

ORGANITZACIÓ DE LA CÈL·LULA
QÜESTIONS I PROBLEMES

Professor: Francisco Pérez Sánchez

Grau en Bioquímica i Ciències Biomèdiques

Facultat de Ciències Biològiques

Aquesta col·lecció de qüestions i problemes ha sigut elaborada amb l'objectiu de complementar els continguts del temari de l'assignatura Organització de la Cèl·lula, de segon curs del grau en Bioquímica i Ciències Biomèdiques de la Universitat de València. A més de revisar i completar els coneixements impartits en les classes teòriques, servirà a l'estudiant per a desenvolupar la capacitat de fer-ne ús en diferents situacions experimentals i entendre així com s'apliquen en el context de la investigació bàsica i la seua aplicació en biomedicina. Per a fer-ho, a vegades haurà de rellegir determinats apartats dels llibres de text recomanats, però parant atenció a aspectes concrets; en altres ocasions, haurà de documentar-se utilitzant altres fonts bibliogràfiques, i també serà de gran ajuda la cooperació amb altres companys per a intercanviar punts de vista. Durant les sessions presencials de *Qüestions i problemes*, el professor seleccionarà algunes de les qüestions més representatives o de major dificultat de cada tema (les respostes de les quals no s'inclouen en aquesta col·lecció) per a discutir amb els estudiants. L'estudiant també podrà utilitzar les tutories amb el professor, individualment o en grup, per a aclarir els dubtes.

Per a l'elaboració d'aquesta col·lecció d'activitats, s'han utilitzat materials originals o modificats procedents de:

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. i Walter, P. (2010). *Biología Molecular de la Célula*. 5a ed. Omega.

Wilson, J. i Hunt, T. (2010). *Biología Molecular de la Célula*. 5a ed. Libro de problemas. Omega.

Becker, W. M.; Kleinsmith, L. J.; Hardin, J. i Bertoni, G. P. (2008). *The World of the Cell*. 7a ed. Pearson / Benjamin Cummings.

Altres activitats han sigut elaborades pel professor de l'assignatura; quan aquestes han sigut inspirades per investigacions d'altres autors, se citen les publicacions científiques en què estan basades.

Francisco Pérez Sánchez

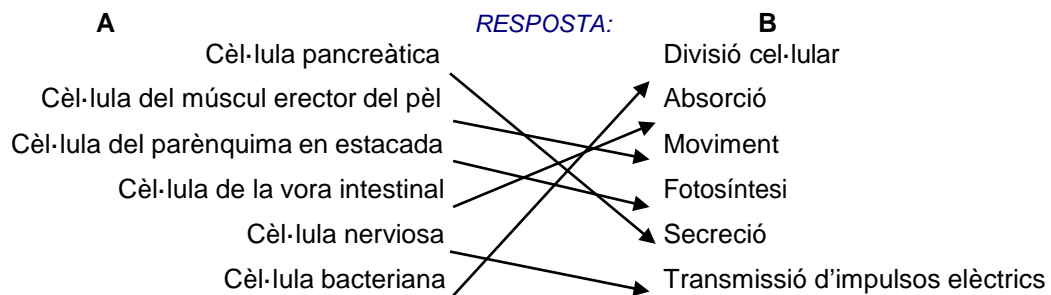
Departament de Biologia Cel·lular,
Biologia Funcional i Antropologia Física

TEMA 1. BIOLOGIA CEL·LULAR: FONAMENTS I TÈCNIQUES D'ESTUDI

1.1. Procariotes i eucariotes. Assenyala quins dels enunciats següents són vertaders i quins són falsos. En aquests últims, canvia la frase per a fer-la certa.

- La majoria de les cèl·lules eucariotes són més grans que les procariotes.
- Algunes cèl·lules són prou grans per a ser observables a simple vista.
- Les cèl·lules procariotes manquen dels elements següents: mitocondris, nucli envoltat de membrana, membrana plasmàtica i microtúbuls.
- La relació àrea/volum és generalment major en les cèl·lules procariotes que en leucariotes.
- Els ribosomes mitocondrials de les cèl·lules musculars s'assemblen més als dels bacteris de l'intestí que als del citosol de les mateixes cèl·lules musculars.
- Atès que els procariotes no tenen ni mitocondris ni cloroplastos, no poden dur a terme ni la síntesi de ATP, ni la fotosíntesi.

1.2. Especialitzacions cel·lulars. Cadascun dels tipus cel·lulars indicats més avall és un bon exemple d'especialització funcional. Uneix les cèl·lules de la columna A amb les funcions apropiades de la columna B, i explica la teua elecció.



1.3. Estructures cel·lulars. Indica quines de les estructures o quins dels components cel·lulars següents apareixen en cèl·lules animals, en bacteris i/o en cèl·lules vegetals.

- | | |
|----------------------|-----------------------|
| a) Cloroplastos | h) Complex de Golgi |
| b) Paret cel·lular | i) Vacúol |
| c) Microtúbuls | j) Tilacoïdes |
| d) DNA | k) Ribosomes |
| e) Embolcall nuclear | l) Bicapès lipídiques |
| f) Nuclèol | m) Actina |
| g) Centríols | n) Mitocondris |

1.4. Qüestió de grandàries. *Escherichia coli*, una cèl·lula bacteriana típica, té forma cilíndrica amb un diàmetre al voltant d'1 μm i una longitud al voltant de 2 μm . Com a exemple de cèl·lula animal típica considerarem una cèl·lula de fetge humà, l'hepatòcit, que té forma aproximadament esfèrica amb un diàmetre d'uns 20 μm . Com a cèl·lula vegetal típica considerarem les cèl·lules columnars del parènquima en estacada localitzades immediatament per davall de la superfície del feix de les fulles de moltes plantes. Aquestes cèl·lules tenen forma cilíndrica, amb un diàmetre d'uns 20 μm i una longitud aproximada de 35 μm .

Calcula el volum aproximat de cadascun d'aquests tres tipus cel·lulars (recorda que $V = \pi r^2 h$ per a un cilindre i que $V = 4\pi r^3/3$ per a una esfera).

R: bacteri 1,57 μm^3 ; hepatòcit 4.200 μm^3 ; cèl·lula de parènquima 11.000 μm^3

Quantes cèl·lules bacterianes podrien cabre aproximadament a l'interior d'una cèl·lula hepàtica humana? R: 2.700 bacteris

I quants ribosomes hi cabrien, tenint en compte que un ribosoma humà, de forma quasi esfèrica, té un diàmetre aproximat de 30 nm? R: 297 x 10⁶ ribosomes

Quantes cèl·lules hepàtiques humanes podrien cabre dins d'una cèl·lula del parènquima en estacada? R: 2,62 cèl·lules

I en un cm^3 de fetge? R: 2,38 x 10⁶ cèl·lules

EQUIVALÈNCIES:

1 cm ($\times 10$) mm ($\times 10^3$) μm ($\times 10^3$) nm

1 cm^2 ($\times 10^2$) mm^2 ($\times 10^6$) μm^2 ($\times 10^6$) nm^2

1 cm^3 ($\times 10^3$) mm^3 ($\times 10^9$) μm^3 ($\times 10^9$) nm^3

1.5. Compartimentació cel·lular. Indica si les afirmacions següents són vertaderes o falses. En cas de ser falses, explica per què.

- Les membranes internes de la cèl·lula la divideixen en compartiments funcionalment diferents, els límits dels quals són marcats per membranes impermeables.
- En termes d'àrea i de massa, la membrana plasmàtica constitueix només una petita fracció de les membranes de la majoria de cèl·lules eucariotes.
- L'interior del nucli i el lumen del reticle endoplasmàtic són topològicament equivalents a l'exterior cel·lular.
- Els espais luminals d'aquells orgànuls que es comuniquen entre si mitjançant vesícules membranoses són topològicament equivalents entre si, i també amb l'exterior cel·lular.

1.6. Relaciona les definicions següents amb el terme adequat de la llista que segueix més avall:

- Tipus de microscopi que emprava un feix d'electrons per a crear una imatge.
R: microscopi electrònic
- Tipus de microscopi que produeix una imatge de la superfície d'un objecte.
R: microscopi electrònic d'escombratge
- Proteïna fluorescent (de medusa) àmpliament emprada com a marcador per a observar el moviment de proteïnes en cèl·lules vives.
R: proteïna fluorescent verda (GFP)
- Separació mínima que hi ha d'haver entre dos objectes perquè semblen diferents sota el microscopi.
R: límit de resolució

- e) Compost que, conjugat amb un anticòs, permet visualitzar-lo a nivell cel·lular mitjançant microscòpia de camp clar.
R: cromòfor
- f) Tipus de microscopi que proporciona imatges molt nítides dels marcatges cel·lulars amb immunofluorescència en il·luminar mitjançant un feix làser un únic pla horitzontal de la mostra.
R: microscopi confocal
- g) Tipus de microscopi òptic que permet observar cèl·lules vives mitjançant la manipulació de les propietats ondulatòries de la llum.
R: microscopi de contrast interdiferecial
- h) Propietat d'una estructura cel·lular que permet la visualització d'aquesta mitjançant un microscopi electrònic de transmissió.
R: electrodensitat
- i) Tècnica de microscòpia electrònica en la qual les estructures cel·lulars o molècules d'interès es marquen amb anticossos units a partícules d'or electrodenses que es veuen com a punts negres en la imatge.
R: microscòpia immunoelectrònica amb or col·loidal

microscopi electrònic d'escombratge	límit de resolució
fluoròfor	electrodensitat
proteïna fluorescent verda (GFP)	microscopi de contrast interdiferecial
microscopi confocal	microscòpia immunoelectrònica amb or col·loidal
microscopi electrònic	fotoblanqueig mitjançant làser
cromòfor	microscopi invertit
antigen	fotoactivació

1.7. Comença la teua activitat investigadora. Imagina que obtens una beca per a participar com a col·laborador en pràctiques en una investigació sobre una malaltia rara que afecta greument el fetge d'alguns xiquets. L'equip d'investigació centra els seus treballs en els lisosomes, ja que han trobat que dues mutacions que afecten enzims d'aquests orgànuls són les responsables de quatre dels casos d'estudi. No obstant això, en un individu nouat sospiten que la causa de la malaltia podria estar en els mitocondris dels hepatòcits. Després de fer una biòpsia del fetge, t'encarreguen realitzar els primers estudis prospectius. Indica quin tipus de microscòpia i quin tipus de marcatge utilitzaries amb les finalitats següents:

- Determinar el nombre mitjà de mitocondris per hepatòcit.
- Determinar la fracció del volum cel·lular ocupat pels mitocondris.
- Determinar el nombre mitjà de crestes presents en els mitocondris.
- Comprovar quina és la distribució de les proteïnes transportadores MIT33 i MIT44 en les membranes mitocondrials.

TEMA 2. LA MEMBRANA CEL·LULAR

2.1. Relaciona les definicions següents amb el terme adequat de la llista que segueix més avall:

- a) Fosfolípid de localització exclusiva en la capa interna de la bicapa lipídica, la detecció de la qual és utilitzada com a sistema de detecció d'un procés incipient de mort cel·lular apoptòtica.
R: fosfatidilserina
- b) Descriu una molècula apolar o part d'una molècula que no pot formar interaccions energèticament favorables amb les molècules d'aigua i que, per tant, no es dissol en aigua.
R: hidrofòbic
- c) Petita regió de la membrana plasmàtica enriquida en esfingolípid i colesterol.
R: microdomini de membrana
- d) Glucolípid que tenen un o més residus d'àcid siàlic en la seua estructura; especialment abundants en la membrana plasmàtica de les neurones.
R: gangliòsids
- e) Que té regions hidrofòbiques i hidrofíliques, com un fosfolípid o una molècula de detergent.
R: amfifílic
- f) El principal tipus de fosfolípid de les membranes de les cèl·lules animals, amb dos àcids grassos i un cap polar unit a un esquelet de glicerol de tres carbonis.
R: fosfoglicèrid
- g) Molècula lipídica amb una estructura esteroide de quatre anells que és un component important de les membranes plasmàtiques de les cèl·lules animals.
R: colesterol

amfifílic	colesterol
fosfolípid	cerebròsids
hidrofòbic	hemimembrana
gangliòsids	microdomini de membrana (<i>lipid raft</i>)
glicocàlix	fosfoglicèrid
gota lipídica	fosfatidilserina
glucolípid	hidrofílic

2.2. Descobriments sobre l'estructura de la membrana cel·lular. Cadascuna de les observacions següents va contribuir a millorar el nostre coneixement sobre l'estructura de la membrana. Explica el significat de cadascuna.

- a) Quan s'observa una membrana al microscopi electrònic, les dues línies fines i electrodenses tenen una grossària aproximada de 2 nm, encara que sovint és possible distingir que no són idèntiques.
R: Evidència de l'asimetria de la membrana.
- b) L'etilurea penetra molt més fàcilment en una membrana que la urea, i la dietilurea hi penetra encara amb major facilitat.
R: La permeabilitat de la membrana està relacionada amb el caràcter apolar d'aquesta.
- c) En afegir fosfolipasa a una cèl·lula viva, es produeix una digestió ràpida de la bicapa lipídica de les seues membranes, la qual cosa suggereix que aquest enzim té accés als fosfolípids de la membrana.
R: La superfície de bicapa lipídica no està recoberta completament per proteïnes.

- d) Quan se sotmeten bicapes lipídiques artificials a una anàlisi amb criofractura, no s'observen partícules en cap de les cares de la criofractura.

R: Aquestes partícules, quan són observades en les membranes biològiques, corresponen a proteïnes integrals.

- e) La resistivitat elèctrica de les bicapes lipídiques artificials és diversos ordres de magnitud major que la de les membranes reals.

R: Les membranes reals són més complexes que les bicapes lipídiques.

- f) Algunes proteïnes de membrana s'extrauen amb facilitat amb NaCl 1M, mentre que d'altres requereixen l'ús d'un solvent orgànic o d'un detergent.

R: Hi ha dues classes de proteïnes de membrana, diferents en la seua localització en la membrana i/o en la seua afinitat per un medi aquós.

- g) Quan els halobacteris creixen en absència d'oxigen, produeixen un pigment porpra que s'inclou en la seua membrana plasmàtica i que té la capacitat de bombar protons cap a l'exterior cel·lular quan s'il·lumina. Si les membranes porpra són aïllades, es realitza una criofractura i s'estudien al microscopi electrònic; s'hi observen taques de partícules cristal·lines.

R: El bombar de protons impulsat per la llum és dut a terme per un complex proteic relativament simple; a més, el seu estat cristal·lí va permetre la seua anàlisi de difracció d'electrons, la qual cosa va permetre per primera vegada entendre com una proteïna de membrana es disposa en la bicapa lipídica.

2.3. Vertader o Fals? Explica per què.

- a) Encara que les molècules lipídiques puguen difondre lliurement en el pla de la bicapa, no poden passar de l'un a l'altre costat d'aquesta llevat que en la membrana hi haja catalitzadors enzimàtics denominats translocadors de fosfolípids.

R: Vertader. L'interior hidrofòbic de la bicapa lipídica actua com una barrera per al pas dels grups hidrofílics del cap dels lípids que es produeix durant un *flip-flop*. El cost energètic d'aquest desplaçament impedeix de forma efectiva el *flip-flop* espontani dels lípids, de manera que aquest es produeix en raríssimes ocasions en absència de catalitzadors específics coneguts com a translocadors de fosfolípids.

- b) Tots els fosfolípids més comuns —fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina i esfingomielina— són portadors d'una fracció carregada positivament al seu cap polar, però cap d'aquests té una càrrega neta positiva.

R: Vertader. En tots els casos, les parts carregades positivament s'equilibren amb la càrrega negativa del grup fosfat; així, cap dels fosfolípids comuns té una càrrega neta positiva.

- c) Els glucolípid mai es troben en la cara citoplasmàtica de les membranes de les cèl·lules vives.

R: Vertader. Els glucolípid se sintetitzen en el lumen del complex de Golgi, que és topològicament equivalent a l'exterior cel·lular, i no poden fer *flip-flop* a través de la bicapa.

2.4. Membranes marcianes. Imagina que en una expedició recent a Mart s'ha descobert un organisme unicel·lular que és capaç de viure en benzè, un líquid apolar. La cèl·lula té una bicapa lipídica formada per fosfolípids, però la seua estructura és molt diferent de la que hi ha en les nostres cèl·lules.

- a) Especula sobre la possible estructura d'aquest nou tipus de membrana biològica.
b) Quines propietats tindrien les proteïnes que formarien part d'aquestes membranes?

2.5. Paradoxes de la ciència: els experiments de Görter i Grendel. Les conclusions d'aquests investigadors sobre el fet que la membrana plasmàtica de l'eritròcit humà consistia en una bicapa lipídica es van basar en les observacions següents: (i) els lípids que van extraure amb acetona a partir de $4,74 \times 10^9$ eritròcits formaven una monocapa amb una àrea de $0,89 \text{ m}^2$ que s'expandia en una superfície aquosa; (ii) l'àrea superficial d'un eritròcit era de $100 \text{ }\mu\text{m}^2$ aproximadament, segons les seues mesures.

- a) Demostra a partir d'aquestes dades com van arribar a la conclusió que la membrana de l'eritròcit és una bicapa.

R: Si els lípids de $4,74 \times 10^9$ eritròcits ocupen una àrea de $0,89 \text{ m}^2 (= 0,89 \times 10^{12} \text{ }\mu\text{m}^2)$, això significa que en cada cèl·lula l'àrea d'una monocapa és de $0,89 \times 10^{12} / 4,74 \times 10^9 = 188 \text{ }\mu\text{m}^2$. Això és aproximadament el doble de la superfície d'un eritròcit estimada per Görter i Grendel, amb la qual cosa, es conclou que la superfície de cada cèl·lula està recoberta per dues capes (una bicapa) de lípids.

- b) Ara sabem que l'àrea superficial de l'eritròcit humà és en realitat de $145 \text{ }\mu\text{m}^2$ aproximadament. Suggereix una possible explicació al fet que Görter i Grendel pogueren arribar a la conclusió correcta tot i que la seua estimació de l'àrea dels eritròcits era errònia.

R: Hui sabem que la tècnica d'extracció utilitzada per Görter i Grendel no era quantitativa, la qual cosa els va fer subestimar la quantitat de lípids per cèl·lula. Realment, van extraure tan sols dos terços dels lípids totals dels eritròcits, per la qual cosa el seu error va ser de la mateixa dimensió que el que es va cometre en l'estimació de la superfície dels eritròcits. Així, van obtenir una conclusió certa a partir de dades errònies.

2.6. La grandària importa. Sabem que cada grup metil ($-\text{CH}_2-$) d'una cadena hidrocarbonada lineal allarga la longitud de la cadena aproximadament $0,13 \text{ nm}$. A partir d'estudis sobre estructura de proteïnes, sabem, a més, que una volta d'una hèlix- α inclou 3,6 residus d'aminoàcids i estén l'eix major de l'hèlix aproximadament $0,56 \text{ nm}$. Utilitza aquesta informació per a contestar el següent:

- a) Quant mesura una única molècula d'àcid palmític (16 àtoms de carboni) en la seua forma completament estesa?; i una molècula d'àcid làuric (12C)?; i una altra d'àcid araquidònic (20C)?

R: Palmític: $16 \times 0,13 \text{ nm} = 2,08 \text{ nm}$; làuric: $12 \times 0,13 \text{ nm} = 1,56 \text{ nm}$; araquidònic: $20 \times 0,13 \text{ nm} = 2,6 \text{ nm}$

- b) L'interior hidrofòbic d'una membrana típica té una grossària de 4-5 nm. Quin seria el gruix si s'enfronten dues molècules d'àcid palmític? I si foren d'àcid làuric o d'àcid araquidònic?

R: Palmític: $4,16 \text{ nm}$; làuric: $3,12 \text{ nm}$; araquidònic: $5,2 \text{ nm}$

L'àcid làuric és massa curt per a abastar l'interior hidrofòbic, mentre que el palmític i l'araquidònic tenen una longitud més o menys adequada.

- c) Quants aminoàcids ha de tenir aproximadament un segment transmembrana amb forma d'hèlix d'una proteïna integral de membrana, si el segment ha de creuar la bicapa lipídica definida per dues molècules d'àcid palmític enfrontades extrem amb extrem?

R: Cada aminoàcid ocupa una longitud sobre l'eix major de l'hèlix aproximadament de $0,56 / 3,6 = 0,156 \text{ nm}$. Per a ocupar una longitud de $4,16 \text{ nm}$ (dues molècules de palmític) es necessiten $4,16 / 0,156 = 26,7$, o siga, **27 aminoàcids**.

- d) La proteïna bacteriorodopsina té 248 aminoàcids i set segments transmembrana. Aproximadament, quina porció dels aminoàcids formen part del segment transmembrana? Si assumim que la majoria dels aminoàcids restants estan presents en els bucles hidrofílics que mantenen units els segments transmembrana, quants aminoàcids, de mitjana, estan presents en cadascun d'aquests bucles?

R: Set segments transmembrana de 26,7 aminoàcids aproximadament cadascun representen uns 187 aminoàcids, la qual cosa significa $187 / 248 = 0,752$, o **aprox. el 75% de la proteïna**. Els 61 aminoàcids restants (248-187) formarien els sis llaços que connecten els set segments transmembrana entre si, per la qual cosa cada llaç contindria $61 / 6 = 10$ aminoàcids.

2.7. Construïm diferents bicapes lipídiques i especulem sobre les seues propietats. Les propietats d'una bicapa lipídica estan determinades per les estructures de les seues molècules lipídiques. Preveu les propietats de les bicapes lipídiques que resultarien si el següent fora cert:

- Si els fosfolípids tingueren una sola cadena hidrocarbonada en lloc de dues.
- Si les cadenes hidrocarbonades foren més curtes del que és normal; diguem-ne, d'uns 10 carbonis de longitud.
- Si totes les cadenes hidrocarbonades foren saturades.
- Si totes les cadenes hidrocarbonades foren insaturades.
- Si la bicapa continguera una mescla de dos tipus de molècules lipídiques, una amb dues cadenes hidrocarbonades saturades i l'altra amb dues cadenes hidrocarbonades insaturades.
- Si cada molècula lipídica estiguera unida covalentment a través de l'últim àtom de carboni d'una de les seues cadenes hidrocarbonades a una molècula lipídica de la monocapa oposada.

2.8. Quin dels fosfolípids enumerats a continuació es troba en quantitats molt petites en les membranes plasmàtiques de les cèl·lules dels mamífers, malgrat el paper essencial que tenen en la senyalització cel·lular?

- Fosfatidilcolina
- Fosfatidiletanolamina
- Fosfatidilinositol
- Fosfatidilserina
- Esfingomielina

R: El fosfatidilinositol és un component minoritari dels fosfolípids de la membrana plasmàtica, encara que té un paper molt important en la senyalització cel·lular.

2.9. Podries predir quin dels organismes següents tindrà el major percentatge de cadenes d'àcids grassos insaturats en les seues membranes? Raona la resposta.

- El peix antàrtic
- La iguana del desert
- L'ésser humà
- L'os polar
- Un bacteri termòfil

2.10. Temperatura i composició de la membrana. Quina de les respostes següents probablement no s'observarà quan un cultiu bacterià que creix a 37 °C es transferisca a una sala de cultiu que es manté a 25 °C? Explica la resposta.

- a) Un descens inicial de la fluïdesa de la membrana.
- b) Una substitució gradual dels àcids grassos de cadena curta per àcids grassos més llargs en els fosfolípids de la membrana.
- c) Una substitució gradual d'àcid esteàric per àcid oleic en els fosfolípids de membrana.
- d) Una millora de la velocitat de síntesi dels àcids grassos insaturats.
- e) La incorporació de més colesterol en la membrana.

2.11. Fluïdesa de membrana i temperatura. Sovint s'estudien els efectes de la temperatura i de la composició lipídica sobre la fluïdesa de la membrana utilitzant membranes artificials que contenen només una o unes poques classes de lípids i cap proteïna. Suposa que tu i el teu company de laboratori heu fabricat les membranes artificials següents:

Membrana 1. Fabricada completament a partir de fosfatidilcolina amb àcids grassos saturats de 16 carbonis.

Membrana 2. La mateixa que la membrana 1, excepte que cadascun dels àcids grassos de 16 carbonis té un únic doble enllaç *cis*.

Membrana 3. La mateixa que la membrana 1, excepte que cadascun dels àcids grassos saturats té només 14 àtoms de carboni.

Després de determinar les temperatures de transició de les mostres que representen cadascuna de les membranes, descobreixes que el teu company de laboratori es va equivocar en apuntar a quin tipus de membranes corresponien les mostres. Els tres valors que va determinar van ser -36 °C, 23 °C i 41 °C. Assigna cadascuna d'aquestes temperatures de transició a la membrana artificial correcta i explica la resposta.

2.12. Més sobre membranes. Dona una resposta breu a les observacions següents:

- a) Tant la proteïna A com la B tenen un pes molecular de 33.000 i consten d'una única cadena polipeptídica amb 240 aminoàcids hidrofílics i 60 aminoàcids hidrofòbics; la proteïna A és una proteïna integral de membrana i la proteïna B és una proteïna soluble.
- b) Quan es realitza un experiment de fotoblanqueig amb proteïnes de superfície de la membrana de les cèl·lules marcades amb fluorescència, es tarda molt més a aconseguir restituir la fluorescència que quan l'experiment es fa amb fosfolípids marcats. A més, només un 55% de la fluorescència de les proteïnes torna finalment a la zona de la taca blanquejada pel làser.
- c) La majoria dels agents utilitzats en medicina com a anestèsics són apolars i actuen augmentant la fluïdesa de les bicapes lipídiques de les membranes cel·lulars fins al punt que la transmissió de l'impuls nerviós s'interromp i les sensacions de dolor s'eliminen.

2.13. Experiments amb bacteris. *Acholeplasma laidlawii* és un petit bacteri que no pot sintetitzar els seus propis àcids grassos i, per tant, ha de construir la seua membrana plasmàtica a partir dels àcids grassos disponibles en el seu entorn. El resultat és que la membrana d'*Acholeplasma* adquireix les característiques físiques dels àcids grassos que estiguen disponibles en aquell moment.

- a) Si a les cèl·lules d'*Acholeplasma* se'ls dona accés a una mescla d'àcids grassos saturats i insaturats, ¿creixeran normalment a temperatura ambient?
- b) Si es transfereix part dels bacteris a un medi de cultiu que conté només àcids grassos saturats i no es realitza cap altre canvi en les condicions de cultiu, deixaran de créixer immediatament després d'haver canviat el medi. Explica per què.
- c) Si hagueres de mantenir el cultiu d'*Acholeplasma* de l'apartat *b* en les condicions que s'hi descriuen, durant un període de temps prolongat, què es pot predir sobre el que ocurriria als bacteris?
- d) Quina seria l'única forma que els bacteris de l'apartat *b* cresqueren una altra vegada sense canviar-los el medi? Explica la resposta.
- e) Quins resultats esperaries si es transferira part dels bacteris a un medi que només continguera àcids grassos insaturats, sense realitzar cap altre canvi en les condicions del cultiu?

2.14. Els microdominis lipídics són rics tant en esfingolípidis com en colesterol, i sembla que el colesterol té un paper essencial en la formació dels microdominis, perquè aparentment aquests no es formen en la seua absència. Per què creus que el colesterol és essencial en la formació dels microdominis lipídics?

Pista: els esfingolípidis diferents de l'esfingomielina tenen grans grups polars del cap formats per diverses molècules de sucre unides.

R: Els grans grups del cap de la majoria dels esfingolípidis impedeixen l'estret empaquetament de les seues cues d'àcids grassos en la membrana. S'ha postulat que les molècules planes de colesterol emplen els buits que es formen davall dels grans grups del cap dels esfingolípidis, amb la qual cosa queden estretament empaquetats contra les cadenes d'àcids grassos a les quals, altrament, no haurien pogut aproximar-se prou per a unir-se.

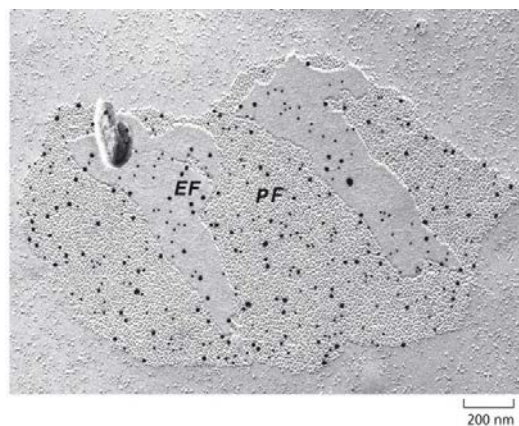
Per què els microdominis lipídics són més gruixuts que altres parts de la bicapa?

