

A ULAS
DE
VERANO

Instituto
Superior de
Formación del
Profesorado

LA CÉLULA COMO FACTORÍA.
GENÓMICA, PROTEÓMICA Y MEDIO

Federico Morán Abad

**QUÍMICA
Y SOCIEDAD:
UN BINOMIO
POSITIVO**



MINISTERIO
DE EDUCACIÓN
Y CIENCIA

LA CÉLULA COMO FACTORÍA. GENÓMICA, PROTEÓMICA Y MEDICINA¹

Federico Morán Abad
Profesor Titular Universidad.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I
Universidad Complutense. Madrid
Investigador Senior del Centro de Astrobiología. CSIC-INTA

1. BIORREACTORES

2. LA CÉLULA VIVA

La revolución de los “omas

Desarrollo biotecnológico

Ingeniería genética

Ingeniería metabólica

Genómica sintética

¿Qué hace a una célula viva?

BIBLIOGRAFÍA

1. BIORREACTORES

La célula viva es un sistema altamente complejo que puede desempeñar funcionalidad diversa y aparecer bajo una gran variedad de estructuras. La célula viva es un sistema abierto que necesita energía en forma de nutrientes para mantenerse viva y desempeñar su función. Esta actividad desarrollada por el metabolismo celular ha sido aprovechada por el hombre desde tiempos inmemoriales para obtener productos a partir de la transformación de unas materias primas o nutrientes. En este sentido la célula se comporta como una factoría que transforma unas sustancias en otras de interés.

1. Agradecimientos: A José Luis García Gómez, por haberme prestado muchas de las figuras.

El concepto de “factoría celular” se emplea oficialmente por primera vez en el V Programa Marco de la Comisión Europea dentro del área de Calidad de Vida y Gestión de Recursos Vivos. En este programa se incluyen subprogramas como: ingeniería de la factoría celular, desarrollo de nuevos procesos y productos, y explotación de nuevas materias primas. Todos estos atractivos programas financiaron gran cantidad de proyectos de investigación básica y, sobre todo, aplicada, que posibilitaron un mayor entendimiento de las funciones celulares, la producción a gran escala de fármacos y nutrientes, o el reciclado de materia orgánica de desecho.

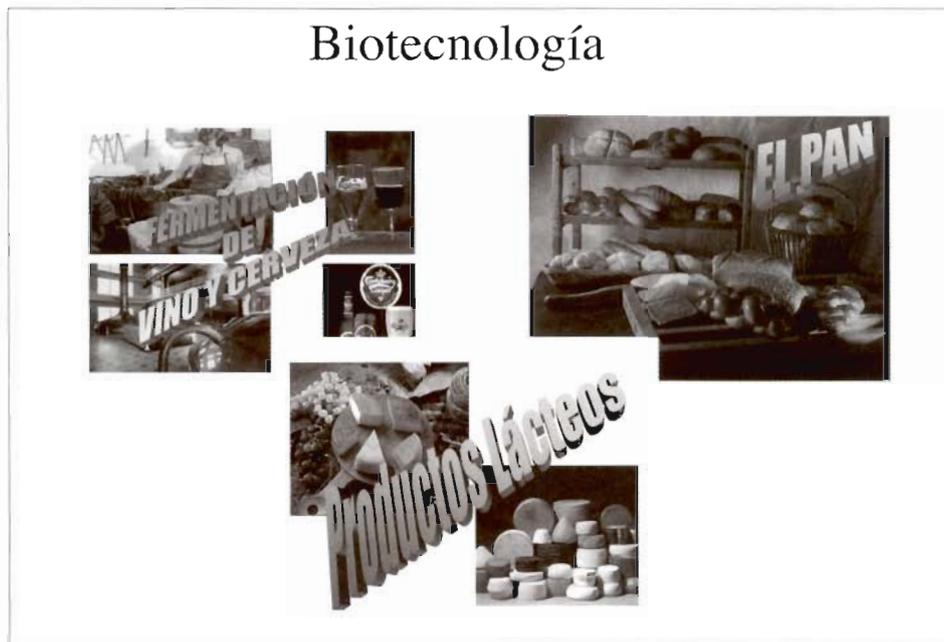


Figura 1. Biotecnología

La Biotecnología se ocupa precisamente de estudiar y desarrollar estos procesos, es por lo tanto el área donde se enmarca el programa de Factoría Celular. Como se ha apuntado anteriormente la Biotecnología es casi tan antigua como el hombre (figura 1). Desde hace mucho tiempo se viene fermentando materias primas como uva y levadura para fabricar vino y cerveza, a partir de la transformación bacteriana de glucosa en alcohol etílico. Productos lácteos como el queso o la cuajada también se obtienen por acción de agentes biológicos, así como la fermentación del pan. Esto no es nuevo. Lo que pretende la Biotecnología actual es optimizar y regular estos procesos y desarrollar otros mucho que sean de utilidad para el ser humano, desde la alimentación a la medicina, pasando por su empleo industrial y ecológico.

