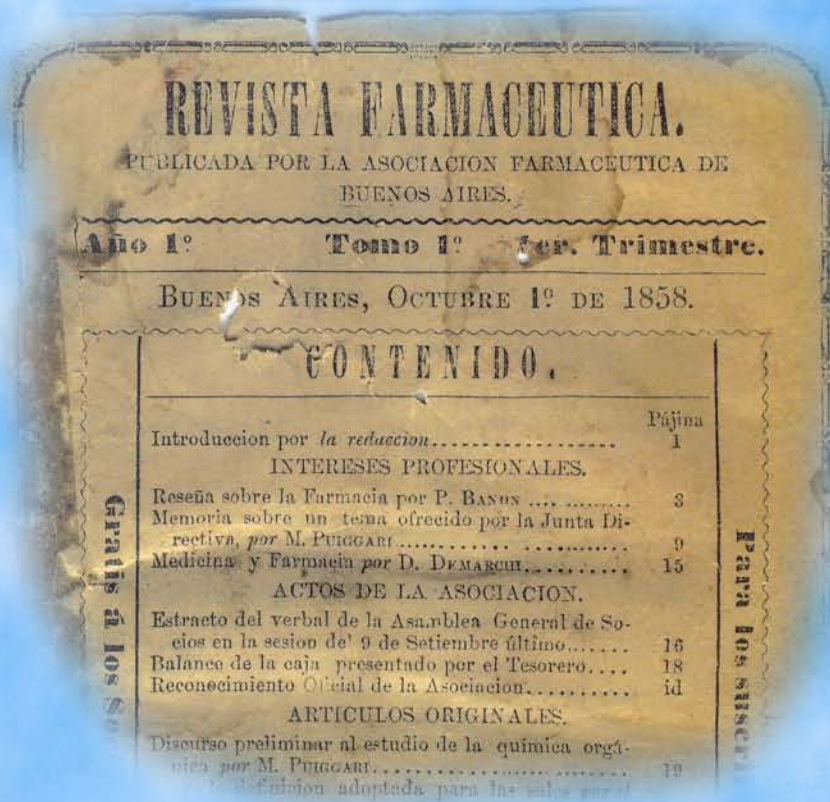


REVISTA FARMACEUTICA

REVIEWS



El citoesqueleto. Funciones estructurales y de regulación de las proteínas de membrana

The cytoskeleton: Structural function and regulation of membrane proteins

Laura Vanagas¹ y Juan Pablo F.C. Rossi²

Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas, Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Junin 956 (1113) Buenos Aires.

¹ Becaria doctoral del CONICET lvanagas@qb.ffyb.uba.ar

² Investigador principal del CONICET jprossi@qb.ffyb.uba.ar

Tabla de contenidos

- Resumen - Summary	26
- Introducción	27
- Funciones del citoesqueleto	29
- Polimerización-despolimerización de la actina	30
- Regulación del citoesqueleto de actina. Proteínas asociadas a la actina	31
- Regulación de proteínas de membrana por el citoesqueleto	34
- Referencias bibliográficas	36

Resumen

El citoesqueleto es una red de filamentos proteicos del citoplasma que ocupa el interior de todas las células animales y vegetales. Adquiere una relevancia especial en las animales, que carecen de pared celular rígida, pues mantiene la estructura y la forma de la célula. Actúa como soporte para la organización y la fijación de organelas y enzimas. En muchas células, el citoesqueleto no es una estructura permanente, sino que se desmantela y se reconstruye sin cesar. Se forma a partir de tres tipos principales de filamentos proteicos: microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios, unidos entre sí y a otras estructuras celulares.

La polimerización controlada de actina y tubulina es responsable de la movilidad de las células eucariotas y de la forma de éstas. El movimiento celular es el resultado de la acción coordinada de formación de

Summary

The cytoskeleton is a network of proteic filaments which occupy the interior of all vegetable and animal cells. It has a special relevance in the latter, which lack a rigid cellular wall, because it maintains the structure and shape of the cell. It acts as a support for the organization and fixation of organelles and enzymes. In many cells, the cytoskeleton is not a permanent structure, but instead it is continuously being dismantled and reconstructed. It is formed by three main types of proteic filaments: microtubules, actin filaments and intermediate filaments, bound together and to other cellular structures.

The controlled polymerization of actin and tubulin is responsible for both the mobility and shape of eukaryotic cells. The movement of eukaryotic cells is the result of the coordinated action of the formation of extensions, adhesions and retractions of the membrane, where the

extensiones, adherencias y retracciones de la membrana, en donde la red de actina y las interacciones entre estas y los motores moleculares juegan un papel fundamental. Los microtúbulos controlan la distribución espacial de estas actividades, creando una polarización de la célula que determina la dirección del movimiento.

Estudios recientes de nuestro laboratorio muestran que la actina monomérica activa el transporte de calcio en membranas de glóbulos rojos, mientras que la actina polimerizada o filamentosa inhibe dicho transporte.

Este fenómeno parece ser una propiedad general de todas las proteínas de membrana en las que el citoesqueleto ya no se restringe a una función meramente mecánica, sino que produciría la modulación de la actividad de las proteínas integrales a las que se encuentra vinculada.

actin network and the interactions between these and molecular motors play a key role.

The microtubules control the spatial distribution of these activities, creating a polarization of the cell which determines the direction of movement. Recent studies of our laboratory (Vanagas and col, 2007, 2008) show that monomeric actin activates calcium transport in the membrane of red blood cells, whereas polymeric or filamentous actin inhibits it.

This phenomenon seems to be a general property of all membrane proteins in which the cytoskeleton is no longer restricted to a merely mechanical function, but rather would produce the modulation of the activity of the integral proteins to which it is related to.

Palabras clave

Citoesqueleto, regulación de proteínas de membrana, actina.

Key words

Cytoskeleton, membrane protein regulation, actin.