R: Els microdominis de membrana tendeixen a ser més gruixuts que altres parts de la membrana perquè les cadenes d'àcids grassos dels esfingolípidis són més llargues (de 20 a 26 àtoms de carboni comparats amb els 16 a 22 d'altres lípids) i tenen menys dobles enllaços (de 0,1 a 0,4 per esfingolípid comparat amb els 1,1 a 1,5 d'altres lípids). La combinació de cadenes d'àcids grassos més llargues i rectes dona lloc a l'eixamplament de la bicapa lipídica a la regió del microdomini.

Si t'abelleix aprofundir en aquests temes, pots consultar l'article d'investigació següent, que pretén llançar llum sobre aquesta qüestió:

Harder, T. i Simons, K. (1997). "Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains". *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 534-542.

2.15. Estàs estudiant dues proteïnes que creus que són components de les unions de tipus *gap*, estructures que permeten que les cèl·lules adjacents intercanvien molècules petites. Quan les cèl·lules són congelades i fracturades, i observades amb el microscopi electrònic de transmissió (MET), les unions de tipus *gap* s'observen amb claredat com a àrees especialitzades densament poblades amb partícules de membrana. Per a decidir si les proteïnes són components de les unions tipus *gap*, has preparat anticossos contra cadascuna d'aquestes. A un anticòs has unit partícules d'or col·loïdal de 15 nm; a l'altre, partícules de 10 nm. Després de preparar les cèl·lules per a criofractura al MET i incubar-les amb els anticossos marcats amb or col·loïdal, obtens els resultats que es mostren en la figura. Indiquen aquests resultats que ambdues proteïnes formen part de les unions de tipus *gap*? Raona la resposta.



Electromicrografia d'una criofractura d'una unió de tipus *gap*, que ocupa l'àrea central densament empaquetada. Les dues cares de la membrana plasmàtica s'indiquen com a EF (cara externa; *external face*) i PF (cara interna; *protoplasmic face*). Les partícules d'or s'observen com a punts negres.

R: La micrografia mostra amb claredat que ambdues proteïnes es localitzen en les unions de tipus *gap*. S'observen punts negres (partícules d'or) de dues grandàries diferents en la unió de tipus *gap*. I tots els punts negres excepte un (prop del cantó superior dret) estan situats en la unió de tipus *gap*. Un examen acurat de l'únic punt discrepant mostra que en realitat també està associat amb un petit pegat de membrana que té exactament el mateix aspecte que la zona de la unió de tipus *gap*. En realitat, les dues proteïnes marcades en la micrografia són connexines, que són components dels canals de membrana que formen les unions de tipus *gap*.

Referència: Fujimoto, K. (1995). "Freeze-fracture replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labeling of integral membrane proteins". *J. Cell Sci.* 108, 3443-3449.

2.16. A un amic de safari per Àfrica li va mossegar una serp verinosa mentre travessava el riu Limpopo i quasi va morir a conseqüència d'una extensa hemòlisi. Com a vertader biòleg vocacional que és, va capturar la serp abans que fugira i ha demanat que analitzen el verí per a descobrir la base de la seua activitat hemolítica. Troba que el verí conté una proteasa, una neuraminidasa (que elimina els residus d'àcid siàlic dels gangliòsids) i una fosfolipasa (que hidrolitza enllaços dels fosfolípids). El tractament d'eritròcits aïllats amb aquests enzims purificats va donar lloc als resultats que es mostren en la taula següent:

ENZIM PURIFICAT	HEMÒLISI
Proteasa	no
Neuraminidasa	no
Fosfolipasa	sí

L'anàlisi dels productes d'hemòlisi produïts pel tractament amb la fosfolipasa va mostrar un gran augment de fosforilcolina lliure (colina amb un grup fosfat unit) i diacilglicerol (glicerol amb dues cadenes d'àcids grassos unides).

a) Quin és el substrat de la fosfolipasa i on l'escindeix?

- b) En funció del que coneixes de l'estructura de la membrana plasmàtica, pots suggerir per què la fosfolipasa produeix la lisi dels eritròcits, però no la proteasa ni la neuraminidasa?

2.17. Intentarem determinar la distribució dels fosfolípids de la membrana plasmàtica dels eritròcits humans. Sabem que els fosfolípids constitueixen el 60% dels lípids de la bicapa lipídica dels eritròcits i que el colesterol (23%) i els glucolípid (3%) representen la major part de la resta. Amb la finalitat de determinar la distribució dels fosfolípids individuals, podríem tractar eritròcits intactes i fantasmes d'eritròcits permeables i) amb dues fosfolipases diferents i ii) amb un reactiu fluorescent, abreujat SITS, que marca específicament els grups aminos primaris, però que no travessa una membrana intacta.

Tal com es resumeix en la taula següent, el tractament amb esfingomielinasa degrada la majoria de l'esfingomielina dels eritròcits intactes (sense lissar-los) i dels fantasmes d'eritròcits permeables. Les fosfolipases de verí de serp marina només degraden la fosfatidilcolina en els eritròcits intactes (sense lissar-los), però també degraden la fosfatidilserina i la fosfatidiletanolamina en els fantasmes d'eritròcits permeables. SITS marca tota la fosfatidiletanolamina i la fosfatidilserina en els fantasmes d'eritròcits permeables, però quasi no marca res en els eritròcits intactes.

Taula. Sensibilitat dels fosfolípids d'eritròcits humans intactes i de fantasmes d'eritròcits permeables a fosfolipases i a un marcador fluorescent que no pot travessar una membrana intacta.

FOSFOLÍPID	ESFINGOMIELINASA		VERÍ SERP MARINA		FLUORESCÈNCIA SITS	
	ERITRÒCITS	FANTASMES	ERITRÒCITS	FANTASMES	ERITRÒCITS	FANTASMES
Fosfatidilcolina	-	-	+	+	-	-
Fosfatidiletanolamina	-	-	-	+	-	+
Fosfatidilserina	-	-	-	+	-	+
Esfingomielina	+	+	-	-	-	-

- a) A partir d'aquests resultats, dedueix la distribució dels quatre fosfolípids principals de les membranes dels eritròcits. Quin dels fosfolípids, si n'hi ha algun, es localitza en les dues monocapes de la membrana?

R: Només la fosfatidilserina i la fosfatidiletanolamina tenen grups aminos primaris que poden reaccionar amb SITS. Atès que aquests fosfolípids només es marquen quan els eritròcits es fan permeables (fantasmes), és probable que estiguen situats en la monocapa citoplasmàtica. Aquesta conclusió compta amb el suport dels resultats dels experiments amb verí de serp marina, que degrada la fosfatidilserina i la fosfatidiletanolamina únicament en els fantasmes d'eritròcits permeabilitzats. Aquests resultats, presos en conjunt, indiquen que tant la fosfatidilserina com la fosfatidiletanolamina estiguen situades quasi en exclusiva en la monocapa citoplasmàtica de les membranes dels eritròcits. La degradació per acció de les fosfolipases de la fosfatidilcolina i de l'esfingomielina en els eritròcits intactes indica que es troben presents en la monocapa externa. Aquesta conclusió depèn del fet que els eritròcits es mantinguen intactes durant el tractament. L'absència de degradació de la fosfatidilserina i de la fosfatidiletanolamina en eritròcits intactes per acció del verí de la serp marina serveix de control intern. En el cas de l'esfingomielinasa, no hi ha control intern, perquè l'absència de lisi indica que la membrana està intacta. Els resultats de la taula no exclouen la possibilitat que la fosfatidilcolina i l'esfingomielina també es localitzen en la monocapa citoplasmàtica. Atès que la majoria de l'esfingomielina es degrada per acció de l'esfingomielinasa, ha de trobar-se situada majoritàriament en la monocapa externa de la membrana. No s'aporten dades similars de la fosfatidilcolina, per la qual cosa seria incorrecte concloure que la fosfatidilcolina només es localitza en la monocapa externa. No obstant això, resultats obtinguts en altres experiments que no es mostren ací suggereixen que la fosfatidilcolina es localitza quasi per complet en la monocapa externa.

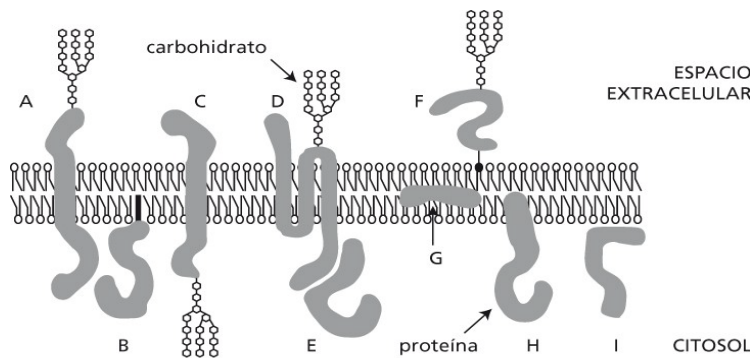
b) Per què es van utilitzar eritròcits i no altres cèl·lules animals per a aquests experiments?

R: Es van utilitzar eritròcits per a aquests experiments perquè no contenen membranes internes. Si s'hagueren fet els mateixos experiments amb cèl·lules que tingueren membranes internes, hauria sigut impossible determinar de forma directa la composició de fosfolípids de la monocapa citoplasmàtica, perquè s'haurien confós amb els de les membranes internes.

Referències: Bretscher, M. (1972). "Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes". *Nat. New Biol.* 236, 11-12.

Deenen, L. L. M. i DeGier, J, (1974). "Lipids of the red cell membrane", en *The Red Blood Cell* (D. MacN. Surgenor, ed.), p. 147-211. New York: Academic Press.

2.18. Quines de les distribucions de proteïnes de membrana que es troben en la figura es troben en les membranes biològiques?



R: En les membranes biològiques s'han trobat fins al moment les disposicions A, B, D, E, F i I. La disposició C, que presenta carbohidrats en el costat citoplasmàtic de la membrana sembla que no existeix. Les disposicions G i H, que mostren proteïnes incloses per complet o només amb els seus extrems inclosos en la membrana, no s'han trobat, i sembla que, basant-se en premisses teòriques, és poc probable que es troben. S'ha trobat una disposició similar a H, però amb una hèlix- α amfifílica, inserida horitzontalment en la monocapa citoplasmàtica.

2.19. Quines de les afirmacions següents descriuen la relació de masses entre lípids i proteïnes en les membranes?

- La massa dels lípids supera amb molt la massa de les proteïnes.
- La massa de les proteïnes supera amb molt la massa dels lípids.
- Les masses dels lípids i de les proteïnes són aproximadament iguals.
- La massa dels lípids i de les proteïnes varia de forma àmplia en diferents membranes.

R: La relació de masses depèn de la membrana. En la membrana de mielina que envolta els axons de les neurones, les proteïnes representen menys del 25% de la massa. En les membranes mitocondrials externes, les proteïnes arriben a representar al voltant del 75% de la massa total. En les membranes plasmàtiques típiques, les masses de proteïnes i de lípids són quasi iguals.

TEMA 3. EL CITOESQUELET

3.1. Relaciona les definicions següents amb el terme adequat de la llista que segueix més avall:

- a) Una cadena lineal de subunitats proteiques unides extrem amb extrem, que s'associa de forma lateral amb altres cadenes per a formar els components del citoesquelet.
R: protofilament
- b) La propietat de transformació sobtada de creixement a escurçament, i viceversa, en un microtúbul o un filament d'actina.
R: inestabilitat dinàmica
- c) L'extrem d'un microtúbul o d'un filament d'actina en el qual els monòmers s'afegeixen amb més facilitat; l'extrem de creixement ràpid.
R: extrem més
- d) Terme general per a denominar els filaments proteics fibrosos (aproximadament de 10 nm de diàmetre) que formen xarxes semblants a cordes en les cèl·lules animals.
R: filaments intermedis
- e) El procés mitjançant el qual un filament proteic polimèric manté constant la seua longitud afegint subunitats proteiques en un extrem i perdent subunitats per l'extrem oposat.
R: intercanvi rotatori
- f) Sistema de filaments proteics en el citoplasma d'una cèl·lula eucariota que li proporciona la seua forma i capacitat per a moure's en una direcció concreta.

citoesquelet	intercanvi rotatori
extrem més	neurofilament
extrem menys	protofilament
filaments intermedis	queratina
inestabilitat dinàmica	tubulina

3.2. Vertader o fals? Explica per què.

- a. La polaritat estructural dels microtúbuls és tal que la tubulina α es troba en un extrem i la tubulina β es troba en l'extrem oposat.

R: Vertader. Cada protofilament en un microtúbul està assemblet a partir de subunitats que apunten totes en la mateixa direcció; així, cada protofilament està format per una tubulina α en un extrem i una tubulina β en l'extrem oposat. Com que els protofilaments en un microtúbul estan alineats en paral·lel, la tubulina α està en un extrem i la tubulina β està en l'extrem oposat.

- b. El paper de la hidròlisi del ATP en la polimerització de l'actina és semblant al paper de la hidròlisi del GTP en la polimerització de la tubulina: ambdues hidròlisis serveixen per a afegir els enllaços en el polímer i afavorir així la despolimerització.

R: Vertader. Quan l'ATP en els filaments d'actina (o el GTP en els microtúbuls) és hidrolitzat, la major part de l'energia lliure alliberada en la hidròlisi de l'enllaç d'alta energia s'emmagatzema en el polímer, de manera que l'energia lliure en el polímer que conté ADP és major que la del polímer que conté ATP. Això desplaça l'equilibri cap a la despolimerització de manera que els filaments d'actina amb ADP es desassemblen amb més facilitat que els filaments d'actina amb l'ATP unit.

- c. Igual que els filaments d'actina i els microtúbuls, els filaments intermedis citoplasmàtics es troben en totes les cèl·lules eucariotes.

R: Fals. Al contrari que els filaments d'actina i els microtúbuls, que estan presents en tots els organismes eucariotes, els filaments intermedis només es troben en alguns metazous, vertebrats, nematodes i caragols. Fins i tot en aquests organismes, els filaments intermedis no són necessaris en tots els tipus cel·lulars. Les làmines nuclears, que són els avantpassats dels filaments intermedis i formen una xarxa de proteïnes que envolta la membrana nuclear, estan molt més àmpliament distribuïdes entre els eucariotes.

3.3. La figura 16-2 mostra la distribució en equilibri de subunitats lliures d'actina (monòmers) i de filaments, en funció de la concentració d'actina. Indica la concentració crítica d'actina en aquest diagrama.

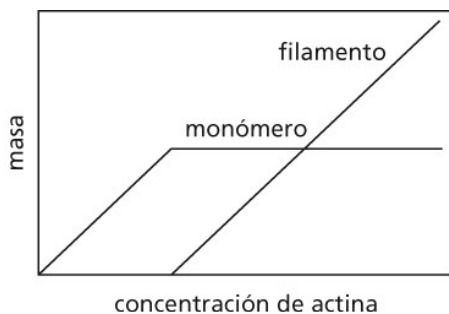


Figura 16-2. Massa dels monòmers i dels filaments d'actina en funció de la concentració d'actina.

3.4. La inestabilitat dinàmica provoca que els microtúbuls cresquen o s'escurcen amb rapidesa. Considera un microtúbul individual que es troba en la seua fase d'escurçament.

- Què ha de succeir en l'extrem del microtúbul perquè es deixi d'escurçar i comence a créixer?
- De quina forma un augment en la concentració de tubulina afectarà aquest canvi d'escurçament a creixement?
- Què succeiria si en la solució hi haguera GDP però no GTP?
- Què succeiria si la solució tinguera un anàleg del GTP que no poguera ser hidrolitzat?

3.5. Les seqüències d'aminoàcids de les actines i de les tubulines de tots els eucariotes estan molt ben conservades. No obstant això, el gran nombre de proteïnes que interactuen amb aquests filaments no estan més conservades que la majoria de les altres proteïnes en les diferents espècies. Com és possible que les proteïnes dels filaments estiguen tan conservades i no ho estiguen les proteïnes que interaccionen amb aquests?

R: L'evolució de les actines i de les tubulines està condicionada no solament per la necessitat que s'unisquen l'una amb l'altra, sinó també per la necessitat que interaccionen amb un gran nombre d'altres proteïnes que s'uneixen als mateixos llocs en les seues superfícies. Una mutació en l'actina que donara lloc a un canvi desitjable en la seua interacció amb una proteïna podria provocar canvis no desitjats en la seua interacció amb mitja dotzena d'altres proteïnes que s'uniren al mateix lloc o prop d'aquest. Aquestes interaccions múltiples limiten l'evolució de la majoria de les superfícies de l'actina i de la tubulina. Per contra, les proteïnes que s'uneixen als filaments d'actina i als microtúbuls tan sols necessiten mantenir el lloc d'unió al filament —en el fons, les parts de la seua estructura més conservades— i els llocs d'unió per a les poques proteïnes amb les quals interaccionen. Aquesta limitació més reduïda permet una considerable major llibertat evolutiva.

3.6. Quin dels tipus següents de cèl·lules esperaries que tinguera una densitat alta de filaments intermedis citoplasmàtics? Explica la resposta.

- a) *Amoeba proteus* (una ameba de vida lliure).
- b) Una cèl·lula epitelial de pell humana.
- c) Una cèl·lula muscular llisa del tracte digestiu d'un vertebrat.
- d) Una cèl·lula nerviosa de la medul·la espinal d'un ratolí.
- e) Un espermatozoide humà.
- f) Una cèl·lula vegetal.

R: Les cèl·lules que migren ràpidament d'un lloc a un altre com les amebes (a) i els espermatozoides (e) no necessiten, en general, filaments intermedis en el seu citoplasma, ja que no desenvolupen o mantenen gran resistència a la tensió. Les cèl·lules vegetals (f) són arrossegades i espentades per les forces del vent i l'aigua, però resisteixen aquestes forces gràcies a les seues parets cel·lulars rígides, més que pel seu citoesquelet. Les cèl·lules epitelials (b), les cèl·lules musculars llises (c) i els llargs axons de les neurones (d) tenen citoplasmes molt rics en filaments intermedis, que impedeixen que es trenquen mentre són estirades i comprimides pels moviments dels teixits que les envolten.

3.7. Encara que els *knockouts* dels gens d'alguns filaments intermedis donen lloc a fenotips detectables en ratolins, els *knockouts* del gen de la vimentina o de la proteïna àcida fibril·lar glial (GFAP) produeixen un fenotip normal. No obstant això, els ratolins *knockouts*, tant per a vimentina com per a la GFAP, presenten disfuncions en els seus astròcits, les cèl·lules accessòries del sistema nerviós central. Per què suposes que els *knockouts* individuals per a la vimentina i per a la GFAP són normals, mentre que els *knockouts* combinats presenten una deficiència demostrable?

R: És sorprenent que molts dels *knockouts* de gens dels filaments intermedis tinguen poc efecte en els ratolins. La seqüència d'aminoàcids de la vimentina, per exemple, és idèntica en un 98% en el hámster, el pollastre, el ratolí i l'home, la qual cosa significa que té una funció important, encara que els ratolins *knockouts* per a la vimentina semblen ser totalment normals. La falta d'efecte d'un *knockout* d'un gen tan conservat s'interpreta en termes d'un sistema de compensació que n'equilibra la pèrdua. En el cas dels gens dels filaments intermedis, el sistema de compensació poden ser altres filaments intermedis. El fet que el doble *knockout* de vimentina i GFAP manifesten un fenotip alterat —astròcits defectuosos— suggereix que aquests dos filaments intermedis es compensen entre si en els astròcits. Els astròcits expressen gens de tres proteïnes dels filaments intermedis — la vimentina, la GFAP i la nestina— les propietats de les quals s'han estudiat utilitzant les proteïnes pures. La nestina no pot formar filaments intermedis per si sola, la qual cosa explica probablement la seua incapacitat per a compensar la pèrdua de la vimentina i de la GFAP. La vimentina pot formar filaments intermedis, però només amb la nestina o la GFAP com a parella, i la GFAP pot formar filaments intermedis una mica anormals per si sola. Així doncs, sembla que aquestes tres proteïnes cooperen en la formació de filaments intermedis adequats en els astròcits: poden tolerar la desaparició d'una d'aquestes, però no la de dues.

Referències: Herrmann, H. i Aebi, O. (2000). "Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics". *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 79-90.

Eliasson, C.; Sahlgren, C.; Berthold, C. H.; Stakeberg, J.; Celis, J. E.; Betsholtz, C.; Eriksson, J. E. i Pekny, M. (1999). "Intermediate filament protein partnership in astrocytes". *J. Biol. Chem.* 274, 23996-24006.

3.8. El taxol, que s'extrau de l'escorça del teix, i la colquicina, un alcaloide que procedeix del safrà de tardor, tenen efectes oposats. El taxol s'uneix fortament als microtúbuls i els estabilitza. Quan s'afegeix a les cèl·lules provoca que la major part de la tubulina lliure s'assemble en els microtúbuls. Tots dos són igual de tòxics per a la cèl·lula en divisió i tots dos s'utilitzen com a fàrmacs anticancerosos. Basant-te en els teus coneixements de la dinàmica dels microtúbuls, explica per què aquests fàrmacs són tòxics per a les cèl·lules en divisió malgrat tenir maneres de funcionament oposades.

R: La divisió cel·lular depèn de la capacitat dels microtúbuls de polimeritzar i despolimeritzar. Durant la mitosi, les cèl·lules primer despolimeritzen la major part dels seus microtúbuls i els tornen a polimeritzar per a formar el fus mitòtic. Les cèl·lules tractades amb taxol no poden despolimeritzar els microtúbuls ja existents i, per tant, no poden formar el fus mitòtic. Les cèl·lules tractades amb colquicina no poden polimeritzar nous microtúbuls i, per tant, tampoc poden formar el fus mitòtic. A una escala més subtil, tots dos compostos bloquejarien la inestabilitat dinàmica dels microtúbuls i interferirien així amb les funcions del fus mitòtic, fins i tot si poguera formar-se.

3.9. Tríada de Kartagener. L'esterilitat en homes amb la tríada de Kartagener es deu al fet que els espermatozoides no poden moure's. L'anàlisi citològica dels espermatozoides d'aquests individus revela que a les seues cues (és a dir, els seus flagels) els falta un o més dels components estructurals normals. Aquests individus poden patir malalties del tracte respiratori, particularment bronquitis i sinusitis recurrents, provocades per la seua incapacitat de netejar el moc dels seus pulmons i sins nasals.

- Quin és el mecanisme que explica la immobilitat dels espermatozoides en aquests casos d'esterilitat?
- Per què la disfunció respiratòria està associada amb l'esterilitat en els individus afectats?

3.10. Si afegeixes filaments curts d'actina marcats amb caps de miosina (filaments decorats amb miosina) a una solució que conté un excés de monòmers d'actina, esperes uns quants minuts i llavors examines els filaments amb el microscopi electrònic, observaràs una imatge com la que es mostra en la figura 16-6.

- Quin és l'extrem més en el filament decorat amb miosina i quin és l'extrem menys? Quin és l'extrem "espinós" (*barbed*) i quin és l'extrem "punxegut" (*pointed*)? Raona la resposta.
- En diluir la mescla de manera que la concentració d'actina estiga per davall de la concentració crítica, quin extrem es despolimeritzaria més ràpidament?

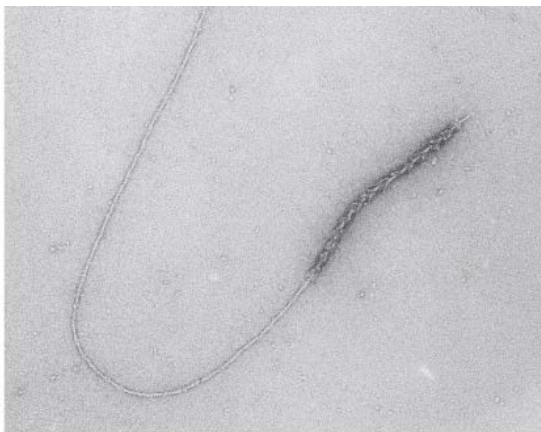


Figura 16-6. Filaments d'actina decorats amb miosina després d'uns quants minuts en una solució amb un excés de monòmers d'actina. El segment més gruixut i més curt és el filament d'actina decorat amb miosina.

3.11. Es va determinar l'orientació d'un dímer de tubulina $\alpha\beta$ en un microtúbul de distintes formes. Per exemple, es va observar que esferes fluorescents recobertes amb GTP només s'unien als extrems més dels microtúbuls. Per contra, partícules d'or recobertes amb anticossos específics contra un pèptid de la tubulina α només s'unien a l'extrem menys. De quina forma defineixen aquestes observacions l'orientació del dímer de tubulina $\alpha\beta$ en el microtúbul? Quina subunitat, α o β , està en cada extrem? Explica el teu raonament.

R: Aquestes observacions mostren que els dímers de tubulina $\alpha\beta$ estan orientats en els microtúbuls amb la tubulina β exposada en l'extrem més i la tubulina α en l'extrem menys. Com que el GTP, que està unit al monòmer de tubulina α , està físicament atrapat en la interfase del dímer, mai serà hidrolitzat ni substituït. Per contra, el GTP de la tubulina β és hidrolitzat i pot ser substituït. Per tant, quan un microtúbul és exposat a boles fluorescents recobertes de GTP, el GTP pot unir-se a les subunitats de tubulina β exposades en l'extrem del microtúbul. El fet que les boles fluorescents es troben en l'extrem més indica que el dímer de tubulina $\alpha\beta$ ha d'estar orientat amb el monòmer de tubulina β en l'extrem més. La presència de les boles només en un dels extrems, i no al llarg de tot el microtúbul, indica que el GTP només pot ser substituït en els extrems exposats. De forma semblant, la presència de boles d'or recobertes amb anticossos específics contra la tubulina α en els extrems menys indica que el dímer de tubulina $\alpha\beta$ ha d'estar orientat amb el monòmer de tubulina α exposat en l'extrem menys. La presència de boles només en un extrem indica que la porció de tubulina α amb la qual reacciona l'anticòs està oculta en la interfase entre dímers de tubulina $\alpha\beta$ adjacents i, per tant, només està disponible en l'extrem.

Referències: Mitchison, T. J. (1993). "Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules". *Science* 261, 1044-1047.

Fan, J., Griffiths; A. D.; Lockhart, A.; Cross, R. A. i Amos, L. A. (1996). "Microtubule minus ends can be labeled with a phage display antibody specific to α -tubulin". *J. Mol. Biol.* 259, 325-330.

Nogales, E.; Whittaker, M.; Milligan, R. A. i Downing, K. H. (1999). "High-resolution model of the microtubule". *Cell* 96, 79-88.

3.12. En la figura 16-8A es mostren les velocitats de creixement dels extrems més i dels extrems menys dels filaments d'actina en funció de la concentració d'actina i en la figura 16-8B es mostren els mateixos resultats en una escala ampliada.

- a) Les dades de la figura 16-8A es van obtenir determinant les velocitats de creixement inicial per a cada concentració d'actina. Dades semblants regides per a qualsevol enzim amb cinètica de Michaelis-Menten generarien una corba hiperbòlica en lloc dels gràfics lineals que es mostren. Per què la velocitat de creixement dels filaments d'actina augmenta linealment en augmentar la concentració d'actina, mentre que en una reacció catalitzada per un enzim s'aconsegueix una fase estacionària amb concentracions de substrat creixents?
- b) La figura 16-8B mostra les velocitats de creixement del filament a concentracions baixes d'actina en una escala ampliada. Imagina que pogueres afegir filaments d'actina a la solució de subunitats d'actina a les concentracions indicades com A, B, C, D i E. Per a cadascuna d'aquestes concentracions, decideix si el filament d'actina afegit creixeria o s'escurçaria en els seus extrems més i menys. Quina és la concentració crítica per a l'extrem més? Quina és la concentració crítica per a l'extrem menys? Es produiria recanvi rotatori a alguna d'aquestes concentracions?

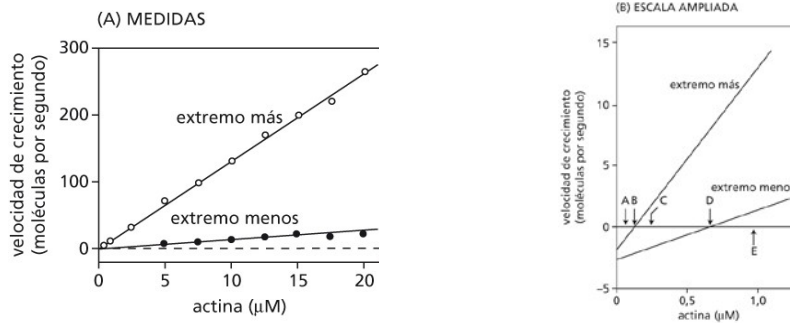


Figura 16-8. Velocitats de creixement en els extrems més i menys dels filaments d'actina en funció de la concentració d'actina. (A) Mesura de les velocitats de creixement en un rang ampli de concentracions d'actina. (B) Velocitats de creixement a concentracions baixes d'actina, que es mostren en una escala ampliada.

