

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CEL·LULAR I ANATOMIA PATOLÒGICA
FACULTAT DE MEDICINA**



**DINÁMICA DE LA ACTINA Y TRÁFICO DE MEMBRANAS ASOCIADO AL
COMPLEJO DE GOLGI: PAPEL REGULADOR DE RHOA, RAC1 Y CDC42**

**Tesis presentada por Olga B. Matas Guadix y
dirigida por el Dr. Gustavo Egea Guri
para optar al grado de Doctora en Bioquímica**

Barcelona, Mayo del 2005

II. INTRODUCCIÓN

1.-EL CITOESQUELETO DE ACTINA

1.1.-LA MOLÉCULA DE ACTINA

La actina es una proteína globular de 43 KD (fig. 1A). Es el componente principal del citoesqueleto de actina y la proteína más abundante en la mayoría de los tipos celulares. Su secuencia aminoacídica está muy conservada a lo largo de la evolución. En vertebrados existen seis isoformas cada una codificada por un gen diferente pero todavía se desconocen sus implicaciones biológicas (Yao et al., 1995). Las distintas isoformas son específicas de tejido, así las células del tejido muscular liso presentan las isoformas α y γ mientras que las células no musculares presentan mayoritariamente las isoformas β y γ (Vanderkerckhore y Weber 1984; Kovilur et al., 1993; Fagotti et al., 1998).

La actina puede existir en forma monomérica (G-actina del inglés *globular actin*) o bien, las diferentes subunidades se pueden ensamblar dando lugar a la formación de actina filamentosa también conocida como actina-F que cuenta con unas propiedades bioquímicas y biofísicas particulares. La transición de un estado a otro le confiere una gran flexibilidad y le permite participar de manera determinante en una gran cantidad de procesos celulares. Por esta razón, la célula ha de regular la actina que tiene disponible así como el estado (actina globular o actina-F) en que se encuentra. Para ello, además de las propiedades de la molécula de actina y de los filamentos que conforma, cuenta con la colaboración de las proteínas que se unen a la actina o ABPs (del inglés *actin-binding proteins*).

La célula ha de regular no sólo el proceso de polimerización para formar los filamentos de actina, sino también la organización final de esos filamentos para constituir unas estructuras u otras. Esta es la función de las proteínas de la familia de las Rho GTPasas. La actividad de estas proteínas está generalmente condicionada por los estímulos que recibe la célula de su entorno. Varias vías de señalización se encargan de remodelar de distinta manera la organización de la actina.

La célula cuenta también con proteínas motoras, las miosinas, que se desplazan a lo largo de los filamentos de actina. Existen diversos grupos y sus funciones son muy variadas. Cabe destacar su papel en el movimiento de orgánulos y membranas (revisado en Schliwa y Woehlke 2003; de Pina y Langford, 1999; Vale, 2003).

1.2.-PROCESO DE POLIMERIZACIÓN DE ACTINA

Los filamentos de actina, también conocidos como microfilamentos, son una estructura muy dinámica. Miden 8 nm de ancho y están formados por la unión no covalente de subunidades de G-actina dispuestas en una hélice de dos monómeros por vuelta. Cuando las cadenas pesadas de la miosina se unen al filamento, crean un patrón que recuerda a una punta de flecha (fig. 1C). En base a esto, se puede diferenciar en el filamento el extremo “+” ó cola de la flecha (*barbed end*) del extremo “-” o punta de la flecha (*pointed end*). Esta estructura polarizada de los filamentos aporta una vía a lo largo de la cual las miosinas pueden generar fuerza en la dirección adecuada (del extremo “-” al “+”).

Los monómeros de actina presentan una hendidura hacia el centro de la molécula a la que se une ATP o ADP (fig. 1 A). Asimismo, la molécula de actina puede hidrolizar el ATP o intercambiar el ADP por el ATP. La conformación de la molécula difiere según esté unida a uno u otro nucleótido. Cuando la G-actina está unida a ATP es cuando se favorece su incorporación al filamento (Drenckhahn y Pollard, 1986; Engel et al., 1977). Los monómeros unidos a ATP se incorporan en el extremo “+” del filamento, mientras que en el extremo opuesto o extremo “-”, los monómeros hidrolizan el ATP a ADP+Pi (fig. 1 B), este último es dissociado pero el ADP es retenido en el monómero de actina que como consecuencia sufre un cambio de conformación y es eliminado del filamento. Una vez libre puede intercambiar ADP por ATP cuya concentración es mas alta en el citoplasma celular y volver a unirse al extremo “+”.

Las células en condiciones fisiológicas mantienen relativamente constante el tamaño de los filamentos de actina mediante un proceso cíclico de intercambio (*treadmilling*) de monómeros de actina (Wegner, 1982; Nakajima et al., 1997). En estas condiciones fisiológicas la célula tiene una concentración estándar de actina (Cs), que permite la adición de monómeros de actina en el extremo “+” y la eliminación en el extremo “-”, por lo que no se produce polimerización neta ya que ambos fenómenos quedan compensados (fig. 1 D). Para que se produzca la polimerización neta ha de existir una concentración de actina superior a la concentración crítica o mínima (CC). Como la CC del extremo positivo es menor que la CC del extremo negativo, la adición de monómeros de ATP-actina ocurre mayoritariamente por el extremo “+” y la despolimerización por el extremo “-” (Carlier y Pantaloni, 1997; Cooper y

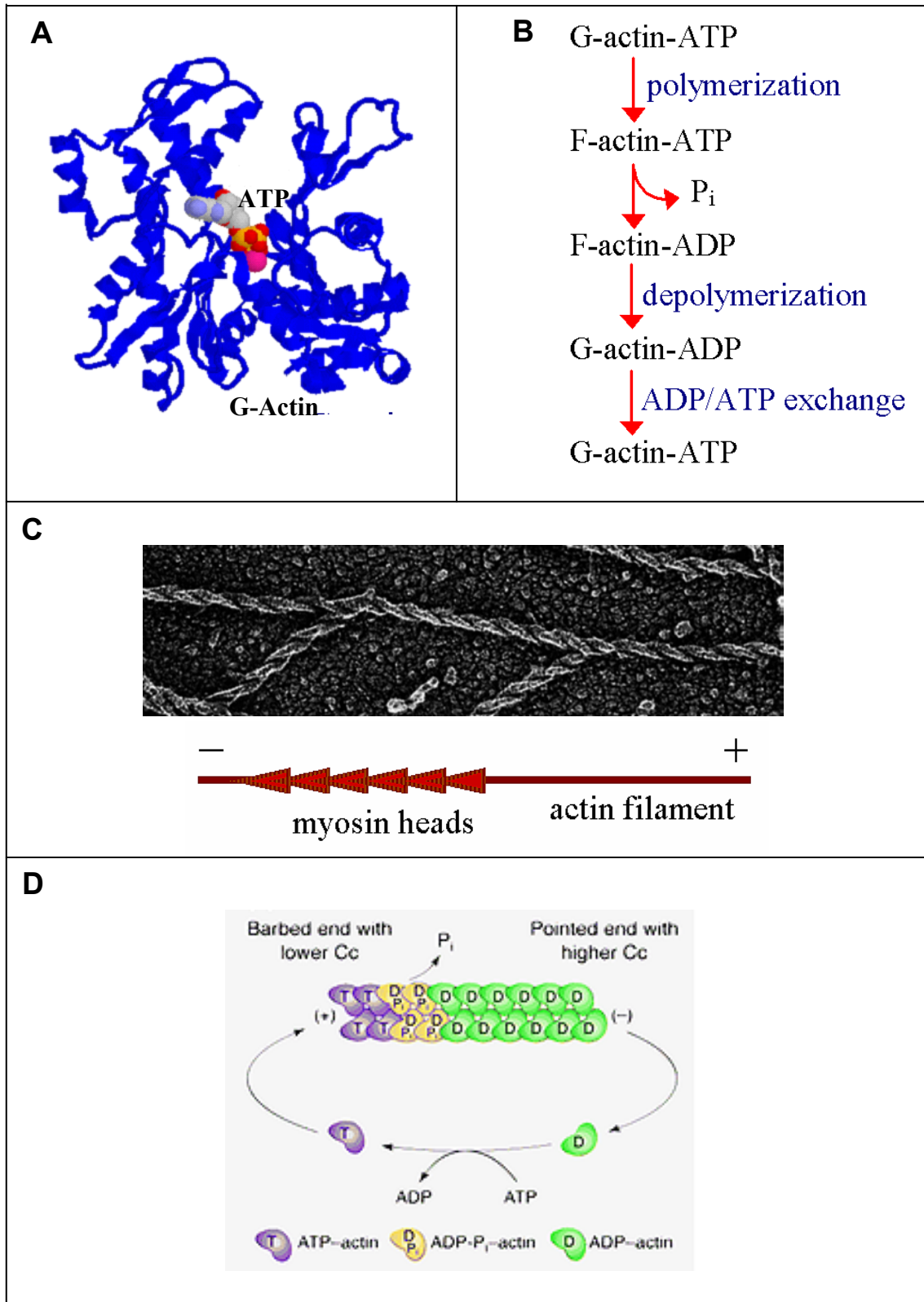


Figura 1. (A) Estructura molecular de un monómero de G-actina mostrando el sitio de unión de ATP/ADP. (B) Esquema de las etapas que transcurren en los procesos de polimerización/despolimerización. (C) Polaridad de un filamento de actina. Imagen en 3D obtenida con la técnica de *quick-freeze, deep-etch* (www.heuserlab.wustl.edu). (D) Recambio de monómeros de actina en un filamento (*treadmilling*). *Chen et al., 2000, Trends Biochem. Sci. 25:19-23.*

Schafer, 2000; Pollard, 1986).

Por tanto, la tasa de polimerización está en función de la cantidad de actina monomérica libre y de los extremos “+” libres.

1.3.-PROTEÍNAS DE UNIÓN A ACTINA

En condiciones fisiológicas, el proceso de polimerización de actina transcurre lentamente sin embargo, en determinadas circunstancias es necesario que el recambio de monómeros de actina en el filamento ocurra a gran velocidad. Es el caso de la formación del lamelipodium en el frente de avance de las células en migración. Para explicar el comportamiento fisiológico de la dinámica de la actina es necesario recurrir a las proteínas de unión a actina o ABPs. La tasa de elongación del filamento depende de la concentración de G-actina en el medio por tanto, un papel clave de las ABPs es mantener una concentración alta de monómeros de actina libres. Para ello, algunas ABPs secuestran monómeros de actina evitando la nucleación de nuevos filamentos. Es el caso de profilina y timosina β -4. La profilina se une a monómeros de actina-ATP creando un “pool” de actina lista para polimerizar. Por su parte, la timosina β -4 también se une a ATP-actina pero en este caso bloquea todas las reacciones que implican ensamblaje de actina ya sea, nucleación o elongación del filamento. Sin embargo, la profilina puede desplazar a la timosina de su unión al monómero. Esto permite a la célula tener un “pool” de actina disponible para elongar los extremos “+” de los filamentos mientras que la timosina mantiene el resto de monómeros en reserva (Pollard y Borisy, 2003).

Otro factor a tener en cuenta es que el rápido crecimiento de los extremos “+” de los filamentos acabaría rápidamente con el reservorio de ATP-actina. Por ello existen dos mecanismos que compensarían este efecto. El primero de ellos está regulado por las proteínas de *capping* que se unen al extremo “+” de los filamentos de actina e impiden su elongación (Schafer et al., 1996). El segundo mecanismo está mediado por la cofilina, un miembro de la familia de proteínas ADF (del inglés *actin-depolymerizing factor*). ADF/cofilina se une al monómero GDP-actina e inhibe el intercambio de ADP por ATP dando lugar a que estos monómeros no puedan ser empleados para elongar los filamentos. A su vez, esta ABP se une también a los monómeros ADP-actina que forman el filamento y promueve su disociación manteniéndose dichos monómeros

unidos a cofilina con lo cual, tampoco pueden volver a ensamblarse uniéndose al extremo “+” de un nuevo filamento. Bajo determinadas circunstancias, la ADF/cofilina puede romper el filamento de actina ya que al unirse lateralmente a los monómeros de actina, la hélice del filamento queda distorsionada lo que finalmente puede generar tensiones que conduzcan a su ruptura.

Existen otras ABPs especializadas en romper filamentos de actina. Es el caso de la gelsolina y proteínas relacionadas. Cuando la gelsolina se activa por calcio se une lateralmente a los monómeros de G-actina que constituyen el filamento ocasionando su ruptura. Además, tras la ruptura se une al extremo “+” bloqueando la elongación del nuevo fragmento.

Otras ABPs permiten la formación de haces de actina mediante su unión a varios filamentos de actina. En otras ocasiones entrecruzan los filamentos dando lugar a la formación de redes y en algunos otros casos conectan los filamentos con estructuras de membrana. Las proteínas fimbrina, valina y fascina forman haces de actina (Bretscher y Weber, 1980; Mooseker, 1985). En cambio, la filamina y la α -actinina entrecruzan los filamentos para formar redes de actina (Matsudaira, 1991). Por su parte, las proteínas ezrina-radixina-moesina (ERM) intervienen conectando los filamentos de actina con la membrana plasmática y con otras membranas ya que poseen dominios de unión al extremo citosólico de proteínas integrales de membrana (Pestonjamas et al., 1995; Hirao et al., 1996; Tsukita y Yonemura, 1999; Defacque et al., 2000).

1.4.-NUCLEACIÓN DE ACTINA: ARP2/3 Y FORMINAS

La creación de nuevos filamentos de actina puede acontecer de dos formas diferentes: mediante la formación *de novo* de un filamento, o bien a partir de filamentos de actina preexistentes. En el primer caso ha de tener lugar la formación de un oligómero de G-actina de una longitud mínima para que se favorezca su elongación en lugar de su despolimerización. Este proceso conocido como nucleación, es muy desfavorable desde un punto de vista cinético. Una vez constituido ese núcleo, tendría lugar el proceso de elongación mediante el cual el polímero crece bidireccionalmente a partir del núcleo formado. Debido a que las cinéticas de polimerización son diferentes para ambos lados, el extremo “+” crece más rápidamente que el extremo “-” donde está favorecido el proceso de despolimerización.

Como indicábamos antes, el nuevo filamento también se puede generar a partir de la elongación de filamentos preexistentes. Para ello, es necesario o bien desplazar a las proteínas que bloquean los *barbed end* (proteínas de *capping*), o bien, que la cofilina rompa dichos filamentos generándose así nuevos extremos de crecimiento libres para la incorporación de monómeros de ATP-actina (Pollard y Borisy, 2003).

Durante un largo periodo de tiempo, el proceso de formación y crecimiento de filamentos de actina nuevos era totalmente desconocido ya que no se conocía el factor o factores que promovían la formación de esos núcleos de polimerización tan desfavorables desde un punto de vista cinético. El descubrimiento del complejo proteico Arp2/3 permitió un gran avance en el conocimiento de la regulación del proceso de polimerización de actina (Machesky et al., 1994). Más recientemente, las forminas han aparecido como una segunda familia de proteínas con la misma capacidad para iniciar la formación de filamentos de actina que Arp2/3 (Evangelista et al., 2003; Harris y Higgs, 2004; Kovar y Pollard, 2004).

1.4.a.-El complejo Arp2/3 y sus activadores

Este complejo multiproteico fue purificado por primera vez en *Acanthamoeba catellanii* (Machesky et al., 1994) y posteriormente ha sido encontrado en todas las células eucariotas. Consta de siete polipéptidos (fig. 2): dos proteínas relacionadas con actina; (Arps del inglés *actin related proteins*) Arp2 y Arp3 y cinco subunidades; (ARPCs del inglés *Arp2/3 complex component*) p40-ARPC1, p34-ARPC2, p21-ARPC3, p20-ARPC4, p16-ARPC5 (Machesky et al., 1994).

Los modelos moleculares sugieren que el dímero estable compuesto por las subunidades Arp2 y Arp3 se une y bloquea al extremo “-” del filamento o *pointed end* e inicia el crecimiento en la dirección del extremo “+” o *barbed end* con una orientación constante de 70° (Mullins et al., 1998).

Experimentos de polaridad empleando miosina S1 indican 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” al unirse lateralmente con filamentos preexistentes (Mullins et al., 1998). Mediante el marcaje con anticuerpos frente a subunidades del complejo Arp2/3 se observa que dicho complejo se localiza justo en el punto de bifurcación de esa rama (Svitkina y Borisy, 1999) (fig. 2),

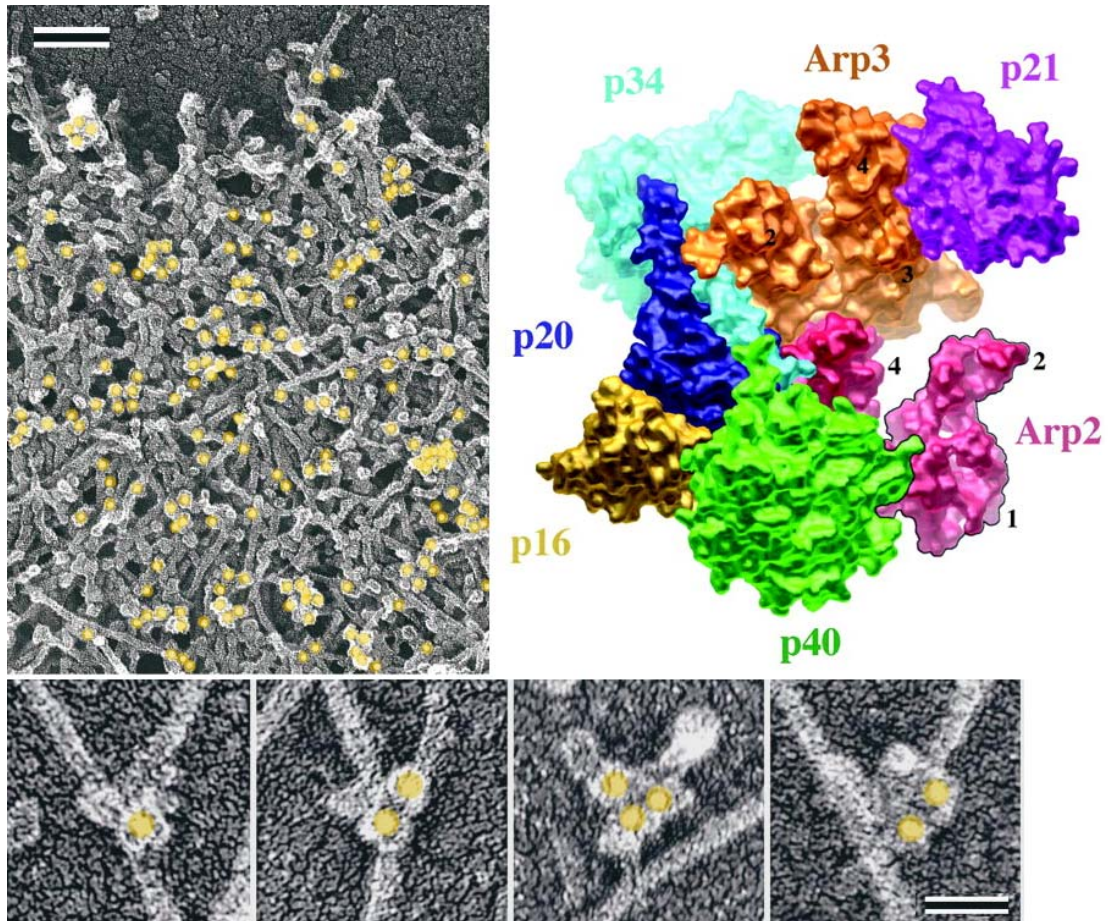


Figura 2. A la derecha. Modelo molecular de la estructura cristalina del complejo proteico Arp2/3 indicando la posición de las diferentes subunidades. Los números en negra indican los subdominios de Arp2 y Arp3. *Robinson et al., 2001, Science 294:1679-84.* Izquierda y abajo. Inmuno microscopía electrónica en keratocitos de *Xenopus*. Marcaje con un anticuerpo frente a la subunidad p21 Arc seguido de un anticuerpo secundario conjugado con oro coloidal de 10 nm. Las partículas de oro se visualizan en amarillo. A la izquierda se muestra una imagen del lamelipodum. Barra 0.1 μm . Abajo se muestra la localización de Arp2/3 en los puntos de ramificación de los filamentos de actina. Barra 50 nm. *Svitkina y Borisy, 1999, J. Cell Biol 145:1009-1026.*

lo que indica que Arp2/3 funciona como nucleador de la polimerización de actina sobre filamentos preexistentes y que permanece unido al extremo “-” del filamento.

