

# MODULACIÓN BIOLÓGICA DE CAMBIOS DE FASE FUERA Y DENTRO DE LAS CÉLULAS

Rubén López Sánchez, David Pantoja Uceda y Douglas V. Laurents

Instituto de Química Física 'Blas Cabrera', CSIC, Madrid

<https://doi.org>



El título de este artículo puede traer a la mente recuerdos escolares de los intercambios de fase entre el hielo, el agua y el vapor del agua. En la primera parte de este ensayo, revisaremos algunos de estos intercambios «sencillos» en procesos fisiopatológicos de gran importancia (Figura 1). La segunda parte del ensayo tratará de otra clase de intercambio de fases, las separaciones de fase líquido/líquido (LLPS, por sus siglas en inglés *Liquid-Liquid Phase Separation*). La separación de fase líquido/líquido ha ganado gran relevancia durante los últimos 17 años en la biología molecular y celular por su capacidad de regular y fomentar procesos bioquímicos (Figura 2).

Quizás resulte sorprendente que el primer cambio de fases que aprendimos en el cole, la transición entre agua y hielo, esté modulado de forma compleja por la biología. El hielo se funde a 0°C, pero el agua muy pura puede superenfriarse hasta -40°C sin congelarse ya que el núcleo de hielo contiene al menos 90 moléculas de agua y la entropía se opone fuertemente a su formación. Organismos que habitan en

climas fríos cuentan con péptidos y/o proteínas anticongelantes que atrapan los núcleos nacientes de hielo o los obligan a crecer distorsionadamente, retrasando su desarrollo. Estas proteínas anticongelantes tienen orígenes evolutivos diversos. Sus estructuras también son diferentes aunque comparten una cara plana que se une al hielo. Una de estas proteínas tiene una estructura fascinante: está compuesta en casi su 50% por residuos de glicina y consiste en un haz de seis hélices de poliprolina II (PPII) organizada en una bicapa (Figura 1).

De la misma forma que hay proteínas que inhiben el cambio de fase del agua al hielo, hay otras que lo promueven de tal forma que van ordenando las moléculas del agua en estructuras similares al núcleo de hielo (Figura 1). Así logran que el agua se congele a temperaturas ligeramente inferiores a 0 °C. Un mejor ejemplo de esto se encuentra en la bacteria *Pseudomonas syringae*, que induce la formación de hielo para dañar la pared celular en frutas, creando una entrada para la bacteria. Aunque *P. syringae* estropea la fruta, también juega un papel

beneficioso en la producción de nieve artificial en las estaciones de esquí. Más relevante aún es su papel ecológico en el ciclo del agua, ya que grandes cantidades de esta bacteria son transportadas por el viento y una fracción significativa de la nieve y la lluvia que cae sobre la faz de la Tierra es inducida por *P. syringae* y microbios similares.

Cuando respiramos, las moléculas de oxígeno en fase gaseosa pasan a su fase sólida en combinación con la proteína hemoglobina y moléculas de dióxido de carbono, bien unidas en fase sólida a hemoglobina o disueltas en fase líquida como CO<sub>2</sub> o H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, y son liberadas a la atmósfera en fase gaseosa (Figura 1). Estos fueron los primeros procesos fisiológicos dilucidados a nivel molecular gracias a los estudios de Perutz, Kendrew y sus colaboradores. Aunque menos conocidos que la hemoglobina, las proteínas y lípidos que componen el surfactante pulmonar son igualmente importantes para estos cambios de fase. La tensión superficial agua/aire es tan elevada que los insectos la aprovechan para andar sobre el agua y los pulmones de bebés

