

Tema 3* El Armazón de la Célula Eucariótica

El Armazón de la Célula Eucariota

Composición molecular, estructura y carácter dinámico de las fibras del citoesqueleto:

Microfilamentos

Microtúbulos

Filamentos intermedios

Proteínas determinantes de la especificidad regional de funciones

Citoesqueleto

Introducción

La capacidad de las células eucariotas de adoptar gran variedad de formas, llevar a cabo movimientos direccionales y coordinados, dividirse, mover partículas en el citosol, depende de una red de filamentos proteicos del citoplasma.

Hay tres tipos de estructuras: microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios.

- **Microtúbulos** (25nm de diámetro): estructuras cilíndricas huecas que determinan la forma celular. Son muy abundantes en células que no tienen la forma celular estándar (redondeada) como en células nerviosas, células de la retina. También intervienen en la división celular y segregación de cromosomas en la mitosis, pues dan lugar al huso mitótico por formación del aster a partir del material pericentriolar de las dos parejas de centriolos. Para la segregación de cromosomas, estos se unen por el cinetocoro a los microtúbulos cinetocóricos. En la citocinesis animal, se produce un estrangulamiento de la célula madre en el que intervienen los microtúbulos y los microfilamentos. Movimiento de orgánulos por el citoplasma celular. Transporte de partículas de secreción, ejemplo de los neurotransmisores desde el cuerpo celular hasta las terminaciones nerviosas. Movimiento de gránulos de pigmento en células cromatóforas de escamas de peces (el movimiento de los gránulos de pigmentos puede ser controlado por el pez, pudiendo así cambiar de color). Los microtúbulos y los microfilamentos son normalmente dinámicos a diferencia de los filamentos intermedios, pero en el axonema de cilios y flagelos, los microtúbulos están organizados de manera permanente.
- **Microfilamentos o filamentos de actina** (6–8 nm): más abundantes en las células que los microtúbulos. Se encuentran por debajo de la membrana plasmática *corteza celular (suele interaccionar con la membrana). Se organizan de manera muy diversa. En células musculares del músculo esquelético forman estructuras contráctiles estables: sarcómeros, compuestos por filamentos de actina y miosina que se encuentran continuamente. En células de músculo liso y no musculares se encuentran en el cuerpo de Fleming que produce la citocinesis (por lo tanto, en todos los tipos de células al intervenir en la división), microvellosidades: estructuras lábiles. Intervienen en la migración de células animales (se ha estudiado en células en cultivo):
- **Protusión:** formación de lamelipodios y filopodios por polimerización de filamentos de actina ayudados por miosina. Estas estructuras son evaginaciones de la membrana plasmática.
- **Fijación al sustrato:** fijación por receptores transmembranosos con dos dominios, uno para unirse con actinas de la corteza celular y otro para unirse a la matriz extracelular.
- **Tracción:** movimiento propiamente dicho.

- **Filamentos intermedios (10 nm de diámetro):** gran número de diferencias con microtúbulos y microfilamentos. No están formados por una única proteína (la actina y la tubulina son proteínas globulares) sino que hay un gran número de subunidades de proteínas distintas pero todas tienen una zona central común. Son proteínas filamentosas. Son estructuras rígidas (normalmente no se ensamblan y desensamblan, es decir, no presentan un carácter dinámico). Son abundantes en regiones de la célula sometidas a tensiones mecánicas ya que distribuyen tensiones mecánicas entre muchas células cuando la tensión se localiza en una determinada zona para que no se produzcan daños. Se conectan con células adyacentes a través de los desmosomas. Un tipo de estos filamentos forma una red llamada red nuclear que se localiza por debajo de la membrana nuclear interna.

Técnicas para conocer el citoesqueleto

- **Inmunofluorescencia indirecta**

Las moléculas fluorescentes absorben la luz a una determinada longitud de onda y emiten luz a otra longitud de onda más larga. Si un componente de este tipo es iluminado a su longitud de onda absorbente y visualizado a través de un filtro que sólo permita pasar la luz de la longitud de onda igual a la de la luz que emite, el componente aparece brillante sobre un fondo oscuro.

Se utilizan microscopios de fluorescencia, en los cuales la luz incidente, procedente de una potente fuente, atraviesa dos series de filtros:

- **Primer filtro:** monocromador que selecciona la luz de una longitud de onda que excita a un determinado colorante fluorescente.
- **Segundo filtro:** bloquea la luz que llega al primero y sólo permite el paso de la luz con la longitud de onda emitida por el componente fluorescente.

