

Biología Molecular

P. G. B.

Primero B-Grupo III

ÍNDICE

Contenido.....	Páginas
-Índice.....	3
-Contenido del trabajo.....	4
-Código genético.....	7
-Composición molecular de los genes.....	8
-Secuenciamiento del código genético.....	12
-Ingeniería genética.....	15
-Enzimas de restricción.....	15
-Fusión celular.....	20
-Trasplante nuclear y ampliación génica.....	23
-Bibliografía.....	29

CONTENIDO DEL TRABAJO

El siguiente trabajo comprende los temas más importantes que se reúnen generalmente bajo la denominación de biología molecular. En este campo se han verificado los progresos más notables de los últimos años, sobre los cuales reside el futuro de muchos aspectos de la biología molecular. Estos estudios están íntimamente relacionados con la genética molecular, que intenta explicar los fenómenos hereditarios como resultantes de la función de componentes químicos específicos localizados o formados en los cromosomas. Se ha demostrado, así, que la información genética es dictada inicialmente por la disposición de las bases del ácido desoxirribonucleico (ADN), que luego es transcrita a las diferentes moléculas del ácido ribonucleico (ARN-mensajero, ARN de transferencia y ARN ribosómico) y, finalmente, traducida en diversas proteínas y enzimas específicas.

Primero analizaremos el modo en que la información genética se acumula en el ADN. En el **código genético** cada aminoácido es especificado por un grupo de tres nucleótidos (codón). El código genético es universal y es compartido por todos los organismos vivientes, con muy pocas excepciones conocidas. Las cuatro diferentes bases nitrogenadas dan lugar a los distintos codones, con estas cuatro bases se forman los dieciséis codones.

Veremos por encima la **transcripción**, es decir, el proceso por el cual los genes son copiados en ARN para producir ARNs mensajeros, los que a su vez codificarán las proteínas. El ARN mensajero de los eucariotas es generalmente producido en forma de grandes moléculas precursoras, que luego son procesadas para dar lugar a ARNs maduros más cortos.

Por último abarcaré los problemas fundamentales de la diferencia-ción celular. Esta parte adquiere una importancia especial en biología, puesto que en él se exponen los fundamentos recientes sobre la regulación de la acción génica en células superiores. Los experimentos de control nuclear ejercido por el citoplasma demuestran la influencia de éste sobre el núcleo e ilustran, además, las continuas interrelaciones entre los dos territorios celulares principales. En los organismos superiores los diversos tejidos tienen células especializadas que expresan genes diferentes. Se analizarán los posibles mecanismos por los cuales se establecen las primeras diferencias entre las células embrionarias.

EL CÓDIGO GENÉTICO

Los conceptos de genotipo y fenotipo son bastante conocidos, pero no los son tanto los mecanismos por los cuales el genotipo se expresa en el fenotipo. Ahora analizaremos la vía molecular por medio de la cual un gen puede producir cambios fenotípicos como los observados por Mendel en sus experimentos con las arvejas.

Se sabe actualmente que el **ácido desoxirribonucleico** (ADN) es el material genético de las células: es decir, la molécula que lleva la información en forma codificada de una molécula a otra y de las células parentales a las filiales. La expresión de un gen se hace mediante su copia en **ácido ribonucleico** (ARN), que a su vez dirige la síntesis de las **proteínas específicas**, las cuales son la última etapa de la información genética. El ARN representa el material genético en ciertos virus, los que contienen ARN en vez de ADN. Estos conceptos fueron resumidos por Crick en la secuencia, que se considera como **el dogma central de la biología molecular**:

El flujo de la información presenta, pues, tres etapas:

- 1.-**Replicación** de la molécula de ADN y, por lo tanto de la información genética.
- 2.-**Transcripción** de la información en moléculas de ARN.

3.-Traducción de la información en proteínas (y enzimas) de una célula.

Se debe recordar que *transcripción se usa como sinónimo de síntesis*

de ARN y traducción como equivalente de síntesis de proteínas.

Como sabemos puede existir una inversión en este diagrama. En los virus que contienen ARN, la transcripción puede revertirse por la acción de la **transcriptasa invertida**, (ARNADN). En cambio, la traducción de ARN en proteínas es unidireccional y no puede ser invertida. El mecanismo básico por el cual se expresa la información genética fue descubierto inicialmente en organismos simples, como

bacterias y virus. El más usado fue la *Escherichia Coli*, una bacteria que vive en el intestino del hombre. Se sabe actualmente que los mismos principios genéticos operan en *Escherichia Coli* y en los animales y plantas superiores.

