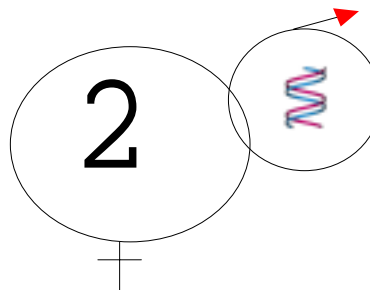


PANORAMA DE LA BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Rolando Hernández Fernández



En 1953 se produce un hecho trascendental en la historia de la Biología, cuando la revista Nature publicó el trabajo sobre estructura del ADN de James D. Watson y Francis H. C. Crick. Este trabajo dio comienzo a una revolución en el campo de la Biología y marcó el inicio de la Biología Molecular. Desde entonces hasta nuestros días el conocimiento acerca de los mecanismos moleculares relacionados con la herencia biológica han alcanzado un desarrollo insospechado en épocas anteriores.

El conocimiento de la estructura molecular del ADN ha permitido esclarecer los mecanismos relacionados con la duplicación del ADN, la síntesis de los ARN y de las proteínas, la recombinación genética y la mutagénesis, así como los complejos mecanismos que permiten la autorregulación de todos esos procesos.

Por si esto fuera poco, a partir de ese descubrimiento se han desarrollado poderosos procedimientos experimentales que han rebasado el marco de la genética molecular y han incidido de forma fundamental en el conocimiento de la estructura y las funciones celulares, de los procesos del desarrollo filo y ontogenético, de la relación entre el genoma y el ambiente y de las bases moleculares de las enfermedades.

En este capítulo nos proponemos hacer un resumen de los principales aspectos de la Biología Celular y Molecular como una introducción panorámica para el resto de los capítulos del libro.

LA BIOLOGÍA CELULAR

La Biología Celular contemporánea tiene como objetivo explicar las funciones de las células a partir del conocimiento de la estructura, las propiedades y las funciones de las moléculas que la forman, especialmente de los agregados supramoleculares. Desde ese punto de vista la célula eucarionte se presenta como un complejo sistema biomolecular con un alto grado de organización estructural y funcional que constituye la unidad básica de los organismos superiores. Sus estructuras están formadas por agrupaciones de moléculas o de macromoléculas que forman verdaderos organitos en los cuales se llevan a

cabo todas las funciones celulares de una forma armónica y coordinada. Las moléculas que componen estos organitos son los lípidos, las proteínas, los ácidos nucleicos y los polisacáridos. Dos aspectos destacan en estas células, la existencia del núcleo donde se encuentra confinado el ADN y la existencia de una basta red de estructuras membranosas que dividen la célula en numerosos compartimentos, de manera que los procesos se produzcan con relativa independencia uno de otros. Así, para realizar funciones complejas es necesario que se genere un flujo de sustancia, energía e información no sólo entre la célula y su entorno sino además entre los diferentes compartimentos intracelulares.

La membrana plasmática

La membrana plasmática es una estructura laminar que rodea a la célula separándola y comunicándola con el exterior. Está compuesta por lípidos, polisacáridos y proteínas. La estructura básica está formada por una doble capa de moléculas de lípidos que son los fosfátidos de glicerina, los esfingolípidos y el colesterol. Estos lípidos presentan una estructura anfipática, es decir, contiene una zona polar pequeña y una zona apolar mucha más grande. En las membranas las zonas apolares se disponen hacia el interior y las zonas polares hacia el exterior, una en contacto con el espacio extracelular y otra hacia el interior de la célula. Hasta hace poco se daba por sentado que los lípidos de la membrana solamente tenían un papel pasivo como parte de la barrera que separa la célula del exterior, sin embargo, recientemente se ha descubierto que los componentes lipídicos de la membrana intervienen en complejos mecanismos de comunicación intercelular, unos generando segundos mensajeros (como el diacilglicerol), otros regulando la actividad de enzimas (como el fosfatil inositol) y aún unos terceros como precursores de importantes señales moleculares (como el ácido araquidónico que da origen a las prostaglandinas) que comunican a una célula con sus vecinas. Los lípidos además participan en los mecanismos de difusión a través de la membrana de sustancias apolares y del agua.

Los polisacáridos suelen ser cortos (catorce a veinte unidades) y ramificados, con monosacáridos derivados (galactosamina, fucosa, glucosamina, etc.) y siempre están orientados hacia el espacio extracelular. Participan en funciones de reconocimiento intercelular (como los grupos sanguíneos) y se encuentran unidos bien a los lípidos, bien a las proteínas.

Las proteínas son los componentes funcionales más importantes de las membranas. Las funciones específicas que una membrana realiza se deben a las proteínas que contiene. Las proteínas pueden ser extrínsecas o periféricas si sólo están en contacto con la parte polar de la membrana e intrínsecas o integrales si lo hacen con la zona apolar, entre las que se encuentran las transmembranales que atraviesan la membrana de un lado al otro. Las proteínas pueden constituir poros por donde pasan sustancias polares cuyo

diámetro sea inferior al del poro; canales, que cumplen una función similar, pero son estructuras más activas que se abren y se cierran en respuesta a determinados estímulos (cambios de voltaje, unión de un ligando); transportadores que llevan sustancias de un lado al otro de la membrana, bien a favor de su gradiente de concentración (transporte pasivo) o contra el gradiente (transporte activo) en cuyo caso requieren de una fuente de energía como la hidrólisis del ATP. Otras proteínas son enzimas que pueden estar formando parte permanente de la membrana o asociarse temporalmente con ésta. Por último existen proteínas que actúan como receptores de señales extracelulares que permiten adaptar el funcionamiento de la célula a las condiciones específicas del organismo en un momento dado.

El sistema de endomembranas

El sistema de endomembranas consta de dos componentes, un sistema continuo de membranas intracelulares y un conjunto de orgánitos citoplasmáticos membranosos independientes (Figura 2.1). Al primer grupo pertenecen el retículo endoplásmico tanto el liso como el rugoso, el aparato de Golgi y la envoltura nuclear. Las membranas de este sistema son esencialmente iguales en estructura a la membrana plasmática, sin embargo sus diferencias radican en las proteínas que poseen, lo que hace que cada uno de ellos cumpla funciones diferentes. Así, en el retículo endoplásmico liso se encuentran las enzimas relacionadas con la síntesis de lípidos y las que participan en los mecanismos de detoxificación. En el retículo endoplásmico rugoso se encuentran proteínas que actúan como receptores para los ribosomas, a los cuales éstos se fijan durante la síntesis de proteínas que van a formar parte de las membranas o que serán segregadas al exterior.