Actualmente está aceptado que el complejo Arp2/3 es intrínsecamente inactivo y que su actividad depende de factores extrínsecos.

La familia de proteínas WASP/WAVE

Los miembros de esta familia de proteínas son los principales activadores del complejo proteico Arp2/3 aunque actualmente y como describiremos a continuación, existen evidencias bioquímicas y genéticas que muestran la existencia de otros factores con capacidad de promover la actividad nucleadora de este complejo proteico.

La proteína WASP (del inglés *Wiscott-Aldrich syndrome protein*) fue identificada como una proteína que se encontraba mutada en individuos con el síndrome de Wiscott-Aldrich (Derry et al., 1994), una enfermedad genética que se caracteriza por defectos en el citoesqueleto de actina de las células hematopoiéticas (Ochs, 1998) lo que clínicamente se traduce en trombocitopenia, eczema e inmunodeficiencia.

La restricción de WASP a células hematopoiéticas hizo pensar que podría existir otra proteína de expresión más generalizada. Así, posteriormente se encontró la proteína N-WASP (del inglés *Neural-Wiscott-Aldrich syndrome protein*) aislada inicialmente en cerebro de rata y que presenta una homología del 50% con WASP pero su expresión es mucho más ubicua (Miki et al., 1996).

El miembro más reciente de esta familia es Scar (del inglés *suppressor of cAMP receptor*) que se identificó por primera vez como un supresor de un receptor defectuoso de AMPc (cAR2) durante el desarrollo de *Dictyostelium* (Bear et al., 1998). Más tarde se descubrió su homóloga en mamíferos, WAVE (del inglés WASP family verproline-homologous protein; Miki et al., 1998). En base a los diferentes dominios en la parte N-terminal, se considera a WAVE como una subfamilia dentro de WASP constituida por tres miembros diferentes WAVE1, WAVE2 y WAVE3 (Suetsugu et al., 1999). Finalmente, Bee1p y Las17p son proteínas homologas de WASP en levaduras (Li, 1997; Madania et al., 1999).

Todos los miembros de la familia de WASP presentan una longitud de unos 500 aminoácidos aproximadamente y tienen una organización molecular común (fig. 3). En

su parte N-terminal, tanto WASP como N-WASP así como sus homólogos en levaduras presentan el dominio WH1 (del inglés *WASP homology 1*). Los miembros de la subfamilia Scar /WAVE carecen de este dominio y en su lugar presentan el dominio SHD (del inglés *Scar homology domain*). Seguidamente, aparece un dominio común a todas las proteínas de esta familia, el dominio básico B que tiene sólo 20 aminoácidos, 9 de los cuales son lisinas. El dominio GBD (del inglés *GTPase binding domain*) está presente en todos los miembros excepto en Scar/WAVE y contiene un motivo CRIB (del inglés *Cdc42/Rac-interactive binding motif*). Todas las proteínas de esta familia contienen un región central rica en prolinas que media la interacción con proteínas adaptadoras y tirosina kinasas que presentan dominios SH3 (del inglés *Src homology 3 domain*) y, al menos en N-WASP, con la proteína profilina. El extremo C-terminal contiene dos regiones altamente conservadas, una llamada WH2 (del inglés *WASP homology 2*) o simplemente V (del inglés *verprolina homology domain*) que une actina monomérica y la otra región es la suma de dos estrechos dominios que en conjunto se conocen como región CA y es la responsable de la unión a Arp2/3. Esta corta región es rica en residuos ácidos y básicos y presenta secuencias que son homólogas a la cofilina y a la proteína ActA de *Lysteria monocytogenes*, respectivamente.

Una de las principales diferencias entre las proteínas WASP y WAVE, estriba en su especificidad por las Rho GTPasas que actúan como activadores de esta gran familia de proteínas. Así, se ha demostrado que Cdc42 actúa a través de WASP y N-WASP (Rohatgi et al., 1999; Higgs y Pollard, 2000) y Rac lo hace a través de Scar/WAVE (Miki et al., 1998). WASP y N-WASP unen directamente a GTP-Cdc42 a través de su dominio GBD. Puesto que Scar/WAVE carece de dominio GBD, la interacción con Rac debe ser indirecta (Caron, 2003). En cualquiera de los casos, todas las proteínas de la familia WASP/WAVE convergen finalmente en Arp2/3 que lleva a cabo la nucleación de actina.

En reposo, WASP y N-WASP se encuentran autoinhibidos a través de interacciones intra-moleculares entre el dominio GBD y la región VCA. Esta fuerte autoinhibición es importante si tenemos en cuenta las altas concentraciones intracelulares de estas proteínas (en neutrófilos humanos WASP alcanza una concentración de 10 μ M; Higgs y Pollard, 2000). Se han propuesto dos modelos estructurales para explicar como esa interacción intramolecular provoca la autoinhibición de N-WASP y WASP (fig. 4 A).

En el modelo de inhibición directa, tanto la región básica B como el dominio GBD actúan de forma cooperativa uniéndose al dominio VCA que a su vez mantiene unido al complejo Arp2/3. En esta situación se establecen unas restricciones estructurales que impiden la activación de Arp2/3 (Prehoda et al., 2000). Existe un modelo alternativo al anterior en el que el dominio GBD es suficiente para secuestrar al dominio VCA e impedir la unión y activación de Arp2/3 (Panchal et al., 2003).

La unión de fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PI(4,5)P₂ o PIP₂) y la Rho GTPasa Cdc42 (ver más adelante) a la región B y al dominio GBD respectivamente, provocan un cambio conformacional que conduce a la liberación del extremo C-terminal permitiendo que el dominio VCA pueda interactuar y activar al complejo Arp2/3 (fig. 4 A). La regulación de WASP/N-WASP puede ser llevada a cabo mediante dos mecanismos: (i) a través de la unión de proteínas de señalización que contienen dominios SH3 que se unen al dominio rico en prolina de N-WASP/WASP y (ii) mediante fosforilación (Cory et al., 2003). La fosforilación por kinasas Src en residuos de tirosina del dominio GBD puede provocar (a) la máxima activación de WASP (b) su ubiquitinización y su posterior degradación (Suetsugu et al., 2002) y (c) la exclusión de N-WASP del núcleo (Suetsugu y Takenawa, 2003) donde podría estar involucrado en regular la expresión de genes. En concordancia con esto último, se ha observado que N-WASP interactúa con FBP11, una proteína nuclear implicada en la función del espliceosoma (Mizutani et al., 2004).

Al contrario de lo que ocurre con N-WASP/WASP, las proteínas Scar/WAVE no tienen dominio GBD y están constitutivamente activadas (Machesky et al., 1999; Miki et al., 1998). La primera proteína que se consideró como nexo de unión entre WAVE2 y Rac fue IRSp53 (Miki et al., 2000). Sin embargo, estudios *in vitro* mostraron que no tenía ningún efecto sobre la actividad de WAVE2 sino que estaba implicada en la formación de filopodia que inducía Cdc42 de manera independiente a WAVE2 (Krugmann et al., 2001, Suetsugu et al., 2003). Recientemente, se ha encontrado que WAVE1 forma parte de un complejo de cinco proteínas por lo que se ha sugerido un nuevo modelo para su regulación (fig. 4 B). Dicho complejo incluye PIR121 (del inglés *p53 inducible messenger RNA*), Nap 1 (del inglés *Nck-associated protein*), Abi (del inglés *Abl interactor*) y HSPC300 (Eden et al., 2002). Son varios los estudios que muestran que WAVE1 o WAVE2 se encuentran unidos al complejo PIR121/Nap1/Abi/HSPC300

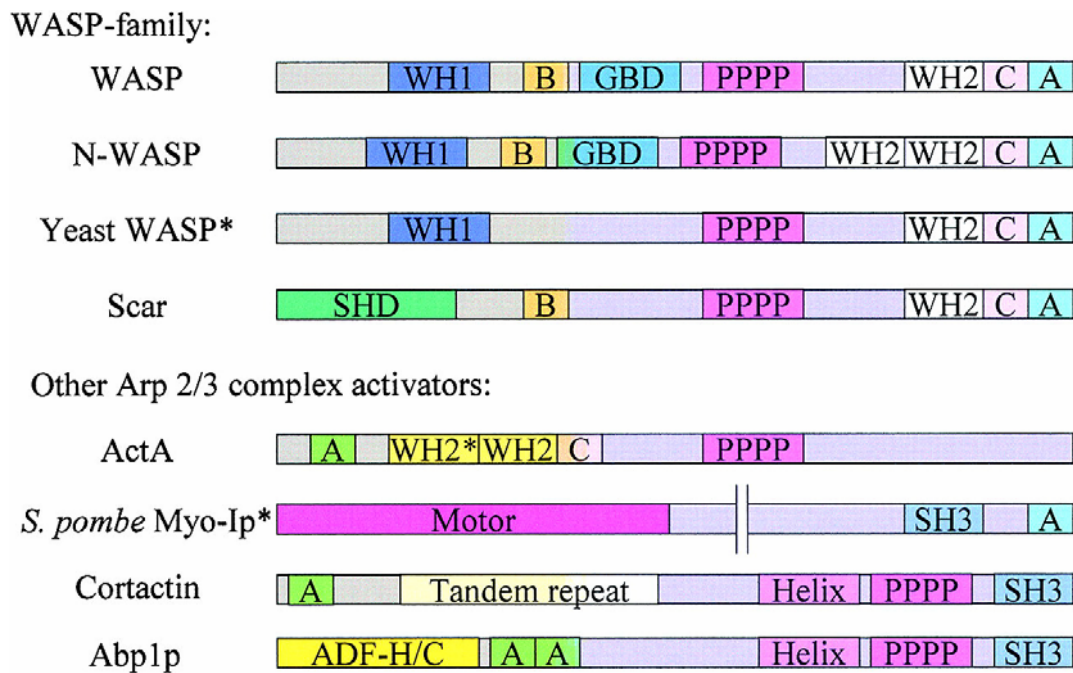


Figura 3. Representación esquemática de las secuencias de los diferentes activadores del complejo Arp2/3: WASP, N-WASP, el homólogo de WASP en levaduras, Scar/WAVE, ActA, el homólogo en levaduras de Miosina I, Abp1 y cortactina. Todos contienen la secuencia rica en aminoácidos ácidos (A) a través de la que se unen a Arp2/3. WH (WASP homology domain). SHD (Scar homology domain). B (Basic region). GBD (GTPasa binding domain). PPPP (poli-proline rich domain). C (cofilin homology domain). A (acidic domain). *Olazábal y Machesky, 2001, J. Cell Biol, 154:679-682.* Ver mas detalles en el texto.

(Gautreau et al., 2004; Innocenti et al., 2004; Steffen et al., 2004). PIR121 es probablemente el enlace entre la Rho GTPasa Rac y este complejo pentamérico.

En un principio se observó que cuando WAVE1 se encontraba unido al complejo no podía estimular la actividad nucleadora de Arp2/3. La polimerización de actina sólo ocurría en presencia de Rac o la proteína adaptadora Nck cuya unión conduce a la separación de PIR121, Nap1 y Abi quedando el subcomplejo WAVE1/HSPC300 (Eden et al., 2002). Sin embargo, dos trabajos recientes muestran que los complejos que contienen WAVE permanecen estables y unidos incluso después de la activación de Rac y que WAVE es intrínsecamente activo cuando forma parte de dicho complejo siendo su reclutamiento el principal paso que regula su actividad (Innocenti et al., 2004; Steffen et al., 2004).

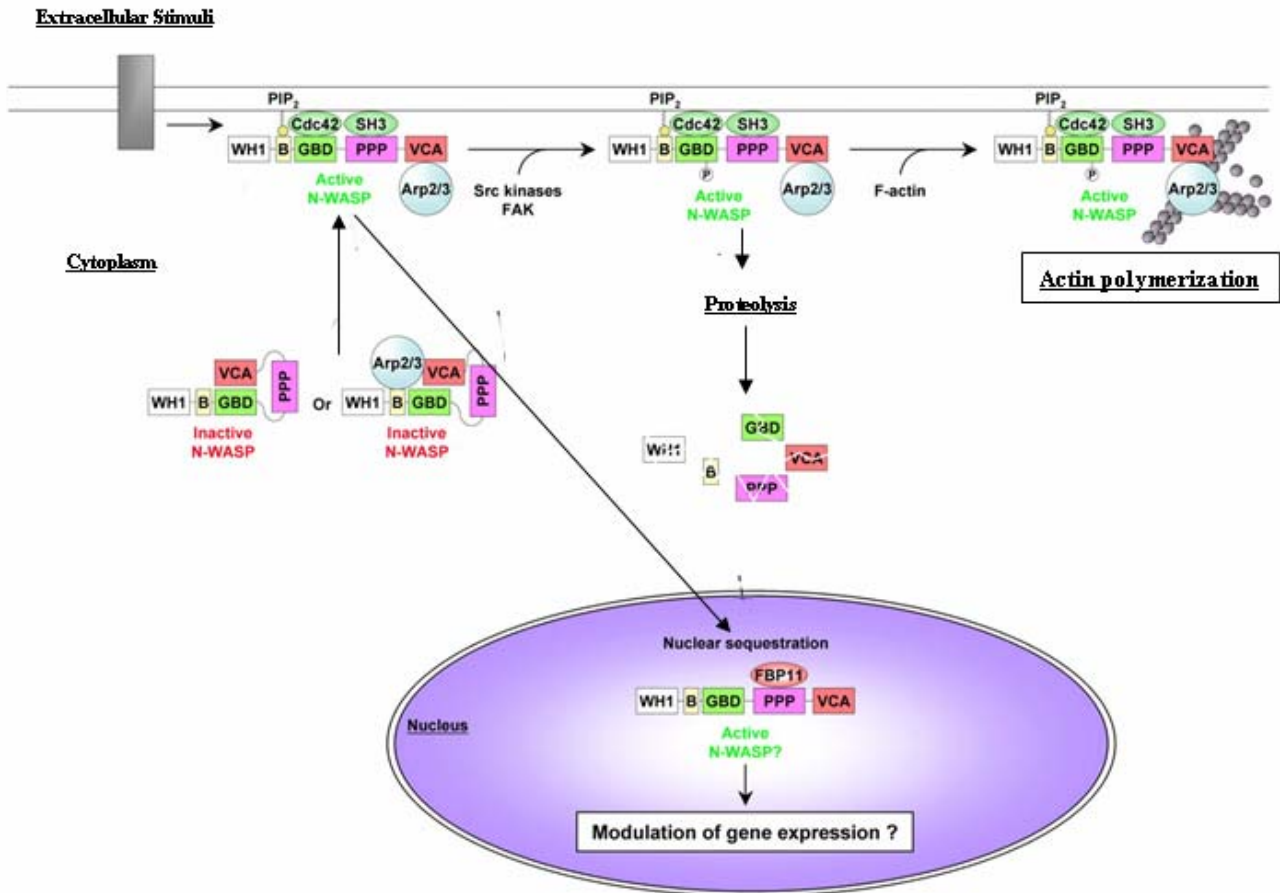
Mecanismo de acción WASP-Arp2/3

El modelo mejor conocido y aceptado para explicar la actuación conjunta de las proteínas WASP y Arp2/3 es el modelo de nucleación dendrítica que tiene lugar en el frente de avance de células en migración (Pollard et al., 2000; fig. 5).

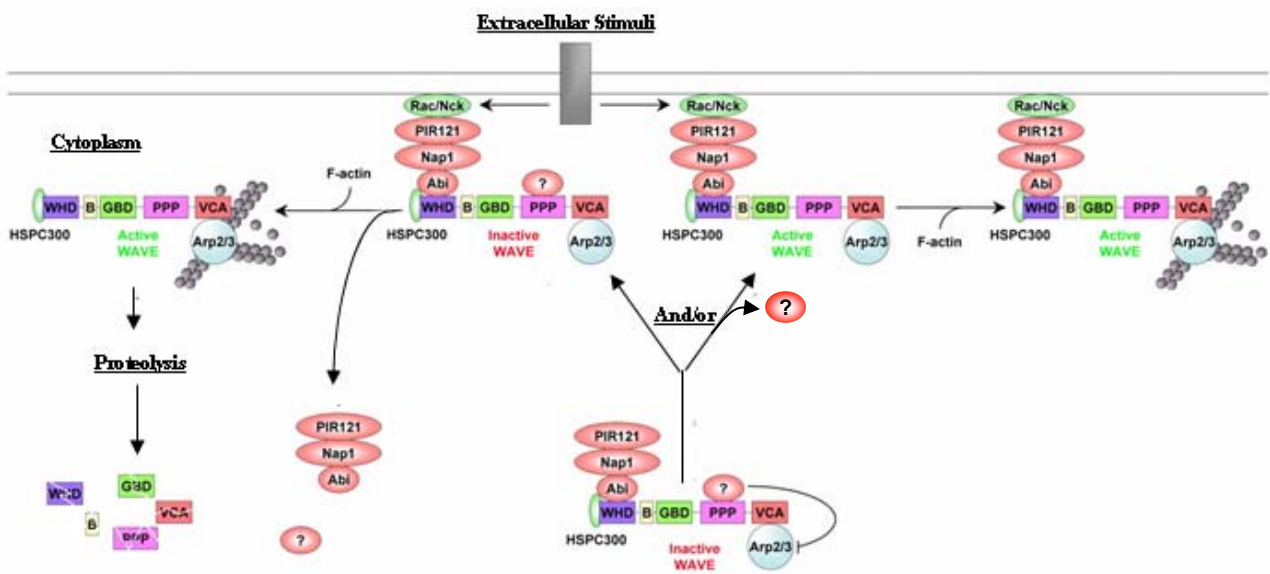
Estímulos extracelulares como factores quimiotácticos, se unen a sus correspondientes receptores de membrana plasmática y activan moléculas de señalización como las Rho GTPasas. La unión de PI(4,5)P₂ y GTP-Cdc42 a las proteínas N-WASP/WASP provoca la activación de las mismas. Una vez activas, N-WASP/WASP colaboran con Arp2/3 y con monómeros de actina para estimular la la formación de nuevos extremos “+” o *barbed end* en un proceso que incluye tanto nucleación como formación de

Figura 4. (A) Modelo de regulación de N-WASP. En condiciones de reposo N-WASP está inactivo en el citosol. En respuesta a un estímulo extracelular se activa tras la unión de GTP-Cdc42 y PIP₂ o de proteínas que contienen dominios SH3. En su conformación abierta, N-WASP puede ser transportado al núcleo donde regula la expresión de genes. Alternativamente, N-WASP activo puede permanecer en el citosol. Su fosforilación por tirosina kinasas potencia su capacidad de activar a Arp2/3, impide su transporte al núcleo y en ciertos modelos puede inducir su degradación vía proteosoma. (B) Modelo de regulación de WAVE. En este modelo WAVE interacciona constitutivamente con Arp2/3 pero en condiciones de reposo Arp2/3 se mantiene inactivo. Estímulos extracelulares, ya sea la activación de Rac o la movilización de Nck, provocan el reclutamiento del complejo pentamérico a la membrana plasmática. La activación de WAVE requiere su correcta ubicación, la presencia de F-actina y/o la pérdida de la interacción con una/s proteínas adicionales (indicadas como “?”). Alternativamente la activación puede ocurrir con la separación del subcomplejo WAVE/HSPC300/Arp2/3 y en presencia de F-actina y la señal terminaría con la degradación de WAVE. *Bompard y Caron, 2004, J. Cell Biol 166:957-962.* →

A



B



estructuras ramificadas (Blanchoin et al., 2000; Higgs et al., 1999; Pantaloni et al., 2000; Marchand et al., 2001; Zalevsky et al., 2001; Amann y Pollard, 2001). El dominio VCA de las proteínas WASPs se une tanto a un monómero de actina como al complejo Arp2/3 (Marchand et al., 2001). Las subunidades Arp3 y Arp2 quedan muy próximas entre sí y simulan dos monómeros de actina (Robinson et al., 2001), los cuales quedan próximos a su vez al monómero de actina unido al dominio VCA. En conjunto, se forma un trímero estable que se une con gran afinidad al lateral de un filamento de actina preexistente (filamento madre) y constituye un núcleo de polimerización listo para iniciar la formación de un nuevo filamento con un ángulo constante de 70°. Tras el ensamblaje de Arp2/3, VCA y actina hay un paso adicional de activación antes de iniciar el nuevo filamento (Marchand et al., 2001). Se trata de la hidrólisis de ATP llevada a cabo por Arp2 (Le Clainche et al., 2001).

