
Síntesis
de DNA. Véase *Replicación de DNA*
Mit, oxidación de ácidos grasos, 301, 308*f*
de proteínas
en bacterias, 680
en cloroplastos, 683
GTP, 661, 663*f*
microsomas rugosos, 660, 660*f*

Síntesis *(Cont.)*
en la mitocondria, 683
pasos, 11, 11*f*, 658*f*, 663*f*
proceso, 102*f*. Véase también *Procesamiento de RNA; Transcripción, Traducción*
de proteínas secretorias, 658*f*, 659, 660*f*
regulación, 86
en el retículo endoplasmático, 15
ribosomas, 123, 168, 169*f*
sobre el retículo endoplasmático rugoso, 166*f*, 168, 168*f*, 169*f*, 659, 660
traduccional, 11, 11*f*. Véase también *Traducción*
transcripcional, 11, 11*f*. Véase también *Translocación de proteínas*
translocación cotraduccional, 661, 661*f*
siRNA (RNA de interferencia corta), 518. Véase también *RNA*
Sistema
de amortiguación Argos, 651
de dos híbridos de levadura, 480, 480*f*, 594
de escisión-reparación, 965, 965*f*, 966*f*
del DNA, 964
de expresión
bacteriana, 377, 378*f*
en *Escherichia coli*, 377, 378*f*
inmune
degradación proteica, 72
interacción antígeno-anticuerpo, 73, 74*f*
oligosacáridos, 675
vía Toll/Dorsal, 632
vías de señalización de NF-κB, 573*c*, 601, 602*f*
de raíz, 231
de recombinación loxP-Cre, 391, 391*f*
de secreción bacteriana, 681, 681*f*, 682*f*
Sitio(s)
A, 125, 127*f*, 128
activo, 75
de contacto, en el direccionamiento de proteína mitocondrial, 686, 687*f*
de corte y empalme, 406, 498, 498*f*
E, 127, 127*f*, 128
de inicio
de la traducción, 406
de la transcripción, 110*f*, 453, 453*f*
interno de entrada en los ribosomas, 127
P, 125, 127
poli(A), 406, 496*f*, 497
alternativos, 407*f*, 408, 504
de restricción, 361
de unión
ATP/GTP, 382*c*
al ATP, 75, 76*f*
al grupo prenilo, 382*c*
Smads
mutaciones, en el cáncer, 956
oncoproteínas, 577
receptores del factor de crecimiento en transformación, 575, 576*f*, 577*f*
Smaug, 631
Smoothened, 641, 641*f*, 642, 651
SNAP-25, 736
snRNA (RNA nuclear pequeño), 410*c*, 422. Véase también *RNA*
apareamiento de bases de pre-mRNA, 499, 499*f*
en el corte y empalme, 499, 499*f*
en el corte y empalme, 499, 499*f*, 502, 503*f*
evolución, 502, 503
genes repetidos en tándem, 410*c*, 411, 422
snRNP, 499
corte y empalme, 499, 500*f*, 501, 502*f*, 503, 515
en empalmosomas, 499, 500*f*, 515
snoRNA (RNP nucleolares pequeños), 526
Solubilidad
efecto hidrófobo, 35, 35*f*
enlaces de hidrógeno, 33, 34*f*
de lípidos, hidrofobicidad, 246
Soluciones
acuosas
efecto hidrófobo, 35
iones, 33, 33*f*
concentraciones iónicas, membrana permeabilidad, 164, 164*f*
hipertónicas, flujo acuoso, 164, 164*f*, 272
hipotónicas, flujo acuoso, 164, 164*f*, 272
isotónicas, flujo acuoso, 164, 164*f*, 272
Somitas, 914, 914*f*
Sondas de DNA
amplificación por PCR, 376
en los ensayos de hibridación sobre membrana, 367, 367*f*
de oligonucleótidos, 367, 367*f*, 368, 368*f*
en el rastreo (screening) en las genotecas de cDNA, 367, 367*f*, 368
síntesis, 368, 368*f*
Sonic Hedgehog (Shh)
en el desarrollo de extremidades, 650*f*, 651
tubo neural, 643
Sonicación, 180
Southern blot, 376*f*, 377
en las huellas dactilares del DNA *(fingerprinting)*, 413, 413*f*, 414
Spätzle, 627, 629
Spt4/5, en la transcripción, 486
SR-BI, en la incorporación de los ésteres de colesterol, 762, 762*f*
START
en levaduras, 874, 882
en las proteínas de transporte lipídico, 753
Ste12, 912
STI-571, 955
Subclonación, 371
Subunidad(es)
9 de la ATP sintasa, direccionamiento, 688, 688*f*
de moléculas pequeñas, 30*f*
proteicas, 64, 65*f*
ensamblaje, 678
proteínas, 64, 65*f*
Succinato deshidrogenasa, en el ciclo del ácido cítrico, 310, 310*f*
Superenrollamiento, en la replicación del DNA, 106, 107*f*
Superfamilia
G de la inmunoglobulina. Véase *Superfamilia IgG*
de la GTPasa, 84, 129, 542, 588
de homología al dominio calponina, 782, 783*c*
de las IgG, 199, 199*f*, 227. Véase también *Moléculas de adhesión celular (CAM)*
en la extravasación de los leucocitos, 228, 228*f*
moléculas
de adhesión celular neural, 227
de unión de adhesión, 207
de receptores
esteroides, 464
nucleares, 464, 482, 482*f*, 573*c*
TGFbeta, 574, 577
Supresión
genética, 359, 360*f*
por retroalimentación, en la señalización, 553
Sustrato(s), 74
enzimáticos, 74
unión, 75, 76*f*
unión, 75, 76*f*. Véase también *Unión de proteínas*
mediante proteincinasas, 75, 76*f*