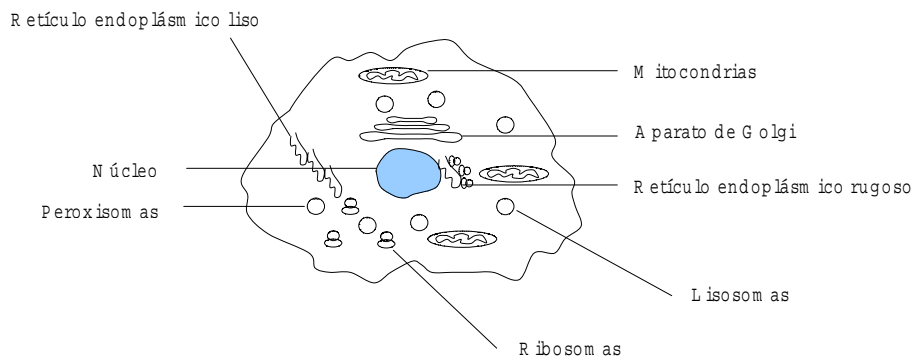


Figura 2.1. Se representan esquemáticamente los componentes de una célula eucariote. Por simplicidad del esquema no se representan los componentes del citoesqueleto.

La envoltura nuclear está formada por dos membranas, la externa cubierta temporalmente de ribosomas y la interna asociada con la lámina nuclear. Estas membranas se fusionan en numerosos puntos dejando una abertura cuyas paredes están cubiertas de proteínas dando lugar al llamado complejo del poro nuclear por donde transitan macromoléculas, tanto desde el núcleo hacia el citoplasma, como en sentido contrario. El aparato de Golgi está formado por un conjunto de sacos membranosos aplanados que está muy desarrollado en las células secretoras. En su interior las proteínas sintetizadas por los ribosomas unidos al retículo endoplásmico rugoso son modificadas, principalmente por glicosilaciones, concentradas y empaquetadas para ser enviadas a diferentes lugares, entre ellos los lisosomas, los peroxisomas y la membrana plasmática.

Los organitos citoplasmáticos membranosos son las mitocondrias, los lisosomas y los peroxisomas. Las mitocondrias están formadas por dos membranas, la externa es lisa y permeable a moléculas de hasta 10 kDa, mientras que la interna forma pliegues hacia el interior llamados crestas y es prácticamente impermeable a casi todas las sustancias con excepción del agua, el oxígeno y el dióxido de carbono. El espacio limitado por la membrana interna recibe el nombre de matriz y es el asiento de importantes procesos metabólicos principalmente del Ciclo de Krebs. La membrana interna contiene cerca de un 70% de proteínas entre las cuales se encuentran las que forman parte de la cadena transportadora de electrones y la ATP sintetasa que cataliza la formación del ATP. Muchas de las otras proteínas actúan como transportadores, lo cual es necesario debido a la poca permeabilidad de la membrana.

Los lisosomas contienen un gran número de enzimas hidrolíticas capaces de degradar un gran número de sustancias complejas por lo que se han identificado como el sistema digestivo de la célula. Su membrana contiene una bomba de protones que permite mantener en el interior un pH más bajo que en el exterior. Como las enzimas tienen su mayor actividad a ese pH en caso de ruptura de los lisosomas su contenido sería vertido al citosol, donde el pH más alto inactivaría a las enzimas impidiendo la digestión de los componentes celulares.

Los peroxisomas son corpúsculos membranosos redondeados que contienen un buen grupo de enzimas oxidativas, entre ellas la catalasa y la peroxidasa, y otras que participan en la oxidación de los ácidos grasos de cadena muy larga.

Se han descrito numerosas enfermedades debidas a la deficiencia genética de muchas de las proteínas que forman parte del sistema de endomembranas.

El citoesqueleto

El citoesqueleto forma una especie de armazón de la célula y está integrado básicamente por tres tipos de estructuras: los microfilamentos, los microtúbulos y los filamentos intermedios. Los microfilamentos se forman por la polimerización de la actina en presencia de ATP. Estos filamentos forman una intrincada red inmediatamente por debajo de la membrana plasmática y mediante proteínas específicas están en contacto con componentes de la matriz extracelular. Los microfilamentos son estructuras dinámicas. Existe normalmente un equilibrio entre las reacciones de polimerización y despolimerización de la actina que hace posible los movimientos que realiza la membrana plasmática en los movimientos ameboides y durante el proceso de fagocitosis.

Los microtúbulos se forman por la polimerización de la tubulina de la cual existen dos variedades, la α y la β . Estas forman un dímero que se polimeriza dependiendo de GTP. Los dímeros al polimerizarse dan lugar a una estructura helicoidal que deja una luz central que es el motivo de su nombre. Los microtúbulos se disponen en forma radiada desde el núcleo hacia la periferia de la célula, creando una armazón que da forma y consistencia a la célula. Proteínas que funcionan como motores moleculares se asocian a la superficie de los microtúbulos y transportan sustancias de gran tamaño incluyendo vesículas membranosas y macromoléculas. También constituyen una estructura dinámica que se polimeriza y despolimeriza de acuerdo con las condiciones celulares. Una forma especial de estos microtúbulos es el huso acromático que se forma durante la división celular.

Los filamentos intermedios son proteínas fibrilares que se asocian lateralmente y dan a la célula consistencia y resistencia a las tensiones. Mientras la actina y la tubulina son las mismas en todas las especies celulares, los filamentos intermedios son específicos de cada tipo, así en los epitelios se encuentran los filamentos de queratina mientras los neurofilamentos se encuentran en el sistema nervioso. Entre los filamentos intermedios se encuentran las lamininas A, B y C que son los componentes moleculares de la lámina nuclear.

Los ribosomas

Los ribosomas no son orgánitos membranosos pues están formados por ácidos ribonucleicos ribosomales y proteínas. Están formados por dos subunidades de tamaño diferente denominadas L la mayor y S la menor. La subunidad L contiene los ARNr de 28 S, 5,8 S y 5 S y más de cincuenta proteínas. La subunidad S solo contiene el ARNr de 18 S y unas 35 proteínas. Para su funcionamiento requieren además del concurso de un buen número de proteínas no ribosomales. La función de los ribosomas es la traducción genética o sea, la síntesis de proteínas.