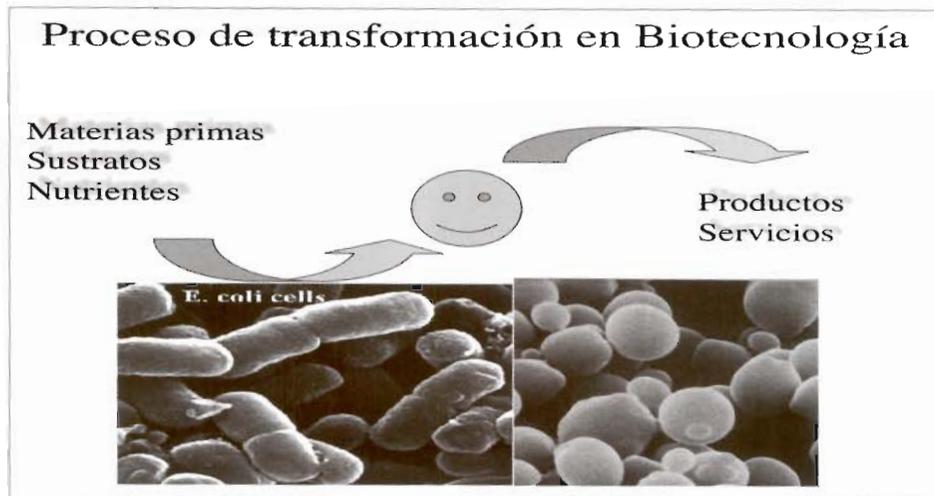


Figura 2. Transformación por biotecnología.

En términos generales podemos decir que la Biotecnología se ocupa de los procesos de transformación de materias primas, sustratos o nutrientes en productos y/o servicios, empleando para ello agentes biológicos, que pueden ser microorganismos o partes de ellos, como enzimas (Figura 2). La producción biotecnológica puede ser: a gran escala, como vino, cerveza, lácteos, etanol como combustible, etc.; a media escala, como antibióticos, polisacáridos y productos orgánicos; y a pequeña escala, como la producción de esteroides, insulina, enzimas y otros fármacos.

Los procesos biotecnológicos se pueden clasificar en dos categorías:

- 1) Biotransformación: biocatálisis in vitro; enzimas inmovilizadas
- 2) Metabolismo celular: biocatálisis in vivo; fermentadores

2. LA CÉLULA VIVA

La primera reflexión que hay que hacer antes de continuar analizando la estructura y las propiedades que hacen a las células desarrollar su función es el hecho indiscutible de que todas las especies vivas de la Tierra proceden de un ancestro común, todas están emparentadas. En la figura 3 se muestra un esquema del “árbol de la vida” donde se ve el origen común de los tres grandes superreinos. Todas las especies, desde bacterias a seres humanos compartimos unos componentes moleculares comunes, estamos formados con los mismos tipos de moléculas, que en el mejor de los casos sólo se diferencian en la secuencia de los aminoácidos en las proteínas. Desde el punto de vista del estudio de las teorías sobre qué es la vida, este hecho es un contratiempo, porque solo tenemos un único ejemplo, solo conocemos una forma de vida. Pero desde el punto de vista biotecnológico esto es una ventaja ya que los productos de unos sirven para los otros. De este hecho se aprovecha en parte la biotecnología.

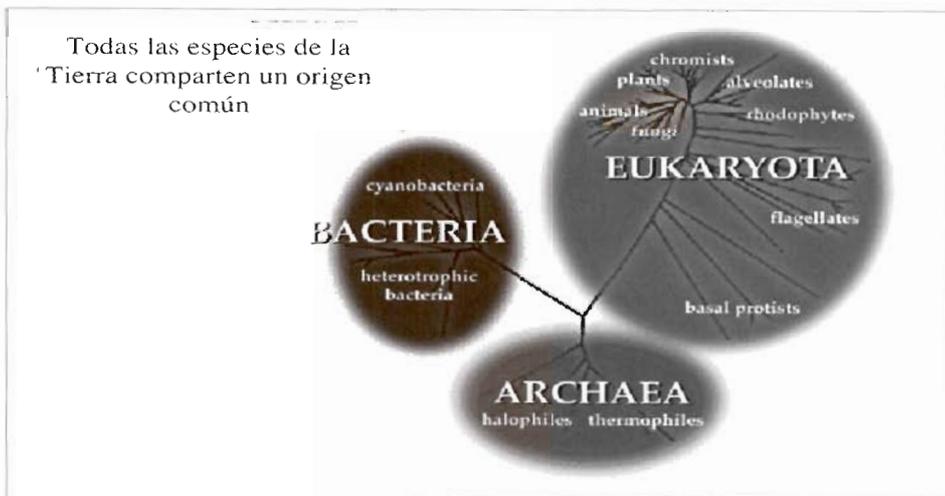


Figura 3: El árbol de la Vida

El desarrollo de la Biología Molecular en los últimos años ha permitido comprender la estructura y en buena medida el funcionamiento de las células. Siempre teniendo en cuenta que a pesar de su origen común, la funcionalidad y complejidad estructural de unas células puede llegar a ser totalmente diferente a otras. Sirva como comparación una neurona y una bacteria. Siendo las dos células vivas no hace falta abundar en las grandes diferencias que las separan, a pesar que ambas tienen ribosomas para sintetizar proteínas y canales iónicos para establecer su potencial de membrana y sistemas reparadores de DNA, etc.... que funcionan con los mismos principios moleculares.

