

Proteínas asociadas a los componentes del citoesqueleto

Delia Mercedes Rojo Domínguez, Lourdes García Bacallao, Maureen Hernández Angel y Mayra Álvarez Corredera.*

División de Productos Naturales, Centro de Investigaciones Biomédicas, Calle 146 esquina a Avenida 31, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana. *Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas "Calixto García", Ciudad de La Habana.

Recibido: 9 de octubre de 2001. Aceptado: 30 de mayo de 2002.

Palabras clave: proteínas, citoesqueleto, citoplasma, células eucariotas.
Key words: proteins, cytoskeleton, cytoplasm, eucaryotic cells.

RESUMEN. El citoesqueleto es una compleja trama de filamentos en el citoplasma que sirve como "huesos y músculos" de las células eucariotas y que permite las propiedades de forma, organización interna y movimiento. Los filamentos que constituyen el citoesqueleto son: los microtúbulos, los filamentos intermedios y los filamentos de actina de 24,10 y 7 nm de diámetro respectivamente. Los principales avances logrados en el conocimiento de esta dinámica estructura subcelular derivan de estudios realizados en músculos y tejidos cuyas células presentan cilios o flagelos, las cuales poseen funciones evidentemente asociadas al movimiento mecánico. Los componentes moleculares presentes en estas estructuras están también en aquellas que conforman el citoesqueleto de todas las células. Los filamentos y microtúbulos que participan en los movimientos del músculo y de los cilios presentan propiedades muy semejantes a las observadas en el citoesqueleto, pero difieren en estabilidad. Los movimientos del citoesqueleto son muy lábiles y cambiantes mientras que los del músculo y los de los cilios son más estables. Los dos tipos más importantes de filamentos del citoesqueleto son los de actina y los microtúbulos. Ambos están formados por subunidades de proteínas que pueden ensamblarse y desensamblarse rápidamente en las células. Existen delicados mecanismos que controlan este ensamble del *pool* de subunidades no polimerizadas en el citoplasma. Los filamentos intermedios se encuentran en la mayor parte de las células animales. Están formados por subunidades de proteínas fibrosas y son mucho más estables que la mayoría de los filamentos de actina y los microtúbulos.

ABSTRACT. The cytoskeleton is a complex weft of filaments in the cytoplasm, which is used as the "bones and muscles" in the eucaryotic cells and supports the properties of shape, internal organization and movement. The cytoskeleton filaments are: microtubules, the intermediate filaments and actin filaments of 24,10 y 7 nm in diameter respectively. The main achievements in the knowledge of this dynamic subcellular structure derive from studies performed on muscles and tissue whose cells present cilium and flagellum having its function obviously associated with the mechanical movement. The molecular components present in those structures are also present in those other structures conforming the cytoskeleton in all types of cells. The filaments and microtubules participating in the muscles and cilium movement have properties very similar to those observed in the cytoskeleton although differing in stability. The two most important types of filaments of the cytoskeleton are actin filaments and microtubules. Both are made of globular protein subunits that can assemble and disassemble rapidly in the cell. A delicate mechanism exists for controlling their assembly from pools of unpolymerized subunits in the cytoplasm. A third class of protein filaments called intermediate filaments is found in most animal cells; they are made of fibrous protein subunits and are much more stable than most actin filaments and microtubules. In addition to three major types of protein filaments, the cytoskeleton also contains many different accessory protein that either link the filaments to one another or to other cell components as the plasma membrane, or influence the rate and extent of the filament polymerization.

INTRODUCCION

Tanto los movimientos como las formas características de un tipo celular o estructura eucariótica específica implican un complejo conjunto de fibras proteicas que se encuentran en el citoplasma, "el citoesqueleto". Las células eucarióticas contienen tres grandes clases de fibras citoesqueléticas: microfilamentos de actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios de 7, 24 y 10 nm de diámetro respectivamente. Estas fibras no se encuentran en los procariotas.

Los microfilamentos de actina y los microtúbulos se forman por polimerización de subunidades de proteínas llamadas actina G y tubulina respectivamente. La polimerización y despolimerización de estas fibras están estrechamente reguladas por las células. Por ejemplo, estructuras tales como los husos mitóticos que contienen microtúbulos, se forman durante la fase mitótica del ciclo celular y posteriormente, se desensamblan rápidamente. La mayor parte de las células eucariotas contienen uno o más tipos de filamentos intermedios, cada uno de los cuales también está formado a partir de subunidades proteicas específicas.

Algunos sistemas de actina y de microtúbulos son características permanentes de las células, incluyendo los filamentos de actina y miosina en el aparato contráctil del músculo, los filamentos de actina en las células intestinales de borde en cepillo y los microtúbulos que se

encuentran en los cilios de ciertos microorganismos. Estos sistemas de fibras se prestan fácilmente a análisis bioquímicos y ultraestructurales porque sus estructuras filamentosas extremadamente ordenadas son estables, abundantes y fácilmente purificables. Tales estudios han aportado gran cantidad de información sobre la estructura molecular y función de estos sistemas. Por ejemplo, los movimientos ondulatorios de los cilios y la contracción muscular son consecuencia del ensamble y desensamble de asociaciones específicas proteína- proteína entre dos filamentos que se deslizan uno sobre otro. La energía para estos movimientos se genera de la hidrólisis del ATP, catalizada por enzimas específicas que se unen a la actina o a los filamentos de tubulina.

Muchas de las proteínas citoesqueléticas están codificadas por familias multigénicas. Cada familia derivó probablemente de un gen original presente en una célula eucariota primordial que a través de la evolución fue duplicado y posteriormente modificado. Una cuestión importante que se debe discutir es si las diferentes proteínas de actina y tubulina de los vertebrados superiores forman estructuras específicas o tienen funciones únicas o bien, si son otros componentes los que determinan las diferentes funciones de las diversas estructuras que contienen a aquellas.