Bajo condiciones de activación óptimas cada complejo Arp2/3 inicia la nucleación de un filamento o rama individual. Existen dos hipótesis que explican dónde ocurre inicialmente la nucleación del nuevo filamento. Pantaloni et al., (2000) propone que las ramas se forman preferentemente en los extremos “+” o *barbed end* de filamentos de actina ya formados. Sin embargo, imágenes de microscopía a tiempo real muestran que las ramas se forman en el lateral de filamentos preexistentes (Amann y Pollard, 2001; Ichetovkin et al., 2002; Fujiwara et al., 2002). Tras iniciar la formación de un nuevo filamento o rama, el papel de las proteínas WASPs no está del todo claro. Se especula que se disocian del complejo Arp2/3 inmediatamente después de la formación del nuevo filamento. Consistente con esta idea es la rápida tasa de disociación *in vitro* del dominio VCA de Arp2/3 y actina (Marchand et al., 2001). Cortactina (ver siguiente apartado) puede unirse al complejo Arp2/3 y se ha propuesto que estabiliza las ramas tras la separación de WASP/N-WASP y Arp2/3 (Weaver et al., 2002; Uruno et al., 2003).

Los filamentos crecen hasta que sus extremos “+” son bloqueados por la unión de proteínas de *capping*. Este hecho tiene dos importantes consecuencias. Por un lado limita la longitud de las ramas. Los filamentos cortos son más rígidos, menos flexibles y por tanto más efectivos para empujar a la membrana plasmática. Por otro lado, restringe el consumo innecesario de monómeros de actina.

La red de filamentos cortos y ramificados en el frente de avance es generalmente estrecha, aproximadamente una micra de profundidad desde la membrana plasmática.

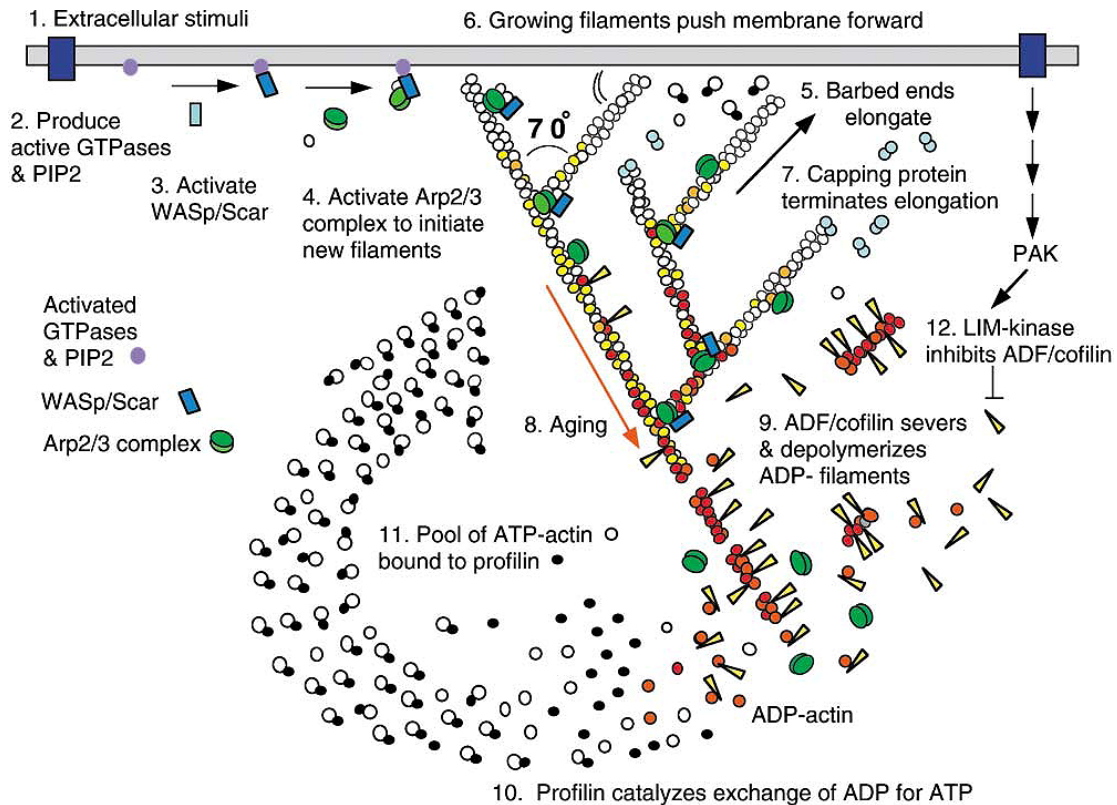


Figura 5. Modelo de nucleación dendrítica. (1) Estímulos extracelulares activan a sus correspondientes receptores de membrana. (2) Las vías de señalización asociadas conducen a la activación de las Rho GTPasas que conjuntamente con PIP₂ (3) activan a las proteínas WASP/Scar. (4) WASP/Scar unen a Arp2/3 y a un monómero de actina al lateral de un filamento de actina preexistente. Dicha unión tiene lugar con una inclinación de 70°. (5) El nuevo filamento es elongado por adición de monómeros de actina al extremo “+”. (6) Los filamentos de actina empujan a la membrana dando lugar al lamelipodia en el frente de avance. (7) Las proteínas de *capping* evitan el continuo crecimiento de los filamentos. (8) Los filamentos de actina más alejados del frente de avance hidrolizan ATP (monómeros amarillos) y el Pi se disocia quedando los monómeros unidos a ADP (monómeros rojos). (9) ADF/cofilina promueve la disociación del Pi y rompe los filamentos. (10) Profilina cataliza el intercambio de ADP por ATP en los monómeros de actina (monómeros blancos). (12) Las Rho GTPasas pueden activar a PAK y LIMK que a su vez inactivan a ADF/cofilina, esto provoca que el recambio de los filamentos sea mas lento. *Pollard et al., 2000, Annu. Rev. Biophys. Biomolec. Struct 29:545-576.*

Detrás, todos los filamentos son largos o bien se están despolimerizando (Small et al., 1978). El primer paso para que ocurra esta transición es la separación de las ramas de los filamentos madre sobre los que se han formado. Esto ocurre cuando las subunidades de G-actina que constituyen las ramas hidrolizan ATP hasta ADP+Pi. La disociación de Pi debilita la unión de Arp2/3 y conduce finalmente a la separación de la rama del filamento madre. ADF/cofilina se encarga de acelerar tanto el proceso de disociación del Pi como la ruptura de las ramas y la disociación de los monómeros de G-actina del ADP. Como Arp2/3 se mantiene unido al extremo “-” de la rama, esta puede continuar creciendo en su extremo “+”.

La familia de las Rho GTPasas también pueden influir en el desensamblaje de los filamentos de actina. Así, Rac estimula a PAK (del inglés *p21-activated kinase*) que activa entonces a LIMK (del inglés *LIM kinase*) (Edwards et al., 1999) que finalmente fosforila e inactiva a ADF/cofilina incrementándose de esta manera la vida media de los filamentos de actina recién formados. En resumen, la activación de las Rho GTPasas estimula tanto la formación como la estabilización de nuevos filamentos de actina.

Otros activadores de Arp2/3: Cortactina, Abp1 y Myo 1p

Cortactina fue descubierta inicialmente como un sustrato de la kinasa Src (Kanner et al., 1990). Actualmente se sabe que también es sustrato de otras kinasas como Fer y Syk. Al igual que la mayoría de activadores de Arp2/3, cortactina presenta un dominio ácido a través del que interacciona con este complejo proteico (fig. 3 pág. 17). A diferencia de las proteínas WASP/WAVE dicho dominio se localiza en el extremo N-terminal y se conoce con el nombre NTA (del inglés *N-terminal acidic domain*) (Weed et al., 2000). Tras este dominio aparecen seis repeticiones en tandem de unos 37 aminoácidos cada una y un fragmento de unos 20 aminoácidos de longitud. En conjunto constituyen un dominio central conocido como *tandem repeat* responsable de la unión a filamentos de actina. Esta unión es imprescindible para que cortactina pueda activar a Arp2/3. A continuación hay un dominio en α -hélice seguido de un dominio rico en residuos de prolina de longitud variable y que contiene también abundantes residuos de tirosina, treonina y serina. Finalmente, ya en el extremo C-terminal, aparece un dominio SH3 capaz de asociarse con gran cantidad de proteínas. Cortactina se expresa en todos los tejidos de mamífero (Migliarese et al., 1994; Du et al., 1998) excepto en células

hematopoiéticas que expresan la proteína HS1 (Kitamura et al., 1989) cuya única diferencia con cortactina es que tiene sólo tres repeticiones en tandem y los dominios en α -hélice y rico en prolina está invertidos (Kitamura et al., 1995).

Los dominios ácidos de cortactina y N-WASP unen Arp2/3 de forma diferente, así N-WASP puede unirse a las subunidades Arp2, Arp3 y p40-ARPC1 mientras que cortactina sólo se puede unir a Arp3 (Weaver et al., 2002). En comparación con N-WASP, cortactina es un débil activador del complejo Arp2/3 pero en cambio potencia la activación del complejo llevada a cabo por el dominio VCA de las proteínas WASP/WAVE (Weaver et al., 2001). En base a ello Weaver y colaboradores postularon un modelo en el que cortactina y N-WASP forman un complejo con Arp2/3 al que se unen simultáneamente (fig. 6 A) llevando a cabo de manera sinérgica su activación. Posteriormente, Uruno y colaboradores (Uruno et al., 2003) mostraron que en presencia de actina polimerizada, cortactina incrementaba su afinidad por Arp2/3. De hecho, en ensayos in vitro con actina filamentosa, cortactina desplazaba al dominio VCA de N-WASP de su unión con Arp2/3 aún cuando VCA se encontraba en concentraciones de saturación (Uruno et al., 2003). Estos resultados les llevaron a proponer un nuevo modelo (fig. 6 B) en el que la unión de cortactina y N-WASP al complejo Arp2/3 es secuencial. En primer lugar N-WASP se une y activa a Arp2/3 que inicia la formación de una nueva rama de actina. A continuación, cortactina desplaza a N-WASP y se encarga de estabilizar la rama recién formada. Este modelo es más coherente con la diferente localización de N-WASP y cortactina en las cometas de actina inducida por patógenos intracelulares, donde N-WASP aparece en la superficie de la bacteria mientras que cortactina se distribuye a todo lo largo de la cola de la cometa (Zetl y Way, 2001; Uruno et al., 2003). Esta misma distribución se observa en las cometas de actina asociadas a vesículas intracelulares (Schafer et al., 2000; Kaksonen et al., 2000). A nivel celular, cortactina se localiza en sitios donde ocurren de forma frecuente procesos de polimerización y despolimerización de actina como la zona cortical de la membrana plasmática o el lamelipodium y filopodium de células en migración. En estos lugares, su función es potenciar la formación de una red de filamentos de actina ramificados mediante su interacción con Arp2/3 y/o la estabilización de las ramas ya formadas por la acción de WASP/Arp2/3. Su localización en el frente de avance está regulada por la Rho GTPasa Rac (Weed et al., 1998). A su vez, cortactina recluta

proteínas a la región cortical a través de su dominio SH3. Es el caso de dinamina 2 (Krueger et al., 2003) y de proteínas implicadas en la formación de filopodia dependiente de Cdc42. En conjunto, estas proteínas pueden funcionar como reguladoras de las organizaciones del citoesqueleto de actina observadas en la zona cortical.

Cortactina también se ha relacionado con la endocitosis. Estudios de microscopía electrónica revelan que cortactina co-localiza con dinamina en las vesículas de clatrina en formación. Otros estudios han puesto de manifiesto que cortactina es necesaria para la endocitosis mediada por receptor (Cao et al., 2003).

Otro activador del complejo proteico Arp2/3 es la proteína Abp1 (del inglés *actin-binding protein*) estructuralmente muy parecida a cortactina (fig. 3 pág 17). En levaduras, presenta dos dominios ácidos a través de los que se une a Arp2/3 y un dominio con homología a cofilina en posición N-terminal a través del que se une a filamentos de actina. La interacción con filamentos de actina es necesaria para llevar a cabo la activación del complejo Arp2/3 (Goode et al., 2001). Su homólogo en mamíferos carece de los dominios ácidos a través de los que se une a Arp2/3 aunque dicha unión podría ocurrir de manera indirecta ya que Abp1, a través de su dominio SH3 puede unir dinamina (Kessels et al., 2000) que a su vez puede interactuar con WASP (Qualmann et al., 1999). En mamíferos Abp1 se localiza en la región perinuclear y al igual que lo que ocurre con cortactina la activación de Rac produce su translocación al frente de avance conjuntamente con Arp2/3 (Kessels et al., 2000).

En levaduras, la proteína miosina I (Myo 1p) (fig. 3 pág. 17) es capaz de unir y activar débilmente al complejo Arp2/3. Análisis bioquímicos muestran que estas proteínas tienen funciones iguales a las que desempeñan las proteínas WASP de levaduras (Lechler et al., 2000; Evangelista et al., 2000; Lee et al., 2000).

1.4.b.-Forminas

Las forminas son una familia de proteínas altamente conservadas en todos los eucariotas e implicadas en una gran variedad de procesos relacionados con el ensamblaje de actina como la citocinesis, la formación de estereocilia y del acrosoma así como en el desarrollo embrionario (Wasserman, 1998; Zeller, 1999). Son proteínas grandes, de más de 1000 aminoácidos. Todas las proteínas de esta familia se caracterizan

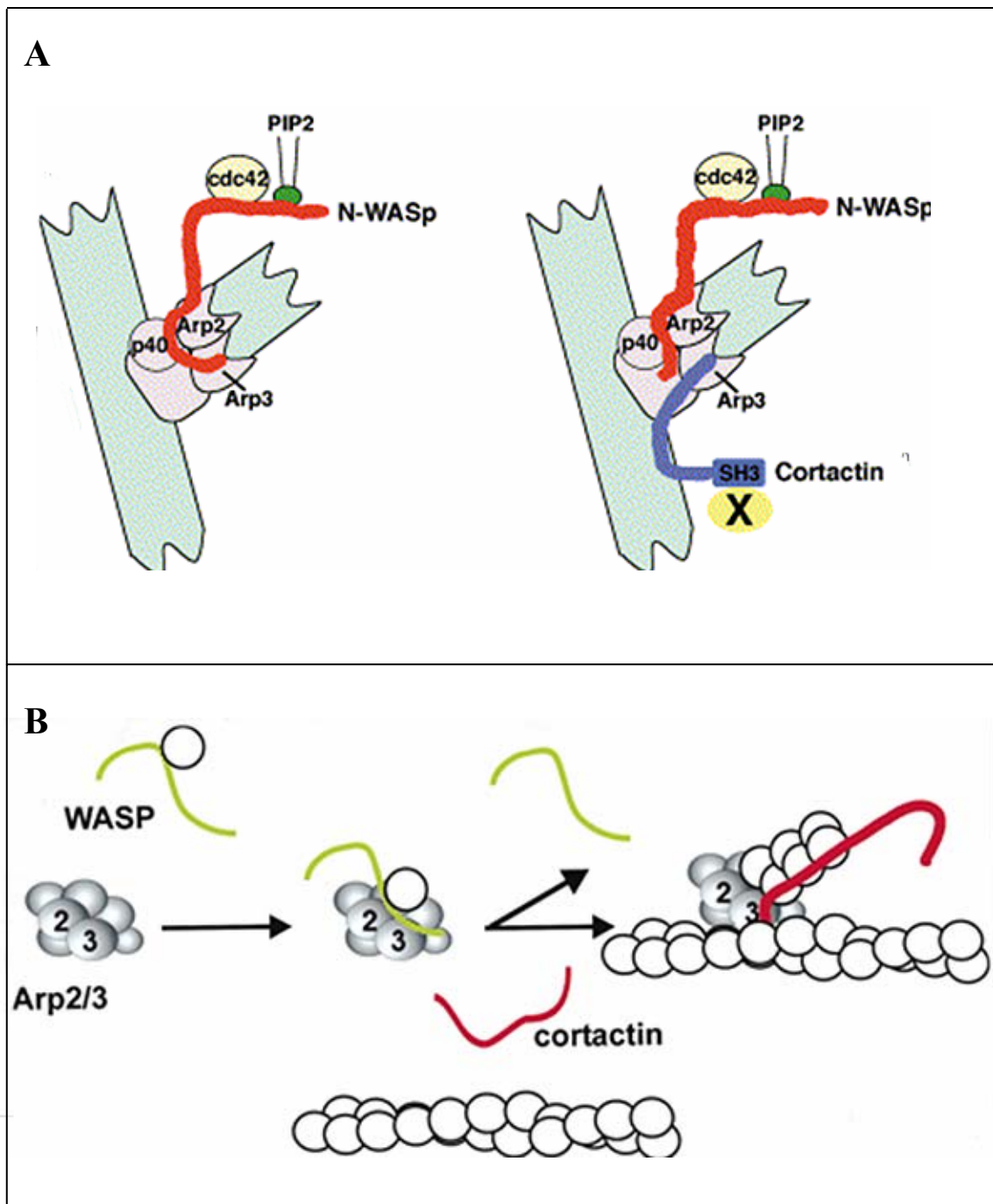


Figura 6. (A) Modelo de co-activación de Arp2/3 por cortactina y N-WASP. Izquierda. N-WASP es activado por la unión de Cdc42 y PIP₂. En su conformación abierta, N-WASP se une a las subunidades Arp3, Arp2 y p40 del complejo Arp2/3. Derecha. Cortactina se une a la subunidad Arp3 y desplaza el extremo C-terminal de N-WASP. A través de su dominio SH3, cortactina se puede unir a otras proteínas de señalización (dinamina por ejemplo) (se muestra como X en el dibujo). *Weaver et al., 2002, Cur. Biol. 12:1270-1278.* (B) Modelo de activación secuencial de Arp2/3 por cortactina y N-WASP. Una vez activo, N-WASP tiene una gran afinidad por Arp2/3 al que se une y activa facilitando el inicio de una nueva rama de actina en el lateral de un filamento de actina preexistente. Una vez formado el nuevo filamento, Arp2/3 se hace menos accesible para N-WASP y cortactina incrementa su afinidad por el complejo proteico. Finalmente, cortactina desplaza a N-WASP y queda unida al filamento de actina y a Arp2/3 estabilizando el sitio de ramificación. *Uruno et al., 2003, J. Biol. Chem. 278:26086-93.*

por la presencia de dos dominios típicos: FH1 y FH2 (del inglés *Formin homology domain*) (Castrillon y Wasserman, 1994). Algunas forminas contienen también un dominio FH3 (fig. 7 A) que determina su localización subcelular (Evangelista et al., 2003). El dominio FH1 es un dominio rico en prolina y es capaz de unirse a profilina además de otras moléculas de señalización (Wallar y Alberts, 2003). A través de este dominio las forminas pueden reclutar proteínas que modulan su actividad intrínseca como nucleadores de actina.

