

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y ANATOMÍA PATOLÓGICA
FACULTAD DE MEDICINA



**IMPLICACIÓN DE LOS FILAMENTOS DE ACTINA EN LA ARQUITECTURA,
HOMEOSTASIS Y TRÁFICO DE SALIDA DEL APARATO DE GOLGI
Y
ESTUDIO DE LA FORMACIÓN Y DEGRADACIÓN DE
UN AGRESOMA DE ACTINA**

El director

El autor

Gustavo Egea

Francisco Lázaro Diéguez

Tesis presentada por Francisco Lázaro Diéguez
dirigida por el Dr. Gustavo Egea
para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona

Barcelona, Marzo de 2008

1. EL CITOESQUELETO DE ACTINA

Generalidades

La célula eucariota ha desarrollado a lo largo de la evolución un complejo esqueleto celular o citoesqueleto, el cual resulta imprescindible para el mantenimiento de la morfología celular, así como para realizar diversas funciones como la movilidad/migración y división celular. El citoesqueleto está constituido por tres tipos de biopolímeros; microtúbulos (MTs), filamentos intermedios (FIs) y filamentos de actina o microfilamentos (MFs). Junto con estos biopolímeros hay todo un conjunto de proteínas implicadas en el control y regulación de su dinámica de polimerización/despolimerización. Se piensa que las proteínas del citoesqueleto de la célula eucariota evolucionaron a partir de genes procedentes de células procariontas ancestrales; Archaea (Li and Wu, 2003) o de un hipotético antepasado extinto "cronocito" superviviente a través de sus descendientes eucariotas (Fedorov et al., 2002).

El citoesqueleto de actina está constituido por MFs y es regulado por proteínas relacionadas (ARPs) o de unión (ABPs) a actina globular (G-actina) o filamentosa (F-actina). La red de MFs puede organizarse formando distintas estructuras como el córtex o fibras de estrés que determinan y mantienen la morfología celular. Los MFs participan en el movimiento celular proporcionando una fuerza de locomoción resultante del fenómeno de polimerización de actina y, por otro lado, contribuyen al transporte intracelular sirviendo como "carriles" por los que viajan moléculas y estructuras membranosas, conducidas a través de motores moleculares (miosinas). Se cree que los mecanismos implicados en la polimerización de los MFs son evolutivamente anteriores a aquellos que implican a los motores moleculares (Mitchison, 1995). El ensamblaje de los MFs participa en el "comportamiento exploratorio" de las células con cuerpo lábil (metazoa típicos, células ameboides, fibroblastos o neuronas), es decir, en la formación de filopodios, lamelipodios y ondulaciones de la membrana o *ruffling* (Small et al., 2002). Las "cometas" de actina propulsan parásitos (algunas bacterias y virus) y ciertos orgánulos a través del citoplasma aprovechando la fuerza generada por la polimerización de la actina (Pollard and Borisy, 2003). Los MFs también resultan indispensables para el ciclo celular. Así, durante la citoquinesis en Metazoa y células ameboides tiene lugar la formación de un anillo contráctil de actomiosina subcortical (Field et al., 1999). Recientemente también se ha asociado la red de MFs con el empaquetamiento o congregación de los cromosomas durante la mitosis en oocitos (Lenart et al., 2005). *Grosso modo* la actina tiene un papel

fundamental al menos en la determinación y el mantenimiento de la morfología celular, en el movimiento e interacción “táctil” con el ambiente, y en la división/proliferación celular.

1.2. Los filamentos de actina o microfilamentos

1.2.1. Origen y estructura

La actina es una proteína altamente conservada entre miembros de especies muy divergentes. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos (aa) de la actina de *Acanthamoeba* es en un 95% idéntica a la actina de los vertebrados. Muchas especies disponen de múltiples isoformas de actina, las cuales muestran diferencias estructurales y funcionales. Se sabe que el número de genes de actina por genoma varía desde 1 (en levadura) a unos 100 (en algunas plantas) (Cvrckova et al., 2004). Las proteínas parientes eucariotas más cercanas a la actina comprenden las ARPs (Frankel, 1999). La separación entre la actina y las ARPs a nivel evolutivo *sensu stricto* tuvo lugar en un eucariota ancestral. La familia de genes actina/ARPs puede considerarse, por tanto, como una sola unidad si tenemos en cuenta los estadios tempranos de la evolución eucariótica.

Se han encontrado homólogos procariotas distantes de actina. La proteína bacteriana MreB forma filamentos *in vitro* e *in vivo* (Doolittle and York, 2002; van den et al., 2001). Tanto la actina como la MreB son proteínas consideradas como miembros de una superfamilia ancestral que también integraría la proteína de división celular bacteriana FtsA, el dominio ATPasa de Hsp70 e incluso la enzima hexoquinasa. La mayor parte de miembros procariotas de la familia MreB son bacterianos con sólo unos pocos homólogos identificados en Archaea (Erickson, 2007; Li and Wu, 2003). La proteína de *Escherichia coli* ParM forma filamentos altamente dinámicos implicados en la producción de fuerzas y transporte intracelular de forma similar a lo que ocurre con los MFs de eucariotas (Amos et al., 2004; Shih and Rothfield, 2006).

La actina es la proteína más abundante en la célula eucariota constituyendo más del 15% de la proteína total. Se trata de una proteína globular de 375 aa con un peso molecular de 43 kDa. Los monómeros de actina unen los nucleótidos ATP o ADP y/o los cationes Mg^{2+} o Ca^{2+} con afinidades del orden de nM. Así existen cuatro estados básicos para la actina: ATP-G-actina, ADP-G-actina, ATP-F-actina y ADP-F-actina, predominando las formas ATP-G-actina o

ADP-F-actina. Aunque a nivel de microscopía electrónica la G-actina presenta una estructura globular. Mediante el análisis cristalográfico por rayos X se observa que en realidad consiste en cuatro subdominios distribuidos en dos lóbulos separados por una profunda hendidura que permite una relativa flexibilidad entre éstos. En esta hendidura es donde tienen lugar la unión de los nucleótidos ATP o ADP y/o los cationes Mg^{2+} o Ca^{2+} , cuya unión regula la conformación/funcionalidad de la molécula. De hecho la molécula de G-actina se desnaturaliza rápidamente de no unirse al nucleótido (Fig. 1A,B).

En un sistema *in vitro*, la molécula de actina se presenta como monómero o actina globular libre (G-actina) y/o de forma polimerizada como (F-actina). En la F-actina, la unión de cada monómero modifica su posición respecto al monómero anterior mediante sendos movimientos de traslación ~ 2.75 nm y de rotación $\sim -166^\circ$, lo cual origina una hélice dextrógira de F-actina a partir de dos cadenas paralelas de G-actina polimerizada (Sheterline et al., 1995). Una unidad de F-actina consiste en una hélice de diámetro estimado entre 6 y 8 nm que contiene 28 moléculas de G-actina con una longitud de 72 nm por vuelta completa (Fig. 1C,D). Al igual que la G-actina, la F-actina presenta polaridad, en donde se distingue un extremo (+) y un extremo (-). Esta nomenclatura se debe a observaciones en el microscopio electrónico de MFs decorados con fragmentos S1 de la cadena pesada de la miosina II, que confieren a la F-actina un aspecto similar a puntas de flecha, correspondiendo la punta al extremo (-) o *pointed end* y la base al extremo barbado (+) o *barbed end* (Fig. 1E).

En los mamíferos y las aves se han descrito seis isoformas de actina estructuralmente relacionadas, cada una de ellas codificada por un gen diferente. Estas isoformas se han clasificado según su patrón de distribución en cuatro actinas musculares (α -actina en tejido muscular esquelético, α -actina en tejido muscular cardíaco, α -actina en tejido muscular liso vascular y γ -actina en tejido muscular liso visceral) y dos actinas no musculares o actinas citoplasmáticas (β - y γ -actina). Todas polimerizan de forma similar *in vitro* y pueden formar copolímeros entre ellas con características biofísicas particulares en función de la isoforma/s que lo integren, influyendo también en la unión de las ARPs y/o ABPs. Las distintas isoformas de actina (cuyo punto isoeléctrico varía entre 5.4 y 5.9) tienen un extremo N-terminal ácido con 4-6 cargas negativas y se sabe que la mayor parte de las diferencias observadas entre éstas se encuentran en el extremo N-terminal, donde se supone tiene lugar la unión de la mayoría de las ARPs (Chaponnier et al., 1995).

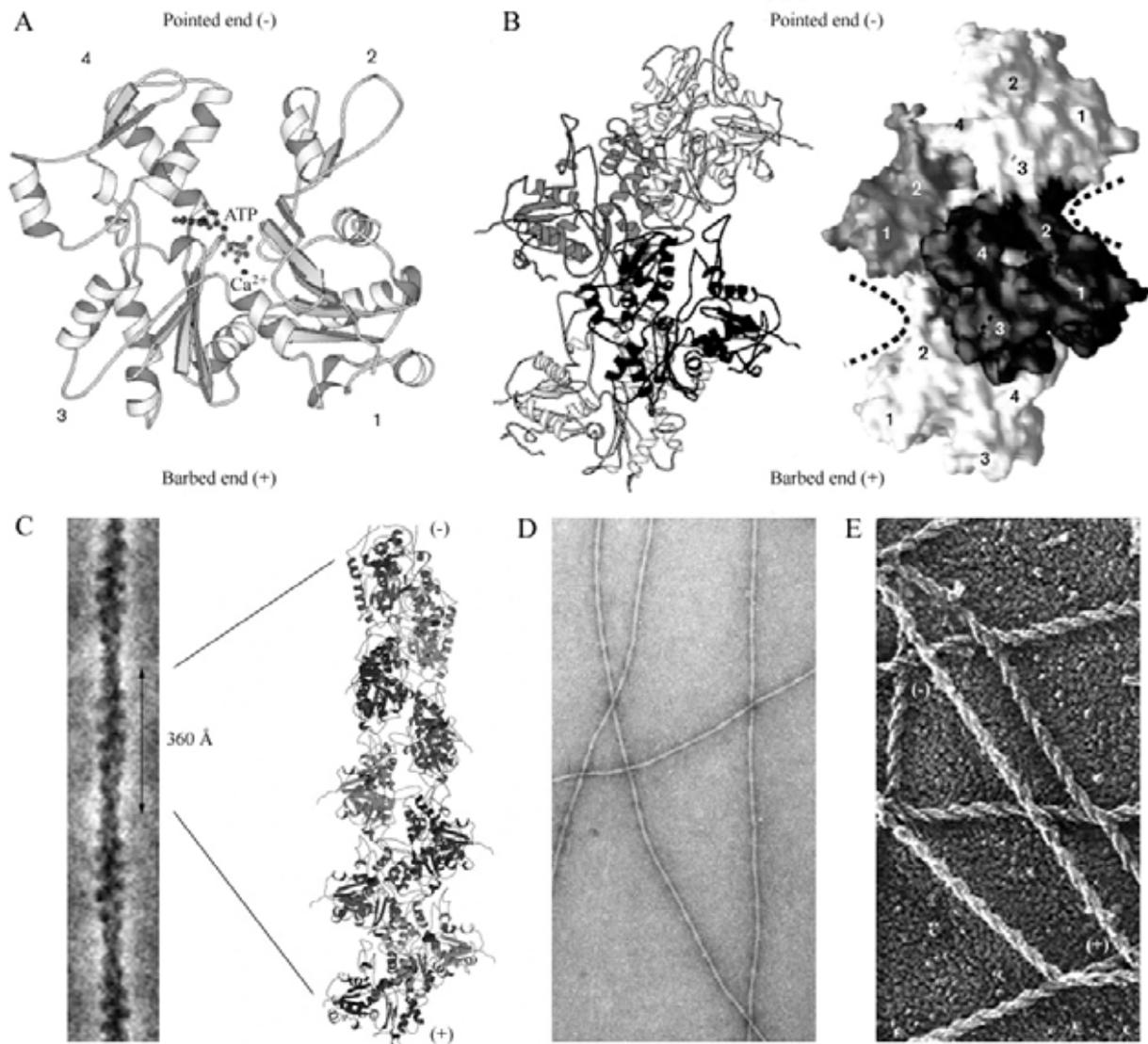


Fig. 1. Estructura de la actina. A. Diagrama de cinta del monómero de actina basado en la estructura cristalográfica del complejo actina:DNasa. B. Modelo para la F-actina basado en datos cristalográficos y de difracción de fibra, representados tanto como en cinta como diagramas 3D. Las superficies cóncavas, representadas por las líneas discontinuas corresponden a los sitios de unión de proteínas como la fimbrina. A nivel de los subdominios 1 y 3 es donde tiene lugar la adición predominante de monómeros de actina y es el lugar donde se unen mayoritariamente las proteínas de coronado/bloqueo (Modificado de Puius et al., 1998). C. Estructura de la F-actina (Modificado de Holmes et al., 1990; Lorenz et al., 1993; Aguda et al., 2005). D. Tinción negativa de MFs estabilizados con faloidina (Modificado de Schoenenberger et al., 1999). E. MFs decorados con el fragmento S1 de la cadena pesada de la miosina II observados tras aplicar la técnica de *quick-freeze, deep-etch, and rotary-replication* (Obtenido de <http://www.heuserlab.wustl.edu/gallery/classics/classic017>).

La molécula de actina sufre modificaciones co- y post-traduccionales de tipo covalente, la más frecuente es la acetilación de un residuo del extremo N-terminal. Otras incluyen la metilación de la His 73 (Hennessey et al., 1993) o bien la fosforilación de tirosinas en *Dictyostelium discoideum* como respuesta al estrés químico. Existe una quinasa en *Physarum polycephalum* que fosforila el complejo actina-fragmina (De, V et al., 1996; Gettemans et al., 1992) inhibiendo la polimerización de actina bajo estrés ambiental en situaciones de poca disponibilidad de agua. También se ha descrito como la quinasa Src fosforila la ABP

cortactina promoviendo la polimerización de actina (Tehrani et al., 2007). Resumiendo, en función de las necesidades de la célula, la actina será modificada variando su dinámica de polimerización.

1.2.2. Dinámica y toxinas de actina

Dinámica de los microfilamentos

La formación de MFs como consecuencia de la polimerización de G-actina tiene lugar de forma espontánea *in vitro* en condiciones similares a las que se supone *in vivo* cuando se añade Mg^{2+} , K^+ o Na^+ . El proceso en sí no requiere ATP pero se favorece cuando la G-actina se encuentra unida a éste. En un primer estadio de la polimerización, la unión al Mg^{2+} y ATP provocará la “activación” de la G-actina tras una serie de cambios conformacionales que le confieren susceptibilidad para polimerizar. Seguidamente tres monómeros de actina se unen entre sí para formar un oligómero o núcleo susceptible de polimerización en un proceso llamado “nucleación”, el cual ocurre espontáneamente según las condiciones iónicas del medio. Esto se sabe porque la nucleación es proporcional al cubo de la concentración de actina, lo cual sugiere que la estructura de nucleación mínima para la polimerización espontánea de la actina es un trímero de moléculas de actina. El núcleo es el oligómero de actina más pequeño en el que la tendencia a formar F-actina es mayor que la tendencia a disociarse en monómeros de actina y se sabe que la formación de un núcleo es termodinámicamente desfavorable, constituyendo la etapa limitante de la polimerización de la actina.

La siguiente fase de la polimerización es la “elongación” durante la cual la G-actina se une rápidamente a los extremos de un núcleo de actina o filamento corto, siendo la velocidad de polimerización distinta en los dos extremos del filamento. En el extremo (+), el crecimiento es más rápido que en el extremo (-). Esto es debido a que la concentración mínima de G-actina necesaria para que tenga lugar la polimerización o concentración crítica (C_c) del extremo (+) es menor que la del extremo (-). Los monómeros de actina se incorporarán al filamento preferentemente en forma de G-actina-ATP, orientando su hendidura o sitio de unión al ATP hacia el extremo (-). A continuación tendrá lugar la hidrólisis del ATP provocando una disminución en la afinidad de la G-actina para permanecer en el filamento lo que permite que los monómeros de G-actina-ADP+Pi sean susceptibles de disociarse o liberarse del polímero de F-actina en forma de G-actina-ADP. Dado que hay una fase de retardo antes de la

hidrólisis del ATP, un crecimiento rápido del filamento producirá que la región central del MF contenga G-actina-ADP mientras que los extremos tendrán G-actina-ATP.

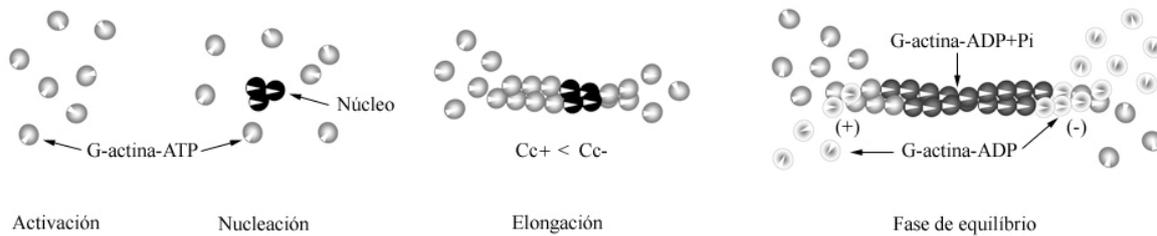


Fig. 2. Dinámica de polimerización de la actina. La unión del monómero de G-actina a Mg^{2+} y ATP provoca un cambio conformacional o “activación” de la molécula de G-actina quedando activada y susceptible para polimerizar. En un primer estadio se produce la oligomerización en un núcleo o trímero de G-actina inestable en la fase conocida como de “nucleación”. En la fase de “elongación” se produce la incorporación de monómeros en el extremo (+) del núcleo de forma más favorable que en el extremo (-). La elongación dura hasta que la velocidad de adición de nuevas subunidades a los extremos de los MFs se iguala a la velocidad de disociación de las subunidades de dichos extremos. A esta concentración no se produce crecimiento neto del polímero, será la “fase de equilibrio”.

La elongación dura hasta que la adición de nuevas subunidades a los extremos de los MFs se iguala a la velocidad de disociación de las subunidades de estos. A esta concentración no se produce crecimiento neto del polímero, y se alcanza la “fase de equilibrio” o *treadmilling* (Fig. 2). Ambos procesos (polimerización y despolimerización) se complementan de forma equilibrada para mantener los MFs como una estructura “estable” pero altamente dinámica en la que los monómeros que componen el filamento son reemplazados continuamente. Este mecanismo de ensamblaje/desensamblaje polarizado permite organizar los MFs rápidamente en consonancia con los requerimientos morfo-funcionales de la célula.

Toxinas de actina

La dinámica del citoesqueleto de actina puede modificarse mediante el uso de sustancias naturales denominadas toxinas de actina que se obtienen a partir de diversos animales como esponjas y nudibranquios marinos así como de plantas, hongos y bacterias. Su principal característica estructural es la presencia de un componente macrocíclico hidrofóbico central englobado por grupos laterales estereoquímicamente complejos. En general, estas sustancias se dividen en dos grupos: (1) toxinas que bloquean/inhiben el ensamblaje o desestabilizan los MFs y (2) toxinas que promueven la polimerización o estabilizan los MFs (Fig. 3).

Los compuestos que bloquean o desestabilizan los MFs se unen a la G-actina bien en la hendidura donde tienen lugar la unión de los nucleótidos (Fig. 1A) o bien en el extremo (+) de

la F-actina (Figs. 1,2) (Allingham et al., 2006; Spector et al., 1999). Para provocar la despolimerización del citoesqueleto de actina se han utilizado clásicamente las citocalasinas (del griego *cytos-* célula; *chhalasis-* relajación) que son metabolitos fúngicos cuya estructura química consiste en un anillo macrocíclico unido a un anillo de isoindol. Las citocalasinas actúan a nivel del extremo (+) de la F-actina donde se unen con una estequiometría 1:1 bloqueando la entrada y salida de G-actina lo que provoca la despolimerización de los MFs en los extremos (-). La citocalasina D obtenida del hongo *Zygosporium mansonii* presenta cierta capacidad para acelerar la nucleación de actina (Goddette and Frieden, 1986; Goddette and Frieden, 1985) siendo su eficiencia de despolimerización menor que el de otras toxinas desestabilizadoras de los MFs (Morris and Tannenbaum, 1980).

Las latrunculinas son potentes inhibidores de la formación de F-actina y se obtienen en su mayoría a partir de esponjas de la familia Latrunculiidae (*Negombata* y *Latrunculia sp.*) (Spector et al., 1983; El Sayed et al., 2006). Se conocen distintas latrunculinas y en todas ellas destaca la presencia de un anillo macrocíclico unido a un anillo de tiazolidinona responsable de su actividad. La estructura cristalina del complejo latrunculina A (LtA)/G-actina muestra cómo este compuesto se une con una estequiometría 1:1 entre los subdominios 2 y 4 del monómero de actina bajo el sitio de unión al ATP. La inserción del anillo de tiazolidinona es facilitada y estabilizada por el rígido anillo macrocíclico, el cual establece principalmente contactos hidrofóbicos con la molécula de actina. Curiosamente, en la latrunculina B (LtB) aislada de *N. magnifica* la ausencia de 2 carbonos en el anillo macrocíclico provoca que la toxina presente menor citotoxicidad, probablemente por la pérdida de interacciones hidrofóbicas entre el anillo macrocíclico y la G-actina. Estas toxinas de actina secuestran el monómero de G-actina (Spector et al., 1989) impidiendo su incorporación a la F-actina. Las latrunculinas unidas a la G-actina actúan como cuñas entre los subdominios 2 y 4 provocando una restricción en los cambios conformacionales de la G-actina requeridos para su polimerización e integración en la F-actina. Esto provoca la despolimerización de los MFs al no tener disponibilidad de G-actina (Fig. 3C).

