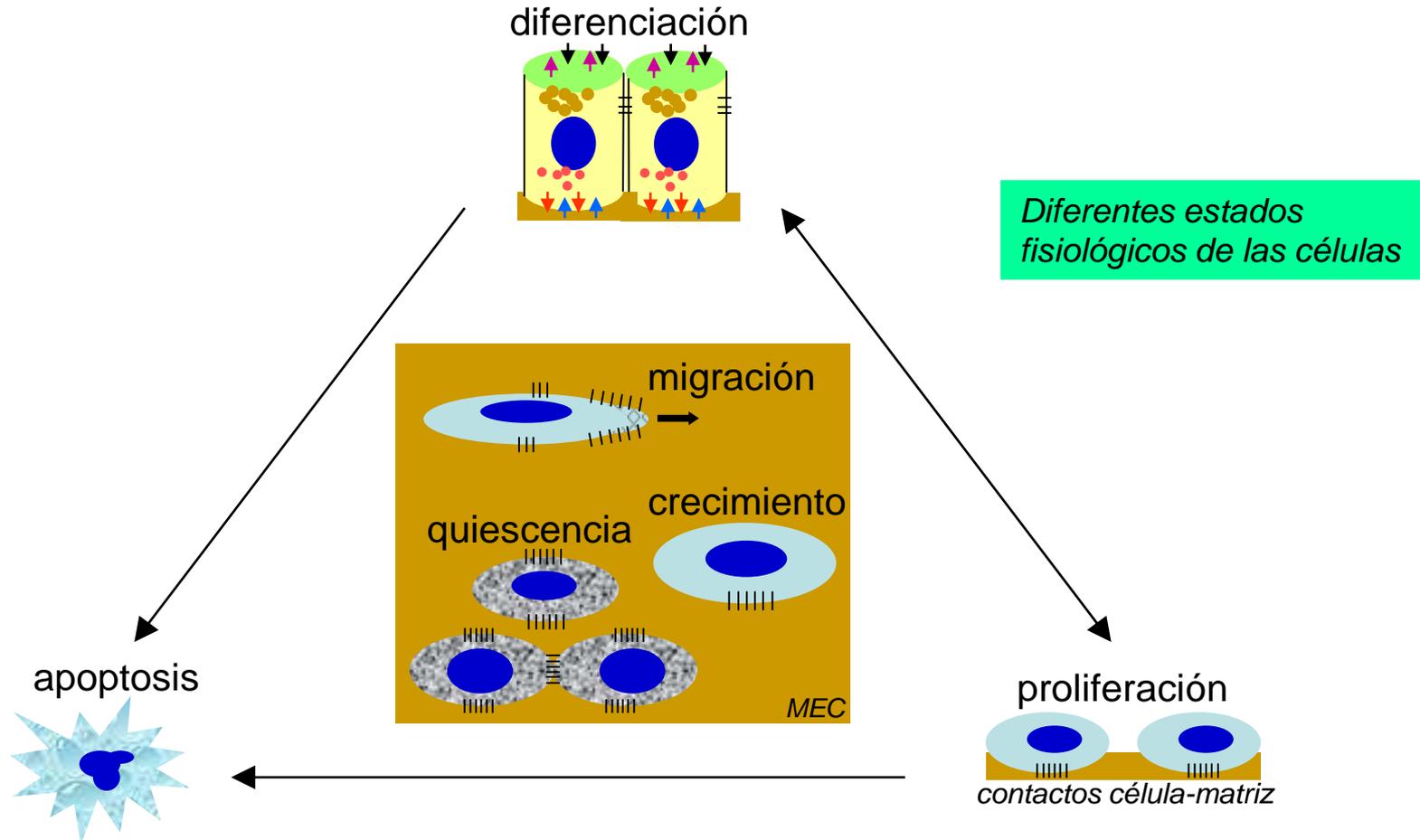


Biología Celular

La Biología Celular estudia la composición, estructura y funciones de las células.



Las células difieren en tamaño, composición, estructura y función

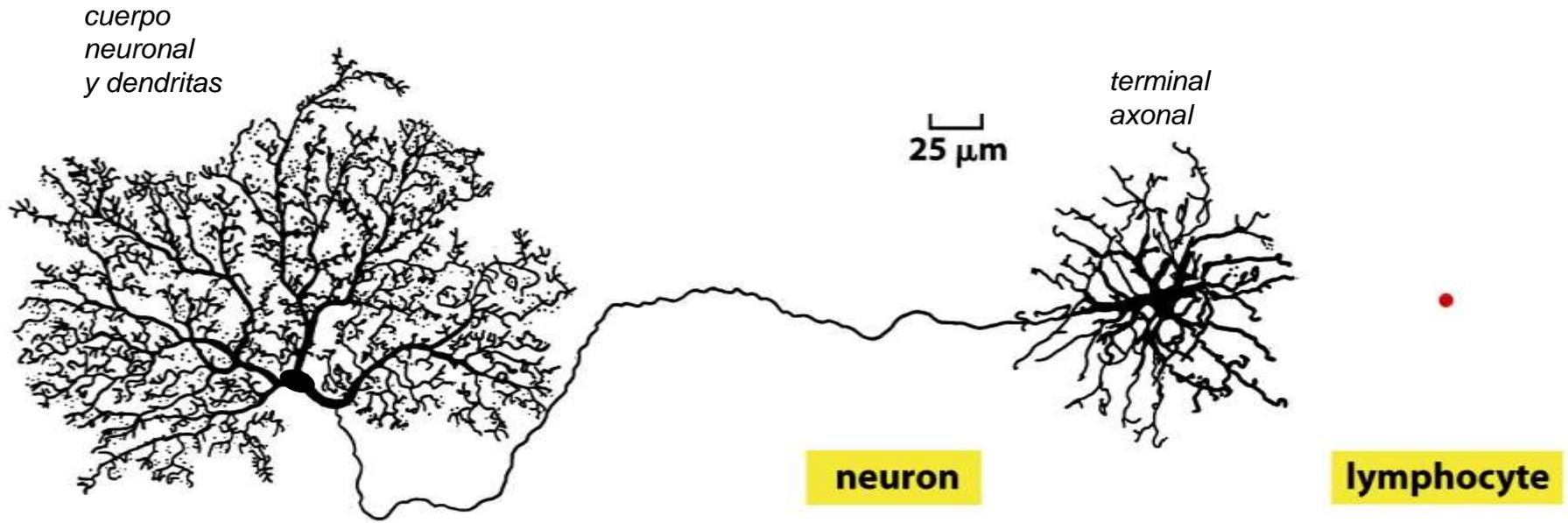


Figure 7-1 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Todas las células somáticas de un organismo pluricelular poseen la misma información genética en el ADN

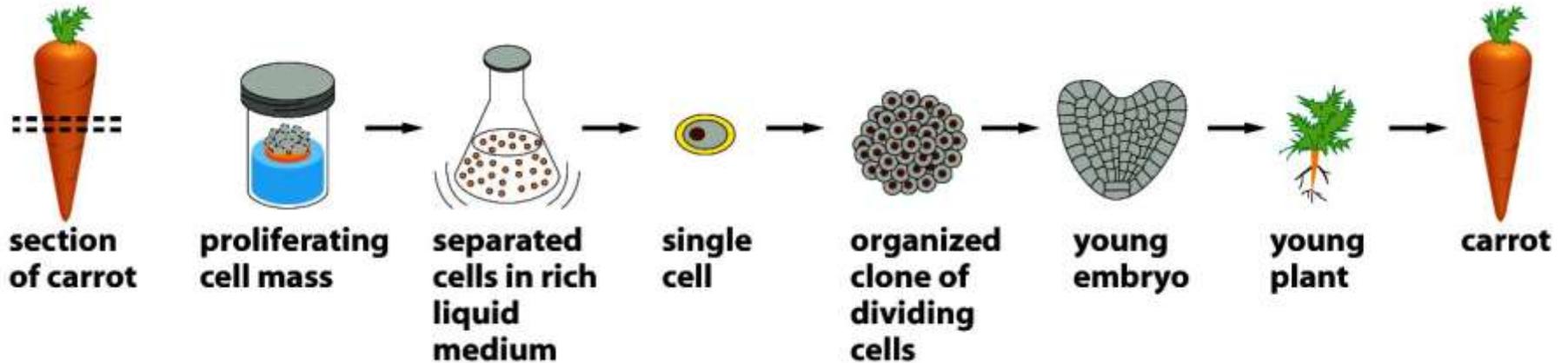


Figure 7-2b Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

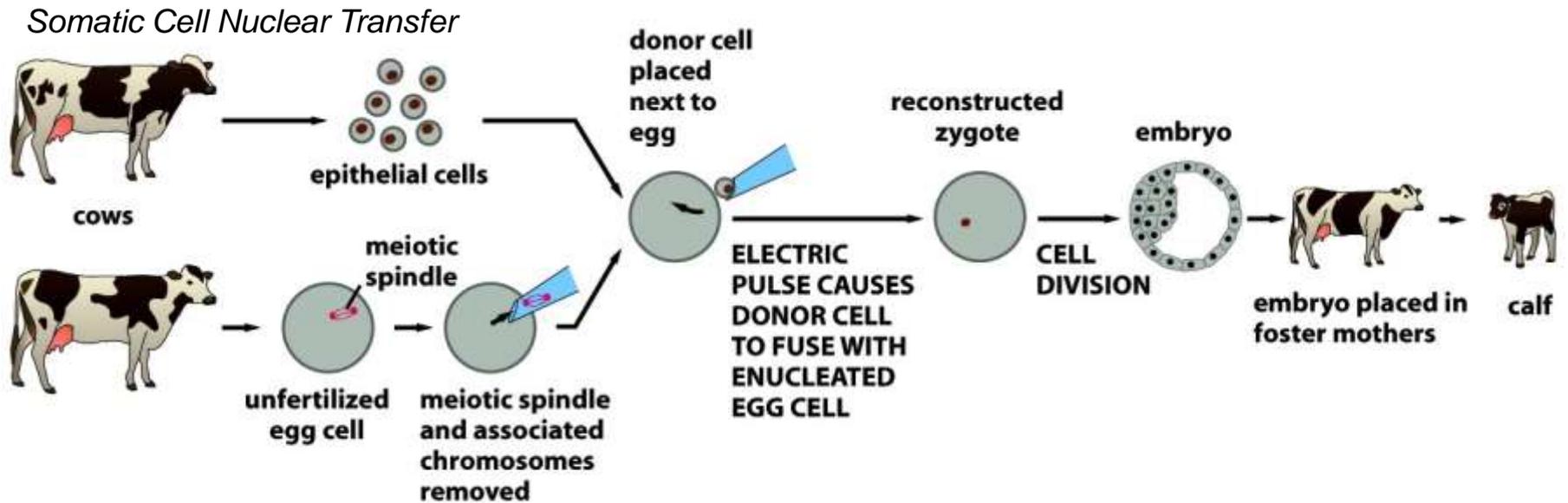


Figure 7-2c Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

La **diversidad celular** en los organismos pluricelulares es consecuencia de expresión génica diferencial

Durante el desarrollo **señales extracelulares** regulan la activación/expresión de **Factores de transcripción** los cuales controlan la expresión de genes específicos y la diversificación celular.

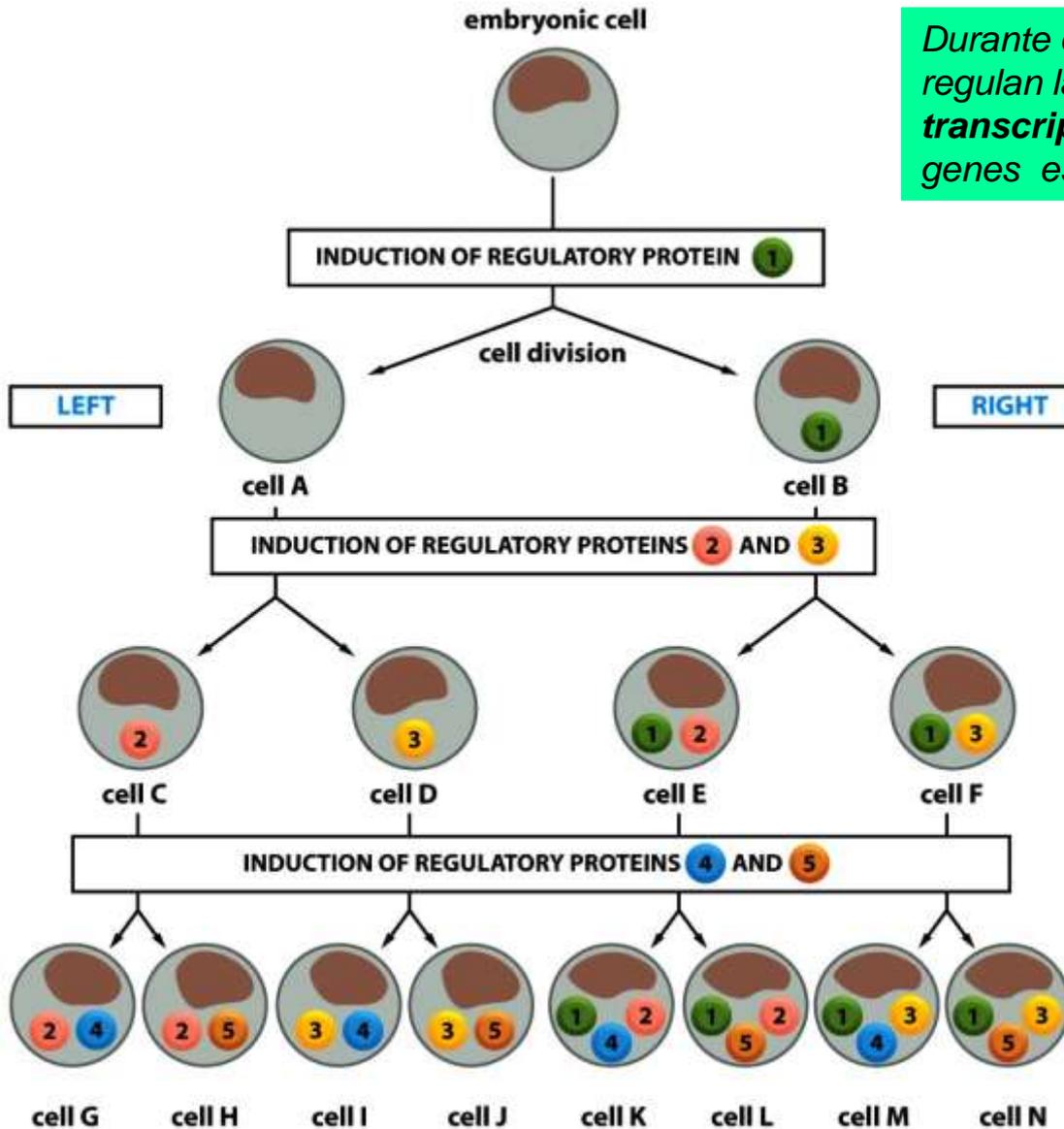
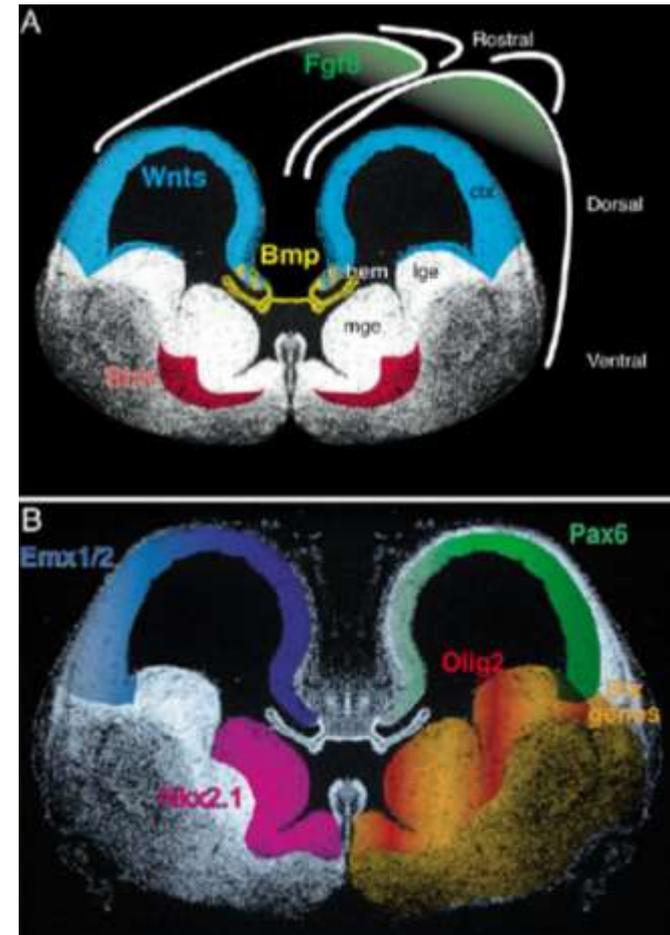


Figure 7-76 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

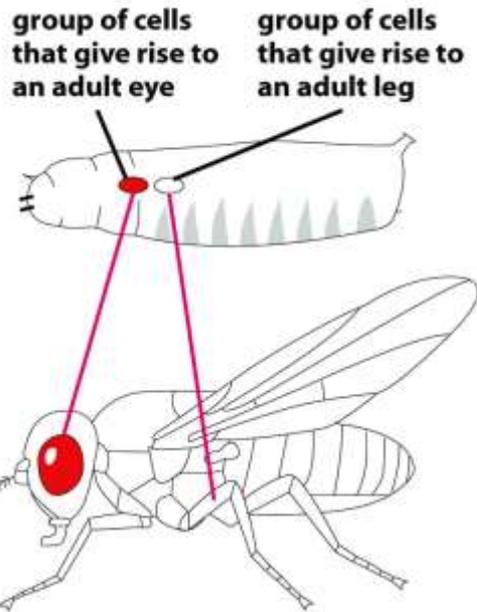


Gotz & Sommer, Development 2005

La activación espaciotemporal de factores de transcripción maestros es crítica para determinar patrones de diferenciación específicos

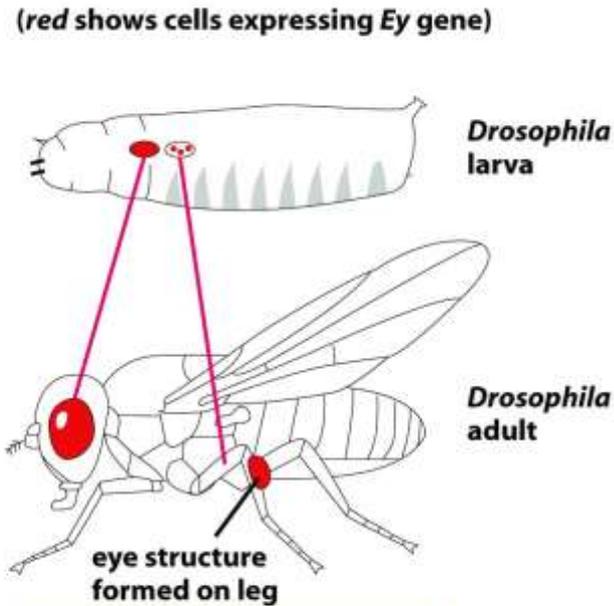
El factor de transcripción **Eyeless (Ey)** en la mosca *Drosophila* controla la formación del ojo.

contexto normal

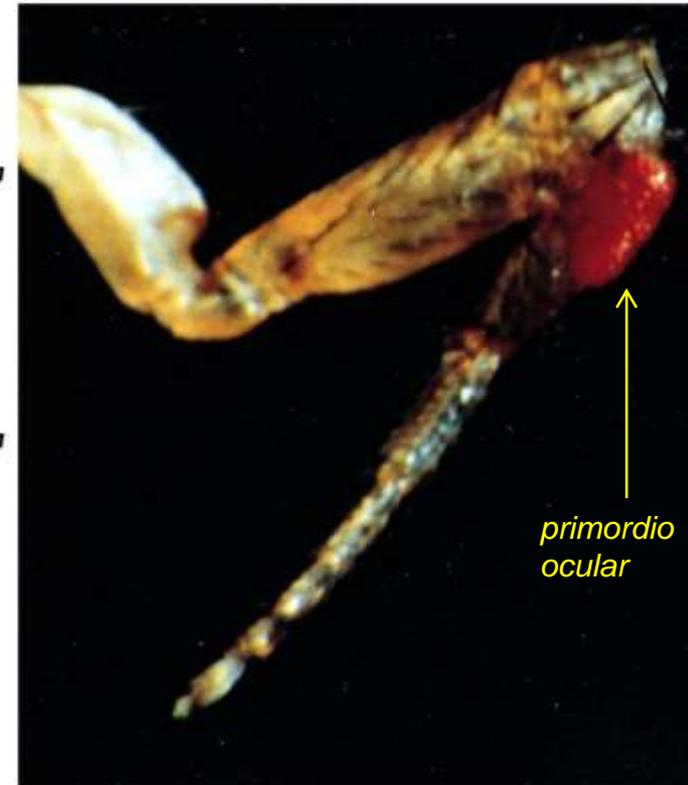


normal fly

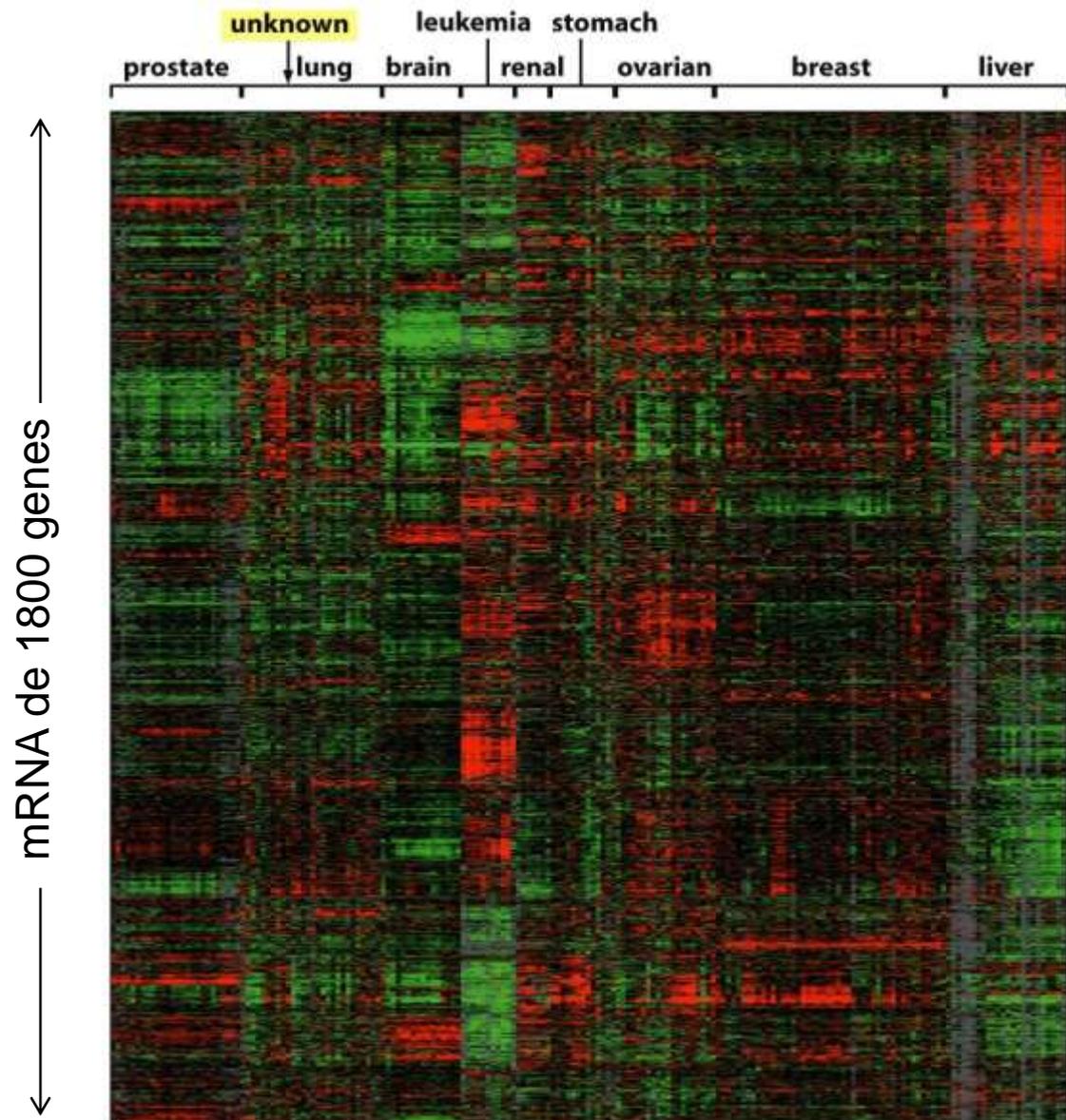
contexto anormal



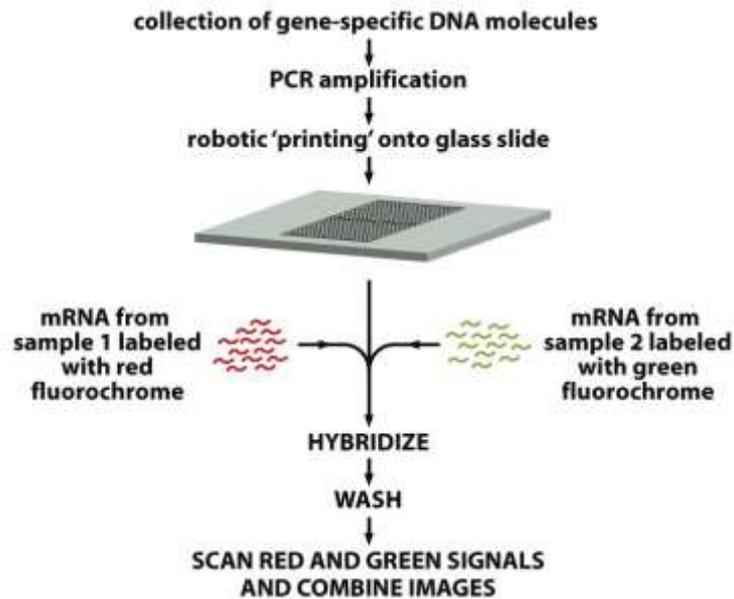
fly with *Ey* gene artificially expressed in leg precursor cells