3.13. Comparacions del comportament dels microtúbuls entre espècies apunten a diferències que reforcen la importància biològica de la inestabilitat dinàmica. Per exemple, els peixos nototènids que viuen a l'Oceà Antàrtic a una temperatura constant de $-1,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ tenen microtúbuls extraordinàriament estables en comparació amb els dels vertebrats de sang calenta com la vaca. Aquest fet respon a una modificació essencial dels peixos nototènids, ja que els seus microtúbuls es desassemblen per complet en dímers de tubulina $\alpha\beta$ a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Si es mesuren els microtúbuls individuals en solucions de tubulina pura, pot observar-se que els microtúbuls dels peixos creixen a una velocitat molt més lenta, s'escurcen a una velocitat molt més lenta i rarament passen de l'estat de creixement al d'escurçament (catàstrofe) o del d'escurçament al de creixement (rescat) (taula 16-1).

- Les seqüències d'aminoàcids de les subunitats de tubulina α i β dels peixos nototènids es diferencien dels de la vaca en posicions i en formes que podrien esperar-se per a estabilitzar el microtúbul, d'acord amb les dades de la taula 16-1. Esperaries que aquests canvis augmentaren les interaccions entre les subunitats de tubulina α i β en el dímer $\alpha\beta$, entre dímers adjacents en el protofilament o entre subunitats de tubulina en protofilaments adjacents? Explica el teu raonament.
- Sembla que la inestabilitat dinàmica exerceix un paper fonamental en les ràpides reorganitzacions dels microtúbuls que es produeixen en les cèl·lules. Com suposes que dirigeixen les cèl·lules d'aquests peixos els canvis en l'arquitectura dels seus microtúbuls prou ràpidament per a complir amb les funcions cel·lulars essencials? O suposes que aquestes cèl·lules posseeixen un citoesquelet estable de microtúbuls que només es reorganitza molt lentament?

Taula 16-1. Propietats dels microtúbuls individuals en un peix nototènid i en la vaca domèstica.

MICROTÚBULS	VELOCITAT DE CREIXEMENT ($\mu\text{m}/\text{min}$)	VELOCITAT D'ESCURÇAMENT ($\mu\text{m}/\text{min}$)	FREQÜÈNCIA DE CATÀSTROFE (min^{-1})	FREQÜÈNCIA DE RESCAT (min^{-1})
Peix nototènid	0,27	0,8	0,008	0,0004
Vaca domèstica	2,18	61,2	0,52	3,1

S'observaren mitjançant videomicroscòpia múltiples microtúbuls a una temperatura propera a la temperatura corporal de cada espècie: $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ per al peix i $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ per a la vaca. Les velocitats de creixement mitjanes es van calcular en microtúbuls en creixement; les velocitats d'escurçament mitjanes es van calcular en microtúbuls que s'escurçaven. Els canvis de creixement a escurçament (catàstrofe) i d'escurçament a creixement (rescat) s'estimaren fent una mitjana durant el període d'observació i es van expressar com la freqüència de cada esdeveniment per minut.

3.14. El teu supervisor vol que compregues alguns dels fets bàsics sobre l'acoblament de l'actina i explica que el ATP s'uneix als monòmers d'actina i que és necessari per al seu acoblament. Però la hidròlisi del ATP no és necessària per a la polimerització, ja que el ADP pot, sota determinades circumstàncies, substituir el ATP. No obstant això, els filaments de ADP són molt menys estables que els de ATP, la qual cosa confirma la seua sospita secreta que l'energia lliure de la hidròlisi del ATP s'utilitza en realitat per a l'acoblament de l'actina.

El teu supervisor suggereix que prengues acuradament mesures de la relació quantitativa entre el nombre de molècules de ATP hidrolitzades i el nombre de monòmers d'actina units al polímer. Els experiments es duen a terme. Per a mesurar la hidròlisi de ATP, afegeixes $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP a una solució d'actina en polimerització, prens mostres a intervals de temps i determines quant de fosfat radioactiu s'ha produït. Per a analitzar la polimerització, mesures l'augment de dispersió de la llum provocat per la formació dels filaments d'actina. Els resultats es mostren en la figura 16-9; les mesures de dispersió indiquen que han polimeritzat 20 μmol de monòmers d'actina. Com que el nombre de monòmers d'actina polimeritzats indica exactament el nombre de molècules de ATP hidrolitzat, concloues que s'hidrolitza un ATP cada vegada que un monòmer s'afegeix a un filament d'actina.

Quan mostres al teu supervisor les dades i li expliques les teues conclusions, somriu i molt gentilment et diu que mires amb més atenció el gràfic: les teues dades proven que l'actina pot polimeritzar sense la hidròlisi del ATP.

- Què és el que veu el teu supervisor en les dades que tu havies passat per alt?
- Què suposen les teues dades sobre la distribució del ATP i del ADP en els filaments d'actina en polimerització?

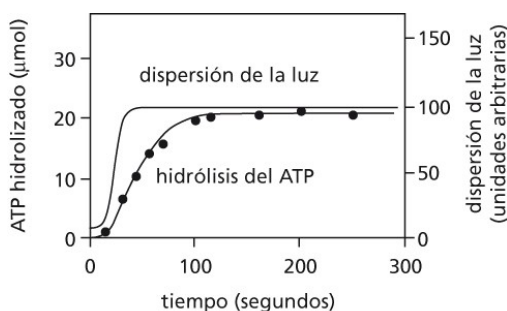


Figura 16-9. Cinètiques de la polimerització de l'actina i de la hidròlisi del ATP.

3.15. La citocalasina B inhibeix certes formes de motilitat cel·lular, com la citocinesi i les espines dels cons de creixement, i disminueix de forma dràstica la viscositat dels gels formats per una mescla d'actina i una àmplia varietat de proteïnes d'unió a l'actina. Aquestes observacions suggereixen que la citocalasina B interfereix en l'acoblament dels filaments d'actina. En l'experiment clàssic que defineix aquest mecanisme, filaments d'actina de curta longitud es decoren amb caps de miosina i llavors es mesclen amb subunitats d'actina en presència i en absència de citocalasina B. Es mesura l'acoblament dels filaments d'actina determinant la viscositat de la solució (figura 1) i observant les mostres amb el microscopi electrònic (figura 2).

- Suggereix un possible mecanisme per a explicar de quina forma la citocalasina B inhibeix l'acoblament dels filaments d'actina. Tin en compte l'aspecte dels filaments en les electromicrografies i les mesures de viscositat (tant la taxa alterada com ampliada).
- El creixement normal característic d'un filament d'actina i les propietats d'unió a l'actina de la citocalasina B prova que els monòmers d'actina pateixen un canvi conformacional en ser afegits al filament. De quina forma?

Referència: MacLean-Fletcher, S. i Pollard, T. D. (1980). "Mechanism of action of cytochalasin B on actin". *Cell* 20, 329-341.

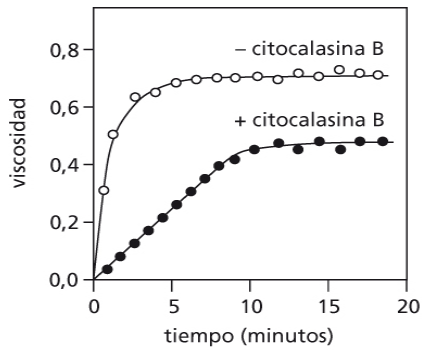


Figura 1. Augment de la viscositat de solucions d'actina en presència i en absència de citocalasina B.

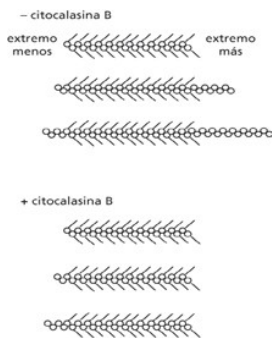


Figura 2. Aspecte dels filaments d'actina formats en presència i en absència de citocalasina B. Els filaments d'actina decorats presents abans de l'addició de monòmers d'actina es mostren en la part superior de cada conjunt de tres esquemes. Els filaments presents després d'un temps d'incubació amb els monòmers d'actina es mostren en la part inferior.

3.16. La fal·loïdina, que és un pèptid tòxic de l'*Amanita phalloides*, s'uneix als filaments d'actina. La fal·loïdina marcada amb una sonda fluorescent sovint s'utilitza per a tenyir la xarxa de filaments d'actina de les cèl·lules (figura 1A). Si la fal·loïdina es marca amb una partícula d'or, la seua unió als filaments d'actina pot observar-se a gran resolució mitjançant microscòpia electrònica d'escombratge. La figura 1B mostra una electromicrografia d'un filament d'actina amb fal·loïdina unida i la figura 1C mostra la mateixa fotografia amb el contrast ajustat de manera que només són visibles els punts més electrodensos (les partícules d'or). S'uneix la fal·loïdina a cada subunitat d'actina? Com pots explicar-ho?

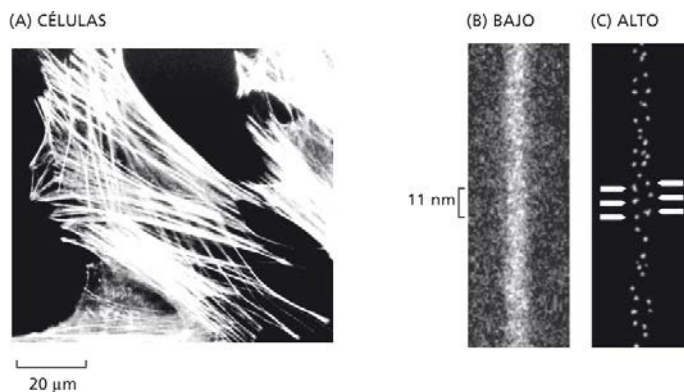


Figura 1. Unió de les fal·loïdina als filaments d'actina. (A) El citoesquelet d'actina marcat amb fal·loïdina fluorescent. (B) Un filament d'actina marcat amb fal·loïdina unida a or observat amb baix contrast. (C) El mateix filament d'actina que en B però observat amb alt contrast. Les fletxes blanques indiquen les posicions de sis partícules d'or.

Referència: Steinmetz, M. O.; Stoffer, D.; Hoenger, A.; Bremer, A. i Aebi, U. (1997). "Actin: From cell biology to atomic detail". *J. Struct. Biol.* 119, 295-320.

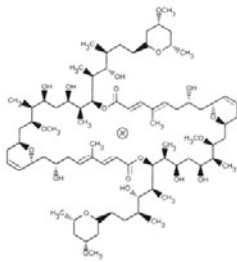
R: Les partícules d'or en la figura 1B i 1C segueixen vies helicoidals paral·leles que estan relativament separades les unes de les altres, com dos protofilaments en un filament d'actina. Si reviseu la bibliografia, veureu que la separació de les partícules d'or coincideix amb la separació de les subunitats d'actina en el filament d'actina (5,5 nm per partícula).

3.17. La swinholida A és un membre d'una classe de compostos lipídics anomenats macròlids que inclouen diversos antibiòtics útils com l'eritromicina, que són sintetitzats pels actinomicets. La swinholida A és una molècula "bessona", formada per dues meitats idèntiques (figura 1A). Quan s'afegeix a les cèl·lules que creixen en cultiu, la swinholida A desorganitza el citoesquelet d'actina. La teua supervisora ha mostrat de forma concloent que la swinholida A s'uneix a un parell de monòmers d'actina i sospita que la swinholida A provoca la despolimerització dels filaments d'actina mitjançant el segrest de les subunitats d'actina en una forma dimèrica no funcional, amb la qual cosa accelera la despolimerització a través d'efectes d'acció de masses.

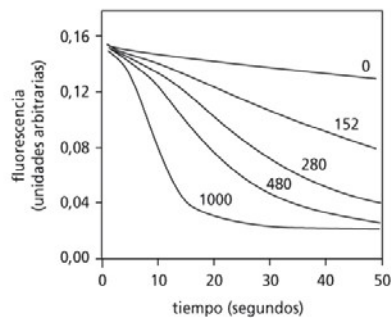
Arribat aquest punt, la teua supervisora et demana que comproves aquesta hipòtesi. Per a fer-ho, prepares filaments d'actina marcats amb una sonda que emet fluorescència intensa en el filament i molt menys intensa en les subunitats lliures (o subunitats unides a swinholida A). Això permet observar de manera fàcil i ràpida la despolimerització com una pèrdua de fluorescència. Tal com va predir la teua supervisora, la despolimerització augmenta en presència de concentracions creixents de swinholida A (figura 1B). Però s'adona de dues característiques d'aquestes corbes que suggereixen que la swinholida A pot realment trencar els filaments d'actina. Una d'aquestes característiques s'il·lustra en la figura 1C, la qual mostra una dependència no lineal en la velocitat inicial de despolimerització per damunt de la concentració de swinholida A. Un efecte simple d'acció de masses —el segrest dels monòmers d'actina mitjançant unió a la swinholida A— prediria una dependència lineal; no obstant això, l'augment de la concentració de swinholida A té progressivament un efecte més gran en la despolimerització.

- a) En la figura 16-16B, per què arriba la fluorescència a un valor estable (al voltant de 0,03) en comptes de disminuir fins a zero?
- b) L'altra característica estranya que s'observa sobre la despolimerització en presència de swinholida A (figura 1B) és que les línies tenen una "vall" en els primers segons (abans d'assolir l'altiplà més tard). Per què suggereix aquesta vall que la swinholida A trenca els filaments d'actina?
- c) Si suposem que la swinholida A trenca els filaments d'actina, és suficient amb una molècula o es necessiten moltes molècules? Com ho saps?

(A) ESTRUCTURA DE LA SWINHOLIDA



(B) ENSAYO DE DESENSAMBLAJE



(C) TITULACIÓN DE LA SWINHOLIDA

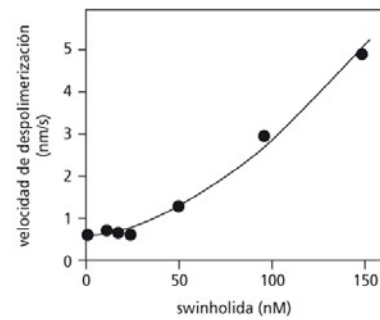


Figura 1. Efectes de la swinholida A sobre els filaments d'actina. (A) Estructura de la swinholida A. Les dues meitats idèntiques de la swinholida A estan disposades cap amb cua, de manera que si la molècula girara 180° sobre l'eix indicat (cercle amb una X), se superposaria a si mateixa. Per aquesta raó es diu que té un eix de simetria doble. (B) Despolimerització dels filaments d'actina al llarg del temps en presència i en absència de swinholida A. Els números indiquen la concentració de swinholida A (nM) utilitzada en cada assaig de despolimerització. (C) Velocitats inicials de despolimerització en funció de la concentració de swinholida A.

Referència: Bubb, M. R.; Spector, I.; Bershadsky, A. D. i Korn, E. D. (1995). "Swinholide A is a microfilament disrupting marine toxin that stabilizes actin dimers and severs actin filaments". *J. Biol. Chem.* 270, 3463-3466.

R:

a) La fluorescència en la figura 1B arriba a l'equilibri quan tota l'actina s'ha transformat en monòmers. L'equilibri no es produeix en el punt zero perquè els monòmers per si mateixos posseeixen un nivell baix de fluorescència.

b) Les "valls" en les corbes de despolimerització (vegeu la figura 1B) mostren que les velocitats de despolimerització augmenten amb el temps en presència de swinholida A. Com que la velocitat de despolimerització depèn del nombre d'extrems, un augment de la velocitat és coherent amb un augment del nombre d'extrems. Aquesta característica de les corbes de despolimerització dona suport a la idea que la swinholida A trenca els filaments d'actina i augmenta el nombre d'extrems. No és conseqüent amb la idea que la swinholida A assoleix la despolimerització a través d'uns efectes acció-massa en unir-se a les subunitats d'actina, que prediu una pèrdua lineal de la fluorescència amb el temps.

c) Es necessiten moltes molècules de swinholida A per a trencar un filament d'actina. La conclusió es basa en les dades de la figura 1C, que mostra que l'augment de la concentració de swinholida A té efectes progressivament majors en la despolimerització. Si es necessitara una sola molècula de swinholida A, la relació hauria sigut lineal, de manera que un increment en la concentració de swinholida A produiria el mateix augment en la velocitat de despolimerització.

3.18. Relaciona les definicions següents amb el terme adequat de la llista que segueix més avall:

a) Orgànu del centre de les cèl·lules animals que és el centre primari organitzador de microtúbuls i que actua com el pol del fus mitòtic durant la mitosi.

R: centrosoma

b) Capa especialitzada del citoplasma en la cara interna de la membrana plasmàtica rica en filaments d'actina.

R: còrtex cel·lular

- c) Complex proteic format per una forma específica de tubulina que, juntament amb altres proteïnes, constitueix un nucleador eficient del creixement dels microtúbuls.

R: complex de tubulina γ en forma d'anell

- d) Disposició cilíndrica curta de microtúbuls, amb un parell d'aquests immersos en el principal centre organitzador dels microtúbuls d'una cèl·lula animal.

R: centríol

- e) Una proteïna motora que es desplaça al llarg dels microtúbuls i es dirigeix al seu extrem més.

R: cinesina

- f) Un grup de GTP-ases monomèriques molt relacionades que inclou Cdc42, Rac i Rho.

R: família de proteïnes Rho

- g) Feix de microtúbuls i de proteïnes associades que formen el nucli d'un cili o d'un flagel en una cèl·lula eucariota i és responsable dels seus moviments.

R: axonema

- h) Protrusió llarga amb forma de pèl de la superfície de les cèl·lules eucariotes les ondulacions de les quals permeten que la cèl·lula es moga per un mitjà fluid.

R: cili

- i) Proteïna formadora de filaments intermedis en cèl·lules musculars.

R: desmina

- j) Estructures fines i allargades de la superfície d'algunes cèl·lules que, tot i ser de major grandària que les microvellositats, també posseeixen feixos llargs de filaments d'actina paral·lels entre si a l'interior.

R: estereocili

centríol	complex de tubulina γ en forma d'anell
complex ARP	còrtex cel·lular
família de proteïnes Rho	estereocili
desmina	queratina
cinesina	centre organitzador de microtúbuls (MTOC)
miosina	proteïna associada als microtúbuls (MAP)
axonema	cili
centrosoma	filopodi
formina	dineïna citoplasmàtica

3.19. La concentració d'actina en les cèl·lules és de 50 a 100 vegades més elevada que la concentració crítica observada per a l'actina pura en un tub d'assaig. Com és possible això? Què impedeix que les subunitats d'actina de les cèl·lules polimeritzin en filaments? Per què és avantatjós per a les cèl·lules mantenir un magatzem tan gran de subunitats d'actina?

R: En les cèl·lules, la majoria de subunitats d'actina estan unides a timosina, que disposa l'actina en una forma en què no pot hidrolitzar el ATP unit i no pot ser afegida a cap extrem d'un filament. La timosina redueix la concentració de subunitats d'actina lliure a valors pròxims als de la concentració crítica. Les subunitats d'actina són reclutades d'aquest magatzem inactiu per la profilina, l'activitat de la qual està regulada de manera que la polimerització de l'actina es produeix quan i on és necessària. L'avantatge d'aquesta organització és que la cèl·lula pot mantenir un gran magatzem de subunitats per a un creixement sobtat en els llocs i en el moment que necessite.

3.20. La filamina entrecrua filaments d'actina quasi en angles rectes per a produir un gel viscós necessari perquè les cèl·lules estenguen lamel·lipodis. Per què la pèrdua de la filamina en cèl·lules de melanoma és una mala notícia per a les cèl·lules de melanoma, però és una molt bona notícia per al pacient?

3.21. Quan les cèl·lules entren en mitosi, la seua xarxa de microtúbuls citoplasmàtics existent ha de ser ràpidament desorganitzada i substituïda pel fus mitòtic, que arrossega els cromosomes cap a les dues cèl·lules filles. L'enzim catanina, dit així per les espases dels samurais japonesos, s'activa a l'inici de la mitosi i trenca els microtúbuls en fragments petits. Quina creus que és la destinació dels fragments de microtúbuls generats per la catanina?

R: La catanina trenca els microtúbuls al llarg de tota la seua longitud. Per tant, els fragments que es formen contenen tubulina-GDP en els seus extrems exposats i ràpidament es despolimeritzen. Així, la catanina proporciona una forma molt ràpida de destruir microtúbuls existents.

3.22. El bacteri patògen intracel·lular *Listeria monocytogenes* es propulsa a si mateix a través del citosol en una estructura semblant a la cua d'un cometa de filaments d'actina (figura 1). Sorprenentment, només una única proteïna bacteriana, la proteïna transmembrana ActA, és necessària per a aquest desplaçament. La proteïna ActA està distribuïda de forma desigual en la superfície del bacteri i assoleix les concentracions màximes en el pol en contacte amb la cua d'actina. En la figura 2A, es mostren els efectes d'ActA en la polimerització de l'actina en presència i en absència del complex ARP. Els primers segons de les reaccions es mostren en una escala ampliada en la figura 2B. Es va seguir la polimerització de l'actina utilitzant actina-pirè, que presenta una major intensitat de fluorescència quan l'actina està polimeritzada.

- Quins són els efectes d'ActA i del complex ARP, per separat i en conjunt, en la velocitat de nucleació dels filaments d'actina? Raona la resposta.
- Com suposes que la polimerització d'actina mediada per ActA i el complex ARP propulsa el bacteri a través de la cèl·lula? En la cua en forma de cometa del filament d'actina, quin extrem —el més o el menys— es dirigeix cap al bacteri?

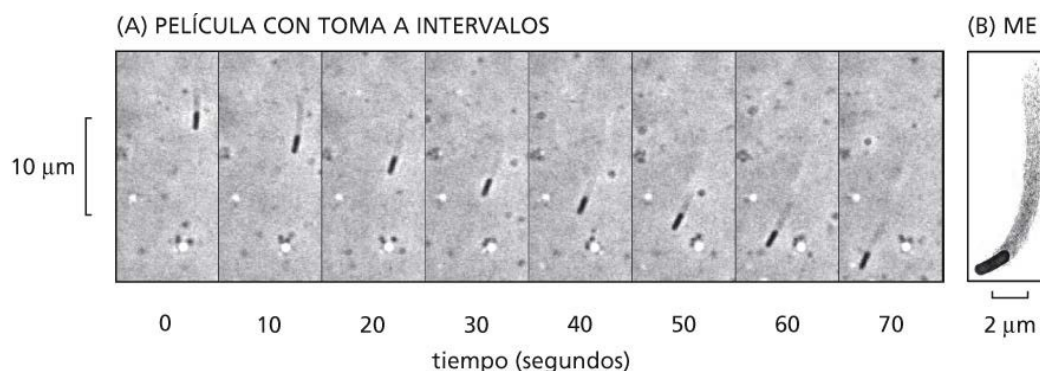


Figura 1. Moviment d'un bacteri a través del citosol mitjançant una estructura semblant a la cua d'un cometa de filaments d'actina. (A) Pel·lícula amb presa d'imatges a intervals. (B) Micrografia electrònica. El bacteri té 2 µm de longitud.

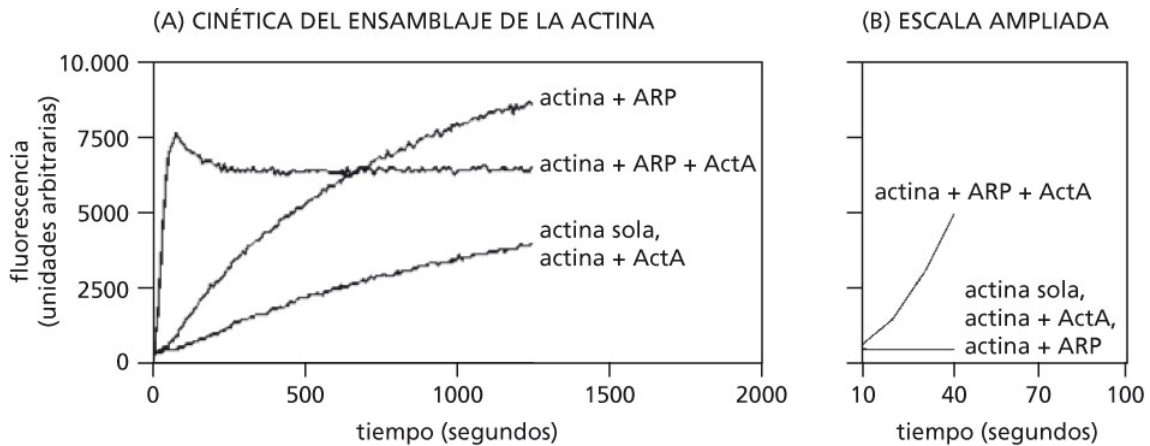


Figura 2. Efectes de l'ActA i del complex ARP en la polimerització d'actina.

- A) Cinètica de la polimerització de l'actina en presència d'ActA i del complex ARP.
 B) Cinètica de polimerització en una escala ampliada. En tots els casos, l'actina va estar present a 2 μ M, i l'ActA i el complex ARP a 30 nM.

R:

- a) L'ActA sola no té cap efecte en la polimerització de l'actina. El complex ARP estimula la velocitat de la polimerització de l'actina, però no disminueix substancialment la fase de latència abans que comence la polimerització (vegeu la figura 2B), que és una mesura de la velocitat de nucleació. Així, l'absència d'un efecte en la fase de latència indica que el complex ARP no nuclea de forma eficient la polimerització de l'actina sota aquestes condicions. La combinació d'ActA i del complex ARP estimula en gran manera la nucleació (disminueix la fase de latència) i augmenta la velocitat de polimerització. L'augment en la velocitat pot ser conseqüència d'una nucleació accelerada, que generaria molts més extrems i, per tant, velocitats de polimerització més ràpides.
- b) La proteïna ActA estimula la nucleació de nous filaments d'actina mitjançant el complex ARP, de manera que la polimerització es produeix en l'immediat veïnatge del bacteri (ja que ActA està unida a la superfície bacteriana). La polimerització de l'actina està orientada de manera que els extrems en creixement —els extrems més— apunten cap al bacteri. En aquesta orientació, els extrems en creixement poden "espantar" el bacteri i desplaçar-lo cap avant (tant com la xarxa de filaments d'actina espanta la membrana plasmàtica en el front d'avanç del lamel·lipodi). La forma en què els filaments d'actina espanten el bacteri no es coneix totalment. Una corriola dentada tèrmica proporciona una manera versemblant de pensar en això. El moviment tèrmic permet la separació suficient entre el bacteri i els extrems dels filaments nucleats perquè l'actina pugui polimeritzar en l'extrem; llavors, l'extrem actua com una corriola dentada que impedeix el moviment cap endarrere del bacteri. La xarxa d'actina està probablement ancorada d'alguna forma al citoesquelet de la cèl·lula, que impedeix el seu propi moviment cap endarrere. Així, el bacteri està movent-se cap endavant mitjançant un moviment tèrmic a l'atzar i per la polimerització unidireccional de l'actina. Mentre es desplaça cap endavant, el bacteri crea nous llocs de nucleació i perpetua així el seu moviment.

Referències: Dramsi, S. i Cossart, P. (1998). "Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton". *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 137-166.

Welch, M. D.; Rosenblatt, J.; Skoble, J.; Portnoy, D. A. i Mitchison, T. J. (1998). "Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation". *Science* 281, 105-108.

3.23. Disposes de dues proteïnes i sospites que ambdues encasqueten els extrems dels filaments d'actina. Per a determinar si ho fan i, en cas afirmatiu, quines proteïnes encasqueten cada extrem, mesures la formació de filaments com la funció de la concentració d'actina en absència d'ambdues proteïnes, en presència de la proteïna 1 i en presència de la 2 (figura 1). Quina proteïna encasqueta l'extrem més i quin el menys? Raona la resposta. Proporciona exemples de proteïnes cel·lulars que esperaries que es comportaren com la proteïna 1 i com la proteïna 2.

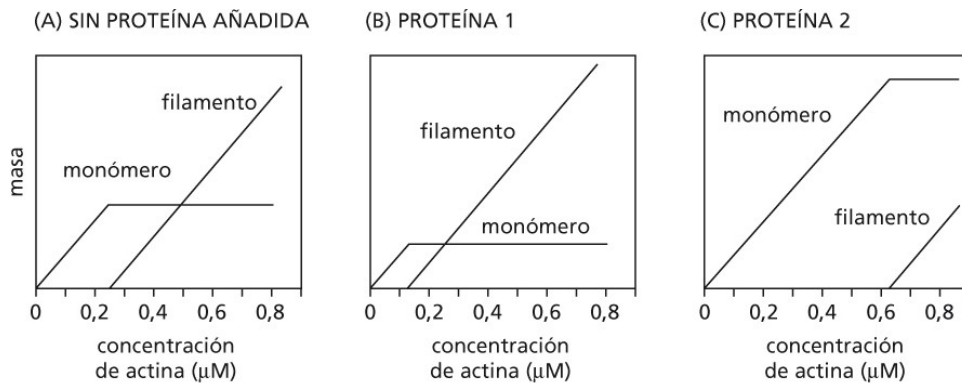


Figura 1. Efectes de dues proteïnes en la polimerització de l'actina. (A) Polimerització de l'actina pura. (B) Polimerització de l'actina en presència de la proteïna 1. (C) Polimerització d'actina en presència de la proteïna 2. La massa d'actina, com a monòmers o filaments, es va determinar en l'equilibri.