Comentarios sobre la figura 1.

- El primer filtro deja pasar la luz azul (longitud 450–490 nm).
- Espejo que permite el paso de luz de una longitud de onda mayor a los 510 nm. Refleja, por lo tanto, una longitud de onda inferior a los 510 nm (espejo dicróico).
- El segundo filtro elimina las señales de fluorescencia no deseadas y deja pasar la fluorescente verde de emisión (longitud 520–560 nm).

Una técnica muy utilizada consiste en acoplar covalentemente un colorante fluorescente a moléculas de un anticuerpo (anticuerpo secundario). Ejemplo: los microfilamentos se han hecho reaccionar con un anticuerpo que reconoce actina. El anticuerpo secundario reconoce al primario (parecido en prácticas a las pruebas con el músculo). Los fluorocromos más utilizados son **fluoresceína**, que emite luz verde, y **tetrametilrodamina**, que emite luz roja.

También se puede unir al anticuerpo secundario una determinada actividad enzimática (fosfatasa, peroxidasa) para localizar determinados compuestos. También hay moléculas específicas para una determinada estructura que se puede marcar con fluorescente, por ejemplo, la faloidina, que inhibe la función de los microfilamentos, y que, por lo tanto, se puede marcar.

Se pueden utilizar moléculas fluorescentes que sólo lo son cuando se activan, por ejemplo, con luz ultravioleta, o láser de una determinada longitud de onda. Por ejemplo: utilizar tubulina con un reactivo fluorescente enjaulado. Cuando se forma el huso acromático, si lo activamos, podemos ver como las moléculas de tubulinas migran a los polos.

- Observación de células vivas en un microscopio de contraste de fases o microscopios de contraste de fases

interferencial (contraste de Nomarski).

Figura 2:

- Las zonas teñidas de la célula, reducen la amplitud de las ondas luminosas de una determinada longitud de onda que pasan a través de ellas. De esta forma se obtiene una imagen de color de la célula, visible mediante la observación habitual.
- No se producen cambios en la amplitud, sino en la fase de las ondas. Cuando la luz pasa a través de una célula viva, la fase de la onda luminosa, varía con relación al índice de refracción de la célula: la luz pasa a través de una zona gruesa o densa de la célula (núcleo) se retrasa y su fase queda desplazada respecto a la de la luz que ha pasado por una región adyacente más fina. El microscopio de contraste de fases o el microscopio de contraste de Nomarski aprovechan los efectos de interferencia que se producen cuando se combinan estos dos grupos de ondas, creando una imagen de la estructura celular. El contraste se puede amplificar por técnicas de vídeo, figura 4.

Ampliación del Ross: el microscopio de contraste de fase permite observar células y tejidos sin colorear y por eso resulta experimentalmente útil para el examen de células vivas. Existen pequeñas diferencias del índice de refracción de diferentes partes de la célula y en diferentes partes de una muestra de tejido. La luz que pasa por regiones de mayor índice de refracción experimenta una deflexión y queda fuera de fase con respecto al haz principal de las ondas de luz. Estas diferencias de refracción no resultan evidentes con el microscopio óptico, pero con el de contraste de fase las longitudes de onda fuera de fase se aparean con otras inducidas, lo cual cancela su amplitud. En esencia, las ondas de luz en un principio retardadas por el componente específico del tejido han sido disminuidas cada vez más por una serie de anillos del sistema óptico y entonces puede verse el objeto con un grado de contraste útil. Por lo común se utiliza el microscopio de contraste de fase no sólo para el examen de células y tejidos vivos sino también para examinar cortes gruesos de material plástico no coloreado.

Otras dos modificaciones del microscopio de contraste de fase son el microscopio de interferencia, que permite la cuantificación de la masa del tejido y el microscopio de interferencia diferencial (que utiliza el sistema óptico de Nomarski) y que es útil especialmente para estudiar las propiedades de superficie de las células y otros elementos biológicos.