MICROTUBULOS

Son polímeros dinámicos que se caracterizan por su aspecto tubular y por la constancia de sus propiedades en diferentes tejidos celulares. Pueden estar libres en el citoplasma o bien como parte integrante de los cilios y flagelos. El componente principal es una proteína denominada tubulina, que forma la unidad básica, heterodímero de α - β tubulina. Estos polímeros crecen por la adición de α - β tubulina y se acortan por la liberación de heterodímeros de tubulina desde ambas terminaciones. La estabilidad de los diferentes microtúbulos es variable, los del citoplasma y los del huso suelen ser lábiles, en tanto que los de los cilios y flagelos son más resistentes a los diferentes tratamientos. Los microtúbulos desempeñan una función mecánica, ya que constituyen una especie de citoesqueleto. También depende de ellos la forma de las células y de las prolongaciones celulares. La polaridad y desplazamiento direccional de las células cultivadas

depende de los microtúbulos. Estas estructuras están asociadas con el transporte de moléculas, gránulos y vesículas en el interior de las células. También desempeñan un papel importante en la contracción del huso y en el movimiento de los cromosomas y centriolos, así como el movimiento ciliar y flagelar. Se ha considerado la intervención de los microtúbulos en la transducción sensorial.¹

La mayoría de las Proteínas Asociadas a los Microtúbulos (MAP) han sido identificadas y se conoce que se unen a ellos sin requerimiento de nucleótidos.² Individualmente se revela un patrón característico en las células nerviosas (Tabla 1)

Todas estas MAP son moléculas fibrosas de diferente longitud en un intervalo entre 50 a 185 nm y forman proyecciones filamentosas en la superficie del microtúbulo. En recientes clonajes y secuenciaciones moleculares de cDNA- MAPs, revela que MAP 2 (1828 aa), Tau (432 aa) y MAP 4 (1072 aa) están todas compuestas por una proyección dominio amino-terminal y una carboxilo terminal, región de unión de los microtúbulos. Esta región de unión está bien conservada en estas tres proteínas y consiste en tres o cuatro repeticiones de 18 aa. En contraste, la región de unión a microtúbulos de MAP 1 B (2413aa) contiene 21 repeticiones de 4 aa (lys, lys, glu X, donde X es cualesquiera aa), cerca del centro de la molécula.

Un considerable número de evidencias basadas fundamentalmente en estudios *in vitro*, implica que el control de la dinámica de los microtúbulos y la morfogénesis celular, es la mayor función de estas MAP *in vivo*.

Dinámica de los microtúbulos

En disolución la tubulina pura exhibe un estado de inestabilidad dinámica, en el cual los polímeros continúan polimerizando y despolimerizando, aun cuando la masa de estos se mantenga en un estado estático. Esta inestabilidad se piensa que sea manejada por un ciclo de hidrólisis e intercambio de GTP. Los dímeros de tubulina unidos al GTP se polimerizan preferencialmente y las terminaciones de los microtúbulos no-se despolimerizan, hasta que el GTP unido se hidrolice a GDP³ La dinámica de los microtúbulos puede ser descrita por los indicadores siguientes:

1. El número total de microtúbulos, depende del número de sitios

Tabla 1. Patrón de distribución de las MAP.

Tipo	Localización
MAP 1 A	Dendritas y axones.
MAP 1 B	Dendritas y axones.
MAP 2 A	Dendritas.
MAP 2 B	Dendritas.
MAP 2 C	Dendritas.
MAP (Tau)	Axones.
MAP (big Tau)	Axones.
MAP 4	Predominante en muchos tipos de células en división.
X MAP	Huevos de Xenopus.

de nucleación *in vivo*, ya que los microtúbulos crecen solo por sitios específicos en la célula, usualmente desde los centrosomas.

2. La "velocidad de crecimiento" y la "de acortamiento", están definidas por la velocidad de adición y pérdida respectivamente de dímeros de tubulina al final de los microtúbulos individualmente.

3. La "velocidad de catástrofe" es la frecuencia de transición de los finales individuales de los microtúbulos en un estado de crecimiento a un estado de acortamiento.

4. La "velocidad de rescate" es la frecuencia de transición de los finales individuales de los microtúbulos del estado de acortamiento al estado de crecimiento. Siendo constante el número de sitios de nucleación, las cuatro velocidades (crecimiento, acortamiento, catástrofe y rescate) determinan otros indicadores:

- La fracción de tubulina presente como polímero contra la fracción presente como unidad base (los heterodímeros).
- La velocidad de renovación o recambio de los dímeros de tubulina entre polímeros y *pool* de dímeros.

Las MAP controlan la dinámica de los microtúbulos *in vitro* e *in vivo*

Los microtúbulos exhiben fases de elongación y rápido acortamiento, la abrupta transición entre estas fases (rescate y catástrofe) es la razón de su llamada "inestabilidad dinámica" *in vitro*. Se han hecho observaciones a tiempo real, usando video-microscopio o microscopio de campo oscuro y se ha demostrado la inestabilidad dinámica de los microtúbulos, ensamblados individualmente *in vitro*, con MAP(Tau) purificadas, MAP2 purificadas, preparaciones de MAP estables al calor

no fraccionadas o MAP(Tau) producidos en *Echerichia coli*.⁴⁻⁶ Las MAP cerebrales reducen la velocidad del "acortamiento rápido" de los microtúbulos, pero permiten una pérdida significativa de polímeros durante la fase de acortamiento. Las MAP(Tau) y MAP2 purificadas, disminuyen la frecuencia de catástrofe y aumentan la frecuencia de rescate, mientras que las MAP estables al calor, suprimen la catástrofe completa, pero a muy bajas concentraciones de tubulina. Entonces cada una de estas MAP modulan, pero no suprimen la conducta dinámica de los microtúbulos. Esta conducta es perturbada por la fosforilación por MAP (mitogen-activated protein) quinasa,⁷ que afecta esta actividad disminuyendo la afinidad de las MAP(Tau) del enrejado de microtúbulos.⁵ Estudios de la redistribución cinética de la longitud de los microtúbulos *in vitro*, muestra que un péptido análogo correspondiente a la segunda secuencia, en la región de unión al microtúbulo de la MAP, puede retardar marcadamente la distribución cinética de la longitud.⁸