Introducción

En los organismos superiores, la forma de las células (eucariotas) depende de una red de filamentos proteicos (particularmente filamentos de actina) llamada citoesqueleto, que conforma su esqueleto interno (Figura 1). La idea de citoesqueleto surge sólo a comienzos de la década de los ochenta, cuando Keith Porter uno de los más notables biólogos celulares modernos, logra visualizar en el microscopio de alto voltaje una red tridimensional que involucra a

microtúbulos y otros filamentos del citoplasma celular (Ellisman y Porter, 1980). Al analizar la naturaleza de las asociaciones que se observan entre los componentes del citoesqueleto surge la pregunta de cómo contribuye el ensamble de los polímeros que forman el citoesqueleto a la organización del citoplasma. Por otra parte, surge la cuestión de cómo cambia esta estructura en respuesta a las necesidades funcionales de toda célula.

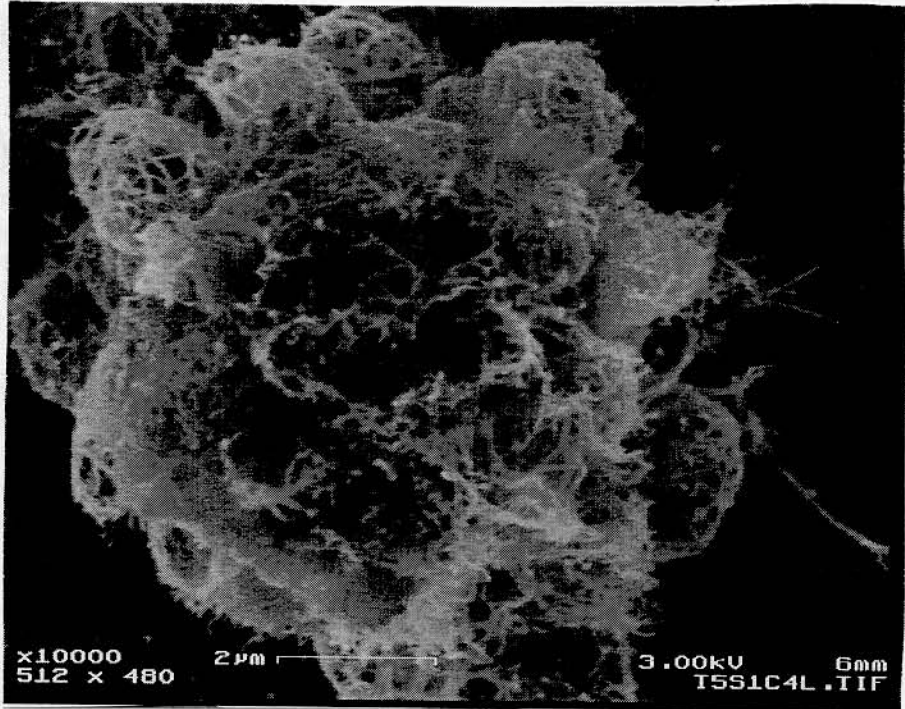


Figura 1. Citoesqueleto de actina de una célula eucariota durante su migración. Durante el proceso se generan salientes celulares esféricas (denominadas blebs o vesículas) que ocurren en muchas situaciones fisiológicas. La generación de estas salientes ocurren en dos fases distintas: extensión, que dura ~30s, y contracción, que dura ~2min. Durante la extensión, la membrana de la célula se desprende de la corteza de actina y se rellena de citosol. El crecimiento se detiene cuando se reforma la corteza de actina debajo de la membrana del *bleb*, y la contracción comienza, inducida por la miosina -II. En esta figura, la membrana de la célula se ha eliminado con detergente y el citoesqueleto de actina se ha estabilizado con phalloidina. La microscopía electrónica muestra la estructura de los filamentos de la actina dentro de los *blebs* contraídos. La fotografía electrónica fue reproducida con permiso del autor, Dr. Guillaume Charras, Royal Society University Research Fellow, London Centre for Nanotechnology and Department of Physiology, University College London, London, UK. (g.charras@ucl.ac.uk).

El citoesqueleto de las células eucarióticas consta principalmente de estructuras filamentosas compuestas de distintos polímeros lineales. Considerando los monómeros que componen estos polímeros y el diámetro de sus filamentos, se pueden diferenciar principalmente tres clases de estructuras. Estas son el citoesqueleto compuesto de microfilamentos de actina (6 a 10 nm de diámetro) (Korn y col, 1987), el de filamentos intermedios (7 a 11 nm de diámetro) (Steinert y Liem, 1990) y el de microtúbulos (25 nm de diámetro) (Bayley, 1990). Una característica común de los filamentos del citoesqueleto es que son polímeros unidimensionales, es decir, estructuras en las que una de sus dimensiones es significativamente

mayor que las otras dos. Así, el largo de los polímeros puede llegar a varios micrómetros mientras que el diámetro de los monómeros está en el orden de los nanómetros.

Las interacciones entre proteínas juegan un papel clave en la estructuración de esta red de filamentos. Estas interacciones incluyen: (i) asociaciones homólogas entre proteínas como las que ocurren en procesos de oligomerización de actina en la formación de los microfilamentos, o en el autoensamblaje de tubulina en microtúbulos; y (ii) asociaciones heterólogas como en el caso de las interacciones entre microtúbulos con proteínas asociadas denominadas

MAPs (*Microtubule-Associated Proteins*).

Dicha organización intracelular no había podido evidenciarse en las bacterias y durante décadas se pensó que la pared (matriz extracelular) rígida que

envuelve las células bacterianas (procariotas) era el único elemento que determinaba su forma. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que las bacterias también poseen un esqueleto interno compuesto de proteínas similares a la actina.

Funciones del citoesqueleto

El citoesqueleto es dinámico y sumamente resistente, siempre listo para adaptarse a las demandas de la célula (Dos Remedios y col, 2003).

Los microtúbulos se encuentran frecuentemente agrupados en paquetes de fibras largas (10-25 μm) que ayudan a mantener la forma celular. Están compuestos por dos clases de monómeros, α y β tubulina, que forman un dímero $\alpha\beta$ que se repite a lo largo del microtúbulo (Bayley, 1990). La función de los microtúbulos y las proteínas asociadas a ellos es particularmente importante en el movimiento de cilias y flagelos (Haimo y Rosenbaum, 1981), en el de los cromosomas durante la mitosis y meiosis (Hatsumi y Endow, 1981), y en el transporte de proteínas (Grafstein y Forman, 1980) y organelas a lo largo del axón (Schnapp y col, 1985). Además, se sabe que la tubulina interactúa con proteínas de la membrana plasmática, modulando de alguna manera la actividad de enzimas. Un ejemplo de esto es la regulación que ejerce sobre la sodio ATPasa, en varios tipos celulares, inhibiendo su actividad catalítica (Santander y col, 2006).