T

t-SNARE, 708, 708*f*, 736. Véase también *Proteínas SNARE*
tailless, 633
Talasemia, 515
Tallo
bucle, 107, 108*f*
vegetal, 231
Tamaño
del campo blanco, para neuronas, 925, 926*f*
del paso
de las cinesinas, 833
de miosina, 794
Taq polimerasa, 375
Tasa de rendimiento, 795
Tau, 824, 824*c*, 824*f*
Taxol, 825
Técnica(s)
de inmunoprecipitación de la cromatina, 474*f*, 475

genéticas moleculares, 22, 351
en el análisis genético, 22, 352
en la genómica, 380
en la tecnología del DNA recombinante, 361
utilizando fragmentos de DNA clonados, 371
Tecnología
del DNA. Véase *Tecnología del DNA recombinante*
recombinante, 361
electroforesis en gel, 371
fragmentos clonados, 371
genotecas de DNA, 364, 365, 366*f*
marcación con epítopo, 379, 380*f*
método
de terminación de cadena o método dideoxi, 372, 372*f*, 373*f*, 374*f*
de clonación, 361, 371. Véase también *Clones/clonación*
Northern blot, 377, 377*f*
en enfermedades genéticas, 398
Southern blot, 376*f*, 377
transfección, 378, 379*f*
transformación celular, 379, 379*f*
vectores de expresión, 378, 378*f*
Western blot, 92*f*, 93, 614
reproductiva, 8
Tejido(s)
conectivo
agregado de proteoglucanos, 219, 220*f*
colágeno, 218*f*, 219
lámina basal, 210, 210*f*
matriz extracelular, 216
presión de turgencia, 219
propiedades similares a las del gel, 219, 220
definición, 197
dérmico, en plantas, 231
esporógeno, 231
neural, uniones de hendidura, 230, 230*f*
procesos de adhesión celular, 199, 199*f*, 200*f*
de sostén, 231
tipos, 197
vascular, en plantas, 231
vegetales, 231
dérmicos, 231
esporógeno
organización, 231
sostén
vascular, 231
Telofase, 838, 839*f*, 854. Véase también *Ciclo celular*
iniciación, 879
en plantas, 848, 849*f*
reensamblaje de la envoltura nuclear, 873, 873*f*
Telomerasa, 436, 436*f*
en el cáncer, 969
como transcriptasa inversa, 437
en el crecimiento de tumores, 437
Telómeros, 26, 969
definición, 413
DNA satélite, 413
silenciamiento de genes, 471, 473*f*
Tem-1, 888
Temperatura
no permisiva, 357
permisiva, 357
Tendones, colágeno, 218
Terapia de rehidratación, 275
Terminales axonales, 277, 277*f*
en vesículas sinápticas, 290
Termogenina, 330
Termus thermopolis, ribosoma, 124, 129*f*
Tetrahymena termophila
autoprocesamiento, 527, 527*f*
movimiento rítmico de cilios, 837
replicación, 435, 436
TFIIA, 470, 470*f*
TFIIB, 469, 470*f*
TFIID, 469, 470, 476
TFIIH, 469, 470*f*
en la reparación del DNA, 469, 470*f*, 967
TGFbeta
en la activación de la serina/treonina cinasa, 575
estructura, 574, 575*f*
síntesis, 574, 575*f*
TGFbeta-1, 574
TGFbeta-2, 574
TGFbeta-3, 574
Tilacoides, 172, 172*f*, 331, 332*f*
Timidinacinasa, en la vía de rescate de nucleótidos, 239, 239*f*
Timina, 40, 40*f*
en la doble hélice, 103, 104*f*, 105*f*
Timosina beta4, 786, 787*f*
Tinción, 186
de cromosomas, 431, 431*f*, 432*f*
con eosina, 186
fluorescente, 187
hematoxilina, 186
inmunohistoquímica, 614
con oro, 190, 191*f*
con tetróxido de osmio, 191
Tiorredoxina (Tx), 344
Tipo sanguíneo
A, 161, 162*c*, 162*f*
AB, 162, 162*c*, 162*f*
B, 161, 162*c*, 162*f*
Tirosina(s), 38, 39*f*. Véase también *Aminoácido(s)*
fosforilación, en la vía de JAK-STAT, 583, 584*f*
Todo-*trans*-retinal, 556
Topoisomerasa I/II en la replicación del DNA, 106, 133, 135
Traducción, 68
activación de aminoácidos, 122*f*, 123
aminoacil-tRNA, 121, 122*f*
sintetasas, 121, 122*f*, 123
anticodones, 119, 121, 122, 123*f*
apareamiento de bases, 128
en el aprendizaje y la memoria, 520
en bacterias, 128*f*
codón de inicio, 120, 121*f*, 125, 126*f*
codones, 120, 121*f*, 122, 125, 126*f*
definición, 101, 109, 119
en el desarrollo temprano, 630, 631*f*
elongación, 127, 127*f*
factores de liberación, 129
fuente de energía, 123
GTP, 662
inhibición antisentido, 518
iniciación, 125, 126*f*
codón de, 120, 121*f*, 125, 126*f*
pasos, 126*f*
marcos de lectura, 120, 121*f*
mRNA, 119, 119*f*, 121, 121*f*
del mRNA inapropiadamente procesado, prevención, 523
panorama general, 102*f*, 119
pasos, 121, 122*f*, 126*f*, 127*f*
poliadenilación citoplasmática, 519
polirribosomas, 130
en procariontes, 112
proteína de unión al elemento de respuesta al hierro, 522, 522*f*
proteínas de unión al RNA, 522, 522*f*
reacción peptidiltransferasa, 128
en la regulación
del ciclo celular, 884
del linaje celular, 909
regulación mediada por proteínas, 519
represión por miRNA, 518
ribosomas, 123
pioneros, 523
rRNA, 119, 124, 124*f*
sitio
A, 125, 127*f*, 128
E, 127, 127*f*, 128
P, 125, 127
de iniciación, 406
terminación, 129, 130*f*
translocación, 125, 127, 127*f*, 128*f*
de proteínas, 661, 661*f*, 662*f*, 663*f*
tRNA, 119, 121, 122*f*, 123*f*
velocidad, 130
vigilancia del mRNA, 523
en virus, 139, 140*f*, 142
Transcitosis, 727, 735, 735*f*
Transcripción
activación. Véase *Transcripción, iniciación*
análisis
de la cadena naciente, 448
de iniciación, 448, 449*f*
arrestina, 567
en bacterias, 111, 112*f*, 115, 116*f*
caja TATA, 454, 455*f*, 457, 458*f*, 470
cAMP, 566*f*, 567
coactivadores, 467, 476
en el control génico. Véase *Control génico*