Se sabe ya que las MAP controlan individualmente la dinámica de los microtúbulos *in vitro*. Ahora es necesario saber si ellas realmente controlan la dinámica de los microtúbulos *in vivo*. En observaciones y cuantificaciones *in vivo* de la conducta individual de los microtúbulos, se observó que la dinámica de los microtúbulos es específica del tipo celular; estos experimentos se realizaron por microscopía fluorescente después de una inyección con subunidades de tubulina, marcada con rodamina.⁹

La estabilidad también se examinó en células Hela y 3T3 transformadas con el cDNA de MAP 2 C, MAP (Tau) o MAP 1 B con tratamiento de un agente despolarizante de los microtúbulos. Los microtúbulos en células transformadas con MAP2 C, MAP(Tau) o MAP1B se estabilizaron contra los agentes despolimerizantes de microtúbulos, pero la estabilización fue menos eficiente en células transformadas con MAP1B que en células transformadas con MAP2C o MAP(Tau).¹⁰ Este estudio demostró también que los microtúbulos en células transformadas con MAP1B, fueron enriquecidas en una tubulina acetilada. Estos resultados sugieren que las MAP neuronales que fueron introducidas en los fibroblastos por transfección de cDNA estabilizan los microtúbulos y afectan el estado de modificación

postraduccional de la tubulina. Entonces hay aquí una gran evidencia que indica que las MAP funcionan en la dinámica de los microtúbulos.¹²⁻¹⁴ Se estudió también cómo los componentes de tubulina influyen en la dinámica de los microtúbulos, utilizando a estos libres de MAP, de la banda marginal de eritrocitos de aves, en comparación con los microtúbulos de cerebro de mamíferos. La tubulina en el sistema eritrocitario es muy homogénea, en contraste con la tubulina cerebral. Fue muy interesante que aunque los microtúbulos de eritrocitos muestran una conducta similar a los de cerebro, ellos fueron mucho menos dinámicos. La concentración crítica para la elongación y velocidad de asociación y disociación de la tubulina, es mucho menor que con los microtúbulos de cerebro. Los catástrofes son raras, los rescates frecuentes. Esto significa, que la estabilidad dinámica puede ser controlada por el isotipo de tubulina, también como e independientemente de las MAP.¹⁵

La fosforilación de las MAP es otro factor que influye en la dinámica de los microtúbulos *in vivo*. Estudios previos han demostrado que hay unión de las MAP a los microtúbulos dependiente de fosforilación.

En las células en división, se piensa que la fase de transición interfase mitosis de microtúbulos dinámicos sea inducida por reacciones de fosforilación mediadas por MPF (mitosis promoting factor) y por la MAP quinasa, funcionando después de esta interacción, las principales MAP p220 se purificaron de huevos de *Xenopus*. Cuando se purificó p220 de la célula en interfase, se unió fuertemente a los microtúbulos y estimuló la polimerización de la tubulina, mientras que cuando p220 se extrajo de las células en fase M (mitosis), mostró muy poca o ninguna actividad. La proteína fue localizada en los microtúbulos durante la interfase, pero fue fosforilada y difusamente distribuida a través de la célula en la fase M. Este estudio sugiere que el drástico cambio en la acción de p220 en la dinámica de los microtúbulos durante la transición de interfase a fase M, pudo ser inducida por su fosforilación en fase M, probablemente catalizada por MAP quinasa y MPF.¹⁶

Acorde con la regulación de la dinámica de los microtúbulos por las MAP, la única ATPasa que se une a estos (katanina) fue identificada y caracterizada recientemente.¹⁷ La

katanina es una proteína heterodímera (81 a 70 kDa) purificada de huevos de rana y erizo, que usa la hidrólisis de ATP para separar y ensamblar los dímeros de tubulina de los microtúbulos. Junto a otras MAP esta proteína podría controlar la dinámica de los microtúbulos de la célula en división.

La proteína X MAP fue originalmente descrita como una proteína que incrementa el contenido de polímero por el incremento de la velocidad en el extremo de crecimiento rápido de los microtúbulos.¹⁸

Trabajos más recientes demostraron que XMAP incrementa el recambio, disminuyendo la frecuencia de rescate y aumentando la velocidad de crecimiento y acortamiento. El incremento en la velocidad de crecimiento es suficiente para compensar el aumento de la velocidad de rescate y acortamiento y por tanto promueve el ensamble de la malla. Este resultado es importante por dos razones: primero XMAP es la primera proteína caracterizada que incrementa el recambio. Todas las otras MAP caracterizadas, reducen el recambio incrementando el rescate. La existencia de proteínas como XMAP podrían explicar porqué el recambio *in vivo* es mucho mayor que en disoluciones de tubulina pura. Segundo XMAP promueve el ensamble de la malla al mismo tiempo que incrementa el recambio. La acción de XMAP o de una proteína similar, podría parcialmente explicar cómo el nivel de polímeros de la malla en interfase y metafase son iguales, aun cuando el recambio es mucho mayor en metafase.