Por otra parte, se han descrito por lo menos cinco clases principales de proteínas en los filamentos intermedios (Osborn y Weber, 1982). Estas incluyen las citoqueratinas en las células epiteliales, pelo y piel, la desmina y la vimentina en las células musculares, los neurofilamentos en el axón neuronal, y la proteína ácida fibrilar glial en las células gliales. Aparentemente, el papel principal de los filamentos intermedios sería formar el soporte del esqueleto celular.

La actina está presente en todas las células eucarióticas, donde puede llegar al 20% de la proteína celular total (Korn, 1987). Además de ser una de las proteínas más abundantes en la naturaleza, la actina es también una de las más altamente conservadas en la escala evolutiva (Hightower y Meagher, 1986).

Tanto su aparición tan dispersa, como la estabilidad evolutiva de su estructura primaria, sugieren su

importancia en las diversas funciones celulares.

El monómero de actina (actina-G) es una proteína globular en forma de pera compuesta por una sola cadena polipeptídica de 42 kDa que se mantiene como monómero en condiciones no fisiológicas de baja fuerza iónica (Korn y col, 1987). En presencia de Mg^{2+} o de fuerza iónica equivalente a la fisiológica, la actina se polimeriza a través de asociaciones no covalentes para formar filamentos helicoidales dobles con sentido dextrógiro (actina-F), constituidos por miles de monómeros (Korn y col, 1987). Este proceso es favorecido por la presencia de ATP, y mientras que el nucleótido y el monómero no sean factores limitantes de la reacción de polimerización, el filamento continúa su polimerización desde ambos extremos. Ambos extremos presentan propiedades diferentes y, basados en el patrón de flecha creado cuando las cabezas de miosina se unen a actina (Pollard y Cooper, 1986), se conocen como extremos agudo y romo, siendo este último el que adiciona preferentemente monómeros durante el proceso de polimerización (Pollard y Mooseker, 1981).

Se han estudiado intensamente las funciones biológicas de la actina polimérica. El ejemplo más estudiado son los filamentos finos del músculo, que junto con los filamentos gruesos de miosina, proveen las bases mecano-químicas de la contracción muscular. No obstante, también es importante en las actividades motiles de células no musculares: locomoción celular, citocinesis, fagocitosis, retracción del coágulo en plaquetas, y agrupación de receptores de la superficie celular inducida por ligandos, son algunos ejemplos de células no musculares que se piensa que son fundamentalmente similares a la contracción muscular (Korn y col, 1987).

En células no musculares, las polimerizaciones y despolimerizaciones extensas del citoesqueleto son posiblemente procesos continuos y regulados, con filamentos de actina desapareciendo y reapareciendo en diferentes tiempos y lugares a medida que se necesitan para funciones específicas (Korn y col, 1987).

Polimerización-despolimerización de la actina

La actina-G se une de manera no covalente a una molécula de ATP y a un ion metálico divalente, que puede ser Ca^{2+} o Mg^{2+} ; se cree que es el Mg^{2+} en la célula (Carlier, 1991). El ATP es hidrolizado a ADP unido a actina-F y fosfato inorgánico (Pi) durante la polimerización, en un proceso que involucra la formación transitoria de actina F-ADP:Pi. El ATP no se resintetiza cuando la actina-F se despolimeriza, pero el ADP unido a los monómeros de actina-G que se disocian en el extremo del filamento se intercambia por ATP en solución y se regenera la actina-G-ATP.

Por lo tanto, la despolimerización no es simplemente el proceso contrario a la polimerización (Dos Remedios y col, 2003). La polimerización resulta en una continua hidrólisis de ATP, y en este sentido, la actina es una ATPasa (Korn y col, 1987).

El mecanismo de polimerización de la actina puede ser dividido convenientemente en cuatro pasos (Pollard, 1986):

1. Activación: unión de sales y cambios conformacionales en los monómeros.
2. Nucleación: la formación de oligómeros que tienen mayor probabilidad de crecer en filamentos que descomponerse a monómeros.
3. Elongación: el crecimiento bidireccional de los polímeros.
4. Unión extremo con extremo de dos filamentos.

Todos estos pasos son reversibles. Debido a que la nucleación, o sea la asociación de monómeros-probablemente trímeros (Cooper y col, 1983) o tetrámeros (Tobacman y Korn, 1983)- en un núcleo pequeño y termodinámicamente inestable es lenta y limitante, la polimerización espontánea de los monómeros se caracteriza por una fase de latencia al principio (Figura 2), seguida por una fase rápida, en la que el núcleo crece hasta convertirse en largos filamentos, con poca acumulación de oligómeros de tamaños intermedios (Korn y col, 1987). La elongación ocurre en ambos extremos del filamento, pero más rápidamente en los extremos romos, que en los agudos. (Pollard y Mooseker, 1981). La elongación termina cuando la concentración de monómeros decrece hasta la concentración crítica, que es la concentración de monómeros a la que la velocidad de disociación de monómeros de los extremos del filamento iguala a la tasa de adición de monómeros (Korn y col, 1987). En condiciones fisiológicas la concentración crítica para el extremo agudo es 12 a 15 veces mayor que para el extremo romo (Wegner e Isenberg, 1983). Esta diferencia puede resultar en el crecimiento unidireccional del filamento de actina debido al continuo flujo de subunidades de actina desde el extremo agudo hacia el romo, lo cual se llama "treadmilling", que describe el proceso de sacar unidades en un extremo y agregarlas en el otro (Dos Remedios y col, 2003).