Composición molecular de los genes

Mucho después que Mendel descubriera que los genes se heredaran en forma de factores separados, las observaciones citogenéticas indicaron que el material genético estaba localizado en los cromosomas. En 1924, Feulgen desarrolló la conocida reacción histoquímica y demostró que los cromosomas contienen ADN. Sin embargo, por mucho tiempo se pensó que el material genético debería ser una proteína nuclear. Esto se debió al hecho de que, teniendo los ácidos nucleicos sólo cuatro nucleótidos, parecían demasiado simples como para codificar la gran cantidad de proteínas.

Los estudios citofotométricos demostraron que los núcleos contenían una **cantidad constante** de ADN y esto llevó a pensar en el posible papel del ADN en la herencia. Para entonces, sin embargo, ya se había demostrado en microorganismos que el ADN era, en realidad, el material genético.

En 1928, Griffith encontró que una variedad no patógena de neumococo podía **transformarse** en una variedad virulenta, si se inyectaba en ratones juntamente con neumococos patógenos muertos por el calor. Avery y colaboradores, en 1944, purificaron el **factor de transformación** y demostraron que el ADN aislado del neumococo patógeno era el causante de la transformación.

En la actualidad se conocen los fenómenos moleculares de la transformación del neumococo. Se observa que el ADN liberado de una bacteria es tomado por otra y se recombina con el cromosoma de la célula huésped. En el experimento de Avery, el ADN transferido produce la síntesis del polisacárido de la cápsula, que lo vuelve virulento.

La capacidad del ADN de transferible de una bacteria a otra es un fenómeno esencial en genética, ya que hace posible estudiar la frecuencia de recombinaciones entre diversas mutaciones y construir mapas genéticos. La transformación permite también la moderna tecnología de la ingeniería genética por la cual fragmentos foráneos de ADN se unen a plásmidos y se incorporan a *E. coli*.

En la **transducción**, fragmentos de ADN se incorporan a un bacteriófago y luego son introducidos, junto con el ADN viral, dentro de la bacteria. En la **conjugación** se aparean y recombinan dos bacterias de sexo diferente. El análisis de estos y otros mecanismos de recombinación es empleado extensamente en genética molecular, y ha permitido confeccionar mapas genéticos muy detallados de los cromosomas bacterianos.

La unidad hereditaria que contiene la información para codificar un aminoácido es el **codón**, que está formado por tres nucleótidos (**triplete**). Esta información se transcribe en el ARN mensajero (ARNm), que tienen una

secuencia de bases complementarias a la del ADN. Tanto el ADN como el ARNm poseen solo 4 bases diferentes, mientras que las proteínas contienen 20 aminoácidos distintos.

MENSAJEROS ARTIFICIALES

El experimento fundamental para resolver el código genético fue realizado por Nirenberg y Mathei, en 1961. Estos autores descubrieron que, utilizando polirribonucleótidos sintéticos como ARNs mensajeros, era posible estimular la incorporación de aminoácidos en un sistema libre de células. El primer ARN utilizado fue el *ácido poliuridílico* (poli U), que dio como resultado la síntesis de *polifenilalanina*. Se pudo concluir así que el codón UUU era capaz de codificar la fenilalanina.

El sistema libre de células utilizado fue un extracto de *E. coli*, en el que las bacterias se rompieron y se sacó la pared celular por centrifugación.

Este extracto contenía ribosomas, ARNt, las enzimas amino-acilsintetasas y otros factores requeridos para la síntesis, como aminoácidos radiactivos, ATP, GTP y el ARNm exógeno (los ARNm endógenos de la *E. coli* son de vida muy corta, se degradan luego de una preincubación del extracto a 37° C por pocos minutos). Además del poli U, se usaron otros homopolímeros como el poli A (AAA), que codificó lisina y el poli C (CCC) que dio prolina.

El uso de ARNs sintéticos y de composición conocida fue posible gracias al descubrimiento previo de Ochoa de la enzima **polinucleótido fosforilasa**, que polimeriza nucleótidos difosfatos y produce ARNs artificiales, cuya composición depende de la proporción de los distintos nucleótidos utilizados.

In vivo, la polinucleotido fosforilasa funciona como una enzima que degrada al **ARN polimerasa** que usa nucleósidos trifosfatos como sustrato y requiere ADN como molde (templado).

El flujo de la información genética es de la siguiente forma:

La traducción es unidireccional, pero la transcripción puede ser invertida (ARN → ADN) por intermedio de la transcriptasa invertida. La información contenida en el ADN y ARN se basa en los 4 nucleótidos y la de proteínas, en los 20 aminoácidos, y las células son capaces de traducir el código de 4 letras en el de 20.

Los experimentos de Avery con neumococos dieron la primera demostración de que el ADN es la molécula que contiene la información. Esta puede producir transformación de una cepa de neumococo no virulenta. También es posible incorporar en bacterias trozos de ADN por medio de plásmidos, por transducción y conjugación.