Otro grupo de citotóxicas que inhiben la formación de MFs derivadas del macrólido trioxazole, englobaría las kabiramidas, halicondrámidas, ulapualides y micalolides (Wada et al., 1998; Allingham et al., 2005). Estas toxinas se unen a la G-actina con una estequiometría 1:1 (Matsunaga, 2006; Allingham et al., 2006). La kabiramida C contiene en su estructura química un enorme anillo hidrofóbico que actuaría a nivel de la superficie de la G-actina

separando los subdominios 1 y 3 en el extremo (+) de la F-actina. El micalolide B (MyB) obtenido de *Mycale sp.* secuestra monómeros de actina y fragmenta la F-actina provocando en sendos casos la despolimerización de los MFs, y además también tiene capacidad de suprimir la actividad Mg^{2+} -ATPasa del motor de MFs miosina (Saito et al., 1994; Saito and Karaki, 1996).

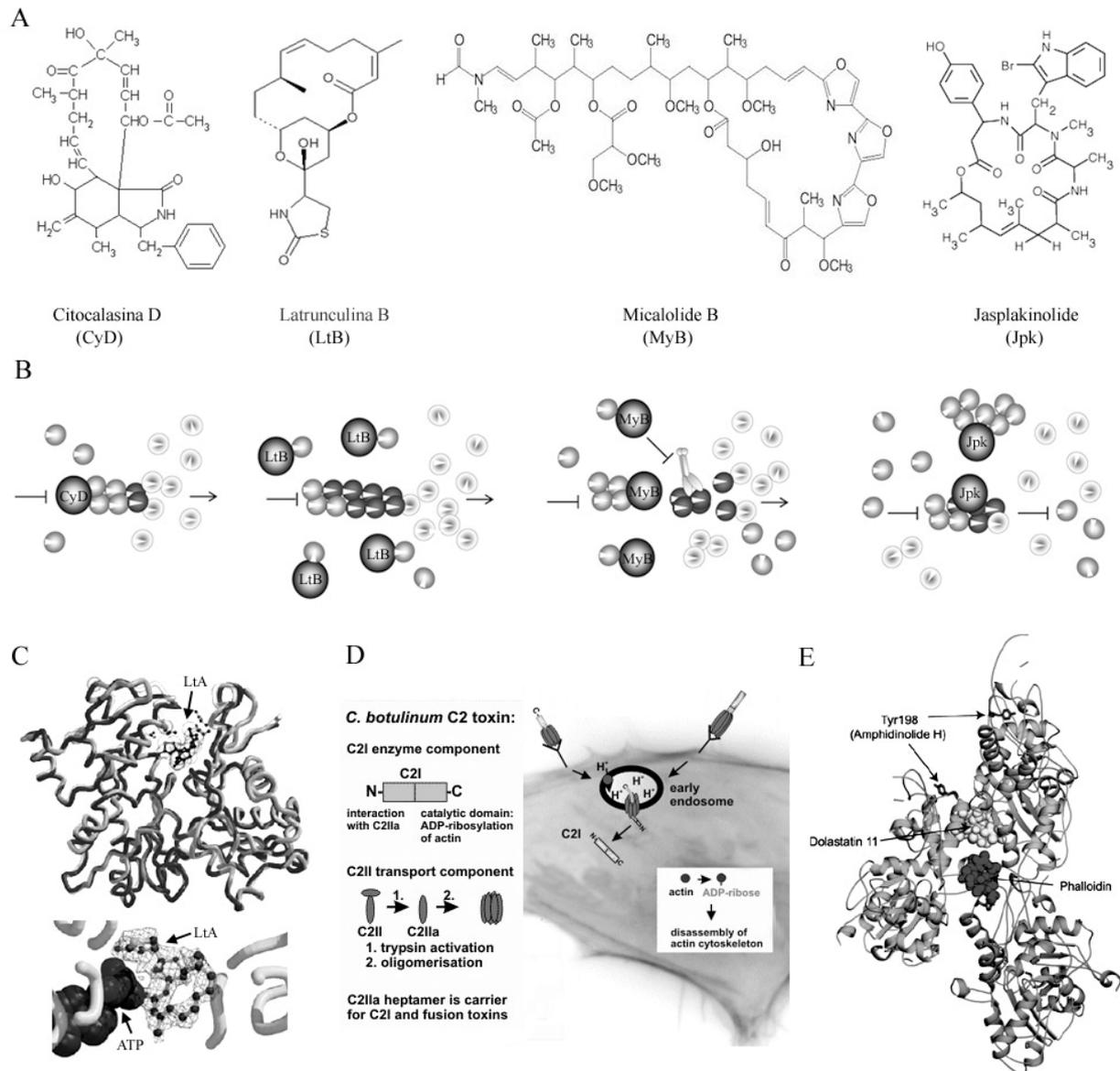


Fig. 3. Toxinas de actina. A. Estructura química de las toxinas despolimerizadoras, CyD, LtB, MyB o de la estabilizadora, Jpk. B. Esquemas representativos del mecanismo de acción de las toxinas CyD, LtB, MyB y Jpk sobre el MF (ver Fig. 2). C. Comparación de un complejo G-actina-LtA (gris oscuro) respecto a la G-actina (gris claro/transparente), en la parte inferior se muestra un detalle del sitio de unión de LtA cercano al sitio de unión del ATP (Modificado de Morton et al., 2000). D. Mecanismo de acción de la toxina C2. La activación proteolítica del componente de transporte C2II forma heptámeros con C2II activado (C2IIa), lo cual provoca su unión a un receptor de membrana del hospedador. Tras ello es reclutado C2I y el complejo C2I-C2IIa es endocitado al interior celular hasta alcanzar los endosomas tempranos en donde debido al pH ácido de éstos los heptámeros C2IIa forman poros en la membrana y el componente C2I es liberado al citoplasma en donde C2I ADP-ribosila la G-actin de forma irreversible. E. Sitios de unión de la faloidina y dolastatina 11 en una porción de F-actina que contiene 3 monómeros de actina. También se muestra la posición de los enlaces covalentes que formaría la anfidinolida en su unión a la G-actina. (Modificado de Morton et al., 2000; Allingham et al., 2006).

También existen un amplio número de toxinas bacterianas que inhiben la formación de MFs. Por ejemplo, las toxinas binarias de *Clostridium* sp. (Iota y familias C2), las cuales provocan la ADP-ribosilación de los monómeros de actina mediante la unión covalente de ADP-ribosa a la G-actina. La toxina C2 de *Clostridium botulinum* (C2) está compuesta por un componente enzimático C2I y un componente de unión/translocación C2II. La activación proteolítica de C2II provoca su agrupamiento en heptámeros que se unen a un receptor de la membrana del hospedador. Seguidamente, se recluta C2I y el complejo C2I-C2II es internalizado hasta alcanzar los endosomas tempranos en donde debido a su pH ácido los heptámeros C2II forman poros en la membrana del endosoma y el componente C2I es liberado al citoplasma. Una vez en el citoplasma C2I ADP-ribosila irreversiblemente la G-actina en la Arg177, lo cual impide que sea utilizada en la formación de la F-actina y provoca en última instancia la despolimerización total de los MFs (Aktories and Barth, 2004) (Fig. 3D). Otras citotoxinas derivadas de *Clostridium* sp. inactivan por glucosilación las proteínas de la familia de las Rho GTPasas, RhoA/B/C, Rac1/2 y Cdc42, las cuales están implicadas en la regulación del citoesqueleto de actina (Just et al., 2001) (ver apartado 1.3.2). Las toxinas de *C. difficile* A y B causantes de la colitis pseudomembranosa son citotoxinas que monoglucosilan las Rho GTPasas. La toxina C3 de *C. botulinum*, cataliza la ADP ribosilación de RhoA/B/C pero no de otras Rho GTPasas. Tanto la glucosilación como la ADP ribosilación de las Rho GTPasas comportará en último término la perturbación del citoesqueleto de actina.

Las toxinas de actina que estabilizan la F-actina o promueven la polimerización de la G/F-actina generalmente presentan una estructura química de depsipéptido cíclico. El compuesto estabilizador más conocido es la faloidina (Pha) aislada del hongo *Amanita phalloides* (Wieland and Faulstich, 1977). Su estructura química consiste en un heptapéptido bicíclico que contiene aa poco frecuentes como la Cys3-Pro(OH)4-Ala5-Trp6, el cual es esencial para su citotoxicidad (Oda et al., 2005). El compuesto jasplakinolide (Jpk) con capacidad de estabilizar F-actina e inducir polimerización de G-actina es producido por la esponja *Jaspis johnstoni*. El Jpk es un depsipéptido cíclico que compite con la Pha por el sitio de unión a la F-actina (Bubb et al., 1994; Holzinger, 2001; Bubb et al., 2000), la cual a su vez interacciona con 3 moléculas de G-actina en la F-actina (Oda et al., 2005). Sin embargo, el Jpk difiere respecto a la Pha en cuanto a su estructura química y su capacidad para atravesar las membranas celulares. El Jpk contiene en su estructura macrocíclica ramificaciones laterales de grupos aromáticos en forma de aa infrecuentes como el N-metil-2-(bromo)-L-triptofano (Allingham et al., 2006; Spector et al., 1999) que resulta esencial para su unión a la F-actina.

Otras toxinas como la dolastatina-11 (obtenida de la liebre de mar *Dolabella auricularia*) tienen efectos similares pero más potentes a los descritos para la Pha o el Jpk, aunque a diferencia de este último, sin competir con la Pha por el sitio de unión a la F-actina (Bai et al., 2001). Finalmente las anfidinolidas obtenidas de los dinoflagelados correspondientes a *Amphidinium* sp. representan el único grupo de compuestos citotóxicos (al menos en el caso de la anfidinolida H) que interaccionan con la molécula de actina mediante un enlace covalente (Usui et al., 2004) (Fig. 3E).

1.2.3. Proteínas asociadas y motores

Proteínas asociadas o de unión a G/F-actina

En la célula eucariota el balance G/F-actina así como el recambio de monómeros de actina en los extremos de los MFs está finamente regulado por las ARPs y ABPs. La cantidad de G-actina *in vivo* es mayor a la esperada según la información obtenida en un sistema *in vitro* debido a que la mayoría de G-actina se encuentra unida a las ABPs, lo cual evita su polimerización espontánea. Esto permite a la célula disponer de una reserva de G-actina susceptible de polimerizar. Algunas ABPs están restringidas a ciertos eucariotas (timosina $\beta 4$ en Metazoa o toxofilina de *Toxoplasma*), pero otras se encuentran ampliamente distribuidas en los distintos eucariotas como es el caso de la profilina y del factor de despolimerización de actina (ADF)/cofilin.

La timosina $\beta 4$ secuestra ATP-G-actina al unirse a la G-actina con una estequiometría 1:1 entre los subdominios 1, 2 y 3 (Safer et al., 1997) bloquea la polimerización de la G-actina. Un incremento en la concentración de timosina $\beta 4$ promueve la despolimerización de la F-actina para equilibrar el balance G/F actina. La profilina también tiene un papel regulador en la polimerización de la G-actina. Esta proteína se une con una estequiometría 1:1 a ATP-G-actina entre los subdominios 1 y 3, lo cual altera su conformación y evita su nucleación espontánea. Además también tiene la capacidad de desplazar a la timosina $\beta 4$ de su unión a la G-actina, de este modo mantiene siempre una reserva de G-actina susceptible de polimerizar (Pollard and Borisy, 2003).

Existen gran cantidad de ABPs que interaccionan con la F-actina ejerciendo acciones diversas en los MFs como el corte/ruptura (*severing*), el coronado/bloqueo (*capping*) de los extremos del filamento, el entrecruzamiento (*cross-linking*), la adhesión con otras estructuras celulares y la generación de fuerzas de tensión intracelulares.

La gelsolina está especializada en el corte o ruptura de los MFs. Cuando la gelsolina es activada por el Ca^{2+} , corta la F-actina y seguidamente corona/bloquea el extremo (+) impidiendo el reensamblaje de los fragmentos cortos de F-actina. Los miembros de la familia de la ADF/cofilina se unen a los monómeros de ADP-G-actina por el extremo (-) de la F-actina promoviendo su disociación. Estos se mantienen unidos a la ADF/cofilina evitando así su reensamblaje. Además la ADF/cofilina también puede cortar la F-actina ya que al unirse a la hélice del filamento puede distorsionar su estructura y generar tensiones que conduzcan a su ruptura, lo que genera múltiples fragmentos cortos de F-actina susceptibles de polimerizar. Se sabe que el dominio ADF comparte similitudes estructurales con la gelsolina (incluyendo el sitio de unión a actina) a pesar de la carencia de semejanzas en su secuencia (Van Troys et al., 1999).

Las proteínas de coronado/bloqueo se unen en los extremos de la F-actina promoviendo su desensamblaje o estabilizando la estructura. Sería el caso de las tropomodulinas (Tmods), las cuales coronan/bloquean la F-actina al unirse al extremo (-) evitando su despolimerización. Por contra CapZ se une al extremo (+) inhibiendo la polimerización y por consiguiente despolimerizando el MF.

Muchas ABPs implicadas en el entrecruzamiento de MFs pertenecen a la superfamilia de proteínas con dominios de homología a calponina (dominios-CH). Sería el caso de la fimbrina, villina y fascina que permiten la formación de haces de MFs (de Arruda et al., 1990; Fischer and Fowler, 2003; Yamashiro et al., 1998). En cambio, la filamina y la α -actinina entrecruzan los filamentos para formar redes de F-actina (Matsudaira, 1991). Filamina, espectrina y distrofina se encontrarían formando parte del córtex de F-actina adyacente a la membrana plasmática (ver apartado 2.6). También se sabe que en la interacción de los MFs con las proteínas integrales de membrana intervienen las proteínas ezrina-radixina-moesina (ERM) (Defacque et al., 2000; Tsukita and Yonemura, 1999).

Proteínas motoras de actina y el tráfico intracelular

Las miosinas o motores de actina son una superfamilia de proteínas motoras caracterizadas por su capacidad para desplazarse por los MFs mayoritariamente desde el extremo (-) al (+), convirtiendo la energía química derivada de la hidrólisis de ATP en movimiento mecánico. En la estructura de las miosinas se distingue la “cabeza” o extremo N-terminal donde reside su actividad ATPasa y su dominio de unión a la actina, la región central o “cuello” donde se localizan las cadenas ligeras reguladoras y que en algunos casos tienen capacidad de unión a calmodulina, y la “cola”, extremo C-terminal muy variable que confiere a las distintas miosinas sus peculiaridades funcionales (Baker and Titus, 1998). Las miosinas se encuentran presentes en la mayoría de eucariotas estudiados, lo que sugiere una evolución similar a la de la propia actina. En este sentido, se postula un origen paralelo al motor de MTs quinesina debido a la similitud de su estructura tridimensional. Aunque no hay un homólogo directo de miosinas en procariotas, los dominios motores de las miosinas y quinesinas se relacionan con la superfamilia de proteínas NTPasas (incluyendo ATPasas y GTPasas) las cuales, sí están presentes en los procariotas.

En *Saccharomyces cerevisiae*, la miosina de tipo I participa en las fases iniciales de la endocitosis (Geli and Riezman, 1996), En mamíferos, la miosina I α interviene en la regulación del transporte de proteínas endocitadas a los endosomas y lisosomas (Raposo et al., 1999). En células polarizadas esta miosina se localiza en vesículas que derivan del aparato de Golgi (AG) y su actividad motora es necesaria para el transporte hasta la membrana plasmática apical.

La miosina de tipo II no muscular ha sido implicada en la generación de intermediarios de transporte (ITs) en el AG (Duran et al., 2003; Egea et al., 2006; Stow and Heimann, 1998). Evidencias bioquímicas demuestran la interacción de este motor con la membrana del AG (Fath, 2005), sugiriendo un modelo en el cual la miosina II estaría unida a la membrana de las cisternas del AG por su “cola” y a los MFs por su “cabeza”. La translocación de la miosina II hacia los MFs podría proporcionar una fuerza que participaría en la fisión del IT para ser liberado de la cisterna y/o para su movimiento posterior a lo largo de los MFs (DePina and Langford, 1999; DePina et al., 2007), proceso que tendría lugar en conjunción con otras proteínas del citoesqueleto asociado al AG como la espectrina, anquirina o la isoforma de tropomiosina Tm5NM-2 (Heimann et al., 1999; Duran et al., 2003; Percival et al., 2004).

La Miosina de tipo V de *S. cerevisiae* es reclutada por la GTPasa Sec4p a vesículas derivadas de la red *trans* del AG (TGN) que tienen como destino la gema donde se genera la célula hija, en donde estas vesículas utilizan los MFs para desplazarse hasta la gema (Schott et al., 1999).

La miosina de tipo VI, a diferencia del resto de miosinas conocidas, se desplaza hacia el extremo (-) de los MFs (Wells et al., 1999). En cuanto a su localización, la miosina VI se ha encontrado en la membrana plasmática, y se sabe que es reclutada a las ondulaciones de membrana o *ruffling* cuando las células son estimuladas con factores de crecimiento. La miosina VI también se ha encontrado en la parte *trans*- de las cisternas del AG (*trans*-Golgi) y en el TGN, implicándose en la regulación de la morfología de estos compartimentos ya que la falta de miosina VI comporta que el AG ocupe menos volumen respecto al citoplasma celular. Por otro lado, se ha descrito una asociación entre la miosina VI y las vesículas endocíticas recubiertas de clatrina ya que (1) colocaliza con proteínas que componen esta cubierta y (2) mutantes negativos de la miosina VI interfieren con la endocitosis dependiente de clatrina (Buss et al., 2001). Se piensa la miosina VI actuaría en la formación de las vesículas de clatrina ayudándolas a moverse por el córtex rico en F-actina (Aschenbrenner et al., 2003). También se ha descrito que la miosina VI es necesaria para la correcta secreción de proteínas (Warner et al., 2003a). El reclutamiento de la miosina VI al AG vendría mediado por la proteína optineurina, cuya ausencia inducida por técnicas de RNA de interferencia provoca la fragmentación del AG y una disminución de la exocitosis (Sahlender et al., 2005).

1.3. Regulación y organización del citoesqueleto de actina

Como se ha dicho anteriormente, los MFs se originan a partir de la nucleación, polimerización y/o ensamblaje de G-actina libre o liberada de las ABPs o bien a partir de la elongación de fragmentos de F-actina derivados de la acción de las ABPs sobre MFs preexistentes. El proceso de nucleación y formación de MFs *de novo* resulta desfavorable desde el punto de vista termodinámico y cinético (Sept and McCammon, 2001), sin embargo, la célula dispone de una serie de proteínas que favorecen este proceso. La nucleación y formación de MFs *in vivo* implica dos mecanismos independientes mediados por el complejo Arp2/3 y las forminas (Pollard, 2007b). Mas recientemente, también se han descrito otros factores nucleadores de actina como son las proteínas Spir y Cordon-bleu (Cobl) (Ahuja et al., 2007; Kerkhoff, 2006).

1.3.1. Nucleadores de actina

El complejo Arp2/3

El complejo proteico Arp2/3 consiste en siete subunidades: Arp2, Arp3, y p40-ARPC1, p34-ARPC2, p21-ARPC3, p20-ARPC4, p16-ARPC5 (Machesky et al., 1994). Arp2/3 es activo en el frente de avance de células en movimiento/migración donde produce ramificaciones en la red de MFs, lo cual proporciona la fuerza que proyecta la membrana en su avance (Pollard, 2007a). La observación de MFs decorados con fragmentos S1 en células en movimiento/migración indica que los extremos (+) son abundantes cerca del frente de avance (Small et al., 1978) mientras que los extremos (-) están implicados en la formación de ramificaciones en forma de “Y” que lateralmente se unen con MFs preexistentes (Mullins et al., 1998). Mediante el marcaje con anticuerpos frente a subunidades del complejo Arp2/3 se observa que éste se localiza en los extremos (-) justo en el punto de bifurcación de una ramificación (Svitkina and Borisy, 1999).

Los principales activadores de Arp2/3 son los miembros de la familia de proteínas del síndrome de Wiscott-Aldrich (WASP) y de su variante neural (N-WASP) conjuntamente con las proteínas WASP con dominios de homología a verprolina (WAVE) o el supresor del receptor de AMP cíclico (Scar). Una de las principales diferencias entre las proteínas WASP/N-WASP y WAVE/Scar consiste en su especificidad por las Rho GTPasas que actúan como activadores de estas proteínas. Así, Cdc42 y fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP₂) actúan a través de WASP/N-WASP (Higgs and Pollard, 1999; Higgs and Pollard, 2000) y Rac lo hace a través de WAVE/Scar (Miki et al., 1998). En cualquier caso, todas las proteínas de la familia WASP/WAVE convergen finalmente estimulando la nucleación/polimerización de actina mediada por Arp2/3. También se ha descrito como la proteína de interacción con WASP (WIP) está implicada en la regulación de la actividad y estabilidad de WASP y participa en la formación de filopodios, lamelipodios, fibras de estrés y podosomas (Anton et al., 2007). Por otro lado, se conocen distintas proteínas de unión a membrana que interaccionan con las proteínas de la familia WASP/WAVE, las cuales regulan su interacción con el complejo Arp2/3. Sería el caso de la familia de proteínas deformadoras de membrana que contienen los dominios BAR (Bin, anfifisina, Rvs167), EFC (de homología a Fer-CIP4) y RCB (de unión a Rac). La mayoría de estas proteínas contienen a su vez dominios de homología a Src (SH3), los cuales interaccionan con las proteínas WASP/WAVE (Takenawa

and Suetsugu, 2007). Así las proteínas WASP/WAVE conjuntamente con las proteínas deformadoras de membrana estarían implicadas en el control de la morfología celular a través de sus efectos sobre la polimerización de actina en los distintos procesos biológicos.