El dominio FH2 es el dominio típico de las forminas ya que no aparece en ninguna otra familia de proteínas. Es el responsable de controlar la nucleación de actina *in vitro* y el ensamblaje de actina *in vivo* (Evangelista et al., 2003) y en la mayoría de las forminas forma dímeros (Xu et al., 2004). Aunque el efecto sobre la polimerización de actina puede variar entre especies, el dominio FH2 de todas las forminas presenta dos características invariables: (i) enlentece la asociación y la disociación de los monómeros de actina al extremo “+” del filamento y (ii) bloquea la unión de proteínas de *capping* a dicho extremo (Harris y Higgs, 2004).

Dentro de la familia de las forminas encontramos la subfamilia DFRs (del inglés *Diaphanous-related formins*) que se caracterizan por contener en su secuencia dos dominios funcionales adicionales; el dominio RBD (del inglés *Rho-binding domain*) en posición N-terminal y el dominio DAD (del inglés *Dia-autorregulatory domain*) en posición C-terminal e incluido a su vez dentro del dominio FH2 (Alberts, 2001) (fig. 7 A). Las proteínas pertenecientes a esta subfamilia se encuentran autoinhibidas a través de una interacción intramolecular entre los dos dominios arriba mencionados (fig. 7 B). La unión de la Rho GTPasa Rho rompe la interacción entre ambos dominios y la molécula queda activada (Alberts, 2001; Watanabe et al., 1999). Estudios recientes muestran que Cdc42 puede actuar como activador de DRF3 mejor conocida como mDia2 (del inglés *mamalian diaphanus 2*) (Peng et al., 2003).

Las forminas son proteínas que están implicadas en la nucleación de filamentos de actina pero a diferencia de Arp2/3 se unen a los *barbed end* o extremo “+” (fig. 7 C). Por ello, en un principio se consideró que su función era únicamente impedir la unión de proteínas de *capping*, pero estudios recientes muestran claramente que estimulan la nucleación y elongación de filamentos de actina.

La gran concentración de proteínas de *capping* en la célula y su gran afinidad por los

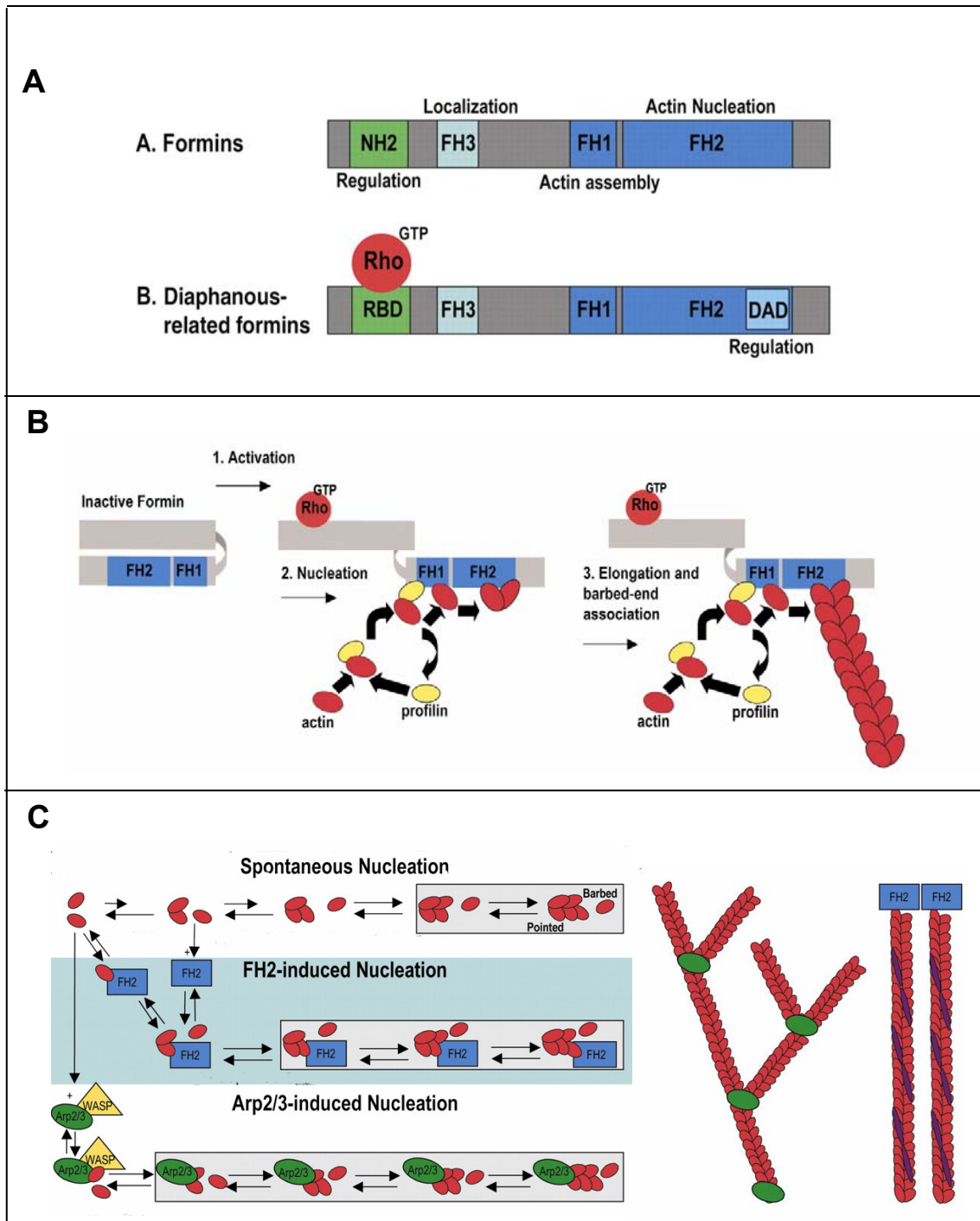


Figura 7. (A) Comparación de las secuencias de las proteínas de la familia de las forminas y de la subfamilia DRFs (ver detalles en el texto). (B) Modelo sobre como el dominio FH1 y el complejo profilina-actina contribuyen a la nucleación de nuevos filamentos de actina. Primero el dominio FH1 se une a profilina que a su vez mantiene secuestrado un monómero de actina. FH1 provoca la separación del complejo actina profilina quedando el monómero de actina libre para que el dominio FH2 pueda utilizarlo para nuclear un filamento de actina. (C) izquierda. Comparación de la nucleación de actina llevada a cabo por el dominio FH2 de las forminas o por el complejo Arp2/3. Este último es más eficiente ya que sólo necesita un monómero para crear un núcleo estable mientras que FH2 requiere dos. Derecha. Arp2/3 genera una red de filamentos ramificados. Las forminas regulan la elongación de los filamentos. *Evangelista et al., 2003, J. Cell Sci.116:2603-11*

barbed end, hacen que el extremo de crecimiento rápido de un filamento de actina sea bloqueado en un segundo a no ser que haya mecanismos que eviten la actuación de dichas proteínas (Pollard et al., 2000). Esto implica que los filamentos raramente alcanzarían longitudes superiores a 100 nm. Sin embargo, la realidad es bien diferente ya que en la célula existen poblaciones de filamentos de varias micras de longitud como los que constituyen los filopodia o los microvilli así como los que aparecen en levaduras comúnmente conocidos como cables de actina. Mientras que Arp2/3 está implicada en la formación de filamentos cortos y ramificados altamente eficaces en ejercer fuerzas de protusión en el frente de avance, las forminas serían proteínas estimuladoras de la nucleación pero en este caso favorecerían la formación de filamentos de actina largos en presencia de proteínas de *capping*.

2.-LAS RHO GTPasas

2.1.-GENERALIDADES

La superfamilia de Ras engloba a 5 familias de proteínas: Ras, Rho, Rab, Arf, y Ran (Etienne-Manneville y Hall, 2002) que suman un total de 60 proteínas en mamíferos. Todas tienen en común que son proteínas monoméricas con un peso molecular de entre 20 y 30 KD (Bishop y Hall, 2000) y que son capaces de unir nucleótidos de guanina activándose o inactivándose en función de si están unidas a GTP o GDP, respectivamente. A su vez, las Rho GTPasas pueden ser clasificadas en 5 grupos o subfamilias (fig. 8): Rho, Rac, Cdc42, Rnd y la subfamilia RhoBTB. Existen tres Rho GTPasas que no pueden ser incluidas dentro de ninguna subfamilia debido a la escasa información que se tiene sobre ellas; RhoD, Rif y RhoH/TTF. Las Rho GTPasas se distribuyen en todas las especies eucariotas examinadas, desde levaduras y hongos hasta plantas y mamíferos.

2.2.-DOMINIOS FUNCIONALES

Cuando las secuencias de las Rho GTPasas Rho, Rac1 y Cdc42 se alinean con la secuencia de H-Ras, se observa una alta conservación de aquellos aminoácidos que se necesitan para la unión e hidrólisis de GTP. Una excepción sería la Rho GTPasa RhoH/TTF así como las Rho GTPasas de la subfamilia Rnd que presentan sustituciones en estos aminoácidos de manera que les confieren la particularidad de no tener capacidad de hidrolizar GTP y por tanto de regular su actividad, por lo que se cree que su regulación se lleva a cabo a través del control de su expresión.

Uno de los dominios funcionalmente más importante es el dominio efector a través del cual se unen todos los efectores de las Rho GTPasas (fig. 9). La especificidad de la interacción está garantizada ya que las proteínas efectoras se unen a residuos específicos dentro de este dominio. Sin embargo, el dominio que hace que las Rho GTPasas sean únicas dentro de la superfamilia de Ras es el dominio de inserción (en inglés *insert domain*; fig. 9). Se trata de un dominio presente en todas las RhoGTPasas y ausente en Ras. Este dominio extra está implicado en la unión a determinados efectores, por ejemplo es capaz de unir a IQGAP1, un conocido efector de Cdc42 y en menor medida de Rac (ver apartado 2.6.a pág 45). También es el responsable de unir las proteínas

reguladoras Rho GDIs (Wu et al., 1997; ver apartado 2.5 pág. 38), lo que significa que los miembros de la familia de Ras no pueden unirse a proteínas GDIs.

Al igual que otros miembros de la superfamilia de Ras, las Rho GTPasas sufren modificaciones post-transduccionales como: prenilación, carboximetilación de una cisteína muy conservada en el extremo C-terminal y la eliminación de los últimos tres aminoácidos de dicho extremo. De todas las modificaciones citadas, es de especial importancia la prenilación ya que facilita la unión de las Rho GTPasas a las membranas determinando en algunos casos su localización subcelular. La prenilación puede ser por adición de un grupo farnesilo (Rho D, Rho E), adición de dos grupos geranilo (RhoA, Rho C, Rac1, Rac2 y Cdc42) o cualquiera de ambas modificaciones como es el caso de RhoB.

2.3.-LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS RHO GTPasas

Las modificaciones post-transduccionales a las que se ven sometidas los miembros de esta familia de proteínas son un hecho clave que determina su localización dentro de la célula. Sin embargo, aunque se trata de un proceso común para todas las Rho GTPasas, existe una gran variabilidad en cuanto a su distribución subcelular por lo que se cree que han de existir otros factores que influyan en su localización. Uno de estos factores sería la proteína Rho GDI, capaz de secuestrar la GTPasa en su estado inactivo y retenerla en el citoplasma. Esa gran diversidad en su localización, mayor incluso que en el caso de Ras, puede ser reflejo de la multitud de funciones biológicas en las que se encuentran involucradas esta familia de proteínas. Aunque existen numerosos estudios acerca de la localización subcelular de las Rho GTPasas (en especial sobre RhoA, Rac1 y Cdc42), la mayoría de los datos obtenidos hasta el momento son confusos e incluso en algunos casos contradictorios. Estudios bioquímicos de fraccionamiento celular muestran que las proteínas endógenas RhoA, Rac1 y Cdc42 se localizan en citosol y en fracciones totales de membrana (Boivin y Beliveau, 1995). Su activación conlleva su translocación a endomembranas (Fleming et al., 1996; Kranenburg et al., 1997; Michaelson et al., 2001). En el caso de Cdc42 se confirmó que parte de las fracciones de membrana se correspondían con las membranas del complejo de Golgi (CG) (Erickson et al., 1996). La localización en CG de esta Rho GTPasa ha sido corroborada con posterioridad por otros laboratorios, incluido el nuestro (Fuccini et al., 2002; Luna et al., 2002). En cuanto

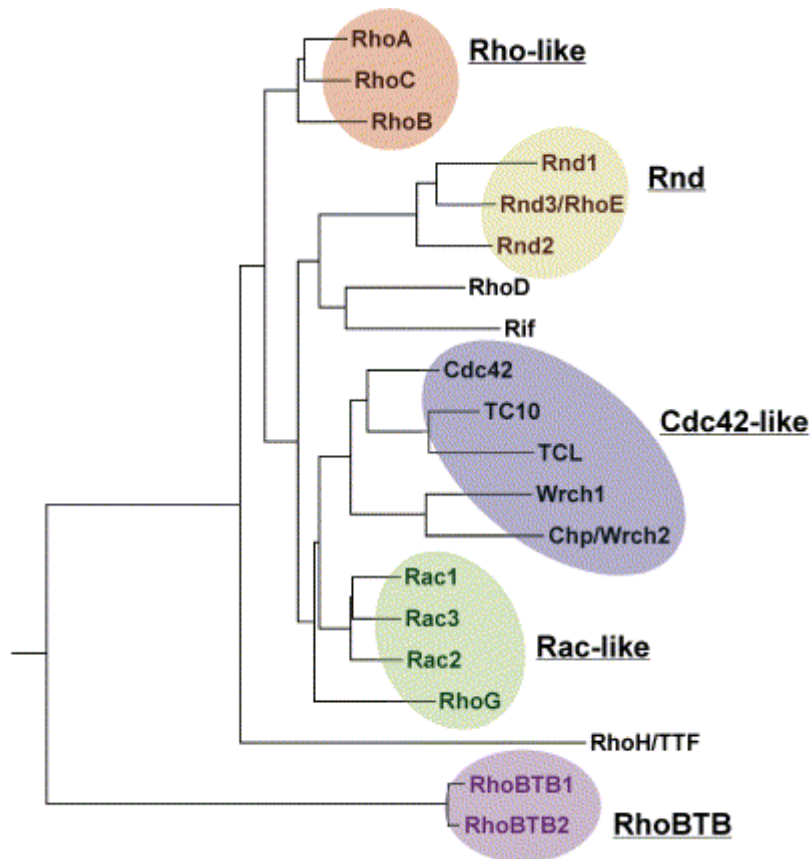


Figura 8. Dendograma donde se representan las relaciones entre los 20 miembros de la familia de las Rho GTPasas. Las cinco subfamilias están rodeadas por círculos de color. *Burridge y Wennerberg, 2004, Cell 116:167-179.*

a Rac1, mediante inmunofluorescencia se ha observado que una forma mutante constitutivamente activada, (RacV12) se localiza en membrana plasmática así como en membranas intracelulares (Jou et al., 2000). La naturaleza de esas endomembranas es de momento desconocida. Se ha demostrado que Rac1 también se localiza en núcleo (Michaelson et al., 2001; Kraynov et al., 2000). En el caso de Rho A, mediante inmunomicroscopía electrónica se observó que co-localizaba en microdominios de la membrana plasmática con caveolina 1 (Michaely et al., 1999), una proteína característica de las caveolas o perfiles vesiculares que participan en un tipo de endocitosis (Schlegel y Lisanti, 2001). Sin embargo, mediante técnicas de inmunofluorescencia sólo se ha podido localizar en citosol (Adamson et al., 1992; Kranenburg et al., 1997).

También se han realizado estudios sobre la localización subcelular de otras isoformas menos conocidas de Rac, Rho y Cdc42. En células en reposo, Rac2 se encuentra asociado con Rho GDI en el citosol (Knaus et al., 1991). Tras su activación *in vitro* se transloca a la membrana plasmática (Philips et al., 1993; 1995). Por lo que respecta a Rho B, se localizó inicialmente en endosomas (Adamson et al., 1992) pero posteriormente, mediante estudios de inmunofluorescencia se localizó también en membrana plasmática, aparato de Golgi y en vesículas peri-Golgi (Michaelson et al., 2001). Finalmente, Rho D ha sido descrita como una proteína endosomal ya que se encuentra en estructuras vesiculares que contienen transferrina internalizada (Murphy et al., 1996).

2.4.-CICLO FUNCIONAL DE LAS RHO GTPASAS

Las Rho GTPasas están continuamente ciclando entre un estado inactivo, cuando están unidas a GDP, y un estado activo si están unidas a GTP. Las Rho GTPasas activas interaccionan con moléculas efectoras para producir una respuesta biológica. Este ciclo está altamente regulado por tres clases de proteínas (fig. 10): GEFs (del inglés *GTP-GDP Exchange Factors*), GAPs (del inglés *GTPase-activating proteins*) y GDIs (del inglés *Guanine nucleotide dissociation inhibitor*) (Symons y Settleman, 2000).

En una célula quiescente, las Rho GTPasas se localizan mayoritariamente en el citoplasma unidas a GDIs. La estimulación de la célula ya sea por factores de crecimiento, moléculas de adhesión o integrinas induce un reclutamiento de GEFs y del

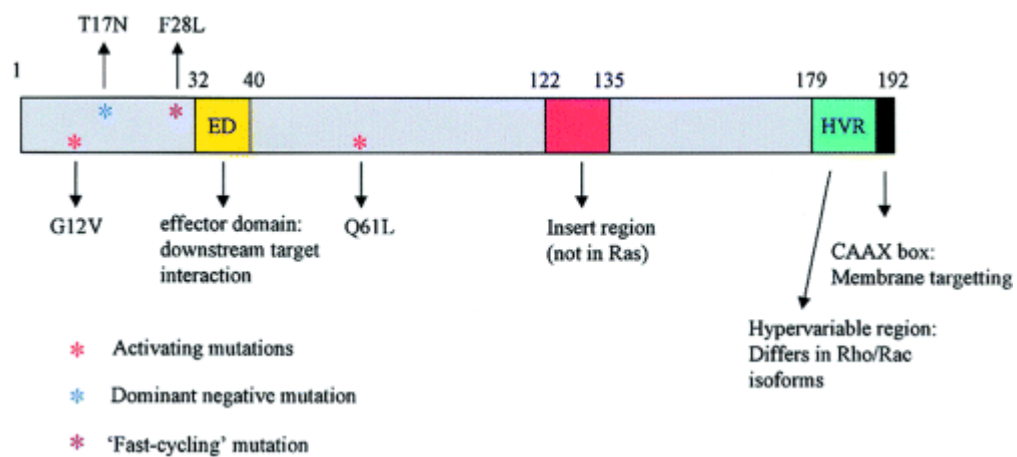


Figura 9. Dominios funcionales de Rac conservados en otras Rho GTPasas. ED, región efectora a través de la que se unen todos los efectores de las Rho GTPasas. *Insert Region*, no presente en la familia de Ras. Se muestran también las mutaciones puntuales comúnmente utilizadas. G12V y Q61L (mutaciones activadoras), F28L (rápido intercambio de GDP por GTP) y T17N (mutación que genera un dominante negativo). La región C-terminal (HVR) es muy variable en las isoformas de Rac (1, 2, 3) y Rho (A, B, C). La secuencia CAAX es la que sufre las modificaciones post-transduccionales esenciales para que las proteínas Rho se unan a membrana. Ridley (a), 2001, *Traffic* 2:303-310.

complejo GDI-GTPasa a la membrana plasmática. Los GEFs interaccionan con la membrana gracias a modificaciones post-transduccionales como la fosforilación por receptores, mientras que las Rho GTPasas se unen a la membrana gracias a su residuo lipídico en el extremo C-terminal. En la membrana plasmática tiene lugar la rápida disociación entre la Rho GDI y la Rho GTPasa y es entonces cuando el GEF produce el intercambio de GDP por GTP. La disociación de la GDI de la GTPasa es facilitada por miembros de la familia ERM que secuestran a la GDI (Takahashi et al., 1998). Una vez unida a GTP, la GTPasa interacciona con efectores que a través de sus correspondientes vías de señalización darán lugar a las correspondientes respuestas celulares. La duración de la señal está estrictamente controlada a través de (i) la degradación de GEF mediante ubiquitinación y (ii) mediante la estimulación por las GAPs de la actividad GTPasa endógena de las Rho GTPasas, la cual suele ser muy baja.