El patrón de expresión de genes específicos (*transcriptomas*) en distintos tipos celulares se revela en "microarrays"



"DNA microarray"



magnificación de un fragmento del "microarray"

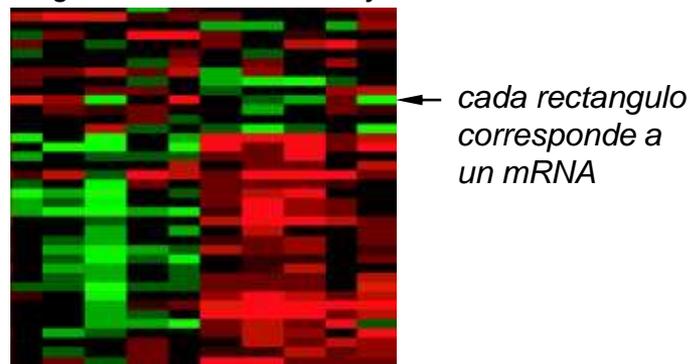
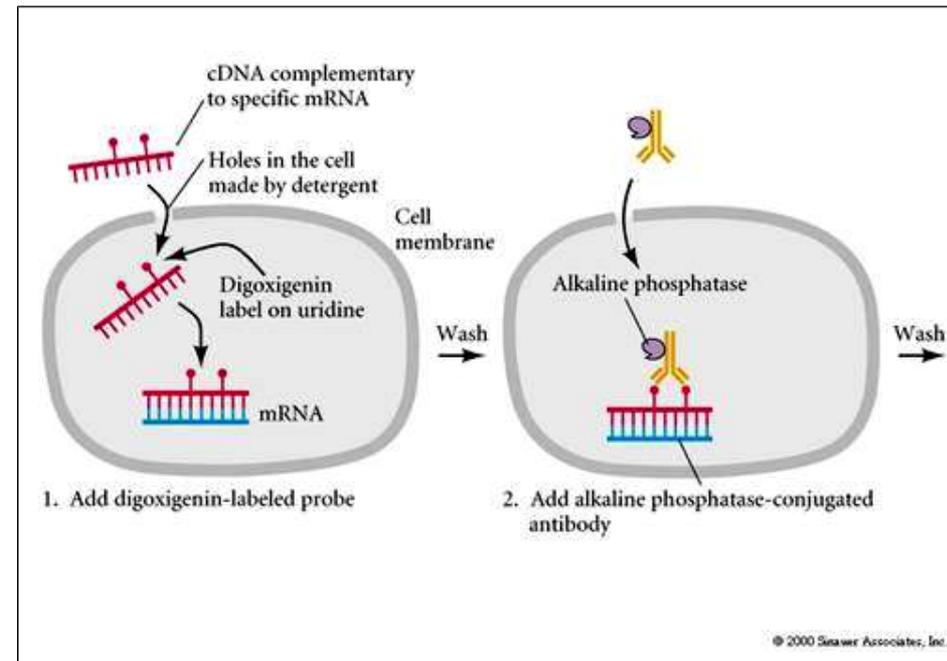
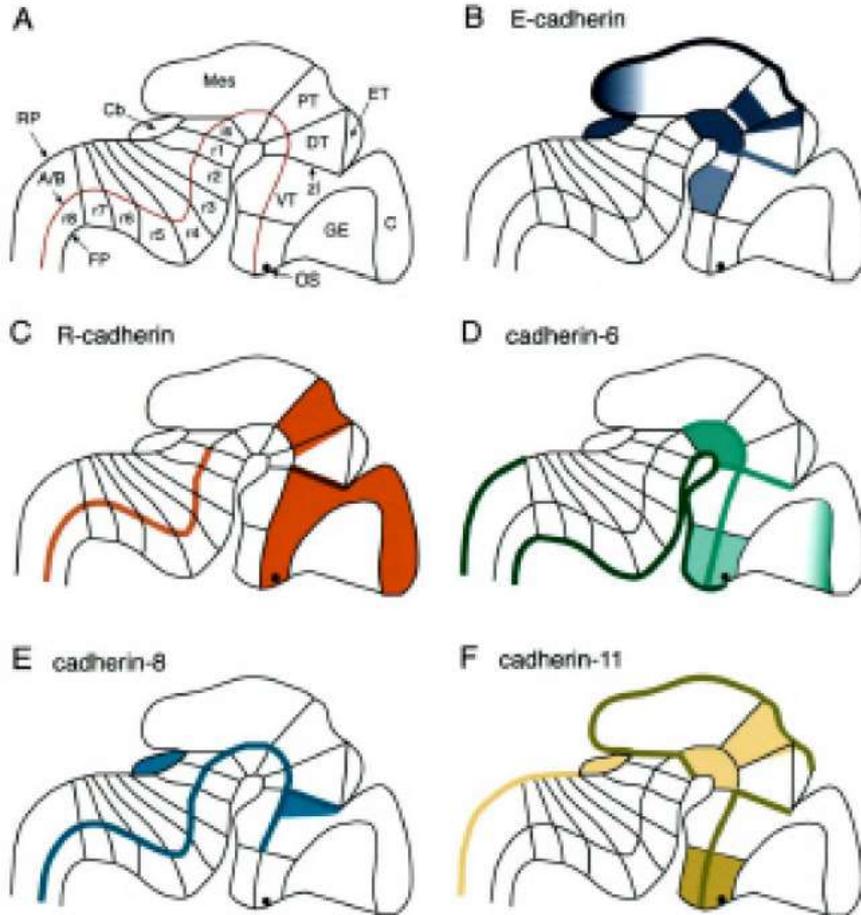


Figure 7-3 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

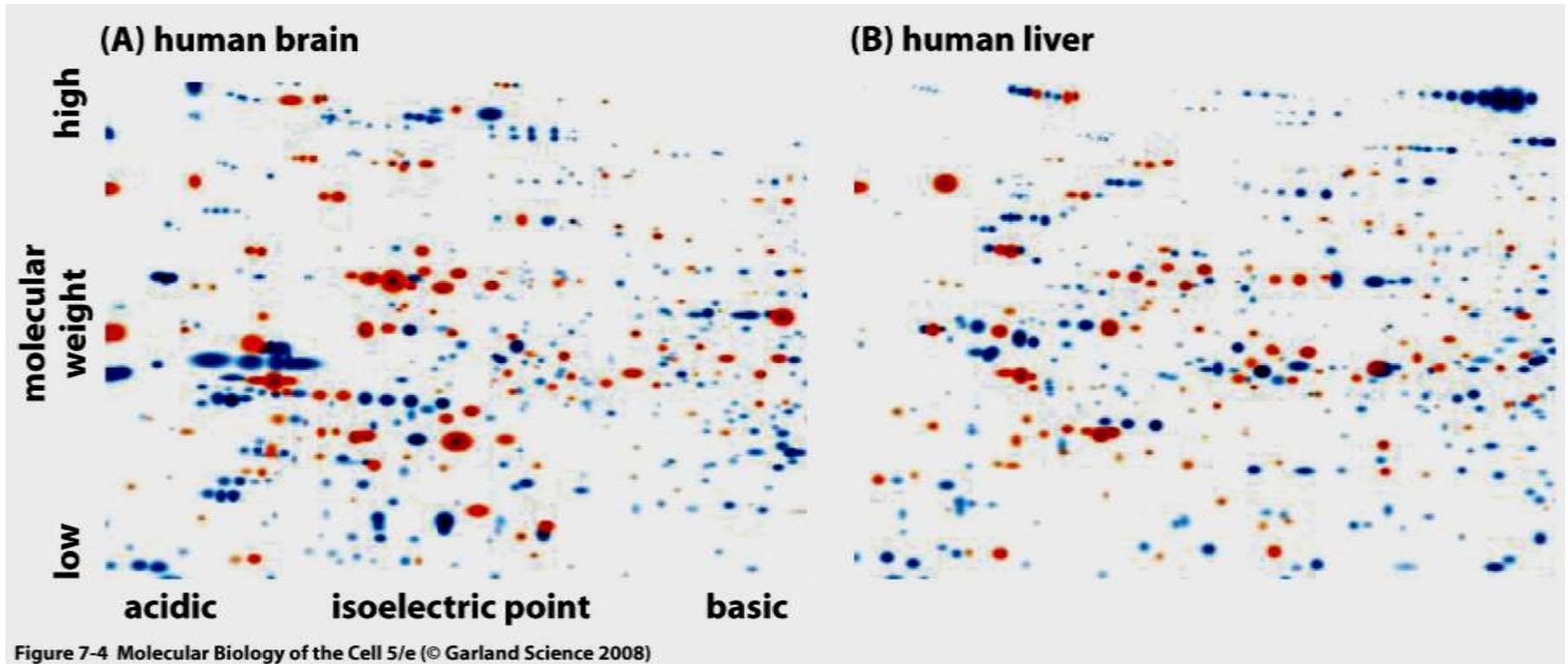
La expresión diferencial de RNA mensajeros puede visualizarse *in situ*

Hibridación *in situ*. Secciones del encéfalo en desarrollo fueron hibridizadas con mRNAs antisentido que codifican para distintos genes de caderinas.



La expresión diferencial de proteínas puede visualizarse en geles bidimensionales de poliacrilamida

Las proteínas se separan por **tamaño** en la dimensión vertical y por **carga eléctrica** en la dimensión horizontal.



Las células pueden ser cultivadas *in vitro*

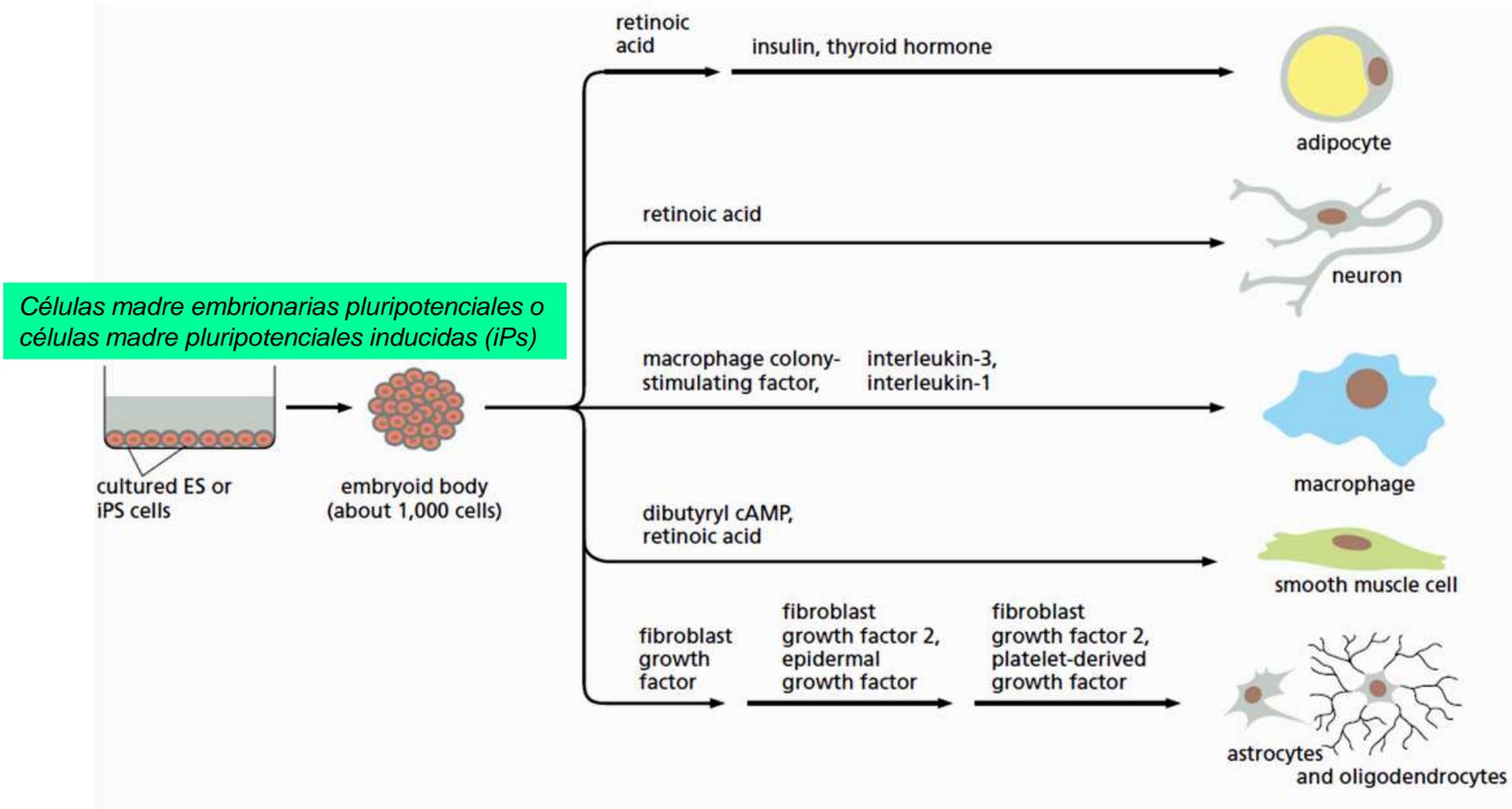
Table 8–1 Some Commonly Used Cell Lines

CELL LINE*	CELL TYPE AND ORIGIN
3T3	fibroblast (mouse)
BHK21	fibroblast (Syrian hamster)
MDCK	epithelial cell (dog)
HeLa	epithelial cell (human)
PtK1	epithelial cell (rat kangaroo)
L6	myoblast (rat)
PC12	chromaffin cell (rat)
SP2	plasma cell (mouse)
COS	kidney (monkey)
293	kidney (human); transformed with adenovirus
CHO	ovary (Chinese hamster)
DT40	lymphoma cell for efficient targeted recombination (chick)
R1	embryonic stem cell (mouse)
E14.1	embryonic stem cell (mouse)
H1, H9	embryonic stem cell (human)
S2	macrophage-like cell (<i>Drosophila</i>)
BY2	undifferentiated meristematic cell (tobacco)

***Many of these cell lines were derived from tumors. All of them are capable of indefinite replication in culture and express at least some of the special characteristics of their cell's of origin.**

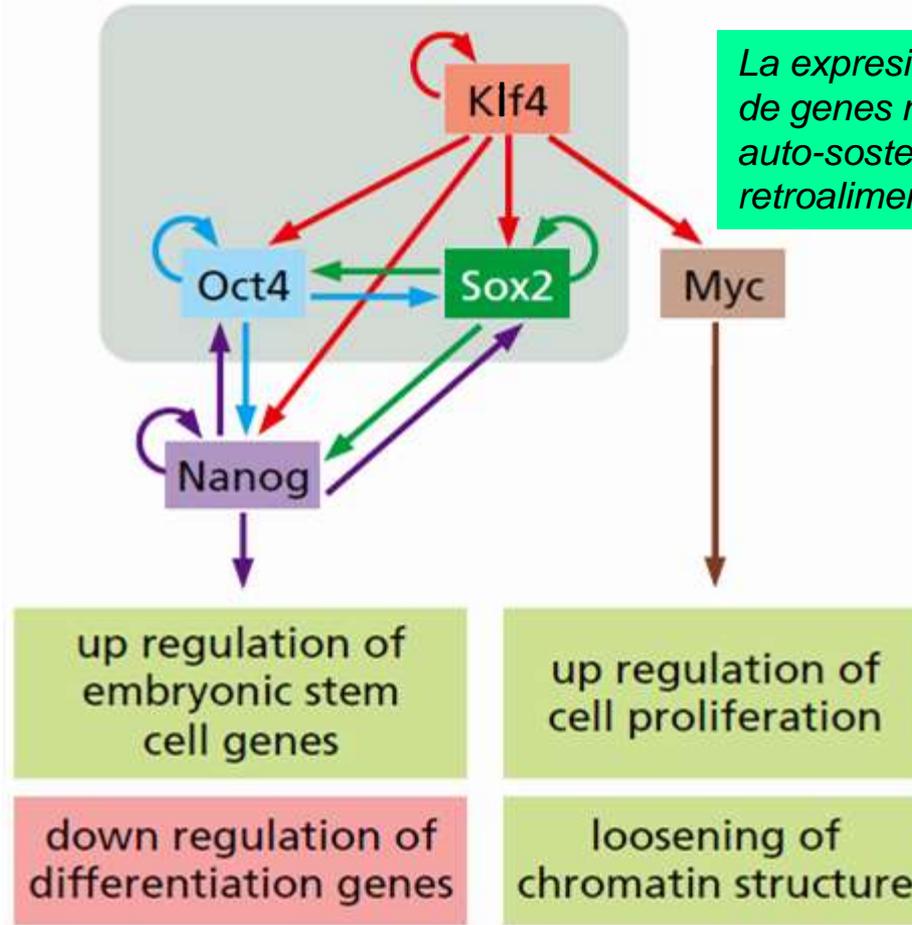
Células madre pluripotenciales pueden estimularse en cultivo para generar diferentes tipos celulares

estímulos químicos exógenos



Células diferenciadas pueden ser reprogramadas a células madre pluripotentes

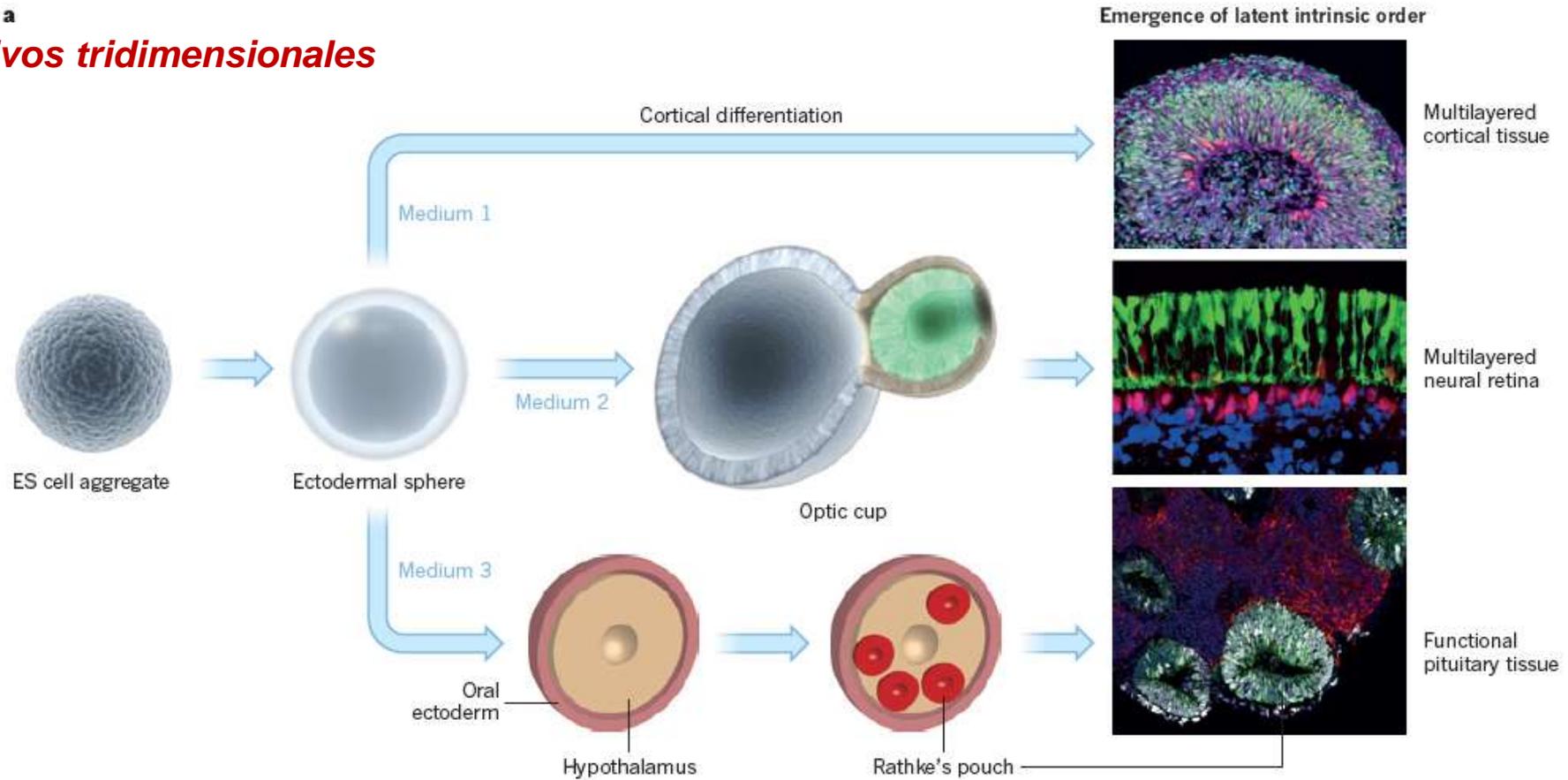
iPs (induced Pluripotent Stem) cells



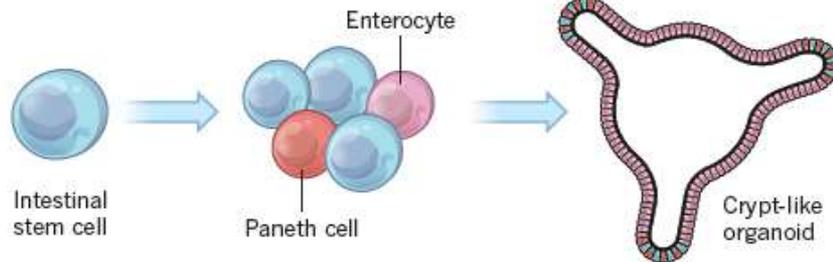
En determinadas condiciones de cultivo, procesos de auto-organización inducen la formación de tejidos y primordios de órganos

a

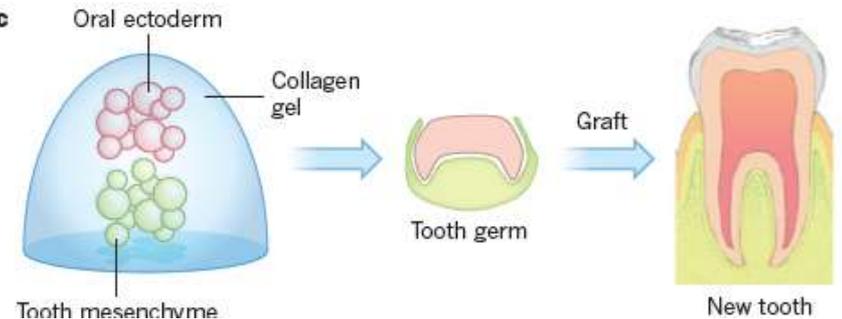
cultivos tridimensionales



b

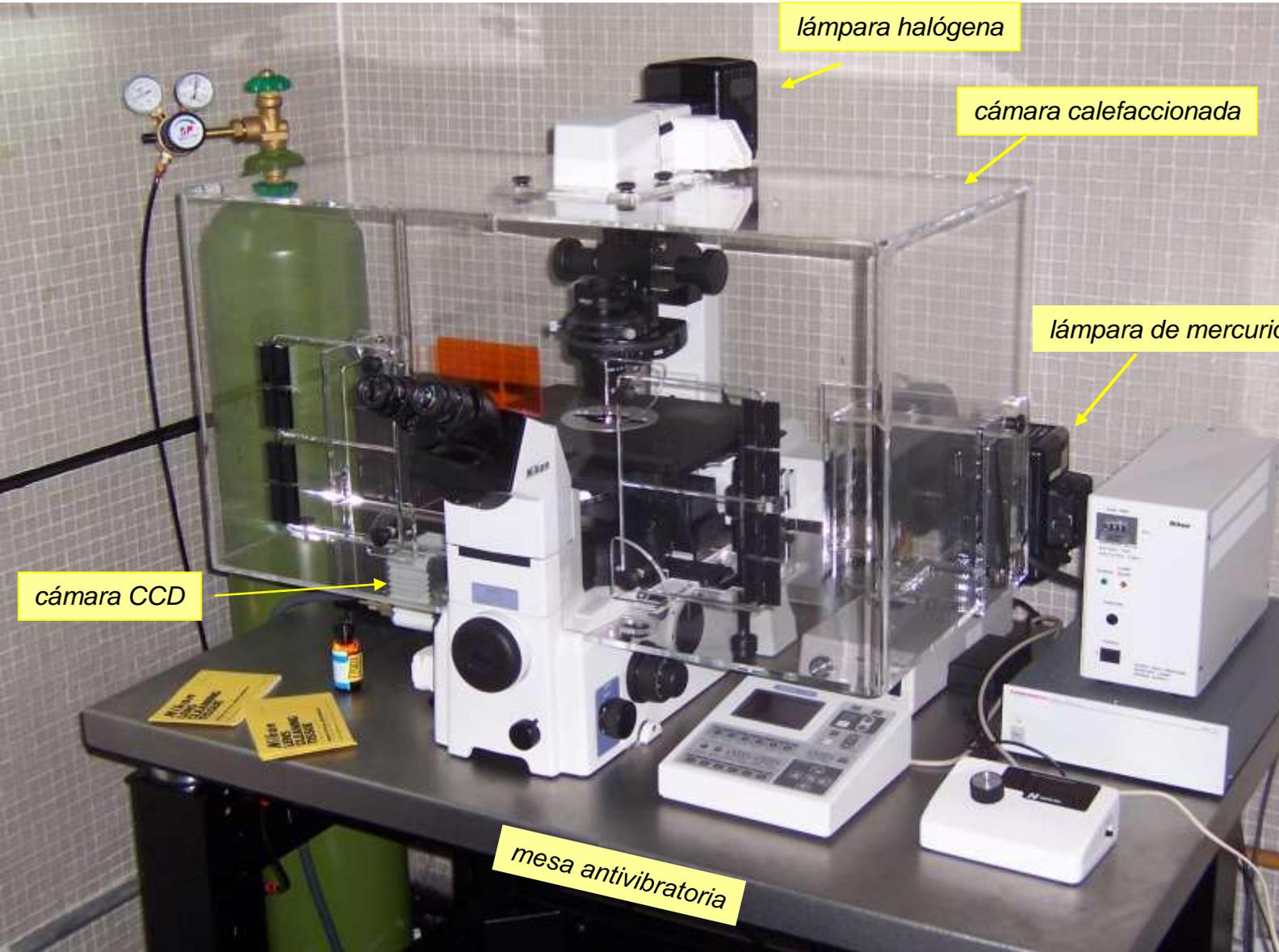


c



Las células en cultivo pueden examinarse vivas mediante microscopía

microscopio invertido



lámpara halógena

cámara calefaccionada

lámpara de mercurio

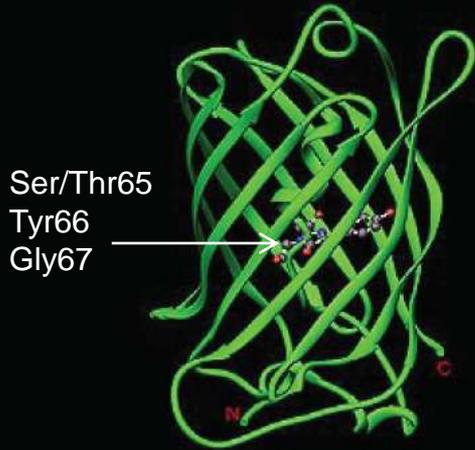
cámara CCD

mesa antivibratoria

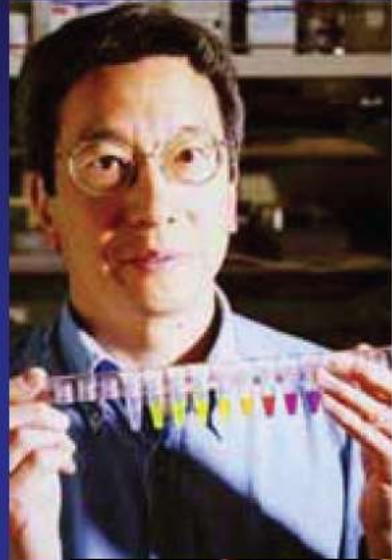
datos a la computadora

Proteínas fluorescentes permiten analizar procesos celulares en los organismos y en células en cultivo