La hipótesis de un gen, una enzima se representa mejor por la de un gen, una cadena polipeptídica, y esto puede ilustrarse con las enfermedades hereditarias conocidas como errores del metabolismo. Por ejemplo, la fenilcetonuria, el albinismo, la galactosemia y el cretinismo son producidos por la ausencia de una de las proteínas (enzima). En la hemoglobina, el cambio de uno solo de los aminoácidos puede producir la anemia falciforme.

El código se lee en grupos de tres nucleótidos. Las unidades de información son los codones (tripletes) que codifican los aminoácidos. El código genético consiste en 4³ = 64 codones, y la longitud del gen está relacionada con el número de aminoácidos en la proteína (por ejemplo; 1500 nucleótidos o 500 codones para 500 aminoácidos).

El código del ADN se transcribe en moléculas complementarias de ARN a partir de una de sus cadenas. La lectura del código se hace en los ribosomas por medio de una molécula que sirve de adaptador. Este es el ARN de transferencia que lleva el aminoácido.

El código genético fue descifrado mediante el uso de ARNms sintéticos de un solo nucleótido (por ejemplo, polirribouridina). También se usaron polinucleótidos con dos o tres tipos de bases y trinucleótidos de composición conocida, así como polirribonucleótidos con dobletes o tripletes alternados.

De los 64 codones, 3 representan señales de terminación y 61 codifican los 20 aminoácidos. Hay por lo tanto tripletes sinónimos. Dado que el número de ARNts que llevan los anticodones y los aminoácidos son menos de 61, se puede explicar la discrepancia por el movimiento (wobble) de la tercera base del anticodón para aparearse con más de una base.

El codón inicial es el AUG que codifica la N-formilmetionina en los procariontes. Los codones de terminación o sin sentido son UAA, UAG y UGA. El código genético es universal; es decir, hay un solo código para todos los organismos vivos.

SECUENCIAMIENTO DEL ADN Y EL CÓDIGO GENÉTICO

El código genético puede ser también descifrado comparando la secuencia de aminoácidos de una proteína con la secuencia de nucleótidos del gen que la codifica. En los últimos años se han desarrollado métodos que permiten el rápido secuenciamiento del ADN, lo que ha producido una verdadera revolución en el mundo de la biología molecular. Por estos métodos se ha podido conocer la secuencia completa del ADN del bacteriófago ϕ X 174, virus que infecta a la E. coli y del SV 40, que ataca a las células del mono.

Esto ha llevado a confirmar el código genético y a establecer que todos los codones son usados *in vivo*. Además se obtuvieron resultados inesperados sobre la organización de los genes.

CONFIRMACIÓN DEL CODIGO GENÉTICO.

Haber descifrado la secuencia del ADN del ϕ X- y del SV 40, así como la secuencia de algunas proteínas, ha permitido una hermosa confirmación del código genético. Se muestran los diferentes codones que usan estos virus, y de su lectura se puede concluir que los 61 codones son empleados *in vivo* para codificar los aminoácidos. Aunque todos ellos se utilizan, algunos codones son preferidos. Por ejemplo, el ϕ X 174 prefiere codones con U en la tercera posición, lo que probablemente refleja el hecho de que el ADN es rico en T.

SECUENCIACIÓN DEL CODIGO GENÉTICO.

En la actualidad hay métodos que permiten el rápido secuenciamiento del ADN, lo que ha generado una nueva revolución en biología molecular. En éste se producen fragmentos de ADN de distinta longitud que empiezan en puntos fijos y terminan en nucleótidos específicos. La lectura se hace en geles de poliacrilamida que separan los fragmentos de ADN por masa. Con estos métodos se pudo establecer la secuencia completa del ϕ X 174 y del SV 40.

El ADN del ϕ C 174 contiene 5375 nucleótidos, pero 6000 nucleótidos hubieran sido necesarios para codificar las 10 proteínas que produce este virus. La discrepancia se explica porque hay superposición de ciertos genes y, en consecuencia, algunos segmentos de ADN pueden codificar dos secuencias de aminoácidos utilizando un encuadre diferente de los codones. El gen K del ϕ X 174 se superpone con los genes A y C y la secuencia de nucleótidos se lee en las tres posibles fases de traducción del mensaje.

El conocimiento de la secuencia del ADN en ϕ X 174 y SV 40 y de la secuencia de aminoácidos de algunas de las proteínas ha permitido una hermosa confirmación del código genético. Se encontró que los 61 codones se usan *in vivo*, aunque algunos son preferidos.

INGENIERÍA GENÉTICA.

ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

Los estudios antes mencionados en los virus ϕ X 174 y SV 40 fueron posibles porque sus cromosomas son muy pequeños y se pueden obtener en forma pura. En cambio, un cromosoma eucariótico contiene una molécula de ADN muy larga y por lo tanto, mucho más difícil de estudiar. Este problema pudo ser solucionado mediante las técnicas llamadas de **ingeniería genética**, que permiten cortar segmentos breves de ADN y unirlos a **plásmidos**, que son cromosomas bacterianos muy pequeños. Luego se puede lograr la replicación de éstos en *E. coli*. Aunque la ingeniería genética es un problema esencialmente tecnológico, se la debe mencionar aquí por su amplio uso actual y por las posibles aplicaciones en la industria y la medicina para la producción en gran escala de valiosas proteínas.

RECONOCIMIENTO DE SECUENCIAS ESPECÍFICAS DEL ADN.

La ingeniería genética se basa en el uso de endonucleasas de restricción, enzimas que reconocen secuencias específicas de nucleótidos y cortan el ADN. Hay dos clases principales. La clase I es de enzimas que reconocen una secuencia específica, pero que cortan el ADN en sitios específicos, los cuales pueden estar varios nucleótidos más lejos. Por tal motivo estas endonucleasas no son útiles en ingeniería genética. En cambio, las de clase II constituyen una especie de bisturí molecular que corta el ADN en sitios específicos y resultan de mucha utilidad. Hasta el momento se conocen unas 80 enzimas de la clase II.

La denominación de las diversas endonucleasas de restricción procede del microorganismo de donde fue aislada. Por ejemplo, **Eco RI** es una enzima de *E. coli* que contiene el plásmido RI (éste produce resistencia a drogas). Las enzimas de restricción generalmente reconocen una secuencia de 4 a 6 nucleótidos.

Las que reconocen 4 nucleótidos producen fragmentos de ADN más cortos (unos 250 pares de bases); los que reconocen 6 fueron fragmentos más largos (alrededor de 4000 pares de bases). Una característica importante de estas secuencias es que son simétricas. Por ejemplo:

5' GAA TTC 3'

3' CTT AAG 5'

Se observa que hay un eje de simetría a partir del cual la secuencia se lee lo mismo en ambas cadenas en la dirección 5' $\rightarrow$ 3'. Algunas enzimas cortan en el medio y producen un corte neto. En otras el corte hace posible separar varios nucleótidos, lo que permite producir segmentos de ADN de una sola cadena, que pueden aparearse entre sí. Estos extremos, llamados "pegajosos" (**sticky**), son susceptibles de unirse a cualquier otro fragmento de ADN que hubiese sido cortado por la misma enzima, lo que constituye un instrumento ideal para la ingeniería genética.

La mayoría de las bacterias tienen endonucleasas de restricción cuya principal función es protegerlas contra cualquier ADN foráneo. Si, por ejemplo, el ADN de la bacteria está naturalmente protegido porque hay enzimas que lo modifican y lo metilan precisamente en los sitios donde las endonucleasas podrían actuar, haciéndolo invulnerable.

El fenómeno de restricción-modificación fue descubierto siguiendo el comportamiento de dos cepas de *E. coli* frente a la infección por bacteriófagos. Se encontró que el bacteriófago lambda, que crece en *E. coli* K12, infecta poco al *E. coli* B, y viceversa.

Se sabe ahora que el ADN de ambas cepas se metila en sitios diferentes. El descubrimiento de este fenómeno aparentemente raro de la **restricción** al crecimiento de esos bacteriófagos llevó al descubrimiento de las enzimas de restricción, y a una verdadera revolución en la biología. Este es un buen ejemplo de que los efectos benéficos de la investigación científica no pueden predecirse de antemano.

LOS GENES EUCARIÓTICOS: INTRODUCCIÓN EN PLÁSMIDOS Y CLONACIÓN EN E. COLI.

Las bacterias tienen a veces un pequeño ADN circular –el plásmido– que se replica en forma autónoma. Algunos de los plásmidos mejor conocidos son los factores de resistencia a los antibióticos (factores R). En 1973 se pudo demostrar que un fragmento de ADN incorporado *in vitro* en un plásmido (con ayuda de endonucleasas de restricción) podía introducirse en una bacteria y multiplicarse.

El plásmido circular se corta en un solo sitio con una endonucleasa de restricción. El ADN eucariótico se corta con la misma enzima, lo que genera terminaciones "pegajosas". Luego ambos ADN se pegan por esos terminales que tienen bases complementarias y se completa la soldadura con la enzima *ADN ligasa*. El plásmido recombinante es luego introducido en *E. coli* con la simple maniobra de poner a las células en una solución de cloruro de calcio, que las hace permeables.

Después se seleccionan las bacterias que llevan el plásmido por el uso de antibióticos. Así, si un plásmido lleva el gen de la resistencia a la tetraciclina, en presencia de este antibiótico mueren todas las bacterias que no lo poseen. Una vez que se obtiene una colonia de *E. coli* se pueden hacer millones de copias del ADN eucariótico incorporado en el plásmido. Como todas estas copias provienen de una sola molécula, el procedimiento se denomina de **genes clonados**.