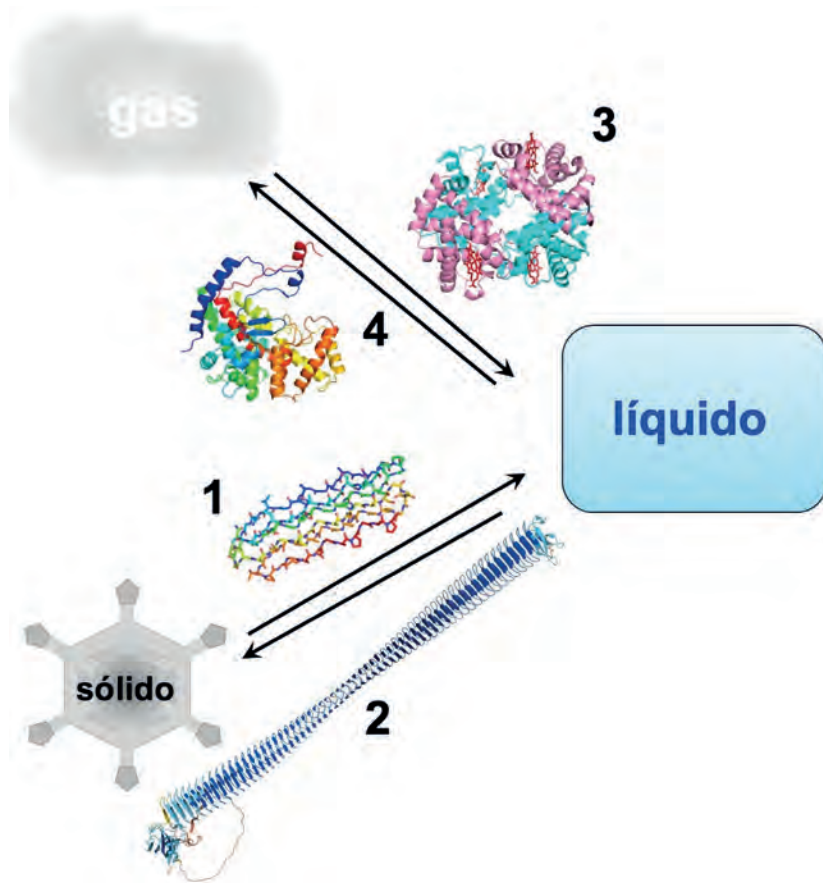


Figura 1  
Intervención de proteínas (1) anticongelantes, (2) inductores de congelación ELSA (por sus siglas en inglés, *enhanced ligand for solid aqua*), (3) hemoglobina y (4) anhidratasa carbónica en transiciones entre las fases sólida, líquida y gaseosa.

prematuramente no la superan para respirar. El surfactante pulmonar reduce esta tensión superficial y gracias a continuas investigaciones sobre su composición y función ha sido posible desarrollar preparaciones para salvar bebés prematuros.

Nuestro conocimiento sobre el estado de fase de las células ha ido evolucionando a lo largo de los últimos 125 años. A principios del siglo XX, gracias a estudios de microscopía de luz visible se había establecido la existencia de varios organelos «sólidos» como la mitocondria, el núcleo, el aparato de Golgi, etc. que flotan en un citoplasma de carácter líquido viscoso (Figure 3). Entonces, el interior de la célula podría describirse como

un coloide, es decir, una mezcla de un líquido y partículas sólidas insolubles minúsculas (de 1 a 1.000 nm), que dispersan la luz y no se asientan con el tiempo. También se reportaron otros organelos, como el nucleolo, el cuerpo de Cajal, o el centrosoma cuya presencia era menos constante y depende de las condiciones celulares.

El siguiente gran avance surgió en los años 1950-1960. Gracias a mejoras en microscopía electrónica, se descubrió que muchos de los organelos principales, como el núcleo, la mitocondria, el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi o las vesículas están rodeados por membranas. Esto dio lugar a un nuevo modelo celular

con las membranas como las protagonistas de la organización del interior de la célula. No obstante, la estructura de los organelos sin membrana como el nucleolo, el cuerpo de Cajal o el centrosoma siguió siendo un misterio. Por su parte, la visión del citoplasma cambió en las décadas de 1960-1980 con descubrimientos que dotaron a ese líquido viscoso un citoesqueleto de carácter dinámico compuesto por microtúbulos, filamentos intermedios y filamentos de actina.