Roger Y. Tsien



Courtesy of Roger Tsien

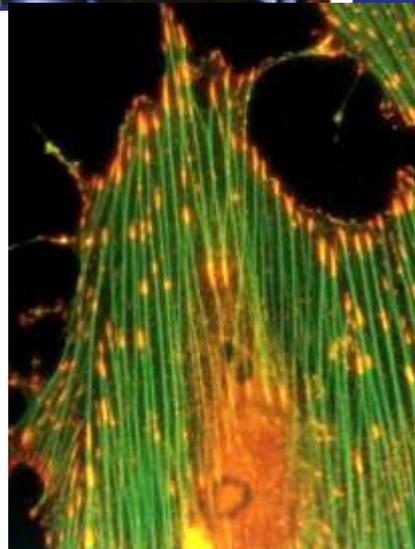
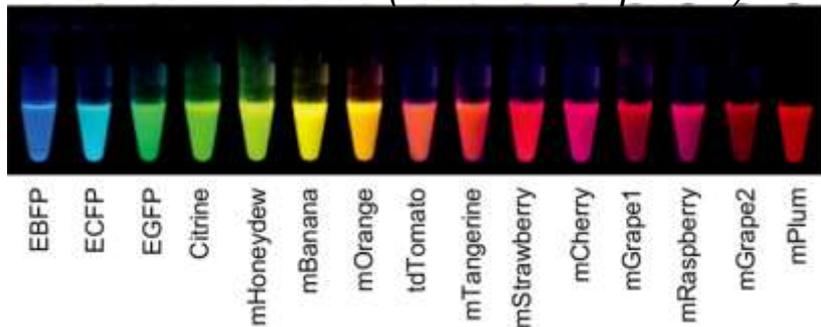


THE CRYSTAL STRUCTURE OF GFP



Aequorea victoria

Fluorescencia (diversidad espectral)



MICE EXPRESSING GFP



Usos de distintas proteínas fluorescentes en biología celular

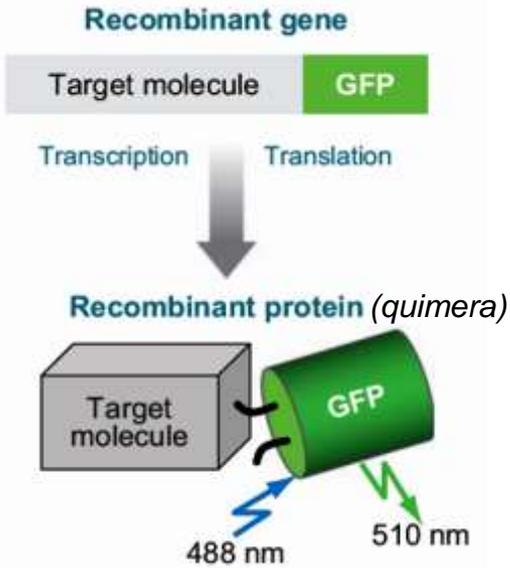


foto-activación
(cambio de intensidad)

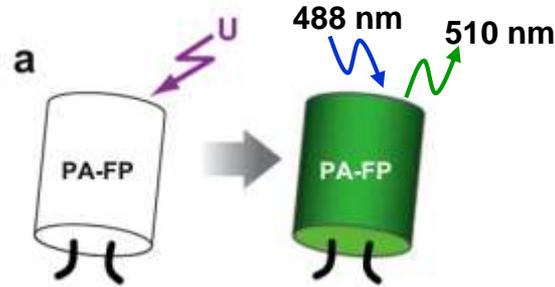
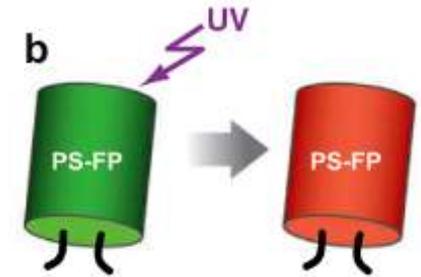


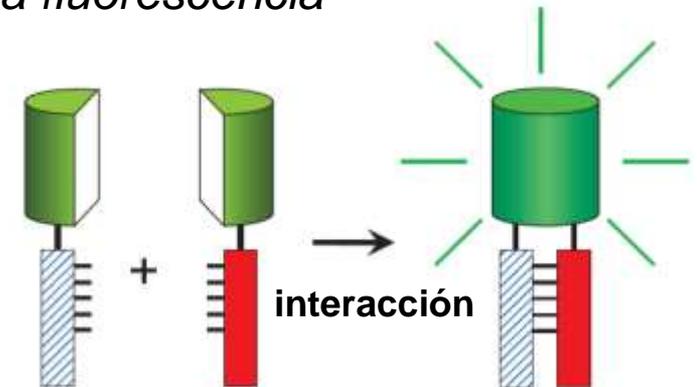
foto-conversión
(cambio de color)



FRET, transferencia de energía por resonancia



BiFC, Complementación bimolecular de la fluorescencia

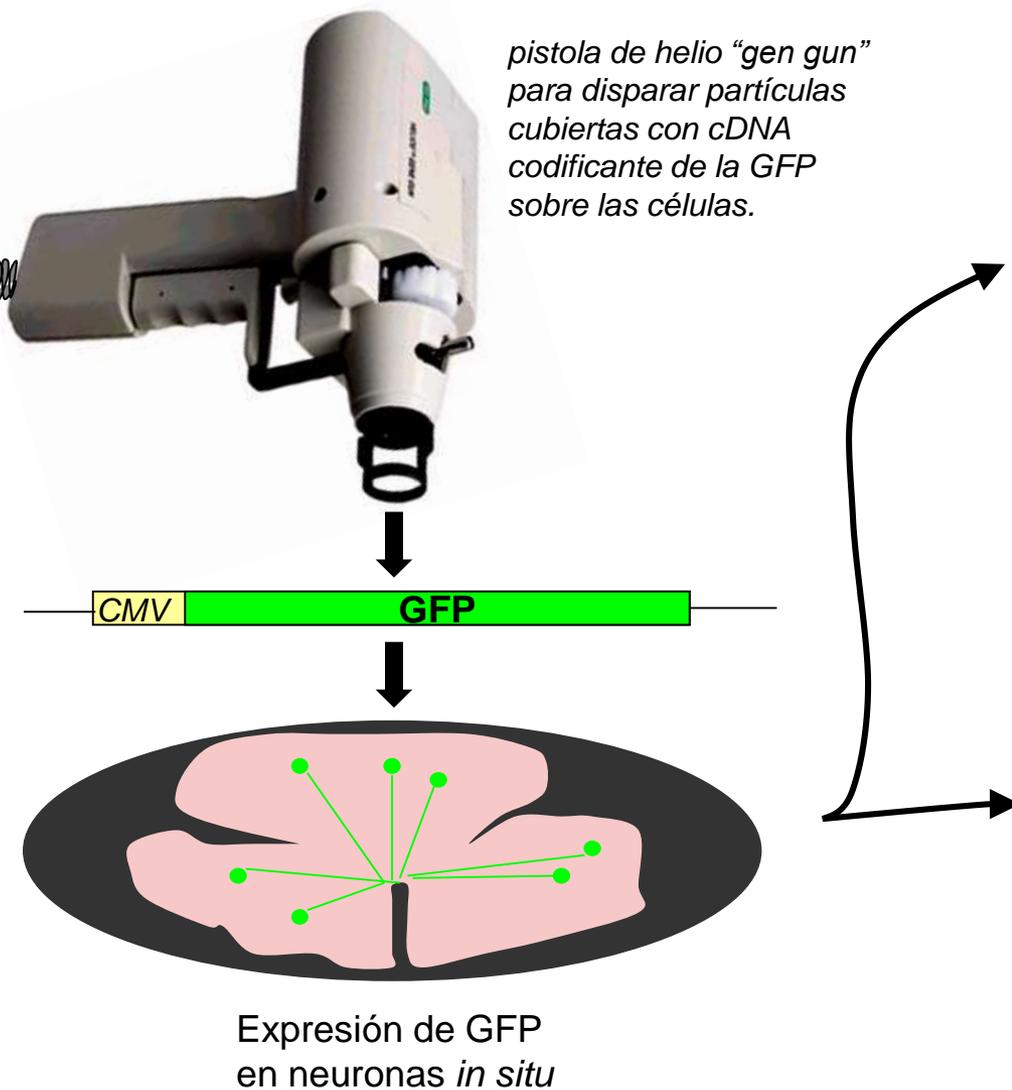


video de GTPasas Rho & Cdc42
(Machacek et al, Nature 2009)

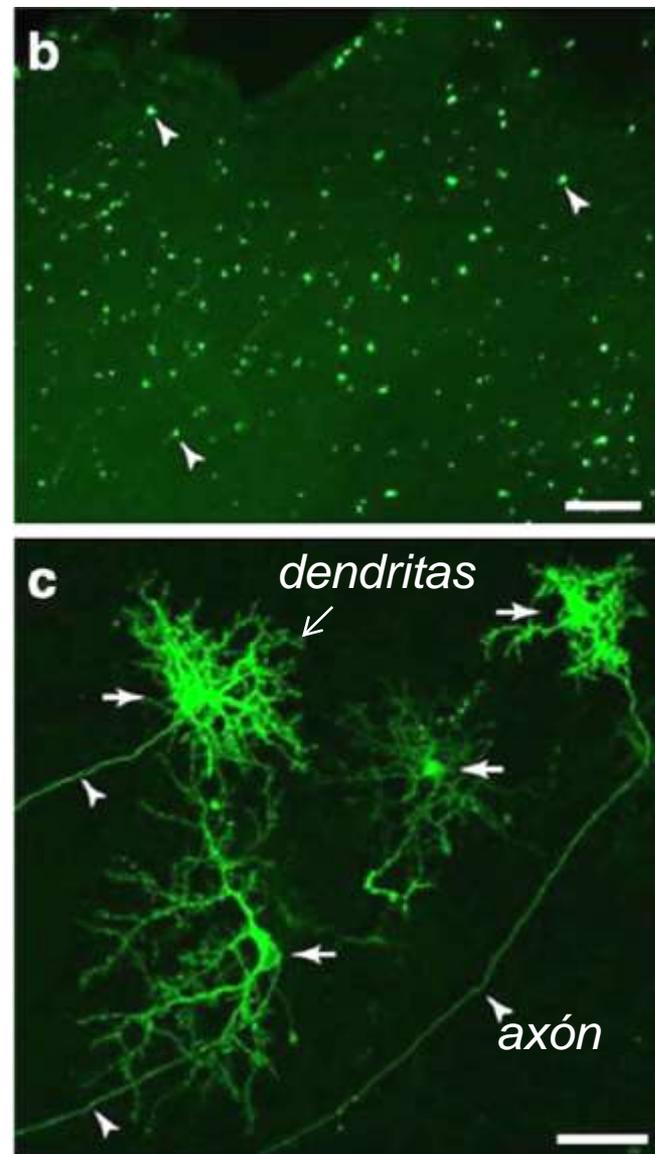
Wang et al, ARB, 2008
Kerppola, MethCellBiol, 2008

Proteínas fluorescentes para visualizar cambios morfológicos y dinámica celular

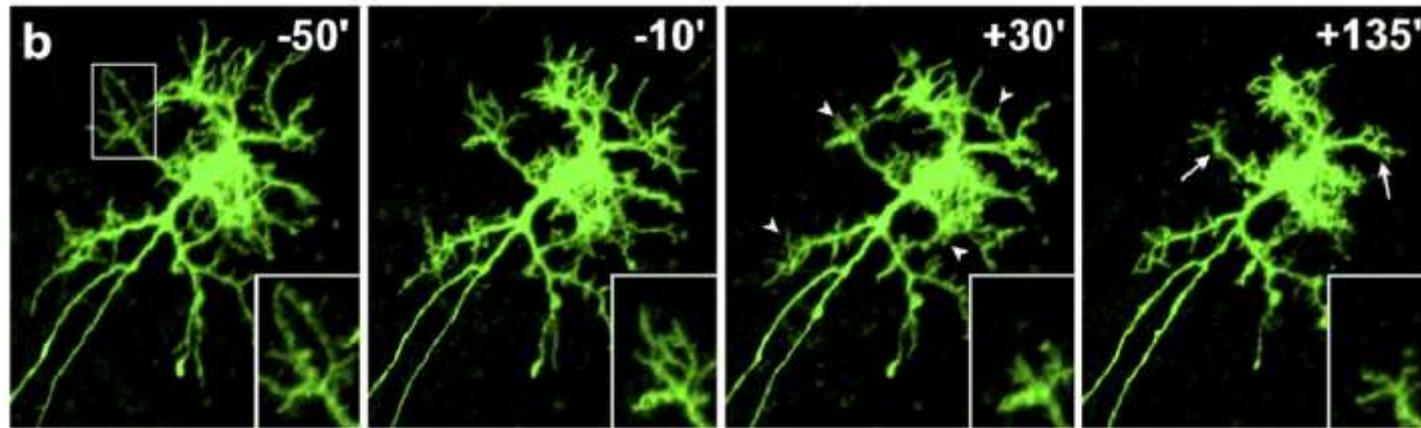
Transfección de retinas enteras



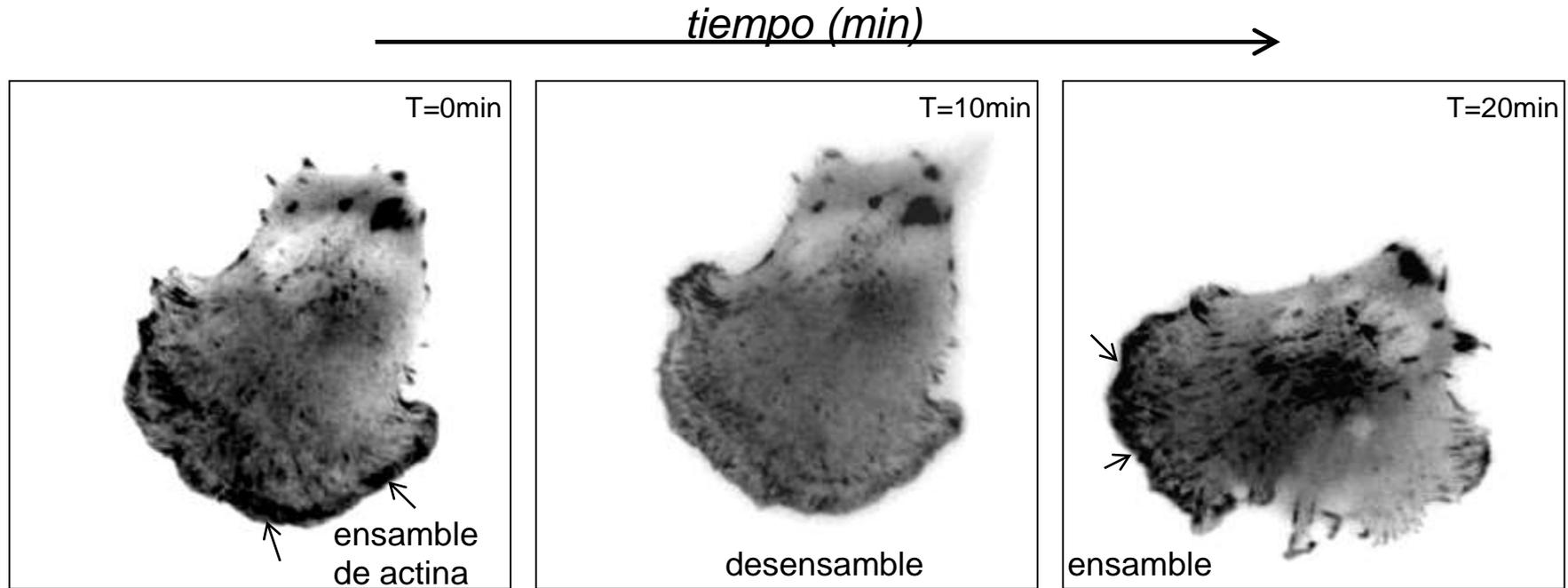
Visualización panorámica (b) y detallada (c) de neuronas ganglionares que expresan la GFP.



Neurona de retina transflectada con GFP muestra la remodelación de dendritas durante el período de observación

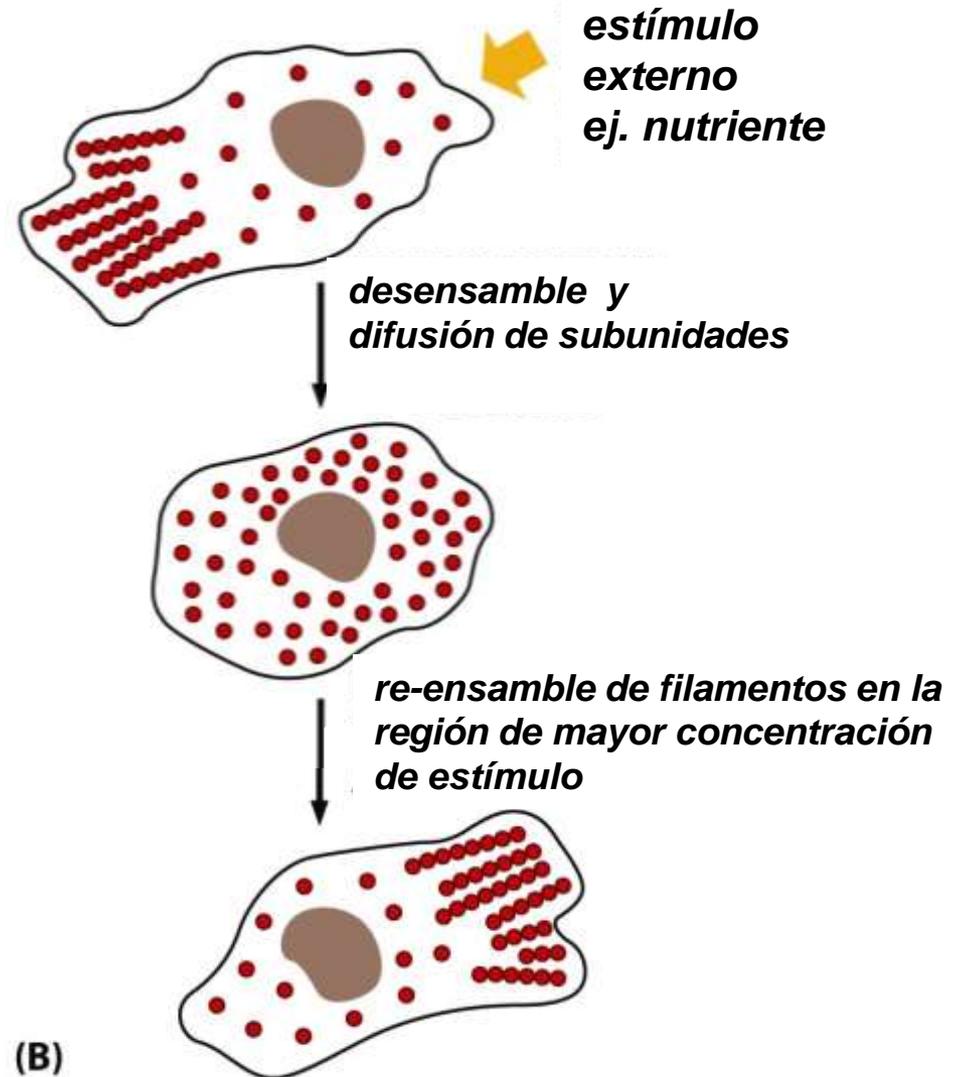
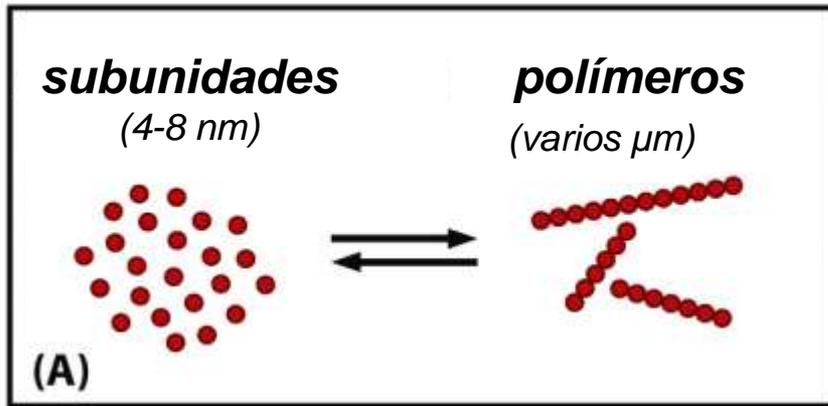


Proteínas quimeras fluorescentes permiten estudiar la dinámica de ensamblajes macromoleculares



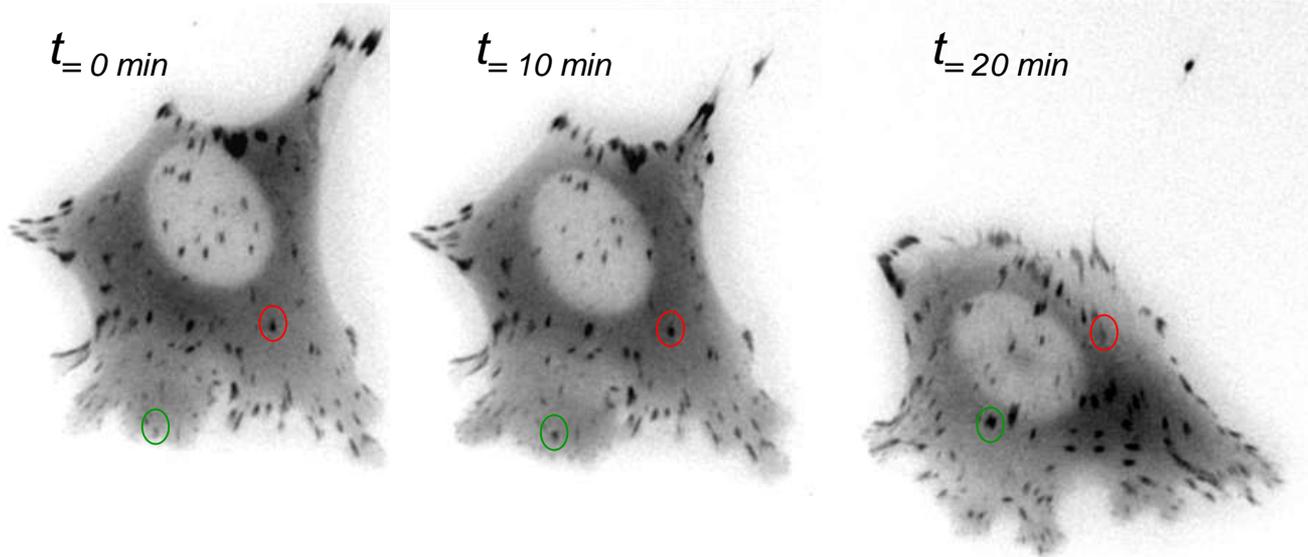
Célula transfectada con una proteína que se une a filamentos de actina fusionada a GFP (el color fue cambiado a blanco y negro). Las regiones más oscuras indican la acumulación de la proteína fluorescente y de los filamentos de actina.