2.5.-PROTEÍNAS REGULADORAS: GEFs, GAPs Y GDIs

Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina: GEFs

Cuando consideramos la amplitud de eventos celulares en los que las Rho GTPasas están implicadas, vemos claro que la activación de estas proteínas ha de estar estrictamente controlada en el tiempo y en el espacio. Dicha actividad depende del intercambio de GDP por GTP.

En condiciones normales, el intercambio de nucleótidos de guanina ocurre muy lentamente (Self y Hall, 1995). Determinadas mutaciones puntuales pueden alterar esta tasa de intercambio (fig. 9). Cambiando el aminoácido fenilalanina de la posición 28 en la secuencia de Cdc42 por una leucina, se acelera la tasa de intercambio de GDP por GTP dando lugar a la acumulación de la proteína en su estado activo (Lin et al., 1997). Sin embargo, en condiciones normales, el intercambio de nucleótidos está normalmente catalizado por los factores de intercambio de nucleótidos de guanina o GEFs. La primera molécula hallada con la capacidad de intercambiar GDP-GTP fue la oncoproteína Dbl (del inglés *diffuse B-cell lymphoma*). Fue identificada por su capacidad de transformar fibroblastos NIH3T3. Esta oncoproteína es el prototipo de una familia de GEFs que en la mayoría de los casos posee en su secuencia un dominio DH (del inglés *Dbl homology domain*) en el extremo N-terminal, adyacente a un dominio

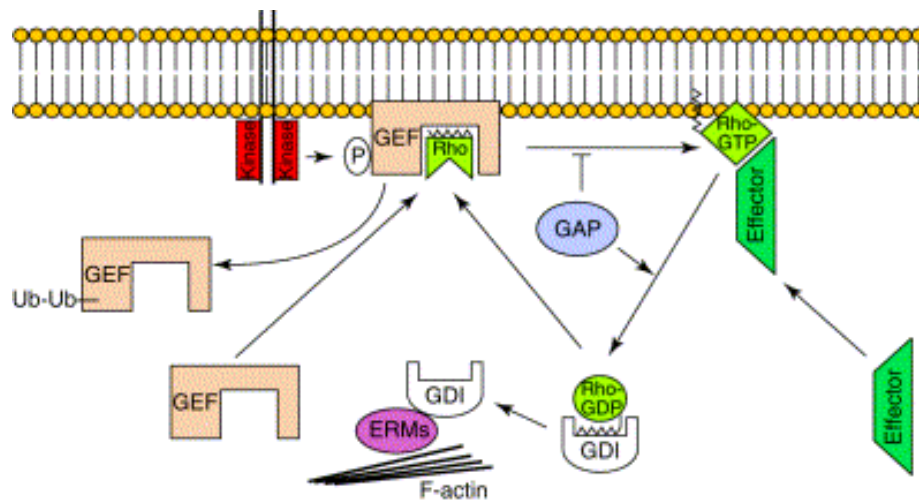


Figura 10. Representación esquemática del modo de actuación de las proteínas reguladoras de las Rho GTPasas. Ver detalles en el texto. *Symons y Settleman, 2000, Trends Cell Biol 10:415-419.*

PH (del inglés *pleckstrin homology domain*) (Erickson y Cerione, 2004). Ambos dominios son imprescindibles para su actividad. Varios miembros de la familia Dbl se han identificado en ensayos de transformación en fibroblastos sin embargo, ningún GEF se ha encontrado mutado o amplificado en ningún cáncer humano.

Hasta hoy, se han identificado más de 50 GEFs para las Rho GTPasas. Como muestra la tabla 1, algunos GEFs son específicos de una sólo Rho GTPasa (Lbc para Rho, Tiam1 para Rac, o FDG1 para Cdc42) mientras que otros pueden llevar a cabo su actividad con varias como es el caso de Vav (Kaibuchi et al., 1999).

La forma de actuar de los GEFs para activar las Rho GTPasas se está empezando a comprender gracias a los datos obtenidos a través de la cristalografía. Estos estudios sugieren que la principal interacción que confiere especificidad a la unión entre una GTPasa y un GEF es la interacción entre el dominio DH y una región α -hélice en la parte N-terminal de la Rho GTPasa. Sería en el dominio DH del GEF donde tiene lugar el intercambio de nucleótidos.

Con respecto al dominio PH de los GEFs parece ser que en algunos casos interviene en su localización subcelular ya que puede unirse a membranas. En otros casos puede contribuir directamente a variar la actividad intercambiadora de los GEFs.

Tras el reconocimiento inicial entre la GTPasa y su GEF, se produce un cambio conformacional en la GTPasa que provoca una disminución de su afinidad por los nucleótidos de guanina lo que combinado con una mayor concentración intracelular de GTP, propicia el desplazamiento del GDP y su intercambio por GTP.

Existen evidencias que muestran que la Rho GTPasa, una vez unido el GTP y por tanto activada, se puede unir al GEF en otros sitios diferentes a aquellos donde se lleva a cabo el intercambio de nucleótidos incrementando así la actividad del mismo.

Proteínas activadoras de la actividad GTPasa endógena: GAPs

Una vez las Rho GTPasas están activadas, dicha activación ha de finalizar mediante la hidrólisis de GTP dando lugar a GDP y un grupo fosfato libre. La tasa intrínseca de hidrólisis de GTP puede ser estimulada por una proteína activadora de la actividad GTPasa o GAP. Determinadas mutaciones puntuales de algunos aminoácidos altamente conservados pueden conducir a una disminución de la actividad GTPasa tanto intrínseca como la estimulada por una GAP dando lugar a que la Rho GTPasa permanezca más

| | | |
|-----|---|--|
| GEF | Dbp Vav1 Dbs Lbc Lfc Lsc Vav2 P115 Rho GEF PDZ-Rho GEF Tiam1 FGD1 Frabin | Rho, Rac, Cdc42 Rho, Cdc42 Rho Rho Rho Rho Rho Rho Rac Cdc42 Cdc42 |
| GAP | p50 Rho GAP p190 RhoGAP Graf myr5 Bcr n-Chimaerin 3BP-1 Abr | Rho, Rac, Cdc42 Rho, Rac, Cdc42 Rho, Cdc42 Rho, Cdc42 Rac, Cdc42 Rac, Cdc42 Rac Rac |

Tabla 1. Reguladores de las proteínas Rho/Rac/Cdc42. *Takai et al., 2001, Physiological Rev. 81:153-208.*

tiempo unida a GTP (Bourne et al., 1991; Barbacid, 1987; fig. 9). Esto es lo que ocurre cuando mutamos el aminoácido glicina en posición 12 (numeración basada en la secuencia de Rac) y se sustituye por una valina o cuando sustituimos el aminoácido glutámico en posición 61 por una leucina.

La primera Rho GAP identificada fue p50 RhoGAP (Garrett et al., 1989). Se observó que era más activa para Cdc42 que para Rho o Rac. Desde entonces se han identificado unas 40 GAPs (tabla 1). Las GAPs comparten un dominio de homología GAP (dominio RhoGAP) que es suficiente para conferirles dicha actividad. Estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) así como estudios de cristalografía han permitido avanzar en el conocimiento de cómo las GAPs facilitan la hidrólisis de GTP. Para ello, la proteína GAP introduce una arginina en el dominio efector de la GTPasa (en inglés *arginine finger*) lo que permite estabilizar el estado de transición de la Rho GTPasa y mantener una adecuada conformación para que se pueda llevar a cabo la hidrólisis de GTP. Por otro lado, el residuo de arginina también permite que la maquinaria hidrolítica de la Rho GTPasa se mantenga en una orientación adecuada para catalizar la reacción de hidrólisis (Nassar et al., 1998).

Inhibidores de la disociación de nucleótidos GDP: GDIs

La proteína Rho GDI se aisló por primera vez como una molécula que interaccionaba de forma específica con GDP-Rho inhibiendo la disociación del GDP. Posteriormente se demostró que Rho GDI era también activa para Cdc42 y Rac.

Hasta la fecha se han caracterizado en mamíferos tres GDIs específicas para las Rho GTPasas:

- Rho GDI.....Ubicuamente expresada
- D4/LyGDI.....Células hematopoiéticas
- GDI γ /RhoGDI-3.....Cerebro y páncreas

La unión de las Rho GTPasas a las GDIs impide el intercambio de nucleótidos de guanina así como la hidrólisis de GTP endógena o estimulada por una GAP. Las GDIs provocan la salida de las Rho GTPasas de las membranas. De hecho, la sobreexpresión de GDIs generalmente inhibe las vías de señalización que normalmente están reguladas por las Rho GTPasas.

En células en reposo, las GTPasas se encuentran mayoritariamente en su forma GDP y

formando complejos con las Rho GDIs en el citoplasma.

La prenilación de las Rho GTPasas es esencial para que las GDIs puedan llevar a cabo su función. Según estudios de cristalografía y RMN las GDIs contienen una hendidura hidrofóbica donde se unen los grupos isoprenos del extremo C-terminal de las GTPasas dando lugar a un complejo soluble en el citoplasma ya que el grupo isoprenil quedaría de esta manera enmascarado y no podría unirse a membranas.

Las GDIs son capaces de interactuar también con ezrina, radixina y moesina. Esta unión favorecería la ruptura del complejo entre la Rho GTPasa y la GDI y por tanto que la Rho GTPasa pueda unirse a membrana y ser activada tras la actuación de un GEF.

2.6.-FUNCIONES BIOLÓGICAS DE RHO, RAC Y CDC42

Como hemos citado anteriormente, la familia de las Rho GTPasas emergió como una rama dentro de la superfamilia de Ras. En principio se sugirió que aunque tenían la misma capacidad de activarse y desactivarse gracias a su actividad GTPasa, cada familia estimularía una vía de señalización específica. Así, los miembros de la familia de las Rho GTPasas regularían la organización del citoesqueleto de actina, los miembros de la familia de Ras controlarían la proliferación celular, los componentes de las familias de Rab y Arf participarían en el tráfico intracelular regulando los movimientos de vesículas entre distintos orgánulos y finalmente los miembros de la familia de Ran intervendrían en el transporte entre el núcleo y el citoplasma (Der Channing y Balch, 2000). Sin embargo, en la actualidad nadie duda de la simplicidad de esta idea. Baste señalar que la familia de las Rho GTPasas, cuando se activan de manera aberrante son capaces de inducir transformación celular (Zohn et al., 1998) al igual que ocurre con los miembros de la familia de Ras. De otro lado, las Rho GTPasas también pueden estar implicadas en transporte intracelular como los miembros de Arf (Wu et al., 2000; Fuccini et al., 2002; Luna et al., 2002).

En los siguientes apartados podremos constatar la diversidad funcional que presenta la familia de las Rho GTPasas.

2.6.a.-Efecto de las Rho GTPasas sobre la organización del citoesqueleto de actina

A principios de los años 90 se empieza a estudiar la familia de las Rho GTPasas, entonces una recién descubierta rama dentro de la superfamilia de Ras. Se observó que

en fibroblastos *Swiss3T3* cuando se estimulaban con agonistas como el ácido lisofosfatídico (LPA del inglés *lisophosphatidic acid*), se producía un incremento en las fibras de estrés y adhesiones focales debido a la activación de Rho (Ridley, 1999; fig. 11 C). De estos resultados se concluyó que Rho regulaba una vía de señalización que une los receptores de membrana con el citoesqueleto de actina.

El siguiente miembro de la familia en ser analizado fue Rac que podía ser activado por varios agonistas como EGF, PDGF o insulina. En cualquier caso su activación conducía al ensamblaje de una red de filamentos de actina en la periferia celular para producir una lamela (lamelipodium) y ondulaciones de membrana (ruffling) (Hall, 1998; Ridley et al., 1992; fig. 11 E). El tercer miembro mejor conocido de esta familia, Cdc42, era capaz de inducir la formación de protusiones filiformes en la superficie celular ricas en actina y conocidas como filopodia (Hall, 1998; Kozma et al., 1995; fig. 11 G). Tanto para Rho como para Rac o Cdc42, los cambios inducidos en el citoesqueleto iban asociados con distintos complejos de adhesión formados por integrinas (fig. 11 D, F, H). Posteriormente se vio que los efectos de las distintas Rho GTPasas sobre el citoesqueleto de actina se podían extender a la práctica totalidad de las células eucariotas.

Reorganizaciones del citoesqueleto de actina inducidas por Rho

La capacidad de Rho de inducir la polimerización de actina es bastante controvertida. De hecho se postula que la formación de fibras de estrés inducida por Rho tiene lugar no a través de la síntesis *de novo* de filamentos, sino mediante el ensamblaje de filamentos de actina ya formados. Así lo indican estudios que muestran que el nivel de polimerización de actina en respuesta a la activación de Rho es relativamente pequeño (Machesky y Hall, 1997; Hall, 1998).

Al menos dos efectores son necesarios para que Rho pueda ejercer su efecto en el citoesqueleto de actina: ROK y mDia.

ROK (del inglés *Rho associated kinase*) incluye dos serina-threonina kinasas conocidas como p164ROK α y p160ROK β (también conocida como ROCK del inglés *Rho-associated coiled-coil containing protein kinase*). La vía de señalización que engloba a estas kinasas sería la siguiente (fig. 12): ROK se activaría tras su unión a Rho-GTP inhibiendo la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP del inglés

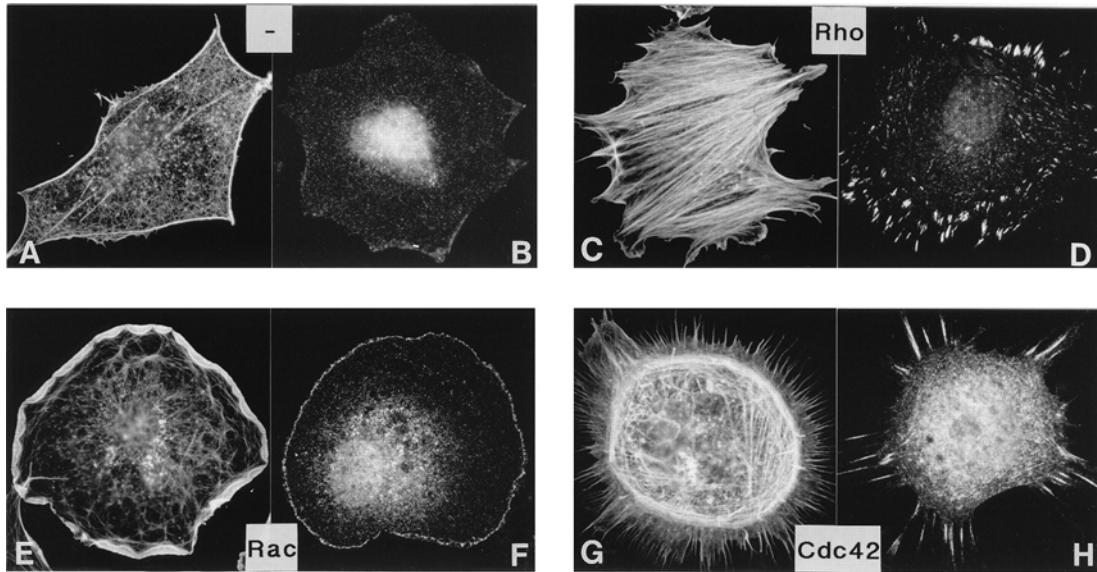


Figura 11. Efecto de Rho, Rac y Cdc42 sobre la organización del citoesqueleto de actina. Los fibroblastos Swiss 3T3 cultivados en ausencia de suero (-) contienen escasos filamentos de actina (A) y escasos complejos de adhesión mediados por vinculina (B). La adición de LPA al medio activa a Rho que promueve la formación de fibras de estrés (C) y de adhesiones focales (D). La microinyección de la forma activa de Rac induce la formación de lamelipodia (E) y de complejos de adhesión (F). La microinyección de FGD1, un GEF de Cdc42, da lugar a la formación de filopodia (G) y de complejos de adhesión asociados (H). Los filamentos de actina se ponen de manifiesto con faloidina rodamina y los complejos de adhesión empleando un anticuerpo frente a vinculina. Escala: 1cm = 25 μ m. Hall, 1998, *Science* 279:509-514.

miosin light chain phosphatase) lo que daría lugar a un incremento en la MLC (del inglés *miosin light chain*) fosforilada que a su vez potenciaría la activación de la miosina. ROK es también capaz de fosforilar directamente a la MLC. Por tanto Rho promueve la contracción dependiente de miosina dando lugar a un incremento en la tensión que conduce a la formación de fibras de estrés y de adhesiones focales. Esta actividad de Rho es totalmente opuesta a la inactivación de MLCK (del inglés *miosin light chain kinase*) por Rac y Cdc42 a través de PAK (ver mas adelante) y quizá explique efectos antagónicos entre Cdc42, Rac y Rho en algunos tipos celulares.

Aunque ROK es esencial para la formación de fibras de estrés dependientes de Rho, su activación no es suficiente (Sahai et al., 1998) ya que se ha observado que las formas constitutivamente activas de ROK dan lugar a prominentes fibras de estrés pero con un aspecto anormal, más gruesas que cuando se sobreexpresa la forma activa de Rho.

Una segunda diana de Rho sería mDia. Se trata de una proteína capaz de unirse a la profilina y a la G-actina. mDia es el homólogo en mamíferos de la proteína *Diaphanous* en *Drosophila* necesaria para la citocinesis. mDia así como *Diaphanous* son miembros de la familia de las forminas (Li y Higgs, 2003; ver apartado 1.4.b pág. 24). Se postula que mDia estaría implicada en la correcta organización de las fibras de estrés. Así, cuando co-expresamos mDia y ROK, el aspecto de las fibras de estrés es normal (Watanabe et al., 1999). A pesar de todo, la función exacta en la que está implicada mDia está todavía por determinar.