Células y virus

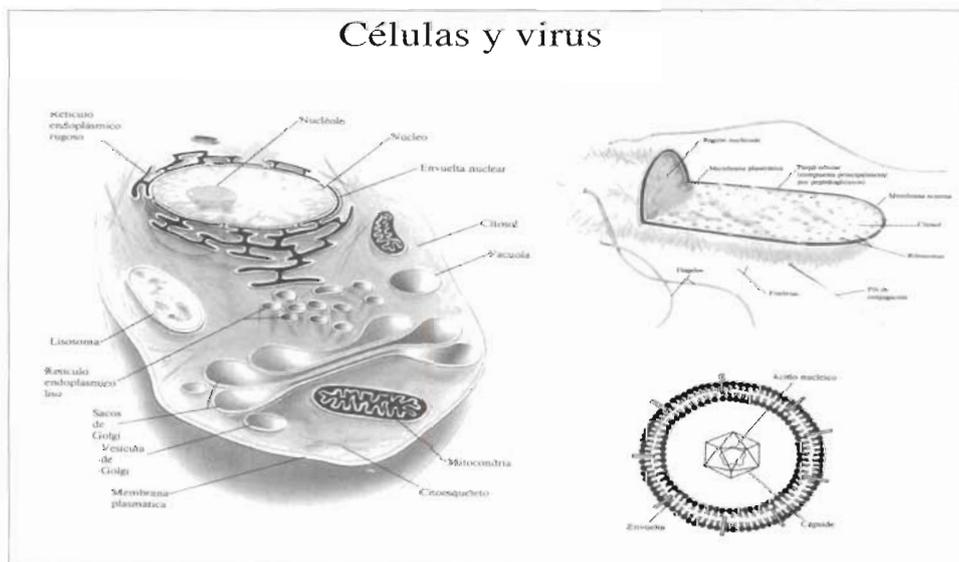


Figura 4: La célula viva

En el árbol de la vida no se ha incluido, intencionadamente, los fagos y virus. Para unos pertenecen al mundo de los seres vivos y para otros no. Todo depende donde se ponga la frontera y que propiedades se consideren esenciales para ser vivo (figura 4). Si se incluye el metabolismo y la estructura celular funcional, dinámica, como condición, entonces los virus no son vivos, son más bien sistemas de estructuras moleculares complejas en equilibrio, casi como un cristal. Si consideramos sus propiedades de autorreproducción y evolución, entonces si pertenecerían al grupo de los vivos. En cualquier caso todos coinciden en que están en la frontera.

La revolución de los “omas”

La primera evolución de la genética y la bioquímica podría atribuirse a las contribuciones de científicos como Mendel, Pasteur, Fleming, Buchner y muchos otros. Pero desde luego, todo el mundo coincide que el punto de partida de la segunda evolución se sitúa con el descubrimiento de la estructura de doble hélice del ADN por Watson y Crick.

Sin embargo, en los últimos años hemos asistido a lo que se ha dado en llamar la revolución de los “omas” que ha transformado el panorama de la biología molecular, la genética y otras disciplinas afines.

Genoma: consistente en la determinación de la secuencia de los genes (su ADN) de las células de diferentes organismos, desde bacterias y virus a el mismo ser humano. Desde el establecimiento de las técnicas masivas de secuenciación (figuras 5 y 6) se esta incrementando a ritmo exponencial la cantidad de genomas de organismos secuenciados. Esto conlleva un conocimiento sin precedentes, pero también una cantidad de información que empieza a desbordar nuestra capacidad de análisis.

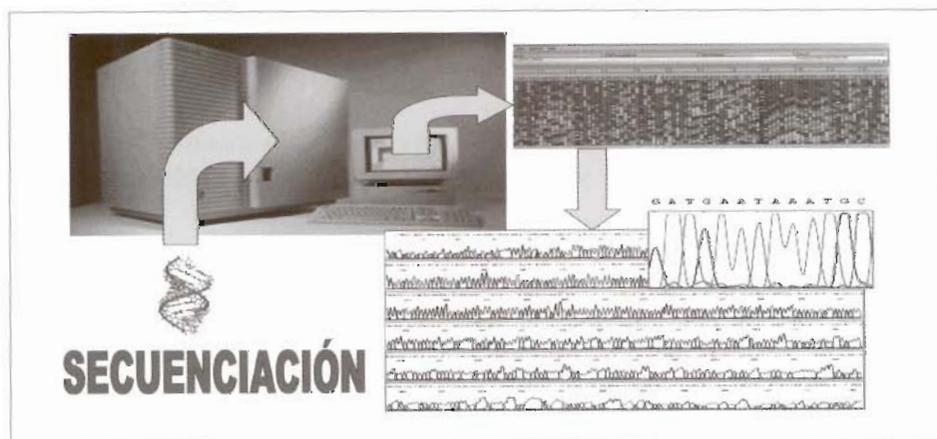


Figura 5. Secuenciación automática de ADN



Figura 6. Amplificación de ADN por PCR

Proteoma: establecimiento de las proteínas que están presentes y por tanto están siendo expresadas en un determinado momento, en una célula. Esta información es funcional y da idea de la actividad que está llevando la célula en cuestión. Las más recientes técnicas de espectrometría de masas (MS como MALDI/TOF) son las empleadas para obtener esta información.