Arp2/3 también puede activarse por otras proteínas como la cortactina, la cual a su vez es sustrato de la quinasa Src (Tehrani et al., 2007). La cortactina se localiza principalmente en sitios donde ocurren frecuentemente procesos de polimerización y despolimerización de actina como el córtex y los lamelipodios. En estas estructuras, su función es potenciar la formación de una red de MFs ramificados mediante su interacción con Arp2/3 y la estabilización de las ramas preformadas por la acción de N-WASP/Arp2/3. La cortactina también participa en procesos endocíticos y colocaliza con la dinamina en vesículas de clatrina durante su formación (Cao et al., 2003). Otros estudios proponen que la cortactina participa en el transporte post-Golgi (Cao et al., 2005). Abp1 también tiene la capacidad de activar Arp2-3. En *S. cerevisiae*, Abp1 presenta dos dominios acídicos a través de los que se une a Arp2/3 y un dominio con homología a ADF/cofilina en el extremo N-terminal a través del cual se une a los MFs. Su homólogo en mamíferos (mAbp1) carece de los dominios acídicos de unión a Arp2/3 aunque ésta podría ocurrir de manera indirecta ya que mAbp1 puede unir dinamina (Qualmann et al., 2000; Kessels et al., 2001) que a su vez puede interactuar con WASP (Qualmann et al., 1999). mAbp1 está presente en la membrana del AG (Fucini et al., 2002) y, al igual que lo que ocurre con la cortactina, la activación de Rac1 produce su translocación conjuntamente con Arp2/3 al frente de avance de una célula en movimiento/migración (Kessels et al., 2000).

Las forminas

Las forminas son una familia de proteínas altamente conservadas en los eucariotas que presentan un dominio de tipo α -hélice FH2 capaz de formar un dímero que actúa en el extremo (+) de la F-actina elongando los MFs. El dominio FH2 se encuentra en la mayoría de eucariotas y suele estar precedido por un dominio rico en prolinas FH1 que interactúa con el complejo profilina-actina “arrastrando” los monómeros de actina al sitio de nucleación/elongación. Algunas forminas contienen también un dominio FH3 que determina su localización subcelular (Evangelista et al., 2003). Las forminas nuclean y promueven la elongación de MFs de forma no ramificada. Están implicadas en la citocinesis, la formación de varios tipos de haces o *bundless* de MFs en estereocilios y microvilli así como en la

formación del acrosoma (Zeller et al., 1999). Aunque la acción de las forminas en la polimerización de actina puede variar entre especies, el dominio FH2 de todas ellas presenta dos características invariables: (1) enlentece la disociación de los monómeros de actina en el extremo (+) de la F-actina y (2) bloquea la unión de proteínas de coronado/bloqueo a dicho extremo (Harris et al., 2004; Harris and Higgs, 2004). Dentro de la familia de las forminas encontramos la subfamilia de las proteínas de mamífero relacionadas con la proteína diáfano (Dia) de *Drosophila melanogaster* (DRFs). Las forminas presentan en su secuencia dos dominios funcionales adicionales: el dominio de unión a Rho (RBD) en posición N-terminal y el dominio autoregulatorio de la proteína mDia (DAD) en posición C-terminal, incluido a su vez en el dominio FH2 (Alberts, 2002). Las proteínas pertenecientes a esta subfamilia se encuentran autoinhibidas a través de una interacción intramolecular entre los dos dominios RBD y DAD, la unión de Rho rompe la interacción entre ambos dominios y la molécula se activa (Alberts, 2001). En este sentido, Cdc42 también puede actuar como activador de Drf3 o mDia2 (Peng et al., 2003). La elevada concentración de proteínas de coronado/bloqueo en la célula y su gran afinidad por los extremos (+) de la F-actina impedirían la construcción de MFs mayores de 100 nm. Sin embargo, la acción de las forminas permite a la célula elongar poblaciones de MFs hasta longitudes de varias micras, como ocurre en los filopodios y el microvilli y en los “cables” de actina que aparecen en *S. cerevisiae*. Mientras que Arp2/3 está implicada en la formación de filamentos cortos y ramificados altamente eficaces en ejercer fuerzas en el frente de avance de una célula en movimiento/migración, las forminas favorecerían la formación de MFs largos con diversas funciones como la exploración del medio extracelular, el aumento de la superficie celular y la división celular.

Otros factores nucleadores de actina: Spir y Cobl

Los factores Spir nuclean actina de forma distinta a Arp2/3 o las forminas. Las proteínas Spir polimerizan actina de forma no ramificada mediante la unión de cuatro monómeros de actina a un cluster de cuatro dominios de homología a WASP (WH2), lo cual se ha descrito mediante ensayos de polimerización *in vitro* y datos de microscopía electrónica de transmisión convencional (TEM). Se sugiere que Spir participa en el movimiento de ITs y en la asociación entre MTs y MFs corticales siendo regulada su acción a partir de fosforilaciones derivadas de protein-quinasas y por su interacción con las Rho GTPasas (Kerkhoff, 2006; Kerkhoff et al., 2001). También se ha descrito el factor nucleador de actina Cobl, el cual une

tres monómeros de actina a tres dominios WH2 para promover la polimerización de actina. Esta proteína parece estar implicada en el desarrollo neuronal y en la formación de neuritas (Ahuja et al., 2007).

1.3.2. Las Rho GTPasas

Las proteínas WASP/WAVE y DRFs son activadas por distintas Rho GTPasas integrantes de la superfamilia de proteínas Ras, la cual engloba a cinco familias de proteínas: Ras, Rho, Rab, Arf y Ran (Etienne-Manneville and Hall, 2002). En términos generales, los miembros de la familia de Ras participan en el control de la proliferación celular, los integrantes de la familia de las Rho GTPasas en la regulación de la organización del citoesqueleto de actina, los componentes de las familias de Rab y Arf en el tráfico intracelular regulando movimientos de vesículas entre distintos compartimentos, y finalmente los miembros de la familia de Ran en el transporte entre el núcleo y el citoplasma (Der and Balch, 2000).

Las Rho GTPasas son proteínas monoméricas con un peso molecular de entre 20 y 30 kDa (Bishop and Hall, 2000) que se encuentran en su forma activa o inactiva en función de si están unidas a GTP o GDP, respectivamente. Su capacidad de interacción con las membranas celulares les permite promover la polimerización de actina en zonas determinadas de la membrana plasmática o de la membrana de un compartimento intracelular con la finalidad de inducir protusiones de membrana o regular el movimiento vesicular. La mayoría de estudios sobre las Rho GTPasas de mamíferos se han centrado en Rho, Rac y Cdc42 (Ridley, 2006). Debido a la amplitud de eventos celulares en los que las Rho GTPasas están implicadas, la activación de estas proteínas se encuentra altamente regulada. Las proteínas o factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) participan en el intercambio del GDP por GTP. La hidrólisis de GTP en una Rho GTPasa activada puede ser estimulada por proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAPs). Por el contrario, la unión de las Rho GTPasas a los inhibidores de disociación de nucleótidos (GDIs) impide el intercambio de nucleótidos de guanina así como la hidrólisis de GTP endógena o estimulada por las GAPs.

RhoA está implicada en la formación de fibras de estrés, las cuales son haces contráctiles de MFs organizados de forma antiparalela que se originan cuando la célula establece conexiones estables con el sustrato a nivel de los contactos focales. RhoA actúa a través de una quinasa asociada (ROCK) o mediante la formina relacionada con diafanos de mamíferos (mDia1).

ROCK, activada tras su unión a Rho-GTP, inhibe la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP), lo que provoca un incremento de los niveles de cadena ligera de miosina fosforilada que a su vez potencia la activación de la miosina. Esto promueve una contracción dependiente de miosina que provoca un incremento en las fuerzas de tensión entre los haces antiparalelos de MFs, lo cual resulta en la formación de las fibras de estrés, en las que la ABP α -actinina participaría formando entrecruzamientos entre los MFs. Una segunda diana de Rho sería la proteína mDia1. Esta proteína es capaz de unirse a la profilina y a la G-actina para promover la polimerización de actina en un contacto focal que originaría las fibras de estrés dorsales (Hotulainen and Lappalainen, 2006). Otra diana efectora de RhoA es la quinasa con dominio LIM (LIMK). Ésta puede ser fosforilada y activada por ROCK y también por PAK (el principal efector de Rac y Cdc42), lo cual constituye un punto de convergencia entre las vías de Rho, Rac y Cdc42. La activación de LIMK estabiliza los MFs, tanto los que constituyen las fibras de estrés como los que aparecen en el córtex. Otras dianas de RhoA son la quinasa Citron y la fosfatidil inositol-4-fosfato 5-quinasa (PI-4P5K). RhoA regula la síntesis de PIP₂ interaccionando con PI-4P5K (Ren et al., 1996), fenómeno que incrementa su actividad y por tanto la producción de PIP₂ (Weernink et al., 2000), el cual facilita los procesos de polimerización de actina (Janmey et al., 1987). Finalmente, las proteínas ERM constituyen otra diana que ayuda a Rho a regular la dinámica de actina. Estas proteínas desempeñan un papel crucial en la regulación del citoesqueleto de actina y son esenciales para la formación de las fibras de estrés, las ondulaciones de membrana y los filopodios inducidas por RhoA, Rac y Cdc42, respectivamente (Fig.4). Las proteínas ERM actuarían como puntos de anclaje para los MFs a la membrana plasmática. Un agente utilizado para la activación de Rho es el ácido lisofosfatídico (LPA).

Rac está implicada en la formación de ondulaciones de membrana en los lamelipodios. Los lamelipodios son estructuras altamente dinámicas constituidas por delgadas protusiones de membrana que aparecen en el frente de avance de las células en movimiento/migración y que a menudo forman ondulaciones de membrana cuando dichas protusiones pierden la adherencia al sustrato. Los lamelipodios contienen agrupaciones de MFs altamente ramificados con sus extremos (+) orientados hacia el borde de la membrana plasmática en el frente de avance. Al igual que ocurre con RhoA, Rac puede estimular la actividad de PI-4P5K (Tolias et al., 2000; Tolias and Carpenter, 2000) incrementando así los niveles de PIP₂. Aunque este proceso favorecería la polimerización de actina en el lamelipodio, actualmente se considera que Arp2/3 es el principal efector de Rac para inducir la polimerización de actina en

el frente de avance, En este sentido Rac activaría a Arp2/3 a través de las proteínas WAVE/Scar. Las proteínas Ena/VASP están implicadas en la arquitectura de los lamelipodios, la ausencia de estas proteínas induce la formación de lamelipodios más cortos con MFs mucho más ramificados. En este sentido, se ha descrito que Ena/VASP promueve la elongación de los MFs impidiendo la acción de las proteínas de coronado/bloqueo (Bear et al., 2002). Los principales agentes utilizados para la activación de Rac son el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), factores de crecimiento como EGF, PDGF, e insulina.

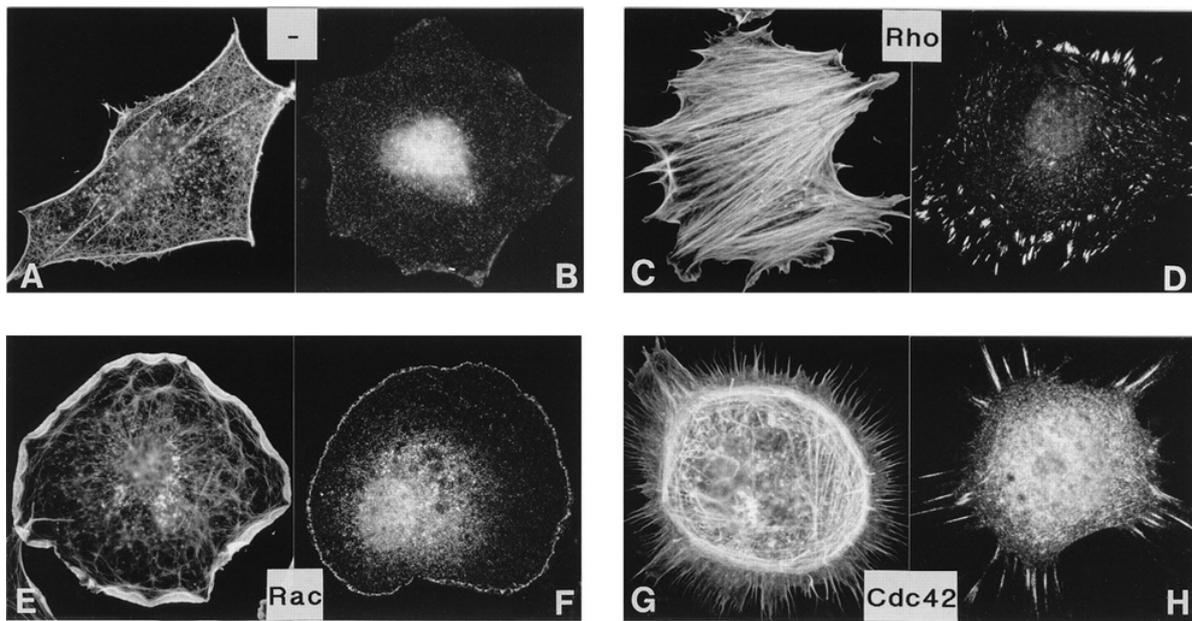


Fig. 4 Efecto de Rho, Rac y Cdc42 en la organización del citoesqueleto de actina. Fibroblastos Swiss 3T3 cultivados en ausencia de suero (-) contienen escasos MFs (A) o contactos focales (B). La adición de LPA al medio activa a Rho que promueve la formación de fibras de estrés (C) y de contactos focales (D). La microinyección de la forma activa de Rac induce la formación de lamelipodios (E) y de contactos focales (F). La microinyección de FGD1, un GEF de Cdc42, da lugar a la formación de filopodios (G) y de contactos focales (H). Los MFs se ponen de manifiesto con Pha rodamina y los contactos focales empleando un anticuerpo frente a vinculina (Modificado de Hall, 1998).

Cdc42 provoca la formación de filopodios y microespinas (Nobes and Hall, 1995; Kozma et al., 1995). Los filopodios son procesos transitorios largos que proyectan al exterior celular. Se trata de haces de MFs paralelos con los extremos (+) orientados hacia la cabeza del filopodio, en los cuales se encuentran proteínas del tipo fascina que participa en el entrecruzamiento de los MFs. Las microespinas son haces paralelos de MFs que se originan en los lamelipodios (Svitkina et al., 2003). N-WASP y las forminas participan en la formación de estas estructuras (Small et al., 1978; Small et al., 2002) mientras que Arp2/3 parece ser que sólo participa en el inicio de la formación de los filopodios (Svitkina and Borisy, 1999). Otros efectores de Cdc42 implicados en procesos de reorganización de actina son las quinasas MRCK, PI3K, el fosfoinositósido PIP_2 y la proteína CIP4.

1.3.3. Asociación actina-espectrina: el córtex del eritrocito

Algunas células presentan bajo la membrana plasmática de una densa red de MFs en el córtex cuya función es especialmente relevante para el mantenimiento de la morfología celular. La morfología típica discoide-bicóncava del eritrocito así como su membrana elástica y deformable viene determinada por el estado del citoesqueleto de actina-espectrina que conforma el córtex. El componente mayoritario del córtex del eritrocito es la espectrina. Tetrameros de espectrinas conectan con el intercambiador aniónico AE1 o banda 3 integrado en la membrana mediante la anquirina. La espectrina también se une con la glicoforina C mediante la banda 4.1. Tanto la banda 4.1 como la aducina, estabilizan la asociación de la espectrina con MFs cortos que contienen tropomiosina, a los que se asocia a su vez la tropomodulina. La banda 4.1 también se ha descrito en el centrosoma de células en interfase o en mitosis, en este sentido se conoce como la secuencia C-terminal de esta proteína presenta homología con la región de la hélice 5 de la β -tubulina (Fant and Merdes, 2002). La banda 4.9, conocida también como dematina, produce el entrecruzamiento de los MFs (Bennett and Baines, 2001). Se piensa que las proteínas transmembrana requieren de un ambiente específico para permanecer estables dentro un determinado dominio de la membrana. Se ha descrito como la anquirina del eritrocito se encuentra unida covalentemente a un ácido graso, el ácido palmítico (Staufenbiel and Lazarides, 1986). Probablemente esta unión podría estar implicada en la localización de la anquirina en determinadas regiones de la membrana denominadas balsas lipídicas o *lipids rafts* teniendo en cuenta que el ácido palmítico y mirístico son dos de los lípidos mayoritarios encontrados en éstas (Brown and London, 2000).

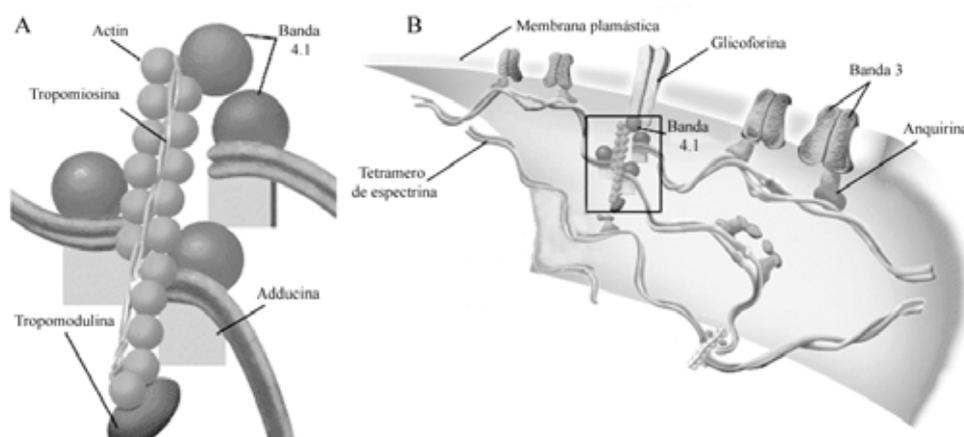


Fig. 5. A,B. Organización de las principales proteínas de citoesqueleto del eritrocito y su interacción con proteínas integrales de membrana (Modificado de Lux, 1979; Luna and Hitt, 1992).

2. TRÁFICO INTRACELULAR

2.1. Rutas o vías de tráfico intracelular

La célula eucariota ha desarrollado a lo largo de la evolución compartimentos intracelulares que permiten organizar y optimizar el metabolismo celular. La compartimentación conlleva la existencia de rutas de transporte que comuniquen los distintos compartimentos, permitiendo así la entrada y salida de sustancias o elementos necesarios para el mantenimiento de la integridad y función de dichos compartimentos. Estas rutas de transporte son las encargadas de llevar la carga o *cargo* (conjunto de moléculas a transportar, que pueden ser (glico)proteínas, (glico)lípidos y sustancias inorgánicas) de un compartimento a otro (Fig. 6A). El transporte entre los distintos compartimentos u orgánulos emplea estructuras membranosas de forma vesicular o túbulo-vesicular que se mueven mediante proteínas motoras utilizando los elementos del citoesqueleto como soporte estructural para su desplazamiento.

2.2.1. La ruta endocítica y de reciclaje

La célula utiliza la ruta endocítica para incorporar sustancias como proteínas y lípidos o elementos exógenos presentes en la membrana plasmática o en el medio extracelular. Éstos se internalizan a compartimentos intracelulares como los endosomas tempranos, donde son destinados hacia los lisosomas, el TGN o bien hacia endosomas de reciclaje (Jones, 2007). Dentro de la vía endocítica encontramos distintos mecanismos por los que moléculas y elementos exógenos se internalizan. De forma simplificada distinguiremos entre fagocitosis y pinocitosis (Conner and Schmid, 2003) (Fig. 6B).

La fagocitosis es el tipo de endocitosis típica de células especializadas en internalizar grandes partículas. Este mecanismo es típico de células del sistema inmune como los macrófagos y células dendríticas, las cuales endocitan patógenos como bacterias, virus y cuerpos extraños, desencadenando respuestas inmunes contra ellos. La fagocitosis es un proceso muy regulado en el que intervienen receptores específicos de la superficie celular y cascadas de señalización intracelular mediadas por proteínas de la familia de las Rho GTPasas. Así, los macrófagos, tras una reorganización de la red de MFs del córtex por la acción de Rac y Cdc42 emiten pseudópodos que atrapan al patógeno internalizándolo en una vacuola autofágica o fagosoma,

el cual se fusiona de la membrana plasmática gracias a la dinamina 2 (Gold et al., 1999). Posteriormente este fagosoma se fusiona con los lisosomas formando fagolisosomas donde se produce la degradación del cuerpo foráneo (heterofagia).

En la pinocitosis distinguimos tres mecanismos: la macropinocitosis, la endocitosis clatrina- o caveolina-dependiente y la endocitosis clatrina-caveolina-independiente. La macropinocitosis tiene lugar en paralelo a la formación de ondulaciones de membrana en respuesta a una estimulación exógena. Por ejemplo, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) induce macropinocitosis implicando a Rac y su efector PAK (Ridley, 2001). Al igual que la fagocitosis, las Rho GTPasas participan en la formación de protusiones de membrana, las cuales se colapsan y fusionan con la membrana plasmática endocitando el elemento exógeno mediante los macropinosomas.

La endocitosis clatrina-dependiente ocurre constitivamente en las células de mamífero. Está implicada en la incorporación de nutrientes esenciales como las lipoproteínas de baja densidad o LDL y la transferrina en un proceso mediado por receptores específicos de estas sustancias (Brodsky et al., 2001). La endocitosis mediada por clatrina es crucial para la comunicación intercelular durante el desarrollo de tejidos y órganos (Seto et al., 2002) así como para la homeostasis celular, regulando la internalización de “bombas” implicadas en el control del transporte a través de las membranas de pequeñas moléculas e iones. La cubierta que recubre las vesículas de pinocitosis en la endocitosis mediada por clatrina consiste en los triesquelions de clatrina, compuestos por tres cadenas ligeras y tres cadenas pesadas de clatrina, las cuales se ensamblan para formar una estructura poligonal que ayuda a deformar la membrana durante la incorporación del ligando-receptor. En este proceso participan también los complejos adaptadores proteicos o proteínas adaptadoras (APs). Se conocen cuatro complejos adaptadores (AP1-4) cada uno de ellos implicado en la formación de vesículas en localizaciones subcelulares distintas, implicándose el AP2 en la endocitosis mediada por clatrina (Robinson and Bonifacino, 2001).