Otra dianas efectoras de Rho serían proteínas del citoesqueleto como LIMK. Esta kinasa puede ser fosforilada y activada por ROK y también por PAK, el principal activador de Rac y Cdc42, revelando un punto de convergencia entre las vías de Cdc42, Rac y Rho. La activación de LIMK estabiliza los filamentos de actina (ver apartado 1.4.a pág. 18 y fig. 5) ya sean los que constituyen las fibras de estrés o los que aparecen en la zona subcortical de la membrana plasmática. Otras dianas para Rho que también participan en la organización del citoesqueleto de actina son la kinasa Citron y la fosfatidil inositol-4-fosfato 5-kinasa (PI-4P5K). Son varias las observaciones que muestran que los lípidos, especialmente PIP₂, facilitan los procesos de polimerización de actina (Janmey et al., 1987). Existen trabajos que muestran que Rho regula la síntesis de PIP₂ interaccionando (de una manera indirecta e independiente de GTP) con PI-4P5K

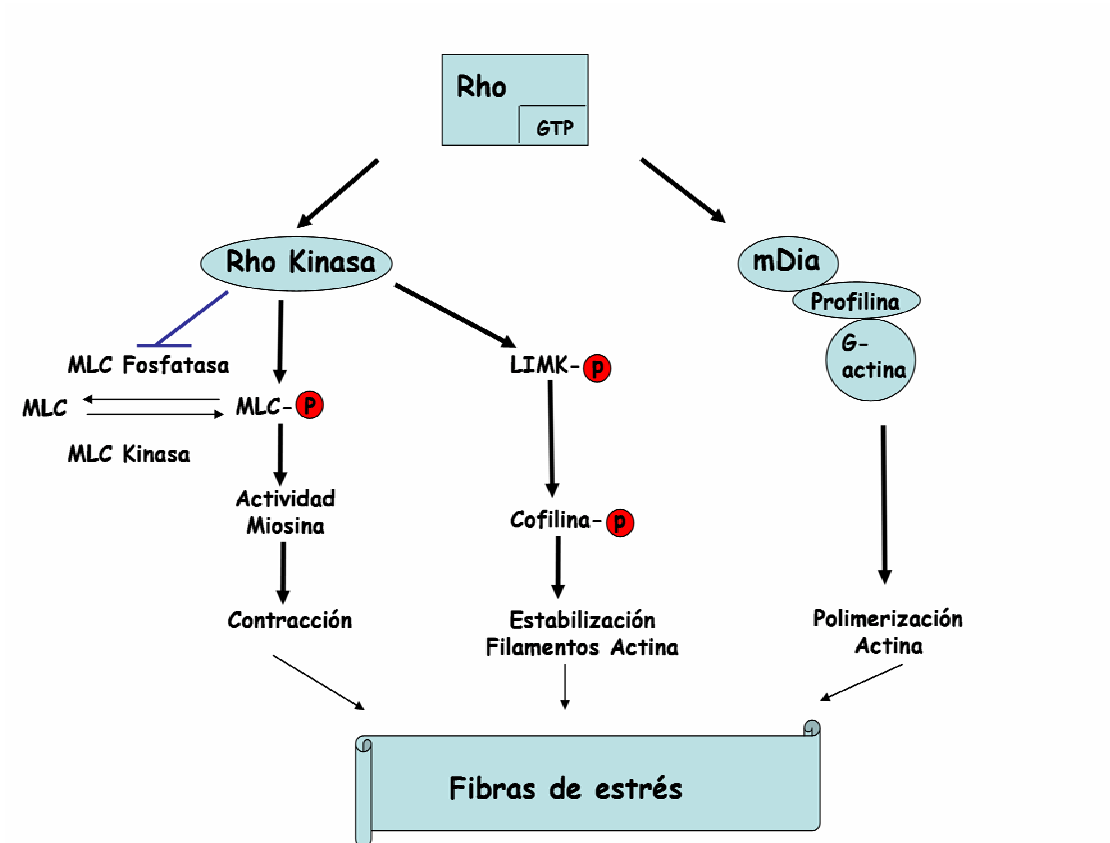


Figura 12. Señalización de Rho implicada en promover reorganizaciones del citoesqueleto de actina. Las flechas gruesas indican señales de activación directas. Las señales de inhibición están representadas por líneas en azul. Las flechas más delgadas indican el resultado neto de la vía de señalización. Ver detalles en el texto. Modificado de *Burridge y Wennerberg, 2004, Cell 116:167-179.*

(Ren et al., 1996) incrementando su actividad y por tanto la producción de PIP₂ (Weernink et al., 2000).

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, de las ondulaciones de membrana y los filopodia inducidas por Rho, Rac y Cdc42, respectivamente. Las proteínas ERM actuarían como anclaje de los filamentos de actina a la membrana plasmática lo que sería empleado por las Rho GTPasas para inducir sus efectos en el citoesqueleto de actina.

Reorganizaciones del citoesqueleto de actina inducidas por Rac

La sobreexpresión de Rac causa la formación de ondulaciones de membrana que están íntimamente relacionadas con el lamelipodium. El lamelipodium está constituido por delgadas protusiones de membrana que aparecen en el frente de avance de las células en migración y a menudo acaban evolucionando hacia ondulaciones de membrana (ruffling) cuando dichas protusiones dejan de estar adheridas y se repliegan hacia atrás sobre la superficie celular. El significado de estas estructuras no es del todo claro pero se cree que están más relacionadas con la macropinocitosis que con los procesos de migración celular (Ridley et al., 1992; Barsagi y Feramisco, 1986).

Mientras el papel de Rho como activador de la polimerización de actina es bastante controvertido, Rac es un potente activador de dicha polimerización. Al igual que ocurre con Rho, Rac puede estimular la actividad de PI-4P5K (Tolias et al., 2000) incrementando así los niveles de PIP₂ (fig. 13). Aunque este proceso favorecería la polimerización de actina en el lamelipodium, actualmente se considera que Arp2/3 es el principal efector de Rac para inducir la polimerización de actina en el frente de avance. Rac puede activar a Arp2/3 a través de las proteínas Scar/WAVE (fig. 13; ver pág 14). Otro efector menos conocido de Rac es la proteína POR1 (del inglés *partner of Rac1*) que ha sido implicada en la formación del lamelipodium (van Aelst et al., 1996).

Reorganizaciones del citoesqueleto de actina inducidas por Cdc42

Estudios de transfección y microinyección han demostrado que Cdc42 induce la formación de filopodia y microespinas (Nobes y Hall, 1995; Kozma et al., 1995). Los

filopodia son delgadas protusiones de membrana surcadas por largos filamentos de actina que se disponen de forma paralela y se organizan en apretados haces (Small et al., 1978; Lewis y Bridgman, 1992; Small et al., 2002) entrecruzados por proteínas de unión a actina. Las microespinas por su parte son haces paralelos de filamentos de actina pero en el lamelipodium (Svitkina et al., 2003). La función bioógica de estas estructuras es todavía desconocida. Parece que desempeñan un papel sensorial más que constituir una fuerza propulsora en los procesos de migración. Estas organizaciones del citoesqueleto de actina inducidas por Cdc42 están mediadas por N-WASP y Arp2/3 (fig. 13) aunque este último parece ser que sólo participa en el inicio de la formación de los filopodia tras lo cual se disocia rápidamente (Svitkina y Borisy, 1999).

Otros efectores de Cdc42 implicados en procesos de reorganización de actina son las quinasas MRCK, PI3K, los fosfoinosítidos (PI(4,5)P₂) y la proteína CIP4.

Efectores comunes de Rac y Cdc42 implicados en reorganizaciones del citoesqueleto de actina: PAKs e IQGAPs

Algunas proteínas efectoras son compartidas por las Rho GTPasas Rac y Cdc42, para inducir la formación de lamelipodia o filopodia, respectivamente (fig.13). El ejemplo más significativo lo constituyen las proteínas PAK. Inicialmente fue descubierta en cerebro de rata una proteína capaz de unirse a GTP-Cdc42 y GTP-Rac1 pero no a GTP-RhoA a la que se denominó p65PAK.

Actualmente existen tres isoformas mayoritarias, PAK1 que se encuentra en cerebro, músculo y bazo, PAK2 que es la más ubicua y PAK3 que se localiza sólo en tejido nervioso. Las tres isoformas contienen un dominio N-terminal rico en prolina que puede interactuar con proteínas que contengan dominios SH3 como es el caso de la proteína adaptadora Nck. Seguidamente se encuentra un dominio CRIB a través del cual se unen a GTP-Cdc42 y GTP-Rac1. Finalmente contienen un dominio C-terminal con actividad serina-treonina quinasa. Con posterioridad se encontró una nueva isoforma, PAK4 (Abo et al., 1998) que interactúa específicamente con GTP-Cdc42 pero no interactúa con GTP-Rac1.

Con respecto a PAK1-3 es difícil decidir si son dianas de Rac1, Cdc42 o bien de ambas. Estudios *in vitro* muestran que PAK1 es activada más eficazmente por Cdc42 que por Rac1 (Manser et al., 1995) mientras que PAK2 parece ser una diana específica de Rac1.

Los estudios que muestran la implicación de PAK en las reorganizaciones del citoesqueleto de actina son bastante controvertidos. Así, algunos trabajos muestran que PAK puede inducir la formación de filopodia y ondulaciones de membrana (Sells et al., 1997; Daniels et al., 1998) mientras que trabajos de otros grupos no encuentran que la sobreexpresión de PAK tenga algún efecto sobre el citoesqueleto de actina (Lamarche et al., 1996; Joneson et al., 1996). Una hipótesis que auna ambas posturas postula que las proteínas PAKs podrían regular el citoesqueleto de actina pero sólo en colaboración con otras proteínas señalizadoras. De hecho son mucho los sustratos de PAK que podrían afectar al citoesqueleto de actina: filamina (se cree que ayuda a confinar la actividad de las Rho GTPasas a regiones locales de la membrana plasmática; Burridge y Wennerberg, 2004), LIMK (se puede considerar como un punto de convergencia entre Rho, Rac y Cdc42), miosina, el complejo paxilina/Pix/PKL y la proteína adaptadora Nck.

Con respecto a las proteínas IQGAPs, en mamíferos se han hallado dos: IQGAP1 e IQGAP2. Ambas presentan un dominio GRD (del inglés *GAP-related domain*) que conserva un alto grado de homología con el dominio catalítico de Ras-GAP pero que carece de actividad GAP. A continuación presentan un dominio CH que se cree interacciona con la actina y finalmente un dominio constituido por cuatro repeticiones en tandem conocido como IQ capaz de unir calmodulina. Ambas proteínas pueden interaccionar con Cdc42 y con Rac1 pero no con Rho. Ya que IQGAPs no contienen dominio CRIB, su unión con las Rho GTPasas se lleva a cabo a través de su dominio GRD (Hart et al., 1996).

IQGAP1 podría mediar los efectos de Cdc42 sobre el citoesqueleto de actina y sobre la adhesión celular ya que (i) es capaz de entrecruzar filamentos de actina (Bashour et al., 1997; Fukata et al., 1997), (ii) IQGAP1 y actina coinmunoprecipitan en un complejo junto con Cdc42 (Erickson et al., 1997), (iii) IQGAP1 se localiza en ondulaciones de membrana y en el lamelipodium pero no en fibras de estrés (Bashour et al., 1997) y (iiii) en células polarizadas, IQGAP1 aparece en contactos célula-célula colocalizando con β -catenina y E-cadherina (Kuroda et al., 1996; Kuroda et al., 1998, respectivamente).

Con respecto a IQGAP2, presenta un 62% de homología con IQGAP1 y como hemos indicado al principio, ambas contienen los mismos dominios estructurales.

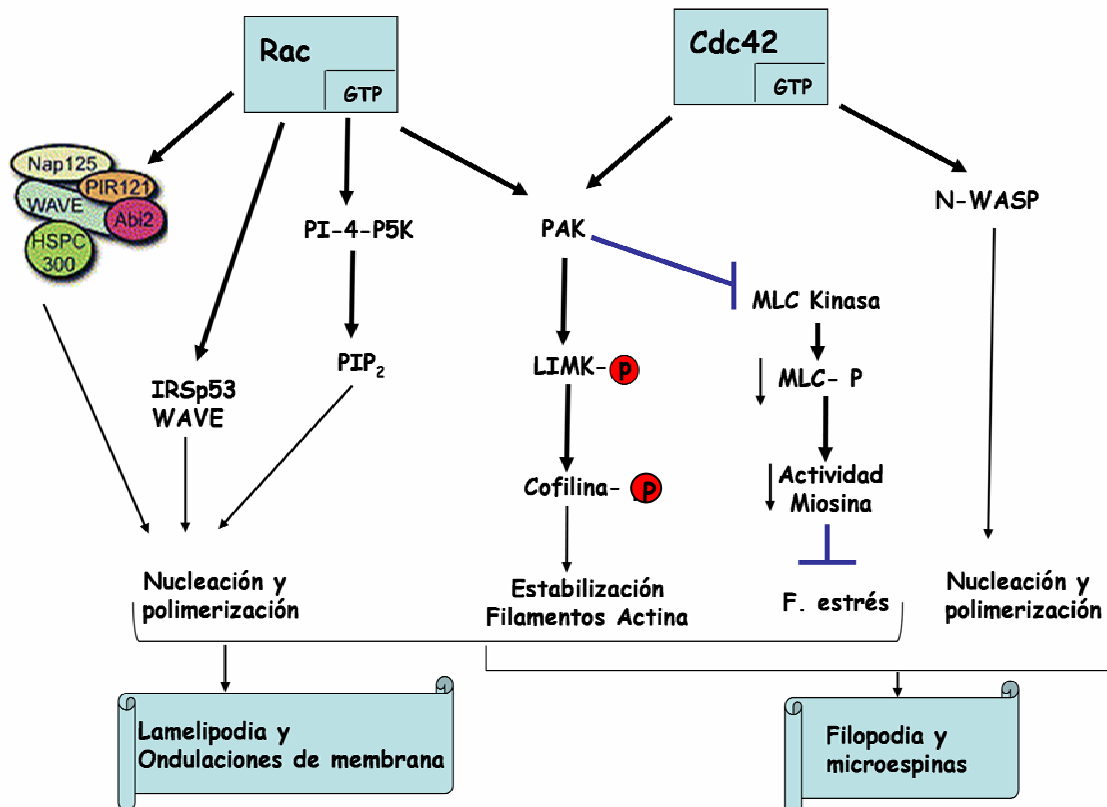


Figura 13. Señalización de Rac y Cdc42 implicada en promover reorganizaciones del citoesqueleto de actina. Las flechas gruesas indican señales de activación directas. Las señales de inhibición están representadas por líneas en azul. Las flechas más delgadas indican el resultado neto de la vía de señalización. Ver detalles en el texto. Modificado de *Burridge y Wennerberg, 2004, Cell 116:167-179.*

Preferentemente interacciona con GTP-Cdc42 y en menor medida con GTP-Rac1. Aunque las IQGAPs no tiene actividad GAP contra ninguna GTPasa presentan todas las características de una proteína de anclaje capaz de interaccionar con multitud de proteínas de señalización.

2.6.b.- Rho GTPasas y la polaridad celular

La polaridad es un proceso imprescindible para la proliferación celular, para la diferenciación y para la morfogénesis. Esto significa que todas las células son capaces de polarizarse, al menos transitoriamente, ya sea durante la división celular o bien para adoptar formas especializadas que les permitan llevar a cabo funciones específicas como la migración. Cdc42 juega un papel central en el establecimiento de la polarización celular en todas las células eucariotas independientemente del contexto biológico en el que se lleve a cabo este proceso y de las características particulares de cada tipo celular. Evolutivamente, el hecho de que un proceso celular de esta relevancia tenga como protagonista central esta única molécula tiene una gran ventaja ya que todas las señales extra e intracelulares recibidas por la célula son procesadas e integradas por una única molécula que finalmente establece un único y apropiado eje de polaridad.

Como comentábamos al inicio de este apartado, la polarización celular también es un proceso imprescindible para las células en migración. En células animales, la migración celular está dirigida por estímulos extracelulares que actúan como repelentes ó atractivos (Raftopoulou y Hall, 2004). Para que la célula pueda migrar, es imprescindible que adopte una morfología polarizada con una parte frontal que se extiende e indica la dirección de avance, y una parte trasera que se contrae y sigue al frente de avance (Ridley, 2001 (b)). Rac se necesita en el frente celular para regular la polimerización de actina que dará lugar a la formación del lamelipodium. Es pues la encargada de inducir la formación de una morfología polarizada. Rho por su parte es requerida para regular las fuerzas de contracción y de retracción en la parte trasera de la célula (Raftopoulou y Hall, 2004). En lo que respecta a Cdc42, al igual que Rac se necesita en el frente de avance donde induce la polimerización de actina para formar los filopodia (Nobes y Hall, 1995). Estas delgadas protusiones de membrana podrían intervenir como sensores del ambiente extracelular (Ridley, 2001(b)) aunque en muchos

casos se ha visto que su formación no es imprescindible para que se lleve a cabo la migración (Sepp y Auld, 2003). Es importante indicar, que el papel que desempeña Cdc42 está en relación con la orientación y el mantenimiento de una morfología polarizada más que en la obtención de una forma polarizada que implicaría a otras Rho GTPasas especialmente a Rac.

Otro de los ejemplos mejor estudiados de polaridad celular es la formación de un epitelio. Una célula epitelial típica presenta una morfología polarizada que se caracteriza por la presencia de contactos célula-célula especializados así como una distribución asimétrica de proteínas en la cara lateral, basolateral y apical. Para preservar de manera continuada estos dominios de membrana son imprescindibles las uniones adherentes (Vasioukhin et al., 2000) que constituyen una fuerte unión mecánica entre las células adyacentes y las uniones estrechas (Tepass et al., 2001) que forman una barrera física para evitar la difusión de lípidos y proteínas entre los dominios apical y basolateral de la misma célula. Asimismo es necesario el establecimiento de contactos célula-matriz extracelular (Etienne-Manneville y Hall, 2002). En esta célula prototipo el citoesqueleto de actina así como los microtúbulos están reorganizados de tal manera que el transporte vesicular también está polarizado (Etienne-Manneville, 2004). En conjunto todos estos elementos permiten establecer y mantener las características de una célula epitelial y en todos ellos se encuentra implicada Cdc42 que coopera en algunas ocasiones con Rho y Rac, (formación de uniones adherentes; Vasioukhin et al., 2000; Van Aelst y Symons, 2002, contactos célula-matriz extracelular; O'Brien 2001, reorganización de los microtúbulos; Palazzo et al., 2001; Daub et al., 2001; Etienne-Manneville y Hall, 2003 y transporte vesicular; Apodaca et al., 2001; Kroschewski et al., 1999; Müsch et al., 2001) o con otras familias de proteínas como la familia Par (formación de uniones estrechas; Yamanaka et al., 2001).

2.6.c.- Rho GTPasas y el tráfico intracelular

Las primeras evidencias de que las Rho GTPasas estaban implicadas en el tráfico de membranas proceden de estudios sobre su localización. Así el grupo de Allan Hall localizó a Rho B en los endosomas tardíos y en los lisosomas (Adamson et al., 1992) y un poco más tarde el laboratorio de R. Cerione y colaboradores mostraron que Cdc42

estaba asociada al aparato de Golgi (Erickson et al., 1996). En un principio, sus funciones en estos lugares eran totalmente desconocidas ya que eran conocidas como proteínas reguladoras del citoesqueleto de actina y por aquel entonces se postulaba que las vesículas se movían a través de microtúbulos. Posteriormente han ido apareciendo multitud de evidencias que indicaban que el citoesqueleto de actina también está implicado en el tráfico vesicular (Qualmann et al., 2000; Valderrama et al., 2001; Luna et al., 2002) y por tanto, algunas Rho GTPasas podían estar directamente implicadas como reguladoras de la movilidad de las vesículas dependiente de actina. Actualmente se confirma que, de forma diversa, las Rho GTPasas están implicadas en todas las etapas del tráfico intracelular.

Endocitosis

La forma mas conocida de endocitosis es la que se lleva a cabo a través de las vesículas recubiertas de clatrina pero existen otros tipos de endocitosis independientes de clatrina como: endocitosis mediada por caveolas (Parton et al., 1994), endocitosis independiente de clatrina y caveolas (Lamaze et al., 1995), fagocitosis (Aderem et al., 1999) y pinocitosis (Mukherjee et al., 1997).