3.24. Verdader o fals? Explica per què.

En la majoria de les cèl·lules animals, els motors microtubulars dirigits cap a l'extrem menys alliberen la seua càrrega en la perifèria de la cèl·lula, mentre que els motors microtubulars dirigits cap a l'extrem més alliberen la seua càrrega a l'interior de la cèl·lula.

R: Fals. El centrosoma, que estableix la disposició dels principals feixos de microtúbuls en la majoria de cèl·lules animals, nuclea el creixement dels microtúbuls en l'extrem menys. Així, els extrems més dels microtúbuls estan prop de la membrana plasmàtica i els extrems menys es localitzen en el centrosoma en el centre de la cèl·lula. Aquesta orientació requereix que els motors dirigits cap als extrems més s'utilitzen per al transport cap a la perifèria cel·lular i els motors dirigits cap als extrems menys, per al transport cap al centre de la cèl·lula.

3.25. Una tècnica molt útil per a estudiar una proteïna motora dels microtúbuls consisteix a unir aquestes proteïnes a un còbreobjectes de vidre a través de les seues cues (les cues s'adhereixen amb força a una superfície de vidre neta) i llavors deixar que els microtúbuls es dipositen sobre aquestes. En el microscopi òptic, es pot observar com es mouen els microtúbuls per la superfície del còbreobjectes mentre els caps de les proteïnes motores els impulsen (figura 1).

- En quina direcció avançaran els microtúbuls sobre un llit de motors de dineïna, es mouran cap a l'extrem més o cap a l'extrem menys?
- En l'experiment de la figura 1, es van marcar alguns dels microtúbuls amb partícules d'or que es van unir mitjançant anticossos específics contra l'extrem menys. És la proteïna motora del còbreobjectes una proteïna que es dirigeix cap a l'extrem més o cap a l'extrem menys? Raona la resposta.

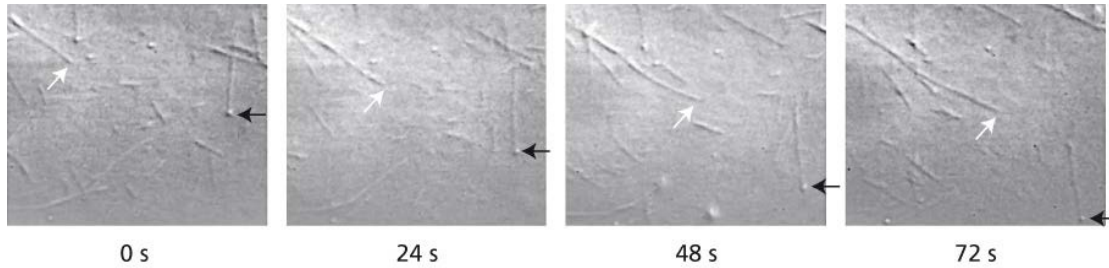


Figura 1. Moviment de microtúbuls en un llit de molècules motores de microtúbuls. Les fletxes negres marquen el moviment d'un microtúbul marcat amb una partícula d'or unida mitjançant anticossos a l'extrem menys d'un microtúbul; les fletxes blanques assenyalen el moviment d'un microtúbul que no està marcat amb una partícula d'or. Les imatges es van prendre utilitzant microscòpia de contrast interferencial millorada per vídeo.

Referència: Fan, J.; Griffiths, A. D.; Lockhart, A.; Cross, R. A. i Amos, L. A. (1996). "Microtubule minus ends can be labeled with a phage display antibody specific to α -tubulin". *J. Mol. Biol.* 259, 325-330.

3.26. La cinesina transporta vesícules durant llargues distàncies al llarg dels microtúbuls de la cèl·lula. Són essencials els dos dominis motors de la cinesina per a complir aquesta funció, o podria ser funcional la molècula amb un sol dels seus caps motors? Utilitzant tècniques de DNA recombinant, es va preparar una versió de la cinesina idèntica a la cinesina normal però sense un dels seus dominis motors. La cinesina de tipus salvatge amb dos dominis motors i la cinesina recombinant amb un domini motor es van adherir a cobreobjectes a diferents densitats i es va determinar la velocitat a la qual s'unien i es movien els microtúbuls (denominada col·lectivament taxa d'interacció) (figura 1).

- Per què suposes que les corbes són tan diferents quan les densitats de les proteïnes motores són baixes?
- Quina informació proporcionen aquests experiments sobre l'estructura de la cinesina: són necessaris els dos caps per al transport de vesícules o només se'n necessita un? Explica el teu raonament.

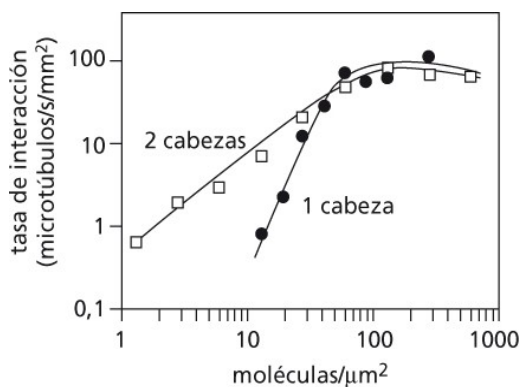


Figura 1. Taxa d'interacció —unió i moviment— dels microtúbuls en funció de la densitat de proteïnes motores. Els resultats amb la cinesina de tipus salvatge es mostren com a quadrats buits, mentre que els resultats amb la cinesina recombinant es mostren com a cercles sòlids.

Referència: Hancock, W. O. i Howard, J. (1998). "Processivity of the motor protein kinesin requires two heads". *J. Cell Biol.* 140, 1395-1405.

R:

- a) Les diferències en les taxes d'interacció a densitats baixes de les cinesines de dos caps i d'un cap indiquen que es necessiten molts motors de cinesina d'un cap per a moure un microtúbul, a diferència de la situació amb dos motors de cinesina. A una densitat elevada de proteïnes motores, les taxes d'interacció per a tots dos motors són quasi les mateixes. La taxa d'interacció de la cinesina de doble cap disminueix linealment amb la densitat, mentre que la taxa d'interacció per a la cinesina d'un cap augmenta en gran manera a densitats baixes. Aquest comportament indica que una sola cinesina de doble cap és suficient per a moure un microtúbul, però que es necessiten més cinesines d'un cap (entre quatre i sis d'acord amb els autors) per a moure'l. Una cinesina d'un cap pot unir-se a un microtúbul, però quan faça el pas següent, el microtúbul s'haurà allunyat. Per tant, es necessiten més cinesines d'un cap perquè puguin mantenir fix el microtúbul mentre les altres s'alliberen i es tornen a unir.
- b) Dos caps són millor que un. En principi, un sol motor de cinesina amb dos caps podria desplaçar una vesícula llargues distàncies al llarg d'una sendera de microtúbuls, ja que es manté unida amb una "mà", mentre que amb l'altra s'allibera i s'uneix de nou. Una cinesina amb un cap perdria el seu camí cada vegada que se soltara del microtúbul per a fer el pas següent.

3.27. En la figura 1, es mostra una electromicrografia d'una secció transversal d'un flagel.

- a) Assigna els components següents a les posicions indicades en la figura.

R:

- 3 Microtúbul A
- 5 Microtúbul B
- 8 Braç exterior de la dineïna
- 4 Braç interior de la dineïna
- 1 Baina inferior
- 7 Nexina
- 2 Espina radial
- 6 Parell de microtúbuls senzills

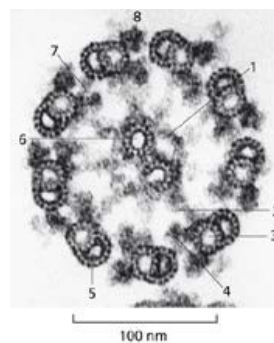


Figura 1. Electromicrografia d'una secció transversal d'un flagel de *Chlamydomonas reinhardtii*.

- b) Quines d'aquestes estructures estan compostes per tubulina?

R: Els microtúbuls A i B dels doblets exteriors i el parell central de microtúbuls estan formats per tubulina α i β .

3.28. El moviment dels fibroblastos en cultiu s'interromp immediatament en afegir citocalasina B, que encasqueta els filaments d'actina. Si s'hi afegeix colquicina, que despolimeritza els microtúbuls, els fibroblastos cessen el seu moviment dirigit i estenen lamel·lipodis en direccions a l'atzar. La injecció en aquestes cèl·lules d'anticòs contra el filament intermedi vimentina no sembla tenir cap efecte en la migració. Què suggereixen aquestes observacions sobre la implicació dels tres tipus de filaments del citoesquelet en el moviment dels fibroblastos?

R: La capacitat de la citocalasina B, que interfereix amb la formació dels filaments d'actina, per a detenir el desplaçament demostra la gran importància de l'actina en el moviment cel·lular. L'experiment amb colquicina demostra que els microtúbuls són necessaris per a donar polaritat a la cèl·lula, i determinen l'extrem de la cèl·lula que es convertirà en el front d'avanç. En absència de microtúbuls, les cèl·lules es desplacen normalment i poden estendre lamel·lipodis, però si no hi ha una polaritat cel·lular definida, aquests esforços són inútils i es produeixen de forma indiscriminada en totes les direccions. La injecció d'un anticòs contra la vimentina no va tenir efecte; aquest fet suggereix que els filaments intermedis no són necessaris per a mantenir la polaritat de la cèl·lula o per al seu desplaçament. Un anticòs, quan s'uneix, sovint interfereix amb les funcions de la seua proteïna diana impedit que interactue adequadament amb altres components cel·lulars.

3.29. El marcatge característic de l'actina en una cèl·lula quiescent es mostra en la figura 1A. Quan en aquestes cèl·lules s'injecta una forma constitutivament activada de les GTP-ases monomèriques Rac, Rho o Cdc42, es produeixen canvis dràstics en el seu citoesquelet d'actina. Quina GTP-asa està associada amb la formació de fibres d'estrès (figura 1B), lamel·lipodis (figura 1C) i fil·lopodis (figura 1D)?

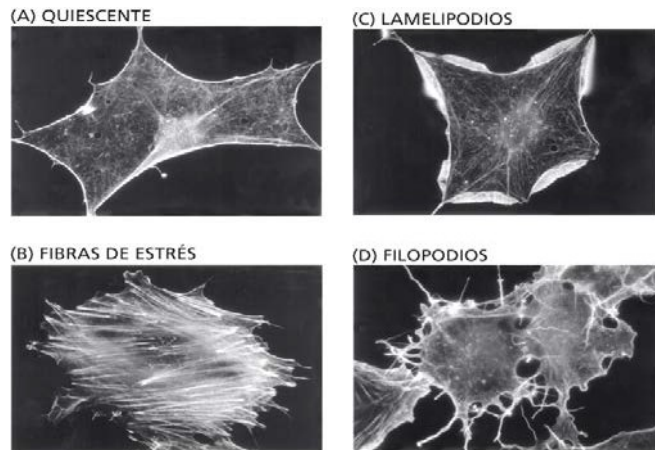


Figura 1. El citoesquelet d'actina en diferents cèl·lules. (A) Cèl·lules quiescents. (B) Cèl·lules amb abundants fibres d'estrès. (C) Cèl·lules amb múltiples lamel·lipodis. (D) Cèl·lules amb molts fil·lopodis llargs. Les cèl·lules en B, C i D van ser injectades amb una forma activada d'una GTP-asa monomèrica.

Referència: Hall, A. (1998). "Rho GTPases and the actin cytoskeleton". *Science* 279, 509-514.

3.30. Els ratolins homozigots per a un *knockout* del gen de la proteïna motora cinesina KIF1B moren en néixer. Els ratolins heterozigots sobreviuen, però pateixen una debilitat muscular progressiva semblant a algunes neuropaties humanes. Els éssers humans que pateixen la malaltia de Charcot-Marie-Tooth tipus 2A tenen una mutació en una còpia del gen de KIF1B que impedeix que la proteïna s'unisca al ATP. Els ratolins heterozigots i els pacients humans pateixen neuropaties progressives molt semblants. Com suposes que la pèrdua d'una còpia d'un gen d'un motor de cinesina pot tenir aquests profunds efectes en la funció nerviosa?

TEMA 4. LA MATRIU EXTRACEL·LULAR

4.1. Relaciona les definicions següents amb el terme adequat del llistat que segueix.

- a) Proteïna fibrosa rica en glicina i prolina que, en la majoria de les seues formes, és el component més abundant de la matriu extracel·lular (MEC) i dels teixits conjuntius.

R: col·lagen

- b) Xarxa complexa de polisacàrids (com els glicosaminoglicans i la cel·lulosa) i proteïnes (com els col·làgens) secretats per les cèl·lules que constitueix un element estructural dels teixits i influeix en el desenvolupament i la fisiologia tissulars.

R: matriu extracel·lular

- c) Nom comú que reben els polisacàrids llargs i lineals amb càrrega abundant, compostos per parells repetits de sucres, un dels quals és sempre un sucre amino, que està unit de manera covalent a una proteïna central en la matriu extracel·lular.

R: glicosaminoglicà (GAG)

- d) Tipus de molècula de col·lagen que s'assembla formant estructures a manera de corda.

R: col·lagen fibril·lar

- e) Proteïna de la MEC que s'uneix a integrines de la superfície cel·lular per a promoure l'adhesió cel·lular a la matriu i proporcionar una guia per a la migració durant l'embriogènesi.

R: fibronectina

- f) Proteïna hidrofòbica que forma fibres extensibles extracel·lulars que proporcionen elasticitat i resistència als teixits.

R: elastina

- g) Tipus cel·lular comú en el teixit conjuntiu que secreta una MEC rica en col·lagen i altres molècules de la MEC.

R: fibroblast

- h) Proteïna de la MEC que es troba en les làmines basals formant una xarxa laminar.

R: laminina-1

col·lagen	glicosaminoglicà (GAG)
col·lagen associat a fibril·les	laminina-1
col·lagen fibril·lar	matriu extracel·lular
elastina	metal·loproteasa de matriu
fibra elàstica	serina proteasa
fibril·la de col·lagen	fibroblast
fibronectina	proteoglican
repetició de fibronectina de tipus III	seqüència RGD
hialuronan	làmina C

4.2. Compara la MEC dels teixits animals amb les parets cel·lulars dels teixits vegetals.

- a) Quin principi d'organització bàsica és comú tant a la MEC com a les parets cel·lulars?
b) Quins són els components químics en cada cas?
c) Quines funcions comparteixen la MEC i la paret cel·lular?
d) Quines funcions són exclusives de la MEC? I de la paret cel·lular?

4.3. Vertader o fals? Explica per què.

- a) La MEC és una armadura relativament inerta que estabilitza l'estructura dels teixits.

Fals. La matriu extracel·lular exerceix un paper actiu de tal manera que influeix en el desenvolupament, la migració, la proliferació, la forma i el metabolisme de les cèl·lules que estan en contacte amb aquesta.

- b) Una de les principals diferències químiques entre els proteoglicans i altres glicoproteïnes resideix en l'estructura de les seues cadenes laterals de carbohidrats: els proteoglicans contenen sobretot cadenes laterals de polisacàrids llargs i sense ramificacions, mentre que altres glicoproteïnes contenen oligosacàrids molt més curts i molt ramificats.

Vertader. A més d'aquestes diferències, els carbohidrats poden constituir fins a un 95% del pes dels proteoglicans, mentre que altres glicoproteïnes generalment contenen un percentatge menor de carbohidrats (1-60%).

- c) L'elasticitat de l'elastina és deguda al seu gran contingut d'hèlixs- α , que actuen com a molls moleculars.

Fals. L'elasticitat de les fibres d'elastina es deu al fet que no presenten estructura secundària: l'elastina forma espirals aleatòries que s'estiren amb facilitat. El conjunt d'enllaços d'hidrogen que estabilitzen una hèlix- α és massa resistent perquè es puguen trencar per qualsevol dels diferents tipus de forces que deformen l'elastina.

- d) En humans, totes les formes de fibronectina es produeixen mitjançant la maduració alternativa d'un gen únic de molta grandària.

Vertader. Només hi ha un gen de la fibronectina en el genoma humà. Aquest gen, que conté uns 50 exons, pot madurar de moltes formes i produir nombroses isoformes diferents de fibronectina.

- e) La làmina basal està formada per components proporcionats per diferents tipus cel·lulars, normalment per cèl·lules epitelials en un costat i cèl·lules estromàtiques (de teixit conjuntiu) en l'altre.

Vertader. Per exemple, les laminines són sintetitzades sobretot per les cèl·lules epitelials, mentre que els col·làgens són sintetitzats per les cèl·lules estromàtiques.

- f) Un proteoglican de la làmina basal del glomèrul renal exerceix un paper essencial en el filtratge de les molècules que passen del flux sanguini a l'orina.

Vertader. La làmina basal que separa les cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis de les cèl·lules epitelials del renyó actua com un component crucial en el filtratge de les molècules que passen de la sang a l'orina. El proteoglican responsable d'aquesta funció de filtre és el perlecà, un proteoglican d'heparan sulfat. Els forats que presenten les làmines de les cèl·lules permeten la comunicació a través de la làmina basal, però també exerceixen un paper important en el procés de filtratge.

- g) La majoria de les distròfies musculars (malalties de desgast muscular) es produeixen per alteracions en els components de la làmina basal especialitzada que envolta les fibres musculars.

Vertader. Hi ha nombrosos exemples. La distròfia muscular congènita és causada per una mutació en la laminina- $\alpha 2$. La distròfia muscular de Duchenne és causada per un defecte en la distrofina, una proteïna intracel·lular que enllaça el distroglican al citoesquelet. A més, diverses mutacions en el distroglican, la integrina- $\alpha 7$ i les cadenes α del col·lagen de tipus IV causen malalties de desgast muscular, en les quals el múscul es desenvolupa amb normalitat, però no pot mantenir-se sa, potser a causa d'un mal funcionament muscular gradual en absència d'una làmina basal ben formada, o perquè la làmina basal defectuosa no pot realitzar les seues funcions de senyalització i de promoció de la supervivència cel·lular.

Referència: Sanes, J. R. (2003). "The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle". *J. Biol. Chem.* 278, 12601-12604.

4.4. Escorbut i col·lagen. L'escorbut és una malaltia que fins al segle XIX va ser comuna entre els mariners i altres persones les dietes de les quals eren deficientes en vitamina C (àcid ascòrbic), que serveix com a agent reductor responsable de l'activitat de la hidroxilasa de prolina durant la síntesi del col·lagen. Els individus amb escorbut pateixen gran varietat d'afeccions, incloent-hi extenses moradures, hemorràgies i l'alteració de teixits de suport estructural.

- a) Segons aquesta informació, postula com s'arriba a símptomes com ara moradures i alteracions de teixits de suport a partir d'una dieta deficient en vitamina C.
- b) Per què creus que l'escorbut afecta distintament diferents teixits, fins i tot entre els diferents tipus de teixits conjuntius?
- c) Ara no et serà difícil deduir el perquè del sobrenom "limeys", amb el qual van començar a conèixer-se els mariners anglesos després de ser descoberta la relació entre l'escorbut i l'àcid ascòrbic.

4.5. S'ha especulat que Abraham Lincoln patia la síndrome de Marfan, principalment perquè era molt alt (1,92 metres quan la mitjana era d'1,67 metres) i molt prim. Quines altres característiques corporals i quin tipus de proves podrien ser utilitzades per a fer un diagnòstic més adequat en un individu del qual se sospita que pot patir aquesta síndrome? Quina proteïna està mutada en aquests malalts? Com es relaciona l'alteració a nivell de la proteïna amb les alteracions corporals?

4.6. La làmina basal del glomèrul renal és molt ampla i és un element clau del complex molecular de filtració que controla el pas de soluts a l'orina. En general, es filtren 180 L de fluid a través del renyó cada dia, però la majoria són reabsorbits, i només 1,5 L són alliberats en forma d'orina. La filtració inicial és selectiva en funció de la grandària, la forma i la càrrega.

- a) La grandària efectiva d'un porus és menor per a soluts carregats negativament que per a soluts de la mateixa grandària però carregats positivament. Quines característiques de la làmina basal creus que estarien contribuint en aquesta filtració selectiva per càrrega de les molècules?

R: La grandària efectiva d'un porus és més reduïda per a soluts carregats negativament perquè la làmina basal, per si mateixa, presenta nombroses càrregues negatives. Aquestes càrregues, procedents de les cadenes polisacàridiques dels glicosaminoglicans dels seus proteoglicans, tendeixen a repel·lir els soluts carregats negativament, amb la qual cosa els dificulta el pas a través de la làmina basal, la qual cosa disminueix la grandària efectiva del porus.

- b) Per a soluts neutres del mateix pes molecular, la grandària efectiva del porus és menor per a les molècules esfèriques que per a les allargades. Quina creus que és la base d'aquesta filtració per forma de la molècula?

R: La selectivitat per la forma sorgeix perquè les dimensions dels porus són fixes. Les molècules allargades travessen porus més petits que les molècules esfèriques, ja que són més primes. Per analogia, un fil molt llarg es pot colar a través d'un forat molt més petit que el que es necessitaria per a fer passar el fil enrotllat en un cabdell.

4.7. No resulta fàcil assignar funcions específiques a cadascun dels components de la làmina basal, ja que és una estructura composta per un material complex amb propietats mecàniques i de senyalització. Per exemple, el nidogen entrellaça dos components principals de la làmina basal mitjançant la unió de cadenes de laminina- γ 1 amb col·lagen de tipus IV. Donat aquest paper clau, és sorprenent que els ratolins mutants homozigots per al gen del nidogen-2 siguin completament normals. No obstant això, els ratolins que són homozigots per a una mutació concreta del gen que codifica la laminina- γ 1, que elimina la regió d'unió al nidogen, moren en nèixer amb defectes greus en la formació del pulmó i del renyó. La porció mutant de la cadena de la laminina- γ 1 no sembla tenir una altra funció que la d'unir el nidogen i no altera ni l'estructura de la laminina ni la seua capacitat d'unir-se a la làmina basal.

Com explicaries el resultat de les alteracions genètiques resumides en la taula 1?

Referència: Sasaki, T.; Fassler, R. i Hohenester, E. (2004). "Laminin: the crux of basement membrane assembly". *J. Cell Biol.* 164, 959-963.

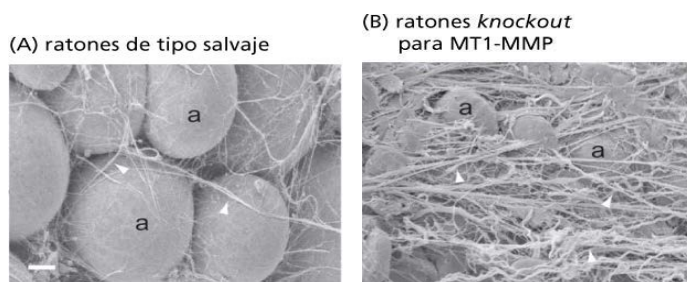
Taula 1. Fenotips de ratolins amb defectes genètics en components de la làmina basal.

PROTEÏNA	DEFECTE GENÈTIC	FENOTIP
nidogen-1	silenciament del gen (-/-)	cap
nidogen-2	silenciament del gen (-/-)	cap
laminina- γ 1	deleció del lloc d'unió al nidogen (+/-)	cap
laminina- γ 1	deleció del lloc d'unió al nidogen (-/-)	mort en nèixer

+/- significa heterozigot, -/- significa homozigot

4.8. Normalment, la làmina basal proporciona una barrera impenetrable a les cèl·lules, però cèl·lules com els limfòcits o els macròfags són capaces de creuar aquesta barrera gràcies al fet que digereixen els components de la làmina utilitzant metal·loproteases matricials (MMP). Aquesta família de proteases està implicada en les funcions fisiològiques normals, així com en moltes malalties. Per exemple, perquè les cèl·lules canceroses facen metàstasis, aquestes han de travessar la làmina basal. Com a conseqüència de la seua importància fonamental per a la ciència bàsica i per a la medicina clínica, les MMP s'han estudiat de forma exhaustiva, amb la qual cosa s'han obtingut nombrosos ratolins *knockouts*.

Així, aquests estudis s'han enfocat sobretot a l'anàlisi de la complexitat funcional de les MMP. És el cas de l'MT1-MMP, que està ancorada a la membrana cel·lular. Els ratolins *knockout* per a l'MT1-MMP mostren alteracions esquelètiques, creixen amb lentitud després de nèixer i normalment moren a les poques setmanes. Les cèl·lules derivades d'aquests animals no poden travessar gels de col·lagen (al contrari que els seus homòlegs normals). Una conseqüència d'això és l'absència total de teixit adipós blanc (veure la figura A). Els adipòcits dels ratolins mutants són molt petits en comparació amb els dels ratolins de tipus salvatge, i semblen estar atrapats en un embull de fibres de col·lagen. A més, l'ús de "microxips" de DNA per a l'anàlisi del mRNA mostra que no estan totalment diferenciats. Es desconeix la relació entre la falta de l'MT1-MMP i la incapacitat dels adipòcits per a diferenciar-se. Suggerix diferents explicacions de com la falta de l'MT1-MMP podria bloquejar la diferenciació dels adipòcits.



4.9. Relaciona les definicions següents amb el terme adequat de la llista que segueix.

- a) Coberta cel·lular prima i extensible en cèl·lules vegetals noves que pot controlar el seu creixement.

R: paret cel·lular primària

- b) Feix d'unes 40 cadenes llargues i lineals de residus glucídics units de forma covalent, tots amb la mateixa polaritat, disposades paral·lelament amb solapaments entre elles.

R: microfibril·la de cel·lulosa

- c) Element estructural de la cèl·lula responsable de l'orientació de les microfibril·les de cel·lulosa durant la seua síntesi.

R: microtúbuls corticals

- d) Gran pressió hidrostàtica interna que es forma en les cèl·lules vegetals a causa del desequilibri osmòtic entre l'interior cel·lular i el fluid de la paret cel·lular vegetal.

R: pressió de turgència

- e) Xarxa complexa de components fenòlics que forma un polímer molt abundant en les parets cel·lulars secundàries.

R: lignina

- f) Coberta cel·lular rígida dipositada per capes dins de la coberta inicial una vegada que el creixement de la cèl·lula s'ha detingut.

R: paret cel·lular secundària

- g) Component de la paret cel·lular equidistant des de la membrana de dues cèl·lules veïnes.

R: làmina mitjana

glican d'entrecruament

lignina

làmina mitjana

paret cel·lular secundària

paret cel·lular primària

pectina

pressió de turgència

microfibril·la de cel·lulosa

microtúbuls corticals

plasmodesmes

4.10. Vertader o fals? Explica per què.

- a) Cada paret cel·lular consisteix en una paret cel·lular primària fina i semirígida adjacent a la membrana cel·lular i en una paret cel·lular secundària més gruixuda i rígida per fora de la paret cel·lular primària.

Fals. Una cèl·lula madura pot simplement quedar-se amb una paret cel·lular primària o, més sovint, generar una paret cel·lular secundària rígida per a engrossir, així, la paret primària o dipositar noves capes de diferent composició per davall de les ja existents, de manera que la paret cel·lular secundària es trobaria més pròxima a la membrana plasmàtica que la paret cel·lular primària.

- b) La pressió de turgència és la principal força que controla l'expansió de la cèl·lula durant el seu creixement i proporciona la major part de la rigidesa mecànica dels teixits vegetals vius.

Vertader. Sense una pressió de turgència, les cèl·lules que creixen no podrien expandir-se fins a la seua grandària normal i les plantes madures es marcarien.

- c) A diferència de la MEC de les cèl·lules animals, que conté una gran quantitat de proteïnes, les parets cel·lulars vegetals estan compostes per complet per polisacàrids.

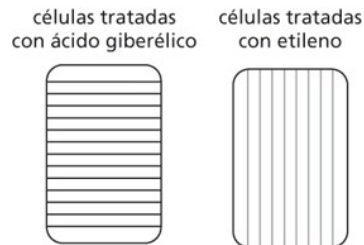
Fals. Encara que els components majoritaris de les parets cel·lulars vegetals són els polisacàrids, aquesta també conté proteïnes estructurals (que representen el 5% de la massa seca de la paret cel·lular). Sembla que aquestes proteïnes confereixen resistència a la paret. També són produïdes en grans quantitats com a

resposta local a l'atac de patògens.

4.11. Tens convidats per a dinar. Només disposes d'un encisam marcit i passat; recordes vagament que hi ha un truc per a rejuvenir-lo, però no saps quin és. Posaries l'encisam en remull en aigua salada, en aigua ensucrada, en aigua de l'aixeta o el posaries davall d'una llum intensa perquè la fotosíntesi el reanimara?