El núcleo celular

El núcleo constituye una estructura característica de las células eucariontes, de hecho es lo que le da el nombre. Está separado del citoplasma por una envoltura compuesta de dos membranas como ya fue mencionado. Por debajo de la membrana presenta una estructura proteínica llamada lámina nuclear compuesta por dos proteínas denominadas laminina A y B, que al polimerizarse forman la estructura laminar. A ella se encuentra unida la cromatina en diversos puntos, al parecer necesarios para la replicación. Al inicio de la mitosis la laminina B es fosforilada por el complejo Ckd1/ciclina B y se despolimeriza provocando la desintegración de la envoltura nuclear. Recientemente se ha establecido que también en el núcleo existen compartimentos aunque éstos no están separados por membranas. Así, se distinguen los cuerpos de Cajal, los corpúsculos de empalme y otros. El componente fundamental de núcleo es la cromatina, un complejo supramacromolecular formado por el ADN y proteínas, principalmente histonas. La célula somática humana contiene 23 pares de moléculas de ADN, la menor de unos 50 millones de pares de bases y la mayor de alrededor de 350. Estas moléculas de ADN y las proteínas correspondientes sufren un proceso de empaquetamiento al final de la etapa G2 del ciclo celular y se hacen visibles en forma de cromosomas al inicio de la mitosis. Las características estructurales de los cromosomas serán estudiadas con más detalle en el capítulo 6. En el núcleo se distingue una estructura más o menos redondeada, casi siempre ubicada hacia la periferia que es el nucleolo. Se forma por la agrupación de los genes que codifican los ARNr localizados en los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22. En él se distingue una zona central de carácter fibrilar reflejo de la transcripción activa de esos genes, y una zona periférica de carácter granular que se corresponde con el sitio de ensamblaje de las subunidades ribosomales. En el núcleo se realizan los procesos de replicación, reparación y transcripción del ADN, así como el procesamiento de los ARN transcritos primarios. Igualmente se realiza un intenso tráfico desde el núcleo hacia el citoplasma y viceversa de macromoléculas a través del complejo del poro nuclear. Los ARN por lo general son exportados del núcleo. Las proteínas del núcleo se sintetizan en el citoplasma y pasan al núcleo porque presentan en su estructura una secuencia de localización nuclear (NLS del inglés nuclear localization sequence). Sin embargo, existen proteínas que reciclan entre el núcleo y el citoplasma. Para su entrada requieren de NLS y para su salida del NES (del inglés nuclear export sequence). Últimamente ha cobrado fuerza la existencia de un nucleoesqueleto formado por proteínas fibrilares que le dan la forma y consistencia al núcleo.

EL CICLO CELULAR

En el desarrollo ontogénico de un organismo pluricelular las células más primitivas se multiplican y se van diferenciando de manera que cada célula forma parte de un órgano o tejido especializado. Cada estirpe celular prolifera hasta cierto punto y entonces se detiene. Los órganos sólidos adquieren forma y tamaño fijos y después cesa el crecimiento. En el individuo adulto el crecimiento de muchos tipos celulares transcurre a velocidades muy lentas que solo permiten reponer células viejas o dañadas.

Al terminar la división celular (fase M) a las células hijas se le presentan dos alternativas, bien entrar en un periodo de reposo (G0) donde la mayor parte de las funciones celulares se expresan a un nivel basal; bien comenzar a prepararse para un nuevo ciclo de replicación (G1). Las células en G1 comienzan su actividad metabólica pero esta puede decrecer si en un momento determinado no son estimuladas por factores de crecimiento del tipo del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)¹ que hace a las células competentes (por eso le llamamos punto C) para continuar su recorrido por G1. Pasado el punto C las células muestran una intensa actividad metabólica. Se incrementa el transporte de nutrientes a través de la membrana. Hay un aumento considerable de la glucólisis y de la síntesis de proteínas. Pero aparece un nuevo punto donde las células deben ser estimuladas por factores como la insulina o el factor insulinoide de crecimiento 1 (IGF?1).² Si las células rebasan ese punto continúan su progresión por el ciclo (por eso le denominamos punto P). A partir de aquí se produce un intenso tráfico de proteínas hacia el núcleo, tal vez las que participan en la replicación del ADN.

Las interacciones de las células con factores específicos de crecimiento constituyen un control positivo, pues la presencia del factor en el medio estimula la proliferación celular.

Los factores de crecimiento influyen sobre la actividad celular porque las células poseen en la membrana plasmática receptores específicos para ellos. Estos receptores son proteínas transmembranales que hacia el lado citoplasmático presentan un dominio enzimático con actividad de tirosil protein kinasa (TPK), es decir, que transfiere grupos fosforilos del ATP hacia proteínas, en las cuales los esterifica con residuos de tirosina. La unión del factor con su receptor específico estimula la actividad de TPK del receptor que en primer lugar se autofosforila y después fosforila a otras proteínas de la membrana y del citosol. Las proteínas fosforiladas por el receptor son, por lo general, kinasas que fosforilan a otras enzimas y así se establece una cadena de fosforilación que comienza en

¹ Las abreviaturas provienen del nombre en inglés, en este caso PDGF: Plateld Derived Growth Factor.

² Insulin-like Growth Factor.

la membrana y avanza hacia el núcleo, donde la fosforilación de factores de transcripción activan la expresión de genes específicos, cuyos productos están relacionados con los mecanismos de la proliferación celular.

Los estudios de transformación llevados a cabo con virus ADN llevaron a la conclusión de que el ciclo celular exhibe igualmente un control negativo. Las células elaboran proteínas cuya función es inhibir la progresión del ciclo. Cuando uno de estos virus infecta a una célula, ésta produce proteínas codificadas por el genoma viral. Se ha podido comprobar que algunas de ellas se asocian con proteínas del hospedero y las mantienen inactivas. Libres del freno que significa la actividad de las proteínas inhibitoras las células proliferan incontroladamente.

En condiciones normales los mecanismos positivos y negativos forman una intrincada red molecular cuyo funcionamiento armónico permite que el grado de proliferación celular se adapte perfectamente al momento del desarrollo del organismo y a las condiciones ambientales imperantes.

Los estudios del ciclo celular en muchos organismos han mostrado que en todos ellos el ciclo celular progresa básicamente por la intervención de un número reducido de familias de proteínas con funciones similares a las de levaduras.

Las ciclinas

Las ciclinas constituyen una familia de proteínas muy diversas de masa molecular relativamente pequeña, 35 a 90 kD, que fueron identificadas y nombradas porque su síntesis fluctúa durante el ciclo celular. Presentan una secuencia de 100 residuos de aminoácidos conocida como motivo de ciclinas. Este motivo es necesario para la unión a, y la activación de las Cdk correspondientes.

La concentración intracelular de un tipo particular de ciclina se eleva bruscamente en un momento del ciclo celular y poco tiempo después también disminuye bruscamente. Mucho se ha investigado acerca del sistema regulador capaz de generar esas oscilaciones en las concentraciones intracelulares de ciclinas y se han podido identificar al menos dos sitios de regulación: la transcripción génica y la degradación de proteínas.

En los mamíferos el conocimiento del control de la transcripción de las ciclinas se limita a la transición entre la fase G1 y la S. La cascada enzimática desencadenada por los factores de crecimiento conduce a la activación de la ERK⁽³⁾, una proteína de la familia de las MAPK⁽⁴⁾. La ERK por medio de la fosforilación produce la activación de

³ Del inglés **E**xtracellular signal **R**egulated protein **K**inases.