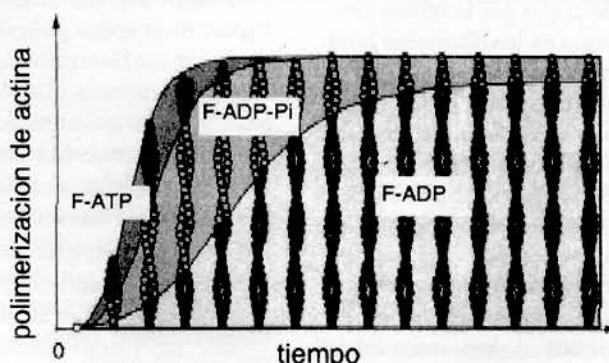


Figura.2. Evolución esquemática del filamento de actina durante el curso en el tiempo de la polimerización. Los filamentos crecen a una tasa rápida al principio con unidades terminales de actina F-ATP; en etapas más tardías se acumulan transitoriamente unidades de actina-F-ADP:Pi; en el estado estacionario, el filamento está compuesto de subunidades de actina-F-ADP, excepto por las subunidades de actina-F-ADP:Pi en el extremo romo. Nótese la forma sigmoidea de la curva con el tiempo, y la fase de latencia al principio de la polimerización. (Tomado de Carlier y col, 1991).

La hidrólisis del ATP es paralela a la formación de actina-F en la mayoría de las condiciones de polimerización. Cuando la polimerización ha llegado al estado estacionario, la hidrólisis de ATP continúa a una velocidad más lenta, pero constante, hasta que todo el ATP se ha consumido (Korn y col, 1987). La hidrólisis continua del ATP cuando la polimerización se encuentra en estado estacionario, es probablemente la suma de al menos dos procesos independientes: uno asociado a la continua adición y pérdida de monómeros en ambos extremos del filamento; otro en que el ATP se intercambia por ADP en subunidades internas de actina en el cuerpo del filamento, seguido por hidrólisis de ATP (Korn y col, 1987).

La hidrólisis de ATP asociada a la polimerización de la actina se encuentra desacoplada de la incorporación de actina en los filamentos (Carlier y col, 1984). La consecuencia inmediata es la presencia tanto de ATP como de ADP en el filamento en crecimiento (Figura 1), y la presencia de una

“capucha” de ATP en el polímero de actina-F en estado estacionario. Dado que la concentración crítica de actina-G-ADP es cerca de 20 veces mayor que la concentración crítica de actina-G-ATP, el cuerpo del polímero, que contiene subunidades de actina-ADP, tendería a despolimerizarse si no existiera la “capucha” de ATP (Carlier y col, 1984). Por encima de la concentración crítica, el sistema es mayormente dominado por las reacciones de asociación-disociación de actina-G-ATP desde y hacia los extremos de actina-F. Por debajo de la concentración crítica, la “capucha” de ATP tiende a desaparecer y el polímero se despolimeriza rápidamente. En la concentración crítica, en presencia de ATP- estado estacionario- el polímero de actina oscilará constantemente entre los dos mecanismos descritos antes. En conclusión, la consecuencia más importante de la hidrólisis del ATP asociada con la polimerización de la actina es la rápida formación de un polímero en estado estacionario inestable que permite la regulación dinámica del nivel del ensamblado (Carlier y col, 1984).

Regulación del citoesqueleto de actina. Proteínas asociadas a la actina.

La regulación del ensamblado y desensamblado del citoesqueleto de actina es complejo, lo cual no es de extrañar dada la abundancia de la actina en el compartimiento intracelular y sus múltiples papeles en las diversas funciones celulares. De hecho, la complejidad puede ser comparable al sistema que controla la expresión génica, donde un promotor contiene los elementos proximales de control cadena arriba, así como los elementos ampliadores y silenciadores. Un nivel mayor de regulación es provisto por las secuencias reguladoras distales. Proteínas unidas al ADN que pueden alterar el estado de condensación de la cromatina, también influyen en estas secuencias del ADN. El control del ensamblado/desensamblado del citoesqueleto de actina puede ser aún más complejo (Dos Remedios y col, 2003).

Para esta regulación, no solo hay múltiples proteínas asociadas a actina, pero además son capaces de ser expresadas simultáneamente dentro de una misma célula. La presencia de ligandos de actina como ATP o ADP, Ca^{2+} o Mg^{2+} , así como el pH, también pueden ser importantes. Bajo estas condiciones, sería sorprendente que el control del estado de ensamblado queda-

ra librado a proteínas asociadas a actina individuales. El siguiente nivel de complejidad es la formación de complejos ternarios, cuaternarios o de órdenes mayores, por la asociación de distintas proteínas con la actina (Dos Remedios y col, 2003).

Muchas de las proteínas asociadas a actina conocidas se unen al mismo sitio en la superficie de la actina y por lo tanto se espera que compitan. La actina también une alrededor de 30 ligandos incluyendo drogas y toxinas (Dos Remedios y col, 2003). Estas proteínas se pueden unir a monómeros de actina (actina-G) o a los filamentos de actina (actina-F) para regular el proceso de polimerización y para fijar o anclar filamentos entre sí o con otros componentes del citoesqueleto como los microtúbulos, con membranas o con otras estructuras celulares (Hartwig y Kwiatkowski, 1991; Vandekerckhove, 1989). Recientemente se han contado 162 proteínas separadas y distintas, sin incluir sus isoformas, que se pueden clasificar dentro de siete grupos (Dos Remedios y col, 2003):

1. Proteínas que se asocian a monómeros de actina-G: hay por lo menos cuatro familias de proteínas que se unen a monómeros de

actina, y además otras proteínas de "bloqueo" también pueden tener afinidad por la actina (Pollard y Cooper, 1986). Por ejemplo, las timosinas, llamadas así por haber sido aisladas originalmente del timo, que se sabe que están más ampliamente distribuidas y que se unen a la actina monomérica estequiométricamente inhibiendo su polimerización (Dos Remedios y col, 2003). La DNAsa I es una glicoproteína secretora pancreática con actividad endonucleasa que cliva el ADN de doble hélice para dar como resultado polinucleótidos 5'-fosforilados, por lo que está implicada en la apoptosis celular (Dos Remedios y col, 2003). Se une muy fuertemente a la actina-G (Kd en el orden nM) y esencialmente remueve todos los monómeros de actina libres de la solución. Se une mucho más débilmente a la actina-F (100 µM) donde es una proteína de "bloqueo" que aumenta la tasa de disociación del extremo agudo de los filamentos (Dos Remedios y col, 2003). El sitio de unión es cercano al sitio en que se une el ATP a la actina (Pollard y Cooper, 1986), por lo cual la velocidad de intercambio del nucleótido se ve disminuida por la unión de esta proteína.