Además de los plásmidos, se ha usado también el bacteriófago lambda para propagar los genes de *E. coli*.

La ingeniería genética abre la posibilidad de usar bacterias para producir proteínas de importancia médica, como insulina y hormona de crecimiento humana. Otra posibilidad es la de introducir genes fijadores de nitrógeno en las bacterias que viven en las raíces de plantas no leguminosas, eliminando así el uso de fertilizantes nitrogenados.

Hasta ahora se han clonado muchos genes eucarióticos en *E. coli*, pero las proteínas producidas no parecen haberse expresado en una forma correcta. Esto se debe, seguramente, a la necesidad de promotores procarióticos (es decir, los sitios donde se inicia la acción de la ARN polimerasa), así como de sitios de unión para los ribosomas. Esta problema puede resolverse clonando los genes eucarióticos dentro de genes bacterianos bien caracterizados. Por ejemplo, se ha podido insertar el gen de la hormona *somatostina* dentro del gen de la β -galactosidasa, que es parte del operón lactosa.

De esa manera se pudo obtener una hormona biológicamente activa usando al promotor y el sitio de unión al ribosoma del gen de la β -galactosidasa. También ha sido posible clonar genes dentro del gen que codifica la *penicilinasa*, ya que esta enzima es secretada fuera de la célula. Así se pudo insertar el gen de la insulina y obtener una proteína que tiene a la vez la secuencia de la insulina y la penicilinasa. Luego se purificó la insulina directamente a partir del medio.

La ingeniería genética es muy valiosa para comprender cómo son controlados los genes en los organismos eucarióticos. En los ovocitos de *Xenopus* es posible inyectar genes en el núcleo y obtener su transcripción y también la traducción en las proteínas.

INGENIERÍA GENÉTICA

Las técnicas de ingeniería genética están basadas en el uso de endonucleasas de restricción de origen bacteriano. Estas enzimas reconocen secuencias específicas de nucleótidos en el ADN y lo cortan en esos sitios. Algunas endonucleasas producen extremos "pegajosos" que se unen a segmentos de ADN eucariótico cortados con la misma enzima. La función normal de la endonucleasa bacteriana es la de proteger a la bacteria de la invasión de ADN foráneo. El ADN resiste la acción de las enzimas por un proceso de restricción-modificación en el cual se produce la metilación de las secuencias específicas del ADN.

Las técnicas de ingeniería genética permiten el clonado de genes mediante su inserción en plásmidos o en el bacteriófago lambda.

Los plásmidos son pequeños círculos de ADN que se replican de forma autónoma, muchos de los cuales llevan genes que causan la resistencia a los antibióticos. El plásmido, que lleva el gen eucariótico, se introduce en la *E. coli* y la bacteria es seleccionada por su resistencia al antibiótico. Así se pueden obtener colonias en las cuales el gen se ha copiado millones de veces. Estas técnicas abren la posibilidad de la producción de proteínas de importancia médica (como insulina y hormona de crecimiento humana). Sin embargo, la expresión de genes eucarióticos en *E. coli* se dificulta por la necesidad de tener promotores y sitios de unión ribosómica procarióticos. También se pueden expresar genes clonados inyectándolos en el núcleo de ovocitos.

FUSIÓN CELULAR

Los **anticuerpos** son moléculas de proteína capaces de reconocer y unirse específicamente a un **antígeno extraño**. Cuando un animal es inyectado con una molécula que el organismo reconoce como ajena (una proteína o polisacárido complejo), al cabo de varios días se producen anticuerpos específicos que pueden interactuar con ese antígeno. En el suero sanguíneo del animal así inmunizado aparecen diversos anticuerpos que reconocen distintas partes de una molécula (o varias moléculas, si es inyectada más de una).

Los individuos de una misma especie pueden tener diferentes respuestas inmunológicas, de manera que un mismo antígeno es capaz de producir en cada uno un anticuerpo distinto. Este es un problema de gran importancia en medicina porque, por ejemplo, el éxito o fracaso de un trasplante de órgano dependerá de si el dador y el paciente que lo recibe presentan o no los mismos **anticuerpos de histocompatibilidad, en la superficie celular**. Se comprende pues la necesidad de tener anticuerpos que puedan ser usados para el diagnóstico en forma exacta. En la actualidad, mediante la técnica de fusión celular se han podido crear líneas celulares que producen un sólo tipo de anticuerpo y en cantidades ilimitadas.

Los anticuerpos son generados por los **linfocitos**, que, cuando los elaboran en gran cantidad, se transforman en **plasmocitos**. Es fundamental que cada célula productora de anticuerpos da origen a un solo tipo de anticuerpo.