Las propiedades dinámicas de los polímeros del citoesqueleto facilitan cambios rápidos de la forma celular



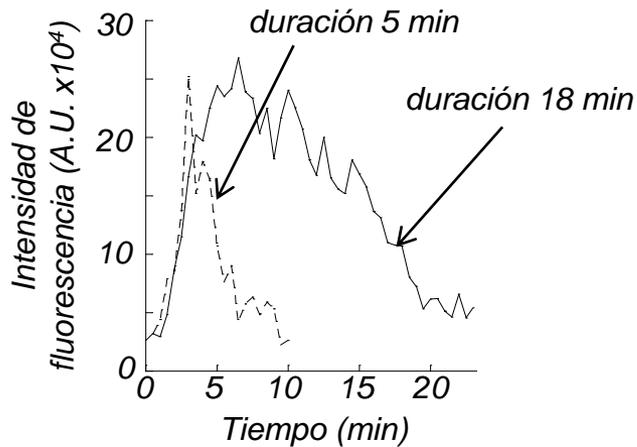
actina \leftrightarrow *microfilamentos*
tubulina \leftrightarrow *microtúbulos*
varias sub \leftrightarrow *filam. intermedios*

Proteínas quimeras fluorescentes para estudiar ensambles macromoleculares: dinámica de adhesiones al substrato



dirección de movimiento

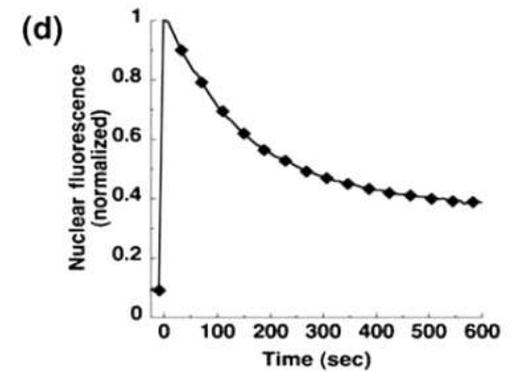
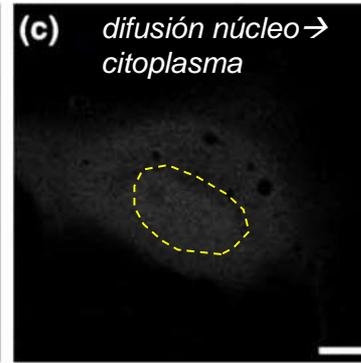
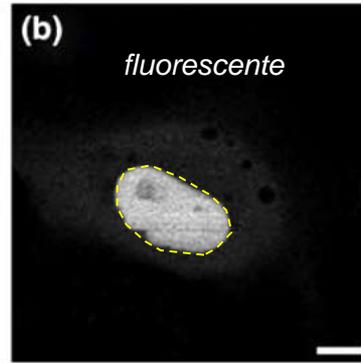
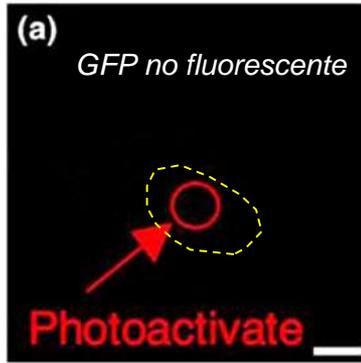
cinética de ensamble y desensamble de adhesiones



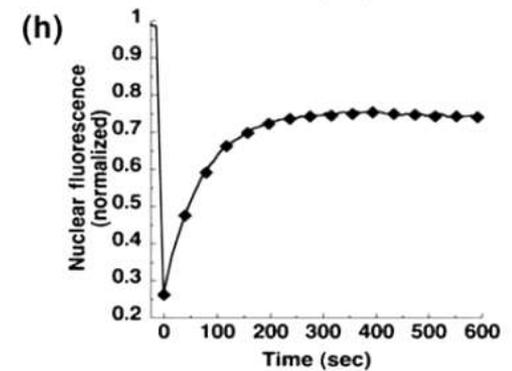
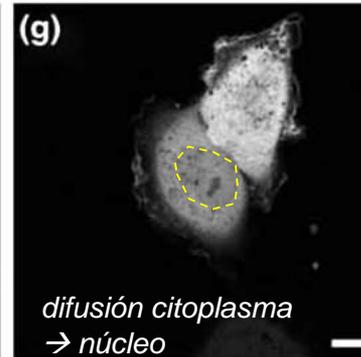
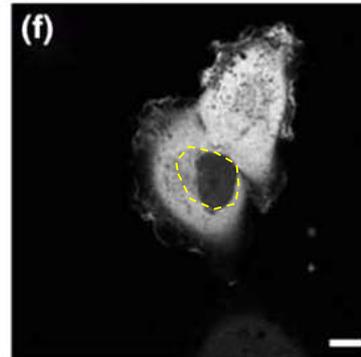
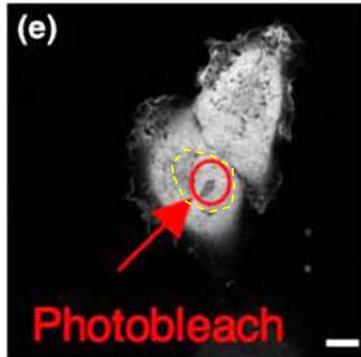
video dinámica de adhesiones (Burdisso & Arregui)

Empleo de láseres y de quimeras fluorescentes para estudiar la movilidad de proteínas dentro y entre compartimientos

pulso de activación por láser



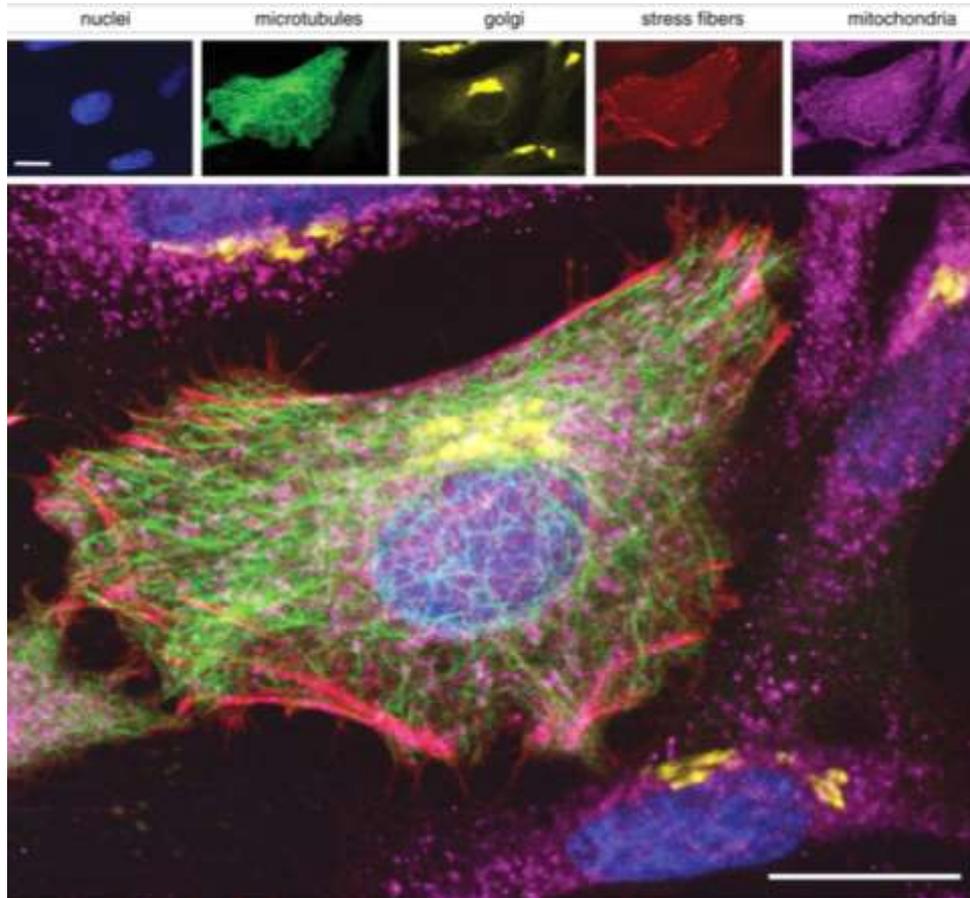
máxima potencia de láser



TRENDS in Cell Biology

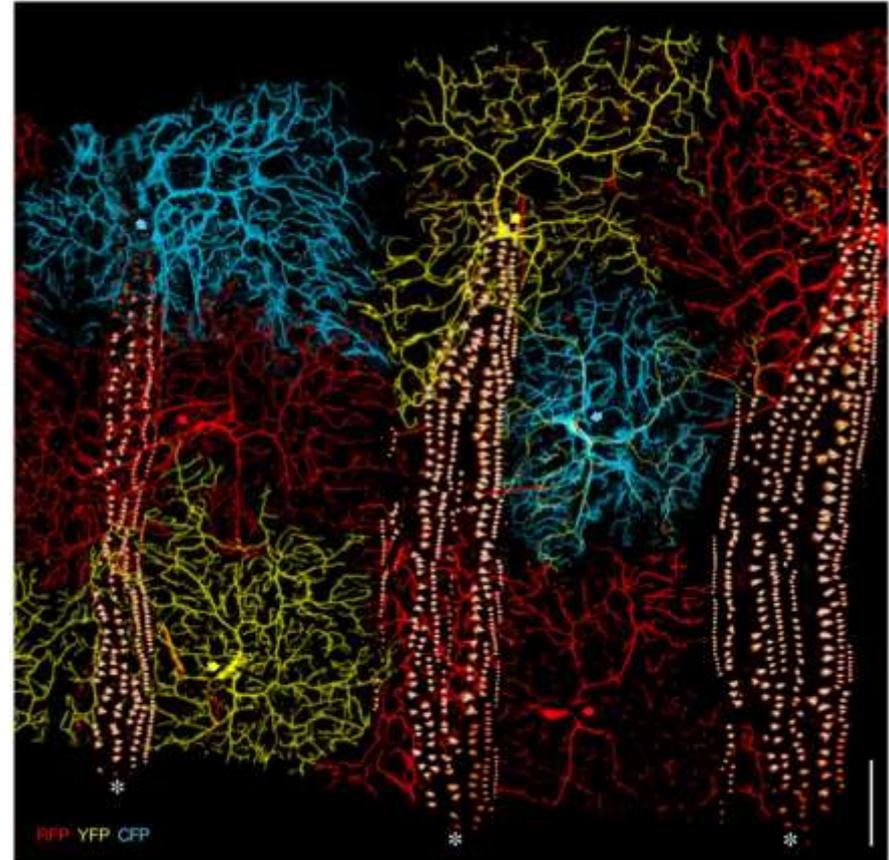
La microscopía multi-dimensional permite el análisis simultáneo de múltiples componentes celulares

Múltiple marcado de subestructuras en una célula HeLa



Giepmans et al., Science 2006

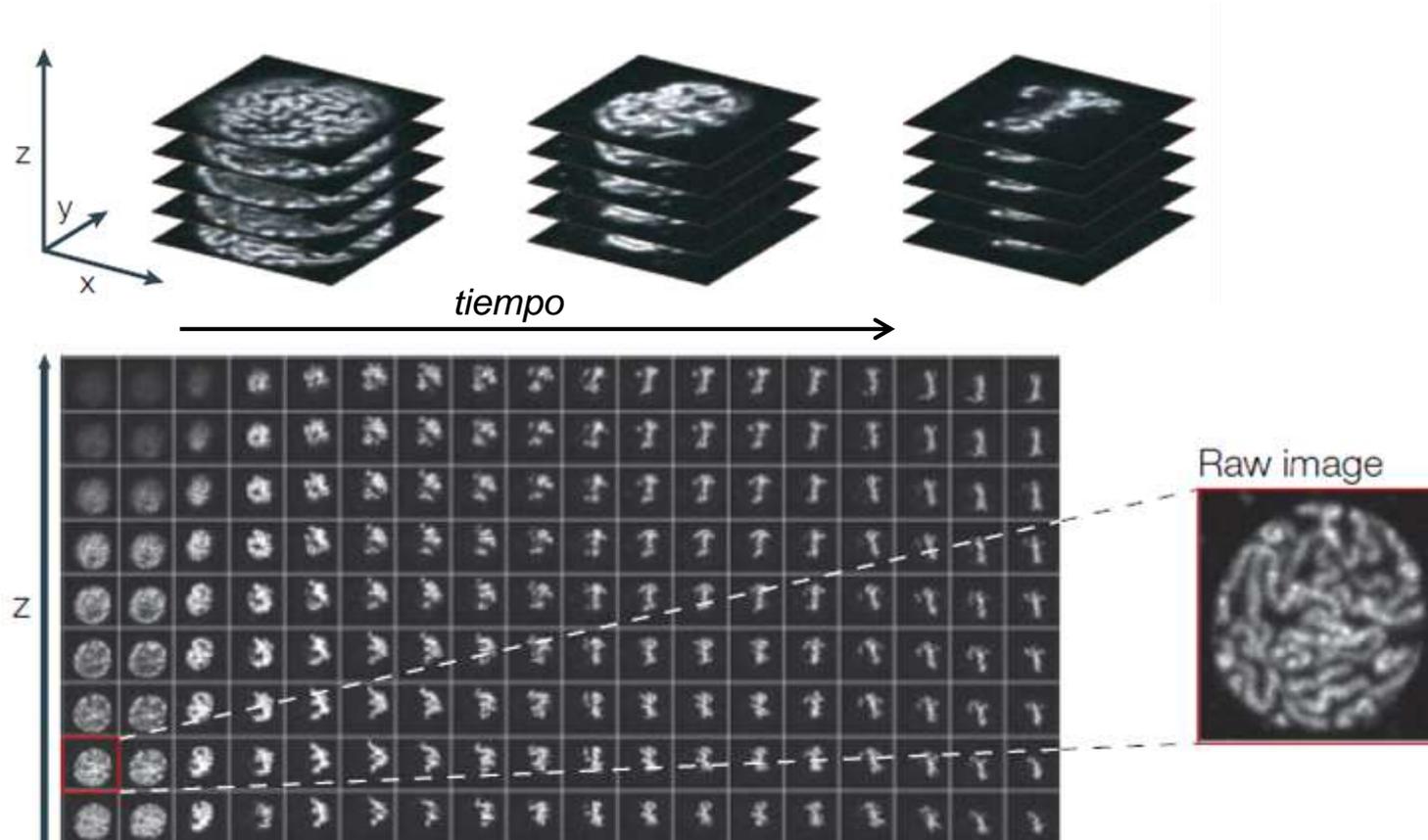
Neuronas sensoriales en la pared ventrolateral de una larva de Drosophila expresan RFP, YFP y CFP



Boulina et al., Development 2013

Adquisición y procesamiento de imágenes (xyz + t)

serie temporal + varios planos de foco en el eje z.

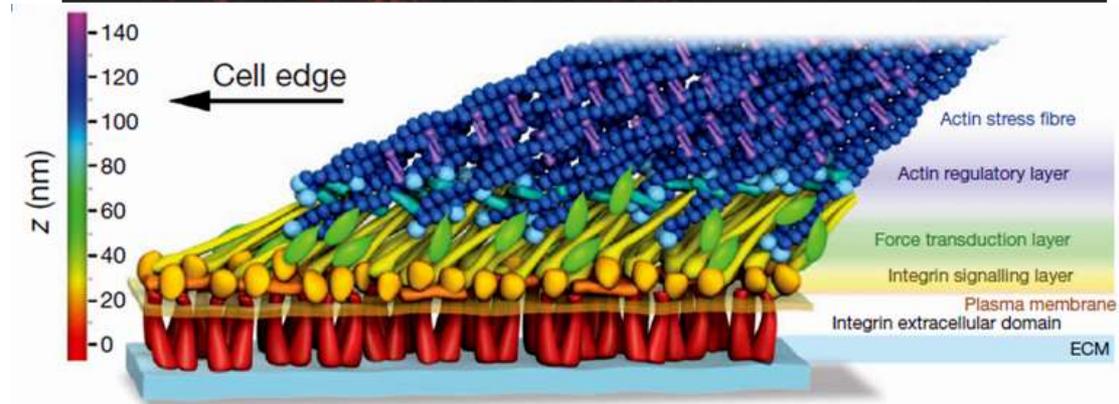
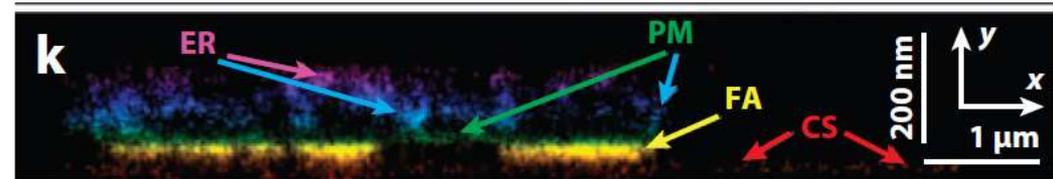
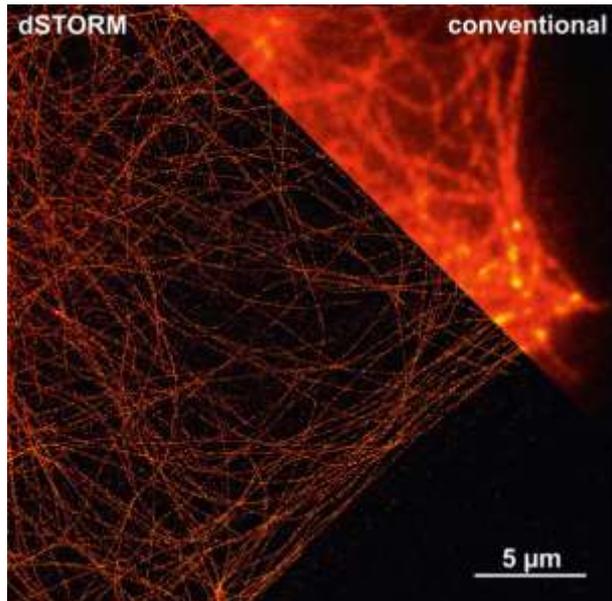
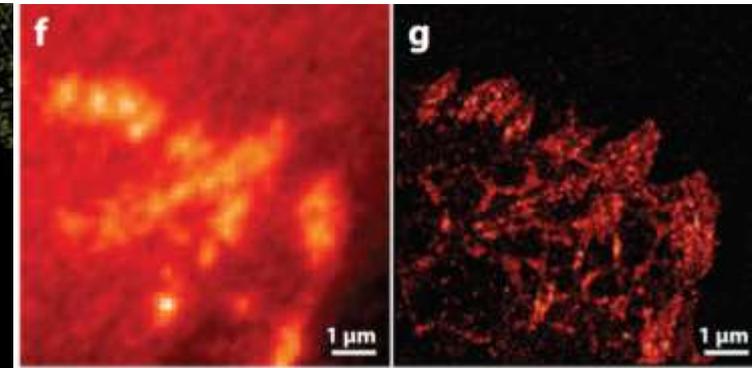
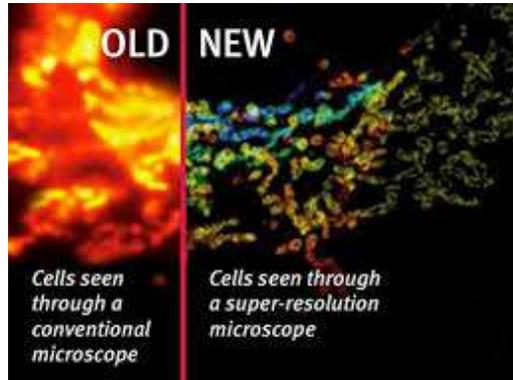
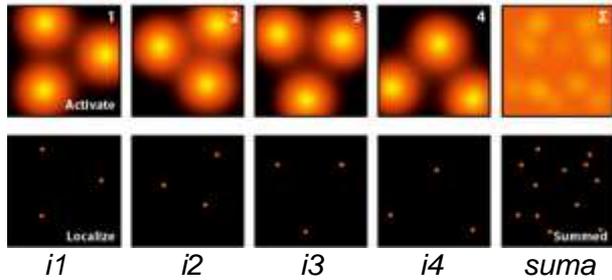


En el ejemplo se muestra el esquema de adquisición de los datos y su posterior procesamiento. Organización de la cromatina durante mitosis visualizada mediante transfección de la histona 2B-CFP.

Nuevas técnicas permiten extender los límites de resolución de la microscopía

Resolución aproximada de la microscopía de luz convencional ~ 200 nm

Resolución aproximada de las técnicas de super-resolución ~ 40 nm



<http://ibidi.com/blog/ibidis-slides-are-as-effective-as-glass-slides-in-live-cell-super-resolution-microscopy-n22>

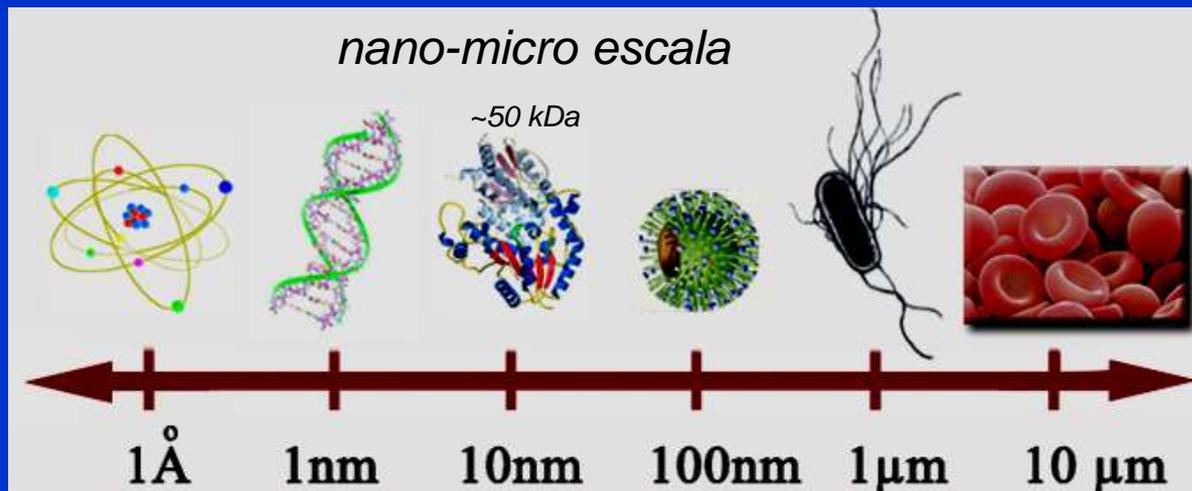
Toomre & Bewersdorf, ARCD 2010
 Kanchanawong et al, Nature 2010
 Paterson et al, ARCP 2010

La célula contiene una alta densidad de macromoléculas y organelas

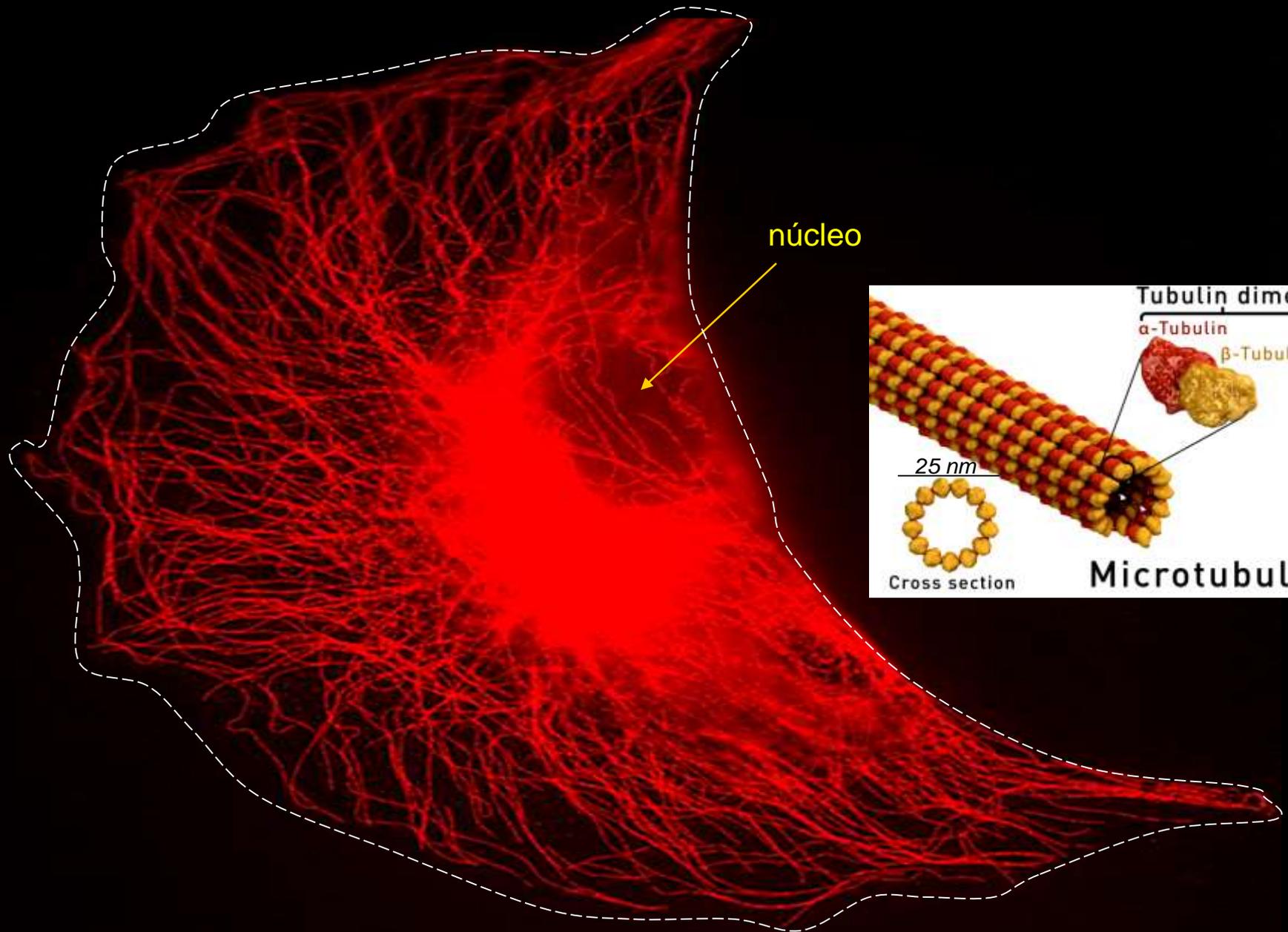
La concentración de proteínas en el citoplasma es de ~ 300 mg/ml (Zimmerman & Trach, *J. Molec. Biol* 1991, 222:599)

La densidad macromolecular del citosol modula la síntesis, estabilidad y dinámica de las proteínas.