Metaboloma: conocimiento del funcionamiento metabólico de una célula, es decir, de su red metabólica activa en una circunstancia dada. También se conoce como “fluxoma”. El establecimiento de los flujos y vías metabólicas es una información esencial en el tema que estamos tratando ya que incide directamente en la posible utilidad metabólica de una célula.

Citoma: se refiere al establecimiento de los tipos celulares y relaciones entre células. Hace referencia a organismos pluricelulares y también a cultivos o fermentaciones. Las técnicas de citometría de flujo son las que se emplean en este apartado.

Se podrían incluir otros “omas” referentes a organismos, poblaciones o ecosistemas, pero quizás ya estaríamos abandonando el dominio de la factoría celular.

Desarrollo Biotecnológico

La implementación a gran escala de las técnicas antes mencionadas ha conducido al desarrollo biotecnológico que observamos hoy en día. Hoy la tecnología puede llegar a un grado de conocimiento de los mecanismos moleculares que están detrás de los procesos biotecnológicos que era impensable solo hace un par de décadas. Estas son algunas de las áreas donde se concreta este desarrollo:

Ingeniería Genética

- Transformación de organismos:
 - Por selección de colonias optimizadas
 - Transformación directa: clonaje

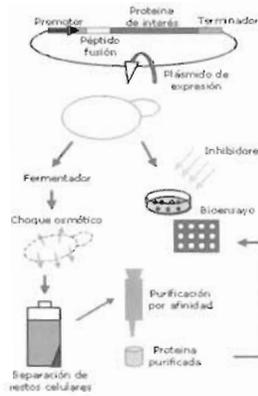


Figura 7

• Ingeniería Genética

La Ingeniería Genética consiste en la transformación del genoma de un organismo para que desarrolle una función de interés biotecnológico (figura 7). Esta transformación en el pasado se ha hecho por selección de colonias optimizadas, método que podríamos llamar de selección artificial (muy empleado en la mejora de cepas de levadura, por ejemplo).

Actualmente la forma más directa de hacer esta transformación es mediante técnicas de clonación. En la figura 8 se representa de modo esquemático el proceso de inserción de un gen (el de la quimotripsina de ternera) en células de levadura. La figura 9 representa el proceso de clonación de una secuencia de DNA de interés en un plásmido (como se muestra en la figura 10, un plásmido es un trozo circular de DNA independiente del cromosoma principal de la bacteria) para su posterior inserción en una célula para su expresión.

