

OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE ALGUNAS FRACCIONES SUBCELULARES

Objetivos:

- Introducción a los métodos de obtención de fracciones subcelulares: conceptos de homogeneización, centrifugación diferencial y en gradiente.
- Identificación, caracterización y análisis de pureza de las fracciones subcelulares obtenidas (núcleos, mitocondrias y cloroplastos). Observación de la morfología microscópica de los organelos aislados y/o en cortes.

Fraccionamiento subcelular:

Los métodos de microscopía permiten analizar en gran medida la anatomía y localización de los organelos celulares, pero si se quiere ahondar en su funcionamiento deben realizarse ensayos bioquímicos, para lo cual generalmente el primer paso es obtener fracciones enriquecidas en los distintos organelos. La obtención de esta fracción puede dividirse en dos partes denominadas homogeneización y fraccionamiento, típicamente mediante centrifugación diferencial.

La **homogeneización** consiste en disgregar los tejidos en las células que los componen y luego realizar la lisis de las células, de tal modo que se liberen sus componentes, en particular sus organelos, sin que estos sufran mayores daños. El uso de instrumentos como morteros, jeringas, homogeneizadores permiten la disgregación y lisis celular. Si se parte de un cultivo celular, no es necesario separar las células y se pasa directamente a la lisis celular. Para esto también existen diversas alternativas como el uso de detergentes que solubilizan las membranas, el “shock” osmótico y el uso de ultrasonido.

Una vez que se tienen todos los componentes celulares libres, es necesario separarlos en fracciones, es decir, realizar su fraccionamiento. El método más utilizado para este fin es la **centrifugación diferencial**. Cuando los diferentes componentes celulares se encuentran suspendidos en un líquido, tienden a sedimentar hacia el fondo debido a la gravedad. Para acelerar este proceso, se puede colocar el tubo conteniendo esta suspensión en un rotor giratorio, de forma de someter a las partículas a una fuerza centrífuga. Este procedimiento se denomina centrifugación, y el equipo especializado en el que se realiza se denomina centrífuga. ¿Qué sucede cuando las partículas suspendidas son sometidas a una fuerza centrífuga? Las partículas van a moverse hacia el fondo del tubo, pero a su vez dos fuerzas van a oponerse a este movimiento, la fuerza de fricción y la fuerza de flotación generada por el líquido desplazado. Esta contraposición de fuerzas hace que eventualmente cada partícula sedimente a velocidad constante, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$v = \frac{(m \times \omega^2 \times r)}{f} (1 - \rho_o/\rho)$$

m es la masa de la partícula, $\omega^2 r$ es la aceleración que se genera en el rotor, ρ_o es la densidad del líquido en el que están suspendidas las partículas, ρ es la densidad de la partícula y f es el coeficiente de fricción de la partícula.

Rearreglando esta ecuación, obtenemos:

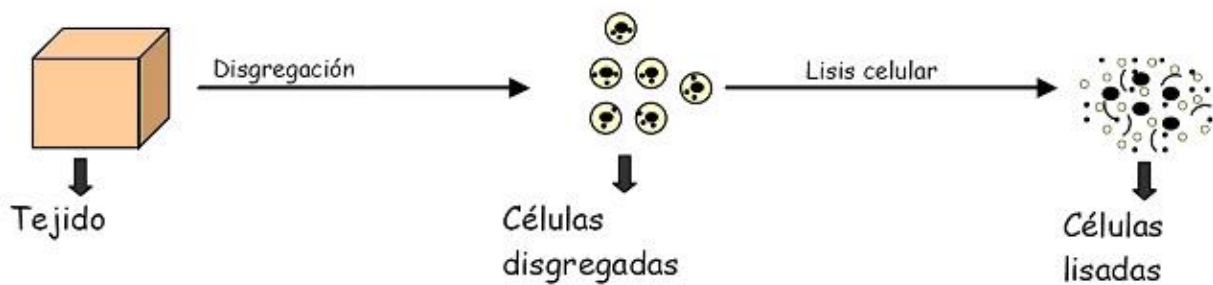
$$\frac{v}{\omega^2 \times r} = \frac{m}{f} (1 - \rho_o/\rho)$$

Esta ecuación implica que, para una aceleración constante, la velocidad de sedimentación depende de la masa de la partícula, de su densidad y coeficiente de fricción, y de la densidad del líquido. En particular, cuanto mayor sea la masa de la partícula, más rápido sedimentará. También vale la pena notar que la partícula solo sedimentará si su densidad es mayor a la del líquido ($\rho_o/\rho < 1$), mientras que si es igual o menor permanecerá quieta o flotará.