Transcripción *(Cont.)*
definición, 109
en el desarrollo, 628, 628*f*, 635, 635*f*
temprano, 625, 628
en dirección
3', 109, 449
5', 109
direccionalidad, 109
del DNA de los cloroplastos, 488
DNA mitocondrial, 438, 439, 440, 488
elongación
de la hebra, 110, 110*f*
regulación, 485
en la especificación del tipo celular, 910, 911*f*, 912*f*
en estallidos cortos, 521
etapas, 11, 11*f*, 109, 110*f*
factores
de crecimiento, 883
de transcripción, 449, 469
en la fase G1, 854, 854*f*
fosfolipasa A, 567
fusión del DNA, 105, 106*f*, 110, 110*f*
del genoma del HIV, 485, 485*f*
iniciación, 11, 17, 66, 66*c*, 67*f*, 109, 110*f*, 447
acetilación de histonas, 475, 476, 476*f*
activadores, 17, 115, 116, 117, 118, 118*f*, 448, 448*f*, 461, 461*f*, 462*f*, 467, 467*f*, 478. Véase también *Dominios de activación*
amplificadores, 117, 456, 457*f*, 458*f*, 468, 468*f*
en bacterias, 115
bucle de DNA, 478
CAP, 115, 116*f*
en cloroplastos, 488
coactivadores, 467, 476
complejo de preiniciación de la transcripción de la Pol II, 469, 470*f*, 471
en el control génico, 115. Véase también *Control génico*
correpresores, 468
elementos proximales del promotor, 455, 456*f*, 457, 458*f*
factores remodeladores de la cromatina, 476, 477*f*
hormonas, 482, 483*f*, 484*f*
inductores, 116
islas CpG, 455
mecanismos moleculares, 471
en procariontes, 115
promotor(es), 66, 109, 111*f*, 116, 454
lac, 378
iniciadores, 454, 457, 458*f*
regulación combinatoria, 465
represión. Véase *Transcripción*
en levaduras, 910, 911*f*, 912*f*
en mamíferos, 503
molde, 109
del operón, 111, 112*f*
panorama general, 102*f*, 109, 110*f*
poli (A) polimerasa, 113
pre-mRNA, 110*f*, 112, 493. Véase también *Procesamiento del pre-mRNA*
pre-
mRNA, 525, 525*f*, 526*f*
tRNA, 528, 528*f*
procesamiento del RNA, 110*f*, 112, 113*f*
proteína
cinasa A, 567
CREB, 567
sensora/receptora, 117, 118*f*
de unión a la caja TATA, 469, 470*f*
receptores acoplados a la proteína G, 565, 566*f*
en la regulación del ciclo celular, 883, 884*f*
regulación combinatoria, 465
represores, 115, 116, 116*f*, 448, 448*f*, 462, 463*f*, 467, 467*f*, 468. Véase también *Represores*
desacetilación de histonas, 474, 474*f*, 475*f*
factores de remodelación de la cromatina, 477
heterocromatina, 471
en levaduras, 471, 472*f*, 473*f*
mediada por la cromatina, 471, 472*f*, 473*f*
RNA
mensajero, 11, 11*f*
polimerasa, 11, 11*f*, 109, 110*f*, 111*f*, 116, 117*f*, 450, 451*f*, 469, 485
de rRNA 5S, 526
de SINE, 421
sistemas de dos componentes, 117, 118*f*
sitios, 66, 453, 453*f*, 455
de snoRNA, 526
terminación, 17, 110, 110*f*, 485, 485*f*
de tRNA, 450
velocidad
análisis de micromatriz de DNA, 615, 616*f*
carga de RNA polimerasas, 411, 412*c*
en el desarrollo temprano, 625
genes repetidos en tándem, 411, 412*c*
medición, 448, 449*f*
en virus, 139, 140*f*, 142
Transcripción
en dirección
3', 109, 449
5', 109
inversa, 142*f*, 418*f*, 419
del RNA LINE, 420, 421*f*
Transcriptasa inversa, 142, 142*f*
en la creación de la genoteca de cDNA, 365
telomerasa, 437
en la transposición, 414, 415*f*, 419
Transcripto(s)
extremo 3', 110, 496, 496*f*, 504
escisión y poliadenilación, 496, 496*f*
poliadenilación, 496, 496*f*
extremo 5', 110, 504
formación del casquete, 112, 113*f*, 493, 504
en la traducción, 126, 127*f*
primarios, 110, 110*f*, 493
deRNA
extremo 3', 110, 496, 496*f*, 504
escisión y poliadenilación, 496, 496*f*
extremo 5', 110, 504
formación del casquete, 112, 113*f*, 493, 504
en la traducción, 126, 127*f*
Transducción
de señales, 574. Véase también *Señalización*
definición, 533
vías. Véase *Vía(s) de señalización*
visual, 558
Transducina, 560, 561*f*
rodopsina, 556, 559, 559*f*, 560, 560*f*
Transfección, 378, 703
estable, 379, 379*f*
transitoria, 378, 379*f*
Transferasa
terminal telomérica, 436
de energía de fluorescencia, 547, 547*f*
Transferrina, 522, 522*f*
en la vía endocítica, 731
Transformación, 363
celular, 379, 379*f*
maligna, 589, 938*f*, 939
neoplástica, 589
oncogénica, 938*f*, 939
Transgenes, en la inactivación génica, 392, 392*f*
Translocación
cotraduccional
de proteínas
integrales, 667
secretorias, 661, 661*f*. Véase también *Translocación proteica*
iniciación, 661
pasos, 663*f*
translocón, 662, 663*f*
postraduccional en levadura, 665
de proteínas. Véase también *Direccionamiento de proteínas*
en bacterias, 661, 662*f*, 680, 681*f*, 682*f*.
complejo Sec61, 663, 664*f*
cotranduccional
de proteínas
integrales de membrana, 667
secretorias, 661, 661*f*
fuente de energía, 659
Hsc70, 389
en levaduras, 665
en mitocondria, 658*f*, 683, 684*f*, 685*f*, 687
nuclear vs. direccionamiento de proteínas peroxisómicas, 696
pasos, 658*f*, 663*f*
en peroxisomas, 658*f*, 683, 693, 694*f*, 695*f*
postraduccional, en levaduras, 665
de proteínas plegadas, 696