4.12. En les cèl·lules vegetals, l'organització cortical dels microtúbuls determina l'orientació de les microfibril·les de cel·lulosa, que, al seu torn, fixen la direcció de l'expansió de la cèl·lula. Les cèl·lules s'allarguen perpendicularment a l'orientació de les microfibril·les de cel·lulosa. Factors de creixement vegetals com l'etilè i l'àcid gibberèlic tenen efectes oposats en l'orientació de la xarxa de microtúbuls en les cèl·lules epidèrmiques de brots joves de pèsols. L'àcid gibberèlic indueix una orientació de la xarxa de microtúbuls corticals perpendicular a l'eix longitudinal de la cèl·lula, mentre que el tractament amb etilè causa una orientació paral·lela a aquest eix (veure la figura).

Quin tractament consideres que produiria brots curts i amples, i quin produiria brots llargs i prims?



TEMA 5. ADHESIÓ CEL·LULAR I UNIONS INTERCEL·LULARS

5.1. Per a cadascun dels termes de la llista A, tria un terme de la llista B i explica la relació entre tots dos, bé siga per la seua semblança o per la seua diferència estructural o funcional.

R:

Llista A	Llista B
1 col·lagen	7 superfície basolateral
2 fibronectina	6 adhesió focal
3 integrina	1 elastina
4 IgSF	2 laminina
5 MEC	4 cadherina
6 hemidesmosoma	5 glicocàlix
8 superfície apical	3 selectina

5.2. **Proteïnes i estructures d'unió.** Indica si cadascuna de les proteïnes o estructures següents és un component de les unions adherents (A), de les unions d'oclusió (O), de les unions comunicants o de tipus *gap* (G), o dels plasmodesmes (P), i explica breument el paper que exerceix la proteïna en la unió.

R:

- a) Connexina: G; forma canals citoplasmàtics entre cèl·lules animals adjacents.
- b) Vinculina: A, ancora filaments d'actina a la membrana plasmàtica.
- c) Desmocolina: A, uneix les membranes de dues cèl·lules veïnes en els desmosomes.
- d) Desmotúbul: P, estructura tubular localitzada en el centre dels plasmodesmes.
- e) Desmoplaquina: A, forma part de les plaques d'ancoratge dels desmosomes.
- f) Anell o *annulus*: P, forma canals citoplasmàtics entre cèl·lules vegetals adjacents.
- g) Cadherina: A, proteïna transmembrana d'unió en les unions d'ancoratge.
- h) Claudina: O, proteïnes de membrana formadores de cordons segelladors en les unions estretes.

5.3. **Compara les unions intercel·lulars.** Indica si cadascuna de les afirmacions següents és verdadera per a les unions adherents (A), les unions d'oclusió (O), les unions comunicants o de tipus *gap* (G), i/o els plasmodesmes (P). Les afirmacions poden ser certes per a alguna, totes o cap (N) d'aquestes estructures.

- a) S'associa amb filaments que confereixen tant propietats contràctils com de tensió.
R: A
- b) Requereix l'alineació de connexons en la membrana plasmàtica de dues cèl·lules adjacents.
R: G
- c) Segella estretament les membranes de dues cèl·lules adjacents entre si mitjançant la fusió de membranes formant cordons proteïnics.
R: O
- d) Permet l'intercanvi de metabòlits entre el citoplasma de dues cèl·lules adjacents.
R: G, P

5.4. Relaciona les definicions següents amb el terme adequat de la llista que segueix més avall:

- a) Membre d'una família de proteïnes de la superfície cel·lular que s'uneixen a carbohidrats i que medien adhesions intercel·lulars transitòries dependents de Ca^{2+} en el flux sanguini; per exemple, entre els leucòcits i l'endoteli que revesteix els vasos sanguinis.

R: selectina

- b) Interacció entre proteïnes iguals en què una molècula d'una cèl·lula s'uneix a una altra molècula idèntica, o molt relacionada, d'una cèl·lula adjacent.

R: homofílica

- c) Tipus d'unió d'ancoratge, normalment formada per dues cèl·lules epitelials, caracteritzada per plaques denses de proteïnes en què s'insereixen filaments intermedis de dues cèl·lules adjacents.

R: desmosoma (unió d'ancoratge)

- d) Membre d'una gran família de proteïnes transmembrana que intervenen en l'adhesió de les cèl·lules a la matriu extracel·lular o a altres cèl·lules.

R: integrines

- e) Unió d'ancoratge que connecta els filaments d'actina d'una cèl·lula amb els d'una altra cèl·lula adjacent.

R: unió adherent

- f) Membre d'una família de proteïnes que intervenen en l'adhesió intercel·lular dependent de Ca^{2+} en els teixits animals.

R: cadherina

- g) Unió d'ancoratge que es disposa en una banda que envolta per complet el pol apical d'una cèl·lula epitelial per a unir-la a una cèl·lula adjacent.

R: banda d'adhesió

- h) Principal tipus d'unió oclusiva en invertebrats; segella les cèl·lules epitelials adjacents i evita el flux de la majoria de molècules solubles d'una cara a una altra de la làmina epitelial.

R: unió septada

- i) Referit a la cara superior d'una cèl·lula. En el cas de les cèl·lules epitelials, es tracta de la superfície lliure exposada, oposada a la superfície adherida a la làmina basal.

R: apical

- j) Unions comunicants intercel·lulars en vegetals en què un canal citoplasmàtic envoltat per la membrana plasmàtica connecta dues cèl·lules adjacents a través d'un petit porus en les seues parets cel·lulars.

R: plasmodesmes

- k) Canals aquosos en la membrana plasmàtica formats per un anell de sis subunitats proteiques, que s'uneixen a un complex idèntic situat en una cèl·lula adjacent per a formar un canal continu entre les dues cèl·lules.

R: connexó

- l) Principal receptor en cèl·lules animals que s'uneix a la majoria de les proteïnes de la MEC, inclosos els col·lagens, la fibronectina i les laminines.

R: integrina

cadherina
connexina

proteïna d'armadura
proteïna transmembrana d'adhesió

família de proteïnes Rho	cinasa de les adhesions focals (FAK)
desmina	homofíllica
integrina	plasmodesmes
unió d'ancoratge	unió adherent
apical	unió formadora de canal
unió estreta	connexó
selectina	unió septada

5.5. Vertader o fals? Explica per què.

- a) Les cadherines promouen les interaccions intercel·lulars en unir-se a altres molècules de cadherina semblants en les cèl·lules adjacents.

Vertader. Aquesta unió d'igual a igual és la raó per la qual la interacció entre cadherines de cèl·lules adjacents rep el nom d'homofíllica.

- b) Encara que tant les cadherines com els membres de la família de les immunoglobulines (Ig) s'expressen sovint en les mateixes cèl·lules, les adhesions mediades per molècules Ig són molt més fortes i, per tant, són les màximes responsables de mantenir les cèl·lules unides entre si.

Fals. Les adhesions mediades per cadherines són molt més fortes que les mediades per membres de la família de les Igs. Així, les cadherines són les principals responsables que les cèl·lules es mantinguin unides entre si, per a la qual cosa segreguen els diferents col·lectius cel·lulars en teixits específics i mantenen la integritat tissular.

- c) A diferència dels canals iònics convencionals, els canals de les unions de tipus *gap* romanen oberts contínuament una vegada que s'han format.

Fals. Els canals de les unions de tipus *gap* canvien contínuament entre els estats obert i tancat.

- d) Quasi tots els epitelis estan ancorats a altres teixits per la seua cara basal mentre que la seua cara apical es troba lliure.

Vertader. La polaritat de la majoria dels epitelis és la mateixa: la superfície basal està ancorada a la làmina basal, la qual es recolza en altres teixits, mentre que la superfície apical està exposada.

- e) Les unions estretes exerceixen dues funcions diferents: segellen l'espai entre les cèl·lules amb la finalitat de restringir el flux paracel·lular i formen un mur que separa els dominis de membrana per a evitar que les proteïnes apicals i basolaterals es mesclen.

Vertader. Les barreres formades per les proteïnes de les unions estretes limiten tant el flux de molècules en els espais intercel·lulars com la difusió de les proteïnes (i lípids) des del domini apical al basolateral i viceversa.

- f) De la mateixa manera que els transports que esdevenen a través de la membrana plasmàtica, el transport paracel·lular pot ser actiu o passiu.

Fals. Tot el transport paracel·lular és passiu; és conseqüència del moviment de material sota un gradient electroquímic.

- g) Les cèl·lules vegetals poden formar un sincici, en el qual diversos nuclis cel·lulars comparteixen un citoplasma comú.

Vertader. Com que totes les cèl·lules d'una planta estan connectades per plasmodesmes, tots els seus nuclis comparteixen un citoplasma comú. No obstant això, com que els plasmodesmes limiten el flux dels components de molta grandària, les cèl·lules no comparteixen la majoria de les seues macromolècules.

- h) Les integrines poden convertir senyals mecànics en senyals moleculars.

Vertader. La tensió —un senyal mecànic— aplicada a una integrina pot fer que aquesta s'adherisca amb més força a les estructures intracel·lulars i extracel·lulars, incloent-hi no solament els components del citoesquelet i de la matriu, sinó també els complexos moleculars de senyalització. Així mateix, la pèrdua

de tensió pot afeblir-ne la unió, de manera que els complexos moleculars de senyalització es desorganitzen en tots dos costats de la membrana. Així, la tensió en les integrines pot activar o inhibir la senyalització molecular.

- i) Sembla que les integrines són com bastons rígids que travessen la membrana i que enllacen punts d'unió extracel·lulars amb punts d'unió intracel·lulars.

Fals. Les integrines són molècules dinàmiques que es pleguen per a amagar els seus llocs d'unió en absència de lligands intracel·lulars o extracel·lulars forts.

- j) Els eritròcits manquen d'integrines, a diferència de la major part de les cèl·lules dels vertebrats, incloses les altres cèl·lules sanguínies.

Vertader. Són cèl·lules que necessiten moure's lliurement per la sang, per la qual cosa no posseeixen molècules d'adhesió, que podrien fer que s'uniren formant agregats, però sí que necessiten en les seues membranes proteïnes com la glicoforina, l'anquirina, etc., per a reforçar la seua estructura i conferir-los la seua forma característica.

5.6. Les molècules d'adhesió cel·lular es van identificar utilitzant anticossos contra components de la superfície cel·lular amb la finalitat de bloquejar l'agregació cel·lular. En assajos de bloqueig d'adhesió, els científics van creure oportú utilitzar fragments d'anticòs formats per una sola regió d'unió (també denominats fragments **Fab**) en comptes d'utilitzar anticossos IgG intactes, és a dir, molècules en forma de Y amb dues regions d'unió idèntiques. Els fragments Fab van ser generats mitjançant la digestió d'anticossos IgG per la proteasa papaïna per a separar les dues regions d'unió (figura 1). Per què suposes que és necessari utilitzar fragments Fab per a bloquejar l'agregació cel·lular?

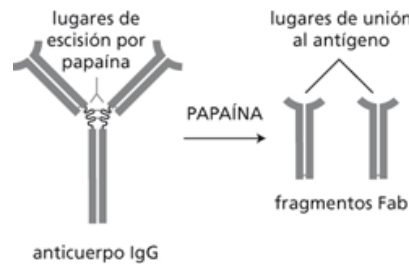


Figura 1 Producció de fragments Fab a partir d'anticossos IgG mitjançant digestió amb papaïna.

5.7. L'adhesió cel·lular pot ser bloquejada *in vitro* tractant les cèl·lules amb agents específics. Quines de les substàncies següents previsiblement interferiria amb l'adhesió cel·lular mediada per selectines? I amb l'adhesió cel·lular mediada per molècules L1-CAM?

- tripsina**, que hidrolitza proteïnes
- un pèptid que conté la seqüència **RGD**
- neuraminidasa**, que elimina l'àcid siàlic dels oligosacàrids
- col·lagenasa**, que hidrolitza el col·lagen
- hialuronidasa**, que hidrolitza l'àcid hialurònic
- EGTA**, que s'uneix i "segresta" ions Ca^{2+} del medi

5.8. Quin és el mecanisme pel qual el fibrinogen produeix l'agregació de les plaquetes que ocorre en el procés de coagulació sanguínia en el lloc de dany vascular?

5.9. En un experiment s'ha demostrat que les cèl·lules cultivades en plaques recobertes amb fibronectina i altres molècules de la MEC s'uneixen al substrat mitjançant molècules d'integrina de les

seues membranes. Si s'afegeix el tripèptid RGD a la placa de cultiu, les cèl·lules segueixen ancorades a la placa. Si s'eliminen del medi els ions Ca^{2+} i Mg^{2+} , les cèl·lules se solten de la matriu que recobreix la placa. Explica aquests resultats.

5.10. En el cuc nematode *Caenorhabditis elegans*, s'ha trobat un membre de la família de les cadherines Fat, anomenat Cdh3. Aquesta proteïna s'expressa abundantment i, per la seua estructura, sembla que pot tenir un paper important en l'adhesió cel·lular i/o en el reconeixement cel·lular en diversos processos morfogènètics. Suposa que generes un mutant en el gen *Cdh3* per a estudiar la funció d'aquesta proteïna. No obstant això, l'únic fenotip que observes és la presència de cues mal formades amb plecs aberrants o bifurcacions que són conseqüència de la deficiència d'una sola cèl·lula, denominada hyp10, que no s'allarga adequadament durant el desenvolupament de l'organisme. Per què suposes que no apareixen problemes en les altres cèl·lules del cuc que també expressen la proteïna?

5.11. Un estudi genètic ha revelat que molts individus d'una família nativa de Nova Zelanda, en la qual 25 dels seus membres han mort de càncer d'estómac en els últims 30 anys, són portadors en el seu DNA de mutacions en el gen que codifica l'E-cadherina. Com creus que les mutacions en aquest gen converteixen les cèl·lules normals en cèl·lules tumorals, que donen lloc a tumors epitelials?

5.12. En els embrions dels mamífers, els òvuls fecundats es comencen a dividir i després de les tres primeres divisions l'embrió està constituït per huit cèl·lules unides inicialment de forma laxa, però que de seguida s'adhereixen estretament en un procés conegut com a compactació (figura 1). Suposa que volem saber si les unions de tipus *gap* estan presents abans o després d'aquest canvi en l'adhesió.

Utilitzant pipetes molt fines de vidre, podem mesurar els esdeveniments elèctrics i, al mateix temps, microinjectar l'enzim peroxidasa de rave (HRP, *horseradish peroxidase*), de 40.000 daltons, o el colorant fluorescent fluoresceïna, de 330 daltons. La fluoresceïna emet llum verda brillant sota il·luminació UV; la HRP es pot detectar si es fixen les cèl·lules i s'incuben amb el substrat adequat.

Després d'injectar embrions en diferents estadis de desenvolupament, obtenim resultats diferents en els estadis de 2 i 8 cèl·lules, segons si les injeccions s'han fet immediatament després de la divisió cel·lular o més tard (figura 2). Just després de la divisió cel·lular, els ponts citoplasmàtics romanen durant uns pocs instants abans que la citocinesi es complete.

- Per què tant la HRP com la fluoresceïna entren amb rapidesa en les cèl·lules veïnes, però no més tard, en l'estadi de dues cèl·lules?
- En quin estadi embrionari es formen les unions de tipus *gap*? Raona la resposta.
- En quin dels quatre estadis del desenvolupament dibuixats en la figura 1 detectaríem l'acoblament elèctric si injectàrem corrent per l'elèctrode d'injecció de la HRP i detectàrem els canvis de voltatge en l'elèctrode de la fluoresceïna?

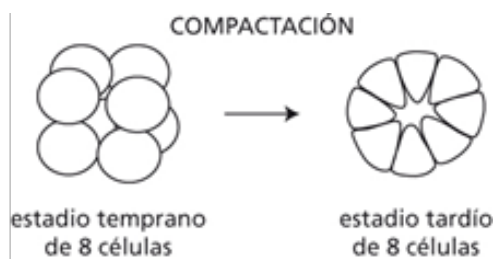


Figura 1. Compactació d'un embrió de ratolí en l'estadi de 8 cèl·lules.

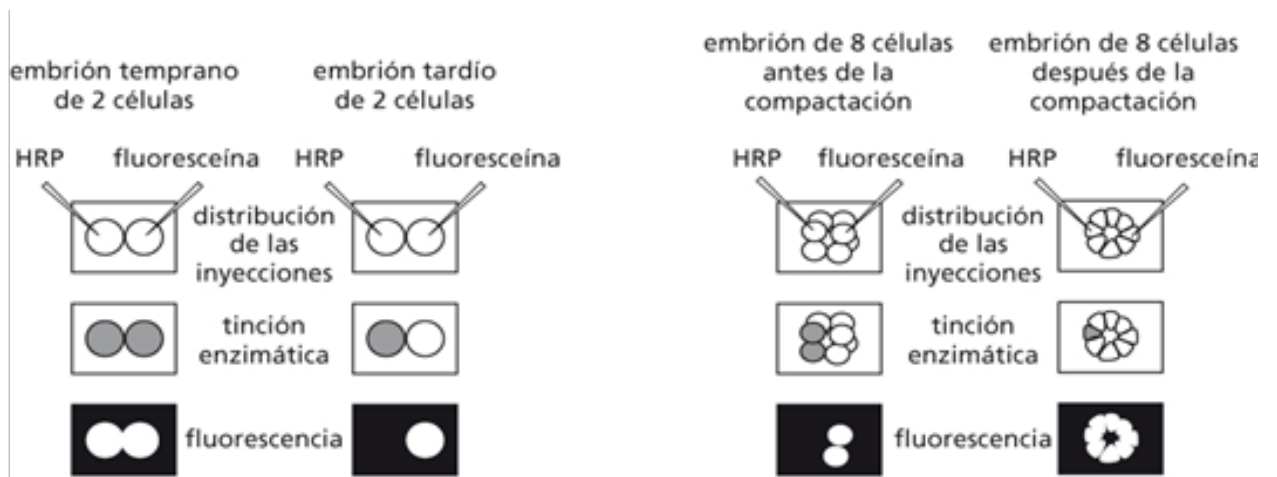


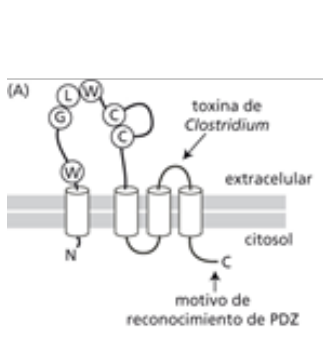
Figura 2. Microinjecció de HRP i fluoresceïna en embrions de ratolí de 2 i 8 cèl·lules.

R:

- La HRP i la fluoresceïna entren en ambdues cèl·lules en l'estadi primerenc de 2 cèl·lules (però no en l'estadi tardà de dues cèl·lules) perquè les cèl·lules encara estan connectades per ponts citoplasmàtics, que permeten el pas de grans molècules.
- Les unions de tipus *gap* es formen en l'estadi de compactació de l'embrió en desenvolupament. Com a conseqüència, la fluoresceïna pot entrar en totes les cèl·lules de l'embrió de 8 cèl·lules compactat. Atès que les unions de tipus *gap* només permeten el pas de molècules menors de 1.000 daltons, la HRP es troba confinada en la cèl·lula en la qual inicialment va ser injectada. Les diferències oposades abans i després de la compactació indiquen que la formació de les unions de tipus *gap* està associada a la compactació.
- Si injectàrem corrent des de l'elèctrode de la HRP, la detectaríem en l'elèctrode de la fluoresceïna només en l'embrió de dues cèl·lules i en l'embrió de 8 cèl·lules compactat. Només en aquests dos estadis les cèl·lules estan elèctricament acoblades. En l'estadi de dues cèl·lules, el pont citoplasmàtic que perdura de la divisió cel·lular possibilita l'acoblament; en l'estadi de huit cèl·lules, les unions de tipus *gap* possibiliten l'acoblament.

Referència: Lo, C. W. i Gilula, N. B. (1979). "Gap junctional communication in the preimplantation mouse embryo". *Cell* 18, 399-409.

5.13. Les molècules de claudina d'una cèl·lula s'uneixen a altres molècules de claudina d'una cèl·lula adjacent, formant unions estretes. Les interaccions entre els dominis extracel·lulars de les molècules de claudina aparellades formen els porus que restringeixen el transport paracel·lular de molècules petites i d'ions. El primer bucle extracel·lular de les molècules de claudina (figura A) sembla ser el que forma el porus en si. La figura B mostra la seqüència d'aquest bucle extracel·lular en tres molècules de claudina. Basant-te en aquestes seqüències, quina d'aquestes claudines suposes que formaria un porus per a cations? Raona la resposta.



R:

Alguns dels experiments de la taula 1 indiquen que la unió estimulada per l'anticòs contra $\beta 1$ es deu a la interacció de la fibronectina amb la integrina $\alpha 5\beta 1$. L'anticòs contra la cadena $\alpha 5$ bloqueja la unió a fibronectina en presència o absència de l'anticòs contra β . Per la seua banda, l'anticòs contra la fibronectina interfereix en la unió estimulada per anticòssos contra $\beta 1$. I de forma més concloent, un pèptid que conté el motiu RGD (mitjançant el qual les integrines s'uneixen a la fibronectina) redueix la unió estimulada, mentre que un pèptid semblant però sense el motiu RGD complet no té cap efecte.

- b) Quins experiments descarten la possibilitat que l'augment aparent de l'afinitat d'unió de la figura 1 siga degut a un augment en el nombre de molècules d'integrina en la superfície cel·lular, tant de les sintetitzades *de novo* com de les transferides des de compartiments interns?

R:

Tant la síntesi de noves molècules d'integrina com el transport des d'un compartiment intracel·lular requeririen ATP. Els experiments que mostren que els verins metabòlics no tenen cap efecte sobre la unió estimulada pels anticòssos contra $\beta 1$ eliminen aquestes opcions. Així, l'afinitat creixent de la integrina $\alpha 5\beta 1$ per la fibronectina sembla ser deguda a algun efecte de l'anticòs contra $\beta 1$ en la població ja existent d'integrines.

- c) De quina forma suposes que els anticòssos contra $\beta 1$ augmenten l'afinitat de la integrina $\alpha 5\beta 1$ per la fibronectina?

R:

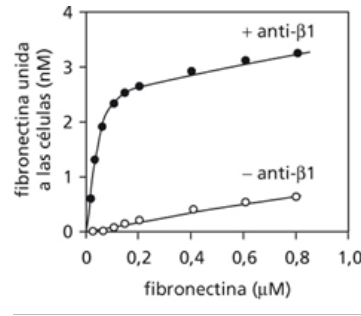
Els experiments de la figura 1 (i l'absència d'efecte amb els verins metabòlics) indiquen que la integrina $\alpha 5\beta 1$ pot presentar estats de baixa i alta afinitat. Sembla que l'anticòs contra $\beta 1$, en unir-se a un lloc específic de la cadena $\beta 1$, indueix un canvi conformacional en la integrina $\alpha 5\beta 1$ que la conduirà al seu estat d'alta afinitat. Aquests canvis conformacionals només ocorrien en el cas que els anticòssos s'uniren a llocs especials i escassos (que es correlaciona amb la peculiaritat dels anticòssos monoclonals que presenten propietats semblants a les d'aquest anticòs contra $\beta 1$). Els estats de baixa i alta afinitat semblen ser comuns per a les integrines. En molts casos, l'afinitat s'altera per esdeveniments que succeeixen en la cèl·lula.

Referència: Faull, R. J.; Kovach, N. L.; Harlan, J. M. i Ginsberg, M. H. (1993). "Affinity modulation of integrin $\alpha 5\beta 1$: regulation of the functional response by soluble fibronectin". *J. Cell Biol.* 121, 155-162.

Taula 1. Efectes dels anticòssos en la unió de la fibronectina a les cèl·lules.

ADDICIONS	FIBRONECTINA UNIDA (cpm)
Res	2.000
Anticòs contra $\alpha 5$	0
Anticòs contra $\alpha 4$	2.000
Anticòs contra $\beta 1$	40.000
Anticòs contra $\beta 1$ + anticòs contra $\alpha 5$	0
Anticòs contra $\beta 1$ + anticòs contra $\alpha 4$	40.000
Anticòs contra $\beta 1$ + anticòs contra fibronectina	500
Anticòs contra $\beta 1$ + pèptid GRGDSP	3.000
Anticòs contra $\beta 1$ + pèptid GRGESP	40.000

Figura 1. Estudis detallats de la unió de la fibronectina a cèl·lules K562.



5.16. Unions estretes i resistència elèctrica dels epitelis. Tu i el teu director de treball de recerca de fi de grau heu observat que hi ha una certa correlació entre la resistència elèctrica d'un epiteli i el nombre de cordons segelladors de les seues unions estretes. Això té un sentit intuïtiu, ja que el corrent a través d'un epiteli es produeix per petits ions que han de penetrar les unions estretes (figura 1). Però podrien donar-se dues situacions per les quals la resistència podria dependre del nombre de cordons segelladors. D'una banda, si cada cordó segellador proporciona una determinada resistència, la resistència total d'una unió estreta estaria relacionada de forma proporcional amb el nombre de cordons segelladors (com si foren resistències elèctriques en sèrie). D'altra banda, si cada cordó segellador poguera existir en dos estats —un estat tancat de gran resistència i un estat obert de baixa resistència—, la resistència de la unió estreta estaria relacionada amb la probabilitat que tots els cordons d'una determinada via a través de la unió estigueren oberts al mateix temps. En aquest cas, la resistència total estaria relacionada de forma logarítmica amb el nombre de cordons segelladors.

Amb la finalitat de poder distingir entre aquestes dues possibilitats d'una manera quantitativa, determines la resistència de quatre epitelis diferents de conill: el túbul proximal del renyó (que és altament filtrant), la vesícula biliar (que és menys filtrant), el túbul distal del renyó i l'epiteli de la bufeta urinària. A més, obtens electromicrografies de preparacions obtingudes per criofractura, amb les quals determines el nombre mitjà de cordons segelladors de les unions estretes que envolten cada cèl·lula d'aquests epitelis. Els resultats es mostren en la taula 1.

- Quina de les dues interpretacions proposades per a la correlació entre la resistència elèctrica de l'epiteli i el nombre de cordons segelladors en una unió estreta es basaria en els teus resultats?
- Per què creus que és més important, si s'ha de jutjar pels resultats, un millor segellament de l'epiteli de la bufeta urinària que el del túbul distal, i d'aquest millor que el del túbul proximal del renyó?

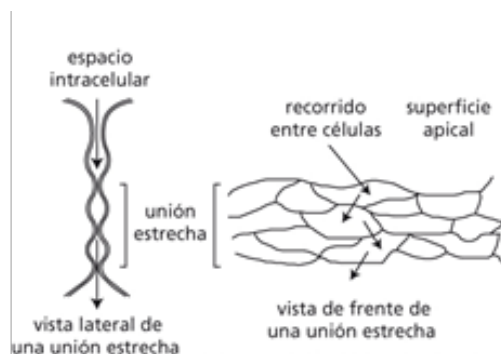


Figura 1. Dues vies d'una unió estreta que uneix les cèl·lules epitelials entre si.

Taula 1. Desplaçament de les sondes fluorescents d'una cèl·lula a una altra.

EPITELI DE CONILL	CORDONS EN UNA UNIÓ ESTRETA (nombre mitjà)	RESISTÈNCIA ELÈCTRICA (relativa)
Túbul proximal	1,2	1,0
Vesícula biliar	3,3	4,7
Túbul distal	5,3	52
Bufeta urinària	8,0	470

R:

De les alternatives donades, els resultats donen suport al model de dos estats de resistència de les unions estretes perquè la resistència d'un epitelí està relacionada de forma logarítmica amb el nombre de cordons segelladors de la unió, com mostra la línia recta de la figura 1. L'anàlisi d'aquestes dades suggereix que un únic cordó segellador té una gran probabilitat de trobar-se en l'estat obert. Si hi ha suficients cordons segelladors, la probabilitat que tots estiguen oberts al mateix temps és molt baixa, de manera que la unió en conjunt és molt estreta. La relació descrita entre el nombre de cordons segelladors i la resistència elèctrica de la unió es va calcular abans que s'identificaren les claudines com el principal component de les unions estretes. Ara sabem que, a més del nombre de cordons segelladors, algunes propietats de les unions estretes depenen del tipus de claudines que s'expressen en aquestes. Així, la resistència relativa de les unions estretes podria reflectir les claudines específiques utilitzades en la seua construcció, més que el nombre de cordons. Es tracta d'una àrea en la qual s'està investigant actualment.

Referències: Claude, P. (1978). "Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens". *J. Memb. Biol.* 39, 219-232.

Van Itallie, C. M. i Anderson, J. M. (2006). "Claudins and epithelial paracellular transport". *Annu. Rev. Physiol.* 68, 403-429.