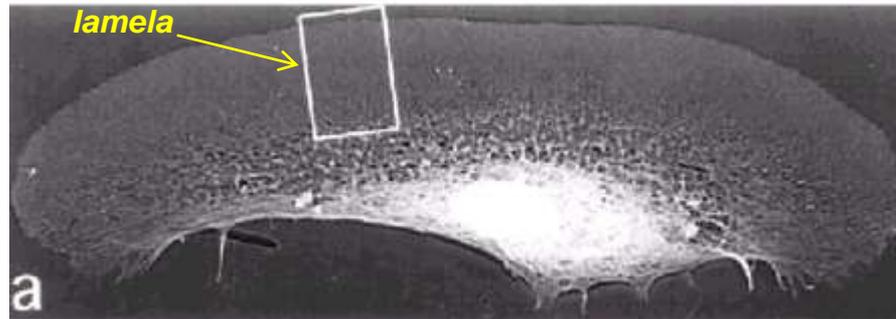
Moléculas < 500 daltons difunden libremente en el citosol, la difusión de grandes macromoléculas, como las proteínas es significativamente retardada (Seksek et al *J Cell. Biol* 1997, 138: 131).



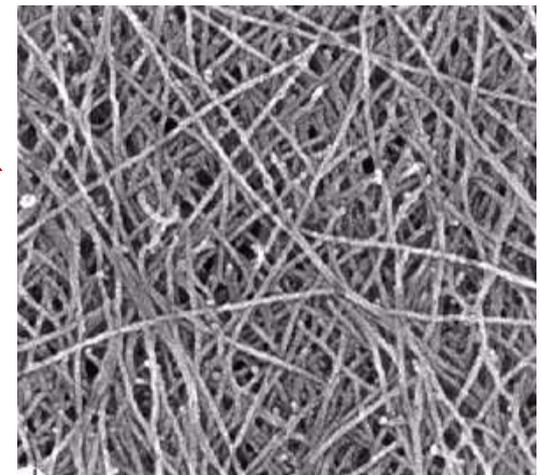
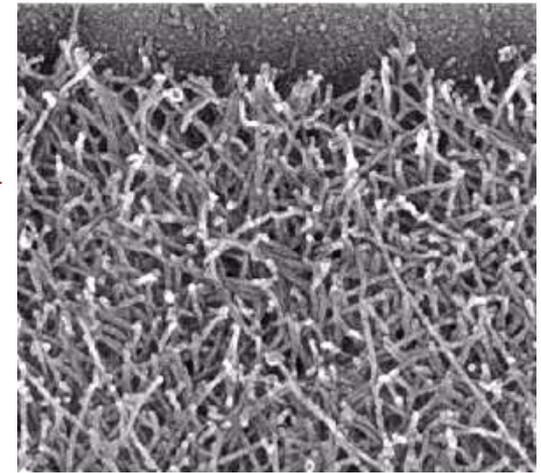
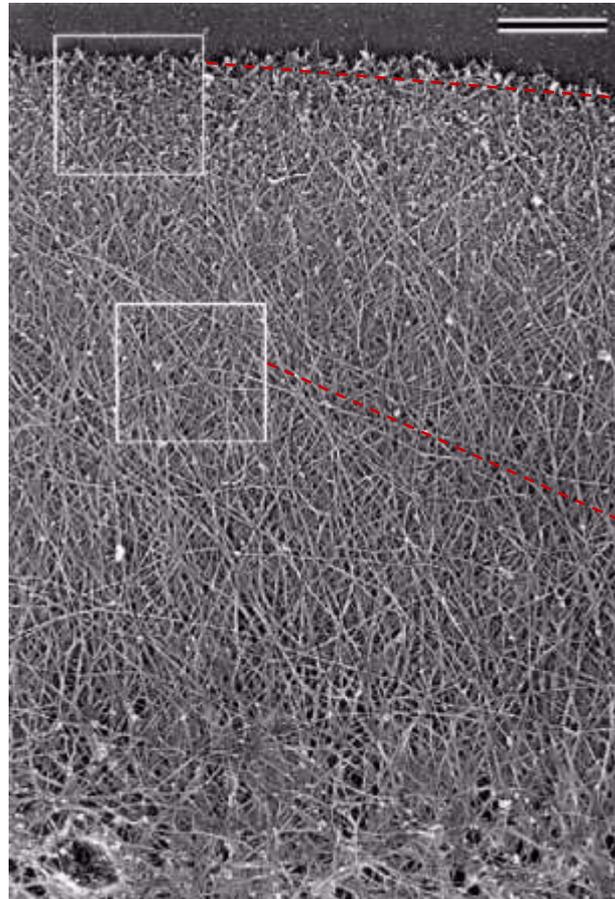
Densidad de microtúbulos de interfase en un fibroblasto



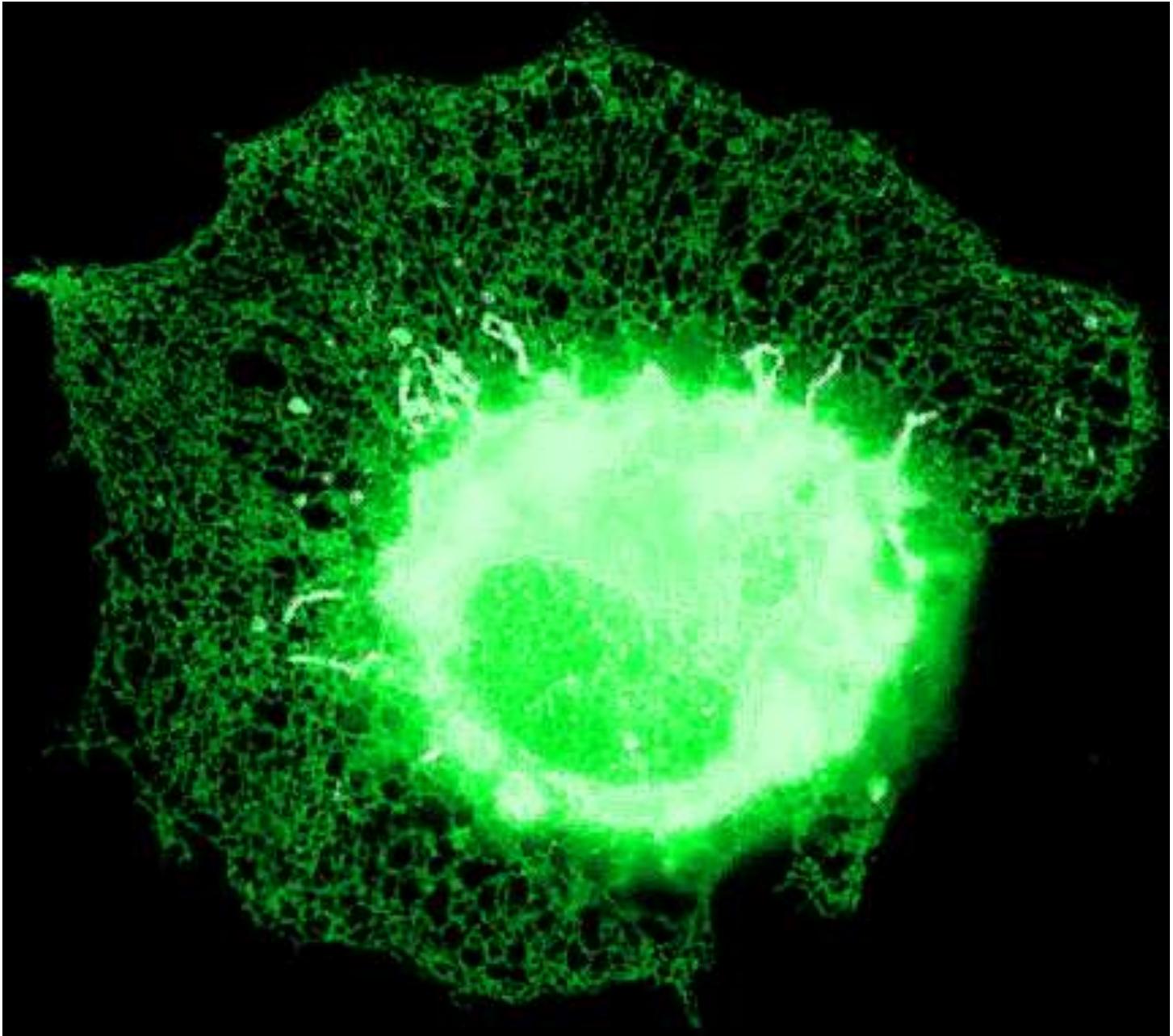
Densidad de filamentos de actina en la lamela de un keratinocito

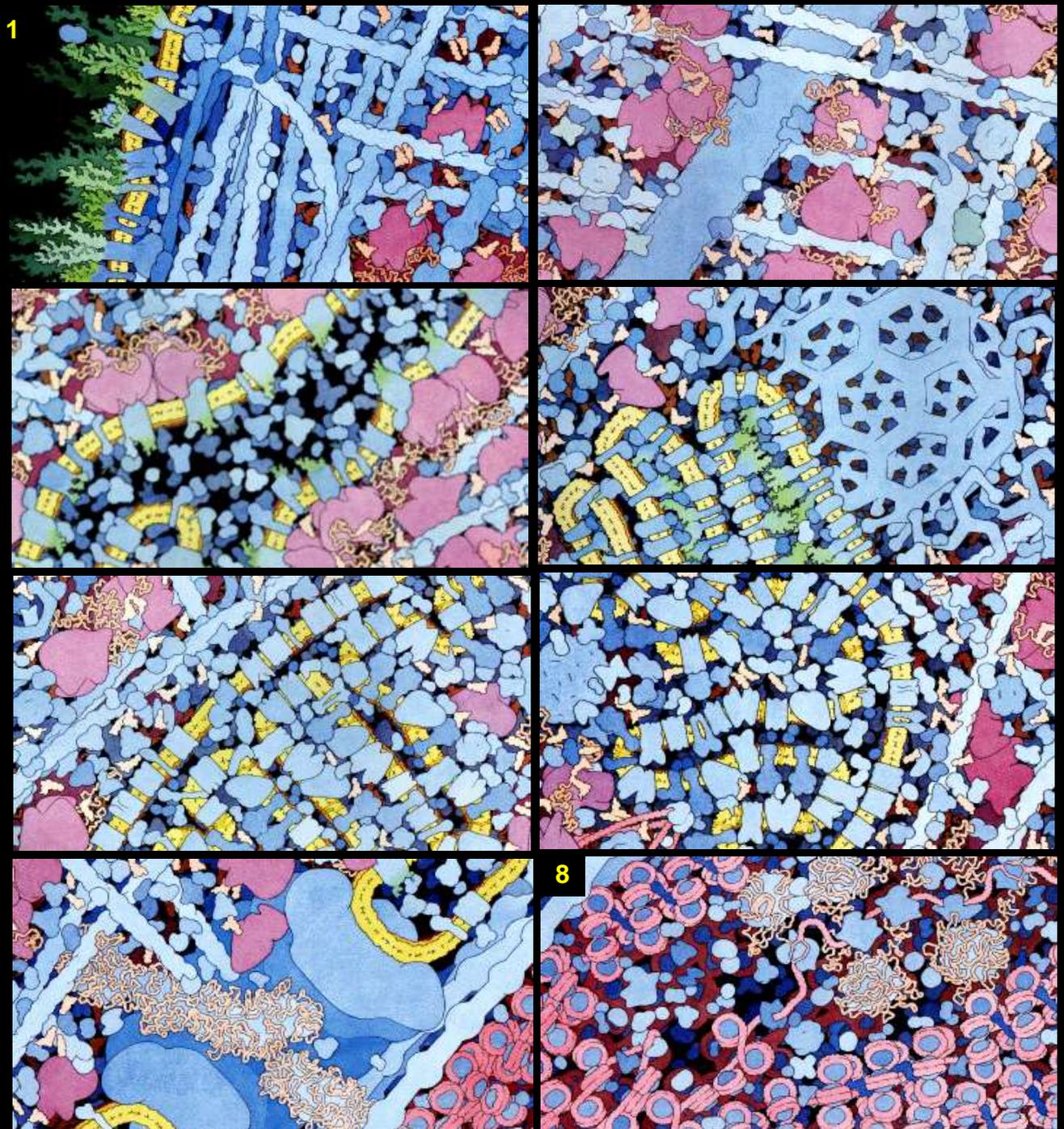
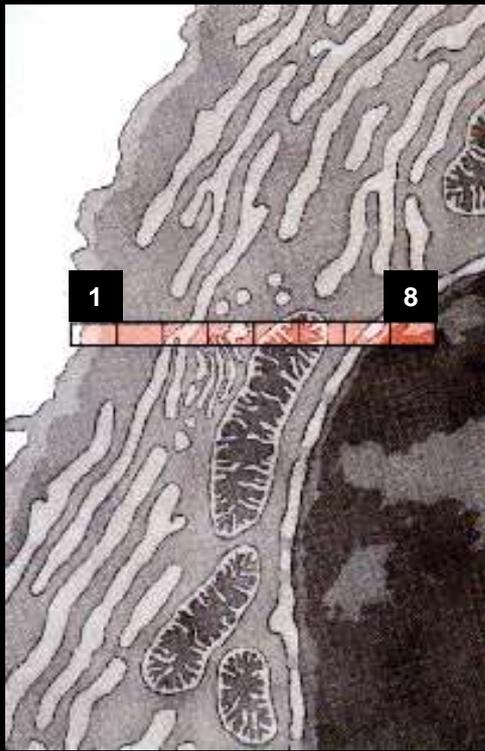


mall
de
filamentos de
actina



Densidad de túbulos pertenecientes a la red del retículo endoplásmico





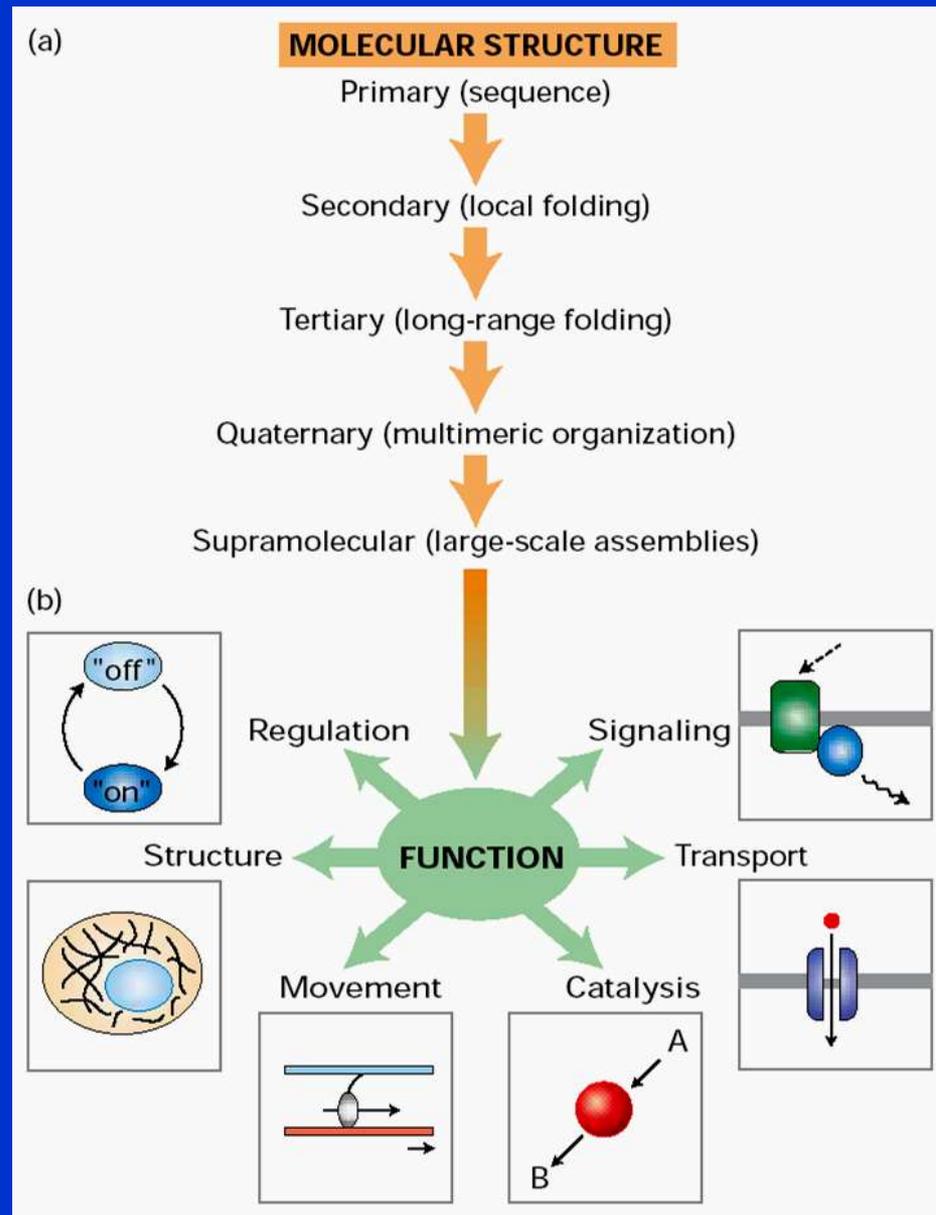
Eucaryotic cell

David Goodsell, Scripps Res. Inst.

<http://mgl.scripps.edu/people/goodsell/>

proteínas en azul,
DNA/RNA en rosa
lípidos en amarillo
carbohidratos en verde
ribosomas en magenta

La estructura y función de las células depende fundamentalmente de las proteínas

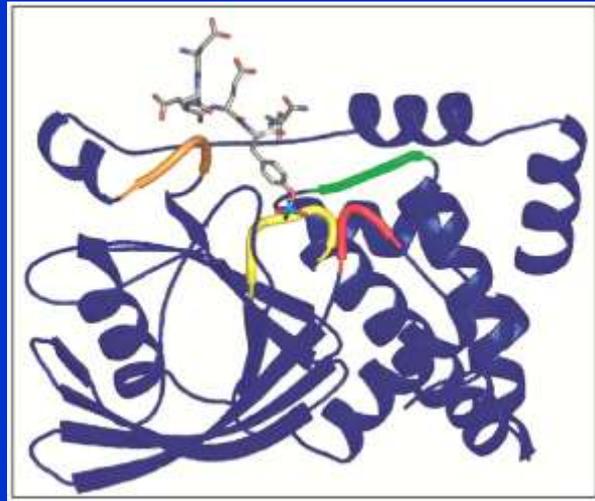


Algunos conceptos fundamentales relacionados a las proteínas

- **Chaperonas** asisten en el plegado de las proteínas en el citosol y en compartimientos específicos (RE, mitocondrias).
- La función de las proteínas depende de su **estructura tridimensional**.
- La estructura tridimensional está **determinada por la secuencia de aminoácidos**.
- Cada proteína adopta una estructura tridimensional única o **conformación nativa**.
- La conformación nativa es la más estable termodinámicamente y se mantiene por múltiples interacciones no covalentes.
- **Dominios** son partes de una proteína con autonomía estructural y funcional.
- **Modificaciones post-traducción** covalentes alteran la estructura/función de las proteínas.
- **Proteosomas** son estructuras macromoleculares que degradan proteínas.
- **Desnaturalización** es la pérdida de la conformación nativa y función de la proteína.

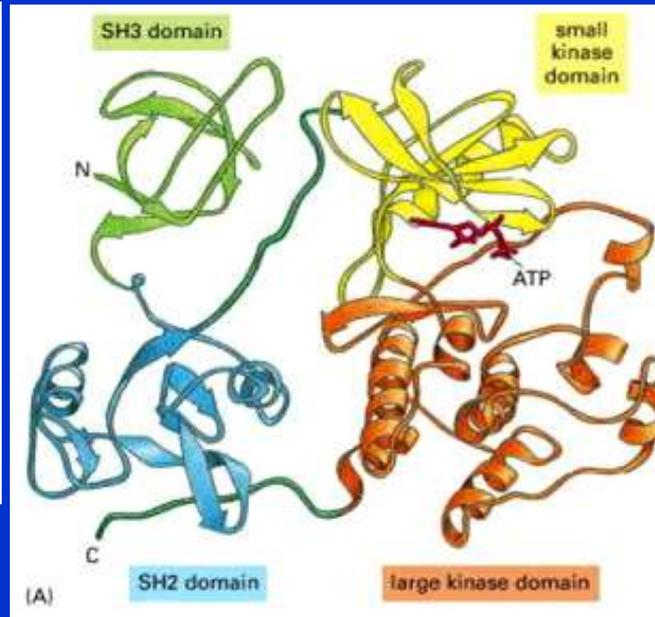
Estructura tridimensional

Fosfatasa de tirosina PTP1B



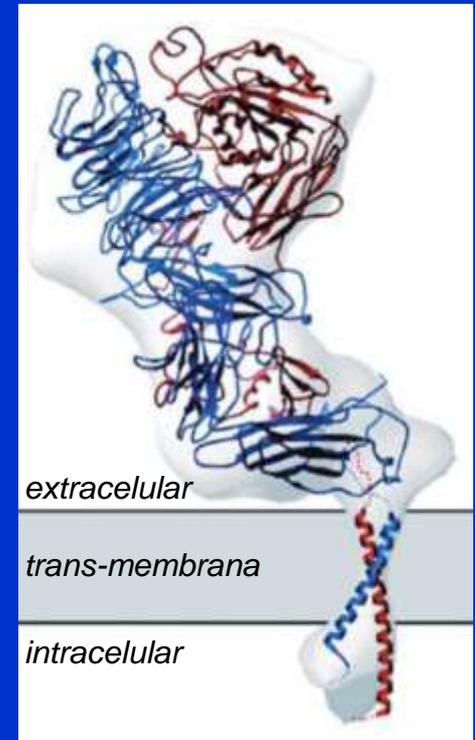
Proteína con un dominio globular

Quinasa de tirosina Src



Proteína con varios dominios globulares

Integrina



*Proteína de transmembrana con 3 dominios:
extracelular
trans-membrana
intracelular*

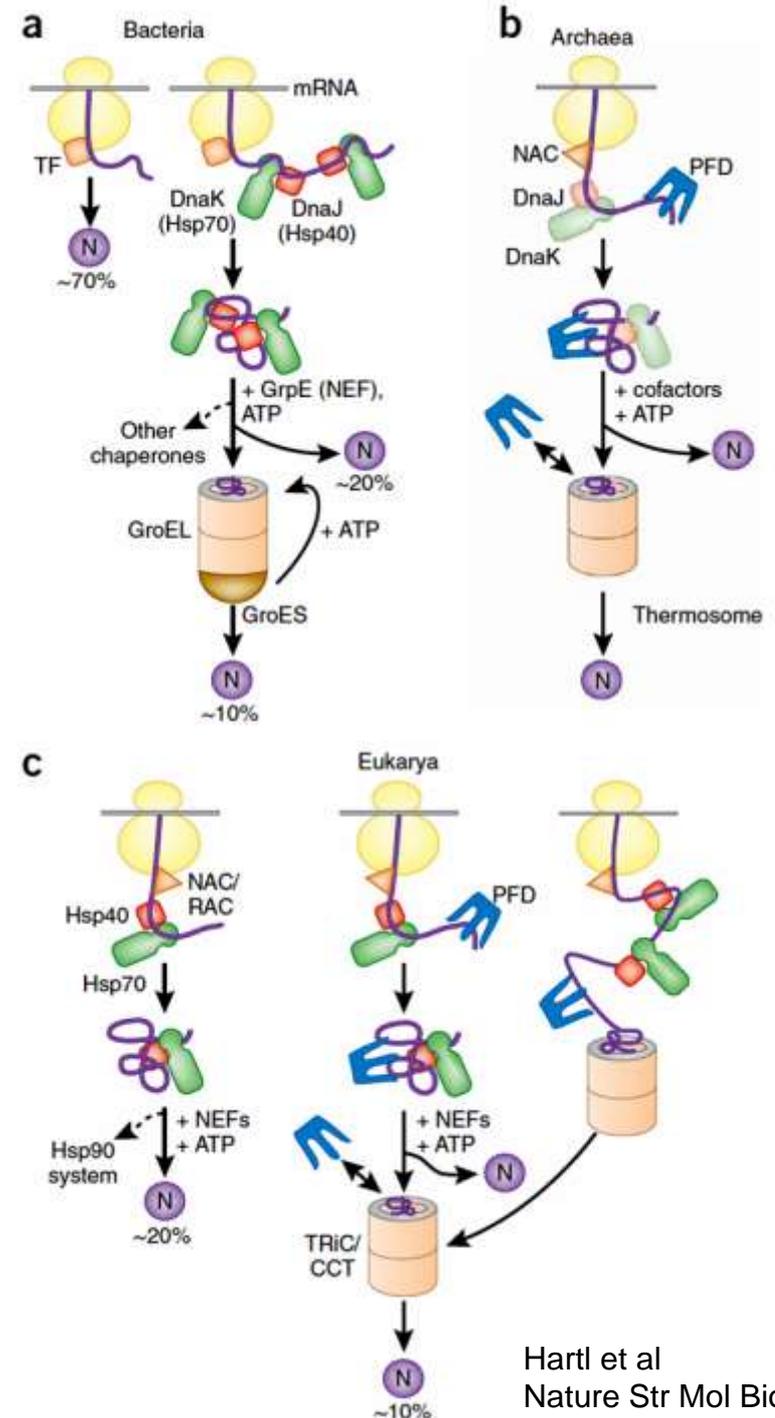
En la célula el plegado de las proteínas es asistido por **chaperonas**

Las chaperonas interactúan, estabilizan y aceleran el proceso de plegado y adquisición de la conformación nativa del sustrato sin formar parte de su estructura final.