ribosómicas, 125, 127, 127*f*, 128*f*
translocones, 662, 663*f*
en bacterias, 680, 681*f*
en mitocondrias, 684, 685
transmembrana. Véase *Transporte de membrana*
a través del retículo endoplasmático, 659
en la vía secretoria, 701. Véase también *Vía secretoria*
Translocones, 662, 663*f*, 664*f*
bacterianos, 680, 681*f*
mitocondriales, 684, 685
Transportador(es)
antiportador, 247, 247*f*, 268, 269
de cocaína, dopamina, 290
cotransportadores, 247
de dopamina, y cocaína, 290
de electrones, 54*f*, 55, 302, 302*f*. Véase también *Transporte de electrones*
cadena respiratoria, 318
móviles, 318*c*, 321
potencial de reducción, 321
tipos, 318, 318*c*
de fosfato, 329, 329*f*
de glucosa, 248, 249*f*, 268, 269*f*, 551, 618, 618*f*. Véase también *GLUT*
secreción de insulina, 618, 618*f*
secuencias topogéncias, 669, 670*f*
ileal de ácido biliar (IBAT), 756
en la lanzadera malato-aspartato, 311, 311*f*
simportador, 247, 247*f*, 268, 269*f*
uniportador, 247, 247*f*
Transporte
acoplado. Véase *Cotransporte*
activo, 247
secundario, 247, 248*c*
activo secundario. Véase *Cotransporte; Transporte de membrana*
axónico, 829
anterógrado, 830
cinesina, 831
dineínas, 833, 833*c*
direccionalidad, 829
pausa, 830*f*, 831
retrógrado, 830
velocidad, 829*f*, 830, 830*f*
de colesterol hepático, 770, 771*f*
de electrones
acoplado, 317
en la cadena respiratoria, 310, 315, 318, 319*f*, 320*f*
ciclo Q, 323, 323*f*, 324*f*
citocromo *c*, 321
coenzima 319,319f,320f,321
complejo(s)
citocromo *c* oxidasa, 320, 320*f*, 321, 321*f*, 322
multiproteicos, 318, 320*f*
CoQH$_2$-citocromo *c* reductasa, 320, 320*f*, 323, 323*f*, 324*f*
fosforilación oxidativa, 316
en fotosíntesis, 333, 334, 334*f*, 337, 337*f*, 338*f*, 339, 339*f*
en la fuerza protón-motriz, 302, 302*f*, 315
grupos prostéticos, 318, 318*c*, 319*f*, 320*f*
lanzadera malato-aspartato, 311, 311*f*
NADH-CoQ reductasa, 320, 320*f*, 322, 323
potencial de oxidorreducción, 316*f*
succinato-CoQ reductasa, 320, 320*f*
translocación de protones, 317, 322, 322*f*
transportadores, 54*f*, 55, 302, 302*f*, 318, 318*c*
de fármacos, MDR1, 258
fotoelectrónico, 334, 334*f*
de hierro, a través de la vía endocítica, 731
inverso de colesterol, 770, 771*f*
de iones, 245. Véase también *Transporte de membrana de iones y moléculas pequeñas*
de lípidos
ácido(s)
biliares, 750*f*, 752, 755, 756, 756*f*
graso, 755
fuente de energía, 754*f*
incorporación selectiva, 760, 762, 762*f*
intercelular, 744*f*, 745*c*, 752
inverso, mediante lipoproteínas de alta densidad, 770, 771*f*
mediado por receptor, 759
proteínas ABC, 252*f*, 253, 258, 748, 748*c*, 755, 756*f*, 757
transcitosis, 735
transporte de ácido biliar ileal, 756, 756*f*
vía de lipoproteínas, 754*f*, 757
de MDR1, 258
modelo de la flipasa, 259, 260*f*
de membrana de iones y moléculas pequeñas, 245
activo, 247, 248*c*
secundario, 247, 248*c*
del agua, 271, 271*f*, 272*f*, 273*f*
antiportadores, 247, 247*f*, 268, 269, 270*f*
en plantas, 270, 270*f*
bombas
de calcio, 252*f*, 253, 254, 254*f*, 255*f*
de hidrógeno, 252*f*, 253, 257, 258*f*
de moléculas pequeñas ABC, 252*f*, 253, 258
de sodio-potasio, 252*f*, 253, 254, 256, 256*f*
canales de iones, 247, 247*f*, 262.
Véase también *Canales iónicos*
catalizado por proteínas, 247, 247*f*, 248, 249*f*. Véase también *Proteínas de transporte de membrana*
cotransporte (activo secundario), 247, 248*c*, 268, 269*f*, 270*f*
por difusión
facilitada, 247, 248, 248*c*
pasiva, 246, 246*f*, 248, 248*c*
energía, 50, 246
de activación, 264
flipasa, 259, 259*f*, 260*f*
fuerza motriz de protones, 304
de glucosa, 248, 249*f*
gradiente
de concentración, 50, 246, 247, 247*f*, 260
electroquímico, 246
en hongos, 252*f*, 263
11sc70, 389
mediada por unión de hendidura, 230
nuclear, 509. Véase también *Transporte nuclear*
panorama general, 246
en plantas, 257, 258*f*, 263, 270, 270*f*
potencial de membrana, 246, 252*f*, 260, 261*f*
en la regulación del volumen celular, 272
simporte, 268, 269*f*
técnica de pinzamiento zonal de membrana (*patch clamp*), 265, 265*f*
transepitelial, 274, 274*f*, 276*f*
transnuclear, 509
a través de la vía transcelular, 207, 208, 208*f*
uniones estrechas, 207, 208*f*
uniportadores, 247, 247*f*, 248, 249*f*
variación de la energía libre, 267, 267*f*, 268
nuclear, 509
complejo del poro nuclear, 509, 509*f*
en el control génico, 515, 516*f*
direccionalidad, 512, 514
exportinas, 512, 513*f*
factor 2 de transporte nuclear, 510, 511, 513, 514
de hnRNP, 512, 512*f*
importinas, 510, 510*f*, 511*f*
de mRNP, 514
proteínas carga, 510, 511*f*
señal
de exportación nuclear, 512, 513, 513*f*
de localización celular, 510, 510*f*, 513, 514
de proteínas
en la vía
endocítica, 702*f*, 703
secretoria, 701, 702*f*. Véase también *Vía secretoria; Transporte vesicular*