Los linfocitos no se multiplican en cultivo de tejidos, pero C. Milstein desarrolló una técnica por la cual es posible propagar indefinidamente una línea celular, partiendo de una célula única mediante la fusión con una célula tumoral.

Vamos a ver como podemos obtener los llamados anticuerpos *mono-clonales*. Al principio se inmuniza un ratón con el antígeno deseado; luego se extraen los linfocitos del bazo y se los fusiona mediante el virus **Sendai** a una línea celular del ratón derivada de plasmocitos tumorales (estos tumores se denominan *mielomas* porque invaden la médula ósea). La célula del mieloma lleva una mutación en el enzima *hipoxantina-guanina fosforiltransferasa* por la cual es incapaz de crecer en medio de HAT, como ya sabemos; en cambio, el híbrido resultante sí puede hacerlo y los clones que secretan el anticuerpo deseado son susceptibles de ser identificados y puestos a crecer.

La fusión con la célula tumoral vuelve **inmortal** al linfocito del bazo del ratón, que desde entonces crece indefinidamente *in vitro*. También pueden ser implantados en ratones y ser mantenidos mediante trasplantes seriados de los tumores. Como todas las células derivarán de un único linfocito, los anticuerpos que se producen serán monoclonales y de alta pureza.

Los anticuerpos monoclonales antivirales se usan para el diagnóstico de algunas enfermedades virales o para el tratamiento de la rabia. Otros anticuerpos se usan en bioquímica clínica y muy especialmente para clasificar todos los antígenos humanos de histocompatibilidad.

Los anticuerpos monoclonales representan un además un buen ejemplo de que no es posible predecir de antemano las aplicaciones prácticas de la ciencia. El estudio de la fusión celular, que al principio se desarrolló como un capítulo especializado de la biología celular para atacar el problema de las relaciones entre núcleo y citoplasma, ha llegado a producir instrumentos inmunológicos de gran importancia práctica para la humanidad.

INTERACCIONES NUCLEOCITOPLASMÁTICAS.

El problema fundamental de la diferenciación celular es el de dilucidar el mecanismo por el cual un huevo aparentemente sin estructura da origen a un embrión con muchos tejidos especializados. La diferenciación celular es un cambio persistente que implica la síntesis preferente de proteínas específicas (por ejemplo , hemoglobina, gama globulina) por células especializadas (eritrocitos, plasmocitos). Estos cambios implican un complejo mecanismo de regulación, que es distinto del que ocurre en las bacterias. La diferenciación celular puede ser inducida por estímulos, pero persiste luego en ausencia de éstos. Hay un período de determinación en el cual la capacidad de diferenciarse está ya establecida. Este es el caso de los discos imaginales de *Drosophila*, que solo se diferencian durante la metamorfosis de la larva y que cuando son trasplantados en el adulto permanecen en un estado indiferenciado, pero determinado.

En las células eucarióticas la interacción nucleocitoplasma es continua. El alga *Acetabularia* es muy apropiada porque el núcleo se halla en un extremo, el rizoide, que se puede cortar fácilmente. Diversos experimentos demuestran que sustancias nucleares (ARNms estables) difunden en el citoplasma y controlan la morfogénesis del capuchón.

La fusión celular con el virus *Sendai* permite la producción de heterocariones. Si se fusionan eritrocitos que han dejado de sintetizar ARN y ADN con células *HeLa*, la síntesis de ARN puede reactivarse y hasta se puede replicar el ADN. La reactivación se debe probablemente a la entrada de proteínas desde el citoplasma. Por acción de la citocalasina B es posible obtener *carioplastos* y *citoplastos*, y luego reconstituir células por fusión entre núcleos y citoplasmas de células diferentes.

Los huevos de ranas (*Xeropus*) son muy útiles, ya que se pueden trasplantar núcleos somáticos diferentes. Si se implantan en un ovocito en crecimiento, el metabolismo de ARN del núcleo implantado se activa. En los huevos los núcleos pueden replicar el ADN. Por lo tanto, la síntesis de los ácidos nucleicos depende del citoplasma del huésped.

El citoplasma del ovocito es capaz de reprogramar la expresión de los genes en los núcleos trasplantados, como se demuestra inyectando núcleos de riñón de *Xeropus* en ovocitos de *Pleurodeles*. Con estos experimentos se estableció que la activación y la inactivación de los genes son selectivas.

MECANISMOS MOLECULARES DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR.

Veamos que las células especializadas contienen la misma clase y el mismo número de genes y que, por lo tanto, las diferencias entre ellas son el resultado de la distinta velocidad de expresión de los genes. Llegaremos a la conclusión de que la diferenciación celular probablemente se controle a nivel de la transcripción.

El genoma permanece constante. Trasplante nuclear.

Una prueba rigurosa de que durante la diferenciación embrionaria no hay pérdida de información genética provino de los clásicos experimentos de trasplante nuclear de J.B. Gurdon.