Bases estructurales de la nucleación de los microtúbulos por γ -tubulina

Además de la regulación del crecimiento y acortamiento dinámico, el número de sitios de nucleación de los microtúbulos del centrosoma también parecen ser regulados con el incremento del número de sitios de nucleación que ocurren durante la mitosis.^{19,20} Los sitios de nucleación en el centrosoma, están compuestos por γ -tubulina (al menos en parte). Esto se basa en que: primero, la inmunolocalización de γ -tubulina muestra que están concentrados en los centrosomas y otros sitios de nucleación de los microtúbulos y segundo, que la inhibición de γ -tubulina, *in vivo* e *in vitro*, trae la pérdida de la actividad de nucleación de los microtúbulos en los centrosomas.

Recientemente, se establecieron las bases de nucleación de la γ -tubulina. El complejo que contiene γ -tubulina (γ Tu RC \rightarrow γ tubuling ring complex) se purificó de huevos de *Xenopus*. Este complejo es un anillo estructurado con diámetro cerrado. Cada anillo complejo tiene al menos 10 moléculas de γ -tubulina además de un número de otras proteínas. En efecto, cada complejo tiene más o menos el mismo número de subunidades de γ -tubulina que de dímeros α,β -tubulina, rodea la circunferencia del microtúbulo sugiriendo que las subunidades α,β -tubulina, pudieran añadirse directamente al anillo de subunidades de γ -tubulina para nuclear el microtúbulo. El γ Tu RC indica tener una potente actividad nucleante de microtúbulo y se puede observar el complejo unido a la terminación menor de microtúbulo nucleados por γ Tu RC.

En un trabajo complementario se demostró que:

1. Los centrosomas aislados, contienen cientos de complejos de anillos, y del mismo diámetro que γ Tu RC.

2. El crecimiento de los microtúbulos del centrosoma se inicia en estos anillos y que ellos contienen múltiples moléculas de γ -tubulina.

Ahora falta por averiguar, si la actividad nucleante de γ Tu RCs es regulada por el número de γ Tu RCs en el centrosoma (número que puede incrementar durante la mitosis por reclutamiento) o si la actividad nucleante es regulada por fosforilación.

FILAMENTOS DE ACTINA

Son polímeros de una proteína globular llamada actina G. Esta proteína constituye una gran proporción de las proteínas citoplasmáticas en su mayor parte está presente bajo la forma globular (actina G. PM 45 000) y puede polimerizarse rápidamente para formar microfilamentos de actina fibrosa (actina F). Esta transición de actina G a F parece constituir la base de la clásica transición sol-gel observadas en el citoplasma de las células en movimiento.

La miosina es una molécula bipolar y fibrosa que se une a la actina; está presente en las células musculares y no musculares, en las plantas superiores y en microorganismos eucarióticos. La miosina II (cel. musc. y no musc.) contiene una región globular que se une a la actina y un segmento fibroso que le permite agregarse en filamentos. La miosina I contiene la región globu-

lar de unión a la actina, pero carece de cola fibrosa; solo está en células no musculares.

La miosina en marcha en la transducción de señal

Recientemente se han descubrieron múltiples miosinas diferentes.^{21,22} Todas estas miosinas tienen conservadas la secuencias de aa de la región de la cabeza \approx 80 kDa, seguida por una región reguladora, de longitud variable que une entre 1 y 6 cabezas ligeras de la familia de proteínas calmodulina. Estas dos regiones derivadas constituyen el dominio motor. Este convierte la energía química liberada por la hidrólisis del ATP, en una fuerza unidireccional a lo largo del filamento apolar. Las nuevas miosinas descubiertas, tienen también dos cabezas o una cabeza y se piensa también que no forman filamentos. Los dominios motores de la miosinas no convencionales trabajan solos, no ensamblados, son frecuentemente mediadores del transporte de funciones, si exhiben actividad no progresiva, tal como la presentada por el dominio motor de las miosinas convencionales.

En todas las miosinas el dominio motor está acompañado de un motivo (cola) adicional, que define en la secuencia primaria, entre las clases individuales de miosinas, en la cual, la variable extensión también difiere en miembros individuales de una clase de miosina.²³

Se ha postulado que este "motivo" adicional especifique las funciones de cada miosina individual. Muchas miosinas contienen secuencias "motivo" presentes también en otras proteínas. Se piensa que estos "motivos" participen en interacciones proteicas en la cascada de señales.

Ej.: 1. La miosina nina C, clase IV, representó la primera miosina para la cual el papel en la señal de transducción fue demostrado.^{24,25} Es expresado en células fotoreceptoras de *Drosófila melanogaster*. El gen de Nina C codifica dos proteínas p132 y p174.

Otras miosinas no convencionales (clase III se encontró involucrada en la transducción auditiva).

El gen de la sordera de ratón Shaker 1 y el gen responsable del síndrome de Usher tipo B en humano, síndrome que representa la asociación de defecto oído (dificultad auditiva) y disfunción vestibular con retinitis pigmentosa lentamente progresiva, codifican miosinas - miosinas humanas VII A respectivamente.^{26,27}

Regulación de los filamentos de actina (FA)

La distribución uniforme, extremadamente estricta de la longitud de los FA es en estructura supramolecular, indica un estricto control en su ensamblaje en los filamentos individuales.²⁸ La actina *in vitro* polimeriza desde las terminaciones de los filamentos una de crecimiento rápido positivo y otras de crecimiento lento negativo, a menos que la concentración crítica de actina sea alcanzada. En el estado constante, la polimerización en malla cesa, pero el recambio de las subunidades continúa en ambos finales por lo que el filamento alcanza una "distribución de longitud exponencial".²⁹ ¿Cómo puede entonces la célula mantener uniforme y estable la distribución de la extensión de los FA?

1. Existen proteínas "encapuchadoras" de las dos terminaciones que se unen a cada uno de ellos para prevenir la asociación y disociación de monómeros, pasando el crecimiento o decrecimiento del FA y por tanto, manteniendo su longitud ej: Cap Z (proteína "encapuchaduras") se une a la terminación de crecimiento rápido y la tropomodulina a la terminación de crecimiento lento.