Transporte *(Cont.)*
de protones, por la coenzima Q, 319, 319*f*, 320*f*
transcelular, 274, 274*f*, 276*f*
transepitelial, 274
vesicular, 701, 702*f*. Véase también *Vesículas de transporte*
anterógrado, 701, 702*f*, 715, 715*f*, 716, 716*f*, 718, 718*f*
cinesinas, 79, 80*c*, 80*f*, 82, 791, 835, 835*f*
cooperativa, 834, 835*f*
dineínas, 833, 833*c*
en la vía endocítica, 702*f*, 703, 727. Véase también *Endocitosis*
direccionamiento de proteínas, 702*f*, 710, 711*c*, 712*f*
en la endocitosis mediada por receptores, 732, 732*f*
endosómico, 703
ensayos, 703, 704*f*, 705*f*
exocítico, 703
levadura mutante, 705, 706*f*
lisosómico, 703
a lo largo de los filamentos de actina, 794
mecanismos moleculares, 707
microtúbulos, 716
miosina, 794, 795*f*
modelo de levadura, 705, 706*f*
progresión cisternal, 701, 702*f*, 718, 718*f*
de proteínas G del VSV, 703, 704*f*
retrógrado, 701, 702*f*, 715, 715*f*, 716, 717*f*, 718*f*
señalización, 708*f*, 711, 711*c*, 716, 717, 717*f*, 729. Véase también *Señal(es) de clasificación*
en la vía secretoria, 701, 702*f*, 715
etapas
finales, 719, 719*f*
iniciales, 715, 715*f*
Transposasa, 415, 416*f*, 423*f*
Transposición, 414, 415*f*. Véase también *Transposones de DNA; Elementos móviles; Retrotransposones*
en bacterias, 415, 415*f*, 416*f*
en células
germinales, 414
somáticas, 414
combinación de exones, 422, 422*f*, 423*f*, 503
definición, 414
de elementos
IS, 415, 416*f*
Ty, 417, 419*f*
en eucariontes, 416
de LINE, 420, 421*f*
mediada
por DNA, 410*c*, 414
por RNA, 417
no viral, 420, 420*f*, 421*f*
en retrovirus, 415, 417, 417*f*
de SINE, 421
Transposones, 410*c*, 414. Véase también *Retrotransposones*
acumulación evolutiva, 417
bacterianos, 415, 415*f*
de DNA, 410*c*, 414
acumulación evolutiva, 417
bacterianos, 415, 415*f*
eucariontes, 415*f*, 416
Treonina, 38, 39*f*. Véase también *Aminoácido(s)*
-161, 866, 866*f*
Triacilgliceroles, 43, 746, 746*f*
hidrólisis, 312
Triglicéridos, 743, 746, 746*f*. Véase también *Lípido(s), estructura*
Tripsina, escisión proteolítica, 85
Triptófano, 38, 39*f*, 40. Véase también *Aminoácido(s)*
regulación, 116
Trisqueliones, 720, 720*f*
Tritón X-100, 182, 183*f*
Trk, 926, 926*f*, 927*f*
tRNA (RNA de transferencia). Véase también *RNA*
anticodones, 119, 121
con inosina, 123
diversidad, 121
estructura, 121, 122*f*
función, 121
genes repetidos en tándem, 410*c*, 411, 422
metionina, 125
plegamiento, 121, 122*f*
reconocimiento de codones, 121
síntesis. Véase también *Transcripción*
RNA polimerasa III, 450, 451*f*, 452*f*
sitios de unión, 125
en la traducción, 119, 121, 122*f*, 123*f*
unión de aminoácidos, 122*f*, 123
Trombocitos. Véase *Plaqueta(s)*
Trombopoyetina, 581
Tropomiosina, 176*f*, 177
Tropomodulina, 176*f*, 177, 788, 788*c*, 788*f*
Tubo neural, destinos celulares, 643, 643*f*
Tubulina, 174, 174*c*
concentración crítica, 820
dependencia de la temperatura, 820, 820*f*
evolución, 382, 382*f*
en microtúbulos, 818
organización, 819, 819*f*
polaridad, 820, 821*f*
polimerización, 820, 821*f*, 827, 827*f*
simple, 820, 820*f*
subunidad gamma, 827
subunidades a/beta 819,819*f*
triplete, 820, 820*f*
unión de colchicina, 825
Tumor(es)
angiogénesis, 620
benigno, 936
clasificación, 938
crecimiento, telomerasa, 437
factores de crecimiento, 938
maligno, 936. Véase también *Cáncer*
Tumorigénesis, 935
Tunicamicina, plegamiento de proteínas, 674, 674*f*
Turgencia, en las células vegetales, 170
twist, 628, 628*f*, 629
en el desarrollo del músculo, 913