⁴ Del inglés **M**itogen **A**ctivated **P**rotein **K**inases.

los factores de transcripción AP-1 y ETS que estimulan la transcripción del gen de la ciclina D. La ciclina D forma complejos con las Cdk4 y la Cdk6. Estos complejos fosforilan a la proteína pRB (proteína del gen del retinoblastoma) y eliminan la inhibición que ésta ejercía sobre el factor de transcripción de la familia E2F, los cuales son necesarios para la transcripción de varios genes cuyos productos están involucrados en la replicación del ADN. También E2F es capaz de estimular la transcripción de los genes de la ciclina E, la ciclina A y el propio E2F.

La transcripción del gen de la ciclina E permite la activación del complejo Cdk2/ciclina E que también fosforila a pRB. Como E2F controla su propia transcripción estas fosforilaciones desencadenan un ciclo de retroacción positiva que incrementa rápidamente la concentración de E2F y con ello la velocidad de la transcripción de los genes que de él dependen, especialmente los relacionados con la replicación del ADN y de esta forma se logra la transición de la fase G1 a la S. El E2F también estimula la transcripción de la ciclina A que actúa con la Cdk2 como compañera formando el complejo Cdk2/ciclina A. Este complejo, cuya concentración se incrementa a medida que avanza la fase S es capaz de fosforilar a E2F haciendo que éste abandone el ADN y con ello se suprime la transcripción de los genes dependientes de E2F.

De esta forma todos los genes cuya transcripción depende de E2F comienzan a transcribirse lentamente a mediados de G1, después se incrementa la transcripción en la transición de G1 a S, y prácticamente queda eliminada al final de la etapa S.

Si la regulación transcripcional está mejor conocida para las ciclinas de la fase G1, la regulación por proteólisis está más estudiada para las ciclinas mitóticas, es decir, A y B. Para arribar a la telofase y poder salir de la mitosis, las células promueven la degradación proteolítica de las ciclinas. Esta proteólisis se lleva a cabo por el sistema dependiente de la ubiquitina y requiere de una pequeña secuencia de aminoácidos localizada hacia el extremo N terminal de las ciclinas A y B y que se conoce como motivo de autodestrucción. Esa destrucción se realiza por un gran complejo multiproteínico denominado Complejo Promotor de la Anafase, o Ciclosoma, que cataliza la transferencia de ubiquitina a varios sustratos mitóticos, entre ellos a las ciclinas. La actividad del complejo promotor de la anafase permanece elevada durante G1 hasta la aparición de las ciclinas características de esta etapa. También las ciclinas E y D son degradadas por el sistema de la ubiquitina. En ambos casos se requiere la fosforilación de las ciclinas. Como se ha podido apreciar estos diversos mecanismos de regulación permiten que las ciclinas y con ellas sus Cdk acompañantes existan solamente en el lugar y en el momento adecuado del ciclo celular lo que permite que éste progrese de una generación celular a la siguiente.

Las proteínas kinasas dependientes de ciclina (Cdk)⁵

Las protein kinasas dependientes de ciclina (Cdk) son enzimas que transfieren grupos fosforilos del ATP hacia grupos hidroxilos de serina o treonina de las proteínas sustratos.

La progresión del ciclo por G1 en los vertebrados requiere la estimulación externa por factores de crecimiento (Figura 2.2). En muchos tipos celulares la respuesta clave a estos factores de crecimiento es la activación de la Cdk4 u otra íntimamente relacionada con la Cdk6 las cuales actúan en asociación con las ciclinas D (D1, D2 y D3). Los complejos Cdk4/Cdk6/ciclina D hacen progresar las células por G1 al suprimir la acción antiproliferante de la proteína pRB, como lo demuestra el hecho de que células carentes de pRB progresan por G1 en ausencia de Cdk4/ciclina D.

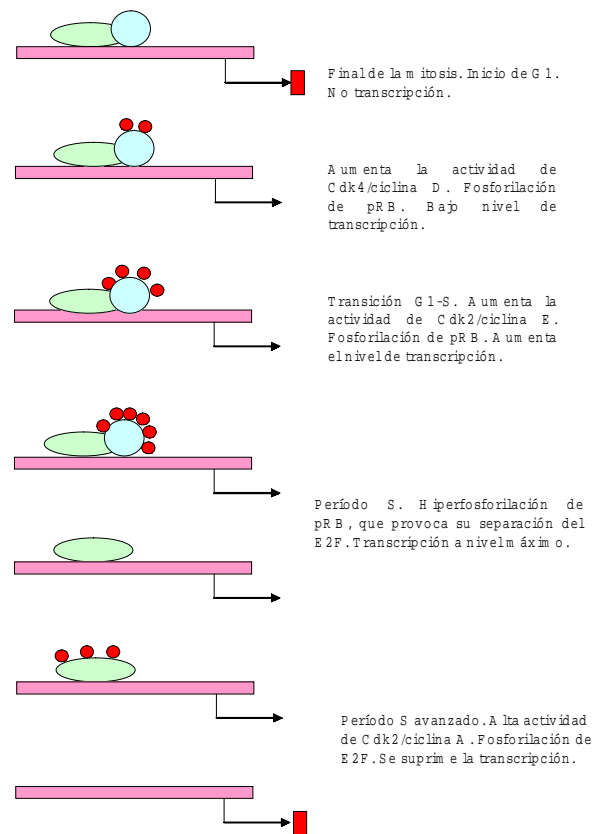


Figura 2.2. Eventos moleculares que favorecen la progresión del ciclo celular. Más detalles en el texto.

⁵ Del inglés Cyclin-Dependent Kinases.

La Cdk2 se asocia con la ciclina E en la transición de la fase G1 a la fase S y posteriormente se asocia con la ciclina A haciendo progresar la fase S aunque su papel exacto no está totalmente establecido.

La concentración nuclear de la ciclina B se eleva a mediados de la fase G2 y forma complejos con la Cdk1 al cual se ha llamado Factor Promotor de la Mitosis (MPF del inglés mitosis promoting factor). Este complejo es el que fosforila la lámina nuclear en la profase posibilitando la desintegración de la envoltura nuclear.

Existen como mínimo cuatro mecanismos principales para la regulación de la actividad de las Cdk. El mecanismo primario de activación es la unión con las ciclinas, que se completa en la mayoría de las Cdk por la fosforilación en un residuo específico de treonina de la posición 160. Por otra parte los complejos Cdk/ciclina pueden ser inactivados por al menos dos mecanismos: la unión con proteínas inhibidoras (CDI) y la fosforilación en sitios inhibitorios cerca del extremo N terminal.