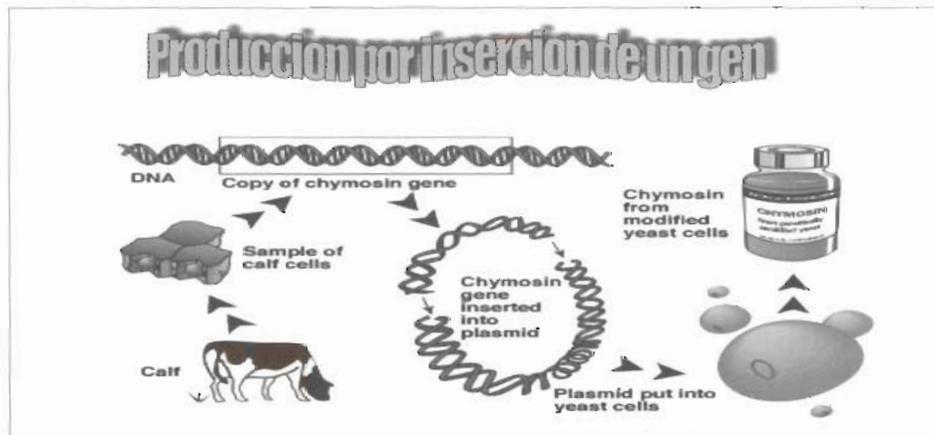


Figura 8. Inserción de un gen

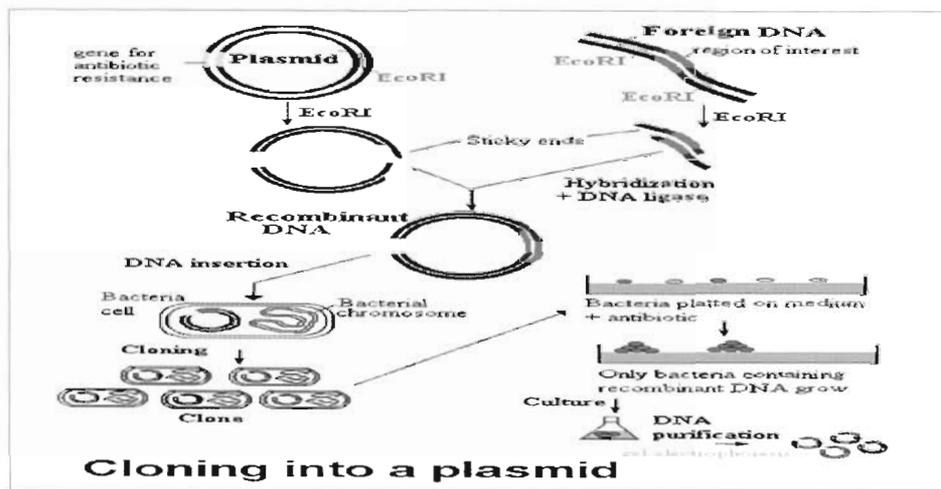


Figura 9. Clonación en un plásmido

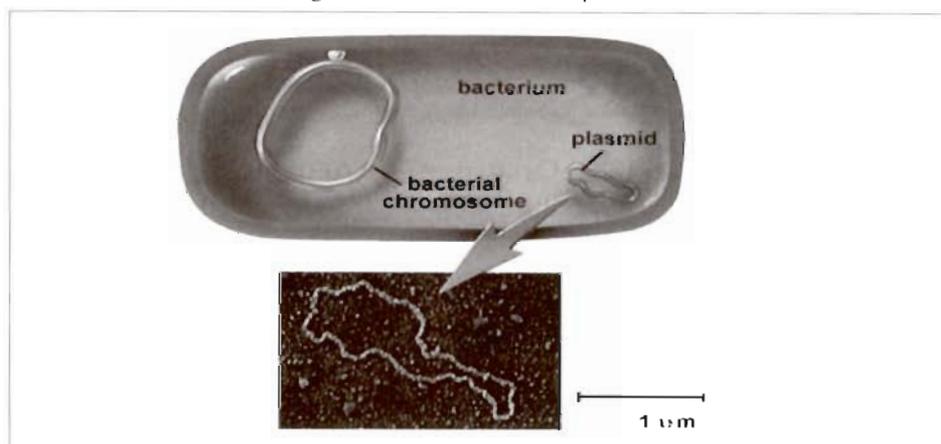


Figura 10. Plásmido bacteriano

Los procesos de “cortado y pegado” de genes de un genoma a un plásmido se realizan gracias a las técnicas de recombinación de ADN mediante el empleo de endonucleasas de restricción. Estas enzimas tienen la propiedad de cortar la doble hélice de ADN de un genoma en secuencias complementarias, de este modo la terminación de un fragmento es complementaria con el inicio de otro fragmento y se pueden asociar por complementariedad de bases. Entonces se añade una ligasa que une las dos hebras de la cadena sellando la unión. En la figura 11 se muestra el modo de acción de la endonucleasa EcoRI. La nueva molécula obtenida se denomina ADN recombinante. De este modo se puede cortar con EcoRI una región de ADN de interés. Se corta un plásmido con el mismo enzima y se introduce la región en el plásmido aprovechando la complementariedad de bases, como se muestra en la figura 12. En la figura 13 se muestra el funcionamiento de otra endonucleasa de restricción, BamHI.