Otro ejemplo de este tipo de proteínas son las profilinas, pequeñas proteínas solubles con un peso molecular aproximado de 19 kDa, que son de las proteínas citoplasmáticas más expresadas y distribuidas en todo el citoplasma (Dos Remedios y col, 2003). Es una proteína de unión a monómeros de alta afinidad ($K_a=10^7 M^{-1}$); esta característica y su alta concentración en las células, han sugerido que la profilina puede actuar como estabilizante de la concentración de monómeros en la célula (Pollard y Cooper, 1986).

2. Proteínas que despolimerizan los filamentos de actina-F a actina-G: Un ejemplo muy importante son las cofilinas o factor de despolimerización de actina (FDA), una familia de proteínas de entre 15 y 19 kDa, con una concentración celular substancialmente menor que la de actina. Se une a actina-ADP con una afinidad 100 veces mayor que a la actina-ATP o actina-ADP.Pi, tanto en la actina-G como actina-F. Por lo tanto no solo promueve el desensamblaje de monómeros de actina-ADP de los filamentos, sino que también se une a los monómeros de actina-ADP liberados e inhibe

el intercambio del nucleótido unido (Dos Remedios y col, 2003). Relativamente pocas proteínas asociadas a actina se unen al extremo agudo comparado con el extremo romo del filamento. La cofilina puede competir con 1) espectrina que estabiliza los oligómeros cortos de actina; 2) tropomodulina que bloquea el extremo agudo de filamentos unidos a tropomiosina; 3) DNAsa I, que se une fuertemente al extremo agudo de la actina monomérica pero solo débilmente a los filamentos (Dos Remedios y col, 2003).

3. Proteínas que bloquean los extremos de los filamentos de actina-F: El ensamblado y desensamblado de actina requiere un equilibrio dinámico entre los monómeros de actina y los dos extremos no equivalentes de los filamentos. Las proteínas que bloquean o previenen este intercambio pueden nuclear, promover, estabilizar o inhibir el ensamblado. Por lo tanto son buenos candidatos para regular la polimerización de la actina (Dos Remedios y col, 2003).

Algunas proteínas asociadas a actina, como la tropomodulina, bloquean el extremo agudo del filamento, pero son bastante raras. El nombre de esta proteína se debe a que solo se une fuertemente a la actina en presencia de tropomiosina (Dos Remedios y col, 2003). Muy pocas proteínas además de ésta bloquean este extremo, algunas son la acumentina, la β-actinina, y se sabe que en membranas de eritrocitos el complejo de espectrina y banda 4.1 tiene algunas propiedades de bloqueador del extremo agudo (Pollard y Cooper, 1986). Las proteínas que bloquean el extremo romo son más abundantes, y podemos mencionar la CapZ, presente en todas las células eucariotas (Cooper, 2000). Las CapZ producen: 1) nucleación del ensamblado de actina, 2) captura de filamentos preexistentes, 3) regulación del ensamblado de actina en los extremos romos de los filamentos, 4) correcto ensamblado de los filamentos en el disco Z del sarcómero (Dos Remedios y col, 2003).

4. Proteínas que cortan los filamentos de actina-F: Estas proteínas cortan la longitud promedio de los filamentos uniéndose a los lados de la actina-F y cortándola en pedazos, por ejemplo la gelsolina, la villina, la severina y

adseverina (Dos Remedios y col, 2003). La gelsolina puede circular en el plasma donde corta y bloquea los filamentos de actina liberados a la circulación (por ejemplo luego de la muerte celular). Los monómeros y oligómeros resultantes son secuestrados por la proteína de unión a vitamina D y finalmente se remueven de la circulación al hígado (Dos Remedios y col, 2003). La gelsolina, rápidamente disuelve los geles de actina *in vitro* por corte y bloqueo y es una proteína asociada a actina muy importante por su alta afinidad por los filamentos de actina (Kd 50 nM). Luego de cortar, la gelsolina se mantiene unida al extremo como bloqueador, previniendo la reunión de filamentos. La gelsolina es también la única proteína de corte dependiente de Ca^{2+} , con un Kd por el catión en el orden micromolar (Dos Remedios y col, 2003).

5. Proteínas que provocan entrecruzamiento de los filamentos de actina-F: estas proteínas contienen por lo menos dos sitios de unión para actina-F, por lo que facilitan la formación de racimos, filamentos ramificados y redes tridimensionales. La fascina, fimbrina y villina crean racimos en los que los filamentos se encuentran muy cercanos (alrededor de 10 nm de separación lateral) y tienen la misma polaridad (Pollard y Cooper, 1986).

Entre las proteínas que forman redes tridimensionales están la filamina, la primera proteína asociada a la actina aislada (Shizuta y col, 1976), y la α -actinina, que se ha postulado que sería responsable de los cambios de sol a gel dependientes de la concentración de Ca^{2+} que tienen lugar en el citoplasma de las células no

musculares (Blanchard y col, 1989).

6. Proteínas que estabilizan los filamentos de actina-F: se unen a los lados del filamento y previenen la despolimerización, como la tropomiosina, que es importante en el músculo estriado para la contracción, pero está presente en numerosas células no musculares (Pollard y Cooper, 1986).

7. Proteínas que anclan los filamentos de actina a la membrana plasmática (Pollard y Cooper, 1986): Los filamentos de actina a menudo tienen sus extremos o sus lados cerca de la membrana plasmática. Muchas células tienen proteínas como espectrina y banda 4.1, que unen actina a la membrana del eritrocito, y la espectrina claramente se asocia con los filamentos de actina como entrecruzador, por lo que estas pueden unir filamentos lateralmente a las membranas.

Se han descrito interacciones no covalentes entre lípidos de membrana y proteínas del citoesqueleto como la ancorina (Bennett, 1992).

Históricamente, la vinculina ha sido el primer candidato como proteína de unión de los filamentos de actina a la membrana (Pollard y Cooper, 1986). Esta proteína está localizada en las placas de unión en fibroblastos y músculo liso, que son sitios donde los racimos de filamentos de actina se encuentran con la membrana plasmática, y también adyacentes a las líneas Z y en los discos intercalares (Pollard y Cooper, 1986).