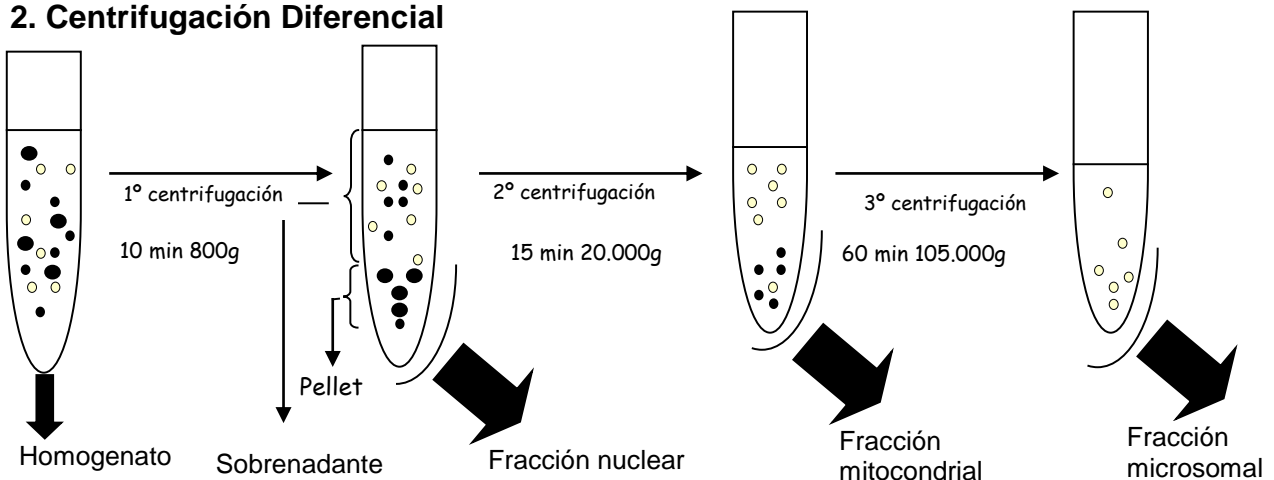
El cociente $v / (\omega^2 \times r)$ es una constante que se denomina coeficiente de sedimentación, y la unidad en que se expresa es el Svedberg (S), en homenaje a uno de los pioneros de la centrifugación. Cuanto más grande este coeficiente mayor será la velocidad de sedimentación. Frecuentemente la velocidad de centrifugación se expresa indirectamente en términos de la fuerza centrífuga resultante y su relación con la constante g de gravedad. Por ejemplo, una velocidad correspondiente a 1000g es aquella a la cual las partículas son sometidas a una aceleración 1000 veces mayor que la gravedad.

Puesto que los distintos componentes celulares difieren en su masa y densidad, van a tender a sedimentar a distintas velocidades. Esto implica que, realizando sucesivos pasos de centrifugación variando la fuerza centrífuga y la duración, puede hacerse que algunos componentes celulares sedimenten mientras que otros permanezcan en suspensión. Esta metodología se conoce como centrifugación diferencial.

1. Homogeneización



2. Centrifugación Diferencial



En la figura se esquematiza un fraccionamiento subcelular.