Figura 3:

- Con el **microscopio de campo oscuro**, también se visualizan células *in vivo*. En él se irradia la luz directamente donde está la célula y al ocular llega la luz difractada, por lo tanto, donde no hay célula se ve oscuro y la célula aparece iluminada.
 - Las formas para observar células *in vivo* se resumen en las siguientes: microscopía de campo claro, de contraste de fases, de contrastes de interferencia diferencial y de campo oscuro.
-
- Microscopía electrónica de criofractura (figura 5)
 - Se congela la célula con nitrógeno líquido o helio líquido, de manera completa o después de haber hecho un tratamiento con un detergente.
 - El bloque de hielo se somete a un corte por una zona lábil, como las membranas biológicas, produciendo la rotura.
 - El nivel de hielo se reduce por sublimación del agua en el vacío, de forma que las estructuras de la célula que se encuentran cerca del plano de fractura quedan al descubierto.
 - Se prepara una réplica de superficie todavía congelada y se examina al microscopio electrónico.

Para preparar la réplica:

- Se sombrea la muestra por vaporización oblicua de un metal pesado (platino).

- Se refuerza con carbono.
- Se digiere la muestra con un ácido obteniendo una replica electrodensa lista para observar al microscopio electrónico.

La tinción negativa (figuras 6, 7), mejora la resolución. Las moléculas que queremos observar se lavan con una solución concentrada de una sal de un metal pesado (Acetato de Uranilo). Una vez seca, como las moléculas han sido colocadas sobre una fina película de carbón anterior, una película muy fina de sal metálica cubre la película de carbón excepto en las partes donde ha sido excluida por presencia de macromolécula adsorbida. Puesto que la macromolécula permite que los electrones pasen mucho más fácilmente que a través del metal pesado, se crea una imagen inversa de la macromolécula.

Ampliación del Ross: Un método especial para la preparación de muestras para MET, especialmente importante para el estudio ultraestructural de las membranas, es el procedimiento denominado congelación–fractura. El tejido que se va a examinar puede ser fijado o no; si se ha fijado, antes de continuar con el procedimiento es necesario quitar el fijador. Se infiltra el tejido con un crioprotector, como el glicerol, y se congela rápidamente hasta -71°C aproximadamente. Se previene la formación de cristales mediante el uso de crioprotectores, el congelamiento rápido y muestras de tejido extraordinariamente pequeñas. Se coloca el tejido congelado en el aparato del congelación–fractura, que posee una cámara en la cual puede ser mantenido al vacío. Se fractura entonces el tejido utilizando una hoja adherida a un brazo movable. En realidad no se efectúa un corte, sino que la muestra es fracturada siguiendo el plano aproximadamente igual al de la hoja de corte. En el plano hidrofóbico de la membrana se producen hendiduras o grietas, paralelas o casi paralelas al plano de fractura, que revela la superficie interna de la membrana. Se puede dejar el tejido fracturado en el aparato durante un tiempo variable, pero breve, para que se evapore el agua congelada y se destaquen en relieve ciertos detalles estructurales. Se cubre entonces la muestra con platino para obtener un molde opaco, es decir, con el platino se obtiene una réplica de la superficie de fractura. Se retira el tejido y la réplica de su superficie, no el tejido, se coloca en la rejilla para ser examinada con el MET. Esta réplica revela detalles a nivel macromolecular.

- Microscopía de fluorescencia confocal

En lugar de iluminar toda la muestra a la vez, en cada instante el sistema óptico enfoca un pequeño punto luminoso en una profundidad determinada de la muestra. Se necesita una fuente de luz que produzca puntos o haces luminosos muy brillantes (fuentes láser cuya luz ha pasado por un diafragma).

Figura 7':

- Una muestra fluorescente se ilumina con un punto enfocado de luz procedente de un diafragma.
- La luz fluorescente emitida por el punto de la muestra está en el foco, se enfoca en el diafragma (por eso es confocal, porque se enfoca en dos diafragmas) y alcanza el detector.
- La luz que procede del resto de puntos de la muestra están fuera del foco del diafragma, por lo que no contribuirá a formar la imagen final.

Para obtener una imagen tridimensional se hace un barrido de la mancha de luz por toda la muestra y se presenta en una pantalla de vídeo (scanning confocal).