La endocitosis caveola-dependiente está mediada por las caveolas. Son estructuras endocíticas de membrana plasmática con forma de botella enriquecidas en la proteína caveolina que una vez fisionadas de la membrana forman los caveosomas. Las caveolas se asocian con la endocitosis de glicosfingolípidos, colesterol y ciertas proteínas con afinidad a formar microdominios de membrana (van Deurs et al., 2003). En estas estructuras se concentran un gran número de proteínas involucradas en señalización, sobre todo receptores de membrana y

GTPasas de la familia Ras. Tanto la dinamina como la polimerización de actina participan en la endocitosis mediada por caveolas (Pelkmans et al., 2002). En términos generales, la internalización de moléculas o complejos macromoleculares mediada por caveolas recibe el nombre de potocitosis (Mineo and Anderson, 2001).

Las caveolas representan un tipo de microdominio de la membrana plasmática. Otros, genéricamente llamados balsas lipídicas o *lipids rafts* contienen colesterol y esfingolípidos con una organización y dinámica diferente al resto de la membrana enriquecida en glicerofosfolípidos (Helms and Zurzolo, 2004) en donde se concentran gran cantidad de moléculas implicadas en la señalización intracelular. Estas balsas lipídicas difunden libremente por la membrana plasmática (Edidin, 2001) y su composición lipídica proporciona las bases físicas para la internalización de proteínas y/o glicolípidos (Anderson and Jacobson, 2002). Así, a nivel de las balsas lipídicas tiene lugar la internalización de moléculas de forma clatrina- o caveolina-independiente como ocurre en el caso receptor de la interleuquina-2 en linfocitos. Curiosamente, se ha descrito como la dinamina interviene en este mecanismo de endocitosis (Lamaze et al., 2001).

En términos generales, la ruta de reciclaje es la vía seguida por ciertas moléculas que tras su endocitosis son seleccionadas y devueltas otra vez a la membrana plasmática. Por ejemplo, el receptor de la transferrina tras ser endocitado es separado del resto de *cargo* y después de liberar la transferrina es devuelto a la membrana plasmática a través de los endosomas de reciclaje y de este modo reutilizarse. Consecuentemente, cada receptor puede capturar muchas moléculas de transferrina antes de ser finalmente degradado (Maxfield and McGraw, 2004).

2.1.2. La ruta secretora o biosintética

La vía secretora o biosintética se inicia en el retículo endoplasmático (RE) en donde se sintetiza el *cargo* que será dirigido posteriormente a compartimentos intracelulares, a la membrana plasmática o al medio extracelular (Fig. 6A). Dentro de la vía biosintética, podemos distinguir dos tipos de secreción: la secreción constitutiva y la regulada. La primera acontece de forma constante a medida que las proteínas y los lípidos se van sintetizando. Todos los tipos celulares poseen este tipo de vía ya que es utilizada para aportar constantemente nuevas proteínas y lípidos a sus destinos (Ponnambalam and Baldwin, 2003). La secreción regulada, por el contrario, se produce sólo en respuesta a algún tipo de señal intra- o extracelular como el Ca^{2+} , hormonas o factores de crecimiento (Blazquez and

Shennan, 2000). En este tipo de secreción, el *cargo* no es secretado inmediatamente tras sus síntesis, sino que se almacena en algún tipo de gránulos o vesículas o especializadas como es el caso de la insulina acumulada en gránulos de secreción en las células del páncreas endocrino.

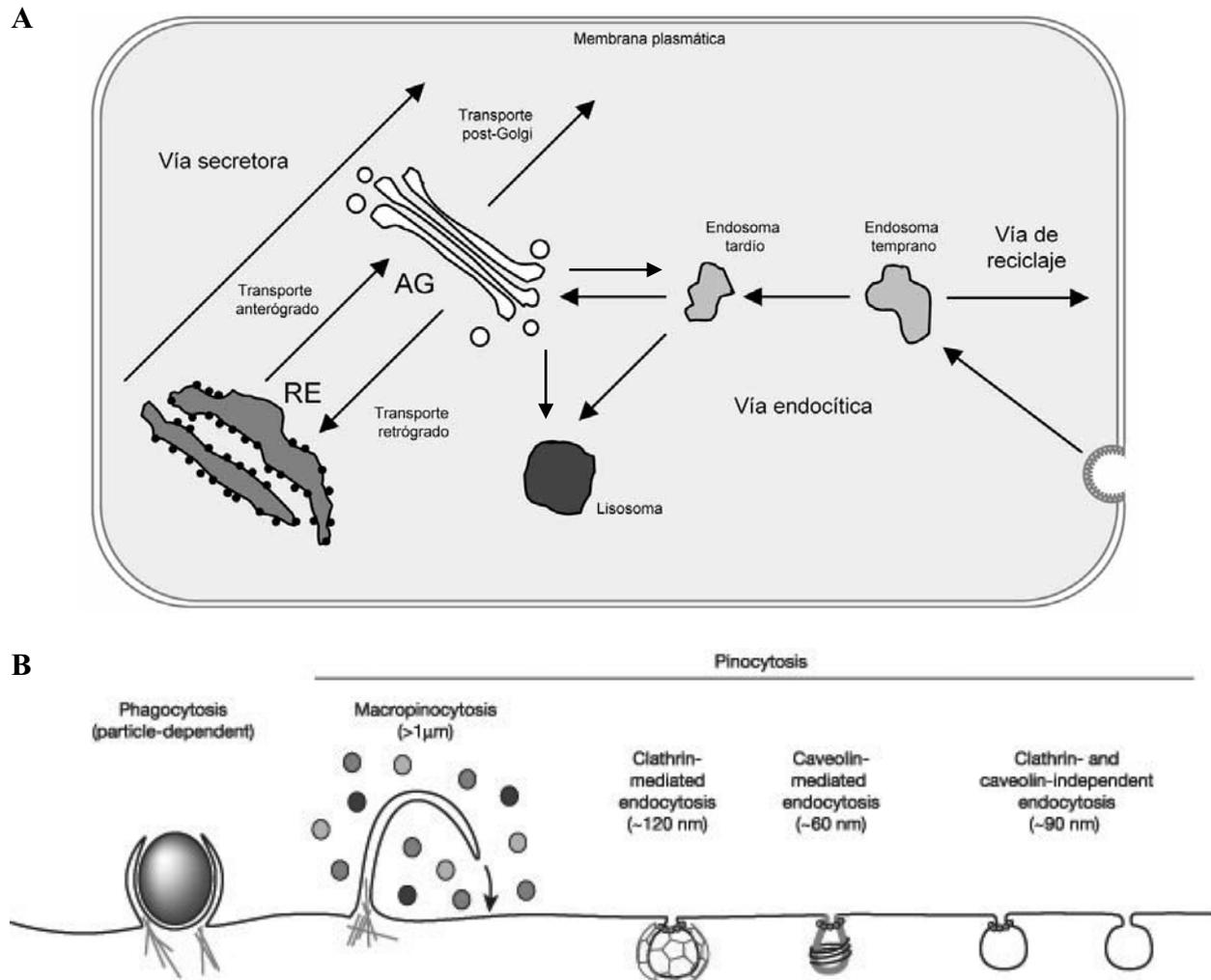


Fig. 6. A. Esquema general de las principales vías de tráfico intracelular. La vía secretora es seguida por el *cargo* sintetizado en el RE, el cual viaja hasta la membrana plasmática pasando por el AG. La vía endocítica introduce *cargo* desde el exterior hacia los compartimentos endosomales y de ahí hasta el AG o los lisosomas. La vía de reciclaje deriva parte del *cargo* endocitado de nuevo hacia la superficie celular (Modificado de Egea, 2001). B. La vía endocítica difiere en cuanto al mecanismo de internalización en función de la naturaleza del *cargo*, tamaño y mecanismo de formación de la de vesícula endocítica (Modificado de Conner and Schmid, 2003).

En las zonas del RE donde se sintetizan proteínas se observa un gran número de ribosomas asociados a la membrana del orgánulo confiriéndole un aspecto rugoso, de ahí su denominación de retículo endoplasmático rugoso. La membrana del RE es una continuación de la membrana nuclear externa. Los ribosomas no están permanente unidos a la membrana del RE, sino que son reclutados una vez a comenzado la síntesis de la proteína destinada a ser secretada. El RE es especialmente importante en la producción de enzimas lisosomales,

proteínas destinadas a la secreción constitutiva o regulada, proteínas integrales de membrana así como en la N- glicosilación de proteínas. También se pueden encontrar zonas del RE sin ribosomas que corresponden a los sitios de salida del retículo endoplasmático (ERES) o bien al retículo endoplasmático liso (REL). El REL juega un papel fundamental en diversos procesos metabólicos como la síntesis de lípidos (esfingolípidos y fosfolípidos) y hormonas esteroideas, así como en un gran número de reacciones de detoxificación (procesamiento enzimático de sustancias tóxicas). Además, el REL es el compartimento más importante para el almacenamiento de iones Ca^{2+} , los cuales son de gran importancia para el desencadenamiento de muchas vías de señalización celular. El REL de las células de músculo estriado recibe el nombre de retículo sarcoplasmático. Si bien la función principal del REL es la síntesis de determinadas moléculas, el retículo sarcoplasmático está especializado en el almacenamiento de Ca^{2+} , el cual es liberado por la célula en la contracción muscular.

2.2. El aparato de Golgi: arquitectura y función

El aparato o complejo de Golgi fue descubierto en 1898 por Camilo Golgi. Localizado generalmente en la zona perinuclear, está formado por un número variable de sáculos o cisternas apiladas y aplanadas. Su función principal es la modificación de proteínas y lípidos que han sido sintetizados en el RE para su posterior distribución intra- o extracelular. El conocimiento de su estructura y función es crucial para entender cómo funciona la vía secretora.

Arquitectura del aparato de Golgi

A nivel de microscopía óptica, empleando técnicas de inmunofluorescencia, el AG de aparece como una sola estructura con forma de media luna, cinta o *ribbon* situada perinuclearmente alrededor del centro organizador de microtúbulos (MTOC) o centrosoma. Esta localización es consecuencia de la interacción del AG con los MTs y proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs) (Rios and Bornens, 2003). A nivel ultraestructural, utilizando técnicas de TEM y tomografía electrónica/reconstrucción 3D, el AG aparece constituido por un número variable de dictiosomas o *stacks* interconectados dinámicamente entre si mediante un sistema túbulo-vesicular de membranas que constituyen las regiones no compactas del *ribbon*. Cada dictiosoma consiste en una estructura que contiene un número variable de sáculos o cisternas apiladas en las que se distingue una región central aplanada o zona compacta y una porción dilatada o zona no compacta distal/lateral o *lateral rims* (Kepes et al., 2005) (Fig. 7). En el

dictiosoma se distingue una cara *cis*- cuyas cisternas reciben el aporte del *cargo* procedente del RE, una cara *trans*- en la que tiene lugar la salida del *cargo* procesado y un conjunto de cisternas intermedias altamente compactadas que constituyen la parte medial o *mid*- del dictiosoma. La entrada y salida del *cargo* en el AG procedente del RE tiene lugar vía una red de estructuras túbulo-vesiculares altamente dinámicas. Así se describe una red *cis*-Golgi o *cis-Golgi network* (CGN) entre el RE y la cara *cis*-Golgi y una red *trans*-Golgi o *trans-Golgi network* (TGN). Estas redes túbulo-vesiculares adyacentes al dictiosoma actúan como una interfase entre el AG y otros compartimentos de la vía secretora. Aún más, interconectando las cisternas del propio dictiosoma se ha descrito también la presencia de continuidades de membrana en forma de estructuras tubulares (Trucco et al., 2004; Ladinsky et al., 1999).

El dictiosoma está polarizado en donde las cisternas presentan ciertas características en cuanto a morfología y composición molecular. Por ejemplo, mediante tomografía electrónica/reconstrucción 3D se ha descrito que las cisternas del *trans*-Golgi están más fragmentadas que las del *cis*-Golgi (Mogelsvang et al., 2004) y además se piensa que la salida del *cargo* tiene lugar en las dos o tres cisternas *trans*. Tanto las proteínas de matriz como los enzimas del Golgi (Rabouille et al., 1995) o proteínas implicadas en polimerización de actina (Matas et al., 2004) se distribuyen de forma polarizada a lo largo de las cisternas del dictiosoma y tienen cierta tendencia a acumularse en las zonas perforadas de las cisternas (Kweon et al., 2004). A partir del análisis tridimensional del AG se han realizado una serie de predicciones funcionales entre las cuales En términos generales la morfología del AG así como los mecanismos de transporte intra- y post-Golgi varían en función del estado fisiológico de la célula así como entre células y tejidos (Mogelsvang et al., 2004).

La forma y tamaño del AG puede presentar grandes variaciones entre organismos o incluso entre distintos tipos celulares de un mismo organismo. Se sugiere que el número de cisternas del AG refleja la complejidad global de las reacciones enzimáticas que tienen lugar en su lumen, mientras que el número de dictiosomas refleja la carga o densidad de macromoléculas que llegan a la primera cisterna *cis*-Golgi (Prydz et al., 2008). En la levadura *S. cerevisiae*, el AG aparece disperso como sáculos o cisternas aplanadas independientes (Preuss et al., 1992; Rambourg et al., 2001). En algas unicelulares como *Ostreococcus tauri* (Henderson et al., 2007) y muchos protozoos como *Toxoplasma gondii* (Pelletier et al., 2002) y *Trypanosoma brucei* (He, 2007) aparece como un solo elemento o dictiosoma de cisternas apiladas. En

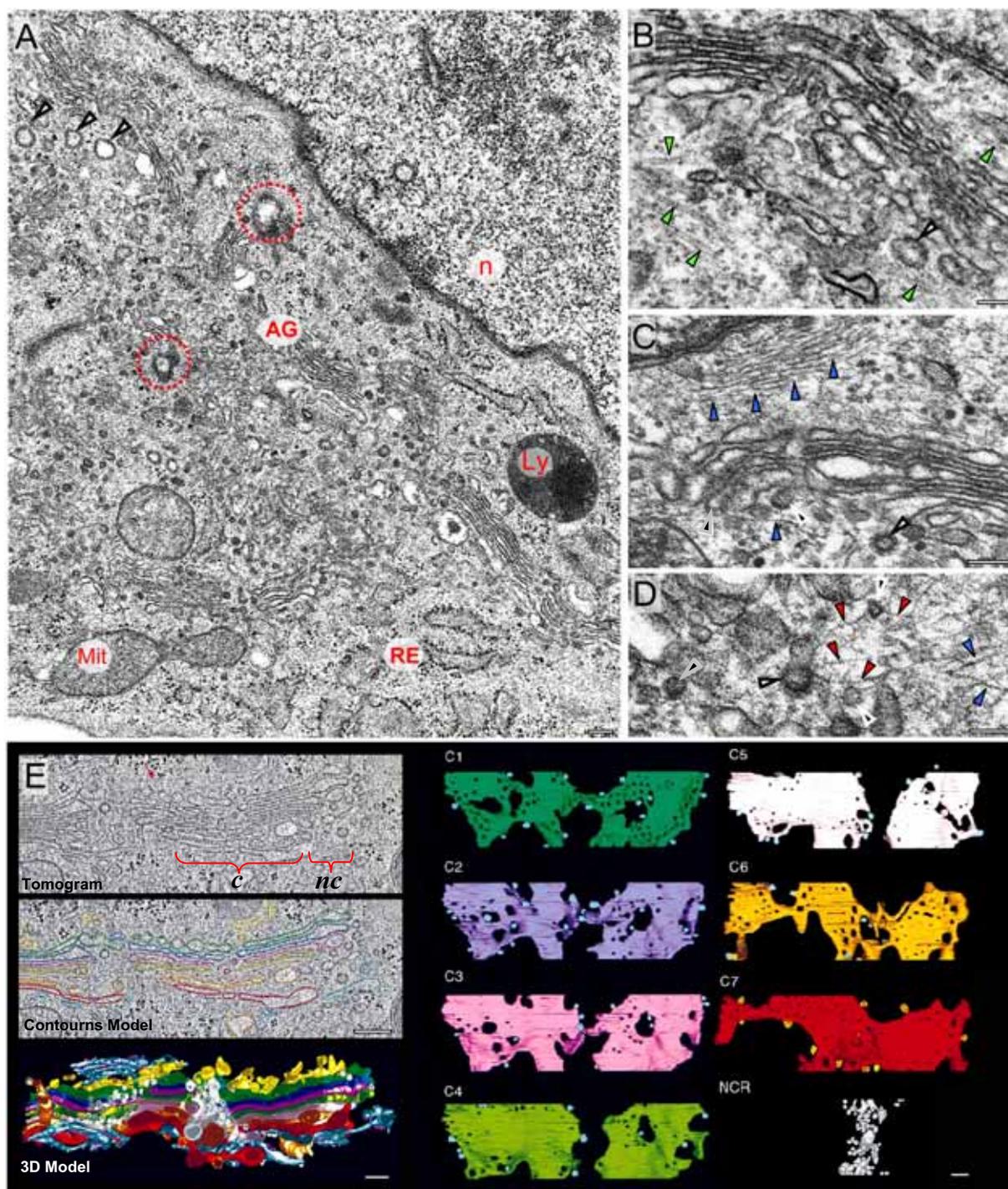


Fig. 7. Arquitectura del aparato de Golgi en una célula NRK. Micrografía electrónica en la que se muestra la distribución perinuclear de distintos dictiosomas de la cinta del AG en la zona centrosomal donde se encuentra la pareja de los centriolos (círculos discontinuos) (A). En las cercanías de las cisternas del AG se detectan MTs (B \blacktriangleright), FIs (C \blacktriangleright) o MFs (D \blacktriangleright). Mediante TTEM se pueden obtener reconstrucciones 3D del AG (E), a partir de un tomograma, de un dictiosoma en el que distinguimos la zona compacta (c) y la dilatación en los *lateral rims* de la zona no compacta (nc) en el cual se delimitan los contornos de las cisternas y estructuras túbulo-vesiculares asociadas para obtener un modelo 3D, en el cual podemos estudiar cada uno de los elementos individualizadamente, en este caso se representan las 7 cisternas desde la cara *cis*- C1 a la *trans*- C7 así como la región no compacta NCR. (Modificado de Ladinsky et al., 1999) En las inmediaciones de las cisternas del AG se detectan perfiles vesiculares con cubiertas de tipo COPI \blacktriangleright o clatrina \blacktriangleright . Núcleo (n), mitocondria (Mit), retículo endoplasmático (RE) y lisosoma (Ly). Barras; 200 nm.

hongos como *D. discoideum* (Becker and Melkonian, 1996), plantas como *Nicotiana tabacum* (daSilva et al., 2004; Hawes and Satiat-Jeunemaitre, 2005) o *D. melanogaster* (Kondylis and Rabouille, 2003), múltiples dictiosomas aparecen dispersos citoplasmáticamente. En todos los casos, los dictiosomas aparecen asociados estrechamente con los ERES formando una unidad secretora.

Función del aparato de Golgi

El AG actúa como una “planta empaquetadora o estación central” en la red de compartimentos de la ruta secretora siendo su función esencial para el tráfico intracelular (Egea, 2001). El AG recibe, selecciona, procesa y destina a sus respectivos destinos intra- o extracelulares el distinto *cargo* producido en el RE. En el AG acontece la mayoría de las modificaciones post-traduccionales de lípidos y proteínas (glicosilaciones, fosforilaciones, sulfataciones y procesamientos proteolíticos) sintetizadas en el RE. Para ello, el AG transporta ciertas sustancias como azúcares y nucleótidos al interior del orgánulo desde el citoplasma. La mayoría de proteínas son glicosiladas en el RE mediante la adición de oligosacáridos ramificados (N-glicosilación) sobre residuos de ácido aspártico. Cuando las proteínas glicosiladas pasan a través de las cisternas del AG distintas enzimas (glicosilasas y glicosiltransferasas) modifican las cadenas de oligosacáridos hasta alcanzar su configuración final. En el caso de las fosforilaciones, el AG importa moléculas de ATP al interior del lumen de las cisternas donde las quinasas catalizan la reacción. Algunas de las moléculas fosforiladas en el AG son las apolipoproteínas que dan lugar a las conocidas lipoproteínas de muy baja densidad o VLDL que se encuentran en el plasma sanguíneo. La correcta ejecución de estas modificaciones es esencial para que la proteína pueda realizar su función. Por ejemplo, en algunos casos la proteína requiere un tipo concreto de residuo glucídico para ser destinada a un compartimento determinado. En este sentido, las enzimas lisosomales contienen manosa-6-fosfato terminal en sus cadenas de oligosacáridos, la cual es reconocida por la maquinaria molecular de selección y transporte para destinar la enzima a los lisosomas (Hille-Rehfeld, 1995). En otros casos las glicosilaciones son necesarias para estabilizar la conformación de la proteína. El AG es el orgánulo de mayor síntesis de carbohidratos, incluyendo la producción de glicosaminoglicanos (GAGs), largos polisacáridos que son anclados a las proteínas sintetizadas en el RE para dar lugar a los proteoglicanos que conforman la matriz extracelular. Estas modificaciones no son exclusivas del *cargo* proteico, sino que también tienen lugar en los lípidos. Así, los esfingolípidos se sintetizan en el AG tras

añadir azúcares a la ceramida sintetizada en el RE. Algunos esfingolípidos (gangliósidos y cerebrósidos) son muy complejos con estructuras altamente ramificadas (Merrill, Jr., 2002). Estos lípidos son fundamentales para el correcto funcionamiento y la estabilidad de las membranas celulares, especialmente en la membrana plasmática. Por último hay que destacar también que el AG participa en el reciclamiento de membrana plasmática mediante la fusión de elementos vesiculares y/o túbulares generados y procedentes de sus cisternas.