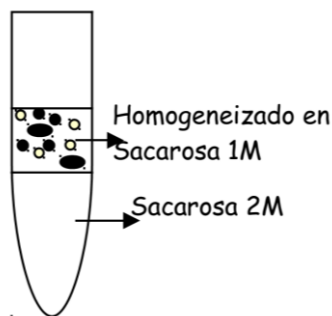
Por ejemplo, partiendo de un órgano como puede ser el hígado, se procede a la disgregación mecánica y lisis celular obteniéndose un homogeneizado, es decir una suspensión con los componentes celulares. Si se centrifuga este homogeneizado, a baja velocidad por un tiempo corto (10 minutos a 800g) se obtiene un sedimento o pellet que contiene los núcleos, es decir la fracción nuclear. Los núcleos son las primeras partículas en sedimentar ya que poseen el coeficiente de sedimentación más grande ($10^6 - 10^7$ S). Si se extrae el sobrenadante (todo aquello del homogeneizado que no sedimentó) se transfiere a otro tubo y se vuelve a

centrifugar ahora a mayor velocidad y durante más tiempo (15 minutos a 20.000g), se obtiene un segundo "pellet" que contiene la fracción mitocondrial.

Si se repite el procedimiento y se centrifuga el segundo sobrenadante (60 minutos a 105.000g) se obtiene la fracción microsomal, es decir vesículas de membrana intracelular y ribosomas principalmente. El sobrenadante de esta tercera centrifugación constituye la fase soluble o citosol de la célula, que contiene proteínas solubles, ácidos nucleicos, polisacáridos, lípidos y partículas pequeñas.

Cuando comienza la centrifugación las partículas se encuentran distribuidas en todo el tubo. Por tal motivo, partículas pequeñas que se encuentren cerca del fondo llegarán rápidamente al sedimento o serán arrastradas por las partículas más grandes. Esto hace que las fracciones de los organelos más grandes estén contaminados con organelos más pequeños. Por lo tanto, si se quieren eliminar organelos más pequeños de las fracciones de organelos más grandes, deben hacerse varias centrifugaciones para deshacerse de los primeros.

Alternativamente se pueden realizar centrifugaciones en gradiente de densidad. En un tubo se colocan soluciones (sacarosa, percoll, ficoll, etc) de densidad creciente hacia el fondo del tubo, y en la parte superior se coloca el homogeneizado. La partícula sedimentará hasta alcanzar la posición en el gradiente que presente igual densidad.



En el esquema se coloca un homogeneizado sobre una solución de sacarosa 2M. En estas condiciones sólo son capaces de sedimentar los núcleos, que son las partículas más densas, y no así el resto de los organelos, que permanecerán en la parte superior del tubo

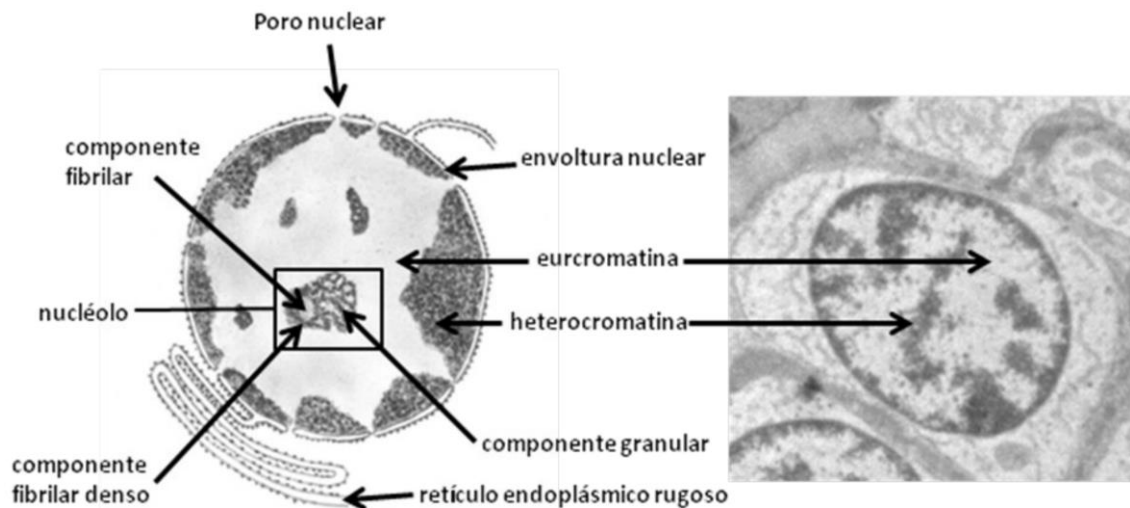
NÚCLEO

Objetivo:

- Identificación de una fracción subcelular enriquecida en núcleos mediante la reacción de Feulgen y comparación con núcleos en cortes histológicos.
- Estudio de la ultraestructura del núcleo.