2. Pueden existir otros mecanismos que especifiquen la longitud característica de los FA en cada extremo supramolecular.

En respuesta a señales del medio la célula cambia su forma y su grado de unión al sustrato. Estos cambios son conservados, al menos en parte por arreglos del citoesqueleto de actina. Si la actina se ensambla en largos "paquetes", la actina F sustenta protusiones "como dedos" de la membrana plasmática, si se ensambla como una malla forma protusiones en forma de hoja y si presentan paquetes acoplados a placas adheridas a las fibras, "las fibras de estrés". La señal que dispara estos patrones citoesqueléticos actúa a través de diversos receptores, que ahora aparecen convergiendo en uno o más miembros de la pequeña familia Rho (RAS homólogo) de proteínas que unen GTP (La familia Rho es una subfamilia de RAS - rat sarcoma). Estas proteínas son Cdc 42, Rac. Rho.^{30,31}

Cuando cada uno de los miembros de esta familia Rho se inyecta en formas activas constitutivamente (GTP-unido) en fibroblastos 3T3, se induce un cambio morfológico único que involucra la reorganización de la actina -F. La Cdc 42 induce protusiones como dedos.³² La proteína Rac induce arrugas y Rho induce las fibras de estrés. Cuando estos

mismos cambios morfológicos son inducidos por agonistas extracelulares, ellos pueden ser bloqueados por la forma GDP-unidos dominante negativo del miembro apropiado de la familia Rho. Entonces la inyección de Cdc 42 dominante - negativa, bloquea la formación de protusiones en forma de dedo inducida por bradiquina³³ y la Rac dominante negativa bloquea la formación de arrugas inducidas por EGF o bombesina.³⁴ La inactivación de Rho con C₃ transferasa de clostridium botulinum, bloquea la formación de la fibra estrés, inducida por ácido lisofosfatídico (LPA).^{35,36} Estos datos sugieren que los miembros de la familia Rho median estos cambios morfológicos que son inducidos por agonistas extracelulares.

FILAMENTOS INTERMEDIOS

Los filamentos intermedios (FI) son estructuras proteicas que constituyen componentes esenciales del citoesqueleto celular y fueron vistas por primera vez por Ishikawa y col. en 1968. Sobre la base de su secuencia primaria y su expresión tejida específico, han sido descritos seis tipos diferentes de proteínas de los FI³⁷ (Tabla 2).

A pesar de su diversidad, todas las subunidades proteicas de los FI tienen características bien definidas, estructura primaria y secundaria bien conservada, habilidad para renaturalizar y formar filamentos de 7 a 11 nm y una cerrada correlación entre la expresión de los genes que codifican para ellas y el tipo celular en que se expresan.³⁸ Todos los polipéptidos de los FI tienen una estructura común; una organización de dominio tripartita que consiste en un dominio central α -hélice "alargado" de 310 a 350 aa, flanqueado por

un "extremo cefálico" amino-terminal no helicoidal y un dominio carboxilo-terminal o cola de tamaño y características químicas variables. El dominio de la α -hélice central de dos monómeros de queratina media la formación del "superenrollamiento"; después estos dímeros se ensamblan en tetrámeros, los cuales forman los filamentos.³⁹

Función de los dominios cabeza y cola en el ensamblaje y formación de la malla de FI

A diferencia del dominio central, cuya forma y conformación están muy conservadas en muchos tipos de FI, los terminales son muy variables.⁴⁰ El dominio carboxilo terminal es globular en las láminas y muy extendido en el caso de los neurofilamentos NF-M y NF-H. Para explorar las funciones de los dominios terminales en la estructura de los FI, ensamblaje y formación de la malla, se han construido proteínas mutantes y truncadas de los FI y se han analizado luego en células transformadas *in vivo*, animales transgénicos o *in vitro*, después de la expresión recombinante en bacterias. Se demostró, que quitando una pequeña porción del dominio amino-terminal de keratina, tiene efectos supresores en la formación de filamentos *in vivo* e *in vitro*.⁴¹ Experimentos de mutagénesis⁴²⁻⁴⁴ y el uso de péptidos sintéticos han demostrado que la secuencia del dominio "cabeza o cola", pueden afectar marcadamente el ensamblaje de los FI de vimentina. En experimentos de ensamblaje *in vitro*, con bacterias que expresan filamentos completos, fragmentos sin cabeza, con o sin tallo, de NF-L de neurofilamentos de ratón revelaron que la reconstitución *in vitro* de filamentos auténticos de 10 nm requiere de

ambos dominios terminales;⁴⁵ mientras que el dominio amino-terminal, promueve la asociación lateral de protofilamentos en protofibrillas y luego, en filamento de 10 nm; el dominio carboxilo-terminal controla el ensamblaje lateral de protofilamentos hasta terminar los filamentos de 10 nm. Investigaciones posteriores del ensamble de filamentos bovino sin cola, producido proteolíticamente, indican que el dominio carboxilo terminal ácido puede suprimir la adhesión lateral de filamentos en crecimiento. Entonces, los dos dominios terminales de NF-L tienen efectos antagónicos en asociación lateral de protofilamentos en estructuras de orden superior, con el efecto carboxilo terminal dominante sobre el dominio amino-terminal.

En estudios *in vitro* con filamentos completos e isoformas de láminas truncadas humanas,⁴⁶ de pollo⁴⁷ y *Xenopus*⁴⁸ han demostrado que ambos dominios están implicados en la formación de los FI.