La figura 3, adaptada de Pollard y Cooper, 1986 muestra un esquema que sintetiza el efecto de las distintas proteínas asociadas a actina.

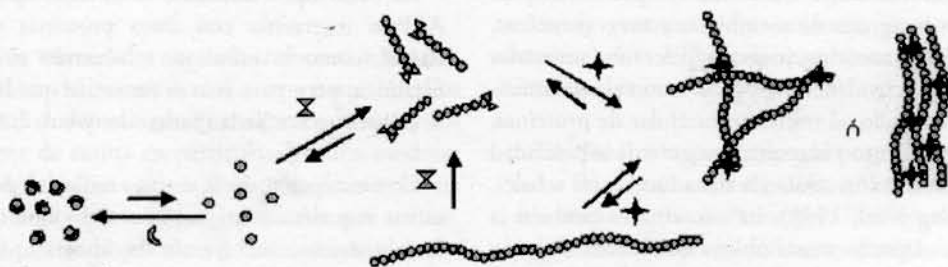


Figura 3. Proteínas asociadas a actina. Las proteínas asociadas a actina están representadas por los siguientes símbolos: (⊙) proteínas que unen monómeros, (X) proteínas de bloqueo o corte; (+) proteínas de entrecruzamiento. Los monómeros de actina (○) se asocian para formar filamentos, que pueden ser largos o cortos, en presencia de proteínas de bloqueo. En presencia de proteínas que unen monómeros, como DNAsa I se inhibe la polimerización (adaptado de Pollard y Cooper, 1986).

Además de estas proteínas, existe gran número de compuestos de diverso origen que afectan la polimerización y/o el ensamblaje de los filamentos de actina. Las citocalasinas son compuestos heterocíclicos producidos por ciertos hongos, que tienen la capacidad de unirse a la actina e interferir en su ensamblaje o polimerización (Goddette y Frieden, 1986). Se conocen varias citocalasinas de estructura similar y diferente actividad: A, B, D y E. El interés de estas moléculas deriva del hecho de que su efecto es semejante al de ciertas proteínas asociadas a actina, que bloquean un extremo del filamento de actina, nucleon la polimerización y acortan los filamentos (Cooper, 1987). Las citocalasinas son permeables a las membranas celulares y se unen al extremo romo de los filamentos, inhibiendo tanto la asociación como la disociación de subunidades en ese extremo. La estequiometría de unión es de una citocalasina por filamento de actina (Brown y Spudich, 1981).

En general, cuando una citocalasina se agrega a una solución de actina-F, se observa una disminución de la viscosidad de dicha preparación. Por otra parte, cuando las citocalasinas se agregan a una preparación de actina-G pueden aumentar la velocidad inicial de

polimerización lo que indica que, de alguna manera, la unión de dichas toxinas al monómero induce un cambio similar al producido por la unión del monómero al MgATP (Goddette y Frieden, 1986).

Brenner y Korn (1980) han visto que la concentración de $MgCl_2$ y KCl es fundamental en el efecto de polimerización o despolimerización de la actina por citocalasina D (Cit D). Cuando el medio tiene una concentración de 0,5 mM $MgCl_2$, la Cit D inhibe la polimerización de la actina y reduce la viscosidad de la solución. En cambio, en presencia de 30 mM KCl, la Cit D aumenta la velocidad de polimerización (Brenner y Korn, 1980). En base a los experimentos de Brenner y Korn (1980), Goddette y Frieden (1986) y Low y Dancker (1976), Cooper (1987) ha resumido el efecto de la Cit D de la siguiente manera: en ausencia de Mg^{2+} , la Cit D no causa formación de dímeros o aumento de la actividad ATPasa. Entre 100 y 500 μM de Mg^{2+} es suficiente para formar dímeros y aumentar la actividad ATPasa. Concentraciones mayores a 1 mM Mg^{2+} provocan la polimerización de la actina, por lo que los monómeros se incorporan a filamentos más que formar dímeros.

Regulación de proteínas de membrana por el citoesqueleto

La colocalización de proteínas transportadoras de iones, como la sodio ATPasa, con estructuras del citoesqueleto ha sido indicativo de una interacción que provee el marco estructural para la localización espacial específica de proteínas de membrana dentro de la membrana plasmática (Cantiello, 1995).

Interacciones entre dominios citoplasmáticos de proteínas integrales de membrana y otras proteínas, mediadas por ancorina, juegan papeles fundamentales en diversas actividades biológicas como el crecimiento y el desarrollo, el tráfico intracelular de proteínas, el establecimiento y el mantenimiento de la polaridad celular, la adhesión celular, la transducción de señales, etc (Zhang y col, 1998). La ancorina es también la proteína adaptadora más ubicua que media la unión de proteínas de membrana con el esqueleto de espectrina, tanto en la membrana plasmática, como en los compartimientos internos de membrana incluyendo el aparato de Golgi. De esta manera, por ejemplo, une actina y espectrina a la sodio ATPasa en un

proceso que se piensa que guía para localizar correctamente a la enzima en el polo basolateral de las células epiteliales (Nelson y Veshnock, 1987). Se sabe que es la subunidad α de la sodio ATPasa la responsable de interactuar con la ancorina mediante una secuencia mínima de 25 residuos (Zhang y col, 1998).

En otros tipos celulares, se ha visto que la sodio ATPasa interactúa con otras proteínas citoesqueléticas, como la tubulina, inhibiendo su actividad catalítica, pero para esto es necesario que la tubulina se encuentre acetilada (Santander y col, 2006).

Con excepción de la actina, todas las demás proteínas esqueléticas mayoritarias del glóbulo rojo son fosfoproteínas, incluyendo la ancorina (Cohen y Foley, 1986). El citoesqueleto de estas células está compuesto principalmente por espectrina, actina, banda 4.1 y banda 4.9 que forman una malla responsable de las propiedades mecánicas de la célula. Existe una correlación entre el grado de fosforilación de las

proteínas esqueléticas de la membrana, particularmente la espectrina, y parámetros como la forma del glóbulo rojo y las asociaciones proteína-proteína.