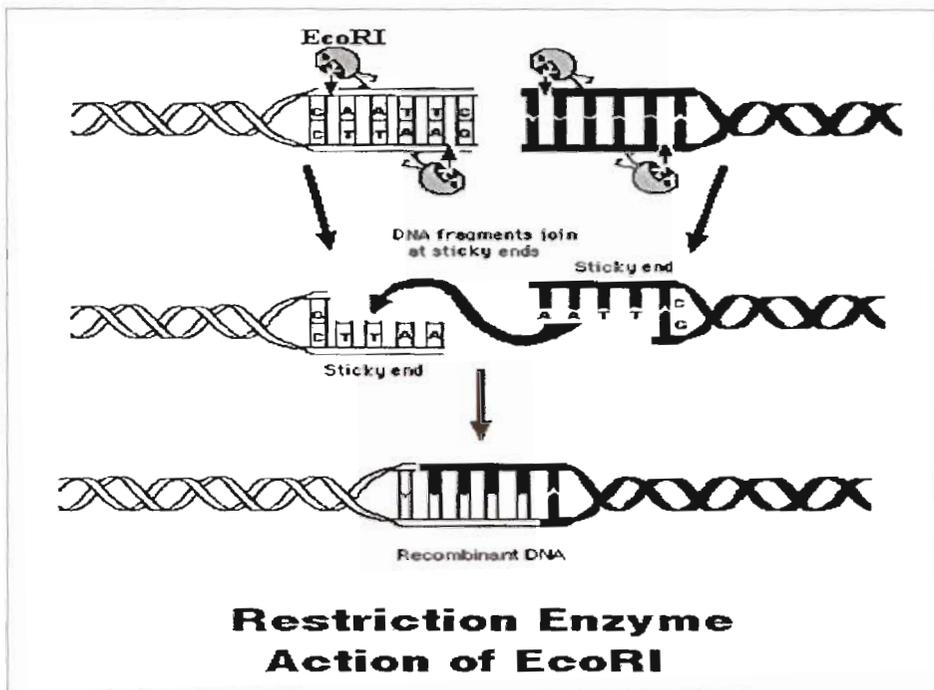


Figura 11. Acción de la enzima de restricción EcoRI

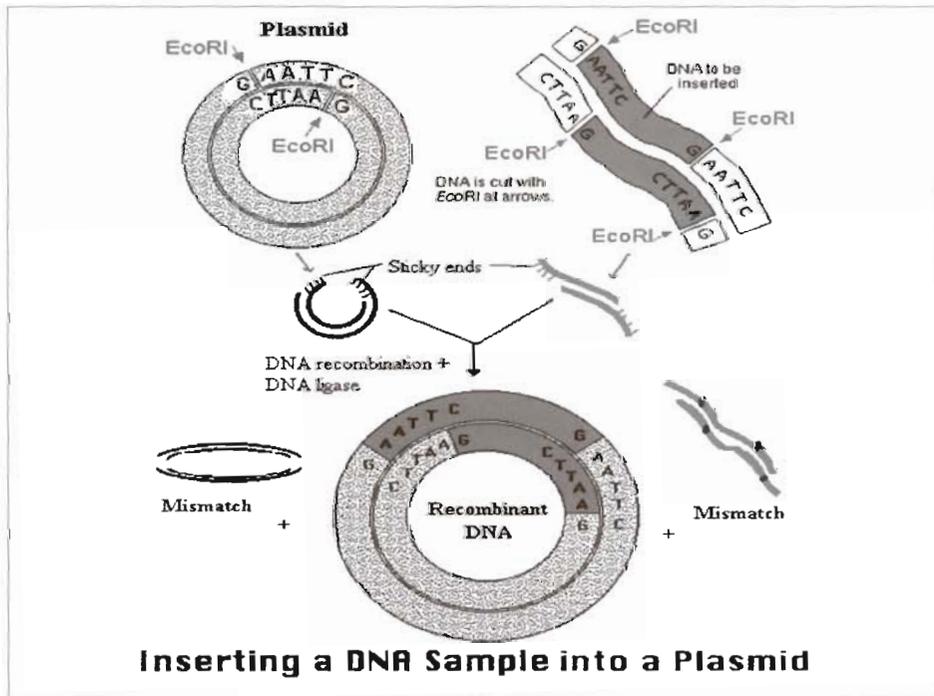


Figura 12. Inserción de un trozo de ADN en un plásmido

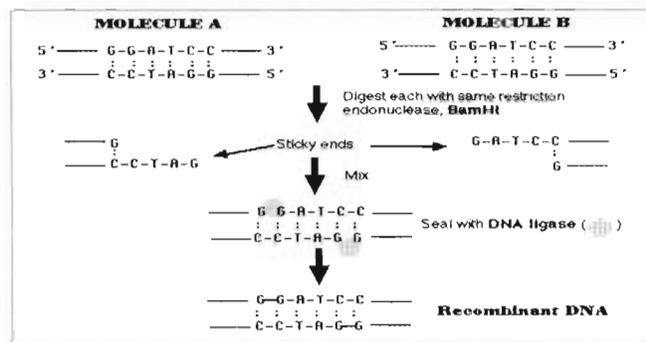


Figura 13. Endonucleasa de restricción BamHI

• Ingeniería Metabólica

Sacar provecho del metabolismo de microorganismos para su empleo industrial no es una tarea fácil. Si se pretende modificar o incidir sobre las rutas metabólicas para favorecer determinados procesos de síntesis, por ejemplo, hay que contar con la propia regulación del metabolismo celular y su intrincada estructura. En la figura 14 se muestra un esquema del metabolismo celular (básicamente de *E. Coli*) donde se puede apreciar a simple vista su complejidad. Sobre esta carta de reacciones, transformaciones y flujos habría que superponer todo un sofisticado sistema de comunicación y regulación que hacen que la modificación del flujo de producción de un “simple” metabolito no sea una tarea fácil. Por ejemplo, muchas veces se piensa que con duplicar o triplicar un determinado grupo de genes involucrados en la síntesis de un metabolito, se obtiene una mayor producción del mismo. Pues bien, son numerosos los ejemplos en los que no sólo no se obtiene un incremento si no que la autorregulación del metabolismo celular condice a una menor producción, a pesar de tener mayor número de enzimas trabajando en la ruta.

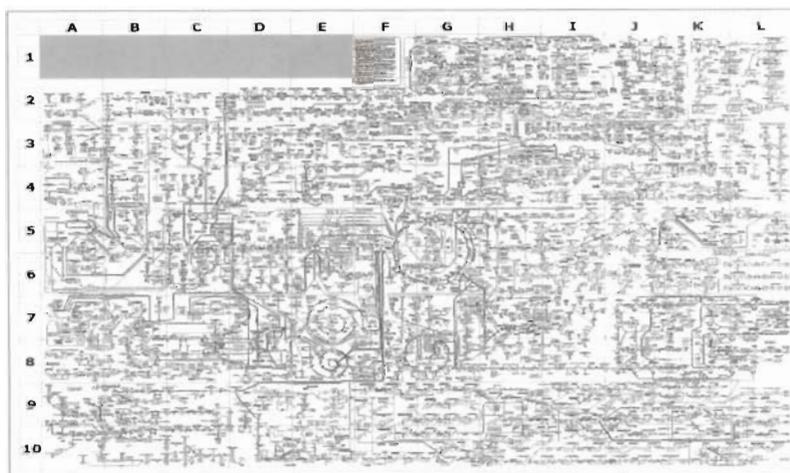


Figura 14. Carta de las rutas metabólicas

Por ello, la Ingeniería Metabólica se ocupa de varios de los aspectos que conducen a la transformación de un microorganismo en un proceso biotecnológico rentable. Cómo modificar una célula viva para obtener flujos y concentraciones de los metabolitos deseados.