U

Ubicuinona, 319, 319*f*, 320*f*
Ubicuitina
en la degradación proteica, 71, 71*f*, 679
en la endocitosis mediada por receptores, 730, 733
ligasa, 863
en la regulación del ciclo celular, 863, 870
en la señalización, 602, 602*f*
Ubicuitinación, de ciclinas mitóticas, 863, 863*f*
Ubx, 635*f*, 636, 636*f*
UDP-glucosa, en la síntesis de glucógeno, 551, 551*f*
Ultrabithorax, 635*f*, 636, 636*f*
Umbral de señalización, 623
Unidad(es)
Svedberg, 124
de transcripción de pre-rRNA, 525, 525*f*, 526*f*
transcripcionales, 407, 407*f*, 505
complejas, 407*f*, 408, 504
microsatélites, 412
pre-rRNA, 525, 525*f*, 526*f*
simples, 407, 407*f*, 504
sitios de inicio, 453, 453*f*
Unión(es)
de adherencia, 198*f*, 203, 203*f*, 204*f*
cadherinas, 204, 204*f*, 205
proteínas, 204*f*, 205
de anclaje, 198*f*, 202, 203
celulares, 198*f*, 200, 202, 203*f*
de adherencia, 198*f*, 203, 203*f*, 204*f*
anclaje, 198*f*, 202, 203, 224
cadherinas, 204, 204*f*, 205*f*
desmosoma puntual, 198*f*
estrechas, 198*f*, 202, 203*f*, 206, 206*f*, 207*f*, 274
filamentos intermedios, 177, 203, 203*f*
hemidesmosoma, 198*f*, 203, 203*f*
de hendidura, 198*f*, 229, 229*f*, 230*f*
en la membrana plasmática, 164
en plantas, 233, 233*f*
proteínas, 204*f*, 205
de DNA, represores, 115, 116, 116*f*
estrechas, 198*f*, 202, 203*f*, 206, 206*f*, 207*f*, 274. Véase también *Uniones celulares*
Ca^{+}, 207
claudina, 206*f*, 207
difusión de la membrana, 208
estructura, 206*f*, 207
funciones, 206
moléculas de adhesión, 207
ocludina, 206*f*, 207
permeabilidad, 207, 207*f*, 208
en la vía
paracelular, 208, 208*f*
transcelular, 207, 208, 208*f*
exón-intrón, 498, 498*f*
de hendidura, 15, 198*f*, 229
en el acoplamiento metabólico, 230
conexinas, 230*f*, 231
estructura, 229, 229*f*, 230*f*
funciones, 230
inexinas, 231
en invertebrados, 231
neurales, 230
permeabilidad, 230, 231
purificación, 229
en la señalización, 230
en vertebrados, 231
intercelulares. Véase *Uniones celulares*
intercitoplasmáticas. Véase también *Uniones de hendidura*
intrón- exón, 498, 498*f*
neuromusculares, 290
de proteínas, 47. Véase también *Unión receptor-ligando*
afinidad, 73, 76, 77*f*
complementariedad, 73
cooperativa, 83
correspondencia inducida, 75
al DNA, 105, 105*f*
especificidad, 73, 74
fuerza, 73
sitio activo, 75
receptor-ligando, 47, 533, 536, 536*f*. Véase también *Ligando(s); Unión de proteínas; Receptor(es); Señalización*
activación del receptor
activación de la vía de transducción de señales, 535
fosforilación, 578, 579*f*
naturaleza fraccionaria, 537, 537*f*
en múltiples vías, 574
respuesta celular, 535, 572*c*, 573*c*, 574, 578, 579*f*
Uniportador, 247, 247*f*, 248
GLUT1, 248, 249*f*
Uracilo, 40, 40*f*, 103. Véase también *Pares/apareamiento de bases*
Uridina difosfoglucosa, en la síntesis del glucógeno, 551, 551*f*
5'UTR, 113