2.2. Transporte anterógrado, retrógrado, intra-Golgi y post-Golgi

El AG es un orgánulo altamente dinámico cuyos componentes de membrana se renuevan constantemente. Al centralizar gran parte del tráfico intracelular recibe continuamente aporte de nueva membrana y *cargo* por fusión de ITs procedentes básicamente de RE y endosomas, lo cual equilibra las pérdidas producidas por la fisión de ITs generados en el AG que son dirigidos hacia la membrana plasmática, endosomas tempranos, endosomas tardíos, lisosomas y RE (Fig. 6A). Así pues, es necesario regular adecuadamente la entrada y salida de flujo de membrana del AG para mantener su estructura y funcionalidad de forma que la variación neta del contenido de membrana en el orgánulo sea nula. Alteraciones en el tráfico de membrana afectan significativamente la estructura del AG e impiden su correcto funcionamiento.

Transporte anterógrado

Los ITs que median el transporte desde el RE al AG (transporte anterógrado) son de tipo COPII (Fig. 6A). Reciben este nombre porque para su formación requieren del ensamblaje de un complejo multiproteico llamado COPII o *coatamer protein II* compuesto por las proteínas Sec23/24p, Sec13/31 y la GTPasa monomérica Sar1p (Kirchhausen, 2007; Barlowe et al., 1994). Este conjunto de proteínas es suficiente para generar *in vitro* vesículas a partir de membranas purificadas de RE en presencia de GTP- γ -S (un análogo no hidrolizable del GTP). La generación de vesículas COPII tiene lugar en los ERES libres de ribosomas donde se acumula el *cargo* biosintético para su inclusión en ITs. Estos dominios son capaces de acumular proteínas destinadas a la ruta secretora a través de interacciones específicas con componentes de la cubierta COPII (Aridor et al., 1998), lo cual a su vez provoca la acumulación del *cargo* en el lugar de producción de los ITs. Después de la formación de la gema o *bud* en la membrana del RE con cubierta COPII, ésta se transforma en una vesícula o

IT desprendiendo la cubierta inmediatamente después de su fisión. A continuación, se piensa que las vesículas COPII se fusionan entre sí originando agrupamientos túbulo-vesiculares (VTCs) (Bannykh et al., 1998). Se propone que la génesis de los VTCs es un proceso mucho más complejo que la mera generación y fusión de vesículas tipo COPII, ya que la formación de los mismos podría tener lugar alternativamente a través de protusiones en bloque de grandes porciones de RE seguida de una selección y concentración del *cargo* mediada a través de cubiertas COPI en ciertos dominios de membrana (Mironov et al., 2003).

Transporte retrógrado

Los ITs que median el transporte desde el AG al RE (transporte retrógrado) son de tipo COPI (Fig. 6A). Reciben este nombre porque para su formación se requiere del complejo proteico COPI o *coatamer protein I*, el cual está formado por 7 subunidades (α , β , β' , γ , σ , ϵ , ζ) (Kreis and Pepperkok, 1994). El modelo más aceptado propone que estas vesículas tienen como función acumular *cargo* y transportarlo mediante transporte retrógrado (Lippincott-Schwartz and Liu, 2006; Bethune et al., 2006) aunque también se ha descrito que podrían estar involucradas en el transporte bidireccional intra-Golgi (Orci et al., 2000). Para el correcto reclutamiento y ensamblaje de la cubierta COPI, así como para coordinar la secuencia de pasos que comportan la entrada del *cargo* en la gema y la posterior formación de la vesícula, se requiere la GTPasa Arf1 o *ADP ribosylation factor 1*, la cual tiene la capacidad de anclarse de forma estable a la membrana del AG debido a la presencia en su estructura del ácido mirístico (Balch et al., 1992). El mecanismo es el siguiente: Arf1 activado (Arf1-GTP) se une a la membrana del AG con el consecuente reclutamiento de los componentes de la cubierta COPI. A continuación, mediante la acción de una proteína GAP, tendrá lugar la hidrólisis del GTP, lo cual provoca la disociación de Arf de la membrana y su relocalización en el citoplasma. En este punto, Arf1-GDP queda secuestrada en el citoplasma por una proteína GDI. Finalmente una proteína GEF, reemplaza el GDP por GTP, para activar de nuevo la GTPasa. Arf1 induce el ensamblaje de COPI en la gema naciente y la acumulación del *cargo*, lo cual provoca cambios en la curvatura de membrana dando lugar a la formación de la gema. Los cambios de curvatura de la membrana del AG también se producen por modificaciones en la composición lipídica del entorno de la membrana donde se genera la gema, así el ácido fosfatídico y el diacilglicerol son capaces de alterar la forma de la membrana en la que se encuentran (Fernandez-Ulibarri et al., 2007; Ktistakis et al., 1996). Hay otras proteínas que

intervienen en la formación de la vesícula COPI como la familia de proteínas p23/p24 (Bremser et al., 1999). Las proteínas que modulan la acción de Arf1 son las ArfGAPs. Originariamente estas proteínas fueron descritas como activadores de la actividad GTPasa de Arf1 (Goldberg, 1999) encargadas de favorecer el desensamblaje de la cubierta COPI. También intervienen en procesos de selección del *cargo* durante su concentración dentro de las vesículas COPI (Yang et al., 2002), así como en la regulación de la actividad Arf1 en función de la curvatura de la membrana en el sitio de formación de la gema (Bigay et al., 2003). Es posible emplear agentes farmacológicos que alteran el estado de las GTPasas. Por ejemplo, la Brefeldina A (BfA) es un metabolito fúngico aislado de *Eupenicillium brefeldianum* que inhibe la actividad de las proteínas GEF de Arf1, dejando permanentemente a Arf1 en un estado inactivo (Arf1-GDP) de manera que no puede insertarse en la membrana del AG, y por lo tanto, no puede reclutarse el complejo COPI. Concretamente la BfA provoca una serie de tubulaciones originadas en la membrana del AG, las cuales se fusionan con las membranas del RE, lo que al final comporta su desaparición. Los efectos de la BfA son reversibles y su eliminación comporta el reensamblaje del AG.

El compartimento intermedio entre el RE y el AG (ERGIC) estaría constituido al menos por los VTCs, los cuales consisten en un sistema de endomembranas formado por túbulos y estructuras vesiculares derivadas de la fusión de vesículas COPII y que actúan como ITs entre el RE y el AG. Se postula que los VTCs contienen tanto *cargo* anterógrado como retrógrado que se desplazaría desde los ERES hasta el AG a través de MTs gracias a motores de la familia de las dineínas. Estos VTCs se fusionarían para dar lugar a la primera cisterna del *cis*-Golgi. La función de este compartimento de tránsito sería doble. Por un lado, los VTCs servirían como transbordadores para la gran cantidad de flujo secretor de *cargo* anterógrado, el cual viajaría hasta el AG. Paralelamente actuarían como “filtro” para evitar que proteínas residentes del RE que se han incluido accidentalmente en el flujo secretor lleguen masivamente al AG. Por esta razón, los VTCs tienen la capacidad de reclutar el coatómero y generar así vesículas de transporte retrógrado COPI que retornan las proteínas al RE.

A pesar de que el proceso de exportación del RE vía vesículas COPII es altamente selectivo, proteínas residentes del RE escapan frecuentemente de este orgánulo y alcanzan otros compartimentos de la ruta secretora. Existen mecanismos de seguridad que detectan estas proteínas para que una vez reconocidas sean devueltas o recicladas al RE. Así, la mayoría de proteínas solubles residentes del RE poseen la secuencia de aa KDEL en su extremo C-

terminal (Munro and Pelham, 1987). Esta secuencia es reconocida por el receptor de KDEL (KDELr), una proteína transmembrana residente en el AG y en ERGIC que cicla constantemente entre el RE y el CG (Lewis and Pelham, 1990). La unión del KDELr a una proteína que contenga la secuencia KDEL provoca el transporte retrógrado del complejo proteína/receptor vía vesículas tipo COPI. Una vez que el complejo receptor-proteína llega al RE, se disocia y el KDELr se relocaliza mayoritariamente en el *cis*-Golgi. Existen otros mecanismos para recuperar proteínas residentes del RE. Es el caso de muchas proteínas transmembrana residentes del RE que contienen una secuencia de dilisinas KKXX en su extremo C-terminal citoplasmático. Esta secuencia interacciona con componentes de la cubierta COPI y actúa como una señal de recuperación que estimula el transporte retrógrado de la proteína en el caso de que escape del RE y llegue a los VTCs o al AG (Nilsson et al., 1989). Cualquier deficiencia en el transporte entre el RE y el AG, se refleja en la redistribución del KDELr quedando retenido mayoritariamente en el RE o AG, en el caso de una alteración del transporte anterógrado o retrógrado, respectivamente.

El sistema COPI ha evolucionado como un mecanismo eficiente para recuperar proteínas que escapen del RE, sin embargo, no parece ser el único que genera un flujo retrógrado. Las primeras evidencias de la existencia de un mecanismo de transporte COPI-independiente surgieron de la identificación de una GTPasa localizada en el AG denominada Rab6 (Martinez et al., 1997). La sobreexpresión de Rab6 activada (Rab6-GTP) provoca un flujo retrógrado con fenotipo similar al producido por la BfA. La existencia de varias rutas de transporte retrógrado se confirmó gracias al estudio del transporte de distintas toxinas bacterianas, por ejemplo, la toxina de *Shigella* es transportada de forma COPI-independiente ya que al incubar las células con agentes que anulan la funcionalidad del sistema COPI no se altera la llegada de esta toxina al RE, y además se ha podido visualizar ITs conteniendo la toxina de *Shigella* colocalizando con Rab6. También se ha descrito como dominantes negativos de Rab6 (Rab6-GDP) retrasan significativamente el transporte de la toxina de *Shigella* y enzimas de glicosilación al RE (Girod et al., 1999). El mecanismo por el cual Rab6 promueve el transporte retrógrado no se conoce bien, aunque se han identificado diferentes proteínas que interaccionan con Rab6-GTP que podrían actuar como efectores para el funcionamiento de esta vía. Por un lado, se ha visto que Rab6 interacciona con una proteína de la familia de las quinesinas llamada rabquinesina (Echard et al., 1998). El dominio C-terminal de esta proteína reconoce específicamente Rab6-GTP y la sobreexpresión de mutantes dominantes negativos de la rabquinesina alteran el efecto sobre el tráfico de

membrana inducido por Rab6-GTP. Esto indica que Rab6 puede hacer uso de este motor de MTs para mover ITs en el mismo sentido de movimiento que la mayoría de las quinesinas del extremo (-) al extremo (+) de los MTs (Miki et al., 2005). Por otro lado, mediante estudios con sistemas de doble híbrido se aisló una proteína denominada Bicaudal-D que interacciona con Rab6 (Matanis *et al*, 2002). Tras su translocación a la membrana del AG, Bicaudal-D recluta el complejo motor dineína-dinactina, el cual se desplaza sobre MTs hacia su extremo (-).

Transporte intra-Golgi

Existen dos modelos que intentan explicar como tiene lugar el transporte intra-Golgi, es decir como el *cargo* procedente de los VTCs atraviesa o avanza a través de las cisternas del AG para ser modificado y exportado a su destino final (Fig. 8). Desde un punto de vista simplificado el modelo de “transporte vesicular” considera que las cisternas del AG son estructuras estables donde el flujo de membrana tiene lugar mediante vesículas tipo COPI que contienen el *cargo* anterógrado, el cual se desplaza lateralmente por los extremos de las cisternas o *lateral rims* hacia el *trans*-Golgi. Por el contrario, el modelo de “maduración de cisternas” considera que las cisternas del AG son estructuras dinámicas. La primera cisterna *cis*- se formaría por la fusión de los VTCs que proceden de ITs generados en el RE. Las cisternas madurarían en sentido *cis*- a *trans*-Golgi y proceso madurativo para cada cisterna acabaría cuando ésta al llegar al *trans*-Golgi/TGN desaparece en forma de vesículas y/o túbulos que originará los ITs que transportarán el *cargo* hasta su destino final. Al mismo tiempo que se pierde la membrana del AG en el *trans*-Golgi, ésta es continuamente renovada por la fusión de membrana de los ITs derivados del RE que construyen la parte *cis*-Golgi, manteniendo así la integridad de la estructura del AG. En este modelo, las vesículas tipo COPI que contienen el *cargo* retrógrado, lo dirigen desplazándose lateralmente hacia el *cis*-Golgi con la finalidad de mantener las enzimas residentes del AG en la cisterna apropiada preservando así su identidad y conservando la polaridad del mismo. Existen sólidas evidencias experimentales a favor de este modelo. Se sabe que el *cargo* que pasa a través del AG puede ser de un tamaño muy superior al de una vesícula de transporte anterógrado (Becker et al., 1995), otros estudios muestran como el procolágeno atraviesa el AG sin ser nunca visto en el interior de vesículas (Mironov et al., 2001). También se ha comprobado que las mutaciones que afectan a la función de COPI afectan sólo al transporte retrogrado en el AG y no el anterógrado (Gaynor and Emr, 1997). Recientemente se ha observado en *S.*

cerevisiae mediante microscopía confocal *in vivo* que tanto el *cargo* que atraviesa el AG (Losev et al., 2006) como las proteínas residentes de membrana en el AG (Matsuura-Tokita et al., 2006) presentan una dinámica que se adapta al modelo de maduración de cisternas.

También se ha descrito un modelo híbrido basado en el modelo de maduración de cisternas en el que las vesículas COPI mediarían transporte de *cargo* anterógrado y retrógrado (Pelham and Rothman, 2000; Orci et al., 1997; Orci et al., 2000). Por último, tras la observación de estructuras tubulares entre cisternas por TTEM se postula un nuevo modelo de conexiones entre cisternas, en el cual no participarían los ITs de tipo COPI y propone que el *cargo* y las enzimas residentes del AG se moverían de forma anterógrada y retrógrada, respectivamente, mediante túbulos que interconectarían las cisternas (Mironov et al., 1997; Trucco et al., 2004).

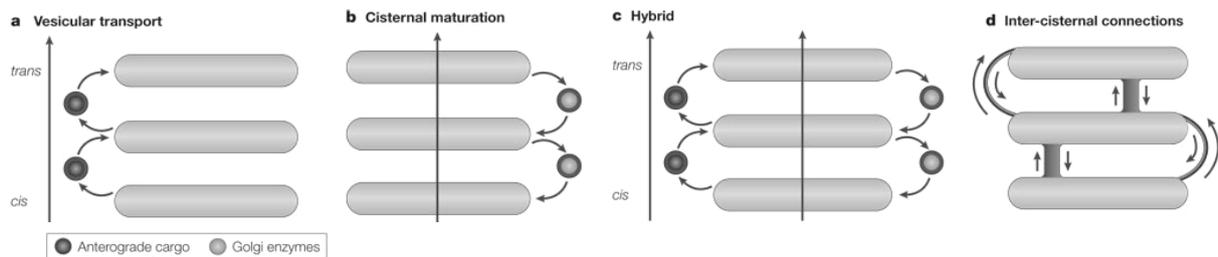


Fig. 8. Modelos de transporte intra-Golgi (Modificado de Rabouille and Klumperman, 2005).

Transporte post-Golgi

Una vez que el *cargo* alcanza el *trans*-Golgi entra en contacto con el TGN donde la mayoría de las proteínas y lípidos son incluidos en ITs que los transportan a su destino final (endosomas, lisosomas y membrana plasmática) (Fig. 6A). La mayor parte del flujo secretor está compuesto por proteínas y lípidos cuyo destino es la membrana plasmática. En células polarizadas se distingue entre transporte secretor hacia la membrana basolateral o hacia la membrana apical, los cuales son regulados por maquinarias moleculares distintas. Se ha visto que ambos mecanismos de transporte se mantienen diferenciados incluso en células no polarizadas (Yoshimori et al., 1996). Por ejemplo, la inhibición de la proteína kinasa D (PKD) localizada en el TGN, interrumpe el transporte basolateral, mientras que el *cargo* con destino apical llega a su destino con normalidad (Yeaman et al., 2004; Bossard et al., 2007). Existen varios mecanismos por los que la maquinaria celular de transporte puede discernir qué vía de salida debe seguir un determinado *cargo*. En el caso de las proteínas con “destino basolateral” la señal está localizada en el dominio citoplasmático de la proteína y consiste en secuencias de

aa del tipo YXX0 (donde Y es tirosina, X cualquier aa y 0 un aa hidrofóbico) o en secuencias de aa con motivos di-leucina DXXLL (donde D es el ácido aspártico y L es leucina). Estas señales son reconocidas por las proteínas de coatómero asociadas periféricamente a la cara citosólica de la membrana. YXX0 y DXXLL son reconocidos por AP1-AP4 y además en el caso de DXXLL por otra familia de adaptadores proteicos denominados GGAs (Bonifacino and Traub, 2003). En el caso de proteínas con “destino apical”, la salida es facilitada por dos mecanismos, bien por interacciones de tipo lípido-lípido y lípido-proteína dentro de dominios transmembrana o luminares, en las que participan los N- y O-glicanos (Potter et al., 2004) o bien por interacciones con el dominio de anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI), el cual está invariablemente asociado a las balsas lipídicas (Schuck and Simons, 2004). Muchas de las proteínas destinadas al dominio apical tendrían una afinidad mayor por este tipo de organización lipídica concentrándose en zonas ricas en esfingolípidos y colesterol ya presentes en el TGN, las cuales serían transportadas separadamente del *cargo* con destino basolateral (Keller et al., 2001). Las razones por la que estas proteínas se dirigen preferentemente en las balsas lipídicas son diversas. Algunas de estas proteínas están modificadas post-traduccionalmente de forma que incluyen cadenas lipídicas que actúan como “anclas” y dictan su localización. En otros casos se ha observado que los N-glicanos influyen decisivamente en el destino apical de una proteína ya que proteínas adaptadoras reclutan y retienen al *cargo* dentro de las balsas lipídicas (Ihrke et al., 2001). Por último, algunos dominios transmembrana tienen afinidad por las balsas lipídicas debido a su longitud y composición de aa (Munro, 1995). También se ha descrito que la oligomerización de proteínas de membrana es un determinante importante para el transporte apical de proteínas asociadas a las balsas lipídicas (Paladino et al., 2007). Así, el transporte apical puede ser dependiente o independiente a las balsas lipídicas. Una vez que el *cargo* ha sido seleccionado, este sale del TGN en ITs en un proceso en el que se postulan varias etapas y estructuras. En el caso del *cargo* con destino a la membrana plasmática, primero se retiene en dominios específicos de membrana del TGN formando una estructura túbulo-reticular que excluye proteínas residentes del AG y *cargo* con otro destino, a continuación estos dominios son separados progresivamente del resto de la membrana del TGN generando estructuras tubulares/saculares y por último, se produce la fisión de los ITs derivados de la membrana del TGN y su posterior transporte a la membrana plasmática vía estructuras vesiculares (Munro, 1995).

2.4. El citoesqueleto en la arquitectura y función del aparato de Golgi

Los microtúbulos

En células no polarizadas el AG aparece como una cinta o *ribbon* localizado alrededor del centrosoma (Rios and Bornens, 2003) (Fig. 7). Esta asociación entre el AG y el MTOC se pierde cuando el citoesqueleto de MTs se perturba mediante drogas como el nocodazol (NZ) o el paclitaxel o taxol (TX) obtenido del árbol del tejo *Taxus brevifolia*, las cuales provocan, respectivamente, la despolimerización o la estabilización/polimerización de extremos (-) de los MTs. Estos resultados indican que el principal factor que gobierna la integridad de la cinta del AG y su localización peri-centrosomal es la red de MTs (Thyberg and Moskalewski, 1999). El NZ o TX provocan la pérdida de la centralización de los dictiosomas o *staks* que forman la cinta del AG, los cuales aparecerían dispersos citoplasmáticamente asociados a los ERES. Estos dictiosomas tienen tamaño significativamente menor que los dictiosomas de la cinta del AG, de ahí su denominación de minidictiosomas o *ministacks*, los cuales mantienen el característico apilamiento de cisternas aplanadas. Los minidictiosomas son totalmente funcionales en cuanto al transporte o glicosilación de proteínas (Rogalski et al., 1984). Sin embargo, son insensibles a BfA. Mediante estudios de TTEM se ha visto como los MTs interactúan con la primera cisterna de los dictiosomas de la cinta del AG y además atraviesan el dictiosoma a través de las perforaciones de las cisternas (Marsh et al., 2001). Se sabe que la estructura del AG en la zona peri-centrosomal es estable, aunque constantemente se fisianan tubulaciones derivadas de las cisternas *cis*- y *mid*- de la cinta del AG que se mueven por los MTs hacia la periferia celular o hacia los ERES donde se fusionan (Mardones et al., 2006). Otro aspecto interesante es la interacción del AG con los denominados MTs estables, caracterizados por la presencia en su estructura de tubulina detirosinizada y/o acetilada. Estos MTs tienen una mayor vida media y son más resistentes al NZ (Schulze et al., 1987). Mediante crioinmuno-EM se ha observado una estrecha relación entre los MTs estables y los ITs en la región RE-AG (Mizuno and Singer, 1994). En células no polarizadas, los MTs se organizan de forma radial con su origen a nivel del centrosoma. Los MTs presentan polaridad en su estructura observándose los extremos (-) a nivel del MTOC y los (+) irradiando hacia la periferia celular en las células no polarizadas. El transporte anterógrado de membrana desde el RE al AG es dependiente de los MTs. Se sabe que el motor de MTs dineína, el cual se dirige al (-), es necesario para el movimiento de ITs desde los ERES al AG (Harada et al., 1998; Corthesy-Theulaz et al., 1992). Por el contrario, el movimiento de ITs desde el AG

hacia el ER está mediado por quinesinas que se dirigen hacia el extremo (+) (Stauber et al., 2006). No se conoce con certeza cómo los motores de MTs interaccionan con el *cargo* contenido en los ITs. En el caso de la dineína un posible candidato para la interacción entre esta y el IT sería el complejo multiproteico dinactina, el cual consiste en 11 subunidades de las cuales el filamento Arp1, p150(*Glued*) y p50 dinamitina son las mejor caracterizadas (Schroer, 2004). La actividad del complejo dineína/dinactina parece tener especial relevancia en el transporte retrógrado y en el mantenimiento de la cinta del AG en la zona pericentrosomal. Es interesante destacar que las GTPasas Cdc42 y Rab6 participarían en el reclutamiento de los motores de MTs dineína y el complejo dineína/dinactina, respectivamente, a la membrana del AG (Chen et al., 2005; Matanis et al., 2002). También se sabe que la huntingtina interacciona con la dineína facilitando el transporte asociado a MTs mediado por el complejo dineína/dinactina (Caviston et al., 2007). La perturbación de la actividad de dineínas o quinesinas provoca la pérdida de la integridad de la cinta del AG y la dispersión de sus dictiosomas.