Introducción:

El núcleo es el organelo celular donde se localiza el ADN. Su forma varía dependiendo del tipo celular, puede ser esférico, ovoide o multilobulado. Su tamaño oscila entre 3 a 15 μm y su posición depende del tipo celular. Está delimitado por una envoltura nuclear constituida por dos membranas celulares (dos bicapas lipídicas) separadas por una cisterna perinuclear. Esta envoltura se continúa en el citoplasma con el retículo endoplásmico rugoso, y por lo tanto su cara externa presenta ribosomas asociados.



En la cara interna de la envoltura se localiza una red de filamentos intermedios denominada lámina nuclear, constituida por las proteínas denominadas laminas. Tanto la lámina nuclear como la envoltura se ven interrumpidas en regiones denominadas poros nucleares, destinados al transporte de moléculas desde y hacia el citosol.

En el interior del núcleo el ADN que constituye los cromosomas se empaqueta con proteínas denominadas histonas. El conjunto del ADN, las histonas, y proteínas cromosómicas no histonas, se denomina cromatina. La unidad fundamental de empaquetado recibe el nombre de nucleosoma y está constituido por un octámero de histonas rodeado por dos vueltas de ADN.

La cromatina posee diversos grados de compactación dentro del núcleo, y pueden existir variaciones durante el ciclo celular. En su estado más laxo o descondensado la cromatina se denomina euromatina y se aprecia en microscopía electrónica de transmisión como regiones electrón-lúcidas (ver figura). Esta cromatina es transcripcionalmente activa ya que permite el acceso de factores de transcripción y toda la maquinaria enzimática necesaria para la transcripción. La cromatina condensada se denomina heterocromatina y se observa en microscopía electrónica de transmisión como regiones electrón-densas, generalmente asociadas a la envoltura nuclear. Esta cromatina se asocia con estados transcripcionalmente inactivos ya que dificulta el acceso de factores de transcripción al ADN. Es importante recordar que la compactación y descompactación de la cromatina son fenómenos reversibles. Podemos encontrar diferentes niveles de compactación del ADN que van desde la fibra de 2 nanómetros

(doble hélice de ADN), pasando por la fibra de 11 nm que corresponde al “collar de cuentas” que incluye los nucleosomas (complejo de histonas rodeadas de dos vueltas del ADN), la fibra de 30 nm, la de 300 nm, la de 700 nm hasta el cromosoma mitótico.