En los procesos de pinocitosis y fagocitosis son imprescindibles tanto el citoesqueleto de actina como las Rho GTPasas que lo regulan. Rac1 (y en algunos modelos celulares Cdc42) se encarga de regular los procesos de pinocitosis (Dharmawardhane et al., 2000; Ridley et al., 1992). En cuanto a la fagocitosis, dependiendo del receptor empleado por la célula fagocítica, está regulada por Cdc42 y Rac (cuando el receptor es Fcγ; Massol et al., 1998) o por RhoA (si interviene el receptor del complemento CR3; May et al., 2000). Menos se conoce sobre la participación de las Rho GTPasas en los procesos de endocitosis mediada por caveolas o endocitosis independiente de clatrina y caveolas. En el primer caso se ha demostrado que las formas activas de RhoA y de Rac se localizan en caveolas (Michaely et al., 1999) pero la relevancia funcional de este dato se desconoce. En el segundo caso no se conocen muchos ejemplos de proteínas que opten por esta vía de internalización y los que se dan ocurren sólo en determinados tipos celulares, lo que ha llevado a sugerir que se trata de un proceso que ocurre en circunstancias especiales.

En la endocitosis mediada por clatrina, a diferencia de lo que ocurre en fagocitosis y

pinocitosis, el citoesqueleto de actina no es absolutamente necesario para el proceso de internalización (Qualmann et al., 2000; Schafer, 2002; Fujimoto et al., 2000). De otro lado, las Rho GTPasas tampoco tienen una función imprescindible en este proceso pero numerosos estudios sugieren que regulan la eficiencia de la internalización. Así, las formas activas de RhoA y Rac bloquean la internalización del receptor de la transferrina (Lamaze et al., 1996). En lo que respecta a Cdc42, en un principio los datos experimentales obtenidos señalaban a la polimerización de actina inducida por la forma activa de Cdc42 como un componente necesario para este tipo de endocitosis (McGavin et al., 2001; Zhang et al., 1999). Reforzando estos datos, Merrifield y colaboradores (Merrifield et al., 2002) muestran una acumulación de actina en el cuello de la vesícula justo antes de la internalización. Sin embargo, estudios con el dominante negativo de Cdc42, muestran que esta Rho GTPasa no es absolutamente necesaria para la endocitosis mediada por clatrina (Kroschewski et al., 1999). El conjunto de los datos expuestos llevó a pensar que la dependencia de actina de este proceso sólo ocurría en determinado tipo de condiciones, es el caso las células epiteliales MDCK en donde la internalización de IgA en la cara apical está inhibida por el dominante negativo de Cdc42 pero no se afecta la internalización en la cara basolateral (Rojas et al., 2001). Sin embargo el grupo de Merrifield y colaboradores sigue aportando datos que apoyan la importancia de la polimerización de actina en este proceso. Así un estudio muy reciente en fibroblastos *Swiss3T3* muestra que tanto Arp3, una subunidad del complejo proteico Arp2/3, como N-WASP, su principal activador, son reclutados transitoriamente mientras se está formando la vesícula de clatrina. Sugieren pues que la polimerización de actina está implicada en los últimos pasos de la endocitosis mediada por clatrina actuando en el proceso de separación de la vesícula de la membrana plasmática así como en su posterior alejamiento de la membrana plasmática (Merrifield et al., 2004).

Transporte en la zona retículo endoplasmático (RE)-complejo de Golgi (CG)

El hecho de que numerosos trabajos pusieran de manifiesto la importancia del citoesqueleto de actina en la vía secretora hicieron que las Rho GTPasas, cuya función mejor conocida es la de regular la dinámica de la actina, ocuparan un papel central en los estudios de transporte intracelular. Durante estos últimos años se ha esclarecido su función en las diferentes etapas de la endocitosis pero poco se conoce sobre el papel que

juegan en el transporte que transcurre en la zona RE/complejo de Golgi.

Efectivamente, los primeros estudios que implican a las Rho GTPasas en la vía secretora son aquellos que muestran alteraciones en el tráfico vesicular en presencia de drogas que afectan al citoesqueleto de actina (ver apartado 3.6.b pág 64). Posteriormente fueron apareciendo trabajos que demostraban la localización de un gran número de proteínas relacionadas con actina en el CG incluida la propia actina (Godi et al., 1998; Heimann et al., 1999; Fuccini et al., 2000; Valderrama et al., 2000). Son numerosas también las evidencias que implican a las miosinas en el transporte a nivel del Golgi (ver revisión Allan y Schroer, 1999; Durán et al., 2003). Pero quizá el descubrimiento clave fue la localización predominante en el CG de Cdc42 en células de mamífero (Erickson et al., 1996). Estudios posteriores de otros laboratorios han confirmado esta localización (Fuccini et al., 2002; Luna et al., 2002).

Se observó que en el CG, Cdc42 tenía un comportamiento muy similar al coatómero, un complejo formado por siete polipéptidos que constituye una cubierta en algunas vesículas que emergen del CG (ver más adelante). Una posible explicación de la localización de Cdc42 en el CG y de su relación con el coatómero apareció tras el descubrimiento de que la forma activa de esta Rho GTPasa interacciona directamente con la subunidad γ del coatómero (Wu et al., 2000). Este hecho hizo que numerosos estudios se volcasen en averiguar el papel de Cdc42 en el tráfico vesicular desde y hacia el CG. Así se observó que las formas constitutivamente activas o inactivas de Cdc42 provocaban defectos en el transporte vesicular, concretamente alteraban el transporte de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) desde el RE hacia el CG (Wu et al., 2000) y el transporte de la toxina de *Shigella* (Shiga-Toxin) desde el CG hacia el RE (Luna et al., 2002).

Otros estudios relacionan a Cdc42 con el transporte post-Golgi. Así, Mellman y colaboradores demuestran que la forma inactiva de Cdc42 bloquea el transporte basolateral (Kroschewski et al., 1999). Posteriormente, Müsch y colaboradores muestran que las formas inactiva o activa de Cdc42 inhiben el transporte basolateral del receptor de las LDL (Müsch et al., 2001).

En definitiva todos estos estudios ponen de manifiesto la importancia de Cdc42 durante el transporte de proteínas a nivel del complejo de Golgi. Sin embargo, poco se conoce

acerca del papel de Rho y Rac en el transporte a este nivel ni de los efectores a través de los cuales Cdc42 lleva a cabo esta función. En lo que concierne al modo de actuación de Cdc42, una posibilidad es que la interacción coatómero-Cdc42 regule la polimerización de actina y el transporte de proteínas a través de un proceso que requiere de N-WASP y Arp2/3. Así, por una parte se ha demostrado que la forma activa de Cdc42 es reclutada a las membranas de Golgi a través de su unión con el coatómero (Fuccini et al., 2002; Wu et al., 2000) y una vez allí estimula la polimerización de actina (Fuccini et al., 2002; Chen et al., 2004). De otro lado, nuestro laboratorio ha demostrado que la activación de Cdc42 recluta N-WASP a las membranas de Golgi (Luna et al., 2002).

3.-TRÁFICO DE MEMBRANAS ENTRE EL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO Y EL COMPLEJO DE GOLGI

3.1.-GENERALIDADES

El transporte entre el retículo endoplasmático (RE) y el complejo de Golgi (CG) es sólo un paso en la vía de secreción encargada de transportar glicoproteínas y lípidos a la superficie celular y otros orgánulos intracelulares.

Las funciones del RE y del CG, así como la necesidad de mantener estos orgánulos, requieren un transporte bidireccional de proteínas y de lípidos (carga) a través de intermediarios de transporte (ITs) sean de tipo vesicular o de naturaleza tubular. Así, denominamos transporte anterógrado al flujo de carga que acontece entre el RE y el CG mientras que el transporte retrógrado tiene lugar sentido contrario, esto es desde el CG hacia el RE. Su función es devolver proteínas residentes de RE que se han escapado por la vía anterógrada (Pelham, 1991) y equilibrar las cantidades de membrana consumidas en el transporte anterógrado (Kelly, 1999; Warren y Mellman, 1999).

En el tráfico de membranas entre el RE y el CG intervienen dos tipos de ITs: COPI y COPII que se distinguen por su composición proteica, por su ubicación y por su direccionalidad en el transporte.

3.2.-FORMACIÓN DE INTERMEDIARIOS DE TRANSPORTE A PARTIR DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO Y DEL COMPLEJO DE GOLGI

Las membranas del RE encaradas hacia el *cis*-Golgi tienen la particularidad de presentar parte de su superficie desprovista de ribosomas y con evaginaciones (fig. 14). Estas zonas constituyen los elementos transicionales (TE, del inglés *transitional elements*) o sitios de salida (Farquhar et al., 1974; Sessa et al., 1994) y representan el lugar de exportación de carga que abandona el RE (Palade, 1975), por lo que de estas zonas emergen continuamente perfiles vesiculares con cubierta proteica COPII.

Entre el RE y el CG se sitúa el compartimento intermedio (CI o ERGIC). Consiste en un conjunto de membranas tubulares y vesiculares (VTC, del inglés *vesiculo-tubular clusters*) (Hauri y Schweizer, 1992) acumuladas en los sitios de salida del RE (Bannykh et al., 1996). En determinadas condiciones experimentales (incubación a 15°C o tratamientos con la droga brefeldina A (BFA), ciertas proteínas ciclantes (receptor de

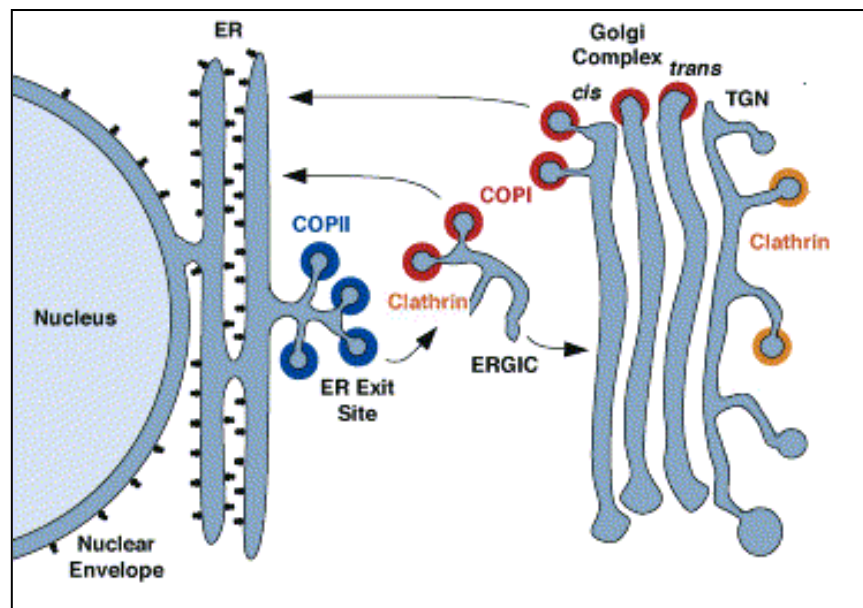


Figura 14. Esquema representativo de la vía secretora donde se reflejan los compartimentos intracelulares que participan. Las vías de transporte están indicadas por flechas. Los colores indican los lugares donde se localizan los intermediarios de transporte COPII (azul), COPI (rojo) y clatrina (naranja). *Bonifacino y Glick, 2004, Cell 116:153-166.*

KDEL, ERGIC53) se acumulan preferentemente en esta localización (Klumperman et al., 1998; Martínez-Alonso et al., 2004). Los perfiles vesiculares que emergen del CI presentan cubierta proteica COPI en lugar de COPII. La hipótesis generalmente aceptada para explicar el tránsito de proteínas desde el RE hacia el CG es como sigue: inicialmente las proteínas abandonan el RE en intermediarios de transporte COPII, rápidamente esta cubierta proteica es sustituida por COPI (Aridor et al., 1995; Rowe et al., 1996; Scales et al., 1997). Este intercambio tendría lugar antes de que las proteínas en tránsito alcancen el CI o bien una vez han llegado al mismo (Rowe et al., 1996). Los elementos membranosos que salen del CI son transportados como tales hasta la cara *cis* del CG (Ladinsky et al., 1999). En sentido contrario (CG hacia RE) el transporte mediado por COPI (Cosson et al., 1997) o el COPI independiente (White et al., 1999), se encargan de devolver membranas y proteínas al RE para compensar el transporte anterógrado.

Modelos que explican el tráfico de membranas entre el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi

La naturaleza de los intermediarios que median el transporte RE/CG es otro aspecto de gran debate. Inicialmente se postulaba que el transporte entre ambos orgánulos estaba mediado por vesículas de 60-80 nm de diámetro (modelo vesicular, Rothman, 1994; Rothman y Wieland, 1996; Schekman y Orci, 1996). Sin embargo, este modelo no explicaba el mecanismo por el que proteínas de gran tamaño como el procolágeno en fibroblastos (Bonfanti et al., 1998) eran transportados desde el RE al CG. Surge entonces el modelo de progresión de cisternas según el cual, las cisternas en la cara *cis* del CG se formarían por coalescencia de membranas derivadas del RE. Desde la cara *cis* las cisternas se moverían hacia la cara *trans* manteniendo en su interior el cargo, y una vez en la red *trans* Golgi (TGN, del inglés *trans Golgi network*) ésta se fragmentaría en ITs hacia los diferentes destinos (Clermont et al., 1993; Becker y Melkonian, 1996). Este modelo no explicaba como se puede mantener cada cisterna con su dotación particular de enzimas. Se propuso entonces el modelo de maduración de cisternas. Se trata de una modificación de los modelos anteriores. Según este modelo, el cargo se transporta en base al modelo de progresión de cisternas, mientras que a través de ITs (vesículas) se transportarían retrógradamente las enzimas que pertenecen a las cisternas

del *cis* Golgi y que han progresado hacia la zona *trans* (Bannykh y Balch, 1997; Mironov et al., 1997; Pelham, 1998).

Además de los ITs con cubiertas proteicas de tipo COPI o de tipo COPII, datos recientes postulan la existencia de otro tipo de intermediarios de transporte (Mironov et al., 2003). Se trata de extensiones tubulares que emergen de los sitios de salida del RE. Un análisis detallado de estos intermediarios de transporte revela la existencia de cuatro tipos de estructuras tubulares que representan diferentes estados de maduración del mismo tipo de intermediario de transporte. La existencia de estas estructuras tubulares también se ha puesto de manifiesto en estudios sincronizados de transporte de una proteína fluorescente llevados a cabo en células vivas (Lippincott-Schwartz et al., 1998). En estos estudios se observaron estructuras de 0.4-1 μm de diámetro a la salida del RE. Para algunos autores, estos intermediarios de transporte de gran tamaño surgen de sitios de salida del RE periféricos y por tanto muy distantes del CG, mientras que las típicas vesículas COPII se formarían en aquellos sitios de salida del RE adyacentes al CG y mediarían por tanto el transporte a corta distancia (Mironov et al., 2003).

3.3.-COMPLEJOS MULTIPROTEICOS COP

3.3.a.-COPI

La cubierta multiproteica de los ITs COPI (Malhotra et al., 1989) está formada por los polipéptidos α , β , β' , γ , δ , ϵ , ζ que se encuentran asociadas formando un complejo citosólico denominado coatómero (Waters et al., 1991). El ensamblaje del coatómero requiere la participación ineludible de la GTPasa ARF1. Esta GTPasa se distribuye subcelularmente de forma diferente en función de si se encuentra unida a GTP (activada) o unida a GDP (inactivada). En el primer caso se une a las membranas del CG mientras que en su estado GDP aparece soluble en el citoplasma. La unión a membrana se realiza a través de una molécula de ácido mirístico (Kahn et al., 1991). La translocación de la forma soluble a las membranas del complejo de Golgi es dependiente de GTP e implica por tanto un intercambio de nucleótidos que está catalizado por proteínas reguladoras como GEFs (Donaldson et al., 1992; Helms y Rothman, 1992). Una vez que ARF1-GTP se encuentra unido a la membrana del CG induce a su vez el ensamblaje del coatómero presente en el citosol lo que provoca la

deformación de la membrana y el inicio de la formación del IT. Una vez se ha reclutado el cargo, tiene lugar el desensamblaje de la cubierta COP que se inicia con la hidrólisis de la molécula de GTP de ARF1 favorecida por la actividad de una proteína GAP (ARF1 GAP) (Cukierman et al., 1995).

3.3.b.-COPII

En levaduras, la cubierta proteica de las vesículas COPII está constituida por dos complejos integrados: uno de 700 KDa formado por las proteínas Sec13p/Sec31p y otro de 400 KDa formado a su vez por Sec23p/Sec24p junto con Sar1p. Este último componente es una GTPasa (Barlowe et al., 1994) cuya función es análoga a la de ARF1 en los ITs COPI. El ciclo de actividad de esta GTPasa está regulado por Sec23p, uno de los componentes de la misma cubierta COPII que actúa como una GAP (Yoshihisa et al., 1993) y por Sec12p, una proteína endógena del RE que actúa como un GEF (Barlowe y Schekman, 1993).

El ensamblaje de estas proteínas se explica por un modelo (fig. 15) según el cual Sec12p activaría a Sar1p presente en las membranas del RE induciendo el intercambio de nucleótidos. Una vez la GTPasa Sar1p está unida a GTP estimula el ensamblaje de los complejos Sec31/Sec13p y Sec23p/Sec24p en las membranas del RE y tiene lugar la formación del IT. El ciclo finaliza con la hidrólisis de GTP llevada a cabo por Sec23p lo que induce el desensamblaje de la cubierta COPII previo al proceso de fisión (Oka y Nakano, 1994; Yoshihisa et al., 1993).

Se ha identificado otra proteína, Sec16p capaz de interactuar con Sec23p, Sec24p y Sec31p a través de dominios diferentes (Espenshade et al, 1995; Gimeno et al, 1996; Shaywitz et al., 1997) por lo que se ha sugerido que podría funcionar anclando a las proteínas COPII citosólicas a la membrana del RE.

Existen numerosos datos experimentales que indican que en mamíferos la formación de las vesículas COPII se realiza por el mismo mecanismo que en levaduras. Así, se han identificado varias proteínas homólogas a las de la cubierta COPII de levaduras. Es el caso de Sar1 (Kuge et al., 1994), de dos formas homólogas de Sec23 (Paccaud et al., 1996), de un homólogo humano de Sec13 (Shaywitz et al., 1995) y cuatro proteínas también humanas homólogas de Sec24 (Tang et al., 1999).