Se sabe que la colocalización de filamentos de actina con canales epiteliales de Na⁺, se encuentra asociada a un mecanismo regulatorio de la actividad del canal (Prat y col, 1993). En este estudio observaron que el estado de polimerización de la actina debía ser de filamentos cortos, que generaban por incubación con Cit D o con proteínas bloqueantes como la gelsolina durante la polimerización.

También se ha demostrado que los filamentos de actina estimulan la actividad sodio ATPasa por un mecanismo que parece estar asociado a la unión directa de la actina a la enzima. Esta interacción puede estar, a su vez, unida a un cambio conformacional de la enzima, lo cual se ve reflejado en el cambio de afinidad por el sustrato intracelular Na⁺ (Cantiello, 1995). En este trabajo se vio que eran los filamentos cortos de actina los responsables de la activación, ya que la actina-F no producía este efecto y además los monómeros unidos a DNAsa I para impedir su polimerización tampoco activaban.

Estudios realizados en músculo esquelético de rana también sugieren un papel del citoesqueleto de actina en la actividad de esta bomba. La hipotonicidad estimula el bombeo de sodio por la sodio ATPasa y se piensa que este aumento de actividad estaría relacionado con un aumento de densidad de bombas de Na⁺ producido por inserción de bombas libres mediada por los microfilamentos de actina (Venosa, 2003). Cuando se despolimeriza la actina en presencia de citocalasinas o latrunculina, la respuesta a la hipotonicidad de estos músculos disminuye.

El calcio intracelular regula la estructura y función de proteínas citoesqueléticas. Por otra parte, estudios recientes han demostrado que el citoesqueleto, y los filamentos de actina en particular, pueden modular el flujo de calcio a través de canales de membrana plasmática de apertura por ligandos y por voltaje. Por ejemplo, la liberación de calcio desde el reservorio del retículo endoplasmático mediado por receptores de inositol trifosfato (IP3) y sensibles a rianodina, es modulada por la polimerización y despolimerización de los filamentos de actina en neuronas del hipocampo en cultivo (Wang y col, 2002).

La despolimerización de los filamentos de actina con Cit D atenúa la liberación de calcio inducida por carbamilcolina - CCh, un agonista muscarínico para los receptores IP3-, cafeína - un agonista del receptor de rianodina- y tapsigargina - un inhibidor de la SERCA. Al contrario, un agente polimerizador de la actina, como jasplaquinolida potencia la liberación de calcio inducida por CCh, cafeína y tapsigargina. También en neuronas, la despolimerización de la actina atenúa, mientras que la polimerización potencia el flujo de calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje y receptores N-metil-D-aspartato (Rosenmund y Westbrook, 1993).

Muchos estudios sugieren que elementos del citoesqueleto pueden directamente controlar la actividad de numerosos transportadores o participar en el proceso de inserción y deserción de proteínas de transporte en vesículas. Se ha visto que la isoforma epitelial del intercambiador de Na⁺/H⁺ NHE3 interactúa con la proteína del citoesqueleto ezrina, que a su vez se une a la actina. Cuando se desorganiza el citoesqueleto de actina con citocalasinas o latrunculina, se inhibe la actividad de este transportador, asociado a una redistribución subcelular del mismo, acumulándose en sitios donde la actina se agregaba, lo cual sugiere una interacción física de los intercambiadores con el citoesqueleto (Kurashima y col, 1999).

Estudios recientes de nuestro laboratorio (Vanagas y col, 2007, 2008) muestran que la actina monomérica activa el transporte de calcio en membranas de glóbulos rojos, mientras que la actina polimerizada o filamentosa inhibe dicho transporte. Este hecho puede describirse como una activación-inhibición de la actividad enzimática en función de la relación entre la proteína de membrana, en este caso la enzima calcio ATPasa de membrana plasmática y el citoesqueleto subyacente.

Este fenómeno parece ser una propiedad general de todas las proteínas de membrana. En efecto, hemos determinado que al variar por dilución el grado de polimerización de la actina se cambia la relación entre la concentración de las proteínas de membrana y las del citoesqueleto, lo que produce la activación o la inhibición de la actividad de la sodio ATPasa y las ectoATPasas, ambas proteínas integrales constituyentes de todas las células eucarióticas. Lo novedoso

de estos estudios consistió en la demostración de que existe una regulación dual de la actina G y la F como activador o inhibidor de la actividad enzimática respectivamente. Otra contribución importante es que una determinación sencilla como medir la actividad específica de una enzima unida a una membrana a diferentes concentraciones de proteína, es indicativo de que dicha enzima puede estar regulada o no por actina.

Estas evidencias experimentales demuestran que el citoesqueleto no se restringe a una función meramente mecánica. La modificación de la forma celular a su vez modifica la interacción entre el citoesqueleto y las proteínas integrales a las que se encuentra vinculada, lo que finalmente se traduce en la modulación de la actividad enzimática y del transporte de materia a través de la membrana.■