Además del centrosoma en la actualidad se considera al propio AG como un MTOC (Luders and Stearns, 2007). Esta revolucionaria idea se basa en distintas observaciones experimentales en las que el AG polimeriza tubulina en ausencia de centrosomas (Malikov et al., 2005; Malikov et al., 2004) que son destruidos mediante una fuerte exposición a una radiación por láser (Efimov et al., 2007). La nucleación de MTs en el AG requiere de complejos proteicos que contengan γ -tubulina, hasta el momento se han descrito dos proteínas en el AG que interaccionan con la γ -tubulina, GMAP210 y AKAP450/CG-NAP la cual además interacciona con p150(*Glued*).

La diferenciación celular en los organismos pluricelulares generalmente provoca la pérdida de la organización radial de los MTs, como se observa en las células polarizadas de epitelio o bien en las fibras del músculo esquelético/estriado (Musch, 2004). En las células polarizadas del epitelio, los MTs forman haces paralelos con los extremos (-) en la superficie apical y los (+) en el dominio basal (Mogensen et al., 2000). En células del epitelio columnar como las células MDCK o Caco-2 también se observan haces de MTs perpendiculares a los MTs ápico-basales paralelos a la superficie apical o el dominio basal. En las células MDCK, el AG aparece fragmentado y se extiende desde la región peri-nuclear hacia la superficie apical. En éstas, el transporte secretor o tráfico de salida es dirigido bien hacia el dominio apical o bien hacia el basolateral. Se sabe que mientras los MTs participan en la exocitosis apical, los MFs

parecen estar implicados en la secreción basolateral (Rodríguez-Boulan et al., 2005). Las células del músculo estriado son células multinucleadas derivadas de la fusión de mioblastos monucleados. Durante este proceso, las proteínas peri-centriolares y los sitios de nucleación de MTs son redistribuidos desde la zona peri-centriolar a la periferia nuclear como se observa en los miotubos. Paralelamente, los dictiosomas del AG se dispersan asociándose con los múltiples centrosomas originados (Takahashi et al., 1999; Tassin et al., 1985). Al igual que en las células no polarizadas estos dictiosomas se encuentran localizados en la periferia de los ERES asociados a MTs estables (Lu et al., 2001; Percival and Froehner, 2007; Ralston et al., 1999; Ralston et al., 2001)

Los microfilamentos

Las primeras evidencias de la asociación entre el AG y los MFs se obtuvieron a partir de la perturbación del citoesqueleto de actina mediante toxinas de actina. A nivel de microscopía óptica se puede observar que tanto las toxinas que bloquean el ensamblaje o despolimerizan los MFs al igual que las que los estabilizan y/o promueven polimerización de actina, provocan la compactación de la cinta del AG (di Campli et al., 1999). Mientras que a nivel ultraestructural, se observa que la CyD provoca la dilatación de las cisternas del AG (Valderrama et al., 1998). La coexistencia en la membrana del AG de moléculas implicadas en la polimerización/regulación de la dinámica de actina como Cdc42, N-WASP, Arp2/3, sindapina y cortactina así como de moléculas implicadas en la formación y fisión de ITs, sugieren su acoplamiento al igual que ocurre en la membrana plasmática durante la endocitosis (Egea et al., 2006). En este sentido, la polimerización de actina y/o los MFs en si mismos, facilitarían la formación de los ITs en las cisternas del AG. Este fenómeno podría deberse a la generación de fuerzas producto de la polimerización de actina *de novo* acoplada a la actividad de las miosinas. A favor a esta idea, se ha localizado en la membrana del AG los nucleadores de actina Arp2/3 y Spir1 (Chen et al., 2004a; Kerkhoff, 2006; Matas et al., 2004; Carreno et al., 2004; Chen et al., 2004a; Duran et al., 2003; Kerkhoff et al., 2001; Matas et al., 2004; Musch et al., 1997). A nivel del TGN, hay evidencias experimentales de un acoplamiento funcional entre la fisión de la membrana mediada por dinamina y la actividad de Arp2/3. Una interferencia en la interacción dinamina-cortactina o dinamina-sindapina produce una alteración en el transporte post-Golgi (Carreno et al., 2004; Cao et al., 2005; Cao et al., 2005). También se ha descrito en el AG una asociación entre la polimerización de actina gobernada por Cdc42, la formación de ITs de tipo COPI y el reclutamiento del motor

de MTs dineína (Chen et al., 2005). La activación de Arf1 provoca el reclutamiento de Cdc42, actina y proteínas del coatómero COPI a la membrana del AG (Stamnes, 2002). En este sentido, Cdc42 interacciona con la subunidad γ -COP de los ITs de tipo COPI (Chen et al., 2005). Se sabe que la activación de Cdc42 inhibe el reclutamiento de la dineína hacia los ITs de tipo COPI. Dicho reclutamiento, por el contrario, es estimulado por una pérdida en la interacción Cdc42-COPI. Este fenómeno podría constituir un mecanismo de control por el que los ITs de tipo COPI no podrían desplazarse por los MTs vía dineínas hasta que el coatómero no estuviese completamente ensamblado, liberándose el IT de su interacción con Cdc42 (Hehnly and Stamnes, 2007). De acuerdo con esta idea, la activación de Cdc42 produce un bloqueo en el transporte retrógrado (Chen et al., 2005; Luna et al., 2002). Según estas evidencias, la regulación local de la dinámica de actina a nivel de la membrana de distintos compartimientos del AG para formar ITs podría ser una etapa precedente a su posterior fisión y subsecuente traslocación y movimiento a través de los MTs. Así, la interacción secuencial entre proteínas Cdc42-N-WASP-Arp2/3 y sindapina- o dinamina-cortactina-Arp2/3 está, respectivamente, restringida a las zonas *cis- mid*-Golgi o bien al TGN, participando por tanto en el transporte en la zona RE-AG/intra-Golgi o bien en el tráfico de salida post-Golgi.

Los MFs también estarían implicados en el transporte al dominio apical o basolateral en el que se han implicado Arp2/3, Cdc42, spir1, miosinas II y VI, cortactina, la proteína de interacción con huntingtina 1 (Hip1) y la propia huntingtina (del Toro et al., 2006; Poupon et al., 2008). En este sentido Hip1 se requiere para la interacción de las vesículas de clatrina con los MFs (Poupon et al., 2008). Mutantes de Cdc42 inducen un retraso en el transporte basolateral mientras por el contrario aceleran el apical (Kroschewski et al., 1999; Musch et al., 2001). La nucleación/polimerización de actina en la membrana del AG puede provocar la formación de las denominadas “cometas” de actina, las cuales consisten en F-actina asociada a determinadas ABPs (Welch and Mullins, 2002). Estas cometas se han descrito a nivel de vesículas derivadas de balsas lipídicas del TGN bajo ciertas condiciones experimentales (Rozelle et al., 2000). Su función probablemente es la propulsión/fisión de la gema a nivel de la membrana del TGN consecuente a la polimerización de actina. Sin embargo, su acción no comporta movimiento direccionado. En este sentido, los MTs y MFs proporcionarían a los ITs “carriles” por los que desplazarse de forma direccional. Análogamente a lo que ocurre en la membrana plasmática, la polimerización de actina mediada *a priori* por Arp2/3 a nivel de la

membrana del TGN, proporcionaría la fuerza necesaria para la fisión y posterior propulsión de los ITs (Merrifield et al., 2005; Perrais and Merrifield, 2005).

Las miosinas también podrían generar la fuerza requerida para la formación/fisión de ITs y su posterior desplazamiento sobre los MFs. La miosina II se ha implicado en el transporte retrógrado y post-Golgi (Duran et al., 2003; Musch et al., 1997). La unión de la tropomiosina a los MFs asociados al AG podría facilitar el reclutamiento de la miosina II y su interacción con los MFs (Percival et al., 2004). La miosina VI también se ha descrito en el AG (Buss et al., 2004; Warner et al., 2003b), la cual sería un buen candidato para proporcionar la fuerza y direccionalidad del movimiento de los ITs de acuerdo con el hipotético origen polimerizador de actina en el AG, con los extremos (+) de la F-actina situados en la membrana del AG (Chen et al., 2004a). La miosina VI junto con optineurina y Rab8 parecen participar en el tráfico post-Golgi. El complejo miosina VI-optineurina se requiere para el transporte basolateral mediado por el complejo de proteínas adaptadoras de clatrina AP1B, el cual a su vez es regulado por Rab8 (Ang et al., 2003; Au et al., 2007).

Los filamentos intermedios

A diferencia de los MTs y los MFs, los FIs no presentan polaridad en su estructura ni tienen la capacidad de unir nucleótidos. Clásicamente, los FIs se han considerado como el componente estable del citoesqueleto. Sin embargo, existen evidencias experimentales que demuestran que estos biopolímeros son altamente dinámicos y al igual que MTs y MFs disponen de proteínas asociadas (IFAPs) implicadas en la regulación de su dinámica (Godsel et al., 2007; Chou et al., 2007). El diámetro estimado de los FIs es de 8-12 nm, mientras que el de MTs es de 23-25 nm y el de los MFs de 6-8 nm. La composición de FIs varía en función del tipo de tejido. En las células epiteliales encontraremos citoqueratinas, mientras que en células de origen mesenquimal y musculares predomina la vimentina y desmina, respectivamente. En el tejido nervioso encontraremos neurofilamentos en neuronas y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en astrocitos. Por el contrario, las láminas nucleares de la cara interna de la membrana nuclear son ubicuamente expresadas. A nivel de microscopía óptica, la red de FIs presenta un fenotipo similar a la distribución radial de MTs pero sin un origen definido del tipo MTOC. Una de las primeras evidencias de la interacción FIs-AG fue descrita para la vimentina a nivel de TEM, la cual fue ratificada bioquímicamente *a posteriori* (Katsumoto et al., 1991; Gao and Sztul, 2001). Esta interacción está mediada por la proteína asociada al AG ciclodeaminasa

formiminotransferasa (FTCD), que está implicada en la conversión de histidina en ácido glutámico. La sobreexpresión de FTCD comporta la formación de fibras que contienen FCTD y que se proyectan desde el AG provocando su fragmentación. Por otro lado, en células epiteliales, la expresión de una citoqueratina mutada provoca la fragmentación del AG y altera el reensamblaje del AG tras el tratamiento con BfA o NZ (Kumemura et al., 2004). También se ha descrito como la vimentina interacciona con AP3 participando en el tráfico post-Golgi hacia endo-lisomas (Styers et al., 2004). En este sentido, enterocitos y hepatocitos deplecionados de queratinas por técnicas de RNA de interferencia presentan alteraciones en el transporte post-Golgi apical (Rodríguez et al., 1994; Salas et al., 1997). La maduración de glicosfingolípidos también parece estar alterada en células deficientes en vimentina a nivel del transporte post-Golgi entre el AG y la vía endosomal/lisosomal (Gillard et al., 1998; Gillard et al., 1994). Se sabe que la quinesina y la dineína participan en el control de la dinámica de los FIs (Helfand et al., 2003; Helfand et al., 2002; Prahlad et al., 1998). Probablemente, mediante este mecanismo la quinesina podría participar en el tráfico post-Golgi de glicosfingolípidos asociado a vimentina, lo cual podría aplicarse también a motores de actina. A favor de esta idea, se ha descrito la miosina Va como una proteína asociada a los neurofilamentos (Rao et al., 2002).

2.5. Regulación del pH en las vías de tráfico intracelular

El transporte de iones a través de la membrana plasmática y la membrana de los orgánulos es esencial para la supervivencia y proliferación celular. Desde los procariotas hasta los organismos multicelulares se han desarrollado una serie de mecanismos implicados en la homeostasis del pH tanto a nivel celular como en los compartimentos intracelulares. Así, algunos orgánulos consumen ATP para bombear protones (H^+) al su interior generando un pH ácido, el cual facilita la maduración y procesamiento de proteínas o bien la disociación y reciclado de materiales endocitados. Alteraciones en la homeostasis del pH de un compartimento (intra)celular como consecuencia de una patología, infección o mediada por la acción de un fármaco provocan cambios significativos en la función celular. Debido a que la mayoría de los enzimas son sensibles al pH, éste influye las reacciones bioquímicas que tienen lugar en la ruta endocítica y secretora.

El pH de los compartimentos intracelulares varía a lo largo de la ruta endocítica y secretora. Así, el pH se acidifica progresivamente en la vía endocítica desde las vesículas endocíticas y

endosomas tempranos hasta los endosomas tardíos y lisosomas o bien en la vía secretora desde el ER hasta la membrana plasmática o lisosomas. (Kim et al., 1998; Kneen et al., 1998; Demaurex et al., 1998; Llopis et al., 1998) (Fig 9A). Se conocen distintos elementos que participan en la regulación de la homeostasis del pH en los orgánulos: las protón-ATPasas (H^+ -ATPasas) vacuolares, los intercambiadores catiónicos (NHEs) y aniónicos (AEs), los canales iónicos, bombas y transportadores iónicos (Fig. 9B).

Las H^+ -ATPasas vacuolares constituyen un elemento esencial en la determinación del pH de los compartimentos intracelulares. Su función es la de bombear H^+ al lumen del compartimento con gasto de ATP. En cuanto a su estructura, las H^+ -ATPasas vacuolares en *S. cerevisiae* están compuestas por un dominio catalítico V_1 (subunidades A-H) y un dominio transmembrana V_0 (subunidades a, d, e, c, c', c'') conectados por un eje proteico central (subunidades D, F, d) y periférico (C, E, G, H, a) (Fig. 9C) (Jefferies and Forgac, 2007; Inoue et al., 2005; Dixon et al., 2003; Drory and Nelson, 2006b). La hidrólisis del ATP en el dominio V_1 promueve la rotación de un complejo rotatorio relativo a la parte estacionaria de la enzima, lo cual promueve la translocación del H^+ a través del dominio integral V_0 . En este sentido, la subunidad H de la parte estacionaria inhibe la hidrólisis del ATP asociada al dominio V_1 al unirse a la subunidad F del complejo rotatorio (Jefferies and Forgac, 2007). La actividad de la H^+ -ATPasa vacuolar se inhibe específicamente utilizando los macrólidos obtenidos de *Streptomyces sp.*, bafilomicina A1 (Baf) y concanamicina A (ConA) o bien por derivados del 2-(indol)pentadienamida (Farina et al., 2001; Dixon et al., 2008). Los cuales parecen ejercer su acción sobre las subunidades c y c' del dominio V_0 de la H^+ -ATPasa vacuolar (Fernandes et al., 2006; Pali et al., 2004; Whyteside et al., 2005).

Las H^+ -ATPasas vacuolares se encuentran en distintos orgánulos como el AG, endosomas, lisosomas, vesículas de secreción y vacuolas de *S. cerevisiae*, *Neurospora* y plantas así como en el acrosoma de las espermátidas (Kawa et al., 2000; Grunow et al., 1999; Kawasaki-Nishi et al., 2001; Gkantiragas et al., 2001). También se encuentran en la membrana plasmática de células especializadas facilitando procesos como la reabsorción ósea por parte de los osteoclastos (Toyomura et al., 2003), la secreción en células renales (Wagner et al., 2004), la homeostasis del pH en macrófagos y neutrófilos (Nanda et al., 1996) o la maduración y almacenaje de espermatozoides en el conducto deferente y epidídimo (Pietrement et al., 2006). Por otro lado, las H^+ -ATPasas vacuolares han sido implicadas en el proceso de invasión celular de células tumorales (Sennoune et al., 2004).

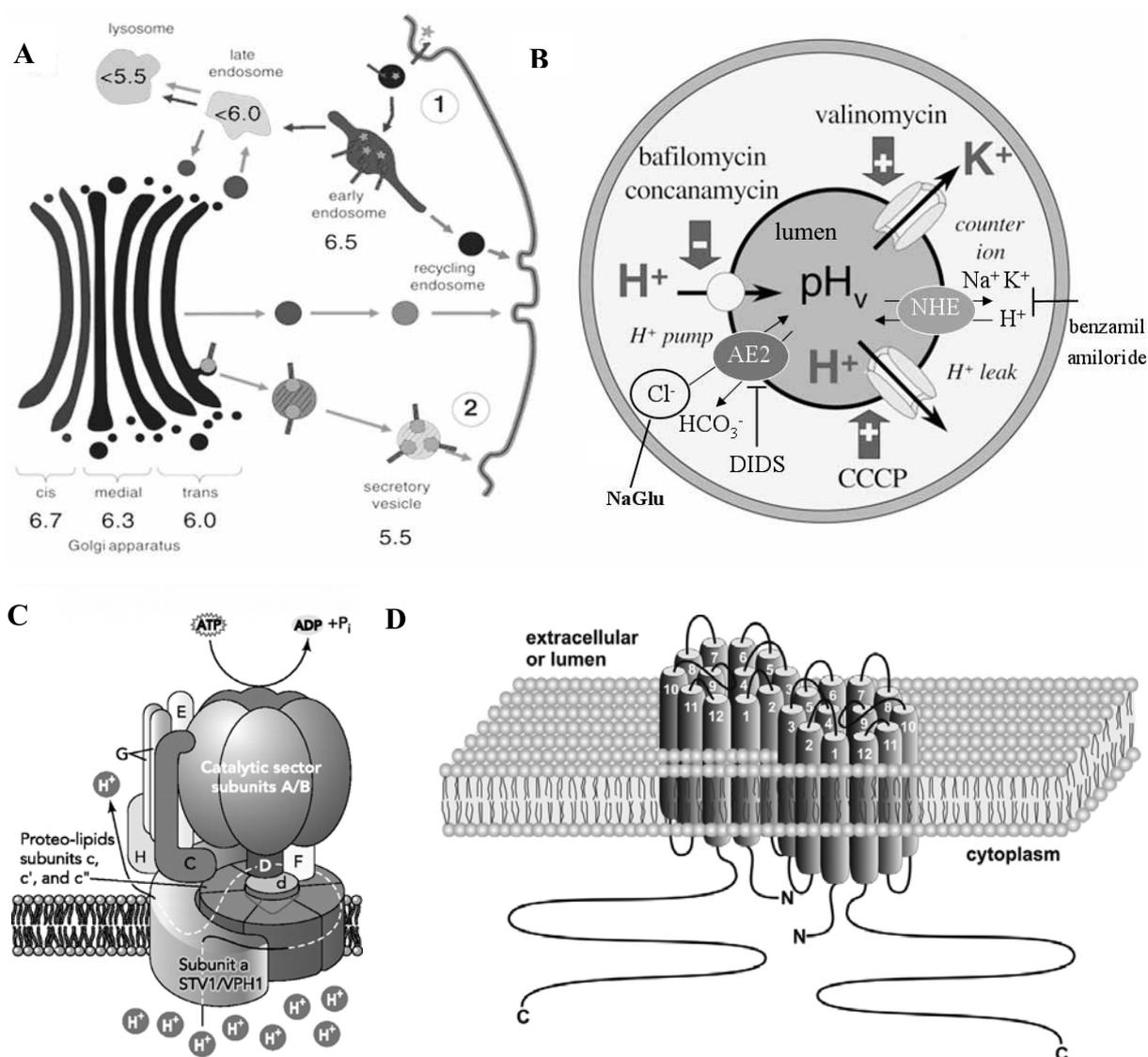


Fig. 9. A. pH en los orgánulos de la ruta secretora y endocítica (Modificado de Demareux, 2002). B. Regulación de la homeostasis del pH de un compartimentos celular (Modificado de Demareux, 2002). C. Modelo esquemático de la estructura de la H^+ -ATPasa vacuolar en *S. cerevisiae* (Modificado de Drory and Nelson, 2006b). D. Modelo hipotético de distribución de los NHEs en la membrana de un compartimento.

Respecto al mecanismo de acción de la H^+ -ATPasa en la regulación de la homeostasis del pH de un compartimento se postula un modelo de bombeo y salida o *pump and leak* de H^+ . De acuerdo con este modelo en estado estacionario los H^+ bombeados por la H^+ -ATPasa hacia el lumen del compartimento se equilibran por un flujo opuesto de salida mediado por canales de H^+ . Los canales de H^+ a diferencia de la H^+ -ATPasa vacuolar u otros intercambiadores iónicos promueven el flujo de H^+ sin gasto de ATP o acoplamiento a otros iones, siendo su actividad incrementada por la acción del protonóforo carbonilcianida m-clorofenilhidrazona (CCCP). Tanto el bombeo como la disipación de H^+ son electrogénicos de ahí que requieren

el movimiento asociado de iones en dirección opuesta o contraiones que compensen el gradiente electrogénico generado. Se ha postulado la conductancia de Cl^- mediante canales de Cl^- como un mecanismo para controlar el grado de acidificación de un compartimento. En este sentido, la depleción del Cl^- intracelular mediante gluconato sódico (NaGlu) o el cloruro amónico (NH_4Cl) provoca la disipación del pH ácido del AG (Llopis et al., 1998). Sin embargo, la generación de una conductancia artificial de K^+ mediante el ionóforo valinomicina no tiene efecto sobre el pH estacionario del AG (Schapiro and Grinstein, 2000; Demaurex et al., 1998). En términos generales, el bombeo de H^+ no está limitado por la conductancia o permeabilidad del compartimento a los contraiones, lo que sugiere que el potencial de membrana no es un determinante importante la homeostasis del pH en los compartimentos de la ruta secretora o endocítica. La variación del pH de los compartimentos de las rutas endocítica y secretora es indicativa de una posible regulación diferencial en cuanto al número y funcionalidad de los elementos implicados en el control del estado estacionario del pH de dichos compartimentos. En este sentido, su número o densidad en un compartimento se correlaciona con el pH del mismo. Así, la baja acidificación de los endodomas de reciclaje respecto a los endosomas tempranos (Gagescu et al., 2000) podría deberse a la ausencia o baja densidad de H^+ -ATPasas vacuolares funcionales en los mismos. Por otro lado, la permeabilidad a los H^+ es mucho mayor en los compartimentos con pH cercano al citoplasmático como el RE, debido probablemente a que presentan una mayor densidad de canales de H^+ respecto a compartimentos ácidos como los lisosomas. Por el contrario, esta permeabilidad se reduce paralelamente a un incremento en la densidad de H^+ -ATPasas vacuolares (Wu et al., 2001).