Fueron irradiados huevos de *Xenopus* con luz ultravioleta para destruir el núcleo y luego se los inyectó con núcleos somáticos. Se vio que los núcleos de una célula intestinal completamente diferenciada eran capaces de

mantener el desarrollo normal de ranas hasta la edad adulta, las cuales resultaron fértiles. Esto demuestra que las células intestinales conservan todos los genes requeridos para completar el ciclo vital de una rana. Además, del mismo intestino de una rana se pueden obtener **clones de gemelos idénticos**.

También se logró el desarrollo de renacuajos usando otros tejidos adultos, como células de la piel y linfocitos. Todos estos resultados demostraron que los genes necesarios para codificar los diversos tejidos del embrión no se hallaban inactivados en los núcleos dadores.

En células vegetales se llegó a la misma conclusión. Por ejemplo, se pudo conseguir una planta completa a partir de una célula cultivada de la zanahoria.

La amplificación génica no implica la diferenciación.

Otra posibilidad de que un gen pudiese activarse en forma diferencial sería si aumentara el número de copias. Esto es lo que se denomina **amplificación génica**, y vimos lo que ocurre con los genes ribosómicos en los ovocitos de anfibios e insectos. Por ejemplo, en *Xenopus*, los 900 genes ribosómicos (núcleo diploide) pueden amplificarse hasta alcanzar 2.000.000 de copias, que se reparten en unos 1000 nucléolos del ovocito. Tenemos el caso del ADN en ciertos **puffs** de los cromosomas politénicos de *Rhyncosciara angela*.

Hay que tener en cuenta, sin embargo, que en ambos casos este ADN amplificando no se transmite a las nuevas generaciones puesto que las células de las glándulas salivares donde están los cromosomas politénicos mueren durante la metamorfosis y el ADN del ovocito no pasa al embrión.

Otros genes que producen grandes cantidades de proteína (por ejemplo, la globina de reticulocitos) se encuentran, sin embargo, en una copia única por genoma haploide en todos los tejidos. En otras palabras, un solo par de genes activados pueden dar origen a toda la globina de un eritrocito (90 % de las proteínas totales). Por lo tanto, el fenómeno de amplificación génica no está muy extendido.

LA TRADUCCIÓN NO EXPLICA LA DIFERENCIACIÓN

Hemos visto que durante el desarrollo y en el adulto el genotipo permanece constante. Por lo tanto, las diferencias entre las diversas células solo puede explicarse sobre la base de la expresión diferencial de los genes. Esto podría obtenerse por un cambio en la transcripción (Síntesis y procesamiento de los ARNs) o en la traducción (síntesis de proteínas). Otra posibilidad sería que existieran mecanismos por los cuales algunos ARNs mensajeros que tradujeran en ciertas células, pero no en otras. Sin embargo los experimentos con ARNs inyectados en ovocitos de xenopus permiten desechar esta posibilidad.

Se demuestra que si se inyecta ARNm de globina de conejo en un ovocito de xenopus, éste traduce en globina. Se ha podido demostrar que gran número de ARNs mensajeros de origen animal y vegetal (ARNm para inmunoglobina, tiroglobulina, interferon, colágeno, proteínas del virus del mosaico de tabaco) se traducen en los ovocitos. Por tanto, éstos no tienen la posibilidad de excluir la traducción de ningún ARNm.

–El ARNm de globina es muy estable y puede continuar traduciéndose durante semanas. Esta traducción es muy eficiente, ya que cada molécula de ARNm puede llegar a dar 100.000 moléculas de globina. Los ovocitos traducen el ARNm en forma mucho más eficiente que cualquier sistema libre de células y, por lo tanto, se han utilizado ampliamente para experimentos con ARNm. Aunque en los homogeneizados de *Xenopus* hay ribonucleasas que pueden degradar el ARNm, en el ovocito vivo éste no se degrada. Esto permite seguir la traducción más fácilmente mediante el análisis bioquímico.

Se podría argüir que como el ovocito no es una célula especializada traduce los diversos ARNs mensajeros, pero que esto no ocurriría en la célula especializada. Se inyectó ARNm de globina en huevos fecundados, que llegaron a desarrollarse hasta el estadio de renacuajo. Luego fueron disecados en un fragmento axial (que

contiene músculos, sistema nervioso y notocordio) y en otra porción que contiene muchos tejidos, incluso las células productoras de elementos sanguíneos. Con aminoácidos marcados se pudo seguir la síntesis de globina de conejo en ambos fragmentos.

A pesar de que el segmento axial carece de tejido hemopoyético, se encontró que podía sintetizar globina en la misma proporción que el resto del renacuajo. Esto demostró que las células diferenciadas (músculos, neuronas, notocorda) son capaces también de traducir ARN heterólogo.