Los inhibidores de las Cdk (CDI/CKI)

Todos los mecanismos reguladores de la progresión de un proceso no sólo necesita de factores que lo aceleren sino que también requieren de algunos que lo frenen o retarden. El ciclo celular también posee esos frenos moleculares que son los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina (CDI o CKI). Estos inhibidores forman un grupo de proteínas de masa molecular relativamente pequeña, 15 a 57 kDa, cuya unión a los complejos Cdk/ciclina determina la inactivación de éstos. En las células de mamíferos pueden distinguirse dos grupos de CDI: la familia Cip/Kip y la familia INK4. Los primeros son inhibidores de cualquiera de las Cdk, mientras los segundos son específicos para las Cdk que actúan con las ciclinas D. Los distintos miembros de cada familia actúan en tejidos específicos y proporcionan un mecanismo mediante el cual puede retardarse la progresión del ciclo celular en respuesta a señales tanto intracelulares como extracelulares.

Análisis de ligamiento genético de familias con melanoma hereditario localizaron un gen putativo de susceptibilidad en la región cromosómica 9p21, la cual es un sitio de rearrreglos cromosómicos frecuentes y pérdida de heterocigocidad en otros tumores esporádicos. Esta región incluye los genes INK4a y INK4b ligados en tándem y las mutaciones encontradas argumentan a favor de que el gen implicado es el INK4a. Recientemente se ha demostrado que mutaciones y deleciones que involucran a INK4a son frecuentes en diferentes tipos de tumores humanos. Esto significa que INK4a puede funcionar como un gen supresor tumoral.

Fosfoproteínas fosfatasa

Como ya fue señalado la actividad de los complejos Cdk/ciclinas depende del grado de fosforilación de la subunidad catalítica. Por lo tanto es el balance entre la actividad de las quinasas y las fosfatasa lo que en última instancia determina el progreso del ciclo celular.

Se ha identificado una actividad enzimática designada KAP (por Kinase associated phosphatase) que cataliza la hidrólisis del enlace éster fosfórico en la posición T160. Esta reacción solamente se realiza si la Cdk no está unida a su ciclina acompañante pues la enzima no es capaz de actuar sobre los complejos Cdk/ciclina, bien porque la ciclina inhibe la actividad de la KAP, bien porque ambas proteínas se unen a la Cdk por el mismo sitio.

La desfosforilación de los sitios inhibitorios es catalizada por fosfoproteínas fosfatasas pertenecientes a la familia génica CDC25. En los humanos existen al menos tres miembros de esta familia denominados Cdc25A, Cdc25B y Cdc25C, de ellas las dos primeras se expresan en G1 y en la transición hacia la fase S mientras la Cdc25C es la isoforma mitótica. Estas enzimas requieren ser fosforiladas para su activación. La Cdc25A que es necesaria para la iniciación de la fase S es fosforilada y activada por el complejo Cdk2/ciclina E que como ya se señaló se encuentra activado al final de la fase G1.

En las desfosforilaciones también parecen estar implicadas otras fosfoproteínas fosfatasas inespecíficas como las tipo 1A y 2A.

LA BIOLOGIA MOLECULAR

La Biología Molecular se ocupa básicamente de los mecanismos moleculares que son el sustento de los procesos de transmisión, expresión y conservación de la información genética, a partir de la estructura, las propiedades y las funciones de las macromoléculas implicadas en esos procesos. También estudia las alteraciones que se producen en esos procesos como consecuencia de las acciones de agentes internos y externos que ocurren sobre el individuo actual o sobre sus antecesores. Por último se encarga de la aplicación a la industria, la agricultura, el cuidado del ambiente, la medicina, etc., de esos conocimientos. Las modernas Biotecnologías son la expresión más acabada de la aplicación de la Biología Molecular a la práctica diaria del hombre. Sus inicios pueden ubicarse en 1953 con la aparición del modelo molecular del ADN postulado por Watson y Crick.

Estructura del ADN

Se ha calculado que el organismo humano posee 10^{12} células somáticas y cada una de ellas posee en su núcleo 46 moléculas de ADN que constituyen el contenido fundamental de los cromosomas. Además en cada una de las mitocondrias existe un número variable de moléculas de ADN que se diferencia en algunos aspectos de las moléculas del ADN nuclear.

Según el modelo descrito por Watson y Crick el ADN está formado por hebras de polidesoxinucleótidos (esto es, que resultan de la unión de un gran número de desoxinucleótidos) enlazados mediante un enlace fosfodiéster. Este enlace se establece entre la posición 3' de un

desoxinucleótido y la posición 5' del otro por lo que se denomina 3' 5'. De esta forma la hebra posee un extremo con el grupo fosfato de la posición 5' libre (extremo 5') y el otro que presenta libre el grupo OH de la posición 3' (extremo 3'). Cada desoxinucleótido a su vez está formado por una base nitrogenada que puede ser purínica o pirimidínica, por la D-2-desoxiribosa y una o más moléculas de ácido fosfórico. Las bases purínicas del ADN son la Adenina (A) y la Guanina (G), mientras que las pirimidínicas son la Citosina (C) y la Timina (T). Cuando se forma el polímero hay una zona con una estructura monótona pues en ella se alternan la desoxiribosa y el grupo fosfato a todo lo largo de la cadena, pero también una zona diversa pues las bases nitrogenadas que sobresalen de la estructura monótona son diferentes en cada sector de la molécula. Es precisamente en el orden o sucesión de esas bases nitrogenadas donde está contenida la información genética (Figura 2.3).

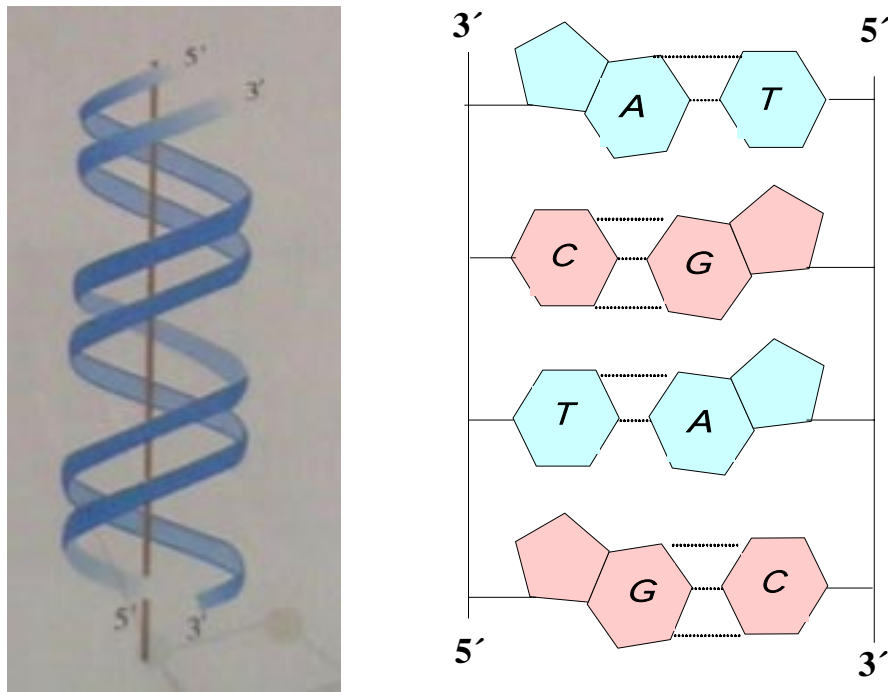


Figura 2.3. Diagrama de la estructura secundaria del ADN que muestra el eje covalente principal de desoxirribosa y fosfato, que forman la doble hélice con giro derecho. Las bases nitrogenadas (no representadas) se orientan hacia el interior de la molécula perpendiculares al eje covalente principal. Los pares de bases son obligados adenina con timina y guanina con citosina.