Modificaciones de las proteínas de los FI y su efecto en el ensamblaje y dinámica de los FI

Fosforilación. Tradicionalmente los FI en comparación con los FA y los microtúbulos han sido considerados estructuras muy estables que exhiben poca conducta dinámica. Estudios más recientes, han demostrado claramente cambios significativos en la subunidades de FI y ensamblaje-desensamblaje dinámico de los FI. Como las proteínas de los FI son fosforilados por quinasas y en muchos casos, atenúa o inhibe el ensamblaje de los FI y facilita el desensamblaje, se sugirió recientemente que particularmente durante la mitosis los FI son reorganizados dinámicamente y que esta reorganización es regulada por la fosforilación y defosforilación de las proteínas de FI.⁴⁹ Todas las observaciones concuerdan con que en general el dominio amino-terminal, representa un importante papel durante el ensamblaje de los FI.

Se ha encontrado que la hiperfosforilación es el evento central durante la mitosis, principalmente los cambios morfológicos que el ensamble de la trama de la lámina nuclear y el desensamblaje de los FI citoplasmáticos, fundamentalmente, los FI tipo III. La kinasa cdc2 mitosis específica, ha sido identificada como la responsable de estos eventos de fosforilación. Otros experimentos han probado que no solo los sitios de

Tabla 2. Clasificación de las proteínas de los filamentos intermedios.

Proteínas de filamentos intermedios (Tipo)	Clasificación
I	Aproximadamente 15 proteínas ácidas.
II	Aproximadamente 15 queratinas epiteliales básicas neutras.
III	Cuatro proteínas diferentes: ◆ vimentina mesenquinal. ◆ desmina muscular. ◆ proteína ácida de las fibras gliales (PFAG). ◆ perifina.
IV	Subunidades de neurofilamentos: NF-L, NF-M, NF-H. α -Internexina.
V	Lámina nuclear.
VI	Nestina.

fosforilación, sino también, el ensamblaje fosforilación dependiente de la lámina nuclear, son iguales *in vivo* e *in vitro*.^{50,51}

Glicosilación. Algunos estudios investigan la glicosilación de las proteínas de los FI y se conoce poco acerca de los posibles efectos de la glicosilación en la estructura de los FI, ensamblaje y dinámica. El marcaje metabólico de colonias de células epiteliales humanas HT29 con [³H]-glucosamina, ha demostrado que las citoqueratinas humanas K8 y K18 tienen un enlace O-glicosídico de residuos simples de N-acetilglucosamina (O-GlcNac), con un promedio estequiométrico de 1,5 y 2 moléculas de O-GlcNac por molécula de K8 y K18 respectivamente.⁵²

En otro estudio se encontraron queratinas epiteliales simples, tales como K8 y K18 en células HT29, que son apreciablemente más solubles que lo reconocido previamente y que la queratina soluble predominante en la forma de tetrámeros, es ensamblaje competente.⁵³

Recientemente, monosacáridos simples de N-acetilglucosamina, unidos O-glicosídicamente, fueron también identificados, predominantemente dentro del dominio aminoterminal de los tripletes de proteínas de neurofilamentos: NF-L y NF-M, aislados de médula espinal de ratón.⁵⁴ En este caso, la glicosilación citoplasmática de residuos de aminoácidos serina y treonina ocurrió a un aproximado estequiométrico de 0,1 y 0,15 mol de GlcNac por mole de NF-L y NF-M respectivamente. La eliminación de estos sitios demostró un detrimento en el ensamblaje del microfilamento *in vivo* e *in vitro*.

Varios estudios demostraron que O-GlcNac, es una modificación de la proteína muy dinámica análoga a la fosforilación y se asumió que como la fosforilación, esta modificación también ejerce efecto regulador en la activación celular, el ciclo celular, la fosforilación de las proteínas y el ensamble de los complejos de proteínas multiméricas, tales como microfilamentos y FI en general.

Algunas aplicaciones de las proteínas de los FI

Dentro de las proteínas de un determinado tipo celular, las proteínas de los filamentos intermedios son de las más abundantes. Los anticuerpos fluorescentes contra ciertas proteínas de los filamentos intermedios han sido muy útiles para identificar células, especialmente, para clasificar tumores en los casos

en que los procedimientos histológicos normales no permiten llegar a un diagnóstico. Como las células tumorales retienen muchas de las propiedades diferenciales de las células de las que derivan, su marcaje con anticuerpos FI permite la identificación del tipo celular. Existen múltiples técnicas inmunohistoquímicas, desde las que utilizan anticuerpos fluorescentes hasta las que combinan anticuerpos monoclonales con enzimas.⁵⁵

Es importante destacar que la expresión de más de una clase de FI en algunos tipos celulares especializados ha sido encontrada, siendo la vimentina el FI que acompaña generalmente a los otras clases, tal como ocurre en los tejidos durante el desarrollo embrionario, además, estudios recientes sustentan la teoría de que los FI son estructuras muy dinámicas y tienen un papel complejo en las células vivas, pero en general, la expresión de la antigenicidad específica de los FI se preserva durante las transformaciones malignas y la identificación por inmunohistoquímica del tipo de FI en la clasificación de tumores poco diferenciados es muy útil.⁵⁶

Con el fin de definir la función de los FI en el tejido normal y patológico, recientemente se han encontrado hallazgos de interés, como la variación en la expresión de las proteínas de los FI en condiciones anormales como la hipoxia. Estos resultados son de gran utilidad en la determinación del daño a nivel tisular en algunas enfermedades cardiovasculares y para la selección de corazones donantes para trasplantes⁵⁷ en el estudio neurológico de lesiones corticales desvascularizantes en las cuales se produce un aumento progresivo de inmunoreactividad de la PFAG y aparición de la expresión de vimentina en las márgenes de las lesiones celulares.⁵⁸ La expresión de citoqueratina en las disfunciones severas de la célula Sertoli asociadas con la detención espermatogénica en los hombres infértiles sugiere su aplicación como marcador histológico.⁵⁹

En general, la reacción de anticuerpos (Ac) contra estas proteínas es tejido específico, de forma tal que los Ac de citoqueratina reaccionan solo con tejidos epiteliales, por tanto los carcinomas pueden ser detectados con estos. Los Ac de desmina diferencian los tumores derivados del tejido muscular estriado y liso, como los rhabdomyosarcomas y leiomyosarcomas de otros tumores de tejidos blandos.