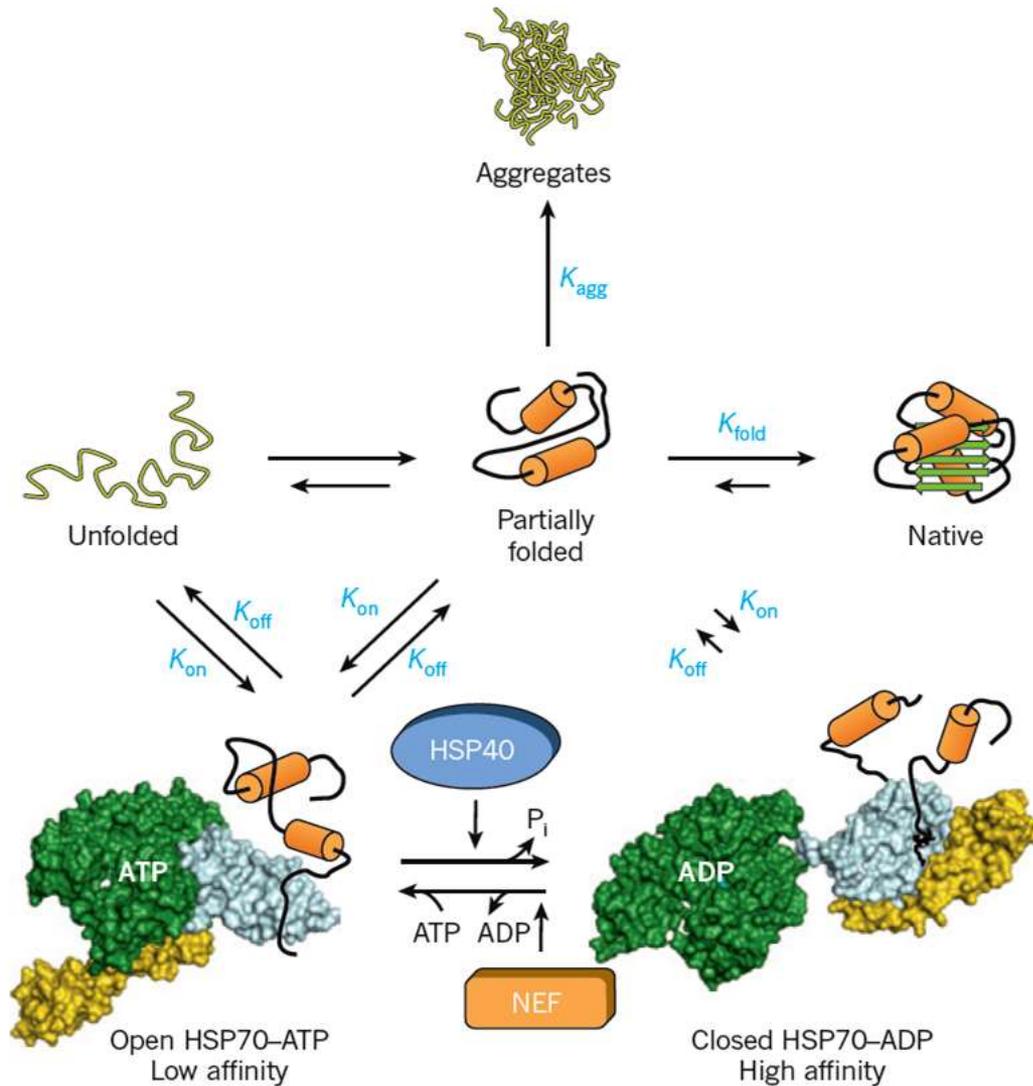
Ciertas chaperonas (*TF, NAC/RAC*) interactúan con el ribosoma y con segmentos hidrofóbicos de los polipéptidos nacientes, impidiendo su agregación y degradación co-traducción.

Las chaperonas moleculares (ej. *Hsp70, Hsp90, BiP*) y chaperoninas (ej. *GroEL, Termosoma, CCT/TRIC*) promueven el plegado del sustrato mediante ciclos de unión/desunión dependiente de hidrólisis de ATP.

La elongación de los polipéptidos en eucariotas ocurre a ~ 4 aminoácidos por segundo y en bacterias a ~ 20 aa/seg. En células humanas existen ~ 200 chaperonas y co-chaperonas. Las chaperoninas representan entre el 0.1-1% del total de proteínas solubles.



Ciclo de la chaperona molecular **HSP70**

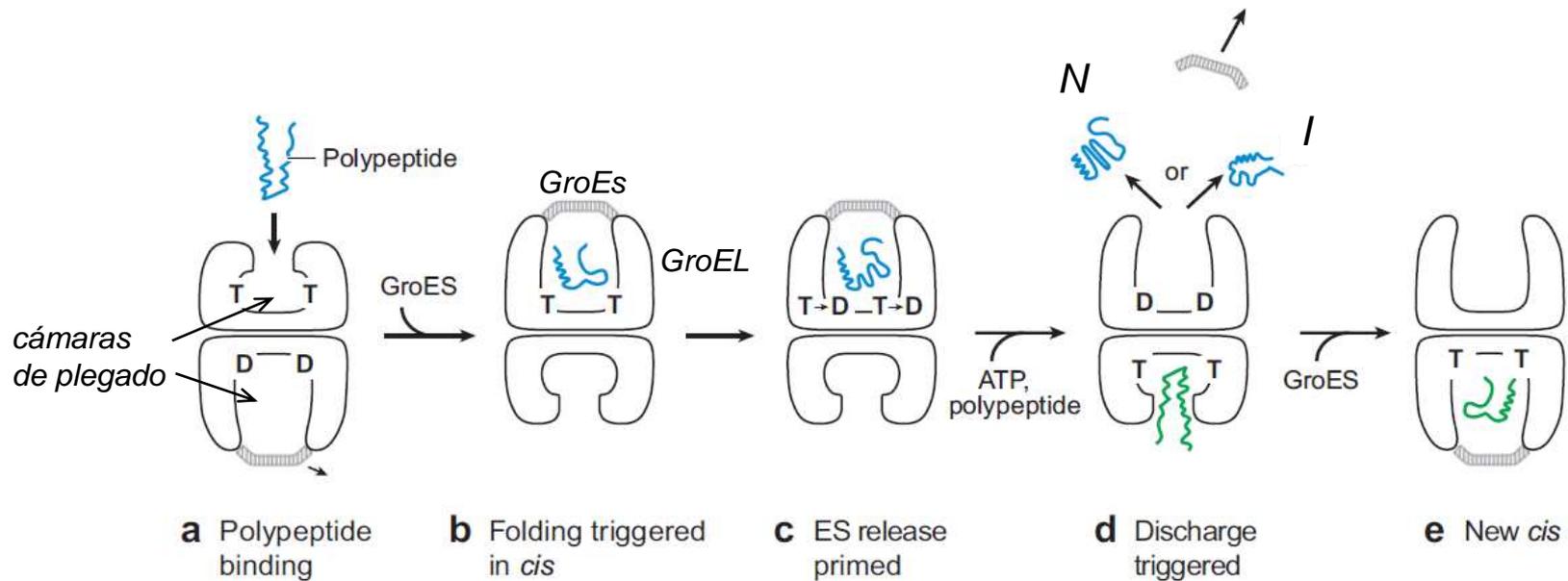


HSP40 presenta substratos a HSP70 y estimula la hidrólisis del ATP unido.

NEF estimula el intercambio del ADP por ATP en HSP70.

HSP70 cicla entre estados de baja (ATP unido) y alta afinidad (ADP unido) de unión por los substratos. Reconoce secuencias hidrofóbicas cortas que se repiten cada 50-100 aminoácidos en los polipéptidos.

Ciclo de la chaperonina **GroEL/GroES**



Ambas cámaras de las chaperoninas funcionan en el plegado de polipéptidos pero de manera alternada.

a) La unión cooperativa del ATP (T) a una cámara de GroEL promueve la unión del polipéptido y de GroES a GroEL. Cambios conformacionales liberan el polipéptido a la cámara de GroEL.

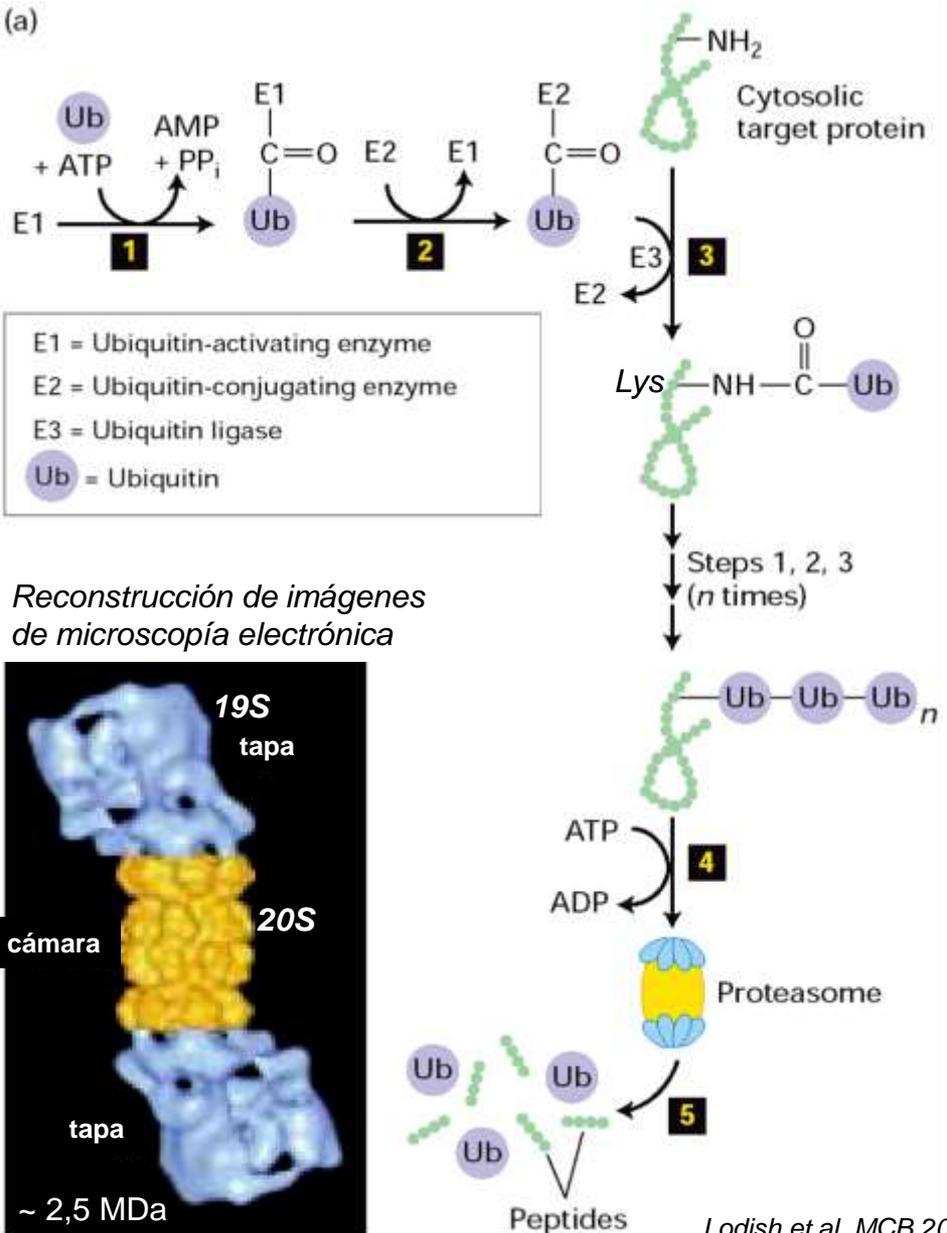
b) Durante el plegado del polipéptido (~10 seg) se hidroliza el ATP (T->D) y disminuye la afinidad por GroES.

c) La unión de ATP a la cámara opuesta (trans) induce la expulsión de la proteína nativa (N) o un intermediario con conformación no nativa (I) de la cámara.

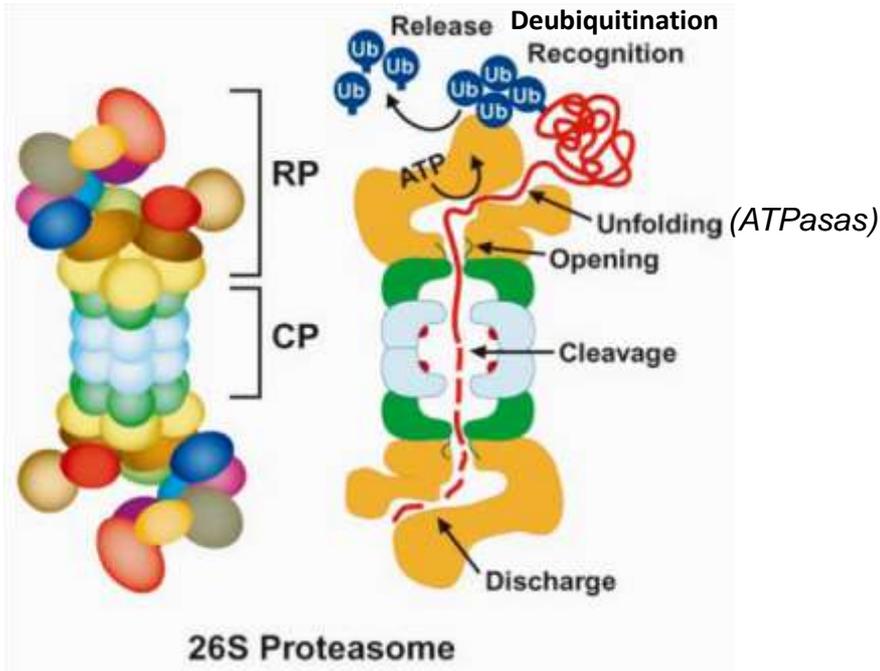
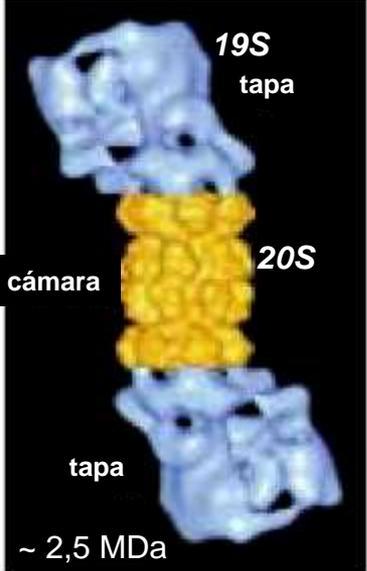
Las proteínas no funcionales se degradan en **proteosomas** por procesos específicos dependientes de ATP

Los **lisosomas** son organelas que degradan material transferido de endosomas y autofagosomas.

Los **proteosomas** son complejos cilíndricos compuestos por proteasas en la cámara central (CP) y subunidades reguladoras (RP) en los extremos. Las RP unen substratos **poli-ubiquitinados**, los despliegan y transfieren a la cámara central donde son degradados a péptidos cortos.



Reconstrucción de imágenes de microscopía electrónica



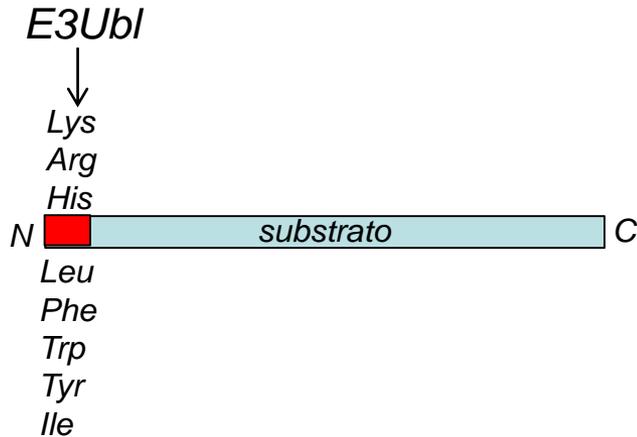
Numerosas proteínas reguladoras son substratos del proteosoma, ej. IκB, p53, inhibidores de CDK, securina, β-catenina, HIF, etc).

Las E3 ubiquitina ligasas (Ubl) reconocen señales de degradación (degrones) en los substratos

La degradación de proteínas en la célula es un proceso selectivo y requiere de energía. Un “degron” en una proteína es un elemento estructural mínimo y suficiente para su reconocimiento por el sistema proteolítico.

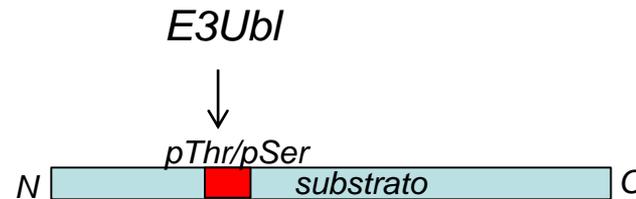
degrones N-terminal:

la E3Ubl reconoce aminoácidos específicos en el terminal amino



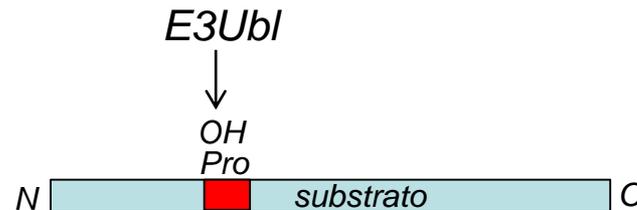
dependiente de fosforilación:

E3Ubl reconoce fosfo-degrones, ej. SCF



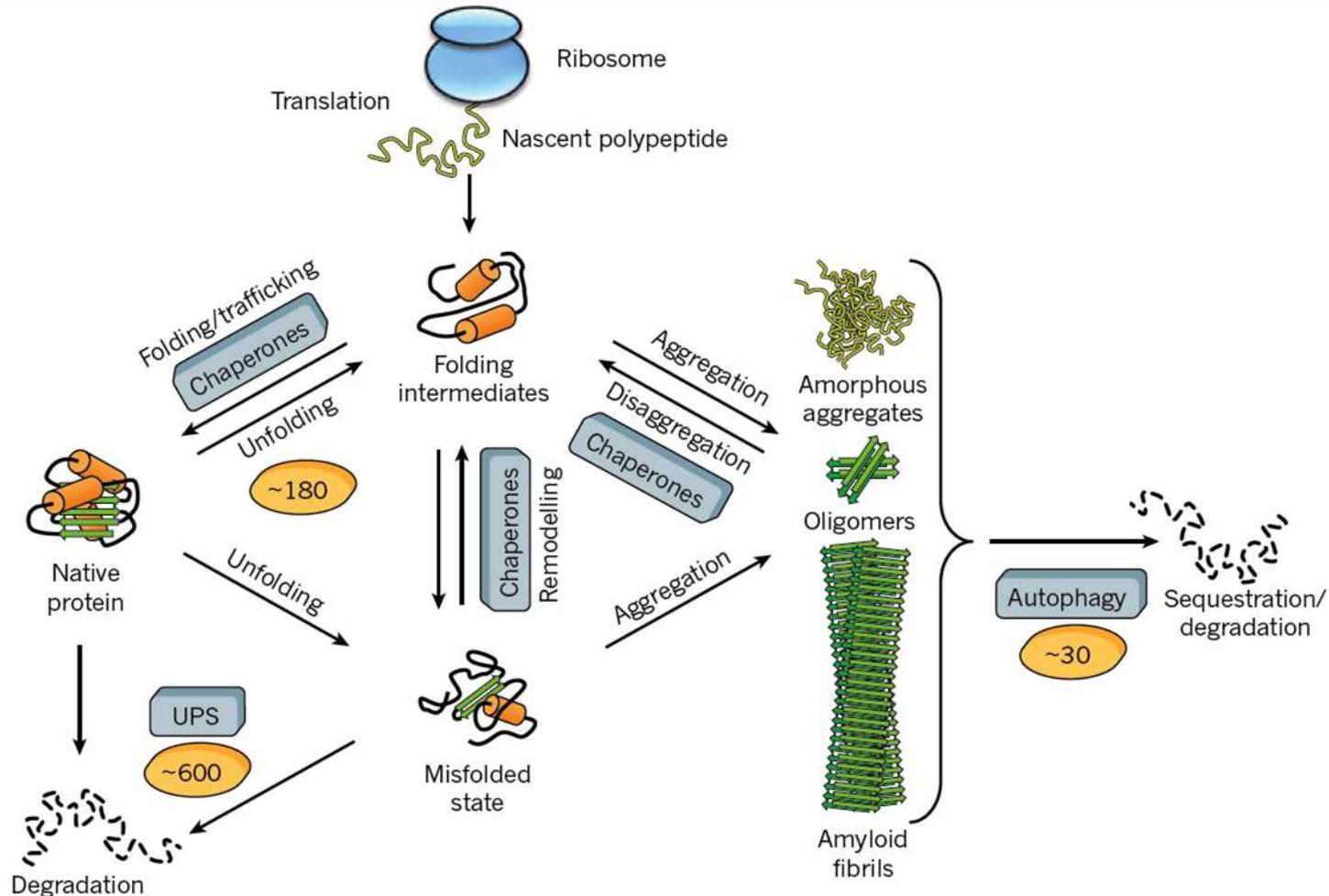
dependiente de oxígeno:

La E3Ubl reconoce hidroxiproline, ej. VHL



Proteostasis

La homeostasis del proteoma celular (proteostasis) es mantenida por una red de cientos de proteínas que controlan el plegado (~180) y degradación mediante el sistema de ubiquitina (~ 600) y de autofagia (~ 30).