LA DIFERENCIACIÓN SE CONTROLA A NIVEL DE LA TRASCRIPCIÓN.

La posibilidad de que la expresión de los genes esté regulada a nivel de la síntesis de ARN fue avalada por diversas evidencias. El ejemplo más claro es el de los cromosomas politénicos, en los que la transcripción se manifiesta en forma de *puffs*.

Vimos que los *puffs* varían en los diversos tejidos y que se modifican por acción de la hormona *ecdisona*.

Los estudios de hibridización molecular demostraron que en una célula solo se expresa una fracción de la totalidad de los genes. Además, diferentes conjuntos de genes se transcriben en cada una de las células especializadas.

Una parte de los genes que se transcriben son propios del tejido, pero hay otros que son compartidos y que representan los genes que mantienen la estructura celular y que se necesitan para que la célula pueda sobrevivir. Pertenecen a este grupo las proteínas de membrana, las proteínas ribosómicas y mitocondriales, las enzimas glucolíticas, etc... Los genes no compartidos son los que codifican las proteínas de las células especializadas; por ejemplo: hemoglobina en el eritrocito y ovoalbúmina en el oviducto, queratina en la piel.

MECANISMOS DE DIFERENCIACIÓN CELULAR.

Durante la diferenciación celular el genotipo permanece constante, es decir que no hay pérdida de información genética. Trasplantando un núcleo diploide de intestino en un huevo de *Xenopus* privado de su núcleo, se puede tener el desarrollo normal de esta rana. Si el genotipo permanece constante, la diferenciación celular debe corresponder a una expresión diferencial de los genes (transcripción o traducción).

Los experimentos en los que se inyectó ARNm en los ovocitos demuestran que éste puede ser traducido correctamente. A partir de un ARNm de globina llegan a formarse 100.000 moléculas de globina. También otros ARNs mensajeros de origen animal o vegetal pueden traducirse en el ovocito.

La síntesis de proteína está sujeta a un control cuantitativo, pero no cualitativo. Por ejemplo, en los huevos de erizo de mar la síntesis de proteína aumenta 10 veces por la acumulación de ARNs mensajeros. Que la expresión génica se regula a nivel de la transcripción, se comprueba en los cromosomas politénicos con la aparición de *puffs* específicos en distintos tejidos.

En cualquier célula solo 5–10 % de los genes estructurales se transcriben. Algunos de ellos son comunes a todas las células y sirven para el mantenimiento de su estructura (por ejemplo: los que codifican proteínas de membranas, ribosomas, mitocondrias, etc...). Otros genes solo se activan en células diferenciadas (como los genes para la ovoalbúmina, queratina, hemoglobina, etc...).

Por medio de la transcriptasa invertida se puede producir ADN complementario (ADNc) a partir del ARNm. Luego el ADNc se usa para medir, por hibridización, la cantidad de un ARNm determinado. En estos genes, aunque son únicos, hay un aumento grande de la velocidad de transcripción.

El mecanismo que regula la transcripción es poco conocido en los eucariontes, aunque algún progreso se ha

alcanzado mediante la inyección de ADN en el núcleo del ovocito. De esta manera, el ADN puede ser transcrito y traducido correctamente.

En el huevo hay determinantes citoplasmáticos que tienen localizaciones especiales. Al distribuirse en forma desigual entre las células, pueden influir sobre la diferenciación celular durante el desarrollo temprano del embrión. En el curso de la ovogénesis de los anfibios los ovocitos acumulan muchas moléculas y organelas que serán usadas en el desarrollo.

Entre las moléculas se hallan los determinantes citoplásmicos, como el plasma germinal, que se localiza el polo vegetativo e induce la formación de células germinales.

En los adultos es posible que los mismos principios actúen en la diferenciación celular. Por ejemplo, si los determinantes se dividen de manera desigual entre dos células, una se diferencia y la otra permanece en forma blástica.

A medida que el desarrollo embrionario progresa, las interacciones celulares se vuelven más importantes. Esto es lo que sucede con la inducción del sistema nervioso por el notocordio, del cristalino por la vesícula óptica, etc., lo que se debe a la difusión intercelular de sustancias. El caso del hongo *Dictiostelium* es muy interesante, porque en él se ha identificado el AMPc como el mensajero que aporta una información posicional. Este hace que las células aisladas puedan converger para formar un organismo multicelular.

-----**Bibliografía**-----

----- **consultada**-----

"Biología Celular y Molecular"-- Pags. 433-451 y 522-539

--*De Robertis*--**Ed. El Ateneo --1981**

"Biología C.O.U."-- Pags. 395-457 --*Vicente Dualde*--

Ed. Ecir--1988

"Maravillas del Saber"--Pags. 39-49 -- *Javier Sánchez*

Almazán -- **Credsa--1983**