Watson y Crick propusieron que la molécula de ADN estaba formada por dos hebras que se disponían en forma antiparalela, es decir, el extremo 5' de una coincidía con el 3' de la otra y adquirirían la forma de una doble hélice de giro derecho. La zona monótona estaba dispuesta hacia el exterior mientras que la zona diversa se orientaba hacia el interior de la molécula, de manera que las bases nitrogenada de una hebra se enfrentaban a las bases de la otra. Lo más trascendental del modelo era que la estructura solamente podía acomodar dos pares de bases, los formados por la Adenina y la Timina (A-T) y por la citosina y la Guanina (C-G). Las bases de cada par se dice que son complementarias. Estos pares se mantenían unidos por la formación de puentes de hidrógeno entre las bases, dos puentes en el par A-T y tres en el C-G. No existía restricción alguna para la sucesión de la bases en una de las hebras, pero la de la otra hebra venía determinada debido al carácter complementario del apareamiento.

Este modelo permitió ver rápidamente el fundamento de una de las funciones más trascendentales de los seres vivos, esto es, su reproducción en seres de su misma especie. Para ello, las moléculas portadoras de la información genética debían duplicarse dando cada una dos moléculas idénticas a las progenitoras. Watson y Crick propusieron que durante ese proceso las dos hebras del ADN se separaban y cada una de ella servía de molde para la formación de la hebra complementaria. Esta idea básica ha resultado ser cierta, aunque el mecanismo es mucho más complejo que lo imaginado en los primeros momentos.

LA TRANSMISION DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA

Tal vez la característica más sobresaliente de los seres vivos es la de poder originar organismos esencialmente iguales a sus progenitores, es decir, reproducirse. Esto sucede gracias a que los organismos contienen en su ADN toda la información necesaria para la formación de un organismo similar. Por lo tanto, para reproducirse al organismo dado le basta con obtener una copia lo más exacta posible de su ADN y transferírsela a sus descendientes. Desde el punto de vista molecular este proceso consiste en obtener dos moléculas de ADN idénticas entre sí e idénticas a la que les dio origen. En eso precisamente consiste la replicación del ADN que es el mecanismo molecular que sustenta la reproducción de todos los organismos vivos.

La replicación del ADN

Durante la fase S del ciclo celular se produce la replicación del ADN, proceso que consiste en obtener, a partir del ADN celular, dos moléculas idénticas de éste. Para este proceso se requiere el concurso de un gran número de proteínas enzimáticas y no enzimáticas.

El proceso global de la replicación comienza prácticamente durante la telofase de la mitosis cuando proteínas del llamado complejo de reconocimiento del origen (ORC) se unen a zonas específicas del ADN marcando los sitios donde debe comenzar la replicación. En las células humanas estos sitios son numerosos y pueden llegar a ser más de mil en un solo cromosoma. Al ORC se unen otras proteínas formando el complejo prereplicativo que está totalmente formado en G1 (Figura 2.4).

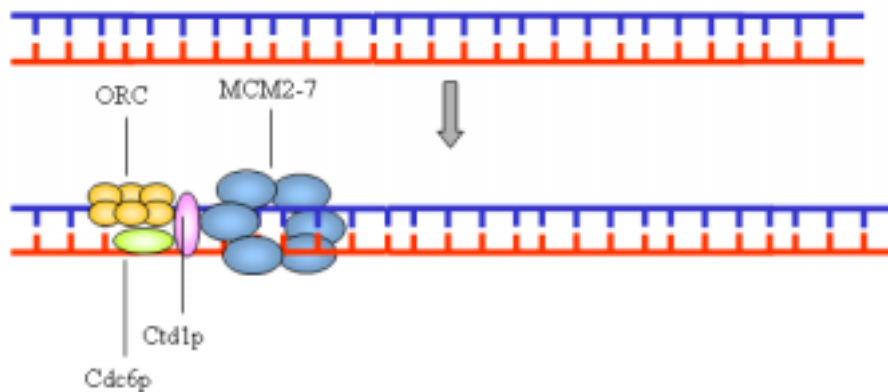


Figura 2.4. Durante el final de la telofase y la primera mitad del período G1 se forma el complejo prereplicativo formado por el complejo de reconocimiento del origen (ORC) la Cdc6p, la Ctd1p y el complejo MCM2-7 con actividad de helicasa

Para la formación de este complejo es necesario que los niveles de actividad de las Cdk esté bajo, como ocurre en estas etapas del ciclo. Cuando al final de G1 se elevan los niveles de actividad del complejo Cdk2/ciclina E, varias de las proteínas que forman el complejo son fosforiladas lo que permite reclutar a esos sitios a otras proteínas que dan inicio a la replicación. Como durante todo el resto del ciclo celular los niveles de actividad de las Cdk son altos, no es posible la formación de un nuevo complejo replicativo y esto garantiza que el ADN se replique solamente una vez durante el ciclo celular.(Figura 2.5).

La acción de todas esas proteínas permite la abertura de la doble hélice dando acceso a las bases nitrogenadas. La proteína replicativa A (RPA) estabiliza la hebra simple impidiendo vuelvan a aparearse. Un complejo enzimático formado por la ADN polimerasa α y una enzima iniciadora (pol α /iniciadora) se unen a la zona de hebra simple que se ha formado. La iniciadora forma un pequeño ARN de unos diez nucleóticos que después es alargado por la pol α unos veinte nucleóticos aunque puede llegar hasta doscientos. (Figura 2.6).