Varias enfermedades humanas se atribuyen a fallas en la proteostasis

Table 1 | **Clinical, pathological and biochemical features of neurodegenerative diseases**

Disease	Mode of transmission	Clinical features	Affected regions of the brain	Protein involved	Cellular location of aggregates
Alzheimer's	Sporadic (95%) or inherited (5%)	Progressive dementia	Hippocampus, cerebral cortex	Amyloid- β and tau	Extracellular, cytoplasmic
Parkinson's	Mostly sporadic, rarely inherited	Movement disorder	Substantia nigra, hypothalamus	α -Synuclein	Cytoplasmic
Huntington's	Inherited (autosomal dominant)	Dementia, motor and psychiatric problems	Striatum, cerebral cortex	Huntingtin	Nuclear
Amyotrophic lateral sclerosis	Sporadic (90%) or inherited (10%)	Movement disorder	Motor cortex, brainstem	Superoxide dismutase	Cytoplasmic
Transmissible spongiform encephalopathies	Sporadic (90%), inherited (8%) or infectious (2%)	Dementia, ataxia, psychiatric problems or insomnia	Various regions depending on the disease	Prion protein	Extracellular

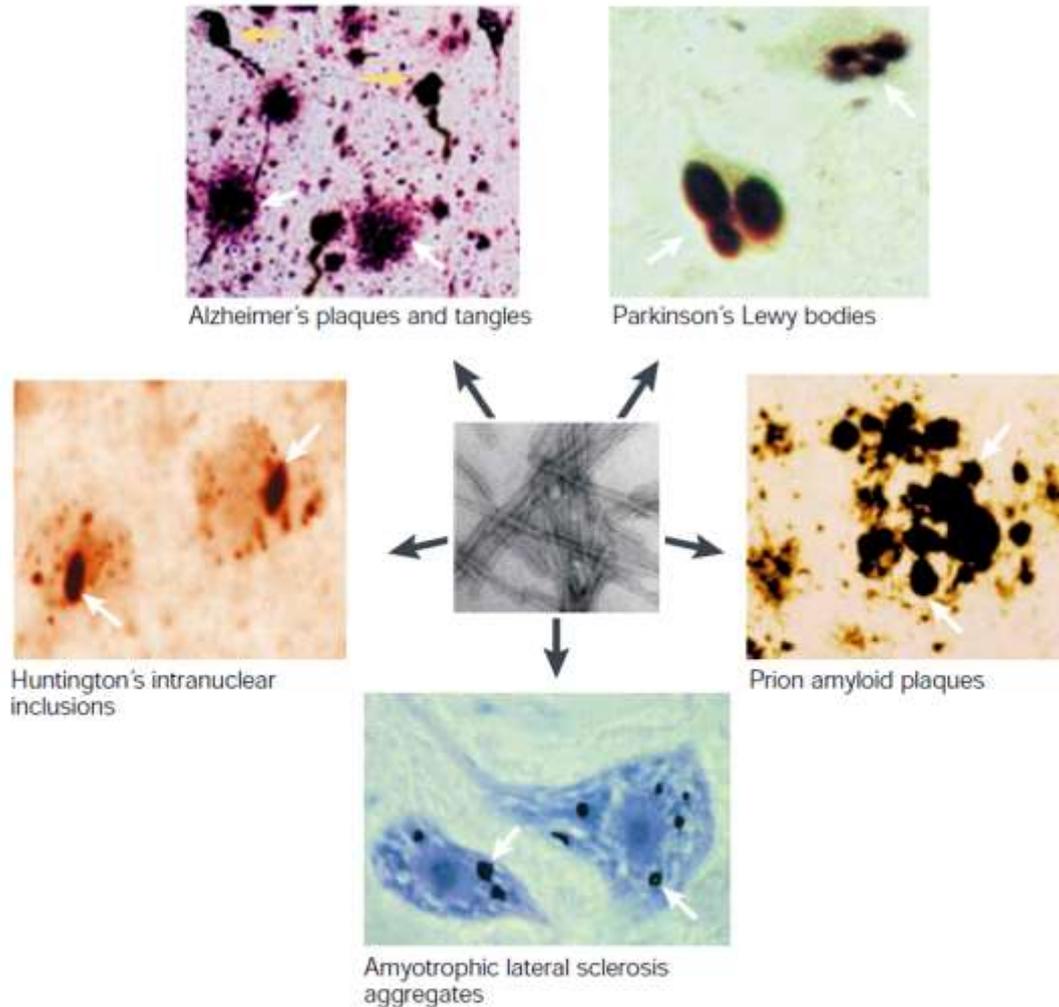
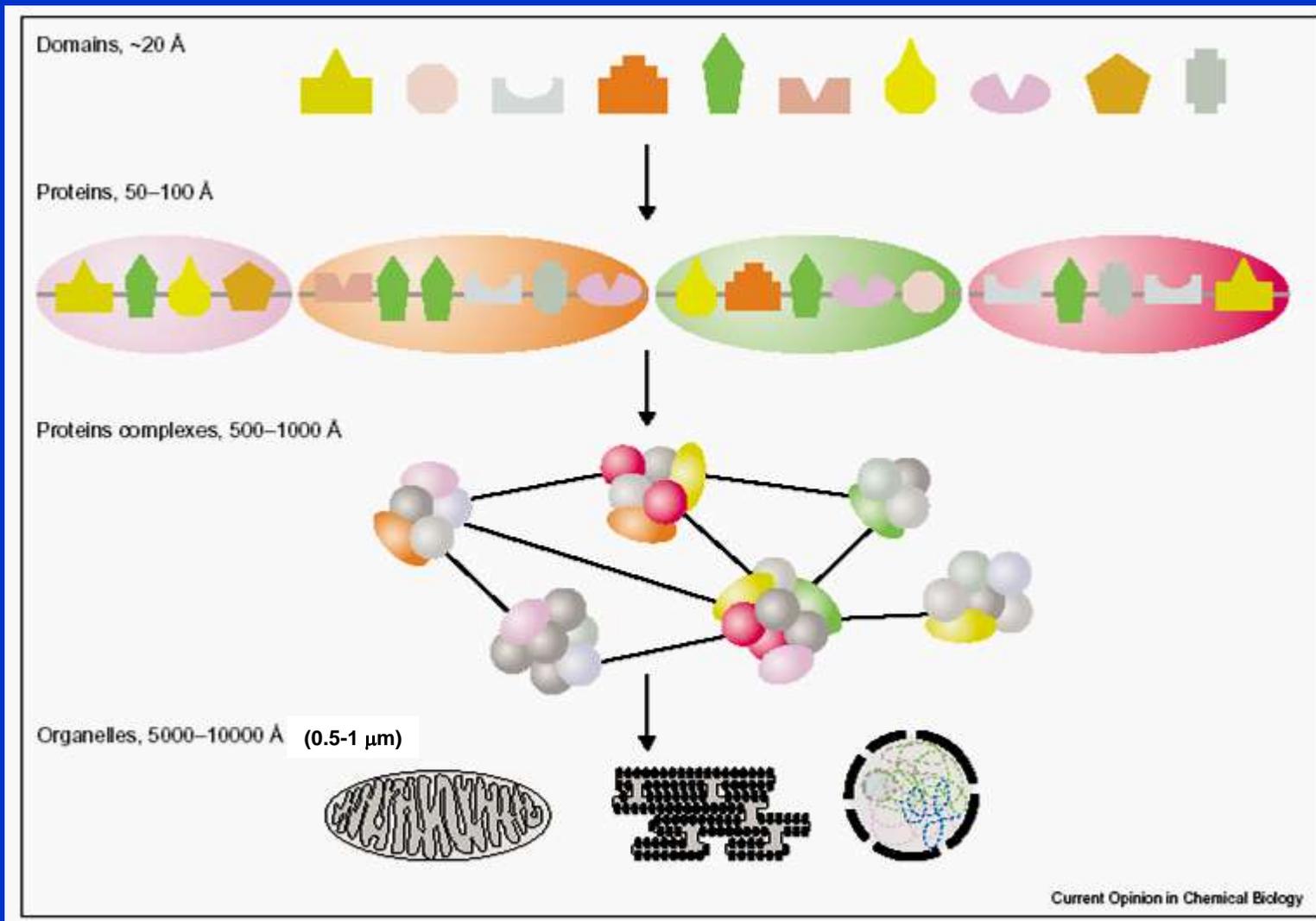


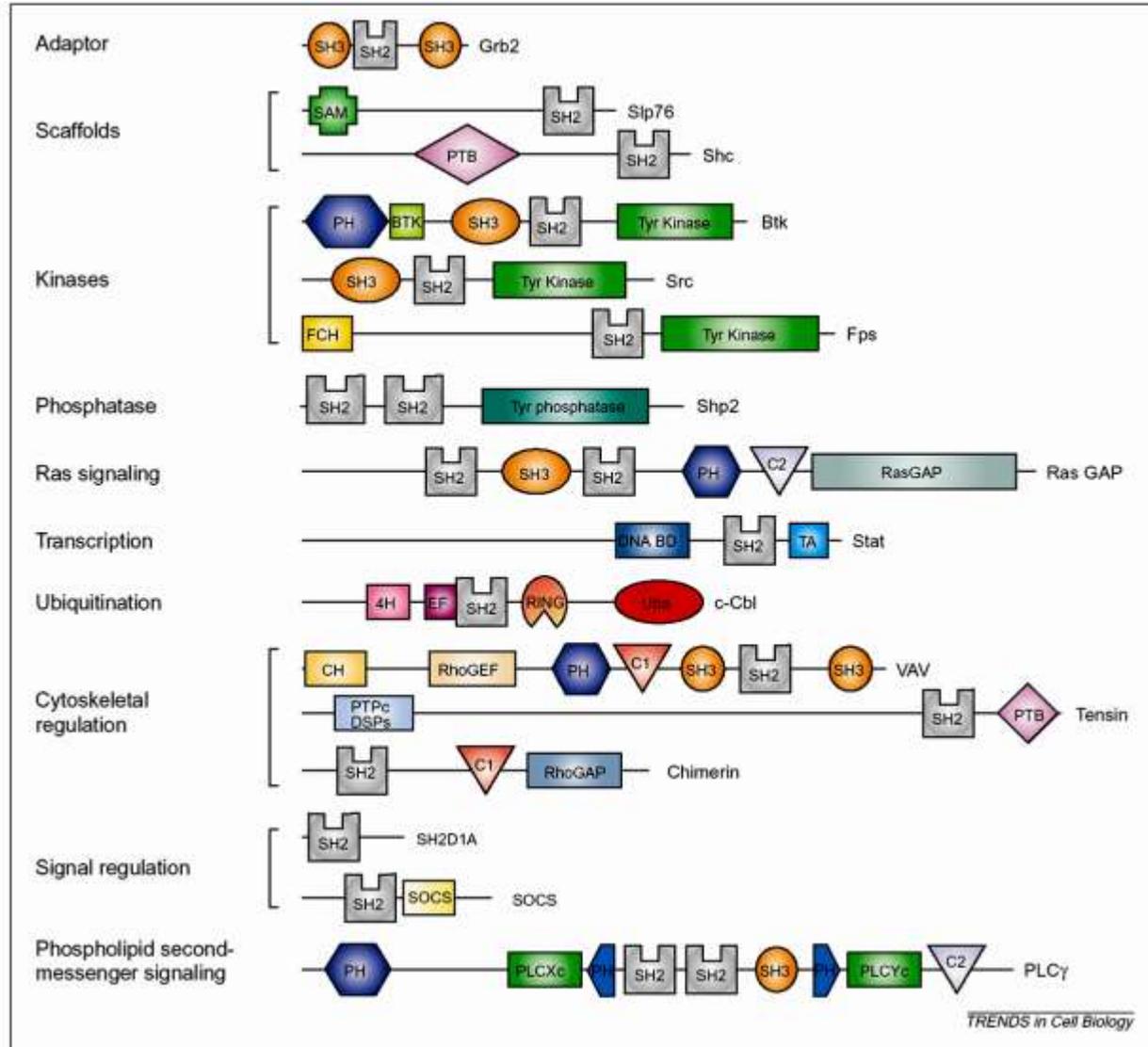
Figure 1 | **Cerebral aggregates in neurodegenerative diseases.** Extracellular amyloid plaques (white arrows) and intracytoplasmic neurofibrillary tangles (yellow arrows) are the pathological signature of Alzheimer's disease. Intracytoplasmic aggregates are typically present in the neurons of people affected by Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. Intranuclear inclusions of huntingtin are observed in Huntington's disease patients and extracellular prion amyloid plaques that are located in different brain regions are present in some cases of transmissible spongiform encephalopathy. In spite of the different protein compositions, the ultrastructure of these deposits seems to be similar and composed mainly of a network of fibrillar polymers (centre).

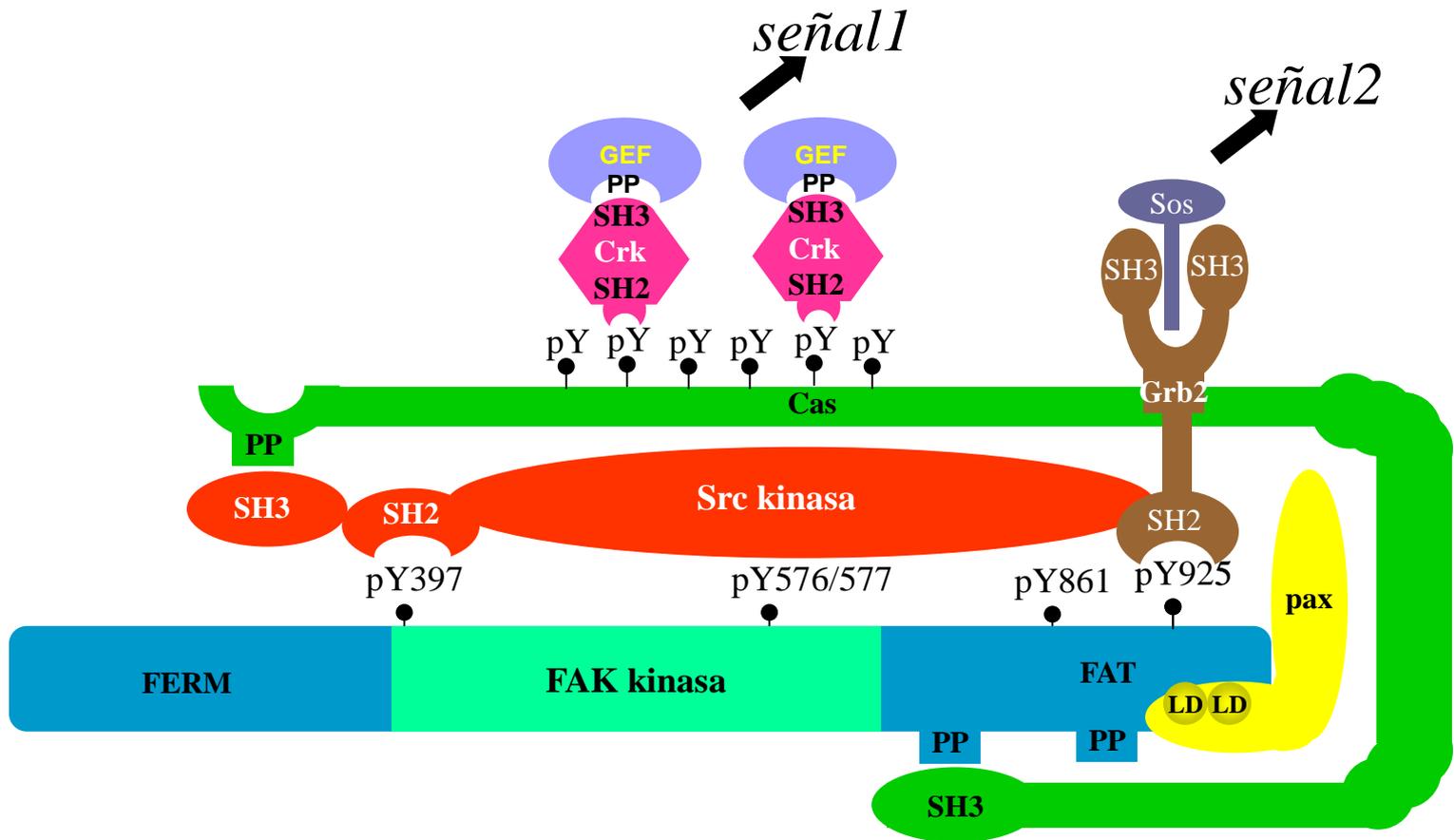
La presencia de agregados proteicos puede visualizarse por histoquímica. Al microscopio electrónico se observa que los agregados forman fibras (*centro*)

Las células exhiben una organización modular



Proteínas de señalización exhiben módulos o dominios que median interacciones con otras proteínas o con membranas





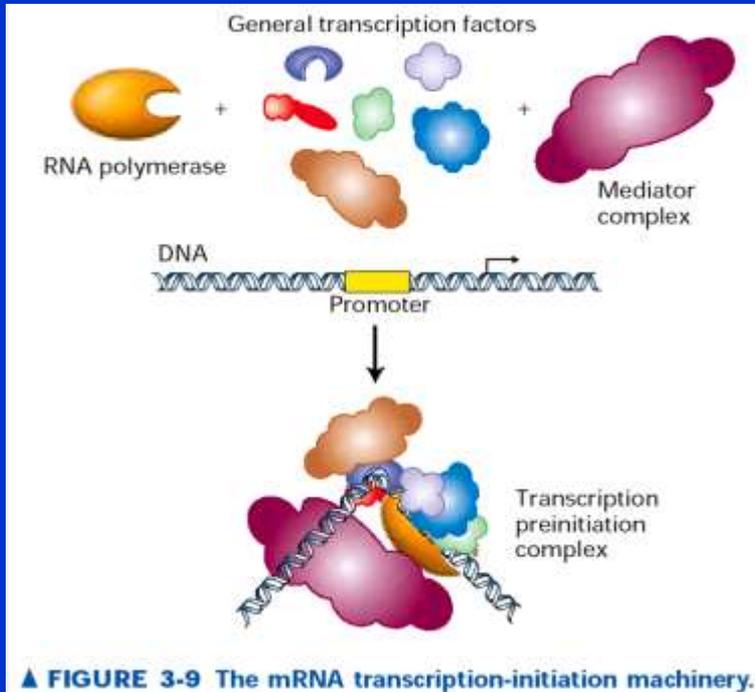
- unión de Grb2
- interacción con Sos

La estabilidad de los complejos o ensamblajes multiproteicos depende de su función

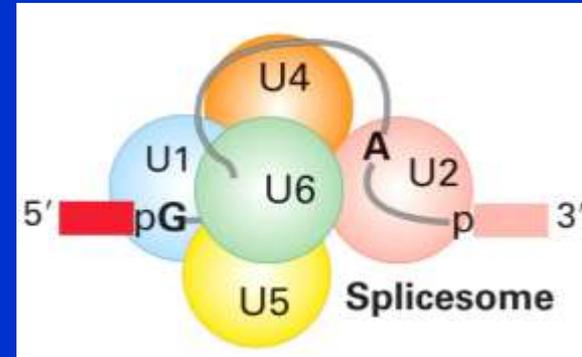
Machine*	Main Components	Cellular Location	Function
Replisome (4)	Helicase, primase, DNA polymerase	Nucleus	DNA replication
Transcription initiation complex (11)	Promoter-binding protein, helicase, general transcription factors (TFs), RNA polymerase, large multisubunit mediator complex	Nucleus	RNA synthesis
Spliceosome (12)	Pre-mRNA, small nuclear RNAs (snRNAs), protein factors	Nucleus	mRNA splicing
Nuclear pore complex (12)	Nucleoporins (50-100)	Nuclear membrane	Nuclear import and export
Ribosome (4)	Ribosomal proteins (>50) and four rRNA molecules (eukaryotes) organized into large and small subunits; associated mRNA and protein factors (IFs, EFs)	Cytoplasm/ER membrane	Protein synthesis
Chaperonin (3)	GroEL, GroES (bacteria)	Cytoplasm, mitochondria, endoplasmic reticulum	Protein folding
Proteasome (3)	Core proteins, regulatory (cap) proteins	Cytoplasm	Protein degradation
Photosystem (8)	Light-harvesting complex (multiple proteins and pigments), reaction center (multisubunit protein with associated pigments and electron carriers)	Thylakoid membrane in plant chloroplasts, plasma membrane of photosynthetic bacteria	Photosynthesis (initial stage)
MAP kinase cascades (14)	Scaffold protein, multiple different protein kinases	Cytoplasm	Signal transduction
Sarcomere (19)	Thick (myosin) filaments, thin (actin) filaments, Z lines, titin/nebulin	Cytoplasm of muscle cells	Contraction