Diseño metabólico: organización, mecanismos de reacción y mecanismos de control. La organización de una compleja red metabólica se puede germinar mediante el empleo de herramientas computacionales a partir de los datos de actividades y flujos. Existen diferentes bases de datos que ofrecen información detallada de rutas metabólicas, más o menos completas. Un ejemplo es el KEGG de Kyoto (ver figura 15). Otra aproximación es a través del análisis estequiométrico, que permite de forma computacional un análisis de los modos elementales de una ruta. El siguiente paso consiste en determinar cómo afectan los cambios en concentración y actividad de determinadas enzimas al flujo de la ruta. Esta tarea se realiza mediante el estudio del control que ejercen los diferentes enzimas en la ruta: la distribución del control del flujo metabólico. También hay que determinar las diferentes posibilidades de conversión de un metabolito en otro y los efectos sobre una u otra ruta.

<http://www.kegg.com>
<http://www.ecocyc.org/>
<http://www.expasy.ch/cgi-bin/search-biochem-index>

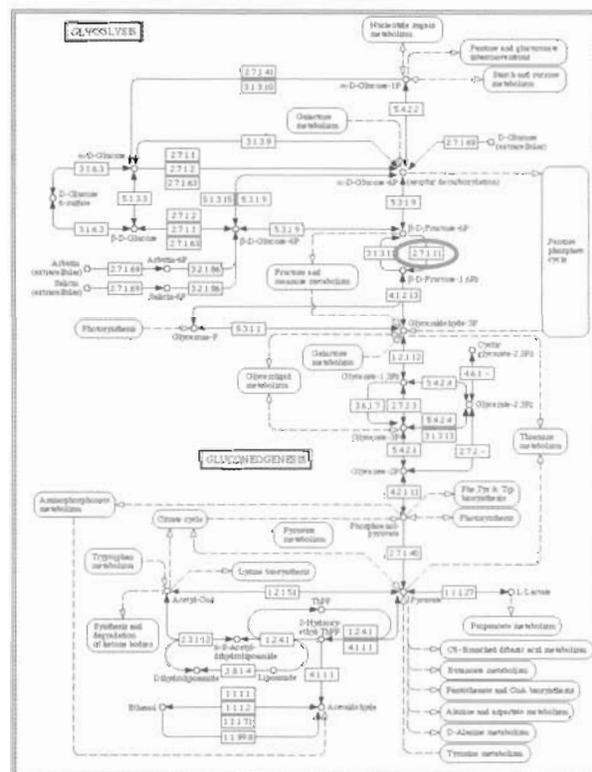


Figura 15. Ejemplo de la base de datos KEGG

Asignación funcional de genomas y modificación genética. Aspectos tratados en el apartado anterior.

Producción Industrial. En la mayoría de los casos una vez determinados y comprobados los cambios metabólicos en el laboratorio hay que trasladarlo a la producción industrial, a mayor o menor escala. Muchas veces el proceso fracasa aquí por problemas de escala en los cultivos, por falta de oxigenación, por rotura de las células por la agitación a mayor escala, etc. La solución de todos estos problemas así como el diseño de los sistemas y su rentabilidad industrial es objeto de lo que podríamos llamar Ingeniería Química/Metabólica.

• Genómica Sintética

En un proceso de fermentación una gran parte los nutrientes suministrados se emplean por el microorganismo para su crecimiento y para el mantenimiento de sus funciones celulares. Cuando este microorganismo se emplea para la obtención por fermentación de un determinado producto metabólico, lo que se pretende es que la mayor parte de los nutrientes se emplee en esta transformación metabólica y no en otros procesos de “mantenimiento” celular. Esto hace que en muchos casos el rendimiento y, por tanto, la rentabilidad industrial sean bajos. Esto ha llevado a una serie de grupos de investigación a hacerse la pregunta ¿cuál es el mínimo número de genes que necesita un microorganismo para sobrevivir en un medio determinado? A esta pregunta se puede contestar mediante dos aproximaciones:

Delección sistemática de genes. Esta es la primera aproximación ofrecida por el grupo de Venter en 1999, eliminando selectivamente genes de *Micoplasma* (un microorganismo de genoma muy reducido de unos 400 genes). El resultado es que se puede reproducir y crecer con solo aproximadamente 250 genes.

Síntesis *ab initio* de un genoma bacteriano. Esta aproximación fue apuntada conjuntamente por Venter y otros científicos en 2003 y de momento sólo se han sintetizado genomas de virus, aunque es cuestión de tiempo la obtención de un genoma completo de bacteria mediante la unión sistemática de los genes que lo componen.