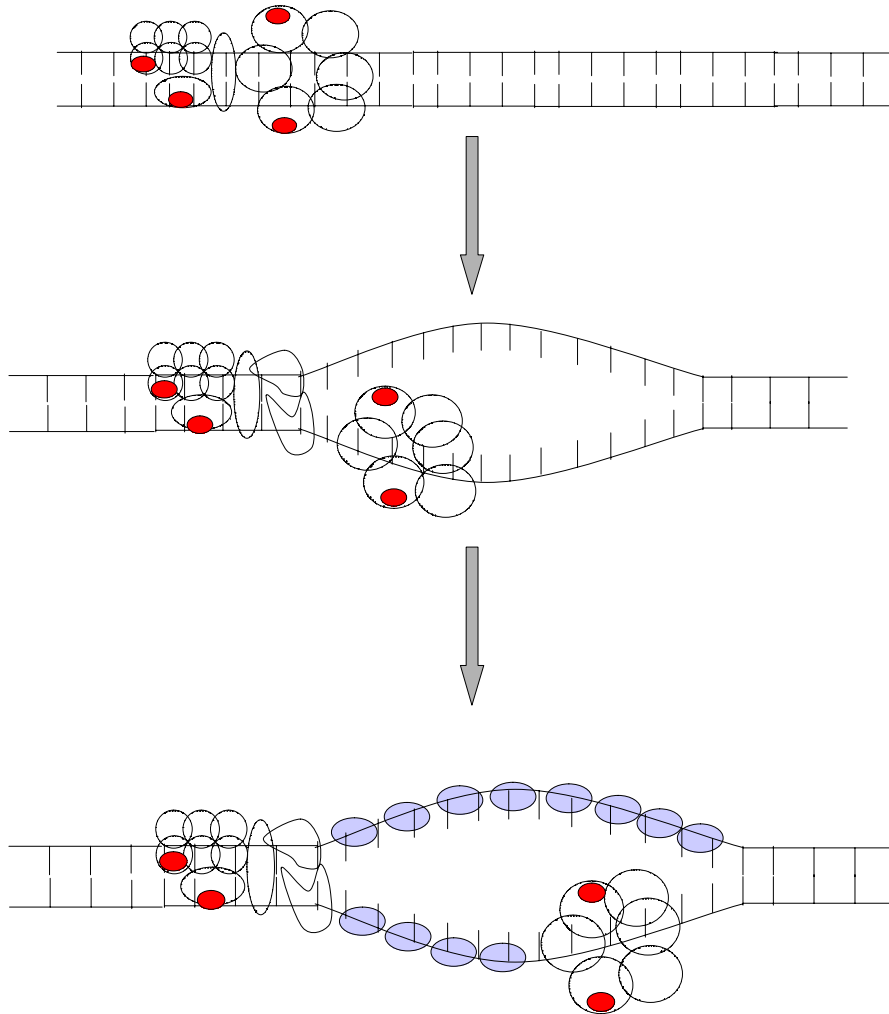


Figura 2.5. En la transición de G1-S aumenta la actividad del complejo Cdk2/cilina E que fosforila varias proteínas del complejo prereplicativo. Si estas proteínas están unidas al ADN permanecen ahí, pero si están libres no pueden unirse al ADN y esto impide que puedan realizarse dos replications en el mismo ciclo celular. Por otra parte estas fosforilaciones permiten la asociación de las proteínas Cdc45p y Mcm10p que de alguna forma propician la apertura del ADN. Esta apertura al parecer es ensanchada por el complejo MCM2-7. Las hebras son estabilizadas por la RP-A y esto permite la incorporación de la ADN polimerasa alfa.

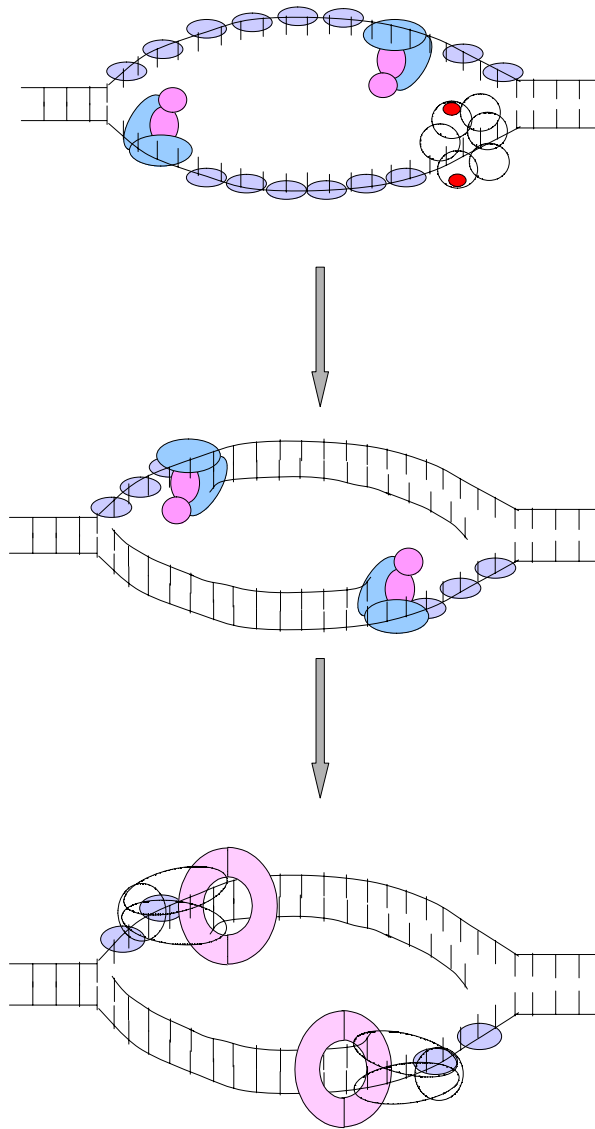


Figura 2.6. La ADN polimerasa alfa tiene actividad de iniciadora y sintetiza un fragmento de ARN complementario al ADN y después lo alarga con desoxinucleótidos hasta formar un polímero de unas 20 unidades que sirven de iniciador o cebador para la síntesis del ADN. En el extremo del iniciador la RF-C (no representada) monta el PCNA que permite la incorporación del la ADN polimerasa delta.

Al extremo 3' de este polinucleótido iniciador se asocia el factor replicativo C (RF-C) que carga al antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA) alrededor del ADN. El PCNA forma un anillo deslizante que rodea al ADN pero sin entrar en contacto directo con él. Al PCNA se asocia la ADN polimerasa δ (o la ϵ) que alarga el polímero hasta cerca de cinco mil nucleótidos sin separarse del ADN.

Como las polimerasas solamente alargan la cadena en el sentido 5'-3' una de las hebras se sintetiza de forma continua (hebra conductora) mientras que la otra se tiene que sintetizar por fragmentos, siendo necesario el concurso del complejo pol α /iniciadora para la formación de cada fragmento. Los segmentos iniciadores son retirados por la endonucleasa FEN1, las brechas son rellenadas por la pol ϵ (o la δ) y la hebra es sellada por la acción de la ADN ligasa 1 (Figura 2.7).