V

v-Jun, 884
v-SNARES, 708, 708*f*. Véase también *Proteínas SNARE*
en la fusión vesícula-membrana, 712, 712*f*. Véase también *Transporte vesicular*
Vacuolas
bombas de hidrógeno, 257
contráctiles, 272
vegetales, 166*f*, 170, 170*f*
Vaina de mielina, 149, 149*f*, 284, 285*f*. Véase también *Membrana(s)*
componentes lipídicos, 153*c*
propagación del potencial de acción, 286, 286*f*
Valina, 38, 39*f*. Véase también *Aminoácido(s)*
Valor p, 381
VAMP, 712, 712*f*, 736
en la toxina botulínica, 737
Vasodilatación
complejo Ca^{2+}/calmodulina, 564
oxido nítico, 564, 564*f*
Vasos sanguíneos
desarrollo. Véase *Angiogénesis*
endotelio, 767, 768*f*
Vector(es)
bacteriófago lambda, 364
carnada, 480, 480*f*
cromosoma artificial de levadura, 437
expresión, 377, 378*f*, 676
fago lambda, 364
en la construcción de genoteca de DNA, 365, 365*f*
en la síntesis de cDNA, 365
inserción de fragmento de DNA, 362, 363*f*
lanzadera, 369*f*, 370
pez, 480, 480*f*
plasmídicos, 363, 363*f*, 364*f*
expresión 377,378f
plásmido de *E. coli*, 363, 363*f*, 364*f*
en el sistema de levadura dos híbridos, 480,480*f*
transformación, 379
viral, 7
Vesícula(s)
autofágicas, 733
complejo de Golgi, 169, 170*f*, 708, 709*c*, 716. Véase también *Vesículas de transporte*
COPI, 708, 709*c*, 716, 717*f*, 719*f*
COPII, 708, 709*c*, 716, 716*f*, 717*f*
endosómica, 733, 734*f*
fusión con la membrana, 712, 712*f*, 714*f*
recubiertas de clatrina/AP, 165, 290, 701*f*, 708, 720, 720*f*, 721*f*, 722*f*
despolimerización de la cubierta, 721
desprendimiento, 721, 721*f*
en la endocitosis mediada por receptores, 728, 728*f*, 730
purificación, 181, 182*f*, 720, 720*f*
recubiertas de proteína adaptadora, 708, 709*c*, 720, 721*f*
secretorias, 169, 170*f*, 702*f*, 703, 724
sinápticas, 288, 290, 290*f*, 736
endocitosis, 290
exocitosis, 288, 736, 737*f*
fusión con la membrana, 736
localización, 736, 736*f*
reciclaje, 289, 289*f*, 737*f*, 738
en las terminales axónicas, 290
de transporte, 169, 170*f*, 701. Véase también *Transporte vesicular*
acoplamiento, 711, 712*f*
anterógrada, 701, 702*f*, 715, 716, 716*f*, 718*f*
brotación, 707, 708*f*, 719, 719*f*, 721
COPI, 708, 709*c*, 716, 717*f*, 719*f*
COPII, 708, 708*f*, 709*c*, 716, 716*f*, 717*f*
estructura, 716, 716*f*
exocítico, 703
formación, en la endocitosis mediada por receptores, 728
fusión, 712, 712*f*
proteínas SNARE, 708
recubiertas
ensamblaje de la cubierta, 709, 710*f*
selección de proteínas carga, 708, 709*c*
tipos, 708, 709*c*
de clatrina, 165, 290, 708, 709*c*, 720, 720*f*, 721*f*, 722*f*
despolimerización de la cubierta, 721
desprendimiento, 721, 721*f*
en la endocitosis mediada por receptores, 728, 728*f*, 730
purificación, 181, 182*f*, 720, 720*f*
de proteína adaptadora, 708, 709*c*, 720, 721*f*
regulada, 724
retrógrada, 701, 702*f*, 715, 715*f*, 716, 717*f*, 718*f*
Vía(s)
de apareamiento de levadura, 596, 596*f*
biosintéticas
análisis, 358, 359*f*
ordenamiento, 358
C3
en la fijación del carbono, 342, 343*f*, 346
de clasificación lisosómica, 722*f*, 723
endocítica. Véase también *Endocitosis mediada por receptores*
panorama general, 702*f*, 703
vía de transporte de hierro, 731
enzimáticas, 76, 77*f*
glucolítica, 304, 305*f*, 310, 311*c*, 314, 314*f*, 551, 551*f*
Insig-1(2)/SCAP/SREBP, 765, 766
IP3/DAG, 561, 562*f*, 572*c*, 598, 601
en el metabolismo del glucógeno, 617*f*, 618
JAK-STAT, 583
MAP cinasa, 572*c*, 594
Notch/Delta, 534*f*, 573*c*, 574, 603, 603*f*
inhibición lateral, 646, 646*f*, 647*f*
paracelular, 208, 208*f*
de la PI-3 cinasa, 598, 599*f*, 600, 600*f*