Los de PFAG para los astrocitomas. Los de neurofilamentos ganglioneuroblastomas y otros neuroblastomas. Los tumores mesenquimatosos tales como linfomas, sarcomas, melanomas y seminomas presentan vimentina.⁶⁰

CONCLUSIONES

Los filamentos de actina, los microtúbulos, los filamentos intermedios y sus proteínas asociadas, son regulados por un delicado mecanismo que aún no está bien dilucidado que produce cambios en la forma de las células y en varios movimientos celulares. Las propiedades únicas de cada tipo de microtúbulo parecen estar determinadas por MAP específicas de cada estructura, el isotipo de tubulina así como los eventos de fosforilación y defosforilación de las MAP entre otros. Las MAP copolimerizan con las subunidades de tubulinas o se unen a los microtúbulos después de la polimerización modulando su dinámica. Los filamentos de actina también participan en estos cambios de la forma de la célula, unidos a proteínas específicas que unen GTP tales como la familia Rho que dispara diversos patrones citoesqueléticos como: las fibras de estrés, arrugas, protusiones en forma de dedo y otras.

Los filamentos intermedios desempeñan un importante papel en la organización del citoplasma de células diferenciadas, en el desensamble de la lámina nuclear en la regulación de la actividad celular, el ciclo celular, etc. Actualmente son muy utilizados en la clasificación de tumores poco diferenciados dado que su antigenicidad específica se preserva durante las transformaciones malignas.

BIBLIOGRAFIA

1. Bruce Alberts. Molecular Biology of The Cell. Tercera edición, Cap. 10, 549, 1983.
2. Nobutaka I. Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. **Cur. Opi. Cell Biol.**, 6, 74, 1994.
3. Francis McNally. Modulation of microtubule dynamic during the Cell cycle. **Cur. Opi. Cell Biol.**, 8, 23, 1996.
4. Pryer. Brain Microtubule - Associated Proteins Modulate Microtubule Dynamic Instability *in vitro*. **Cell S**, 103, 965, 1992.
5. Drechel. Modulation of the Dynamic Instability of tubulin Assembly by the microtubule-associated Protein Tau. **Mol. Biol. Cell**, 3, 1141, 1992.
6. Takei Y., Teng J., Harada A. Hirokawa N. Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. **Journal of Cell Biology**, 150, 989-1000, 2000.