Los intercambiadores (antiporters) de Na^+/H^+ (NHEs) son proteínas integrales de las membranas. A diferencia de sus homólogos en bacteria, que operan como transportadores electrogénicos, en mamíferos catalizan el intercambio electroneutro de cationes alcalinos (Li^+ , Na^+ o K^+) por H^+ . La estructura de los NHEs consiste en doce segmentos transmembrana con los extremos N- y C-terminal orientados hacia el citoplasma (Slepkov et al., 2007; Orłowski and Grinstein, 2007) (Fig. 9D). En mamíferos se han descrito nueve isoformas de NHEs. NHE1-NHE5 se localizan básicamente en la membrana plasmática (Baumgartner et al., 2004) aunque las isoformas NHE3 y NHE5 se han localizado también en endosomas de reciclaje y vesículas de clatrina (Chow et al., 1999; Szaszi et al., 2002), asociándose NHE3 a balsas lipídicas (Murtazina et al., 2006; Li et al., 2001). Los NHE6-NHE9 se localizan en compartimentos intracelulares. Mientras NHE6, NHE7 y NHE9 se encuentran en

compartimentos endosomales, TGN y caveolas, NHE8 se ha localizado en el *mid-trans*-Golgi (Nakamura et al., 2005; Lin et al., 2007; Numata and Orłowski, 2001). La actividad de los NHEs se puede alterar mediante el uso de las sustancias sintéticas como el amiloride (Ami) y benzamil (Benz). Los NHEs de la membrana plasmática catalizan preferentemente el intercambio de Na^+ y Li^+ extracelular por H^+ . El NHE1 es esencial para el mantenimiento del pH citoplasmático (pH_C) y el control del volumen celular. NHE2 y NHE3 se localizan en la superficie apical de las células renales y células epiteliales gastrointestinales, jugando un papel importante en la (re)absorción de sales y bicarbonato. NHE3 es imprescindible para la homeostasis del pH en el lumen de endosomas y procesos de fusión en la endocitosis mediada por vesículas de clatrina (Gekle et al., 2002). Este intercambiador se requiere para la incorporación de albumina y su posterior liberación a los lisosomas en las células renales (Gekle et al., 1999). Los intercambiadores NHE6-NHE9, catalizan el intercambio de Na^+ , Li^+ y K^+ extracelular por H^+ . Se ha descrito como NHE7 interacciona con las proteínas de membrana intermediarias de secreción (SCAMPs) localizadas en el AG y asociadas al transporte post-Golgi (Castle and Castle, 2005). Mutantes dominantes negativos de SCAMP2 provocan la redistribución de los NHE7 del TGN a endosomas de reciclaje (Lin et al., 2005). Además SCAMP2 interacciona con Arf6 y la fosfolipasa D1 (PLD1) (Liu et al., 2005; D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006), lo que sugiere que probablemente participe en el reclutamiento de elementos de la maquinaria celular implicada en la formación y fusión de vesículas o ITs. Por su parte Arf6 y su GEF (ARNO) interaccionan con las subunidades c, a del dominio V_0 de la H^+ -ATPasa vacuolar en los endosomas tempranos (Hurtado-Lorenzo et al., 2006). Lo cual establece una asociación entre la maquinaria implicada en la regulación de la homeostasis del pH de compartimentos intracelulares y la formación de ITs.

Los AEs son proteínas transmembrana que contribuyen al intercambio electroneutro de aniones bicarbonato HCO_3^- por Cl^- . Están implicados en la regulación del volumen, pH y concentración de Cl^- (intra)celular. Los AEs se encuentran asociados normalmente a la membrana plasmática de forma similar a los NHEs como proteínas integrales atravesándola mediante 12-14 segmentos presentando los extremos N- y C-terminal orientados hacia el citoplasma. La familia de AEs incluye cuatro miembros AE1-AE4 con distinta distribución subcelular, así la isoforma AE1 o banda 3 se encuentra presente en la membrana plasmática mientras que la AE2 se ha localizado en el AG. La actividad de AE1 resulta esencial para el mantenimiento de la morfología y función del eritrocito, su inactivación provoca esferocitosis y anemia hemolítica severa (Southgate et al., 1996).

La perturbación del pH del AG (pH_G) provoca alteraciones morfo-funcionales en el mismo. Se sabe que tanto la Baf como la ConA inducen la dilatación de las cisternas del AG (Robinson et al., 2004). La neutralización del pH_G debida a la Baf provoca una alteración en la glicosilación de proteínas, probablemente por pérdida de la funcionalidad de las glicosiltransferasas o bien como consecuencia de un cambio en su localización celular. Así, se ha visto que la neutralización del AG comporta que las enzimas N-acetilgalactosaminil transferasa 2, β 1,2 N-acetilglucosaminil transferasa I y β 1,4 galactosiltransferasa I se relocalizan de la región *mid-trans*-Golgi a vesículas de tipo endosomal o bien a la membrana plasmática (Axelsson et al., 2001). La Baf induce una alteración en el “transporte retrógrado”, del flujo de membrana del AG hasta el RE inducido por la BfA (Palokangas et al., 1998). Por su parte, la ConA provoca alteraciones en el transporte intra- y post-Golgi y en la glicosilación de proteínas (Yilla et al., 1993).

2.6. Interacción entre elementos reguladores de la homeostasis iónica intracelular y el citoesqueleto de actina

La G/F-actina interacciona con las H^+ -ATPasas vacuolares a nivel de las subunidades B y C del dominio V_0 . En osteoclastos la interacción de la subunidad B1 con la actina es necesaria para el reclutamiento de la H^+ -ATPasa vacuolar a la zona de ondulaciones de membrana donde desempeña su función. Por su parte, la subunidad C promovería la estabilización de la F-actina (Chen et al., 2004b; Holliday et al., 2005; Zuo et al., 2006; Vitavska et al., 2005; Drory and Nelson, 2006a; Vitavska et al., 2003). En el caso de los NHEs se ha descrito una interacción de la isoformas NHE1 y NHE3 con elementos del complejo ERM, el cual está implicado en la interacción de los MFs con proteínas integrales de membrana y con la Rho GTPasa Rho y su efector ROCK, observándose una inhibición en la actividad de este intercambiador al perturbar la dinámica del citoesqueleto de actina con CyD y LtB (Kurashima et al., 1999; Alexander et al., 2005). Los intercambiadores NHE6, NHE7 y NHE9 interaccionan con el receptor de RACK1, el cual interacciona con Src y la proteína quinasa C (PKC), las cuales a su vez están implicadas en la polimerización de actina. La supresión de la actividad RACK1 provoca la alcalinización de pH de lumen en los endosomas (Ohgaki et al., 2007). En cuanto a la interacción de los AEs con los MFs, AE1 interacciona con el citoesqueleto de actina-espectrina a través de la anquirina (ver apartado 1.3.3).

3. CITOESQUELETO Y PATOLOGÍA

3.1. Enfermedades relacionadas con alteraciones del citoesqueleto

La perturbación de la estructura y dinámica del citoesqueleto es una característica común a multitud de enfermedades como consecuencia de alteraciones en las moléculas implicadas en la regulación, organización y dinámica de los MTs, MFs y FIs. El citoesqueleto determina las propiedades biofísicas y biomecánicas de las estructuras (intra)celulares, las cuales se ven severamente alteradas en enfermedades como el cáncer (Suresh, 2007). Respecto al cáncer en lo que se refiere al citoesqueleto de actina se sabe, por ejemplo, que alteraciones en la expresión de las tropomiosinas promueven la transformación celular (O'Neill et al., 2008). En el cáncer de mama se han descrito alteraciones en la regulación de Rho (Tang et al., 2008). También se han descrito en ciertas lesiones glioneuronales (incluyendo tumores como los gangliogliomas o las displasias corticales focales que predisponen al individuo a sufrir epilepsia) alteraciones en las vías de señalización mediadas por PI3K, incluyendo los elementos del complejo ERM (Schick et al., 2007). En cuanto a los MTs, existen ciertas quinasas como Aurora o Polo (Warner et al., 2006), implicadas en el control del huso mitótico o *mitotic checkpoint*. La pérdida de este control es típica de las células tumorales, las cuales presentan resistencia a los fármacos convencionales anti-MTs como los taxanos y alcaloides vinca (Sudakin and Yen, 2007; Wang et al., 2008). La sobreexpresión de la proteína centrosomal Aurora A está asociada al cáncer de ovarios (Landen, Jr. et al., 2007) mientras que la proteína de interacción con tau (γ -sinucleína) está implicada en fenómenos de invasión y metástasis (Ahmad et al., 2007). Por su parte los FIs se emplean como marcadores para establecer la histodiagnos y pronóstico de diversos tumores. El examen inmunohistoquímico de las metástasis consiste fundamentalmente en la búsqueda de la presencia de determinados isoformas de FIs de citoqueratina en las células tumorales, las cuales se interrelacionan con el grado de malignidad de un proceso tumoral. Por ejemplo, una baja expresión de las queratinas 8, 18 y 19 así como la expresión de vimentina ectópica, se asocian a un baja supervivencia en pacientes con cáncer de mama (Woelfle et al., 2004; Willipinski-Stapelfeldt et al., 2005).

En las enfermedades neurodegenerativas, al igual que en el cáncer, también se han descrito perturbaciones en la regulación del citoesqueleto de actina consecuencia de alteraciones de la actividad de las Rho GTPasas. (Linseman and Loucks, 2008). Así, en la esclerosis lateral amiotrófica juvenil la pérdida de la función de la proteína Alsin, que actúa como GEF de

Rab5 (Chandran et al., 2007), altera la macropinocitosis mediada por Rac1 (Kunita et al., 2007). Existen evidencias experimentales que asocian defectos en el transporte de las neuritas con estadios iniciales de procesos neurodegenerativos como el Alzheimer y la perturbación de la organización/dinámica del citoesqueleto de actina, provocada por alteraciones en la función de la familia de proteínas ADF/cofilina (Maloney and Bamburg, 2007). También se conoce que mutaciones en el gen de la proteína-ubiquitina E3 ligasa de interacción con MTs son típicas en la enfermedad de Parkinson (Quinlan et al., 2007). Por otro lado, en las enfermedades de Alzheimer, Creutzfeldt-Jacob, esclerosis lateral amiotrófica, degeneración corticobasal y la ataxia espinocerebelar de tipo 2, se observa la fragmentación del AG como consecuencia de la perturbación del citoesqueleto de MTs y motores asociados (Gonatas et al., 2006).

Además del cáncer y de las enfermedades neurodegenerativas existen numerosas enfermedades congénitas que presentan alteraciones del citoesqueleto. Se han descrito alteraciones en el citoesqueleto de FIs en distrofias musculares, cardiomiopatías, cataratas, síndromes dermatológicos y envejecimiento prematuro entre otras patologías (Szeverenyi et al., 2007). Bronquiectasias y esterilidad aparecen unidas en un grupo de enfermedades de los cilios que cursan con alteraciones en la dinámica del citoesqueleto de MTs. En el síndrome de los cilios inmóviles hay un enlentecimiento del transporte ciliar y una parálisis de los espermatozoides. Estas anomalías son consecuencia de una alteración en la función de la dineína microtubular de los axonemas. En el caso del síndrome de Kartagener, la esterilidad se debe a una malformación respecto a la disposición y número de MTs en el axonema (Carlen and Stenram, 2005). En la paraplejia espástica de tipo 10 se ha descrito la alteración de KIF5A, una quinesina específica de neuronas (Reid et al., 2002). En la distrofia muscular de Duchenne, que provoca una parálisis muscular progresiva, se observan alteraciones en el citoesqueleto de MFs que afectan a las bandas Z y producen pérdida de estriación en las fibras del músculo (Nowak et al., 2005). Diversas anomalías que afectan a la morfología de los eritrocitos se deben a una perturbación del citoesqueleto de actina, como es el caso de la esferocitosis y la anemia hemolítica severa. Éstas, son debidas a alteraciones de las proteínas que interactúan con la actina en el córtex (AE1 o dematina y aducina, respectivamente) (Li et al., 2007; Chen et al., 2007; Akel et al., 2007) (ver apartado 1.3.3). Por otra parte la mayoría de virus lesionan el citoesqueleto de las células infectadas. Así, la infección por rotavirus altera la organización de FIs de vimentina (Weclawicz et al., 1994), mientras que la expresión de la proteína-quinasa US3 del herpes virus de tipo 2 altera la expresión,

fosforilación y ubiquitinización de la citoqueratina 17 (Murata et al., 2002). Por último, ciertos factores externos pueden provocar alteraciones del citoesqueleto, como se observa en la cirrosis hepática y el síndrome alcohólico fetal (Martinez and Egea, 2007). Se sabe que el alcohol hace precipitar los IFs de los hepatocitos para formar los cuerpos de Mallory. También se han descrito alteraciones en los elementos del citoesqueleto y el en transporte intracelular debidas al consumo de alcohol (Azorin et al., 2004; Tomas et al., 2005)

3.2. Cuerpos de inclusión y agresomas

Una característica común a diversas enfermedades en las que tiene lugar la perturbación del citoesqueleto es la agregación de péptidos o proteínas como consecuencia de alteraciones en su ensamblaje, mutaciones o interacciones anómalas con otras proteínas. Estos agregados forman acúmulos citoplasmáticos proteícos generalmente libres de envuelta membranosa, denominados cuerpos intracelulares o cuerpos de inclusión (CIs), los cuales representan un signo histopatológico típico en la caracterización de la mayoría de enfermedades neurodegenerativas. En este sentido, en la enfermedad de Alzheimer podemos encontrar las placas seniles derivadas de la acumulación extracelular del precursor de la proteína β -amiloide (β -APP) así como los ovillos neurofibrilares derivados de la acumulaculación intracelular de la proteína tau implicada en la polimerización de MTs, la cual sufre una fosforilación irreversible, que impide su función normal a la vez que facilita su autoagregación en fibrillas (Avila and Hernandez, 2007; Selkoe, 1998; Goedert and Spillantini, 2006; Brandt et al., 2005). Los acúmulos de tau también se han descrito en otras enfermedades genericamente denominadas tautopatías, como la enfermedad de Pick, la parálisis supranuclear progresiva, la degeneración corticobasal y demencia frontotemporal-parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17) (Lee et al., 2001; Tsuboi, 2006). En la enfermedad de Parkinson tiene lugar la formación de los cuerpos de Lewy, derivados de la agregación de la proteína α -sinucleína, la cual interacciona con tau asociándose también con los MFs (Esposito et al., 2007). La agregación de α -sinucleína también se ha descrito en otras sinucleopatías como la atrofia sistémica múltiple y demencia con cuerpo de Lewy y distrofia neuroaxonal de Hallervorden–Spatz (Uversky, 2007). En la esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tiene lugar el ensamblaje anómalo y la agregación de FIs de tipo neurofilamentos (Boillee et al., 2006; Brownlees et al., 2002). En la enfermedad de Alexanders tiene lugar la agregación de GFAP en la denominadas fibras de Rosenthal (Quinlan et al., 2007). La enfermedad de Huntington y otras enfermedades

neurodegenerativas presentan agregaciones de proteínas con repeticiones de poliglutamina expandida.

Otros cuerpos de inclusión denominados genéricamente agresomas se originan por la confluencia en el centrosoma de las proteínas agregadas en CIs (Garcia-Mata et al., 2002; Kopito, 2000; Johnston et al., 1998). Los MTs y la dineína participan en el proceso, mientras que la red de FIs de tipo vimentina se reorganiza englobando la estructura del agresoma (Johnston et al., 2002). Además en los agresomas también se ha descrito el reclutamiento de las mitocondrias, elementos del proteasoma o bien de chaperonas (Garcia-Mata et al., 1999; Bauer and Richter-Landsberg, 2006; Muqit et al., 2006; Grenier et al., 2006). Histopatológicamente la mayoría de los agresomas están constituidos por proteínas integrantes o asociadas al citoesqueleto, así por ejemplo los cuerpos de Mallory presentes en hepatocitos se forman por la acumulación de FIs de tipo citoqueratinas (Bardag-Gorce et al., 2004; Zatloukal et al., 2007).

3.3. Agresomas de actina filamentosa: el cuerpo de Hirano

La actina filamentosa interacciona con proteínas características de la enfermedad de Alzheimer como la apolipoproteína E, β -APP, presenilina y tau (Santa-Maria et al., 2007; Maloney et al., 2005; Ostrowski et al., 2005). En secciones histopatológicas post-mortem de enfermos de Alzheimer se pueden encontrar agregaciones de F-actina en los denominados cuerpos de Hirano (CHs), los cuales continen actina, α -actinina, fractina, vinculina, ADF/cofilina, β -APP, tau y MAPs entre otras proteínas (Davis et al., 2008). En este sentido, los CHs representan una evidendia histopatológica típica de desordenes neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer así como de otras enfermedades como el alcoholismo crónico. En estas patologías, se ha observado también la presencia de acúmulos de actina-ADF/cofilina o *actin rods*. Se piensa que la agregación de éstos origina los CHs (Ostrowski et al., 2005; Laas and Hagel, 1994). Ultraestructuralmente los CHs y acúmulos de actina ADF/cofilin consisten en una red paracristalina de haces de actina filamentosa ordenandos paralelamente (Hirano, 1994; Hirano et al., 1968; Izumiyama et al., 1991; Minamide et al., 2000) (Fig. 10A). En ciertas miopatías también tiene lugar la agregación de F-actina (Schroder et al., 1990; Podlubnaia and Nowak, 2006). La significación biológica de la agregación de actina asociada a procesos patológicos se desconoce por el momento de ahí que se hayan intentado desarrollar una serie de modelos celulares destinados a la reproducción de

este tipo de agregados. En este sentido, la formación de acúmulos de actina-ADF/cofilina se induce bajo condiciones de estrés osmótico o por una elevada temperatura (Nishida et al., 1987) así como por la sobreexpresión de ADF/cofilina (Bernstein et al., 2006; Aizawa et al., 1997; Ono et al., 1996; Jang et al., 2005). Por otro lado, se ha desarrollado un modelo de formación de agresomas de F-actina mediante la sobreexpresión de una ABP de 34 kDa de *D. discoideum*, el cual mimetiza tanto las características ultraestructurales como la composición molecular de los CHs de enfermos de Alzheimer (Davis et al., 2008; Maselli et al., 2003; Maselli et al., 2002; Fechheimer et al., 2002) (Fig. 10B).

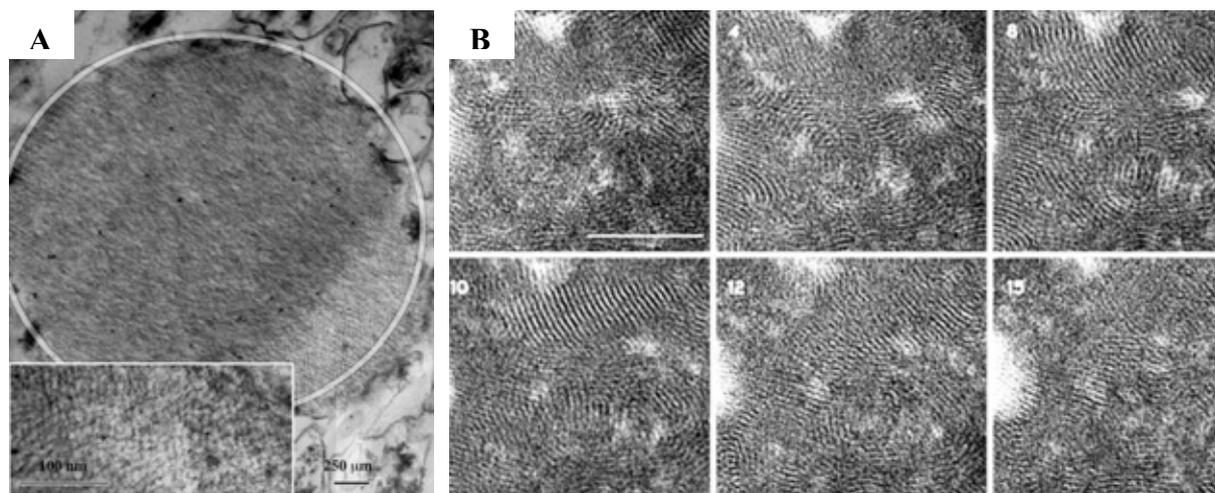


Fig. 10. A. Ultraestructura del cuerpo de Hirano en una sección histopatológica post-mortem de un enfermo de Alzheimer. B. Estructura paracrystalina del modelo de cuerpos de Hirano generado en astrocitos observada bajo distintos ángulos (Modificado de Davis et al., 2008).