Este viaje platónico de la pegajosidad caótica hacia la estructura y el orden promovido por membranas y filamentos dio un giro inesperado en la década de 1990-2000 con los descubrimientos relativos a la membrana celular que indicaban que podría organizarse en zonas menos fluidas con una composición molecular distinta llamada «balsa lipídica». Este cambio de fase líquido/líquido en el contexto de la membrana tiene funciones importantes en la transmisión de señales y presagió el descubrimiento de la naturaleza real de los organelos sin membrana.

Un avance verdaderamente revolucionario ocurrió en 2009 de la mano de Brangwynne, Hyman y sus colaboradores. Ellos descubrieron que un organelo especial llamado cuerpo P (o *P-body*), el cual determina el destino de la línea de células germinales durante el desarrollo, se comporta como una microgota de líquido separada por fases. Para estudiar los cuerpos P, emplearon una técnica denominada FRAP (recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueo, por sus siglas en inglés). En ella, se utiliza un láser para decolorar (fotoblanquear) la mitad de un cuerpo P marcado con proteínas fluorescentes. Al medir cuánto tardan las moléculas de la mitad no blanqueada en mezclarse con la parte afectada, pudieron calcular la viscosidad del

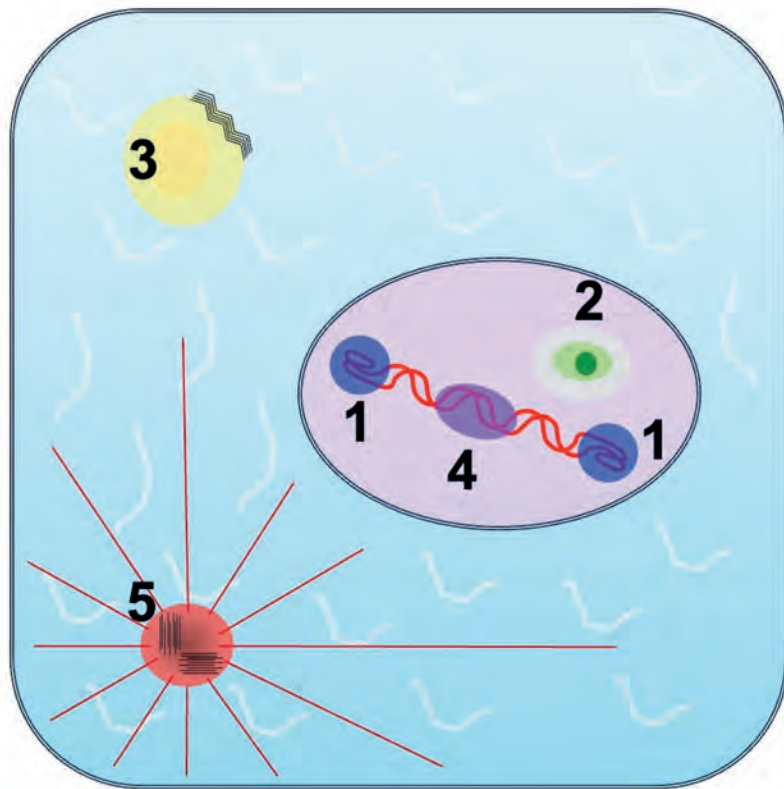


Figura 2

Algunos condensados biomoleculares: (1) el cuerpo de Cajal, (2) el nucleolo, (3) el gránulo de estrés, que puede promover la formación de amiloides (líneas onduladas), (4) el complejo potenciador y (5) la matriz pericentriolar.

cuerpo P, descubriendo que es similar a la de líquidos viscosos como la miel.

En otros experimentos, se fotoblanqueaba la gota completa. Al medir la recuperación de la fluorescencia en el orgánulo totalmente decolorado, lograron calcular la tasa de intercambio de moléculas entre el cuerpo P y el resto del citoplasma.