Ejemplos de ensamblajes funcionales multiproteicos

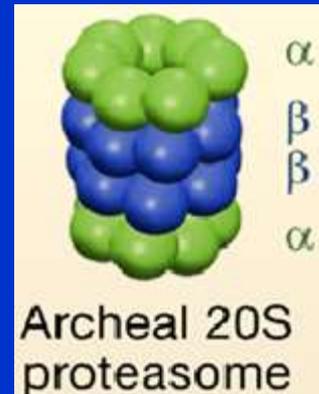
transcripción



eliminación de intrones

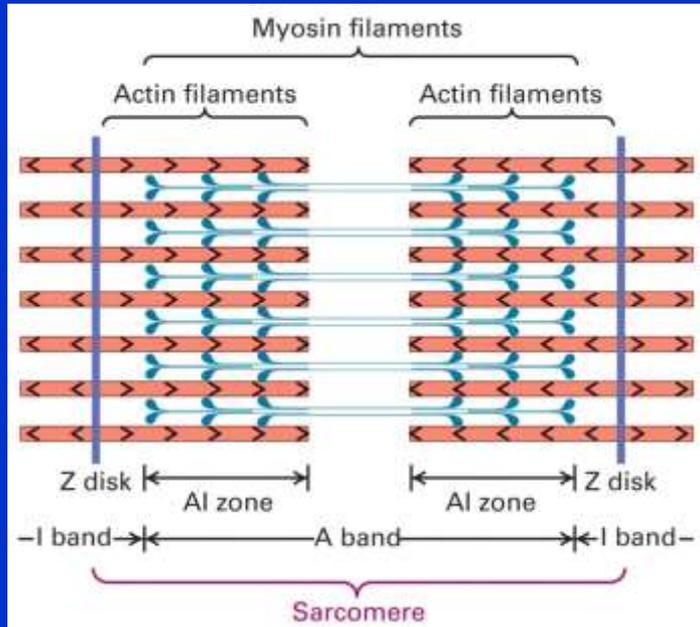


degradación de proteínas

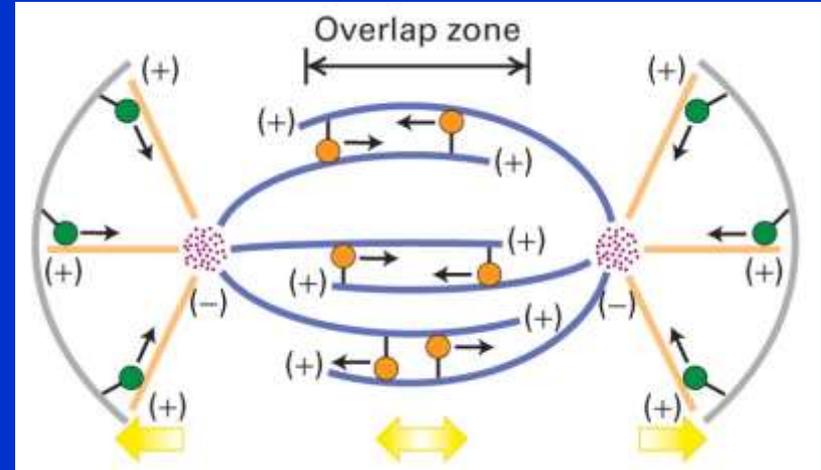


Ejemplos de ensamblajes funcionales multiproteicos

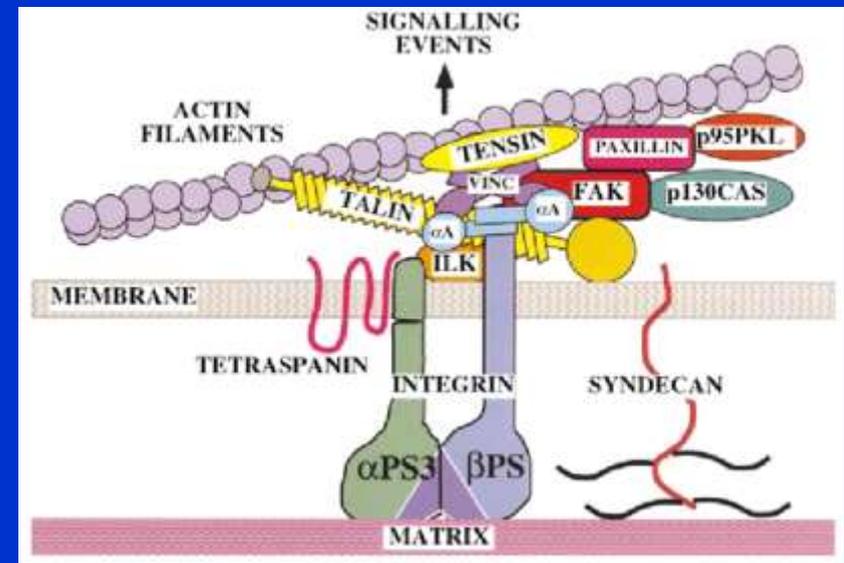
contracción



distribución de cromosomas

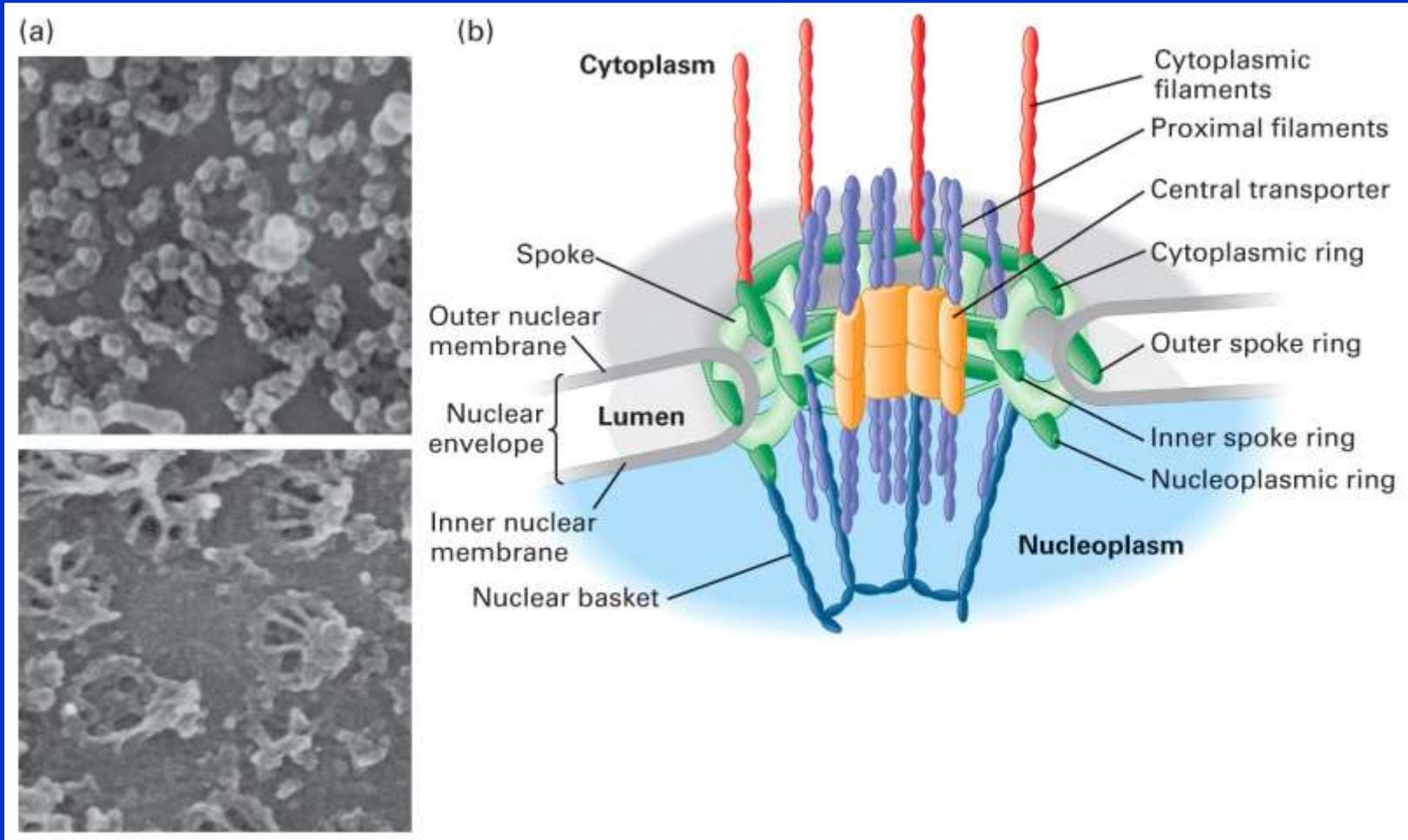


adhesión celular

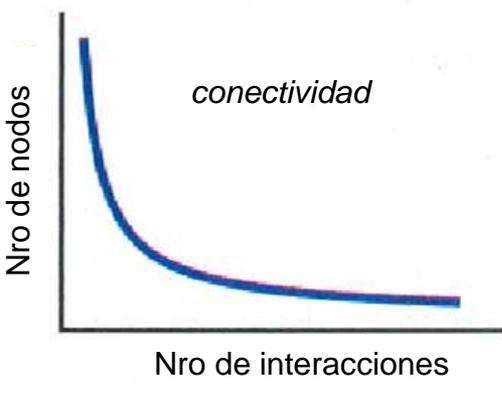


Ejemplos de ensamblajes funcionales multiproteicos

transporte núcleo-citoplásmico

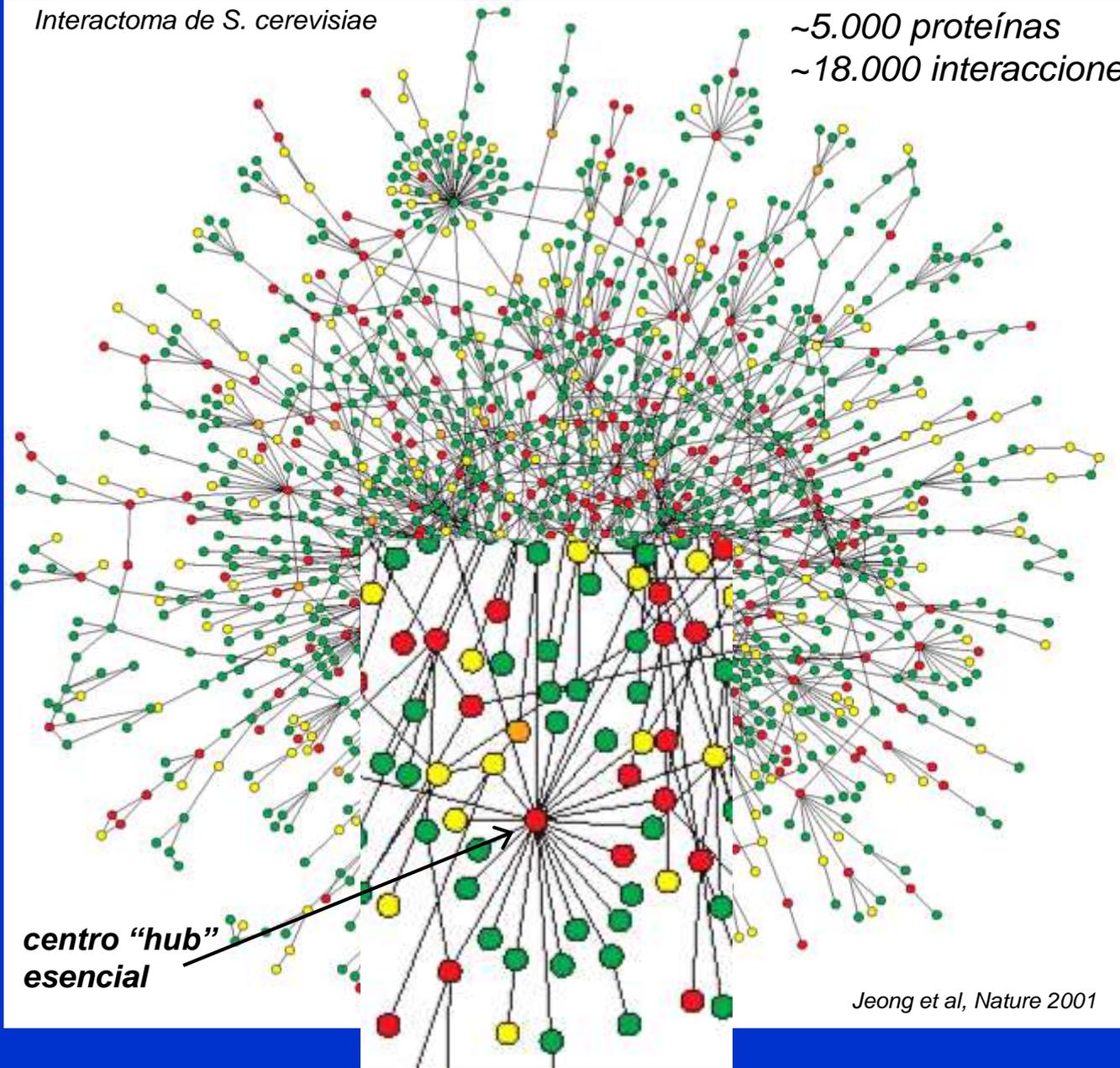


Los interactomas describen las interacciones entre proteínas a nivel global



Interactoma de *S. cerevisiae*

~5.000 proteínas
~18.000 interacciones

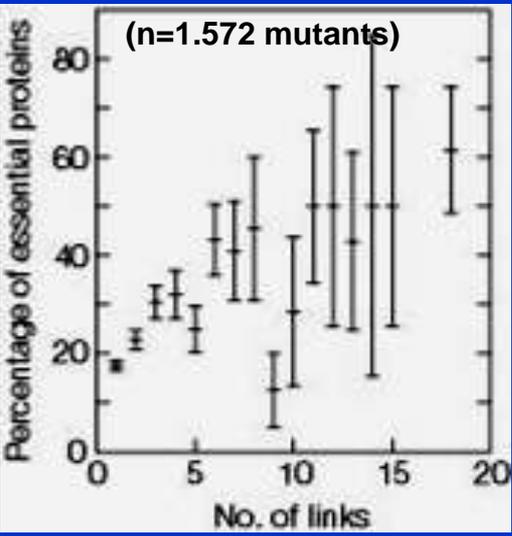


centro "hub"
esencial

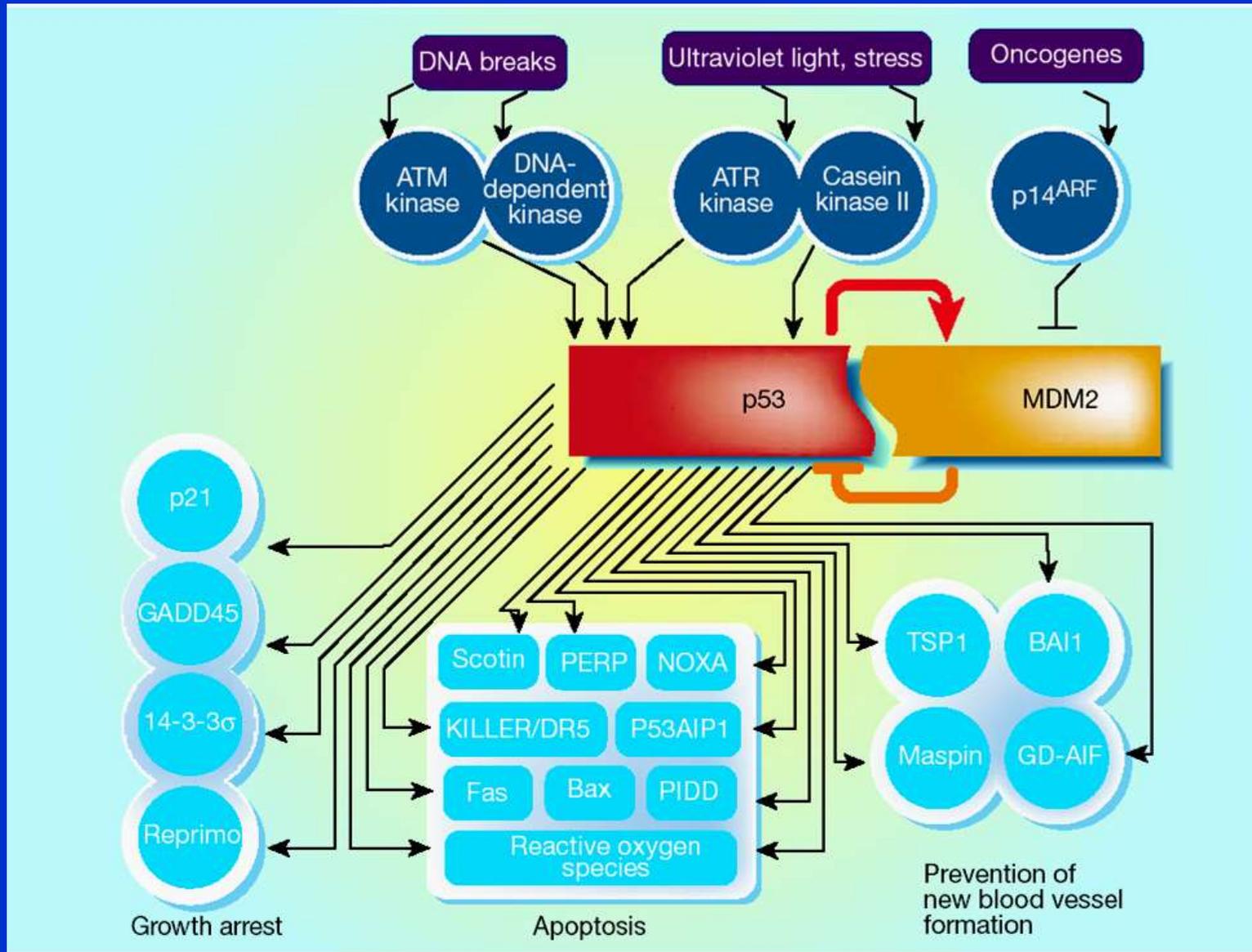
Jeong et al, Nature 2001

ROBUSTEZ

~73% genes de levadura no son esenciales; mutaciones al azar no afectan la topología de la red (Giaever et al, Nature 2002)



P53 es un ejemplo de proteína hiperconectada ("hub")

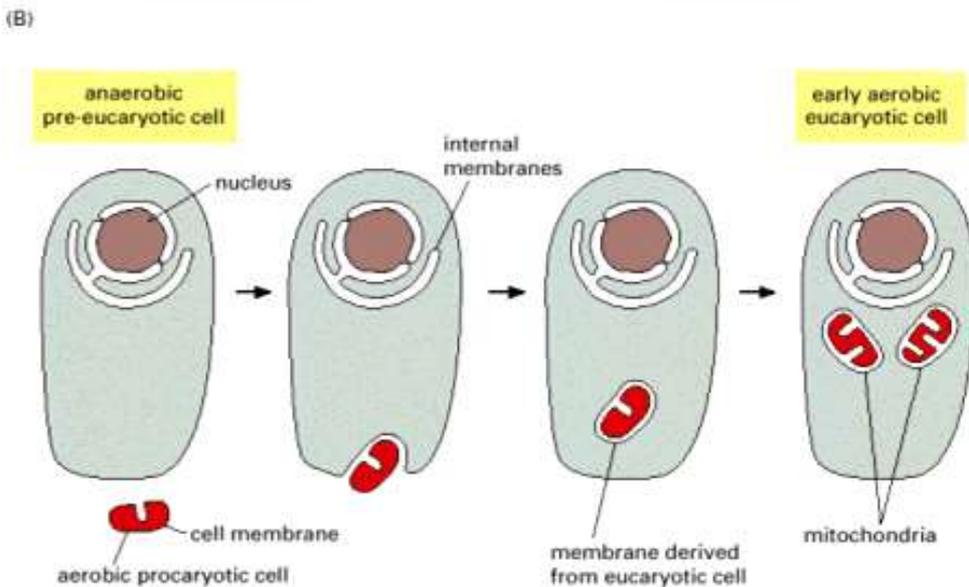
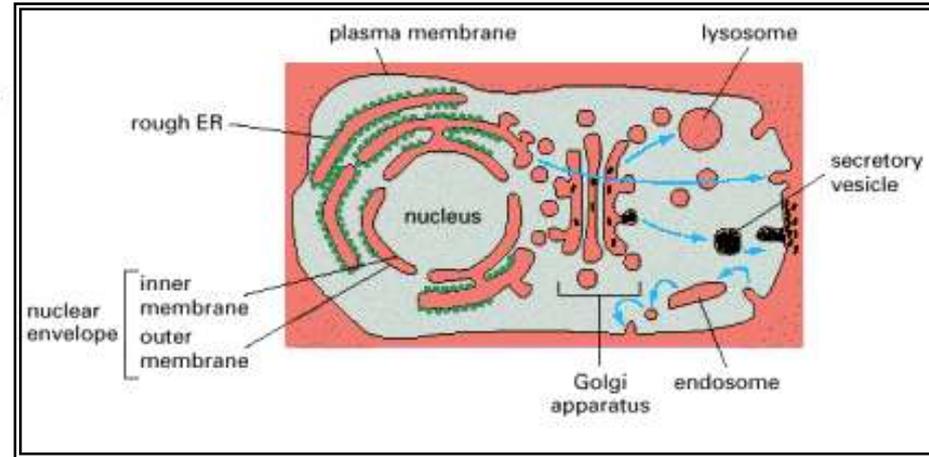
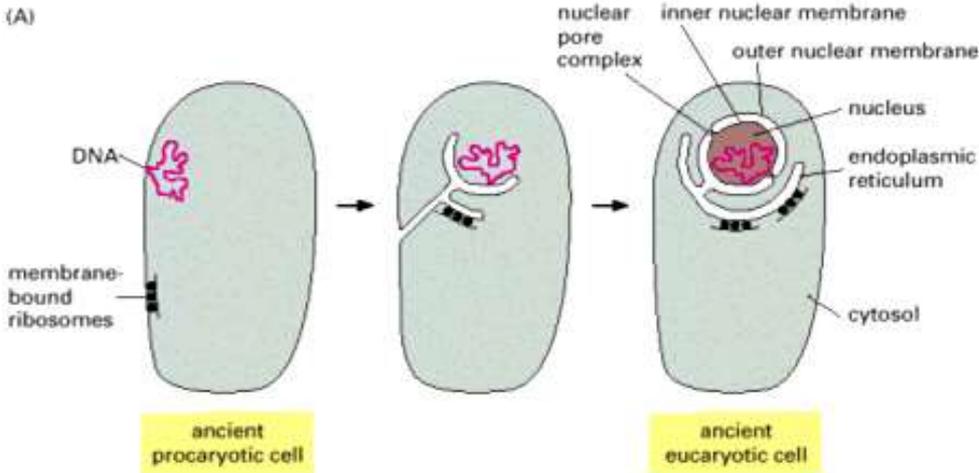


DIP: Database of Interacting Proteins

<http://dip.doe-mbi.ucla.edu>

ORGANISM	PROTEINS	INTERACTIONS
<i>Drosophila melanogaster</i> (fruit fly)	7066	21004
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (baker's yeast)	4920	18272
<i>Escherichia coli</i>	1847	7427
<i>Caenorhabditis elegans</i>	2643	4037
<i>Homo sapiens</i> (Human)	1075	1607
<i>Helicobacter pylori</i>	710	1425
<i>Mus musculus</i> (house mouse)	264	374
<i>Rattus norvegicus</i> (Norway rat)	102	132
Others (153)	814	

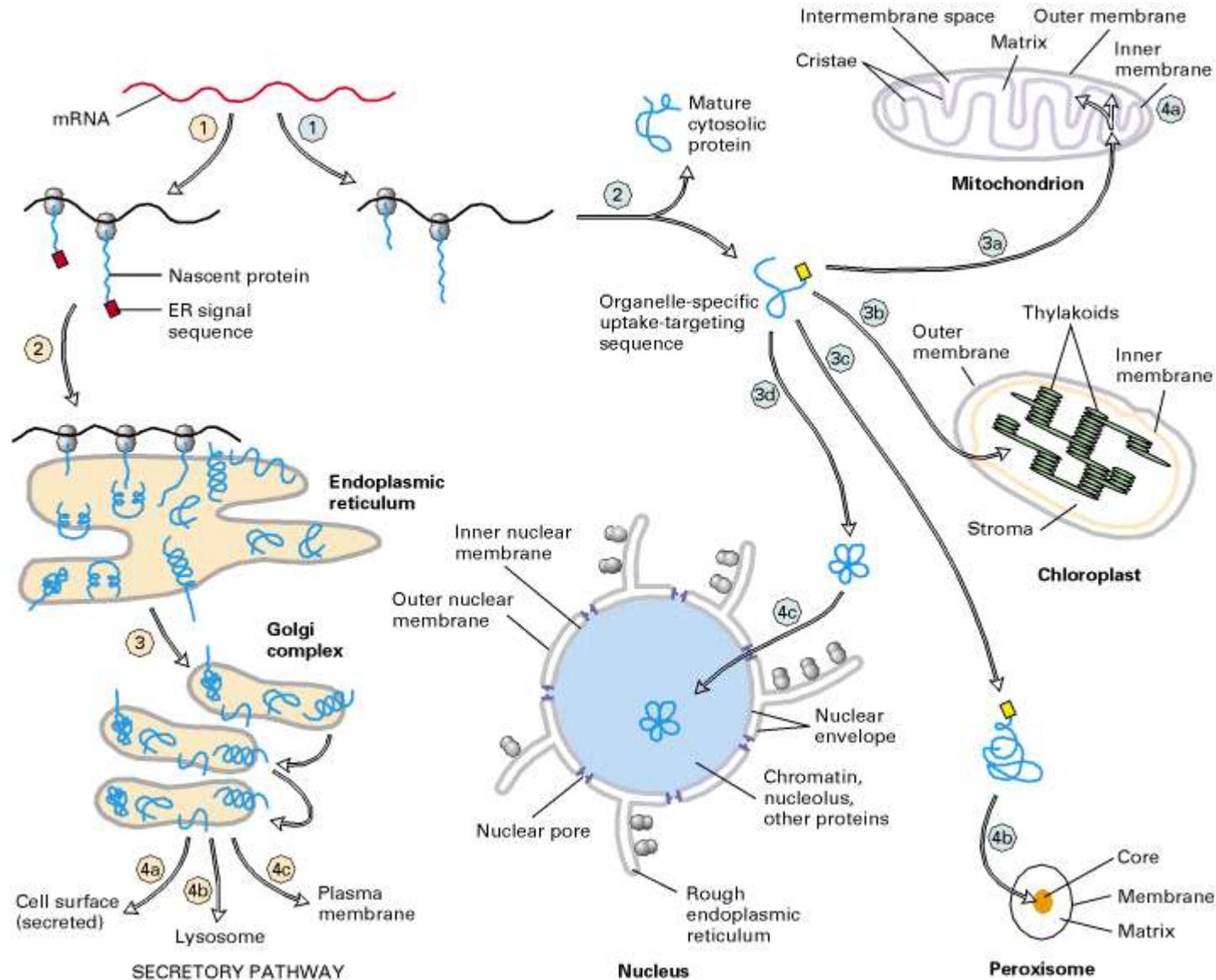
La interacción entre proteínas es restringida por la compartimentalización de la célula



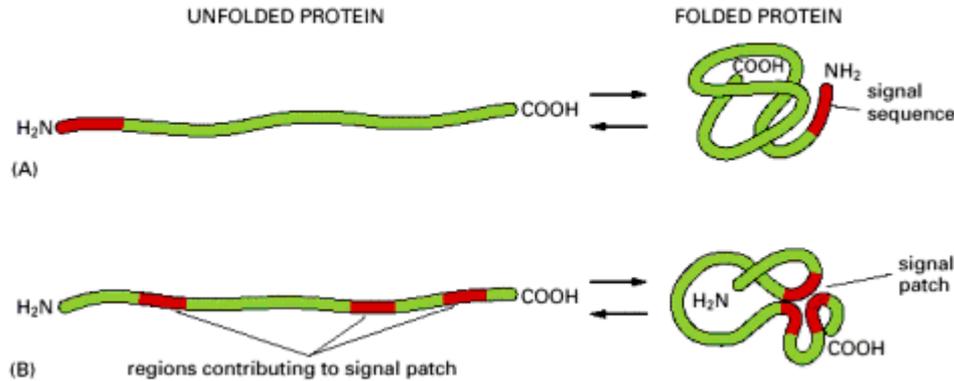
Cuatro compartimientos principales:

- Núcleo y citosol
- organelas de secreción y endocitosis
- mitocondrias
- plastidios

Secuencias específicas determinan la localización de las proteínas en los distintos compartimientos subcelulares



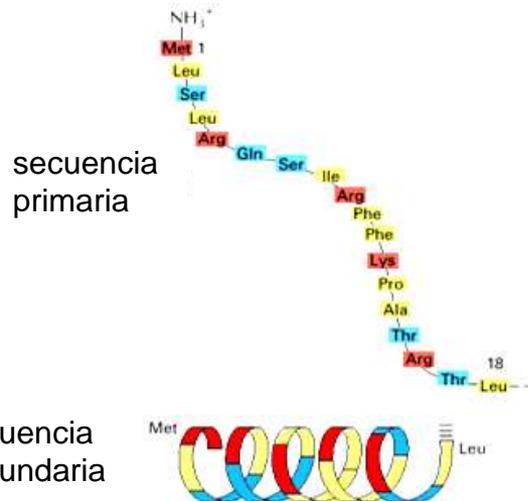
El reconocimiento de las señales de localización depende de características de la secuencia primaria, secundaria o terciaria



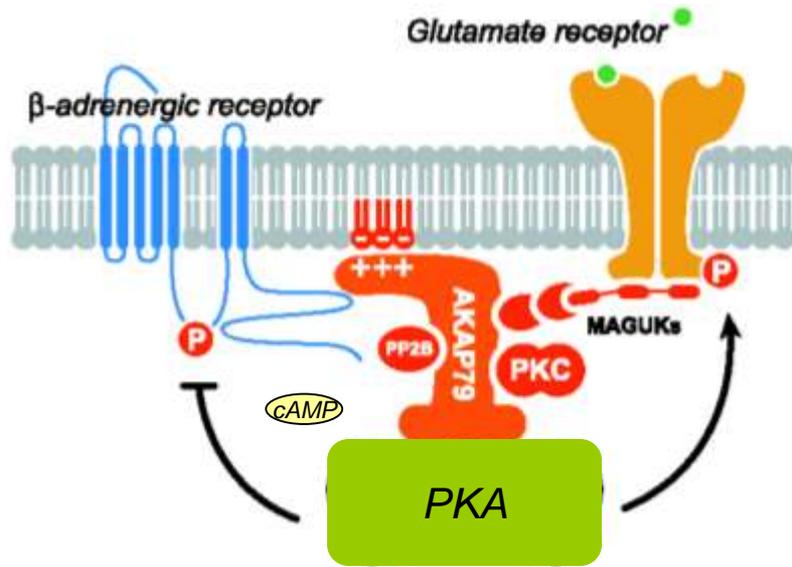
NLS, SKL son reconocidas por su secuencia primaria.

La secuencia señal de proteínas de mitocondrias y del RE depende principalmente de las características de la estructura secundaria.

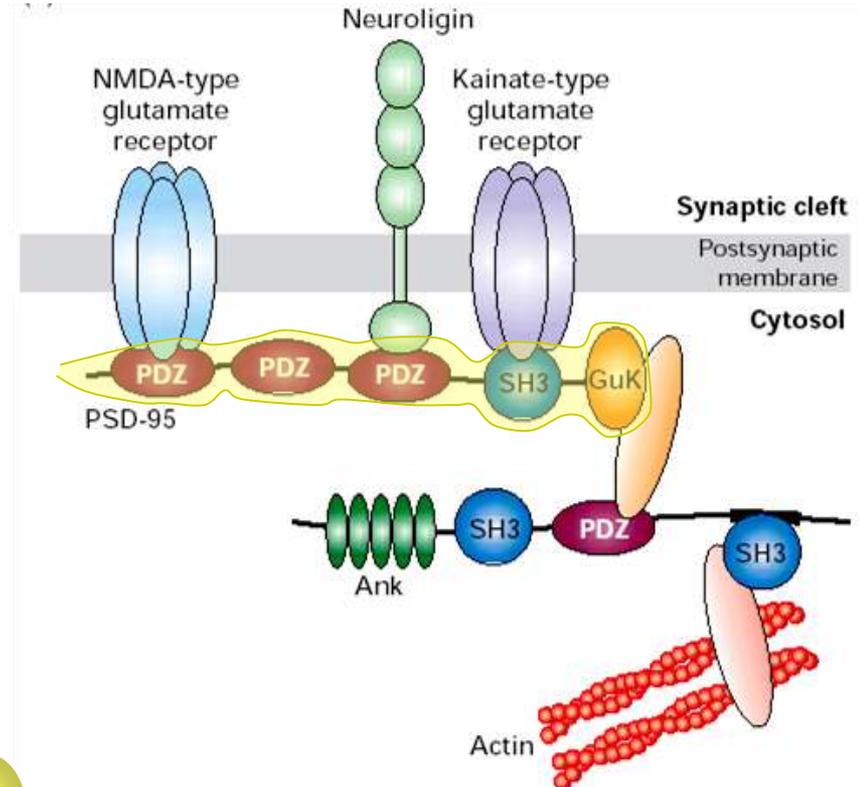
Algunas NLS y la secuencia señal de localización a lisosomas son conformacionales.



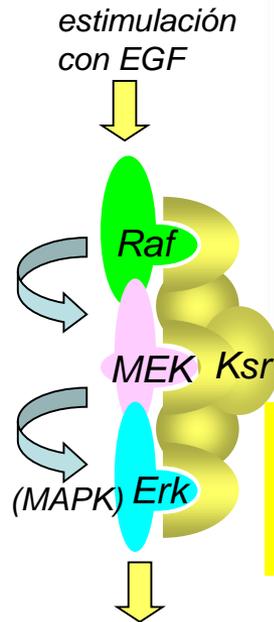
Proteínas "scaffold" multidominio anclan proteínas relacionadas funcionalmente a subcompartimientos celulares



AKAP79 asocia a las enzimas PKA y PKC con diferentes receptores que regulan su actividad en la membrana plasmática.



La proteína **PSD-95** vincula receptores de neurotransmisores con diversas proteínas que organizan la post-sinapsis.



Ksr concentra componentes de la vía de activación de la MAP quinasa Erk

fosforilación de Rsk y TCF. Activación de la proliferación.