Ampliación del Ross: es un sistema de microscopio que se usa para estudiar las sustancias biológicas. El microscopio de barrido confocal combina partes de un microscopio óptico, al que se adapta equipo fluorescente, con un sistema de barrido en el que se emplea un rayo láser. El rayo láser de iluminación es fuertemente convergente y, por lo tanto, produce un punto de barrido muy poco profundo. La luz que emerge del punto es dirigida a un tubo fotomultiplicador, donde es analizada. Se utiliza un sistema de espejos para mover el rayo láser a través del espécimen iluminando un solo punto por vez. Se registran los datos de cada punto de la muestra recorrida con este rayo móvil y se guardan en una computadora. Luego se puede llevar la

información a un monitor de alta resolución para crear una imagen visual. La principal ventaja de este sistema es su capacidad de tomar imágenes de la muestra en cortes ópticos muy finos (aprox. 1 micrometro de espesor). Las regiones fuera de foco son sustraídas de la imagen por el programa de la computadora, creando de este modo una definición máxima de imagen. Las imágenes obtenidas con óptica común, o no confocal, contienen partes del espécimen en foco y fuera de foco superpuestas y, por lo tanto, no es tan definida. Además de utilizar sólo la estrecha profundidad de la imagen en foco es posible crear imágenes múltiples a diferentes profundidades dentro del espécimen. Así, literalmente podemos disecar capa por capa el espécimen, en todo su espesor. También es posible utilizar la computadora para lograr reconstrucciones tridimensionales de una serie de imágenes. Dado que cada imagen individual a profundidades específicas del espécimen es muy definida, la imagen tridimensional resultante es igualmente definida. Además, una vez que la computadora reunió cada una de las imágenes parciales, se puede rotar la imagen tridimensional reconstruida y observarla en cualquier orientación que se desee.

Filamentos

En las células hay dos tipos básicos de filamentos: los **microfilamentos** y los **filamentos intermedios**.

Los primeros histólogos descubrieron abundantes filamentos citoplasmáticos de disposición ordenada en las células musculares. Con el advenimiento de la microscopía electrónica se distinguieron dos tipos de filamentos, uno grueso y uno fino, que se llamaron colectivamente miofilamentos. Los filamentos finos están compuestos de una proteína llamada **actina**; los filamentos gruesos están formados por la proteína denominada **miosina**. En las células no especializadas para la contracción, los filamentos de actina se llaman microfilamentos. Los microfilamentos se encuentran en todos los tipos celulares. La miosina también está presente en casi todas las células, en donde interacciona con la actina, pero es raro que se la encuentre en el estado filamentoso. La actina y la miosina son las responsables de las propiedades contráctiles y viscoelásticas del citoplasma.

Microfilamentos

Introducción

Los microfilamentos, de aproximadamente 5 a 7 nm de diámetro, están compuestos de actina. A menudo se agrupan en fascículos o haces cerca de la membrana plasmática. Estos microfilamentos asociados a la membrana participan en el anclaje y los movimientos de las proteínas membranales, movimientos de la membrana plasmática (endocitosis, exocitosis, citocinesis), extensión de las prolongaciones celulares y locomoción de la célula. Otros microfilamentos se distribuyen en redes tridimensionales a través de toda la célula. Se considera que estos microfilamentos participan en forma activa en el flujo de material citoplasmático, es decir, las corrientes protoplasmáticas que se observan dentro de las células en cultivo. En las células musculares, la contracción requiere la interacción de los filamentos de actina, los filamentos miosina y de proteínas accesorias como la tropomiosina. Sucede lo mismo en las células no musculares, pero aquí la molécula de miosina y tropomiosina no se agrupan para formar filamentos, al menos evidentes. No obstante, se las puede demostrar con técnicas de inmunocitoquímica. Parece ser que algunos movimientos relativos a los microfilamentos se deben a motores moleculares como los descritos para los microtúbulos. La miosina no filamentosa puede actuar de esta manera. Otros mecanismos posibles de movimiento en los que participan los microfilamentos son la fuerza ejercida por la polimerización en el extremo de crecimiento del filamentos del filamento y la sinéresis (la contracción del gel, como un coágulo sanguíneo, al exprimir un poco del medio de dispersión). También se sospecha que las redes de microfilamentos entrelazados son importantes para mantener las estructuras estáticas dentro de la célula.

A diferencia de lo que ocurre con la mayor parte de las organelas, los microfilamentos y los microtúbulos son estructuras transitorias que, a no ser que se agrupen de una manera especial, persisten por periodos que van de minutos a horas. De este modo, la célula puede regular la actividad de los microfilamentos y los microtúbulos

por su colocación selectiva durante la polimerización. Esta colocación se logra, en parte, por fluctuaciones locales de la concentración de proteínas específicas fijadoras de actina (tanto las que se fijan a los monómeros como las que lo hacen al extremo de los filamentos) y el pH. Es debido a la naturaleza dinámica de los microtúbulos y las redes de los microfilamentos que los agentes antipolimerizantes (como la colchicina para los microtúbulos) pueden causar su desaparición.