5.17. Les cèl·lules granuloses de l'ovari maduren en resposta a l'hormona FSH. En aquest procés de maduració, la FSH s'uneix a receptors de la superfície cel·lular que activen l'enzim adenilat-ciclasa, que produeix AMPc, una molècula de baix pes molecular que funciona com a segon missatger i que provoca el procés de maduració d'aquestes cèl·lules. D'una manera semblant, les cèl·lules del múscul cardíac en desenvolupament responen a les hormones epinefrina i norepinefrina. L'epinefrina s'uneix a receptors de la superfície cel·lular, que activen l'adenilat-ciclasa, amb la qual cosa provoquen la síntesi de AMPc i la consegüent contracció rítmica de les cèl·lules. Quan aquests dos tipus cel·lulars són cocultivats en la mateixa placa, poden formar unions tipus *gap* funcionals entre si. Què ocurriria si s'afegeix FSH al cocultiu?

5.18. Evidències experimentals sobre les unions de tipus *gap*. El nostre coneixement sobre les unions comunicants o de tipus *gap* es deu en gran part al treball pioner de Werner Loewenstein i els seus col·laboradors, els quals van desenvolupar els experiments descrits més avall, i representats en la figura 1. En cada cas, indica (i) quina hipòtesi volia comprovar-se amb l'experiment dissenyat, (ii) què creus que els investigadors van concloure dels experiments, (iii) com dona suport als seus descobriments aquesta conclusió, i (vinga, comença a ser creatiu!) (iv) proposa un experiment addicional que podria fer-se amb la mateixa metodologia per a ampliar els seus descobriments.

- a) Es van inserir microelèctrodes en cèl·lules individuals de les glàndules salivals d'insectes. Quan es va aplicar un petit voltatge als elèctrodes de dues cèl·lules adjacents, es va trobar que el corrent que fluïa entre aquestes era diversos ordres de magnitud major que el corrent

registrar quan es va situar un elèctrode en una cèl·lula i l'altre, en el medi extern.

- b) Es van injectar les cèl·lules amb molècules fluorescents de diferents pesos moleculars i es va usar un microscopi de fluorescència per a observar el moviment de les molècules entre cèl·lules adjacents. La figura 1a il·lustra el resultat obtingut amb les molècules fluorescents de pesos moleculars de 1.926 (a dalt) i 1.158 daltons (a baix).
- c) Es va injectar un marcador fluorescent en una cèl·lula (número 3) que forma part d'una seqüència de cinc cèl·lules i es va usar un microscopi de fluorescència per a monitorar el moviment del marcador cap a les cèl·lules adjacents en un mitjà que conté Ca^{2+} . La figura 1b il·lustra el resultat obtingut amb cèl·lules intactes que són impermeables al Ca^{2+} (esquerra) i amb orificis perforats en les cèl·lules 2 i 4 per a permetre que la solució que conté Ca^{2+} entre, i per tant, elevar la concentració intracel·lular de Ca^{2+} (dreta).

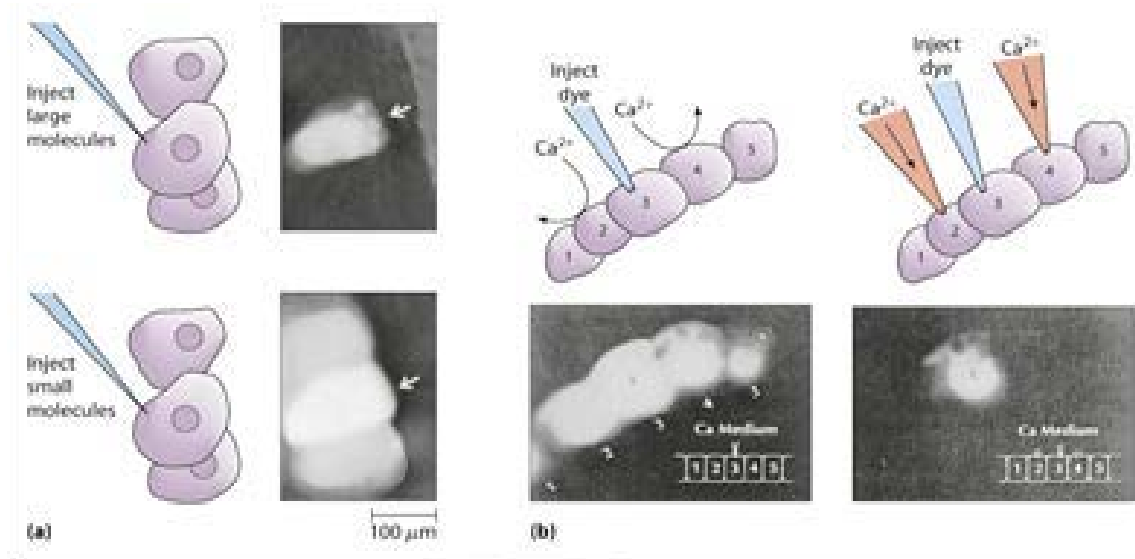


Figura 1. Evidències experimentals de les propietats de les unions tipus *gap*. **(a)** Limitacions de grandària en la permeabilitat a través de la unió tipus *gap* determinada per microscòpia de fluorescència després de la microinjecció de molècules fluorescents de dues grandàries diferents: 1.926 Da (a dalt) i 1.158 Da (a baix). **(b)** Utilització d'un marcador fluorescent per a determinar com afecten els canvis en la concentració de Ca^{2+} intracel·lular a la permeabilitat de les unions tipus *gap*.

TEMES 6, 7 i 8. ORGANITZACIÓ I BIOGÈNESI DELS ORGÀNULS CEL·LULARS

1. **Relaciona les definicions següents amb el terme adequat de la llista que segueix més avall:**
- a) Senyal de classificació de les proteïnes que consisteix en una disposició tridimensional dels àtoms en la superfície de la proteïna plegada.
R: regió senyal
- b) Moviment de proteïnes a través dels complexos de porus nuclears entre el citosol i el nucli.
R: transport regulat
- c) Compartiments delimitats per membrana en una cèl·lula eucariota que tenen estructura, composició macromolecular i funcions diferents.
R: orgànul
- d) Senyal de classificació de les proteïnes que consisteix en una seqüència contínua curta d'aminoàcids.
R: seqüència senyal
- e) Petits orgànuls delimitats per membrana que utilitzen oxigen molecular per a oxidar molècules orgàniques.
R: peroxisoma
- f) Una de les diverses proteïnes que estan implicades en la importació de proteïnes als peroxisomes.
R: peroxina
- g) Regió del RE no associada amb ribosomes.
R: RE lli
- h) Tipus d'unió lipídica per la qual algunes proteïnes s'uneixen a la membrana.
R: ancoratge GPI
- i) Compartiment laberíntic delimitat per membranes en el citoplasma de les cèl·lules eucariotes, on se sintetitzen els lípids i les proteïnes de membrana i de secreció.
R: reticle endoplasmàtic (RE)
- j) Complex ribonucleoproteic que s'uneix a la seqüència senyal del RE d'una cadena polipeptídica parcialment sintetitzada i que dirigeix el polipèptid i el seu ribosoma associat al RE.
R: partícula de reconeixement del senyal (SRP)
- k) Seqüència d'aminoàcids hidrofòbics que deté la translocació d'una cadena polipeptídica a través de la membrana del RE i ancora, així, la proteïna en la membrana.
R: senyal de parada de translocació
- l) Descrui la importació d'una proteïna en el RE abans que la cadena polipeptídica estiga sintetitzada per complet.
R: cotraduccional
- m) Seqüència curta d'aminoàcids d'una proteïna que la reté en el RE.
R: senyal de retenció en el RE
- n) Acció cel·lular desencadenada per l'acumulació de proteïnes amb plegament defectuós en el RE.

R: resposta a proteïnes mal plegades

o) Translocador proteic que forma un canal aquós en la membrana del RE que permet el pas d'una cadena polipeptídica a mesura que és sintetitzada per ribosomes units a la membrana.

R: complex Sec61

p) Descriu qualsevol processament d'una proteïna que succeeix després que la síntesi proteica finalitze.

R: posttraduccional

q) Vesícula petita que es forma a partir del RE fragmentat com a conseqüència de l'homogeneïtzació de les cèl·lules.

R: microsoma

r) Qualsevol proteïna amb una o més cadenes d'oligosacàrids units covalentment a les cadenes laterals d'aminoàcids.

R: glicoproteïna

s) Ribosoma citosòlic que no està unit a cap membrana.

R: ribosoma lliure

regió senyal	lumen
peptidasa de senyal	transport regulat
peroxina	citosol
transport transmembrana	transport vesicular
posttraduccional	peroxisoma
ancoratge GPI	BiP
calnexina	calreticulina
complex Sec61	cotraduccional
dolicol	RE lliu
RE rugós	glicoproteïna
glicosilació proteica	lumen del RE
microsoma	partícula de reconeixement del senyal (SRP)
òrganul	seqüència senyal
receptor de SRP	proteïna transmembrana de pas múltiple
resposta a proteïnes mal plegades	reticle endoplasmàtic (RE)
ribosoma lliure	ribosoma unit a membrana seqüència senyal del RE
senyal d'inici de translocació	senyal de retenció en el RE
senyal de parada de translocació	proteïna resident del RE

2. **Vertader o fals?** Explica per què.

a) Els ribosomes units a membrana i els ribosomes lliures, que són idèntics en termes estructurals i funcionals, només es diferencien en les proteïnes que sintetitzen en un moment donat.

Vertader. Tots els ribosomes inicien la traducció dels mRNA en el citosol. Els mRNA de certes proteïnes codifiquen una seqüència senyal per a la membrana del RE. Després que aquesta seqüència s'haja sintetitzat, dirigeix la proteïna naixent, juntament amb el ribosoma i el mRNA, a la membrana del RE. Els ribosomes que tradueixen els mRNA que no codifiquen una seqüència d'aquest tipus romanen lliures en el citosol.

b) Cada seqüència senyal especifica una destinació particular en la cèl·lula.

Vertader. Les seqüències d'aminoàcids, d'uns 15 a 60 residus de longitud, serveixen com a

senyals de classificació per a la majoria de les proteïnes de la cèl·lula. Les seqüències senyal que especifiquen destinacions cel·lulars particulars (importació al RE, importació al nucli, etc.) tenen trets característics que els permeten interaccionar amb receptors de transport adequats, que guien les proteïnes fins al compartiment correcte.

- c) Únicament es troben peroxisomes en alguns tipus cel·lulars eucariotes especialitzats.

Fals. Totes les cèl·lules eucariotes contenen peroxisomes.

- d) El pèptid senyal s'uneix a un lloc hidrofòbic del ribosoma i provoca una pausa en la síntesi de la proteïna, que torna a iniciar-se quan la SRP s'uneix al pèptid senyal.

Fals. Quan el pèptid senyal hidrofòbic emergeix del ribosoma, s'uneix a la SRP, que provoca una pausa en la síntesi proteica. La síntesi es reprèn quan el ribosoma amb la SRP unida s'uneix al receptor de la SRP en la superfície citosòlica del RE rugós.

- e) Algunes proteïnes de membrana estan unides a la superfície citoplasmàtica de la membrana plasmàtica a través d'un enllaç C-terminal a un ancoratge glicosilfosfatidilinositol (GPI).

Vertader. Les proteïnes que estan unides a ancoratges GPI estan unides a la superfície externa de la membrana plasmàtica. La reacció d'unió es realitza en el lumen del RE, que és topològicament equivalent a l'exterior cel·lular.

3. En una cèl·lula animal típica, quin dels compartiments següents ocupa un major volum? *R: A* Quin es troba en major nombre? *R: F* Quin contribueix en major mesura al conjunt de les membranes cel·lulars? *R: F* Quins tenen una doble membrana? *R: F, G* Quins tenen DNA propi? *R: F, G*

- a) Citosol
- b) Reticle endoplasmàtic
- c) Endosoma
- d) Complex de Golgi
- e) Lisosoma
- f) Mitocondri
- g) Nucli
- h) Peroxisoma

4. Ordena els processos enumerats a l'atzar més avall des que comença la transcripció del gen que codifica una proteïna de secreció fins que aquesta és secretada per exocitosi.

- a) La proteïna es glicosila parcialment en la llum del RE.
- b) La vesícula de secreció arriba a la membrana i es fusiona amb aquesta.
- c) El RNA transcrit es transporta del nucli al citoplasma.
- d) Els grups glucídics definitius s'afegeixen a la proteïna en el complex de Golgi.
- e) A mesura que se sintetitza la proteïna, va travessant la membrana del RE i accedint a la llum de la cisterna.
- f) La proteïna s'empaqueta en una vesícula de secreció que s'allibera des del complex de Golgi.
- g) El RNA missatger s'associa amb un ribosoma i comença la síntesi de la proteïna en la superfície del RE rugós.
- h) La proteïna arriba al cis Golgi després de la fusió dels complexos vesiculotubulars en els quals és transportada.

R: 3-7-5-1-8-4-6-2

5. Quan les cèl·lules són tractades amb substàncies que despolimeritzen els microtúbuls, el complex de Golgi es fragmenta en petites vesícules que es dispersen per la cèl·lula. Quan aquestes substàncies s'eliminen, les cèl·lules solen recuperar-se i créixer amb normalitat. Si les cèl·lules que s'han recuperat del tractament s'examinen amb el microscopi electrònic, s'observa que contenen un complex de Golgi amb un aspecte completament normal. Significa això que el complex de Golgi s'ha sintetitzat novament de zero? Si no és així, com creus que ha succeït?

6. Explica de quina forma una molècula de mRNA pot romandre unida a la membrana del RE mentre que els ribosomes individuals que la tradueixen són alliberats i es reuneixen amb la fracció de ribosomes citosòlics després de cada ronda de traducció.

R: Una molècula de mRNA s'uneix a la membrana del RE pels ribosomes que l'estan traduïnt. No obstant això, aquesta població de ribosomes no és estàtica. A mesura que el mRNA es mou a través dels ribosomes, els ribosomes que han acabat la traducció se separen de l'extrem 3' del mRNA i de la membrana del RE. Però el mRNA roman associat a la membrana del RE mitjançant altres ribosomes que encara l'estan traduïnt. A mesura que els ribosomes es desplacen al llarg del mRNA, el seu extrem 5' queda exposat i els nous ribosomes, procedents de la població citosòlica, s'uneixen i comencen a traduir-lo. Depenent de la seua longitud, hi pot haver de 10 a 20 ribosomes adherits a cada molècula de mRNA unida a la membrana, formant el que coneixem com un poliribosoma.

7. Cadascun dels problemes clínics següents es deu a alteracions en el funcionament d'un òrganul o una altra estructura cel·lular. Indica quin és l'òrganul implicat i si la patologia és conseqüència d'una disminució o d'un augment de la seua activitat.

- a) La ingesta accidental de cianur provoca la mort immediata d'una xiqueta, conseqüència del cessament de la producció de ATP.
- b) Un xiquet és diagnosticat d'adrenoleucodistrofia neonatal (NALD), que es caracteritza per la incapacitat de trencar els àcids grassos de cadena molt llarga.
- c) Una fumadora desenvolupa càncer de pulmó i li expliquen que la causa és que una població de les seues cèl·lules pulmonars està subjecta a una taxa mitòtica superior a la normal.
- d) Un jove descobreix que la seua infertilitat és deguda a la falta de motilitat dels seus espermatozoides.
- e) Un xiquet mor de la malaltia de Tay-Sachs perquè les seues cèl·lules no tenen la hidrolasa que trenca un component de la membrana denominat gangliòsid G_{M2} , de manera que s'acumula en les membranes de les seues cèl·lules cerebrals.
- f) Un xiquet és alimentat amb una dieta sense lactis, perquè les cèl·lules de la mucosa del seu intestí prim no segreguen l'enzim necessari per a hidrolitzar la lactosa, el disacàrid present en la llet.

8. Cadascun dels processos següents està associat a un o més òrganuls de cèl·lules eucariotes. Indica l'òrganul implicat i suggereix un avantatge del confinament del procés a l'interior de l'òrganul.

- a) β -oxidació d'àcids grassos de cadena llarga
- b) Biosíntesi de colesterol
- c) Biosíntesi d'insulina

- d) Biosíntesi de testosterona (hormona sexual masculina)
- e) Degradació d'òrgans danyats o que ja no es necessiten
- f) Glicosilació de proteïnes de membrana
- g) Hidroxilació de fenobarbital
- h) Separació de les proteïnes lisosomals i les de secreció

9. Assenyala quins dels supòsits següents són certs només per al RE rugós (R), per al llis (L), per a tots dos (RL), o per a cap (N).

- a) Conté menys colesterol que la membrana plasmàtica. *R: R, L*
- b) Té ribosomes adherits a la seua cara citosòlica. *R: R*
- c) Conté enzims d'acció antitòxica. *R: L*
- d) Està implicat en la hidròlisi del glicogen. *R: L*
- e) És el lloc on es sintetitzen les proteïnes de secreció. *R: R*
- f) És el lloc on es pleguen les proteïnes de membrana. *R: R*
- g) Tendeix a formar estructures tubulars. *R: L*
- h) Generalment està format per sàculs aplanats. *R: R*
- i) És visible només amb el microscopi electrònic. *R: R, L*

10. Assenyala quines de les afirmacions següents són certes per a vesícules cobertes de clatrina (C), COPI (I) o COPII (II). Cadascuna pot ser certa per a una, diverses o cap (N) de les vesícules amb coberta proteica.

- a) La unió de la proteïna de la coberta a un receptor LDL està mediada per un complex proteic adaptador. *R: C*
- b) La fusió de la vesícula (després de la dissociació de la coberta) amb la membrana del Golgi, està mediada per una t-SNARE específica i per proteïnes Rab. *R: II*
- c) Intervé en el transport bidireccional entre el RE i el complex de Golgi. *R: I*
- d) Intervé en la classificació de proteïnes per al transport intracel·lular cap a destinacions específiques. *R: C, I, II*
- e) Intervé en el transport de les hidrolases àcides cap als endosomes tardans. *R: C*
- f) És essencial en tots els processos d'endocitosi. *R: N*
- g) És important en el trànsit retrògrad de l'aparell de Golgi. *R: I*
- h) Està implicada en el transport de lípids de membrana des de la xarxa del trans Golgi fins a la membrana plasmàtica. *R: C*
- i) El component estructural bàsic de la coberta és el trisquèlion. *R: C*
- j) Les proteïnes de la coberta es dissocien immediatament després de formar-se la vesícula. *R: C, I, II*
- k) Entre les proteïnes de la coberta sempre hi ha una GTPasa monomèrica. *R: I, II*

TRÀNSIT VESICULAR

11. Relaciona les definicions següents amb el terme adequat de la llista que segueix més avall:

- a) Terme genèric emprat per a denominar un compartiment de membrana que transporta material entre compartiments envoltats de membrana en la cèl·lula.
R: vesícula de transport
- b) Qualsevol dels membres d'una gran família de GTPases monomèriques que es troben en la membrana plasmàtica i en els orgànuls membranosos i que confereixen especificitat en l'ancoratge de les vesícules.
R: proteïna Rab
- c) Proteïna que media la unió entre la coberta de clatrina i proteïnes transmembrana, incloent-hi els receptors transmembrana de les proteïnes de càrrega.
R: proteïna adaptadora
- d) GTPasa citosòlica que s'uneix al coll d'una vesícula recoberta de clatrina i que facilita la seua escissió de la membrana.
R: dinamina
- e) Proteïna que catalitza el desassemblatge dels dominis helicoïdals de les proteïnes SNARE aparellades.
R: NSF
- f) Vesícula recoberta que transporta material des de la membrana plasmàtica i entre el compartiment endosòmic i el complex de Golgi.
R: vesícula recoberta de clatrina
- g) GTPasa de reclutament de la coberta responsable tant de l'assemblatge de les cobertes de COPI com de clatrina en les membranes del complex de Golgi.
R: proteïna Arf
- h) Proteïna que facilita el transport vesicular, l'ancoratge i la fusió de les membranes una vegada unida per acció d'una proteïna Rab activa.
R: efector Rab
- i) Terme genèric aplicat a un membre de la gran família de proteïnes que catalitzen la fusió de membranes en el transport vesicular.
R: proteïna SNARE
- j) Complex multiproteic que s'acobla en les membranes endosomals només quan pot unir-se a la cua citosòlica d'un receptor en una membrana corbada que conté lípids fosfatidilinositol amb els seus grups de caps fosforilats.
R: retròmer
- k) Terme genèric que defineix una vesícula de transport que presenta una malla de proteïnes característica en la seua superfície citosòlica.
R: vesícula recoberta

- l) GTPasa de reclutament de coberta responsable de la formació de la coberta de COPII en la membrana del RE.
R: proteïna Sar1
- m) Digestió de les parts obsoletes de la cèl·lula pels seus propis lisosomes.
R: autofàgia
- n) Vesícules molt grans plenes de fluid que es troben en la majoria de cèl·lules vegetals i de fongs, i que en general ocupen més del 30% del volum cel·lular.
R: vacúol
- o) Orgànul membranós de les cèl·lules eucariotes que conté enzims digestius que habitualment són actius al pH àcid del lumen.
R: lisosoma
- p) Hipòtesi segons la qual les noves cisternes del complex de Golgi es formen contínuament en la cara *cis* del complex de Golgi i migren a través del complex a mesura que maduren.
R: model de maduració de cisternes
- q) Molècula formada per una o més cadenes de glicosaminoglicans unides a un nucli proteic.
R: proteoglican
- r) La cara del complex de Golgi per la qual entra el material a l'orgànul.
R: cara cis
- s) Cadena de sucres unida a una glicoproteïna que es forma per modificació de l'oligosacàrid inicial que s'uneix en el RE i sobre el que s'afegeixen altres sucres.
R: oligosacàrid complex
- t) Orgànul membranós de les cèl·lules eucariotes en el qual proteïnes i lípids procedents del RE són modificats i classificats.
R: complex de Golgi
- u) Cadena de sucres unida a una glicoproteïna que conté molts residus de manosa.
R: oligosacàrid ric en manosa
- v) Xarxa de cisternes i túbuls interconnectats en el costat del complex de Golgi pel qual el material ix del complex.
R: xarxa de distribució del trans Golgi (TGN)
- w) Via d'exocitosi que funciona contínuament en totes les cèl·lules.
R: via de secreció constitutiva
- x) Procés que implica la fusió de vesícules amb la membrana plasmàtica.
R: exocitosi
- y) Via d'exocitosi que opera sobretot en cèl·lules especialitzades en la secreció ràpida de productes sota demanda.
R: via de secreció regulada

clatrina

efector Rab

dinamina

fosfatidilinositol (PIP)

NSF	cara trans
proteïna adaptadora	GTPasa de reclutament de la coberta
proteïna Arf	proteïna Rab
proteïna Sar1	proteïna SNARE
t-SNARE	vesícula de transport
vesícula recoberta	vesícula recoberta de clatrina
vesícula recoberta de COPI	vesícula recoberta de COPII
exocitosi	vesícula de secreció
v-SNARE	proteïna Rho
complex de Golgi	model de maduració de cisternes
model de transport vesicular	O-glicosilació
via de secreció regulada	via de secreció constitutiva
oligosacàrid complex	oligosacàrid ric en manosa
proteoglican	xarxa de distribució del cis Golgi (CGN)
cara cis	xarxa de distribució del trans Golgi (TGN)
retròmer	autofàgia
hidrolasa àcida	lisosoma
receptor de M6P	vacúol

12. Verdader o fals? Explica per què.

- a) Totes les glicoproteïnes i glicolípid de les membranes intracel·lulars tenen les seues cadenes d'oligosacàrids dirigits cap a la cara luminal, i els que es troben en la membrana plasmàtica apunten cap a l'exterior cel·lular.

Vertader. Les cadenes d'oligosacàrids són afegides en el lumen del RE i del complex de Golgi, que són equivalents en termes topològics a l'exterior cel·lular. Aquesta topologia bàsica es conserva en tots els processos de vesiculació i fusió de membrana. Així doncs, les cadenes d'oligosacàrids es troben sempre topològicament en l'exterior de la cèl·lula amb independència que es troben en el lumen o en la superfície cel·lular.

- b) El complex de Golgi duu a terme la major part de les glicosilacions conegudes sobre el nucli proteic dels proteoglicans, que es converteixen en proteoglicans per la unió d'una o més cadenes de glicosaminoglicans.

Vertader. L'addició de cadenes molt llargues i no ramificades d'unitats de disacàrids repetits en el complex de Golgi pot crear proteoglicans en els quals la massa de glúcids supere la de proteïnes.

- c) Les membranes lisosomals contenen una bomba de protons que utilitza l'energia de la hidròlisi del ATP per a bombar protons fora del lisosoma i mantenir el lumen d'aquest a un pH àcid.

Fals. La bomba de protons dels lisosomes bomba els protons cap a l'interior del lisosoma per a mantenir un pH baix.

- d) Els endosomes tardans es converteixen en lisosomes madurs per la pèrdua de diferents proteïnes de la membrana endosomal i una major disminució del seu pH intern.

Vertader. Les proteïnes de la membrana endosomal són recuperades de forma selectiva des dels endosomes tardans mitjançant vesícules de transport que retornen les proteïnes als endosomes o a la xarxa del trans Golgi. L'interior dels endosomes tardans és mitjanament àcid (pH aproximat de 6), i a mesura que maduren a lisosomes el pH es redueix fins al valor lisosomal de pH 5,0.

- e) Si les cèl·lules es tractaren amb una base feble com l'amoni o la cloroquina, que augmenta el pH dels orgànuls fins a la neutralitat, seria d'esperar que els receptors de M6P s'acumularen en el complex de Golgi, ja que no es poden unir als enzims lisosomals.

Fals. L'addició d'una base feble provocaria l'acumulació de receptors de M6P en els endosomes tardans. Els receptors de M6P, que uneixen enzims lisosomals bastant bé a pH neutre, en general alliberen els enzims al pH inferior propi dels endosomes tardans i són després reciclats cap al complex de Golgi. Si el pH dels endosomes tardans augmenta, els receptors de M6P no poden alliberar els enzims units i, en conseqüència, no poden ser reciclats i queden atrapats en l'endosoma tardà.

13. Els rents, com molts altres organismes, tenen un únic tipus de cadena pesada de clatrina i un únic tipus de cadena lleugera; així, només produeixen un únic tipus de coberta de clatrina. Com és possible, llavors, que una única coberta de clatrina pugui ser utilitzada en tres vies de transport diferents (de Golgi a endosomes tardans, de membrana plasmàtica a endosomes primerencs i de vesícules de secreció immadures a Golgi) en les quals es transporten de forma específica diferents proteïnes?

R: L'especificitat tant de la ruta de transport com de les molècules transportades no està determinada per la coberta de clatrina, sinó per les proteïnes adaptadores que uneixen les proteïnes receptores de la càrrega amb la clatrina. Els diversos tipus de proteïnes adaptadores permeten a diferents receptors de càrrega i, per això, a diferents molècules càrrega, ser transportats al llarg de vies de transport específiques. Per cert, els humans es diferencien de molts altres organismes perquè tenen dos gens de cadenes pesades. De manera similar a altres mamífers, també tenen dos gens de cadenes lleugeres. A més, en les neurones dels mamífers, els transcrits de les cadenes lleugeres pateixen una maduració diferencial. Així, en humans hi ha el potencial per a una complexitat addicional de les cobertes de clatrina; no obstant això, les conseqüències funcionals d'aquesta potencialitat no estan clares.

Referències: Kirchhausen, T. (2000). "Clathrin". *Annu Rev. Biochem.* 69, 699-727.

Pearse, B. M. F.; Smith, C. J. i Owen, D. J. (2000). "Clathrin coat construction in endocytosis". *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 220-228.

14. Si elimines el senyal de recuperació del RE de la proteïna disulfur isomerasa (PDI: *protein disulfide isomerase*), que habitualment és una proteïna soluble resident en el RE, on esperaries trobar la proteïna PDI modificada?

15. El receptor KDEL ha de desplaçar-se cap endavant i cap endarrere entre el RE i el complex de Golgi per a realitzar la seua funció d'assegurar la retenció de les proteïnes solubles residents del RE en el lumen del RE. En quin compartiment s'uneix el receptor KDEL al seu lligand amb més intensitat? En quin compartiment ho fa més dèbilment? Quina creus que és la raó que podria explicar les diferències d'afinitat que s'observen en els dos compartiments?

16. Has aïllat diverses línies cel·lulars mutants que són defectuoses en la seua capacitat d'afegir carbohidrats a proteïnes d'exportació. Analitzes els monòmers de sucres que s'afegixen en cadascuna de les línies cel·lulars mutants, emprant una proteïna que es purifica amb facilitat i que només conté N-oligosacàrids. Cada mutant és únic per la naturalesa i el nombre de sucres que contenen els seus N-oligosacàrids (taula 1).