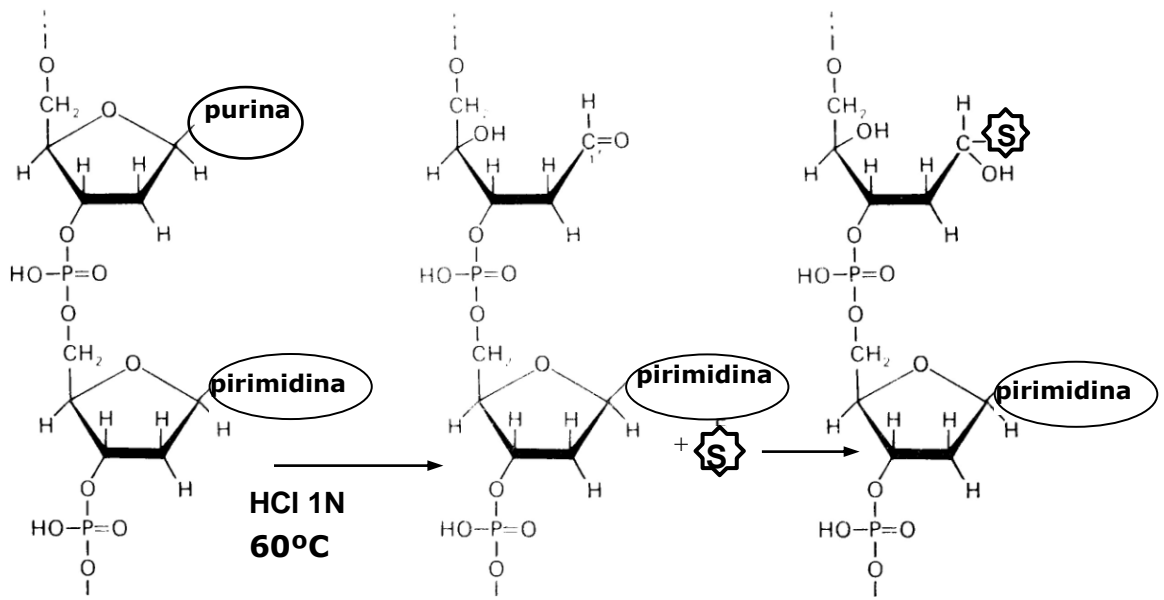
El nucléolo es una región dentro del núcleo, no delimitada por membrana, donde ocurre la transcripción del ARNr y ensamblado de las subunidades ribosomales por separado. Allí se localizan *loops* de ADN de distintos cromosomas, que contienen *clusters* de genes de ARNr. Cada uno de estos *clusters* se denomina Región Organizadora Nucleolar (NOR). En una micrografía electrónica de transmisión pueden distinguirse tres regiones en el nucleolo: (1) una región pálida denominada componente fibrilar o centro fibrilar que contiene ADN que no está siendo transcrito, (2) un componente fibrilar denso que contiene moléculas de ARNr que están siendo sintetizadas, y (3) componente granular que contiene partículas precursoras ribosomales en maduración. El tamaño del nucleolo refleja su actividad por lo que varía en distintos tipos celulares y puede variar también dentro de una misma célula.

En esta práctica, analizaremos una fracción subcelular obtenida mediante el siguiente protocolo a partir de un hígado de rata: (no será realizado en la clase)

- Homogeneización del hígado de rata en un homogeneizador Potter-Elvehjem, (10% peso/volumen) en 0,32 M sacarosa, 3 mM MgCl₂ en baño de hielo con 30 incursiones del émbolo.
- Filtración en gasa del homogeneizado.
- Centrifugación del filtrado a 800 \times g, durante 10 min a 4°C.
- Resuspensión del pellet en 5 ml de 1 M sacarosa, 1 mM MgCl₂, sembrado sobre 15 ml de sacarosa 2M y centrifugación a 100.000 \times g durante 1h a 4°C.
- El pellet resultante se resuspende en un volumen de 4ml de 2 M sacarosa, 1 mM MgCl₂, 10% glicerol y se conserva a -20°C hasta el momento de usar.

Para realizar el análisis de esta fracción utilizaremos **la reacción de Feulgen-Rossenbeck**. Este es un método de determinación cualitativa y cuantitativa de ADN *in situ*. Analizaremos además de los núcleos íntegros (fracción subcelular), los núcleos en cortes histológicos utilizando la misma reacción.

El primer paso de esta reacción incluye la hidrólisis del ADN con HCl 1N a 60°C, de manera de extraer las purinas únicamente, dejando un grupo aldehído expuesto en la posición 1' de las desoxirribosas. La preparación se incuba luego con el reactivo de Schiff (incolore a causa del tratamiento con H₂SO₃), el que se combina con esos grupos aldehído libres restaurando el grupo cromógeno de la molécula (cada molécula del reactivo de Schiff se combina con 2 grupos aldehído), dando una coloración fucsia. El ARN no se marca con esta técnica ya que se hidroliza casi completamente durante el primer paso de la reacción y el ARN remanente no se encuentra depurinado.



S: Ractivo de Schiff