ACTINA

Al igual que los filamentos de actina de las fibras musculares, los filamentos de actina de las células no musculares se componen de un monómero de actina que es una proteína globular formada por un único polipéptido de 375 aa, aunque parece dos por la forma, con un peso molecular de 42000 D, y muy conservada (50% invariable, 30% sustituibles). Estos monómeros de actina (actina G: molécula bilobular globular formada por un único protofilamento, con una hendidura que hace de articulación y que une ATP) se agrupan con una orientación, formando los filamentos de actina (actina F). Sin embargo, los filamentos de actina no musculares difieren de los de las fibras musculares en cuanto a sus proteínas asociadas, y son estas proteínas las que dan las propiedades a los microfilamentos en cada caso. Además, al contrario que los filamentos de actina de las fibras musculares, los filamentos de actina de las estructuras pertenecientes a las células no musculares son muy dinámicos, ya que continuamente se agregan y desagregan en diferentes momentos y lugares en el interior de la célula.

Algunos eucariotas inferiores, como las levaduras, tienen un único gen para la actina, que codifica una única proteína. En mamíferos hay 6 isoformas diferentes de actina codificadas por genes distintos, pero son tan parecidos entre sí que en los experimentos de laboratorio pueden intercambiarse (copolimerizar): formas alfa, una forma en el músculo esquelético, otra en el músculo cardíaco y dos formas en el músculo liso, de las cuales una es de m. liso vascular y la otra es de no vascular. Formas beta y gamma: dos formas en células no musculares. Las propiedades de la actina de las células no musculares son muy similares a las de la actina de las fibras musculares. **Las secuencias de aminoácidos han sido altamente conservadas durante la evolución.** En plantas se han encontrado hasta 60 isoformas, algunas sólo se diferencian en un resto aminoacídico.

La miosina también se encuentra en casi todas las clases de células de los vertebrados y es siempre un componente de los agregados que contienen actina y son capaces de contraerse. Sin embargo, las distintas variedades de miosina poseen diferentes estructuras.

En los músculos, toda la actina está en forma de filamentos delgados. Sin embargo, la actina no muscular está repartida casi por igual en forma de actina G soluble y en fibras de actina F. La naturaleza actínica de los microfilamentos fue establecida tanto a través de microscopía de inmunofluorescencia de células vivas como por el hecho de que los microfilamentos pueden ser recubiertos por cabezas S1 de miosina, formando estructuras en puntas de flechas, que son indistinguibles a simple vista de las formadas por los filamentos delgados de los músculos. Ello ha sido posible, como ya hemos comentado, porque la actina está muy conservada en el reino eucariótico.

In vitro, la actina es monomérica a temperaturas bajas, a bajas fuerza iónicas y a pHs alcalinos. En condiciones fisiológicas, la actina G polimeriza en un proceso que es acelerado por la presencia de ATP. *In vivo*, el ensamblaje y desmontaje de los filamentos están influidos, además, por numerosas proteínas que se unen a la actina. Por ejemplo, la profilina, una proteína de 16 kD, se une a la actina G formando un complejo 1:1 denominado profilactina que impide la polimerización de la actina.

Para poder estudiar la actina G (su estructura molecular), es decir, para cristalizarla hay que hacerlo reaccionar con un compuesto que impida su polimerización para formar filamentos: Actina G + DNAAasa I, pero como parece que esta cambia su conformación, se utilizan mejor la profilina o la gelsolina.

Los filamentos de actina de las células no musculares son estructuras dinámicas

En muchas células no musculares, los filamentos de actina pueden agregar y desagregar tantas veces como sea necesario. La agregación y la desagregación son procesos que están regulados de tal forma en la célula que los filamentos de actina aparecen y desaparecen en función de las necesidades de la célula.