4. PROTEÓLISIS INTRACELULAR

La proteólisis o degradación intracelular de proteínas la realizan básicamente las proteasas del sistema lisosomal en la autofagia o el sistema ubiquitina-proteasoma (SUP). La degradación intracelular de proteínas desempeña importantes funciones en la homeostasis proteica que incluyen tanto la modulación de los niveles intracelulares de proteínas específicas como la eliminación de proteínas aberrantes. Durante mucho tiempo los procesos de degradación de los biopolímeros han sido considerados más una curiosidad que unos mecanismos vitales en la homeostasis celular. Actualmente se sabe que en la degradación de determinadas proteínas se encuentra el punto de control de diversos procesos biológicos, algunos tan fundamentales como la progresión del ciclo celular (Reed, 2006). El proteoma celular se encuentra en estado dinámico de síntesis y degradación. Se sabe que las proteínas pertenecientes a membranas de compartimentos intracelulares así como a la membrana plásmatica suelen ser degradadas por autofagia mientras que las proteínas nucleares parecen ser degradadas tanto en el núcleo como en el citoplasma por el SUP (Bader et al., 2007). Aquellas proteínas citosólicas con un recambio elevado (con una vida media corta, generalmente entre 10 y 120 minutos) suelen ser degradadas en el citosol por alguno de los sistemas proteolíticos existentes, mientras que la mayoría de las proteínas de vida media larga (24-72 horas de media) son probablemente degradadas por autofagia. Las proteínas, lípidos y elementos exógenos también son degradados intracelularmente tras ser incorporados por endocitosis (Ciechanover, 2005a; Ciechanover, 2005b).

La proteólisis intracelular desempeña también otras funciones en la célula, entre ellas la eliminación de metioninas en los extremos N-terminal de las proteínas recién sintetizadas, la eliminación de las secuencias señal de péptidos después de su transporte a través de la membrana, la separación de proteínas virales que se traducen desde un RNA mensajero monocistrónico, la conversión de proteínas inactivas (proenzimas, zimógenos, pre-hormonas) en sus formas funcionales finales así como la degradación de ciclinas y otras proteínas requeridas para la progresión del ciclo celular. Alteraciones en la proteólisis se han implicado en la patogénesis de enfermedades humanas como los desordenes neurodegenerativos (Hegde and Upadhya, 2007; Levine and Kroemer, 2008)

Se han descrito distintas señales proteolíticas en las proteínas que las identifican como diana para su proteólisis. Por ejemplo, la presencia de metionina en el extremo N-terminal. Las

secuencias PEST (Pro-Glu/Asp-Ser-Thr), presentes en enzimas claves de metabolismo celular, son regiones típicas de proteínas de vida media corta flanqueadas por aa básicos (Rechsteiner and Rogers, 1996). Los motivos KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) son secuencias peptídicas que marcan proteínas citosólicas para la proteólisis lisosomal-autofágica mediada por chaperonas (Massey et al., 2006). Las ciclinas, proteínas relacionadas con el control del ciclo celular de eucariotas que son degradadas mediante un paso previo de “marcado” con un polipéptido llamado ubiquitina, poseen una secuencia señal o caja de destrucción (caja D) formada por los aa RAALGNISN (Arg-Ala-Ala-Leu-Gly-Asn-Ile-Ser-Asn) (Yu et al., 1996; Glotzer et al., 1991).

4.1. Sistema lisosomal y la autofagia

La célula utiliza los lisosomas para degradar biomoléculas complejas. El sistema lisosomal está constituido principalmente por los lisosomas, orgánulos celulares que contienen una gran variedad de enzimas hidrolíticas, incluyendo lipasas, glicosidasas, proteasas y nucleasas capaces de degradar inespecíficamente distintas macromoléculas de la célula siendo las más abundantes unas cisteína proteasas incluidas dentro del grupo de las catépsinas (Zavavnik-Bergant and Turk, 2007). Las proteasas lisosomales pertenecen a dos tipos generales: endoproteasas y exopeptidasas (tanto carboxi- como amino-peptidasas) que en conjunto hidrolizan las proteínas en pequeños péptidos. El uso de sustancias inhibitoras de estas enzimas como la pepstatina A (un inhibidor de la actividad de aspartato proteinasas) altera la función lisosomal. Una característica de los lisosomas es el pH ácido de su lumen, el cual es necesario para la óptima funcionalidad de las enzimas lisosomales (Sun-Wada et al., 2003). En este sentido el uso de sustancias que provoquen una alteración en la regulación de la homeostasis del pH como la Baf o la ConA también pueden interferir en la actividad lisosomal.

La autofagia es un proceso catabólico altamente conservado en eucariotas esencial para la supervivencia, diferenciación y homeostasis celular y destinado a la digestión intracelular tanto de orgánulos enteros (macroautofagia) como a la degradación de macromoléculas (microautofagia). En el caso de que los materiales digeridos sean de procedencia extracelular el proceso se denomina heterofagia. La autofagia juega un papel esencial en la adaptación al ayuno y a las condiciones ambientales cambiantes, en la remodelación celular durante el desarrollo y eliminación de orgánulos alterados hipergeneradores de especies reactivas de

oxígeno (ROS) en células envejecidas (Scherz-Shouval and Elazar, 2007). Se sabe que la autofagia puede ser estimulada fisiológicamente mediante la privación de aa (Munafò and Colombo, 2001) o bien farmacológicamente mediante el uso de agentes como la rapamicina (Hartford and Ratain, 2007).

El sistema endosomal-lisosomal es altamente dinámico y heterogéneo en cuanto al tipo de compartimentos intracelulares que lo integran, incluyendo orgánulos libres de hidrolasas como los endosomas tempranos y cuerpos residuales como productos finales de la heterofagia y autofagia (Fig. 11A). En el caso de la heterofagia, la fusión de heterofagosomas o macropinosomas con los endosomas provoca la formación de cuerpos multivesiculares. La maduración autofágica comienza con los fagóforos (Fass et al., 2006) o sacos membranares en torno al orgánulo o material destinado a ser autofagocitado por macroautofagia, los cuales una vez ensamblados forman los autofagosomas tempranos (de doble bicapa lipídica). La fusión de endosomas intermedios/tardíos y autofagosomas origina autofagosomas intermediarios que tras la fusión lisosomal constituyen los autofagolisosomas o autolisosomas (con una sola membrana) (Fig. 11B). Una vez hidrolizado el material encerrado en las vacuolas autofágicas, las moléculas utilizables pasan a formar parte de las rutas metabólicas y lo que no es necesario puede a veces ser desechado por exocitosis, aunque otras veces se acumula en cuerpos residuales.

La autofagia mediada por chaperonas es responsable de la degradación de aproximadamente un 30% de las proteínas citosólicas en condiciones de ayuno. Las chaperonas están implicadas en el plegamiento de las proteínas modificando su estructura tridimensional para facilitar su translocación a través de la membrana lisosomal (Dice, 2007). La unión de las proteínas destinadas a ser degradadas a receptores de la membrana lisosomal constituye la etapa limitante en la autofagia mediada por chaperonas (Kaushik et al., 2007). Por otro lado, la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE provoca una situación de estrés que activa principalmente la autofagia mediada por chaperonas (Yorimitsu and Klionsky, 2007). Se sabe que las chaperonas se activan mediante agentes como el derivado de la geldanamicina, 17-DMAG (Chiosis et al., 2006; Herbst and Wanker, 2007).

El citoesqueleto participa en la correcta función de la macroautofagia. La dineína (Rubinsztein et al., 2005) y los MTs participan en el proceso de fusión de los autofagosomas

con los lisosomas (Webb et al., 2004), los autofagosomas pero no los fagóforos se mueven sobre los MTs en su proceso de maduración (Fass et al., 2006).

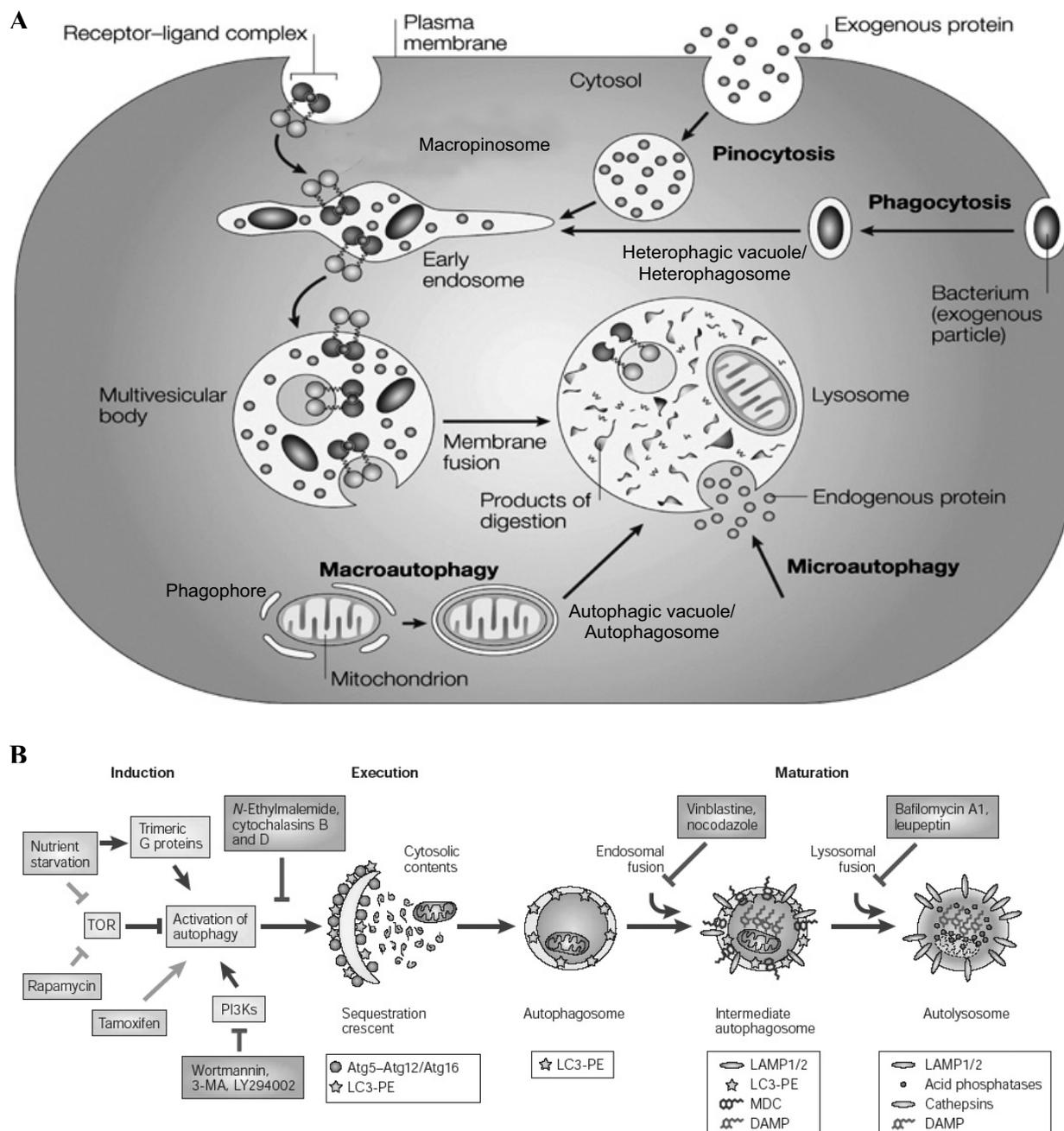


Fig. 11. A. Proteólisis celular mediante la vía lisosomal de elementos internalizados por endocitosis de tipo fagocitosis o pinocitosis, en la que participan endosomas tempranos, vacuolas heterofágicas, cuerpos multivesiculares y macropinosomas. La macroautofagia por su parte corre a cargo de vacuolas autofágicas derivadas del ensamblaje de los fagóforos. Finalmente, el contenido de los heterofagosomas y autofagosomas será digerido en los lisosomas (Modificado de Ciechanover, 2005b). B. En la vía autofágica se distinguen las etapas de inducción, ejecución y maduración de autofagosomas a autolisosomas, indicando también los eventos de activación o inhibición que la inducen. 3-MA, 3-metiladenina; DAMP, N-(3-[2,4-dinitrofenil]-amino) propil-1-N-(3-aminopropil-metilamina) dihidroclorido; LAMP, proteína asociada a la membrana lisosomal; LC3, cadena ligera 3 de proteína asociada a MTs; MDC, monodansilcaderiverina; PE, fosfatidiletanolamina; TOR, diana de la rapamicina (Modificado de Kirkegaard et al., 2004).

Por su parte, en *S. cerevisiae* se ha descrito como el citoesqueleto de actina participaría en el mecanismo de ensamble del fagóforo para conformar el autofagosoma. También se ha descrito como la formación de CIs de citoqueratina estaría asociada a una inhibición de la función proteasomal, la cual se reactivaría paralelamente a la desaparición de estos CIs mediada por la macroautofagia (Harada et al., 2003).

4.2. Sistema ubiquitina-proteasoma

La degradación intracelular específica de proteínas se realiza mediante un complejo multienzimático denominado proteasoma. Las proteínas que van a ser degradadas por el proteasoma suelen “marcarse” anteriormente con una pequeña proteína llamada ubiquitina. La ubiquitina es un polipéptido de 76 aa que se une a las proteínas mediante un enlace isopeptídico con un residuo de lisina determinado. La unión de la ubiquitina al sustrato requiere de una serie de pasos catalizados por tres enzimas: primero se produce la activación de la ubiquitina por la enzima E1, seguidamente una enzima E2 (proteína transportadora de ubiquitina) se encarga de transferir la ubiquitina activada desde E1 hasta el sustrato que, generalmente, está ligado a una enzima E3 (ubiquitina-proteína ligasa). Las proteínas que van a ser degradadas pueden encontrarse monoubiquitinadas, pero es muchísimo más frecuente que estén poliubiquitinadas (Ciechanover, 2005b).

De manera simplificada, el proteasoma 26S es un complejo multicatalítico constituido por la partícula catalítica 20S y por dos partículas reguladoras 19S. La partícula 20S es una estructura cilíndrica compuesta por veintiocho subunidades de bajo peso molecular ensambladas en cuatro anillos apilados formando un cilindro hueco; se trata del cuerpo catalítico del complejo. Se sabe que la partícula 20S es capaz de degradar proteínas de forma ATP- y ubiquitina-dependiente (Donohue, Jr. et al., 2007; Asher et al., 2006). Las partículas 19S contienen cada una seis ATPasas diferentes y uno o más sitios de unión para las cadenas de ubiquitina. Estas partículas se sitúan en los extremos del complejo y se piensa que son las responsables de cambiar la conformación de las proteínas y dirigir las al interior del proteasoma. Se conocen una gran variedad de sustratos del proteasoma 26S, relacionados con muy diversos procesos celulares: proliferación y diferenciación celular, regulación metabólica, control del ciclo celular, respuesta al estrés y eliminación de proteínas anormales (Pickart and Cohen, 2004). Todos estos sustratos, con muy pocas excepciones que incluyen a

la ornitina descarboxilasa (ODC) como ejemplo paradigmático, tienen en común que necesitan ser ubiquitinados antes de ser degradados en el proteasoma. La ornitina descarboxilasa es la enzima limitante en la síntesis de las poliaminas (cationes orgánicos esenciales para la viabilidad celular). Cuando las concentraciones intracelulares de las poliaminas exceden el “umbral permitido”, se activa la traducción del antizima que se une a la ornitina descarboxilasa de manera que queda expuesta la secuencia PEST presente en el extremo carboxilo de la ODC, siendo, entonces, reconocida por el “túnel de degradación” (Garcia-Alai et al., 2006). La actividad del proteasoma puede ser inhibida mediante el uso de diversos agentes farmacológicos. El MG132 actúa como inhibidor de la actividad tipo quimiotripsina del proteasoma aunque también puede inhibir a los lisosomas y a las calpaínas. La lactacistina, por su parte, inhibe de forma irreversible y mucho más específicamente el SUP a nivel de la partícula catalítica 20S (Lee and Goldberg, 1998).

El proteasoma actúa a nivel del citosol pero también en el núcleo y puede además encontrarse secuestrado en agrosomas o interaccionando con elementos del citoesqueleto (Wojcik and DeMartino, 2003), especialmente con los FIs (Olink-Coux et al., 1994) y los MFs (Arcangeletti et al., 1997). La inhibición del proteasoma experimentalmente se ha asociado con la reorganización de elementos del citoesqueleto no ubiquitinados como los MFs y MTs así como con la acumulación perinuclear de vimentina (Csizmadia et al., 2007). La actividad del SUP se requiere para la correcta dinámica del citoesqueleto de MTs. En este sentido, la alteración del SUP supone la acumulación de proteínas centrosomales y la perturbación de la formación del áster de MTs (Didier et al., 2007). Se sabe también que la partícula reguladora del SUP (COP9 signalosoma) estabiliza la proteína de unión a MTs EB1 implicada en el control del crecimiento y dinámica de los MTs (Peth et al., 2007).

4.3. Las calpaínas

Las calpaínas son una familia de cisteína proteasas dependientes de Ca^{2+} relacionadas con el procesamiento de numerosas enzimas y proteínas del citoesqueleto. El control de la actividad de estas proteasas está determinado por las concentraciones de Ca^{2+} y por la presencia de su inhibidor natural endógeno calpastatina (Carragher, 2006). La calpaína es una molécula heterodimérica de unos 80 kDa. El monómero mayor de 50 kDa contiene el dominio catalítico que produce la proteólisis y su estructura es variable según la calpaína, mientras que el

monómero de unos 30 kDa es la subunidad reguladora conservada en todas las calpaínas. Se sabe que las calpaínas intervienen en diversos aspectos de la fisiología celular como la proliferación o la migración (Hood et al., 2006). En este sentido, participan en fenómenos de reorganización del citoesqueleto de actina a nivel de ciertas estructuras como los contactos focales y en el sarcómero de las células musculares (Lebart and Benyamin, 2006). Alteraciones en la expresión de calpaínas se asocian con perturbaciones en la formación de estructuras vesiculares/burbuja o *blebbing* en la superficie de membrana, observándose alteraciones en la expresión de RhoGDI-1, ADF/cofilina y tropomisina (Larsen et al., 2007). Además, la proteólisis de la cortactina mediada por las calpaínas parece participar en la regulación de las protrusiones de la membrana plasmática durante la migración celular (Perrin et al., 2006). Las calpaínas, al igual que las catepsinas y el proteasoma, podrían estar implicadas en mecanismos de muerte celular mediados por apoptosis independiente de caspasas (Moffitt et al., 2007).

4.3. Proteólisis intracelular y patología

En términos generales, el funcionamiento anómalo de los mecanismos de supervivencia celular conduce inexorablemente a la toxicidad celular y, a menudo, a la muerte celular debido a la acumulación de componentes aberrantes en la célula (Ventruti and Cuervo, 2007). Se postula que el SUP es crítico para reducir los niveles de proteínas aberrantes solubles, mientras que la autofagia participaría en la eliminación de los agregados de proteínas anómalas o agresomas que son típicos de las enfermedades neurodegenerativas. Las chaperonas por su parte facilitarían el reensamblaje de proteínas mal plegadas previniendo su agregación (Meriin and Sherman, 2005).

La autofagia, que participa tanto en mecanismos de supervivencia como de muerte celular (Bergmann, 2007) jugaría un papel fundamental en la protección de los organismos frente a diversas patologías incluyendo infecciones, cáncer, neurodegeneración, envejecimiento, desordenes neuromusculares y enfermedades cardiovasculares (Levine and Kroemer, 2008; Nishino, 2006). Se han descrito alteraciones en la autofagia en pacientes de Alzheimer y Parkinson (Shacka et al., 2008) y también una proteólisis defetiva mediada por sistema SUP que podría causar una disfunción de la sinapsis en enfermos de Alzheimer (Upadhyya and Hegde, 2007). La autofagia y el SUP están implicados en la degradación de la α -sinucleína,

que se encuentra agregada formando los cuerpos de Lewy en los enfermos de Parkinson (Levine and Kroemer, 2008). En este sentido, el gen parquin, que codifica para una ubiquitina-proteína ligasa E3 de interacción con MTs, es uno de los genes mutados en la enfermedad de Parkinson (Feng, 2006; Buneeva and Medvedev, 2006). En la enfermedad de Huntington se ha asociado la agregación de huntingtina a una alteración en la función del SUP (Ortega et al., 2007), implicándose a la autofagia en su degradación (Ravikumar and Rubinsztein, 2006). Se sabe que la activación de la autofagia y/o de las chaperonas compromete la agregación de la proteína mielínica periférica 22 que tiene lugar en ciertas neuropatías (Fortun et al., 2007). Por otro lado, existen gran cantidad de oncoproteínas susceptibles de ser degradadas por el proteasoma como N-myc, c-Myc, c-Fox, c-Jun y Src, que sino son degradados correctamente pueden inducir transformación celular (Ciechanover and Schwartz, 2004). En la diabetes tiene lugar la agregación de proteínas ubiquitinadas en las células β -pancreáticas, pero es la autofagia y no el proteasoma quien provoca su degradación (Kaniuk et al., 2007). Se sabe que el fármaco anti-tumoral imatinib induce autofagia promoviendo apoptosis (Ertmer et al., 2007). La actividad del SUP ha sido implicada en el proceso de degradación de las agregaciones de GFAP en la enfermedad de Alexanders (Mignot et al., 2007). La alteración de la actividad de la proteína malina, que actúa como ubiquitina-proteína ligasa E3 promoviendo la poliubiquitinación de la proteína laforina, provoca la agregación de las proteínas laforina y malina en la enfermedad de Lafora (Mittal et al., 2007). Por otro lado, se postula una interacción entre la α -sinucleína, la espinofilina 1 y el complejo regulador 19S que afectaría la función del proteasoma (Marx et al., 2007; Mittal et al., 2007). También se han descrito alteraciones en el SUP en procesos tumorales como el carcinoma en las células renales (Corn, 2007). Por último, existen evidencias experimentales según las cuales la activación de las calpaínas podría promover macroautofagia (Hoyer-Hansen et al., 2007). Se conoce también que las calpaínas son requeridas en la progresión tumoral, participando en la metástasis y en la angiogénesis (Demarchi and Schneider, 2007).