Estos descubrimientos impulsaron el estudio de otros orgánulos sin membrana o «condensados biomoleculares», como se les denomina habitualmente hoy en día. En los últimos 17 años, se ha informado de la existencia de más de 24 condensados formados por separación de fases líquido-líquido (LLPS). Muchos están implicados en la síntesis, modificación, corte y empalme, y regulación de traducción del ARN. Entre los

más notables se encuentran: 1. El cuerpo de Cajal: clave en la acción de la telomerasa; 2. El nucleolo: que funciona como una línea de ensamblaje para los ribosomas y contiene tres capas distintas separadas por fases; 3. El gránulo de estrés: se forma de manera transitoria ante condiciones celulares adversas para detener la traducción, reteniendo ARNm y ciertas proteínas; 4. El complejo potenciador (*Enhancer*): se forma alrededor del dominio C-terminal de la ARN polimerasa II y sirve para potenciar drásticamente la transcripción; y 5. La matriz pericentriolar que rodea a los centriolos y organiza la red de microtúbulos del citoesqueleto (Figura 2).

Al estudiar el comportamiento de proteínas y ARNs marcados bajo diversas condiciones (como el estrés o la mitosis) y observar

los efectos de las mutaciones en la LLPS, los científicos establecieron que ciertas moléculas, llamadas «andamios», son esenciales para la formación del condensado. Otras macromoléculas, denominadas «clientes», solo pueden integrarse una vez que el condensado ya se ha formado. Asimismo, se descubrió que las interacciones débiles, transitorias y multivalentes son fundamentales para mantener el condensado formado en fase líquida. Estas interacciones pueden estar mediadas por: 1. Homo-oligomerización de estructuras plegadas: como ocurre con los dominios N-terminales de la TDP-43 en los gránulos de estrés y de la nucleoplasmina en el nucleolo; 2. Segmentos ricos en prolina: que se unen débilmente a una serie de dominios SH3. 3. Residuos «pegajosos», es decir D, E, F, I, K, L, M, R, W e Y, presentes en regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs, por sus siglas en inglés *intrinsically disordered regions*), que median interacciones electrostáticas (catión/anión, catión/ $\pi$ ,  $\pi/\pi$  e hidrofóbicas).

Los residuos pegajosos suelen estar dispersos entre residuos «espaciadores» flexibles como la alanina (A), serina (S) y treonina (T). Aunque la glicina (G) también se considera un espaciador flexible, los segmentos con varias glicinas consecutivas o repeticiones (GGX)<sub>N</sub> pueden ensamblarse en haces de hélices de PPII. Por último, los residuos de S y T son cruciales debido a su capacidad de ser fosforilados; de hecho, la fosforilación es un mecanismo común que provoca la disolución de los condensados. Por ejemplo, al iniciar la mitosis, la acción de la quinasa DYRK3 lleva a la disolución de los gránulos de estrés, motas nucleares de empalme y la matriz pericentriolar. Más tarde, esta enzima es degradada al terminar la mitosis, lo cual facilita la reconstitución de dichos