Existen pruebas evidentes de que el ensamblaje y desmontaje de los filamentos de actina juega un papel importante en procesos de motilidad celular, tales como la locomoción ameboide, la fagocitosis, la citocinesis y la extensión y retracción de varias protuberancias celulares, tales como las microvellosidades y los axones neuronales. Estas evidencias se obtuvieron principalmente gracias a la utilización de fármacos que intervienen en la agregación de la actina, por ejemplo la citocalasina B, que paraliza la polimerización de la actina, uniéndose específicamente al extremo del filamento de actina F en crecimiento. En cambio, la faloidina, un heptapéptido bicíclico producido por la *Amanita phalloides* (que también sintetiza un compuesto similar químicamente, la alfa-amanitina, un inhibidor de la RNA polimerasa eucariótica) bloquea la despolimerización de los microfilamentos, uniéndose específicamente a las unidades de actina.

El ATP acelera la polimerización de la actina activando a la actina G para que se una preferentemente a un extremo determinado del filamento de actina en crecimiento. Finalmente, el ATP se hidroliza, pero no antes de que la polimerización haya concluido. Este proceso vectorial tiene como consecuencia que exista una cierta concentración crítica de actina G, a la cual las unidades monoméricas activadas se unen predominantemente (aunque no de forma exclusiva) a su extremo preferido del filamento de actina, a la misma velocidad que las unidades monoméricas se disocian predominantemente del extremo opuesto del filamento. En estas condiciones, el filamento de actina ni se alarga ni se acorta; alcanza más bien un estado estacionario en el que, gracias a este proceso que podríamos llamar de **escalera mecánica**, las unidades monoméricas de actina son trasladadas continuamente de un extremo al otro del filamento de actina.

Mecanismo de polimerización de la actina

La polimerización de actina *in vitro*, necesita ATP, cationes potasio, sodio y magnesio. La actina monomérica es una proteína globular conocida como actina G. Cada monómero de actina se encuentra unido a una molécula de ATP. Cuando la **actina G** agrega en filamentos helicoidales, se le llama **actina F**. La agregación de actina G en actina F se lleva a cabo en un proceso que consta de varias etapas. Cuando se añaden potasio y magnesio a la actina monomérica en presencia de ATP se produce una fase lenta, mientras se nuclean los nuevos filamentos, y luego una fase de polimerización rápida, mientras los filamentos cortos se alargan.

Primeramente, tres moléculas de actina deben formar un oligómero, conocido como núcleo. Esto se sabe porque la **nucleación** es proporcional al cubo de la concentración de actina, lo cual sugiere que la estructura de nucleación para la polimerización espontánea de la actina es un trímero de moléculas de actina. El núcleo es el oligómero de actina más pequeño en el que la tendencia a formar el filamento es mayor que la tendencia a disociarse en monómeros. **La formación de un núcleo, proceso conocido como nucleación, es termodinámicamente desfavorable, constituyendo la etapa limitante de la polimerización de la actina.** La segunda fase de la polimerización de la actina es la **elongación**, durante la cual la actina G se une de forma muy rápida a los extremos de un núcleo de actina o de un filamento, siendo la velocidad de polimerización distinta en los dos extremos del filamento. La velocidad con que un filamento se alarga es proporcional a la concentración de la subunidad libre, indicando que el filamento se alarga mediante la adición de moléculas de actina de una en una. La elongación dura hasta que la actina G alcanza su concentración crítica, concentración a la que la velocidad de adición de nuevas subunidades a los extremos de los filamentos se iguala a la velocidad de disociación de las subunidades de dichos extremos. A esta concentración no se produce crecimiento neto del polímero (**fase de equilibrio**).

Cuando un monómero de actina G se incorpora a un filamento de actina, la molécula de ATP que se encontraba unida al monómero es normalmente hidrolizada. Así la hidrólisis de ATP es importante para la

polimerización pero este proceso de ensamblaje no depende o utiliza la energía de la hidrólisis. Hay 4 conformaciones distintas: Actina G-ADP, actina-ATP, actina F-ADP, actina F-ATP. La mayor afinidad a unirse al microfilamento se da cuando está unida a ATP y al unirse se hidroliza a ADP, disminuyendo así su afinidad para que se pueda desensamblar.

Dado que hay una fase de retardo antes de que dicha hidrólisis tenga lugar, un rápido crecimiento del filamento producirá una región central que contenga actina G-ADP, mientras que los extremos poseerán actina G-ATP. Un filamento que crece a una velocidad menor podría contener actina G-ADP en uno o ambos extremos. La actina G-ATP se disocia de los filamentos más lentamente que la actina-ADP. Así, el tipo de actina G presente en los extremos de un filamento afectará a la velocidad de desagregación de dicho filamento. La actina G-ADP también polimeriza en filamentos de actina, pero la velocidad de elongación de estos filamentos es mucho menor que la de los compuestos por actina G-ATP. De este modo, el nivel energético de la célula podría determinar la velocidad global de los procesos de agregación y desagregación de los filamentos de actina.