- Organitza els mutants en l'ordre que es correspon amb les etapes del processament dels seus N-oligosacàrids (figura 1). (Has de suposar que cada línia cel·lular mutant és defectuosa únicament en un dels enzims necessaris per a construir el N-oligosacàrid).
- Quins d'aquests mutants són defectuosos en les etapes que tenen lloc en el RE? Quins mutants presenten efectes en etapes que es produeixen en el complex de Golgi?
- Quins mutants són probablement defectuosos en un enzim de processament que és responsable directe de modificar els N-oligosacàrids? Quin dels mutants pot no ser defectuós en un enzim que modifique directament els N-oligosacàrids, sinó en un altre enzim que afecta indirectament el processament dels oligosacàrids?

Taula 1. Anàlisi dels sucres presents en els N-oligosacàrids de línies cel·lulars de tipus salvatge i mutants amb defectes en el processament dels oligosacàrids.

LÍNIA CEL·LULAR	Man	GlcNAc	Gal	NANA	Glc
Tipus salvatge	3	5	3	3	0
Mutant A	3	5	0	0	0
Mutant B	5	3	0	0	0
Mutant C	9	2	0	0	3
Mutant D	9	2	0	0	0
Mutant E	5	2	0	0	0
Mutant F	3	3	0	0	0
Mutant G	8	2	0	0	0
Mutant H	9	2	0	0	2
Mutant I	3	5	3	0	0

Abreviatures: Man=manosa; GlcNAc=N-actilglucosamina; Gal=galactosa; NANA=àcid N-acetilneuramínic o àcid siàlic; Glc=glucosa. Els números indiquen el nombre de monòmers del sucre en l'oligosacàrid.

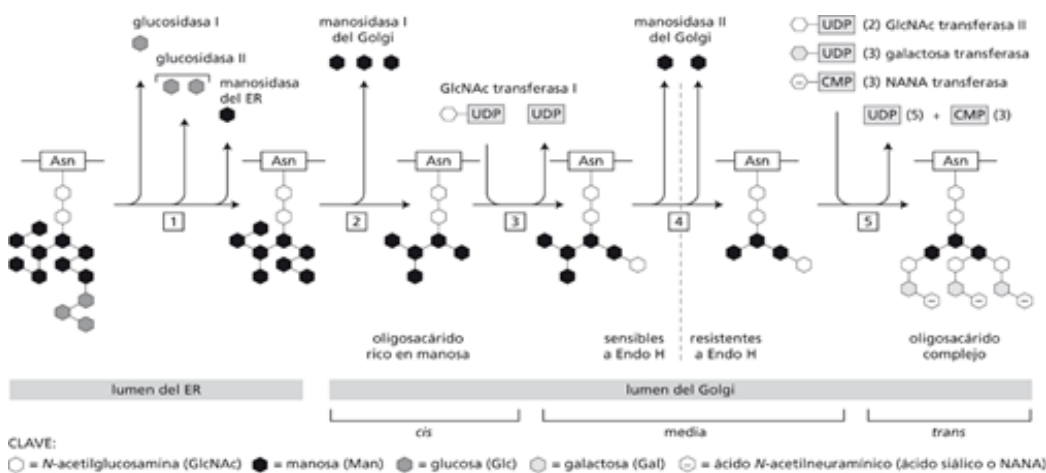


Figura 1. Processament dels oligosacàrids en el RE i en el complex de Golgi. Les reaccions enumerades en l'etapa 5 tenen lloc en dos compartiments diferents; l'addició de GlcNAc es realitza en la cisterna mitjana del complex de Golgi, mentre que l'addició de Gal i NANA té lloc en el compartiment trans del complex de Golgi.

MITOCONDRIIS, CLOROPLASTOS I PEROXISOMES

17. Relaciona les següents definicions amb el terme adequat de la llista que segueix més avall:

- a) Orgànuls delimitats per membranes, aproximadament de la grandària d'un bacteri, que realitzen la fosforilació oxidativa i produeixen la majoria del ATP de les cèl·lules eucariotes.
R: mitocondris
- b) Part d'un complex proteic format per múltiples subunitats que està unit al complex TIM23 en el costat de la matriu i que actua com un motor per a arrossegar les proteïnes precursors cap a l'espai de la matriu.
R: Hsp70 mitocondrial
- c) Complex proteic de múltiples subunitats que transporta proteïnes a través de la membrana mitocondrial externa.
R: complex TOM
- d) Espai de la matriu d'un cloroplast.
R: estroma
- e) Membrana d'un mitocondri que envolta la matriu i que es plega formant crestes.
R: membrana interna
- f) Complex proteic format per múltiples subunitats que transporta proteïnes a través de la membrana mitocondrial interna.
R: complex TIM
- g) Compartiment central d'un mitocondri, delimitat per la membrana mitocondrial interna.
R: espai de la matriu
- h) Sac aplanat de membrana d'un cloroplast que conté les subunitats proteiques del sistema fotosintètic i del ATP sintasa.
R: tilacoide
- i) Proteïna codificada per un gen nuclear, sintetitzada en el citosol, i posteriorment transportada al mitocondri.
R: proteïna precursora mitocondrial
- j) Idea segons la qual els mitocondris i els cloroplastos van evolucionar a partir de bacteris que van ser endocitats fa més de mil milions d'anys.
R: hipòtesi endosimbiòtica

cloroplast	hipòtesi endosimbiòtica
hipòtesi del senyal	complex OXA
complex SAM	complex TIM
complex TOM	espai de la matriu
espai intermembrana	estroma
Hsp70 mitocondrial	membrana externa
membrana interna	mitocondri
proteïna precursora mitocondrial	tilacoide
translocador de proteïnes	lumen

18. Verdader o fals? Explica per què.

- a) El complex TOM és necessari per a la importació de totes les proteïnes mitocondrials codificades pel nucli.

Vertader. Amb independència de la seua destinació final en el mitocondri, totes les proteïnes que es sintetitzen en el citosol (és a dir, totes les proteïnes mitocondrials que són codificades pel nucli) han d'entrar primer en el complex TOM. Després del complex TOM, les vies d'importació divergeixen a mesura que les proteïnes es classifiquen cap al compartiment mitocondrial apropiat.

- b) Les dues seqüències senyal necessàries per al transport de les proteïnes codificades pel nucli fins a la membrana mitocondrial interna a través del complex TIM23 són eliminades de la proteïna en diferents compartiments mitocondrials.

Fals. Només és eliminada una de les dues seqüències senyal. El senyal N-terminal és escindit de la proteïna importada quan arriba a la matriu mitocondrial. El segon senyal (una seqüència molt hidrofòbica situada en l'extrem N-terminal) dirigeix la proteïna cap a la membrana interna o bé a través del complex TIM23, o bé del complex OXA. El segon senyal no és eliminat i possibilita l'ancoratge de la proteïna en la membrana interna.

- c) La importació de proteïnes cap als mitocondris i els cloroplastos és molt similar; fins i tot els components individuals de la seua maquinària de transport són homòlegs, com era d'esperar donat el seu origen evolutiu comú.

Fals. Encara que la importació de proteïnes és similar, els components de la maquinària d'importació en els cloroplastos i els mitocondris no estan relacionats. Les similituds funcionals semblen haver aparegut per evolució convergent, la qual cosa reflectiria els requeriments comuns dels processos de translocació a través de sistemes de doble membrana.

- d) A causa de les nombroses proteïnes transportadores especialitzades de la membrana mitocondrial externa, l'espai intermembrana és químicament equivalent al citosol quant a molècules de grandària reduïda.

Fals. L'espai intermembrana és químicament equivalent al citosol pel que fa a molècules petites, però això no es deu a la presència de proteïnes transportadores especialitzades en la membrana mitocondrial externa, sinó al fet que aquesta membrana conté nombroses còpies de porina, una proteïna que forma grans canals aquosos. Aquests canals converteixen la membrana mitocondrial externa en un tamís que permet el pas lliure de totes les molècules que tinguen una massa molecular inferior a 5.000 daltons, la qual cosa inclou tots els ions i els metabòlits de la cèl·lula, així com algunes proteïnes petites.

- e) Els mitocondris i els cloroplastos repliquen el seu DNA en sincronia amb el DNA nuclear i es divideixen quan la cèl·lula es divideix, amb la qual cosa s'assegura un nombre constant de genomes dels orgànuls.

Fals. Els mitocondris i els cloroplastos es divideixen durant tota la interfase, fora de la fase de divisió de la cèl·lula. De la mateixa manera, la replicació no es limita a la fase S, sinó que es produeix durant tot el cicle cel·lular. El procés està regulat, de manera que el nombre total de còpies del DNA dels orgànuls es duplica en cada cicle cel·lular. Es desconeix el mecanisme d'aquesta regulació.

19. Per a dur a terme un estudi sobre el procés d'importació de proteïnes cap als mitocondris, tractes reents amb cicloheximida, la qual bloqueja el desplaçament dels ribosomes al llarg del mRNA. Quan examines aquestes cèl·lules mitjançant microscòpia electrònica, et sorprèn trobar ribosomes citosòlics units a la superfície externa dels mitocondris. Mai havies vist ribosomes units en absència de cicloheximida. Per a aprofundir en aquest fenomen, prepares mitocondris a partir de cèl·lules tractades amb cicloheximida i posteriorment extraus el mRNA unit als ribosomes associats als mitocondris. Tradueixes aquest mRNA *in vitro* i compares els productes proteics amb un mRNA del citosol traduït de forma semblant. Els resultats són determinants: els ribosomes associats als mitocondris estan traduint mRNAs que codifiquen proteïnes mitocondrials.

La sorpresa és majúscula. Clarament visible al microscopi electrònic, sembla estar la prova que la importació de les proteïnes cap al mitocondri té lloc durant la seua traducció. Com podries conciliar aquest resultat amb l'opinió generalitzada que les proteïnes mitocondrials són importades només després que hagen sigut sintetitzades i alliberades dels ribosomes?

R: La importació de les proteïnes mitocondrials té lloc postraduccionalment. En general, la traducció és molt més ràpida que la importació mitocondrial, de manera que les proteïnes abandonen per complet el ribosoma abans d'interaccionar amb la membrana mitocondrial. El bloqueig de la síntesi proteica amb cicloheximida provoca que la velocitat de traducció siga artificialment més lenta que la velocitat d'importació. Atès que la seqüència senyal d'importació de proteïnes als mitocondris es troba en l'extrem N-terminal, algunes de les proteïnes mitocondrials sintetitzades de forma parcial, que encara es troben unides als ribosomes, podran interaccionar amb la membrana mitocondrial. L'intent d'importació encara que només siga d'una d'aquestes proteïnes unirà al ribosoma i al mRNA (i a tots els altres ribosomes que estiguen traduint la mateixa molècula de mRNA) a la membrana mitocondrial.

Referència: Kellems, R. E.; Allison, V. F. i Butow, R. A. (1975). "Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. IV. Attachment of ribosomes to the outer membrane of isolated mitochondria". *J. Cell Biol.* 65, 1-14.

20. Sovint, les hèlixs- α es troben incrustades en les proteïnes de manera que un costat està orientat cap a la superfície i l'altre cap a l'interior. Amb freqüència aquestes hèlixs són qualificades d'amfifíliques (o amfipàtiques) perquè el costat superficial és hidrofílic i el costat intern és hidrofòbic. Una manera senzilla de decidir si una seqüència d'aminoàcids pot formar una hèlix amfifílica és disposar els aminoàcids al voltant del que es coneix com una "projecció roda d'hèlix". Si els aminoàcids hidrofòbics i hidrofílics queden segregats en costats oposats de la roda, l'hèlix és amfifílica.

La glutamina sintetasa és un enzim implicat en la destoxicació de l'amoni. En gallines, l'enzim és transportat als mitocondris, mentre que en els humans és citosòlica. La característica essencial dels pèptids senyal utilitzats per a la importació de proteïnes al mitocondri és la presència d'hèlixs- α amfipàtiques amb aminoàcids carregats positivament en un costat i aminoàcids hidrofòbics en l'altre costat. Utilitzant la projecció de l'hèlix en forma de roda de la figura 1, indica quina de les dues seqüències N-terminal proporcionades és de l'enzim de gallina i quina és de l'enzim humà.

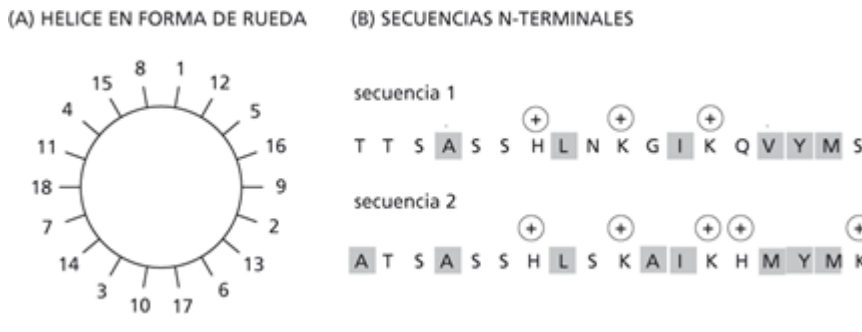


Figura 1. Anàlisi de les seqüències N-terminals de la glutamina sintetasa humana i de gallina. (A) Projecció de l'hèlix- α en forma de roda. Els números mostren les posicions dels primers 18 aminoàcids d'una hèlix- α ; l'aminoàcid 19 ocuparia la mateixa posició que l'aminoàcid 1. (B) Seqüències N-terminals de les glutamina sintetases humanes i de gallines. Els extrems N-terminal es mostren a l'esquerra; els aminoàcids carregats positivament estan indicats amb +.

21. Cinc complexos translocadors de proteïnes dirigeixen proteïnes a diversos compartiments dels mitocondris. Indica en la taula 1 el compartiment o els compartiments mitocondrials en els quals cada translocador insereix els seus substrats de transport.

Taula 1. Compartiments mitocondrials i complexos de translocació.

R:

COMPARTIMENT	SAM	TOM	TIM22	TIM23	OXA
Membrana externa	+	+			
Espai intermembrana		+			
Membrana interna			+	+	+
Matriu				+	

22. La hiperoxalúria primària tipus I (PH1) és una malaltia letal autosòmica recessiva causada per una deficiència de l'enzim peroxisomal específic del fetge alanina:glioxilat aminotransferasa (AGT). Prop d'un terç dels pacients amb PH1 tenen nivells significativament baixos de la proteïna AGT i de la seua activitat enzimàtica. L'anàlisi d'aquests pacients mostra que les seues AGT presenten dos canvis d'aminoàcids que són crítics: un que interfereix amb el transport al peroxisoma i un segon que permet que l'extrem N-terminal forme una hèlix- α amfipàtica amb un costat carregat positivament. On suposes que es localitza aquesta AGT mutant en les cèl·lules d'aquests pacients? Raona la resposta.

R: L'enzim AGT es troba majoritàriament (95%) en els mitocondris d'aquests pacients. Una hèlix- α per la substitució d'una leucina per una prolina en la posició 11 és un senyal d'adreçament al mitocondri feble. De fet, aquesta mutació particular existeix com un polimorfisme en la població humana amb una freqüència al·lèlica del 10% aproximadament. Per si mateixa, dirigeix erròniament sobre el 10% de la AGT els mitocondris, i la resta és dirigida amb precisió als peroxisomes. Combinada amb una segona mutació que inhibeix l'adreçament als peroxisomes, aquest dèbil senyal d'adreçament mitocondrial dirigeix erròniament el 95% de la AGT als mitocondris.

Referència: Purdue, P. E.; Allsop, J.; Isaya, G.; Rosenberg, L. E. i Danpure, C. J. (1991). "Mistargeting of peroxisomal L-alanine:glyoxylate aminotransferase to mitochondria in primary hyperoxaluria patients depends upon activation of a cryptic mitochondrial targeting sequence caused by a point mutation". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10900-10904.

Referència: Kinoshita, N.; Ghaedi, K.; Shimozawa, N.; Wanders, R. J. A.; Matsuzono, I; Imanaka, T.; Okumoto, K.; Suzuki, I.; Kondo, N. i Fujiki, I. (1998). "Newly identified Chinese hamster ovary cell mutants are defective in biogenesis of peroxisomal membrane vesicles (peroxisome ghosts), representing a novel complementation group in mammals. *J. Biol. Chem.* 273, 24122-24130.

23. Si els peroxisomes procedeixen de peroxisomes preexistents mitjançant creixement i fissió, com és possible que les cèl·lules de rents mutants sense peroxisomes visibles, fantasmes de peroxisomes o vestigis de peroxisomes, puguin formar de sobte peroxisomes totalment funcionals quan s'introdueix el gen que els falta?

R: Encara que es poden formar nous peroxisomes per creixement i divisió de peroxisomes preexistents, probablement no és l'únic mecanisme de formació de peroxisomes. No és del tot conegut com es formen els peroxisomes en absència de peroxisomes preexistents. Diversos estudis genètics i bioquímics han permès identificar Pex2 i Pex16 com dues proteïnes peroxisomals que estan implicades en les etapes més primerenques de l'assemblatge de nous peroxisomes en cèl·lules que no en tenen. Pex2 i Pex16 resideixen en la membrana dels peroxisomes madurs, però es troben en el ER en les cèl·lules que no tenen peroxisomes. Aquesta observació suggereix que es podrien formar nous peroxisomes a partir de membranes que venen del RE.

Referència: Fujiki, I. (2000). "Peroxisome biogenesis and peroxisome biogenesis disorders". *FEBS Lett.* 476, 42-46.

24. Els mitocondris dels hepatòcits semblen moure's lliurement en el citosol, mentre que els del múscul cardíac estan immobilitzats entre les miofibril·les adjacents. Suposes que aquestes diferències són una mera conseqüència de l'arquitectura cel·lular o més aviat que reflecteixen algun tipus d'avantatge funcional subjacent? Explica la resposta.

25. Les electromicrografies mostren que els mitocondris del múscul cardíac tenen una densitat de crestes molt superior a la dels mitocondris de les cèl·lules de la pell. Per què suposes que això és així?

26. Tant els mitocondris com els cloroplastos utilitzen el transport d'electrons per a bombar protons i crear així un gradient electroquímic de protons que impulsa la ATP sintasa. Els protons són bombats a través de les mateixes (anàlogues) membranes en els dos orgànuls? Se sintetitza el ATP en compartiments anàlegs? Explica les respostes.

R: En els mitocondris, els protons es bomben a través de la membrana interna cap a l'espai intermembrana. Per contra, en els cloroplastos es bomben a través de la membrana tilacoidal cap a l'espai tilacoidal. Els mitocondris manquen d'estructures anàlogues a la membrana tilacoidal o a l'espai tilacoidal dels cloroplastos. El ATP se sintetitza en els compartiments corresponents dels dos orgànuls: en la matriu del mitocondri i en l'estroma dels cloroplastos.

TEMES 9-10. EL NUCLI. EL CICLE CEL·LULAR: MITOSI I MEIOSI

EL NUCLI

1. Relaciona les definicions següents amb el terme adequat de la llista que segueix més avall:

- a. Heterocromatina constitutiva localitzada en les proximitats de l'embolcall nuclear.
R: heterocromatina perifèrica
- b. Senyal de classificació continguda en l'estructura de les macromolècules i dels complexos que són transportats des del nucli al citosol a través dels complexos de porus nuclear.
R: senyal d'exportació nuclear
- c. Gran estructura multiproteica que forma un canal a través de l'embolcall nuclear que permet a molècules seleccionades desplaçar-se entre el nucli i el citoplasma.
R: complex de porus nuclear (NPC)
- d. Regions del nucli en les quals es produeix la transcripció dels gens de RNA ribosòmic
R: RONS
- e. Doble membrana que envolta el nucli.
R: embolcall nuclear
- f. GTP-asa monomèrica que es troba tant en el citosol com en el nucli i que és necessària per al transport actiu de macromolècules cap a l'interior i cap a l'exterior de nucli a través dels complexos de porus nuclear.
R: Ran
- g. Xarxa fibrosa de proteïnes sobre la superfície interior de la membrana nuclear interna.
R: làmina nuclear
- h. Proteïna que s'uneix als senyals de localització nuclear i que facilita el transport de proteïnes que presenten aquests senyals des del citosol cap a l'interior del nucli a través dels complexos de porus nuclear.
R: receptor d'importació nuclear
- i. Característica cel·lular conseqüència de l'acitocinesi.
R: multinucleació
- j. Porció de l'embolcall nuclear que és contínua amb el RE i està recoberta en la seua superfície citosòlica per ribosomes.
R: membrana nuclear externa
- k. Armadura proteica intranuclear de funció incerta, molt resistent als tractaments proteolítics.
R: matriu nuclear
- l. Heterocromatina l'estat de condensació de la qual és dependent de l'activitat cel·lular i que es pot transformar en cromatina transcripcionalment activa.
R: heterocromatina facultativa
- m. Regions del nucli de localització preferent de cadascun dels cromosomes interfàsics.
R: territori cromosòmic

complex de porus nuclear (NPC)	embolcall nuclear
làmina nuclear	làmines
membrana nuclear externa	membrana nuclear interna
territori cromosòmic	Ran
matriu nuclear	RONs
heterocromatina perifèrica	
poliploïdia	aneuploïdia
receptor d'exportació nuclear	receptor d'importació nuclear
receptor de transport nuclear	senyal d'exportació nuclear
senyal de localització nuclear	nucleoporina
heterocromatina facultativa	proteïna del NPC
multinucleació	endomitosi

2. Vertader o fals? Explica per què.

- a. La membrana nuclear és lliurement permeable a ions i a altres molècules petites per davall dels 5.000 daltons.

Vertader. L'embolcall nuclear permet el pas lliure d'ions i de petites molècules perquè està perforada amb nombrosos complexos de porus nuclear —de 3.000 a 4.000 en una cèl·lula típica de mamífer— cadascun dels quals té un o més canals aquosos a través dels quals les molècules hidrosolubles poden difondre passivament.

- b. Per a impedir la inevitable congestió que ocorreria si es permetera el trànsit de doble sentit a través d'un mateix porus, els complexos de porus nuclears estan especialitzats de manera que alguns medien la importació i uns altres l'exportació.

Fals. Cada porus nuclear regula el transport en tots dos sentits. Es desconeix de quina forma coordinen aquest trànsit de doble sentit impedint que hi haja col·lisions frontals i col·lapses.

- c. Algunes proteïnes són mantingudes fora del nucli, fins que són necessàries, la qual cosa inactiva els seus senyals de localització nuclear mitjançant fosforilació.

Vertader. En particular, les proteïnes reguladores de gens es troben sotmeses a aquest tipus de regulació, com un mecanisme que impedeix l'activació (o repressió) de gens fins al moment adequat.

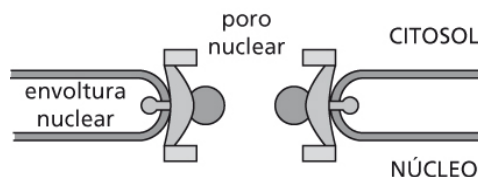
- d. Totes les proteïnes citosòliques tenen senyals d'exportació nuclear que els permeten ser eliminades del nucli quan aquest es forma de nou després de la mitosi.

Fals. Les proteïnes residents del citosol no tenen senyals d'exportació nuclear. Són excloses eficientment dels nuclis que es reassemblen pel mateix mecanisme de reassemblatge. Inicialment, l'embolcall nuclear està molt pròxim a la superfície dels cromosomes i exclou totes les proteïnes amb excepció d'aquelles que es troben unides als cromosomes mitòtics. Una vegada que s'ha format l'embolcall nuclear, s'importen les altres proteïnes residents del nucli a través de les seues seqüències de localització nuclear.

3. Com es mostra en la figura 1, les membranes nuclears interna i externa formen una superfície contínua, connectades a través dels porus nuclears. La continuïtat implica que les proteïnes de membrana poden moure's lliurement entre les dues membranes nuclears per difusió a través de la

bicapa en els porus nuclears. No obstant això, tant la membrana nuclear interna com l'externa tenen una composició proteica diferent com a conseqüència de les seues funcions diferents. Com expliques aquesta aparent paradoxa?

Figura 1. Secció transversal a través d'un complex de porus nuclears en el qual es mostra la continuïtat de les membranes nuclears interna i externa.



R: Hi ha dos aspectes de la funció proteica que poden contribuir a les diferències que s'observen en la composició proteica de la membrana nuclear interna i l'externa. En primer lloc, les proteïnes que desenvolupen la seua funció en la membrana interna estan en general ancorades a aquesta per la seua interacció amb components del nucli, com els cromosomes i la làmina nuclear, que és una xarxa de proteïnes que se situa just per davall de la membrana nuclear interna. Les proteïnes que difonen lliurement i que s'ancoren una vegada que aconsegueixen arribar a la membrana nuclear interna, s'acumularien allí. En segon lloc, les mateixes proteïnes que formen el poro nuclear poden limitar la lliure difusió d'altres proteïnes de membrana mitjançant la seua pròpia inserció en la bicapa lipídica, en el límit entre la membrana nuclear interna i l'externa. Qualsevol proteïna de membrana que no puga passar a través de l'anell de proteïnes del poro nuclear quedaria limitada a la membrana nuclear externa.

4. Com és possible que un complex de porus nuclear puga transportar eficientment proteïnes que tenen diferents tipus de senyals de localització nuclear?

R: Un sol complex de porus nuclears pot transportar proteïnes amb tipus de senyals de localització nuclear totalment diferents, atès que en aquest transport participen diversos receptors d'importació nuclear, codificats per una família de gens relacionats. Cadascun dels membres de la família —cadascun dels productes gènics— està especialitzat en el transport d'un grup de proteïnes nuclears que comparteixen senyals de localització nuclear similars en termes estructurals. Al mateix temps, tots els membres de la família comparteixen característiques comunes que els permeten interaccionar amb els complexos de porus nuclears. Així doncs, els receptors d'importació nuclear actuen a manera d'adaptadors entre proteïnes amb senyals de localització nuclear diferents i la població uniforme de complexos de porus nuclears.

5. De quina forma creus que les proteïnes amb un senyal d'exportació nuclear entren dins del nucli?

R: Les proteïnes amb un senyal d'exportació també tenen un senyal de localització nuclear. Així, aquestes proteïnes es mouen entre el nucli i el citoplasma.

6. Els senyals de localització nuclear no són eliminats després de transportar la proteïna al nucli, mentre que sí que són eliminades en general les seqüències d'importació a altres orgànuls. Per què creus que és crític que els senyals de localització nuclear es mantinguen en les proteïnes?

R: En cada mitosi, el contingut del nucli i del citosol es mescla quan l'embolcall nuclear es desorganitza. Quan el nucli es reorganitza, les proteïnes nuclears han de reimportar-se de forma selectiva. Si els senyals de localització nuclear foren eliminats després de la importació, les proteïnes nuclears quedarien atrapades en el citosol després de la següent mitosi. Per contra, el contingut d'altres orgànuls mai es mescla amb el citosol. En la mitosi, els orgànuls com el complex de Golgi i el RE es fragmenten en vesícules que retenen el contingut luminal dels orgànuls de procedència. Com a conseqüència d'això, les seues proteïnes residents només han d'importar-se una vegada i, per tant, les seues seqüències senyal són d'un sol ús.

7. Indica les conseqüències per a la funció i l'estructura nuclear de cadascuna de les observacions experimentals següents.

- a. La sacarosa travessa l'embolcall nuclear tan ràpidament que la seua velocitat de moviment no es pot mesurar amb precisió.

R: A diferència d'altres membranes cel·lulars, l'embolcall nuclear sembla ser completament permeable a les molècules orgàniques polars.

- b. Les partícules d'or col·loidal amb un diàmetre de 5,5 nm s'equilibren ràpidament entre el nucli i el citoplasma quan s'injecten en el citoplasma, però no ocorre el mateix amb les partícules d'or de 15 nm.

R: Els canals aquosos dels complexos de porus nuclear tenen diàmetres que oscil·len entre 5,5 nm i 15 nm.

- c. A vegades es detecten partícules ribonucleoproteïques associades als complexos de porus nuclears.

R: Aquestes partícules estan probablement en trànsit cap al citosol.

- d. Si les partícules d'or de fins a 26 nm de diàmetre es cobreixen amb un polipèptid que conté un senyal de localització nuclear (NLS) i s'injecten en el citoplasma d'una cèl·lula viva, es transporten al nucli. No obstant això, si s'injecten en el nucli, es queden allí.

R: La NLS només dirigeix el transport des del citoplasma al nucli, no en sentit contrari, suggerint que les proteïnes receptors de NLS (importines) només funcionen en el citoplasma.

- e. Quan s'analitzen per electroforesi, moltes de les proteïnes de l'embolcall nuclear semblen ser les mateixes que les del RE.

R: Les membranes nuclears i el RE tenen probablement un origen evolutiu comú.

- f. Les proteïnes ribosòmiques se sintetitzen en el citoplasma però s'empaqueten amb el rRNA formant subunitats ribosòmiques en el nucli.