El campo de la genómica sintética surge inicialmente con objetivos biotecnológicos, pero la disposición de esta tecnología a abierto el campo a otros objetivos que podrían englobarse bajo el título de Biología Sintética, que implica también programas de investigación como vida sintética, célula sintética, genómica sintética y “Bio-Bricks” (figura 16), entre otros. Como botón de muestra, en la figura 17 se recoge la página web de la primera reunión internacional de Biología Sintética, celebrada este mismo año en Junio en el MIT.

¿Qué hace a una célula viva?

Todo este desarrollo ha despertado una serie de reacciones, unas entusiastas y otras críticas. Detrás de todo esto está la pregunta ¿se puede crear vida en el laboratorio? Para muchos es como “jugar a ser Dios en el laboratorio”, pero para otros es simplemente demostrar que la vida es el resultado de una serie de procesos físico-químicos organizados de un modo complejo, pero al fin de cuentas química y física.

Dejando a un lado el reto tecnológico de poder sintetizar *de novo* un genoma bacteriano completo (o de otro organismo), que en principio es sólo cuestión de técnica y tiempo, y dejando a un lado la utilidad biotecnológica de crear organismos minimalistas que “gasten” poco y “produzcan” mucho, en este último apartado vamos a hacer una serie de consideraciones sobre el objeto de la pregunta que hace a una célula viva.

Una célula viva (bacteria, arquea o eucarionte) es algo más que su genoma. Es evidente que gran parte de “lo que es” una célula viene codificado en sus genes. Es lo que podríamos denominar información explícita, que se encuentra codificada en una cadena de DNA, más o menos larga, más o menos compleja. Pero una cadena de DNA no “es” una célula. La célula tiene algo más. Desde luego muchos componentes que funcionan si están en su sitio: membranas, orgánulos, RNA's, ribosomas, enzimas, metabolitos, sales minerales, agua, etc.

Propongo el siguiente experimento. Tenemos una célula viva, sencilla, digamos una ameba, y con una varilla muy fina rompemos su membrana. Inmediatamente la célula deja de funcionar, deja de estar viva. Sin embargo siguen estando ahí todos sus componentes, pero ahora están desorganizados, se ha perdido la información espacial, tridimensional, que hacía funcionar a la célula. Su genoma sigue intacto, sus componentes siguen ahí, pero no funcionan porque no están en “su sitio”. Este estar en su sitio es lo que denominamos información implícita, que es necesaria para que una célula este viva. Y lo más importante de todo, esta información no está contenida en el genoma, le es dada a la célula en el proceso de su nacimiento, por cualquiera de los mecanismos conocidos. La información genética se hereda, pero la información epigenética (la disposición relativa de los componentes) también se hereda. Dicho de otra manera, hoy en día, en el tiempo presente, no se genera ni un solo organismo vivo si no es por nacimiento a partir de otro, que es su madre o su padre o combinación de ambos. Y esto es así para los padres, y los padres de estos y así hacia atrás en el tiempo hasta llegar al origen de las primeras células, al origen de la vida. Por tanto la evolución es esencial en la definición de vida, es un vector que no se puede obviar.

Esto nos conduce a un par de consecuencias. Primero que el proceso no es reversible, una vez que hemos desorganizado la célula, una vez que está muerta,

no se puede revertir, ni espontáneamente ni con ayuda. Los componentes celulares no se autoorganizan por sí mismos para ensamblar una célula funcional. La segunda consecuencia implica el objetivo de la genómica sintética. Se puede sintetizar el genoma completo de una bacteria, digamos *ab initio*, partiendo de nucleótidos y juntándolos con paciencia uno detrás de otro en el orden adecuado. Pero una vez que tenemos un genoma, pasar de ahí a tener una bacteria, es otra cosa. Aunque expresemos el genoma como lo haría una bacteria (cosa difícil de reproducir fuera de la célula), obtendríamos los correspondientes RNA's y de ahí las correspondientes proteínas, pero ¿cómo se ensamblan estos con lípidos, metabolitos y sales, para dar una célula funcional? No lo hacen. Cuando grupos como el de Venter sintetizan un genoma artificial, lo tienen que introducir dentro de una célula a la que se ha quitado su genoma, para que se exprese y eso sí, si es viable, codifique sus propias funciones. Pero eso no es del todo crear vida. Aunque reconozco que se ha llegado a mitad del camino.

BIBLIOGRAFÍA

GIBBS, W.W. *Synthetic Life. Scientific American*, May. 76-81. 2004.

HUTCHISON III, C.A. et al. *Global transposon mutagenesis and minimal mycoplasma genome. Science* 286, 2165. 1999.

KHOLODENKO, B.N., ET AL. *Metabolic design: how to engineer a living cell to desired metabolite concentrations and fluxes. Biotech. and Bioengin.* 59, 321

KOBAYASHI, H. et al. (2004) *Programmable cells: interfacing natural and engineered gene networks. PNAS* 101, 0414-0419

PFEIFFER, T., et al. *METATOOL: for studying metabolic networks. Bioinformatics* 15, 251-257. 1999.

THE INTERNATIONAL HUMAN GENOME MAPPING CONSORTIUM
A physical map of the human genome. Nature 409, 934. 2001.