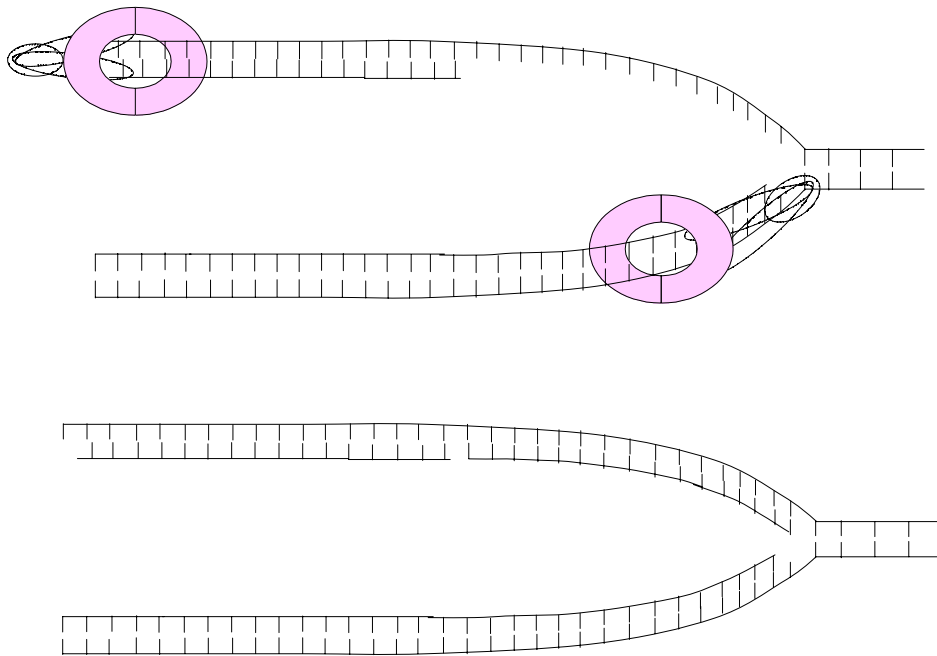


Figura 2.7. Como las ADN polimerasas alargan las hebras en el sentido 5'-3' una de las hebras se sintetiza de forma continua pero la otra tiene que hacerlo por fragmentos pues el movimiento de la horquilla de replicación es contrario al movimiento de la polimerasa

El movimiento del sistema sintetizador crea superenrolamientos en el ADN que son aliviados por la acción de la topoisomerasa I. Cuando dos horquillas de replicación que avanzan en sentido contrario (una hacia la otra) se encuentran el proceso termina. Como en cada cromosoma se forman cientos de horquillas la replicación del ADN de cada uno que tienen entre 50 y 350 millones de pares de bases se produce solamente en unas horas.

Para la replicación de los extremos del ADN que forma parte de los telómeros existe una enzima especial (telomerasa) que contiene como cofactor un ARN que le sirve de molde para el alargamiento de los extremos.

Todo este proceso se realiza con una alta fidelidad de copia pues las ADN polimerasas cometen un error por cada 10^8 a 10^{10} desoxinucleótidos incorporados. Una vez terminada la replicación la célula entra en el período G2. Al inicio de esta etapa se realiza un proceso de corrección de la síntesis del ADN. Durante su actividad las ADN polimerasas cometen errores tales como la incorporación de bases incorrectas, la inserción de bases adicionales o la falta de incorporación de una o más bases. Se ponen en acción un grupo de proteínas codificadas por los genes MSH1, MSH2, MLH2, PMS1 y PMS2 cuya actividad coordinada es capaz de rectificar los errores cometidos durante la replicación. De no reparar los malos apareamientos aparecen mutaciones consistentes en cambios de bases, pero la no reparación de inserciones y deleciones dan lugar a la aparición de microsatélites que pueden dar lugar a una inestabilidad cromosómica. Un microsatélite es la repetición de unos pocos pares de base (generalmente de 1 a 3). Cuando se produce la elongación de la replicación del ADN, en ocasiones se producen deslizamientos en el movimiento de la ADN polimerasas δ que en unos casos lleva a que una base sea copiada dos veces (inserciones) y en otras al salto de una base que no es copiada (deleciones), originándose así los microsatélites. La inestabilidad cromosómica originada por los microsatélites en algunos casos trae como resultado la transformación cancerosa de la célula, como sucede con el cáncer colorectal no polipósico hereditario.

Una vez rectificado el ADN comienza el proceso de empaquetamiento de la cromatina que al hacerse cada vez más compacta da lugar a los cromosomas que se hacen visible al principio de la mitosis.

La mitosis

La mitosis constituye la etapa final de la transmisión de la información genética, pues en ella las dos moléculas de ADN formadas durante la replicación son segregadas hacia las células hija de modo que cada una de ellas reciba la misma información genética que la célula madre.

El estudio de la mitosis se acostumbra a dividir en cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase.

La profase: Puede decirse que la profase se inicia con la visualización de los cromosomas que este momento aún son largos pues no ha terminado su empaquetamiento. Este empaquetamiento lleva a la desaparición del nucléolo. Por otra parte se produce la desintegración de la envoltura nuclear mientras que en el citoplasma comienza a formarse el huso mitótico.

La metafase: La condensación de la cromatina continúa así como la formación del huso y los cromosomas van asociándose con las fibras del huso hasta que en la metafase quedan orientados en el centro de la célula, unidas a las fibras del huso por el cinetocoro, dando lugar a la llamada placa ecuatorial.

La anafase: Una vez que todos los cromosomas se han alineado comienza la anafase con la separación de las cromátidas y su migración hacia los polos del huso mitótico.

La telofase: Ya en la telofase se produce la desaparición del huso, la reaparición de la envoltura nuclear, se produce la descondensación de la cromatina y reaparece el nucléolo. El proceso termina cuando un anillo fibroso de actina se forma por debajo de la membrana plasmática en la posición donde estuvo la placa ecuatorial. Este anillo va contrayéndose y produce la estrangulación de la célula hasta formar dos células hijas. Este último fenómeno recibe el nombre de citocinesis.

De esta forma cada una de las células formadas contiene la misma información genética que a su vez es igual a la de la célula que le dio origen y con ello concluye el proceso de transmisión de la información genética.

De lo anterior se desprende que la función reproductora de los seres vivos se lleva a cabo mediante dos procesos más o menos consecutivos, la replicación del ADN en el cual la información genética de la célula se duplica y la división celular que divide la información duplicada entre las dos células hijas. Aunque en los organismos multicelulares el proceso es más complejo, los fundamentos moleculares son los mismos.

Los mecanismos de expresión y conservación de la información genética se estudiarán en el siguiente capítulo.