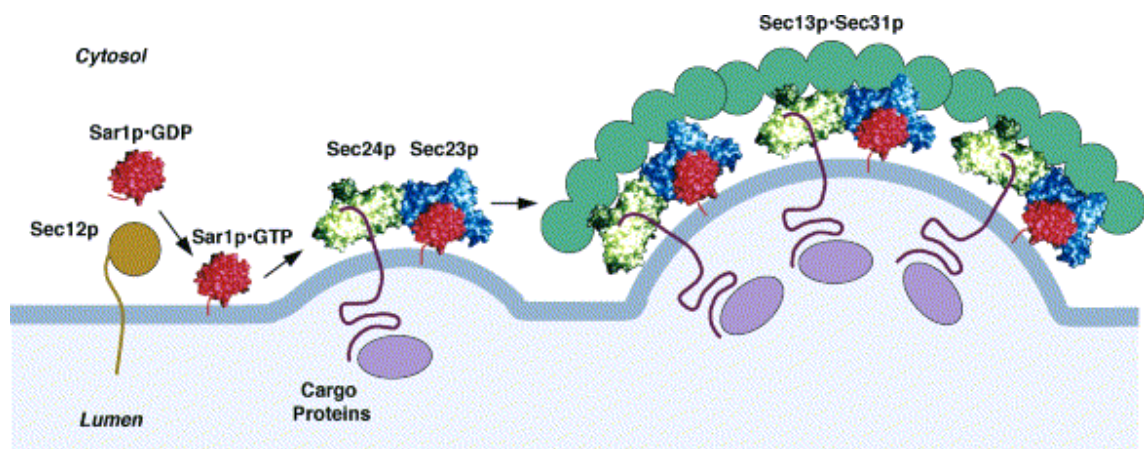


Figura 15. Ensamblaje de la cubierta COPII. Sec12p induce el intercambio GDP-GTP de Sar1p. Una vez unida a GTP, Sar1 se une a membrana y recluta el complejo Sec23p-Sec24p uniéndose a Sec23p. El cargo es concentrado gracias a su unión a los receptores de cargo que reconocen y se unen a Sec24p. El complejo Sec13p-Sec31p se ensambla sobre el complejo Sec23p-Sec24p. *Bonifacino y Glick, 2004, Cell 116:153-166.*

3.3.c.-Función de los intermediarios de transporte COP

ITs de tipo COPI.

Su diámetro medio es de unos 75 nm. Su función no está tan clara como en el caso de los ITs COPII ya que durante los últimos años se han publicado una serie de datos contradictorios. Así, inicialmente se los relacionó con el transporte anterógrado (Malhotra et al., 1989; Ostermann et al., 1993) pero posteriormente se los implicó mucho más en el transporte retrógrado (Cosson y Letourneur 1994; Orci et al., 1997; Lewis y Pelham 1996). En la década de los 90 se propuso un modelo (Gaynor y Emr, 1997) que aúna las diferentes posturas. Según este modelo los ITs COPI desempeñarían un papel crítico en el transporte retrógrado desde el aparato de Golgi hacia el RE lo que afectaría indirectamente al transporte anterógrado. En el RE las proteínas se asociarían con receptores específicos: receptores de carga (ver siguiente apartado), los cuales facilitarían su concentración y empaquetamiento en vesículas COPII para su transporte hasta el CG. Una vez aquí, los receptores de carga serían empaquetados en ITs COPI para su transporte retrógrado al RE.

El transporte mediado por COPI es pues, el que siguen todas aquellas proteínas endógenas del RE que han escapado del mismo y deben retornar así como proteínas y lípidos de la maquinaria transducción/translocación que deben permanecer en el RE. Los mecanismos para retornar estas moléculas a su sitio de origen son altamente eficientes. Se basan en determinadas secuencias de aminoácidos que a modo de etiquetas identifican a las proteínas que los portan como moléculas autóctonas de RE (Letourneur et al., 1994; Sohn et al., 1996; Sonnichsen et al., 1996; Orci et al., 1997; Rexach et al., 1994). Estas etiquetas también están presentes en proteínas que, al igual que los receptores de carga, están continuamente ciclando entre el RE y el CG.

La señal de retorno mejor caracterizada es la secuencia KDEL en posición C-terminal (Munro y Pelham 1987; Pelham, 1998) presente en la mayoría de las proteínas solubles residentes en el RE. Las proteínas transmembrana tipo I del RE contienen la etiqueta KKXX en su dominio citoplasmático. Este motivo interacciona directamente con las proteínas COPI (Cosson y Letourneur, 1994; Jackson et al., 1990; Letourneur et al., 1994; Lewis y Pelham, 1996; Schutze et al., 1994). Las proteínas transmembrana tipo II presentan una señal diferente, en este caso contienen la secuencia RR o bien RXR

situada en el extremo N-terminal (Schutze et al., 1994). En el caso del transporte retrógrado, se ha identificado un receptor de cargo específico que reconoce la secuencia KDEL (receptor de KDEL o ERD2; Lewis y Pelham, 1990). Es una proteína transmembrana altamente conservada en todos los eucariotas. En condiciones normales se localiza en el compartimento intermedio (CI) y la región *cis* del Golgi.

ITs de tipo COPII.

Suelen tener un diámetro de 60 nm. Median el transporte anterógrado desde el RE en dirección al CG. Evidencias que avalan dicha función son el hecho de que en mamíferos, los homólogos de las proteínas Sar1, Sec23 y Sec13 se localizan en los sitios de salida de las proteínas del RE (Orci et al, 1991) y que los ITs COPII se forman exclusivamente a partir de las membranas del RE (Aridor et al, 1995; Kuge et al, 1994). Para llevar a cabo dicha función es necesaria la participación de los receptores de cargo. Se trata de proteínas integrales de membrana con un dominio luminal capaz de reconocer a las proteínas solubles que han de ser transportadas y un dominio citoplasmático que interacciona con la maquinaria de transporte. De este modo, estas proteínas constituyen el nexo de unión entre las moléculas de cargo solubles y las proteínas de cubierta (Kirchhausen et al., 1997). ERGIC-53 y la familia p24, son los receptores de cargo mejor conocidos (Denzel et al., 2000; Itin et al., 1995; Lavoie et al., 1999; Rojo et al., 2000). Estas proteínas están continuamente ciclando entre el RE y el CG para lo que disponen de varias señales de interacción que les permiten incorporarse al interior de los ITs COPII durante el transporte anterógrado y a los ITs COPI en el transcurso del transporte retrógrado. Aunque existen evidencias de que COPII interacciona con las moléculas de cargo (Aridor et al., 1998; Domínguez et al., 1998; Kuehn et al., 1998; Springer y Schekman, 1998) no se ha definido qué secuencias peptídicas están involucradas.

Existe un modelo alternativo según el cual las proteínas abandonan el retículo de forma masiva (Wieland et al., 1987) es decir, el cargo es incluido en las vesículas de manera no selectiva. Estudios cuantitativos de microscopía electrónica apoyan esta hipótesis. Estos estudios muestran que el cargo no se concentra en las zonas de salida del RE sino que su concentración es igual en estas zonas, en el RE y en las vesículas COPII (Martínez-Menárguez, 1999).

3.4.-PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA FUSIÓN DE LOS INTERMEDIARIOS DE TRANSPORTE CON SUS MEMBRANAS ACEPTORAS

Los ITs formados, después de perder las proteínas de cubierta han de fusionarse con la membrana aceptora para liberar su contenido. En este proceso intervienen varias familias de proteínas como NSF, SNAPs y SNAREs.

La proteína NSF (del inglés *N-ethylmaleimide sensitive factor*) es una ATPasa citosólica que participa en procesos de fusión de membranas a las que se une a través de proteínas adaptadoras; las SNAPs (del inglés *soluble NSF attachment proteins*). Las SNAPs se unen a su vez con proteínas integrales de membrana conocidas como SNAREs (del inglés *SNAP receptors*). Las primeras SNAPs que se identificaron syntaxin 1, SNAP-25 y VAMP (también conocida como sinaptobrevina) intervienen en la fusión de vesículas sinápticas formando un complejo estable en ausencia de actividad de NSF (Söllner et al., 1993).

En 1994, Rothman y Warren (Rothman y Warren, 1994) propusieron un modelo de funcionamiento de las SNARE (fig. 16). Según este modelo los ITs de transporte se asocian con SNAREs conocidas como v-SNARE que se unen a SNARE análogas (t-SNARE) presentes en las membranas con las que han de fusionarse. La especificidad en el tráfico de membranas ocurre gracias a la distribución de las v-SNARE y t-SNARE en los diferentes ITs y compartimentos intracelulares de destino. NSF y SNAP reconocerían los complejos estables formados entre v- y t-SNAREs de modo que la hidrólisis de ATP llevada a cabo por NSF induce el desensamblaje del complejo y la fusión de las membranas.

Estudios posteriores establecen que la actividad ATPasa de NSF es necesaria tras la fusión de membranas y no antes. Después de la fusión las v/t-SNARE permanecen en la membrana con la que se ha fusionado el IT formando complejos estables. La hidrólisis de ATP promovida por NSF sería la responsable del desensamblaje de dichos complejos permitiendo que las v-SNAREs puedan ser recicladas a sus membranas de origen para participar en nuevos ciclos de fusión (Hay y Scheller, 1997).

La función de las SNAPs es la de estimular la actividad ATPasa de NSF (Barnard et al., 1997; Steel y Morgan, 1998). Por tanto, NSF y SNAPs serían los componentes implicados no en la fusión de membranas sino en el posterior reciclaje de las SNAREs.

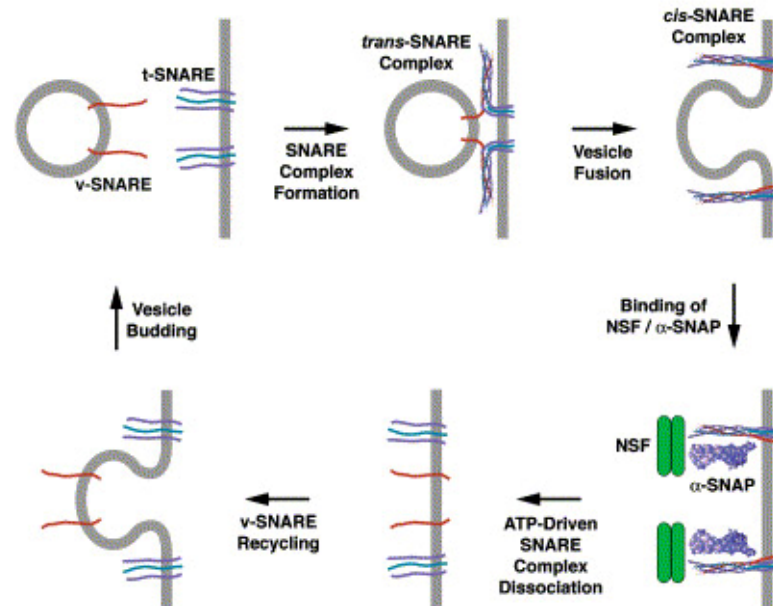


Figura 16. Ciclo funcional de las proteínas SNARE. El complejo SNARE se forma cuando un monómero v-SNARE anclado en el IT se une con un oligómero de t-SNARE anclado a la membrana diana. El complejo formado promueve la fusión del IT con la membrana quedando v- y t-SNARE juntas. α -SNAP se une al complejo y recluta a NSF que hidroliza ATP para separar v- y t-SNARE. V-SNARE son entonces empaquetadas de nuevo en vesículas. *Bonifacino y Glick, 2004, Cell 116:153-166.*

3.5 .-TRANSPORTE RETRÓGRADO COPI INDEPENDIENTE

Aunque tal y como hemos expuesto en párrafos anteriores la vía principal de transporte retrógrado es dependiente de COPI, existen proteínas que viajan desde el RE al CG a través de intermediarios de transporte que no contienen estas cubiertas. Es el caso de las enzimas que catalizan las reacciones de glicosilación en el CG o de ciertas toxinas bacterianas carentes de una señal de reconocimiento tipo KDEL con la toxina de *Shigella* (Girod et al., 1999; White et al., 1999). Esta vía se halla regulada por Rab6 y no se ve afectada por los agentes que impiden la actuación de COPI.

Rab 6 es una GTPasa cuyo ciclo funcional es similar al de otras GTPasas, ciclando pues entre un estado GTP activo y un estado GDP inactivo. El paso de un estado a otro requiere de proteínas reguladoras GEFs, GAPs y GDIs (Burstein y Macara, 1992; Walworth et al., 1992).

Existen diversas isoformas de Rab 6 conocidas como Rab 6A, Rab 6A', Rab 6B y Rab 6C. Las diferencias entre ellas estriban en la región C-terminal. Las isoformas A, A' y B (Echard et al., 2000; Opdam et al., 2000) se localizan en el CG. Mientras que A y A' son ubicuas, la isoforma B es específica de tejido nervioso pero dado que interacciona con todos los efectores conocidos de Rab 6A se ha sugerido que actúa como reguladora de la vía retrógrada en aquellas líneas celulares en las que se halla presente (Opdam et al., 2000). A pesar de que Rab 6A y Rab 6A' sólo difieren en tres aminoácidos en la región C-terminal, se ha visto que interactúan con diferentes efectores como es el caso de la proteína motora Rabkinesina 6 que se une en el CG con Rab 6A pero no con la isoforma A' (Echard et al., 2000). Este, entre otros datos experimentales, fue crucial para determinar que Rab 6A y no Rab 6A' regula la vía retrógrada independiente de COPI a través de la proteína motora de microtúbulos Rabkinesina 6 (Echard et al., 2000). Rab 6A' se identificó posteriormente como una proteína necesaria para el transporte entre el TGN y los endosomas (Mallard et al., 2002). Sin embargo, en un trabajo reciente, el laboratorio de Tommy Nilsson muestra que ambas isoformas, A y A' están implicadas en la regulación del transporte desde el Golgi hacia el RE implicando a una nueva proteína motora (dinactina) en dicha vía de transporte (Young et al., 2005).

Rab 6A y A' pueden interactuar con GAPCenA (Cuif et al., 1999), una proteína implicada en la nucleación de microtúbulos *in vitro*. Esta proteína se asocia con el centrosoma formando un complejo con las subunidades de γ -tubulina. La unión de Rab6

con esta proteína aporta un nexo de unión muy interesante entre la dinámica de microtúbulos y la dinámica del CG.

Si bien existe un consenso en cuanto a la existencia de esta vía retrógrada independiente de COPI, lo cierto es que su implicación biológica todavía no está clara. No se conocen los receptores ni señales moleculares implicadas y menos aún el tipo de proteínas de cubierta que podrían participar. Todo parece apuntar a que se trata de una vía de reciclaje de componentes endógenos (incluidos lípidos) del CG (Matanis et al., 2002).

3.6.-PAPEL DEL CITOESQUELETO EN EL TRANSPORTE EN LA ZONA RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO/COMPLEJO DE GOLGI

3.6.a.- El citoesqueleto de microtúbulos

Los microtúbulos (MTs) son largos filamentos de un diámetro medio de 24 nm constituidos por dímeros de α y β tubulina. Se disponen de forma radial y polarizada es decir, sus extremos “+” o extremos de crecimiento rápido se orientan hacia la periferia celular y los extremos “-” o extremos de crecimiento lento se concentran en el centrosoma o centro organizador de microtúbulos (MTOC del inglés *microtubule organization center*).

La localización de los distintos orgánulos celulares viene determinada por su interacción con los MTs (Cole y Lippincott-Schwartz, 1995). Así, el CG se localiza en la región perinuclear, alrededor del centrosoma, cerca de los extremos “-” (Rogalski et al., 1984), mientras que el RE se sitúa en la periferia celular cerca de los extremos “+” (Terasaki et al., 1986). En ausencia de los microtúbulos, el CG se fragmenta y se dispersa por todo el citoplasma celular, cada fragmento está constituido por un conjunto de cisternas apiladas y es funcional en términos de tráfico de membranas (Rogalski et al., 1984).

La asociación de los microtúbulos con las membranas está mediada por proteínas que interaccionan simultáneamente con ambas estructuras. Podemos diferenciar dos tipos de proteínas (i) proteínas motoras, son ATPasas y utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para desplazarse a lo largo de los MTs y (ii) proteínas sin actividad motora, carecen de actividad ATPasa pero son capaces de establecer interacciones estáticas con los MTs, hasta el momento se han identificado tres proteínas, con estas características:

CLIP-170, CLIP-115 y CLIMP-63, esta última facilita la interacción del RE con los MTs (Klopfenstein et al., 1998).

Atendiendo a la polaridad del movimiento que producen, se diferencian dos tipos de motores moleculares: las dineinas y las kinesinas. La superfamilia de las dineinas incluye proteínas motoras que dirigen el movimiento hacia el extremo “-” de los MTs, mientras que los miembros de la superfamilia de las kinesinas dirigen el movimiento hacia el extremo “+” (Vale, 1987; Woehlke y Schliwa, 2000). La acción coordinada de ambos motores no sólo es fundamental para mantener la distribución intracelular del RE y el CG sino que también está involucrada en regular el transporte bidireccional entre ambos. Evidencias que confirman esta afirmación son el hecho de que tanto dineina1 como dineina2 se localizan en el complejo de Golgi (Roghi y Allan, 1999; Tai et al., 1998; Vaisberg et al., 1996). Dineina1 dirige el movimiento de cargo desde el RE hacia el CG (Burkhardt et al., 1997; Presley et al., 1997; Stephens y Pepperkok, 2002) para lo cual interacciona con el complejo multiproteico dinactina (King et al., 1999). Recientemente se ha encontrado otra proteína, bicaudal2 (BICD2) que interacciona con dinamina1, dinactina y el CG, por lo que parece estar implicada en la función de dinamina1 en este orgánulo (Hoogenraad et al., 2001). Algunos miembros de la superfamilia de las kinesinas también están presentes en el CG. Es el caso de la kinesina KIF1C que ha sido implicada en el transporte COPI dependiente desde el CG hacia el RE (Dorner et al., 1998). La kinesinaII también se ha localizado en el *cis*-Golgi así como en el ERGIC o CI (Le Bot et al., 1998; Yang y Goldstein, 1998) y parece estar implicada en el transporte desde el CG hacia el CI o en la dinámica del CI

3.6.b.-El citoesqueleto de actina

Aunque los microtúbulos desempeñan un importante papel en la posición y en la dinámica de membranas a nivel del CG, ambas funciones también requieren del citoesqueleto de actina. En la actualidad se sabe que al igual que la membrana plasmática, el complejo de Golgi se asocia con una elaborada red de actina que contiene múltiples proteínas de unión a actina como espectrina y ankirina (Beck et al., 1994; Devarajan et al., 1996; Godi et al., 1998) proteínas implicadas en regular el citoesqueleto de actina (Cdc42, Erickson et al., 1996; Fuccini et al., 2002; Luna et al., 2002), así como proteínas motoras que se desplazan a lo largo de los microfilamentos de

actina (miosinas, Allan y Schroer, 1999). Las alteraciones en el transporte intracelular que acontecen cuando se emplan agentes anti-actina como la citocalasina D (CyD), la toxina C2, latrunculina B (LatB) o jasplakinolide, evidencian también la importancia del citoesqueleto de actina en el transporte intracelular.

En 1998, Hirschberg y colaboradores demostraron que el transporte de la proteína G de virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) se encontraba enlentecido en células previamente tratadas con el agente despolimerizador de actina citocalasina D (Cy-D) (Hirschberg et al., 1998). Esta fue una de las primeras evidencias que muestran la implicación del citoesqueleto de actina en la vía secretora. Próximos en el tiempo, trabajos de nuestro grupo pusieron de manifiesto no sólo la importancia de la actina en la morfología y posición del Golgi en la célula (di Campli et al., 1999; Valderrama et al., 1998) sino también en la regulación del transporte de proteínas desde el GC hacia el ER (Valderrama et al., 2001).

Los estudios de localización de las miosinas han contribuido en gran medida a mostrar la importancia de la dinámica de la actina en el tráfico de membranas en la zona RE/CG. Así, la miosina I se ha localizado en ITs derivados del CG en células polarizadas MDCK y se cree que está implicada en el transporte de los mismos hacia la cara apical. Las miosinas V y VI también participan en la formación y transporte de ITs que emergen del CG. Miosina V se ha encontrado asociada con kinesina, una proteína motora de microtúbulos (Huang et al., 1999) pero la relevancia fisiológica de esta interacción todavía se desconoce. Con respecto a miosina VI, se localiza en vesículas de clatrina que emergen tanto de la membrana plasmática como del TGN. A nivel de la membrana plasmática se cree que podría estar implicada en generar una fuerza de empuje que permita la separación entre la vesícula en formación y la membrana. Su función a nivel del CG es todavía menos conocida.

En definitiva, existe una creciente lista de trabajos que señalan a la actina como un elemento necesario en los procesos de transporte celular.