Referencias bibliográficas

- 1- Bayley P.M., What makes microtubules dynamic? *J. Cell. Sci.* 95:329-34, 1990.
- 2- Blanchard A., Ohanian V., Critchley D., The structure and function of alpha-actinin, *J. Muscle Res. Cell Motil.* 10(4):280-9, 1989.
- 3- Brenner S.L., Korn E.D., The effects of cytochalasins on actin polymerization and actin ATPase provide insights into the mechanism of polymerization, *J. Biol. Chem.* 255(3):841-4, 1980.
- 4- Brown S.S., Spudich J.A., Mechanism of action of cytochalasin: evidence that it binds to actin filament ends, *J. Cell Biol.* 88(3):487-91, 1981.
- 5- Carlier M.F., Pantaloni D., Korn E.D., Evidence for an ATP cap at the ends of actin filaments and its regulation of the F-actin steady state, *J. Biol. Chem.* 259(16):9983-6, 1984.
- 6- Carlier M.F., Actin: protein structure and filament dynamics, *J. Biol. Chem.* 266(1):1-4, 1991.
- 7- Cantiello H.F., Actin filaments stimulate the Na(+)-K(+)-ATPase, *Am. J. Physiol.* 269(5 Pt 2):F637-43, 1995.
- 8- Cohen C.M., Foley S.F., Phorbol ester- and Ca²⁺-dependent phosphorylation of human red cell membrane skeletal proteins, *J. Biol. Chem.* 261(17):7701-9, 1986.
- 9- Cooper J.A., Buhle E.L. Jr, Walker S.B., Tsong T.Y., Pollard T.D., Kinetic evidence for a monomer activation step in actin polymerization, *Biochemistry* 22(9):2193-202, 1983.
- 10- Cooper J.A., Effects of cytochalasin and phalloidin on actin, *J. Cell Biol.* 105(4):1473-8, 1987.
- 11- Cooper J.A., Schafer D.A., Control of actin assembly and disassembly at filament ends, *Curr. Opin. Cell Biol.* 12(1):97-103, 2000.
- 12- Dos Remedios C.G., Chhabra D., Kekic M., Dedova I.V., Tsubakihara M., Berry D.A., Nosworthy N.J., Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments, *Physiol. Rev.* 83(2):433-73, 2003.
- 13- Ellisman, M.H., and Porter, K.R. (1980) "Microtubule structure of the axoplasmic matrix: visualization of cross-linking structures and their distribution". *J. Cell. Biol.* 87: 467-479
- 14- Goddette D.W., Frieden C., Actin polymerization. The mechanism of action of cytochalasin D, *J. Biol. Chem.* 261(34):15974-80, 1986.
- 15- Grafstein B., Forman D.S., Intracellular transport in neurons, *Physiol. Rev.* 60(4):1167-283, 1980.
- 16- Haimo L.T., Rosenbaum J.L., Cilia, flagella, and microtubules, *J. Cell. Biol.* 91:125-130, 1981.
- 17- Hatsumi M., Endow S.A., The *Drosophila* ncd microtubule motor protein is spindle-associated in meiotic and mitotic cells, *J. Cell Sci.* 103:1013-20, 1992.
- 18- Hartwig J.H., Kwiatkowski D.J., Actin-binding proteins, *Curr. Opin. Cell Biol.* 3(1):87-97, 1991.
- 19- Hightower R.C., Meagher R.B., The molecular evolution of actin, *Genetics* 114(1):315-32, 1986.
- 20- Korn E.D., Carlier M.F., Pantaloni D., Actin polymerization and ATP hydrolysis, *Science* 238 (4827): 638-44, 1987.
- 21- Korn E.D., Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells, *Physiol. Rev.* 62(2):672-737, 1987.
- 22- Kurashima K., D'Souza S., Szasz K., Ramjeesingh R., Orlowski J., Grinstein S., The apical Na(+)/H(+) exchanger isoform NHE3 is regulated by the actin cytoskeleton, *J. Biol. Chem.* 274(42):29843-9, 1999.
- 23- Low I., Dancker P., Effect of cytochalasin B on formation and properties of muscle F-actin, *Biochim. Biophys. Acta.* 430(2):366-74, 1976.

- 24- Nelson W.J., Veshnock P.J., Ankyrin binding to (Na⁺ + K⁺)ATPase and implications for the organization of membrane domains in polarized cells, *Nature* 328(6130):533-6, 1987.
- 25- Osborn M., Weber K., Intermediate filaments: cell-type-specific markers in differentiation and pathology, *Cell* 31:303-6, 1982.
- 26- Pollard T.D., Mooseker M.S., Direct measurement of actin polymerization rate constants by electron microscopy of actin filaments nucleated by isolated microvillus cores, *J. Cell. Biol.* 88(3):654-9, 1981.
- 27- Pollard T.D., Cooper J.A., Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions, *Ann. Rev. Biochem.* 55:987-1035, 1986.
- 28- Rosenmund C., Westbrook G.L., Calcium-induced actin depolymerization reduces NMDA channel activity, *Neuron* 10(5):805-14, 1993.
- 29- Santander V.S., Bisig C.G., Purro S.A., Casale C.H., Arce C.A., Barra H.S., Tubulin must be acetylated in order to form a complex with membrane Na(+),K (+)-ATPase and to inhibit its enzyme activity, *Mol. Cell. Biochem.* 291(1-2):167-74, 2006.
- 30- Schnapp B.J., Vale R.D., Sheetz M.P., Reese T.S., Single microtubules from squid axoplasm support bidirectional movement of organelles, *Cell* 40(2):455-62, 1985.
- 31- Shizuta Y., Shizuta H., Gallo M., Davies P., Pastan I., Purification and properties of filamin, and actin binding protein from chicken gizzard, *J. Biol. Chem.* 251(21):6562-7, 1976.
- 32- Steinert P.M., Liem R.K., Intermediate filament dynamics, *Cell* 60 (4): 521-3, 1990.
- 33- Tobacman L.S., Korn E.D., The kinetics of actin nucleation and polymerization, *J. Biol. Chem.* 258(5):3207-14, 1983.
- 34- Vanagas L., Rossi R. C., Caride A. J., Filoteo, A.G. Strehler, E.E. and Rossi, J.P.F.C. (2007) Plasma membrane calcium pump activity is affected by the membrane protein concentration. Evidence for the involvement of the actin cytoskeleton". *Biomembranes, Biochim Biophys Acta.* 2007 Jun1, 768(6):1641-1649.
- 35- Vanagas L., Mangialavori, I., Ferreira Gomes, M., Rossi, R.C., Strehler, E.E. and Rossi, J.P.F.C. (2008) The actin cytoskeleton modulates plasma membrane calcium pump activity. *J.Gen. Physiol.* Submitted
- 36- Vandekerckhove J., Structural principles of actin-binding proteins, *Curr. Opin. Cell Biol.* 1(1):15-22, 1989.
- 37- Venosa R.A., Hypotonic stimulation of the Na⁺ active transport in frog skeletal muscle: role of the cytoskeleton, *J. Physiol.* 548(Pt 2):451-9, 2003
- 38- Wang Y., Mattson M.P., Furukawa K., Endoplasmic reticulum calcium release is modulated by actin polymerization, *J. Neurochem.* 82(4):945-52, 2002.
- 39- Wegner A., Isenberg G., 12-fold difference between the critical monomer concentrations of the two ends of actin filaments in physiological salt conditions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80(16):4922-5, 1983.
- 40- Zhang Z., Devarajan P., Dorfman A.L., Morrow J.S., Structure of the ankyrin-binding domain of alpha-Na,K-ATPase, *J. Biol. Chem.* 273(30):18681-4, 1998.