R: Les proteïnes ribosòmiques han d'ingressar des del citoplasma al nucli a un ritme adequat per a permetre l'assemblatge de les subunitats proteïques; les subunitats ribosòmiques han d'eixir des del nucli cap al citoplasma per al seu assemblatge.

- g. Si els nuclis s'irradien amb un microfeix de llum ultraviolada, s'inhibeix la síntesi de rRNA.

R: Els nuclèols són responsables de la síntesi de rRNA.

- h. El tractament dels nuclis amb el detergent no iònic Triton X-100 dissol l'embolcall nuclear però deixa el nucli intacte.

R: La integritat del nucli no sembla que depenga únicament de l'embolcall nuclear.

8. Per què les cèl·lules eucariotes necessiten tenir un nucli com un compartiment separat quan els procariotes funcionen perfectament sense necessitat d'aquest?

R: L'expressió dels gens eucariotes és més complexa que l'expressió dels gens procariotes. En particular, les cèl·lules procariotes no tenen introns que interrompen les seqüències codificants dels seus gens, de manera que el mRNA pot ser traduït immediatament després de la seua transcripció, sense cap processament

posterior. De fet, en els ribosomes de les cèl·lules procariotes comença la traducció de la majoria dels mRNA abans que acabe la seua transcripció. Això podria tenir conseqüències desastroses en les cèl·lules eucariotes perquè la majoria dels transcrits de RNA han de madurar abans que puguin ser traduïts. L'embolcall nuclear separa els processos de transcripció i de traducció en l'espai i en el temps. Un transcrit primari de RNA és retingut en el nucli fins que es processa de forma correcta per a formar un mRNA; només aleshores se li permet abandonar el nucli de manera que els ribosomes puguin traduir-lo.

9. Indica si cadascuna de les afirmacions següents sobre el nuclèol és vertadera o falsa.

- a. Els nuclèols són estructures envoltades de membrana presents en els nuclis eucariotes.

R: Falsa

- b. Les fibril·les que s'observen en les micrografies electròniques dels nuclèols contenen DNA i RNA.

R: Vertadera

- c. El DNA dels nuclèols porta els gens dels tRNAs de la cèl·lula, que estan presents en grups de còpia múltiple.

R: Falsa

- d. Un únic nuclèol sempre es correspon amb una única regió organitzadora nucleolar (NOR).

R: Falsa

- e. Quan a la cèl·lula se li proporcionen ribonucleòtids marcats radioactivament, els nuclèols apareixen marcats fortament.

R: Vertadera

- f. En animals i plantes, la desaparició del nuclèol durant la mitosi està relacionada amb el cessament de la síntesi de ribosomes.

R: Vertadera

EL CICLE CEL·LULAR

10. Relaciona les definicions següents amb el terme adequat de la llista que segueix més avall:

- a. El llarg període del cicle cel·lular comprés entre una mitosi i la següent.
R: interfase
- b. La seqüència ordenada d'esdeveniments en els quals una cèl·lula duplica el seu contingut i després es divideix en dues.
R: cicle cel·lular
- c. La fase del cicle cel·lular eucariota entre el final de la citocinesi i l'inici de la síntesi del DNA.
R: fase G1
- d. Orgànul de les cèl·lules animals localitzat centralment que després de la duplicació organitza cada pol del fus durant la mitosi.
R: centrosoma
- e. Divisió en dues del citoplasma en cèl·lules vegetals o animals.
R: citocinesi
- f. Microtúbuls que se superposen en la zona mitjana del fus mitòtic i interactuen pels seus extrems més per a formar una distribució antiparal·lela.
R: microtúbuls interpolars
- g. Pla imaginari situat entre els pols del fus en el qual es col·loquen els cromosomes en la metafase.
R: placa metafàsica
- h. Etapa de la mitosi en la qual els pols del fus es desplacen en sentit oposat.
R: anafase B
- i. Estructura formada per microtúbuls i filaments d'actina que es forma en el pla de divisió d'una cèl·lula vegetal i dirigeix la formació de la placa cel·lular.
R: fragmoplast
- j. Banda cel·lular que conté actina i miosina que es forma sota la superfície de les cèl·lules animals que s'estan dividint i que es contrau per a separar les dues cèl·lules filles.
R: anell contràctil
- k. Proteasa l'activació de la qual al final de la metafase condueix a la degradació de la cohesina i a la separació de les cromàtides germanes.
R: separasa
- l. Etapa de la mitosi en la qual els cromosomes comencen a desplaçar-se cap als dos pols del fus mitòtic.
R: anafase A
- m. Etapa final de la mitosi en la qual els dos conjunts de cromosomes separats es descondensen i queden envoltats pels embolcalls nuclears.
R: telofase

- n. Complex proteic que utilitza l'energia de la hidròlisi del ATP per a estimular la compactació i la resolució de les cromàtides germanes.

R: condensina

- o. Complex proteic que manté unides les cromàtides germanes en tota la seua longitud fins que separen en la mitosi.

R: cohesina

- p. Microtúbuls que irradien des del pol del fus mitòtic fins al còrtex cel·lular i contribueixen al posicionament del fus en la cèl·lula.

R: microtúbuls astrals

cicle cel·lular	fase G1
anell contràctil	placa cel·lular
anafase A	anafase B
fase G2	fus mitòtic
interfase	fase M
cohesina	fragmoplast
sincici	condensina
cinetocor	mitosi
centrosoma	placa metafàsica
microtúbuls interpolars	divisió cel·lular
nòdul de recombinació	microtúbuls cinetocòrics
microtúbuls astrals	telofase
citocinesi	separasa
làmina mitjana	plasmodesma

Control del cicle cel·lular

- a. Membre de la família de proteïnes cinasa que han d'estar unides amb una proteïna ciclina per a poder actuar.

R: Cinasa dependent de ciclina (Cdk)

- b. Un dels diferents punts del cicle cel·lular eucariota en què es pot detenir el seu avanç fins que les condicions siguen les apropiades perquè la cèl·lula passe a la fase següent.

R: Punt de control

- c. La ubiquitina ligasa, que indueix la degradació d'un conjunt específic de proteïnes i provoca, d'aquesta manera, la separació de les cromàtides germanes i la finalització de la fase M.

R: Complex promotor de l'anafase o ciclosoma (APC/C)

- d. El complex Cdk-ciclina responsable d'induir l'entrada en la mitosi en el punt de control G₂/M.

R: Cdk-M

- e. El punt de control del cicle cel·lular que regula la determinació de la cèl·lula per a entrar en la fase S.

R: Inici o punt de restricció

- f. L'últim punt de control del cicle cel·lular, en el qual el sistema de control estimula la separació de les cromàtides germanes i condueix a la finalització de la mitosi i de la citocinesi.

R: Transició de la metafase a l'anafase

- g. Substància extracel·lular que estimula la divisió cel·lular.

R: factor de creixement

- h. Terme general per a un dels diferents complexos proteics que es formen periòdicament durant el cicle cel·lular quan la concentració de ciclina augmenta i que activa de forma parcial el component cinasa dependent de ciclina.

R: Complex Cdk-ciclina

ciclina	Cdk-M
ciclina M	Cdk-G ₁ S
complex Cdk-ciclina	transició de la metafase a l'anafase
proteïna inhibidora de Cdk (CKI)	punt de control
punt de control G ₂ /M	cinasa dependent de ciclina (Cdk)
telomerasa	factor de creixement
complex promotor de l'anafase o ciclosoma (APC/C)	
punt de restricció	Inici

Meiosi/fecundació

- a. Període de la profase meiòtica durant la qual es forma el complex sinapteinèmic, responsable de l'entrecruament de les cromàtides.

R: paquitè

- b. Complex proteic responsable de la parada en metafase II de la meiosi.

R: factor citostàtic (CSF)

- c. Canvis fisiològics experimentats pels espermatozoides que els permeten adquirir la capacitat de fecundar l'òvul.

R: capacitat espermàtica

- d. Glicoproteïnes de la coberta de l'oòcit implicades en el reconeixement cel·lular i la reacció acrosòmica.

R: proteïnes ZP

diplotè	paquitè
reacció acrosòmica	factor citostàtic (CSF)
MPF	IZUMO1

proteïnes ZP
capacitació espermàtica

complex condensina-sugoshina
glicodelines

11. Vertader o fals? Explica per què.

- a. Atès que una persona adulta està formada per 10^{13} cèl·lules aproximadament, i que diàriament moren i són reemplaçades unes 10^{10} cèl·lules, cada tres anys ens convertim en una persona nova.

Fals. Encara que es reemplaci un nombre de cèl·lules equivalent a una persona adulta aproximadament cada tres anys, no totes les cèl·lules se substitueixen a la mateixa velocitat. Les cèl·lules sanguínies i les cèl·lules que entapissen l'intestí es reemplacen a una velocitat molt alta, mentre que les cèl·lules de la majoria d'òrgans se substitueixen amb més lentitud i les neurones rarament ho fan.

- b. Encara que la duració de totes les fases del cicle és fins a un cert punt variable, la major variació es produeix en la duració de G_1 .

Vertader. La fase G_1 és l'interval més crític per al creixement cel·lular. La seua duració pot variar molt segons les condicions externes i els senyals extracel·lulars procedents d'altres cèl·lules.

- c. A fi que les cèl·lules que proliferen mantinguin una grandària relativament constant, la duració del cicle cel·lular ha de coincidir amb el temps que tarda la cèl·lula a duplicar la seua grandària.

Vertader. Si el cicle cel·lular durara menys del que la cèl·lula tarda a duplicar la seua grandària, la cèl·lula es tornaria progressivament més petita amb cada divisió; si durara més, les cèl·lules creixerien i creixerien.

- d. Quan les condicions que envolten les cèl·lules n'impedeixen la divisió, aquestes generalment es detenen en el punt de control G_2 fins que reben un senyal per a dividir-se.

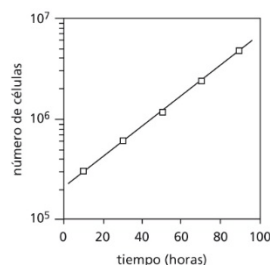
Fals. Si les condicions són desfavorables, les cèl·lules eucariotes superiors generalment es paren en el punt de control G_1 , abans de comprometre els seus recursos en la duplicació dels cromosomes.

12. Si la funció bàsica del cicle cel·lular consisteix a duplicar minuciosament el DNA dels cromosomes i, després, distribuir les còpies de forma exacta a les cèl·lules filles, per què existeixen els intervals entre la fase S i la fase M?

R: Els intervals entre la fase S i la fase M són necessaris perquè les cèl·lules cresquen i dupliquen la seua massa de proteïnes i orgànuls. Els dos intervals també proporcionen temps perquè la cèl·lula comprovi els medis extern i intern per a assegurar-se, així, que les condicions són adequades i que s'han completat els preparatius abans que comence la fase S i la mitosi.

13. La duració completa del cicle cel·lular es pot calcular a partir del temps de duplicació del nombre de cèl·lules d'una població amb creixement exponencial. El temps de duplicació de les cèl·lules L de ratolí s'ha determinat mitjançant un recompte del nombre de cèl·lules presents en mostres de medi de cultiu en diferents intervals de temps (fig.1). Quina és la duració total del cicle cel·lular de les cèl·lules L de ratolí?

Figura 1

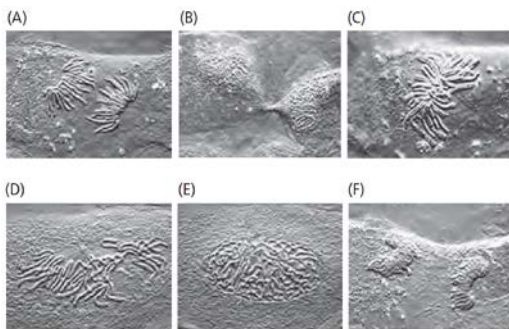


R: La duració completa del cicle cel·lular equival al mateix temps que tarda la població de cèl·lules a duplicar el seu nombre. Per a determinar la duració del cicle cel·lular, selecciona dos punts qualssevol de la gràfica de la figura 17-1, entre els quals s'haja duplicat el nombre de cèl·lules. L'interval que separa els dos punts serà la duració del cicle cel·lular. Per exemple, els primers dos punts informatius de la figura 17-1 corresponen a 3×10^5 cèl·lules (10 hores) i a 6×10^5 cèl·lules (30 hores). Com que la població de cèl·lules L de ratolí es duplica en un període de 20 hores (30 hores – 10 hores), la duració del cicle cel·lular és de 20 hores.

14. Quants cinetocors té una cèl·lula humana en mitosi?

R: Els humans tenim 46 cromosomes, cadascun d'aquests amb dos cinetocors, un per cada cromàtida germana. Per tant, una cèl·lula humana en mitosi té 92 cinetocors.

15. En la figura es mostra una cèl·lula viva de l'epiteli pulmonar en diferents etapes de la fase M. Ordena aquestes imatges obtingudes amb un microscopi òptic de contrast de fases en la seua seqüència correcta i identifica l'etapa de la fase M que representa cadascuna.



Micrografies òptiques d'una sola cèl·lula en diferents etapes de la fase M.

R: E, Profase; D, prometafase; C, metafase; A, anafase; F, telofase; B, citocinesi.

16. A) Quines són les dues màquines citoesquelètiques que s'assemblen en les cèl·lules animals per a dur a terme els processos mecànics de la mitosi i la citocinesi en les cèl·lules animals? B) I en les cèl·lules vegetals?

- A. Les dues màquines citoesquelètiques són el fus mitòtic i l'anell contràctil. La segregació dels cromosomes i la seua distribució a cèl·lules filles les realitza el fus mitòtic bipolar, que està compost per microtúbuls i diversos motors dependents de microtúbuls i altres proteïnes. La divisió d'una cèl·lula animal en cèl·lules filles mitjançant la citocinesi la duu a terme l'anell contràctil, el qual està compost per filaments d'actina i de miosina i es localitza just per davall de la membrana plasmàtica. Quan l'anell s'estreny, estira de la membrana cap a dins i divideix la cèl·lula en dues.
- B. En les cèl·lules vegetals, la paret cel·lular impedeix la participació d'un anell contràctil, per la qual cosa la citocinesi es produeix en formar-se el fragmoplast, una estructura transitòria formada per microtúbuls i vesícules procedents del Golgi, que aporta els components necessaris per a la formació de la nova membrana plasmàtica i de la làmina mitjana.

17. Cada cromosoma interfàsic tendeix a ocupar una àrea concreta i relativament petita en el nucli. Significa això que la posició particular que ocupa un cromosoma és crítica per a la funció cel·lular?

R: Encara que els cromosomes ocupen petites àrees concretes de les cèl·lules, la localització particular probablement no és important. Diversos experiments indiquen que la posició d'un gen a l'interior del nucli

canvia quan passa a ser molt expressat, de manera que s'estén més enllà del seu territori cromosòmic, com un bucle estès. Per tant, amb independència de la posició mitjana dels cromosomes, alguns segments individuals poden desplaçar-se cap a entorns funcionals diferents del nucli.

18. Ordena els processos següents d'una cèl·lula animal en divisió:

- A. Alineament dels cromosomes en l'equador del fus
- B. Unió dels microtúbuls als cromosomes
- C. Disgregació de l'embolcall nuclear
- D. Formació de l'anell contràctil
- E. Descondensació dels cromosomes
- F. Duplicació del centrosoma
- G. Allargament del fus
- H. Reformació de l'embolcall nuclear
- I. Separació dels centrosomes
- J. Condensació dels cromosomes

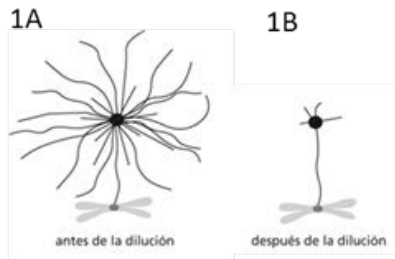
R: F-I-J-C-B-G-H-E-D

19. Durant la formació d'un nou nucli en la telofase, com es classifiquen de manera adequada les proteïnes citosòliques i nuclears de manera que el nou nucli continga proteïnes nuclears però no continga proteïnes citosòliques?

R: El nou embolcall nuclear es reorganitza en la superfície dels cromosomes i impedeix de forma efectiva que les proteïnes citosòliques queden atrapades entre els cromosomes i l'embolcall. Les proteïnes citosòliques també queden excloses dels agregats de cromosomes que s'ajunten per a formar el nucli complet. Durant aquest procés, els porus nuclears s'organitzen en l'embolcall. Els porus permeten la importació selectiva de les proteïnes nuclears i provoquen, així, el creixement del nucli mentre es manté la seua composició proteica.

20. Un article clàssic distingeix clarament les propietats dels microtúbuls astrals de les propietats dels microtúbuls cinetocòrics. Els investigadors van utilitzar centrosomes per a iniciar el creixement dels microtúbuls i a continuació van afegir els cromosomes. Els cromosomes es van unir als extrems lliures dels microtúbuls, tal com s'il·lustra en la figura 1A. Després, van diluir els complexos formats a una concentració molt baixa de tubulina (molt per davall de la concentració crítica per a l'assemblatge dels microtúbuls) i els van examinar (figura 1B). Com s'observa, només els microtúbuls cinetocòrics van ser estables després de la dilució.

- A) Per què els microtúbuls cinetocòrics són estables?
- B) Com explicar la desaparició dels microtúbuls astrals després de la dilució? Es desapeguen del centrosoma, es despolimeritzen per un extrem o es disgreguen al llarg de la seua longitud a l'atzar?
- C) Seria d'ajuda un curs temporal després de la dilució per a determinar quin d'aquests possibles mecanismes és el responsable de la desaparició dels microtúbuls astrals?



R:

- A. Un microtúbul cinetocòric és relativament estable perquè els seus dos extrems estan protegits del desasseblatge: un per la unió al centrosoma i l'altre per la unió al cinetocor. Aquesta estabilització suggereix que els cinetocors tapen més els extrems dels microtúbuls i alteren l'equilibri de la dissociació de les subunitats.
- B. Els microtúbuls astrals es desassemblen quan la tubulina està per davall de la concentració crítica per a l'asseblatge dels microtúbuls. Sota aquestes condicions, la velocitat d'addició no compensa la velocitat de dissociació i els microtúbuls es fan progressivament més curts. La presència de microtúbuls cinetocòrics reforça aquesta interpretació en comparació amb les altres dues possibilitats. Ni el despreniment del centrosoma ni la ruptura a l'atzar explicarien l'estabilitat dels microtúbuls cinetocòrics.
- C. Els possibles mecanismes responsables de la desaparició es distingirien mitjançant un estudi temporal. A temps intermedis, el nombre i la longitud dels microtúbuls seran indicadors precisos de quin és el mecanisme que actua. Si els microtúbuls es desapegaren, el nombre de microtúbuls per centrosoma disminuiria, però la longitud seria la mateixa. Si els microtúbuls es despolimeritzaren per l'extrem, el nombre es mantindria constant i les seues longituds disminuirien amb relativa uniformitat. Si els microtúbuls es trencaren a l'atzar, el nombre es mantindria relativament constant, però la distribució de longituds seria molt àmplia.

Referència: Mitchison, T. J. i Kirschner, M. W. (1985). "Properties of the kinetochore *in vitro*. II. Microtubule capture and ATP dependent translocation". *J. Cell. Biol.* 101, 766-777.

21. Compara i contrasta els moviments dels cromosomes i dels pols del fus i els seus mecanismes corresponents, durant l'anafase A i l'anafase B.

R: Durant l'anafase A, les cromàtides germanes se separen i els cromosomes es desplacen cap als pols per escurçament dels microtúbuls cinetocòrics. L'anafase A depèn de l'activitat de les proteïnes motores en el cinetocor. Durant l'anafase B, que se solapa amb l'anafase A, els pols del fus s'allunyen i separen els cromosomes encara units. Dos grups de proteïnes motores cooperen per a dur a terme la separació del fus. Les proteïnes motores dirigides cap a l'extrem més actuen sobre els microtúbuls polars i espanten els pols del fus en sentits oposats. Aquest moviment va acompanyat pel creixement dels microtúbuls en els seus extrems més. Les proteïnes motores dirigides cap a l'extrem menys que uneixen el còrtex cel·lular als microtúbuls astrals actuen separant els pols del fus.

22. Indica si les afirmacions següents són certes per a la fase G1 del cicle cel·lular, per a la fase S, la fase G2, o la fase M. Una mateixa afirmació pot ser certa per a una, totes o cap de les fases.

- a. La quantitat de DNA nuclear en la cèl·lula es duplica. *R: S*
- b. L'embolcall nuclear es fragmenta. *R: M*
- c. Les cromàtides germanes se separen l'una de l'altra. *R: M*
- d. Les cèl·lules que no tornaran a dividir-se de nou solen quedar-se detingudes en aquesta fase. *R: G1*

- e. Es forma la paret cel·lular primària d'un vegetal. *R: M*
- f. Els cromosomes es presenten com a cromatina estesa i difusa. *R: G1,S,G2*
- g. Aquesta fase forma part de la interfase. *R: G1,S,G2*
- h. La ciclina mitòtica es troba en els seus nivells més baixos. *R: M*
- i. Una proteïna Cdk està present en la cèl·lula. *R: G1,S,G2,M*
- j. S'ha identificat en aquesta fase un mecanisme de control del cicle cel·lular.
R: G1,S,G2,M

23. L'índex mitòtic és una mesura de l'activitat mitòtica en una població cel·lular, que es calcula com el percentatge de cèl·lules en mitosi en un moment determinat. Després d'examinar una mostra amb 1.000 cèl·lules, trobes que 30 estan en profase, 20 en prometafase, 20 en metafase, 10 en anafase, 20 en telofase i 900 en interfase. D'aquelles que es troben en interfase, has estimat (mitjançant la tinció de les cèl·lules amb un marcador específic del DNA) que 400 tenen una quantitat X de DNA, 200 tenen 2X, i 300 una quantitat més o menys intermèdia entre les dues anteriors. L'anàlisi autoradiogràfica indica que la fase G2 dura 4 hores.

- a. Quin és l'índex mitòtic d'aquesta població de cèl·lules?

R: Índex mitòtic = (30+20+20+10+20)/1000 = 0,1 = 10%

- b. Especifica la proporció del cicle cel·lular que s'ha invertit en cadascuna de les fases següents: profase, prometafase, metafase, anafase, telofase, G1, S, G2.

R: profase: 3%, prometafase: 2%, metafase: 2%, anafase: 1%, telofase: 2%, G1: 40%, S: 30%, G2: 20%

- c. Quina és la duració total del cicle cel·lular?

R: Si G2 dura 4 hores, la qual cosa suposa el 20% de la duració total del cicle, tot el cicle dura: $4/0,2 = 20$ hores

- d. Quant de temps (en hores) s'empra en cada fase de la part b?

R: profase: 0,6 h, prometafase: 0,4 h, metafase: 0,4 h, anafase: 0,2 h, telofase: 0,4 h, G1: 8 h, S: 6 h, G2: 4 h

- e. Per a mesurar la fase G2, afegeixes timidina tritiada (un precursor de DNA) al cultiu en un temps determinat t , i posteriorment analitzes mitjançant autoradiografia els nuclis marcats de mostres d'aquest cultiu a intervals de temps regulars. Quina observació concreta hauràs de realitzar per a determinar la duració de la fase G2?

R: Ha d'observar-se el començament de l'aparició de les primeres cèl·lules marcades en profase.

- f. Quina proporció de cèl·lules en interfase s'esperaria que tingueren nuclis marcats en autoradiografies preparades poc després de l'exposició a la timidina tritiada? (assumeix que el període de marcatge és curt però suficient per a permetre que la timidina entre en la cèl·lula i s'incorpore al DNA).

R: Aproximadament el 30% de les cèl·lules en interfase estaran marcades, ja que totes les cèl·lules que estiguen en fase S incorporaran la marca immediatament, i, com hem deduït abans, una mitjana del 30% de les cèl·lules del cultiu estaran en fase S a cada moment.

24. Basant-te en el coneixement que es té sobre la regulació del cicle cel·lular eucariota, com explicaries cadascuna de les observacions experimentals següents?

- a. Quan la Cdk-ciclina mitòtica s'injecta en cèl·lules que acaben d'eixir de la fase S, la condensació dels cromosomes i la ruptura de l'embolcall nuclear succeeix immediatament, en comptes de patir el retard normal de diverses hores de G2.

R: Normalment, el complex Cdk-ciclina s'activa al final de G2 i catalitza, aleshores, la fosforilació de les làmines i les condensines, la qual cosa contribueix al desassemblatge de l'embolcall nuclear i a la condensació dels cromosomes. L'experiment mostra que és possible induir l'activitat del complex Cdk-ciclina mitòtiques de seguida que acaba la fase S mitjançant la introducció exògena en la cèl·lula de Cdk-ciclina.

- b. Quan s'introdueix en les cèl·lules una forma indestructible de la ciclina mitòtica, entren en mitosi però no poden eixir-ne i tornar a entrar-hi en la fase G1.

R: Això prova que es requereix la destrucció de la ciclina mitòtica, i la consegüent inactivació el complex Cdk-ciclina, perquè les cèl·lules puguin completar la mitosi i començar un nou cicle.

- c. Les mutacions que inactiven la fosfatasa principal que s'usa per a catalitzar la desfosforilació de proteïnes, provoquen un gran retard en la reconstrucció en l'embolcall nuclear que té lloc habitualment al final de la mitosi.

R: El trencament de l'embolcall nuclear és produït per la fosforilació de les làmines nuclears durant la profase pel complex Cdk-ciclina mitòtic. La deficiència mostrada per cèl·lules deficientes en la proteïna fosfatasa prova que la desfosforilació de les làmines és necessària perquè l'embolcall nuclear torne a formar-se al final de cicle.

MEIOSI

25. En la figura es mostren dibuixos de diverses fases de la meiosi d'un organisme, marcades des de la lletra A fins a la lletra F.

- a. Quin és el nombre diploide de cromosomes en aquesta espècie?

R: $2n = 4$

- b. Ordena aquestes sis fases de la meiosi cronològicament i nomena-les.

R: Ordre correcte: F, E, D, B, A, C

A: Metafase II

B: Telofase I (i citocinesi)

C: Anafase II (i citocinesi)

D: Metafase I

E: Profase I tardana (diplotè)

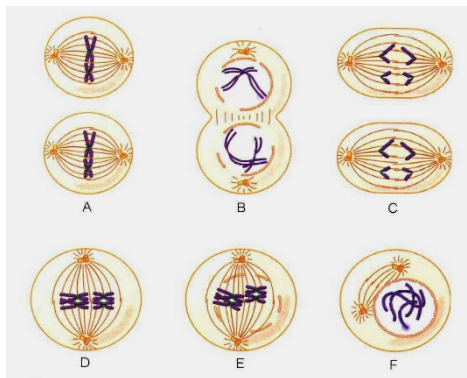
F: Profase I primerenca (leptotè)

- c. Entre quines d'aquestes dues fases se separen els centròmers homòlegs?

R: Entre metafase I (D) i telofase I (B)

- d. Entre quines dues fases succeeix la recombinació?

R: Entre leptotè (F) i diplotè (E) o profase I.



26. Suposa que disposes d'un organisme diploide en el qual els cromosomes aportats per l'espermatozoide tenen marcadors citològics en els centròmers, la qual cosa et permet distingir-los visualment respecte als cromosomes aportats per l'òvul.

- a. Es podria esperar que totes les cèl·lules somàtiques (les cèl·lules que no són gàmetes) d'aquest organisme, tingueren el mateix nombre de centròmers materns que paterns? Explica-ho.

R: Sí. Cada centròmer es duplica i cadascuna de les còpies es reparteix entre les dues cèl·lules filles resultat de la mitosi. Totes les cèl·lules somàtiques procedeixen del zigot per mitosi i aquesta sempre ocorre de la mateixa forma.

- b. Es podria esperar el mateix nombre de centròmers materns que paterns en cada gàmeta produït per aquell individu? Explica-ho.

R: No. Durant la meiosi, els centròmers se separen durant la primera divisió meiòtica i ocorre un repartiment aleatori dels centròmers patern i matern, de manera que cada cèl·lula filla pot rebre el centròmer patern o matern de cada parella de cromosomes homòlegs.

27. Suposem que X és la quantitat de DNA present en el gàmeta d'un organisme que té un nombre de cromosomes diploide igual a 4. Si assumim que tots els cromosomes són més o menys de la mateixa grandària, quant de DNA (X , $2X$, $1/2X$, etc.) esperaries en cadascun dels casos següents?

- a. Un zigot immediatament després de la fecundació.

R: $2X$

- b. Una única cromàtide germana.

R: $\frac{1}{2}X$

- c. Una cèl·lula filla després de la mitosi.

R: $2X$

- d. Un únic cromosoma després de la mitosi.

R: $\frac{1}{2}X$

- e. Un nucli en profase mitòtica.

R: $4X$

- f. La cèl·lula durant metafase II de la meiosi.

R: $2X$

- g. Un bivalent.

R: $2X$