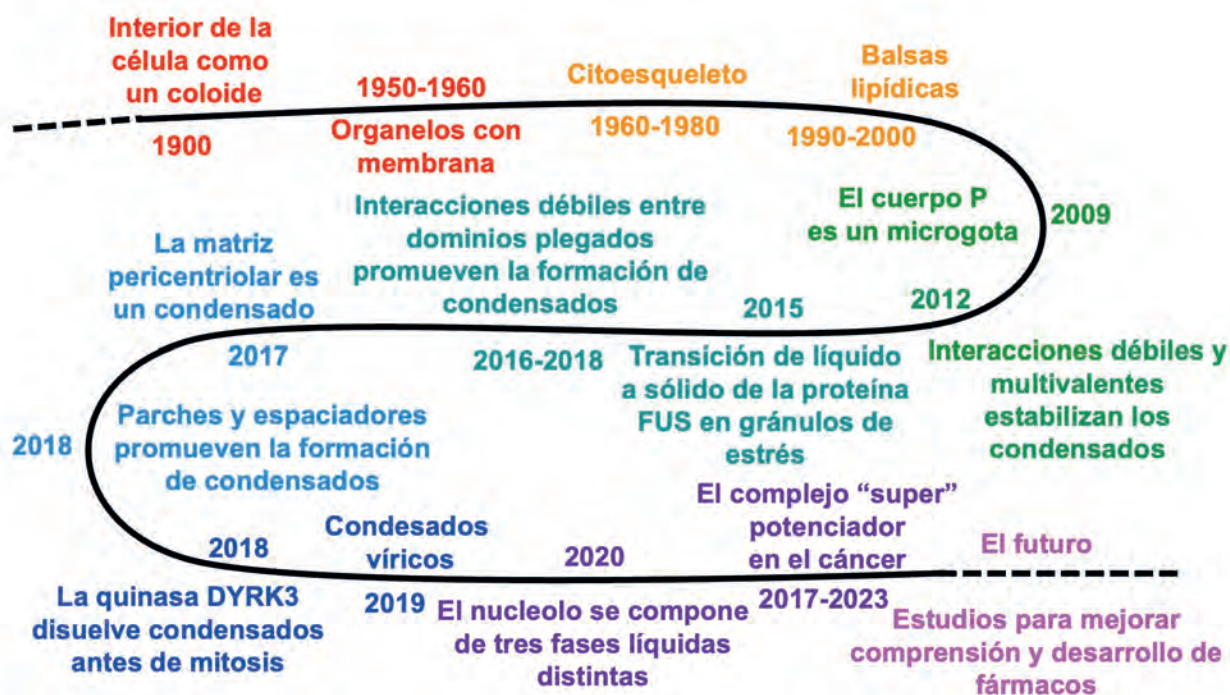


Figura 3  
Cronograma de descubrimientos principales en transiciones de fase intracelulares.

condensados. Otras clases de modificación, por ejemplo la oxidación y reducción de cisteína, la glicosilación, acetilación, ubiquitinación, metilación, etc. también pueden modular el equilibrio entre la fase dispersa y la condensada.

Si bien estos experimentos proporcionaron conocimientos fundamentales, es posible que la presencia de marcadores fluorescentes o proteínas de fusión puedan inducir perturbaciones en el sistema. Asimismo, dichos estudios no ofrecen información a resolución atómica sobre las preferencias conformacionales, la dinámica o las interacciones moleculares. Otras técnicas, como la dispersión de rayos X de bajo ángulo (SAXS, por sus siglas en inglés), las simulaciones de dinámica molecular (DM) y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), han permitido subsanar estas carencias.

La técnica SAXS ha aportado datos clave sobre la nucleación de los condensados. Por su parte, las simulaciones de DM han validado el modelo de *'stickers and spacers'* (parches y espaciadores) y han demostrado que la liberación de moléculas de agua del condensado favorece su formación desde un punto de vista entrópico. Además, han evidenciado que los grupos de residuos cargados u otros *'stickers'* promueven la asociación con mayor eficacia cuando están agrupados que cuando se encuentran dispersos en el entorno. Finalmente, estas simulaciones sugieren que la interfaz entre el condensado y el medio circundante presenta una alta densidad de grupos con valencias no satisfechas, lo que tiende a favorecer diversas reacciones y asociaciones. Por otro lado, la espectroscopia de RMN ha suplido las limitaciones de la

DM (campos de fuerza y tiempo computacional) que limita el estudio de sistemas tan complejos, lo que ha permitido revelar que las proteínas en estado condensado presentan una menor movilidad que en la fase dispersa, aunque mantienen un grado de desorden similar. En ciertos casos, se ha observado un incremento parcial en la formación de estructuras de hélice alfa o lámina beta dentro de la fase condensada.

Estos estudios también han demostrado que la viscosidad de los condensados es variable. Aquellos que se forman y disuelven según las condiciones celulares, como los gránulos de estrés, suelen tener viscosidades bajas. Por el contrario, la matriz pericentriolar, que debe resistir tensiones mecánicas, es muy viscosa y presenta una consistencia similar a la de un gel. Algunos condensados, como el cuerpo de Balbiani, experimentan