7. Chu B., Soncin F., Price B.D., Stevenson M.A., Calderwood S.K. Sequential phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and glycogen synthase kinase 3 represses transcriptional activation by heat shock factor-1. **Journal of Biological Chemistry**, **271**, 30847-30857, 1999.
8. Yamauchi P.S. Redaction in Microtubule Dynamics *In Vitro* by Brain Microtubule-Associated Proteins and by a microtubule-Associated Proteins-2 Second Repeated Sequence Analogue. **J. Neurochem.**, **60**, 817, 1993.
9. Shelden E. Observation and cuantification of Individual Microtubule behavior *in vivo*: Microtubule Dynamics are Cell- Type Specific. **J. Cell Biol.**, **120**, 935,1993.
10. Sanchez C., Perez M., Avila J. GSK3beta-mediated phosphorylation of the microtubule associated protein 2C (MAP2C) prevents microtubule bundling. **European Journal of Cell Biology**, **79**, 252-260, 2000.
11. Takei Y., Teng J., Harada A., Hirokawa N. Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. **Journal of Cell Biology**, **150**, 989-1000, 2000.
12. Takemura R. Increased Microtubule Estability and Alphatubulin Acetylation in Cell trasfected with Microtubule-Associated Proteins MAP1B, MAP2 or Tau. **J. Cell Sci.**, **103**, 953, 1992.
13. Lewis S.A. Organization of microtubule in Dendritis axons is Determined by a Short Hidrophobic Zipper in Microtubule-Associated Proteins MAP2 and Tau. **Nature**, **342**, 498, 1989.
14. Lee O. Expression of Tau Proteins in Non- Neuronal Cells: Microtubule Binding and Stabilization. **J. Cell Sci.**, **102**, 227, 1992.
15. Frinczek B. Dynamics of Microtubule from Erythrocyte Marginal Bands. **Mol Biol. Cell**, **4**, 323, 1993.
16. Shiina N. Regulation of a Major Microtubule Associated Protein by MPF and MAP kinasa. **EMBOJ**, **11**, 3979, 1992.
17. McNally F.J. Identification of Katanine, an Atpasa that servers and Disassembles Stables Microtubule. **Cell**, **75**, 419, 1993.
18. Gard D.L. A microtubule-associated proteins from xenopus eggs that especifically promotes assembly at the plus end. **J. Cell Biol.**, **105**, 2203, 1987.
19. Kuriyama R. Microtubule- nucleating activity of centrosomes in CH0 Cell is independent of the centriole cycle, but coupled to the mitotic cycle. **J. Cell Biol.**, **91**, 822,1981.
20. Buendia B. Regulation of the microtubule nucleating activity in Xenopus egg extracts: role of cyclin Associated protein kinase. **J. Cell Biol.**, **116**, 1431, 1992.
21. Mooseker Ms. Unconventional myosins. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, **11**, 633, 1995.
22. Hammer J.A. III. The structure and function of unconventional myosins: a review. **J Muscle Res. Cell Motil.**, **15**, 1, 1994.
23. Goodson H.V. Molecular evolution of the myosin family: relationships derived from comparison of amino acid sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, **90**, 659, 1993.
24. Montel C. The drosophyla rina C locus encodes two photoreceptor cell specific proteins with domains homologous to protein kinases and the myosinn heavy chain head. **Cell.**, **52**, 757, 1998.
25. Manser E. A brain serinelthreonine protein kinase activated by Cdc 42 y Rac1. **Nature**, **367**, 40, 1994.
26. Gibson F. A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene Shaker-1. **Nature**, **374**, 62, 1995.
27. Weil D. Defective myosin VII A gene responsible for usher syndrome type B. **Nature**, **374**, 60, 1995.
28. Velia M Fowler. Regulation of actin filament length in erythrocytes and striated muscle. **C.O.C.B**, **8**, 86, 1996.
29. Pollard TD. Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. **Annu. Rev. Biochem.**, **55**, 987, 1986.
30. Nobes C. Regulation and function of the Rho subfamily of small GTPases. **Cur. Opi. Genet. Dev.**, **4** (Suppl. 1), 77, 1994
31. Ridley A.T. Membrane ruffling and signal transduction. **Bioassays**, **16** (Suppl. 5), 321, 1994.
32. Pawson T. Protein modules and signaling networks. **Nature**, **373**, 573, 1995.
33. Nobes C.D. Activation of the small GTP- binding proteins Rho and rac by growth factor receptors. **Cell Sci.**, **108**, 225, 1995.
34. Divecha N. Phospholipid signaling. **Cell Sci.**, **80**, 269, 1995.
35. Kovacovics. Phosphoinositide 3- kinase inhibition spares actin assembly in activating platelets but reverses platelet aggregation. **J. Biol. Chem.**, **270**, 11358, 1995.
36. Vlahos C.J. Investigation of neutrophil signal transduction using a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3- kinase. **J. Immunol.**, **154**, 2413, 1995.
37. Susanne H., Velia A. Making heads and Tails of intermediate filament assembly, dynamics and networks. **Current Opin in Cell Biology**, **6**, 25, 1994.
38. Tohru Tsujimura. Expression of the Intermediate Filament. Nestin in Gastrointestinal Stromal Tumors and Interstitial Cells of Cajal. **American Journal of Pathology**, **158**, 817-823, 2001.
39. Robert B. Finding filament function. **Current Biology**, **2**, 43, 1992.
40. Herrmann H. Identification of a Nonapeptide Motif in the Vimentin head Domain involved in Intermediate Filament. **Assembly. J. Mol. Biol.**, **223**, 637, 1992.
41. Wilson AK. The Rules of K5 and K14 Head, Tail, and R/Kllege Domais in Keratin Filament Assembly *in vitro*. **J. Cell Biol.**, **119**, 401, 1992.
42. Eckelt A. Assembly of a Tailless Mutant of the Intermediate Filament Protein, Vimentin, *in vitro* and *in vivo*. **Eur. J. Cell Biol.**, **58**, 315, 1992 .
43. Herrmann H. Identification of a Nonapeptide Motif in the Vimentin Head Domain Involved in Intermediate Filament Assembly. **J. Mol. Biol.**, **223**, 637, 1992.
44. McCormick MB. The Roles of the Rod end and the Tail in Vimentin IF Assembly IF Network Formation. **J. Cell Biol.**, **122**, 395, 1993.
45. Heins S. The Rod Domain of NF-L Determines Neurofilament Architecture, whereas the End Domais Especify Filament Assembly and Network Formation. **J. Cell Biol.**, **123**, 1517, 1993.
46. Mair R.D. Expression in E. Coli of Human Lamin A and C: Influence of Head and Tail Domains on Assembly Properties and Paracrystal Formation. **J. Cell Sci.**, **99**, 363, 1991.
47. Heitlinger E. The Role of the Head Tail Domain in Lamin Structure and Assembly: Analysis of Bacterially Expressed Chicken Lamin A and truncated B₃ Lamin. **J. Struct. Biol.**, **108**, 74, 1992.
48. Gieffers C. *In Vitro* Reconstitution of Recombinant Lamin A and Lamin A mutant Lacking the Carboxiterminal Tail-Eur. **J. Cell Biol.**, **55**, 191, 1991.
49. Stewart M. Intermediate Filament Structure and Assembly. **Curr. Opin. Cell Biol.**, **5**, 3, 1993.
50. Nigg E. Assembly-Dissaembly of the Nuclear Lamina. **Cur. Opi. Cell Biol.**, **5**, 105, 1993
51. Moir R.D. Lamin Dynamics. **Cur. Opi. Cell Biol.**, **5**, 408, 1993.
52. Chov C.F. Caracterizacion and Dynamics of O-Linked Glycosylation of Human Cytokeratin 8 and 18. **J. Biol. Chem.**, **267**, 3901, 1992.
53. Chov C.F. A Significant Soluble Keratin Fraction in "Simple" Epithelial Cells. Lack of an Apparent Phosphorylation and Glycosylation Role in Keratin Solubility. **J. Cell Sci.**, **105**, 433, 1993.
54. Dong D.L.-Y. Glycosylation of Mammalian Neurofilament: Localization of Multiple O-Linked N-Acetylglucosamine Moieties on Neurofilaments: polypeptides Land M. **Cell Biol. Chem.**, **268**, 16679, 1993.
55. Sally J., Naish and Thomas Boenisch. *Immunochemical Staining Methods. Handbook*, 16, 1989.
56. Carraway K. *The Cytoskeleton. A practical Approach*, 223, 1992.
57. Heins. Ischemia induces carly changes to cytoskeletal and contractile proteins in dissed human myocardium. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, **110**, 89, 1995.
58. Yamada T. Vimentin immunoreactive in normal and pathological human brain tissue. **A. N. Neuropath.**, **84**, 15, 1992.
59. Martin Bergmann. The distribution pattern of cytokeratin and vimentin immunoreactivity in testicular brospies of infertile men. **Embriolo. L.**, **190**, 515, 1994.
60. Bach P.H. *Hitochemical and Immuno-histochemical Techniques Applications to Pharmacogy and Toxicology*, 147, 1991.