Vía(s) *(Cont.)*
Ras-MAP cinasa, 572*c*, 582*f*, 587, 592, 601, 649. Véase también *Map cinasa(s); Ras*
oncoproteínas Ras, 953
de rescate de nucleótidos, 239, 239*f*
de respuesta a la hipoxia, 620
secretoria, 658, 701, 702*f*. Véase también *Transporte vesicular*
estudios experimentales
autorradiografía, 703
ensayos
in vitro, 706, 707*f*
in vivo, 703, 704*f*, 705*f*
marcación con pulso y seguimiento, 703
microscopia de fluorescencia, 704, 704*f*
mutantes de la levadura, 705, 706*f*
proteínas VSV G, 703, 704*f*
etapa inicial, 715, 715*f*
modelo de levadura, 705, 706*f*
panorama general, 702*f*
procesamiento proteolítico de proteínas, 70, 71, 85, 602, 724, 725*f*
secreción
constitutiva, 703, 724
regulada, 724
transporte lipídico, 744*f*, 752
de señalización, 359, 359*f*, 535. Véase también *Vías específicas*
análisis, 359, 359*f*
BMP, 643, 643*f*
cinasa PI-3, 572*c*, 598, 599*f*, 600, 600*f*
Hedgehog, 639, 640*f*, 641*f*, 651
Hh, en la inducción del cáncer, 948
insig-1(2)/SCAP/SREBP,765
integrada, 544, 572*c*, 573*c*, 574, 602, 648
interacción, 544, 572*c*, 573*c*, 574, 602, 648
IP3/DAG, 541, 541*f*, 545*c*, 561, 562*f*, 572*c*, 598, 601
ligadas a Ras, 803, 804*f*
múltiple, 572*c*, 573*c*, 574, 601
Notch/Delta, 534*f*, 573*c*, 574, 603, 603*f*
inhibición lateral, 646, 646*f*, 647*f*
óxido nítrico, 564, 564*f*, 573*c*, 619, 620*f*
proteolítica, 573*c*
RANKL/RANK, 606, 606*f*
Ras-MAP cinasa, 572*c*, 582*f*, 587, 592, 601, 649
receptor
intracelular, 573*c*
nuclear, 464, 482, 482*f*, 573*c*
regulación, 544
respuestas a la hipoxia, 620
STAT5, 572*c*, 582*f*, 584
TGFbeta, 574, 576*f*, 577, 629, 643, 644
tipos, 571, 572*c*, 573*c*
Toll-Dorsal, 628, 628*f*, 632
Wnt, 642, 642*f*
en el cáncer, 949
en el crecimiento de células madre, 642*f*, 643
Vibrion colérico, 548
Vigilancia del mRNA, 523
Villina, 783*c*
Vimentina, 807, 807*c*, 808. Véase también *Filamentos intermedios*
Viriones
definición, 137
gemación, 141, 141*f*, 733
lambda, 364, 365*f*
progenie, 141, 141*f*
proteínas de la superficie celular, como sitios de entrada, 229
Virus
ciclo de crecimiento
lítico, 139, 140*f*, 141*f*
no lítico, 141, 142*f*
como
organismos experimentales, 24, 25*f*
vectores, 7
cuantificación, 138, 139*f*
con cubierta, 137, 138*f*, 141, 141*f*
fusión de la membrana, 713, 714*f*
definición, 137
DNA, 137
ensayos en placas, 138, 139*f*, 364
estructura, 6, 137,138*f*
fago, 7*f*, 137, 140*f*
funciones, 6
gemación, 141, 141*f*, 733
de inmunodeficiencia humana, gemación, 734, 734*f*
linfotrófico de células T humanas (HTLV), 142
movimiento, 80*c*
notación, 945
oncogénicos, 142, 945
patogénicos, 6, 7*f*
proteínas de la superficie celular como sitios de entrada, 229
de la rabia, 140*f*, 141
rango de huéspedes, 137
replicación del DNA, 139, 140*f*, 142
lisogenia, 141
retrovirus, 142, 142*f*, 417, 418*f*, 419, 419*f*. Véase tambien *Retrovirus*
RNA, 137
sarcoma de Rous, 945
traducción, 139, 140*f*, 142
transcripción, 139, 140*f*, 142
Vitamina C, en la formación del colágeno, 218
Vmax, 76, 77*f*
Volumen celular, regulación, 164, 164*f*, 272

W

Watson, James, 103
Wee1 proteína tirosincinasa, 866, 866*f*
Western blot, 92*f*, 93, 614
Wilm, tumor de, 462, 463*f*
wingless, 635, 639, 640*f*, 642, 644, 649
Xenopus laevis
maduración de ovocitos, 858, 859*f*, 862*f*, 863*f*, 865
neurogénesis, 647, 652, 652*f*
poliadenilación citoplasmática, 520
regulación del ciclo celular, 858, 859*f*, 860*f*, 862*f*, 863*f*, 865, 870, 871*f*
señalización inductiva, 623

X

Xerodermia pigmentosa, 470, 964*c*, 966
Xilema, 346*f*, 347

Y

Yan, 595
Yersinia pestis, inyección de proteínas, 681, 682*f*

Z

Zona activa, 290, 290*f*
Zwiterión, 48. Véase *Ion dipolar*