Drogas estabilizadoras y desestabilizadoras del polímero.

- **Citocalasinas:** un ejemplo es la citocalasina B, un alcaloide procedente de los hongos, que se une a los filamentos en el extremo +, o extremo en crecimiento. Esta reacción bloquea la unión de los monómeros de actina al filamento y conduce a la desagregación de este.
- **Faloidina:** toxinas aisladas del hongo Amanita faloides que se unen a la actina lateralmente e impiden su despolimerización. Un remedio contra el veneno de la amanita es comer gran cantidad de carne cruda que tiene gran cantidad de actina, en los tejidos musculares, que se une a la faloidina y reduce su toxicidad.
- **DNAasa I:** se une a los microfilamentos e inhibe su polimerización.
- **Profilina:** interacción con actina G impidiendo su polimerización. No es una droga pues se encuentra normalmente en las células, es más se encuentra en todas las células para que haya una reserva de actina G (50% de la actina celular para una polimerización rápida y no esperar a la síntesis de timosina que también tiene ese efecto).

Los microfilamentos son estructuras polares (figura 8)

Conviene recordar nuevamente que los filamentos de actina son estructuras polares (los dos extremos polimerizan a velocidades distintas) y que cada filamento tiene un extremo + (crecimiento rápido) y otro - (crecimiento lento). Los monómeros de actina G se unen más rápidamente al extremo con púas (+) que al apuntado (-), y bajo ciertas condiciones, la agregación se lleva a cabo en el extremo con púas, mientras que la desagregación se da simultáneamente en el extremo apuntado. En este caso, los monómeros de actina circulan a través de la actina F desde el extremo con púas hasta el extremo apuntado. Ligeros cambios en la velocidad de agregación (en el extremo con púas) o de desagregación (en el extremo apuntado) determinarán si el microfilamento se alarga o se acorta.

Para reconocer la polaridad, las cabezas S1 de la miosina se unen al extremo - o apuntado.

Proteínas asociadas o ligantes de actina (ABPs) (figuras 11, 12)

Estas proteínas les dan las características a los filamentos de actina, dándoles distintas organizaciones. Además, la agregación y desagregación de los filamentos de actina en las células están reguladas por proteínas ligantes de actina. Algunas de ellas como la profilina, secuestran monómeros de actina, impidiendo su incorporación en actina F. Otras proteínas, tales como la gelsolina, la severina y la vilina, se unen al extremo con púas de los filamentos de actina y evitan así la polimerización en dicho extremo de los filamentos; muchas de estas proteínas, incluso deshacen la actina F. Algunas se han descubierto pero otras no, pero se saben que tienen que estar. Cabe destacar:

- **Tropomiosina:** la tropomiosina es también una proteína ligante de actina. Se une a los lados de los filamentos de actina no musculares del mismo modo que lo hace a los filamentos de actina en los sarcómeros del músculo estriado. Una vez unida, la tropomiosina estabiliza al filamento de actina, dándole consistencia y fortaleciéndolo. También modula la actividad de muchas proteínas ligantes de actina, incluyendo la gelsolina, y también inhibe la unión de filamina. La tropomiosina es un inhibidor competitivo de la gelsolina que compite por el sitio de unión de la actina F en la molécula de gelsolina. Casi todas las células eucarióticas contienen agregados de filamentos de actina y de miosina no musculares que son capaces de contraerse. Así, en la regulación de la estructura de los filamentos de actina, la tropomiosina también actúa como proteína reguladora en muchos procesos contráctiles.
- **Fimbrina, alfa-actinina:** genera haces de filamentos para empaquetarlos (arracimar).
- **Filamina:** entrecruza los filamentos formando un gel (reticulante).
- **Gelsolina** (PM 95.000): es una proteína ligante de actina que ha sido aislada de muchos tipos de células en mamíferos. La proteína se denomina así debido a su capacidad de convertir la actina en el gel (formado mediante la unión de filamentos atravesados entre sí) en actina en sol (una suspensión de filamentos cortos de actina). La gelsolina lleva a cabo esta conversión deshaciendo las uniones entre los monómeros de actina en los filamentos de actina ya constituidos. Esta actividad lítica es dependiente de Ca^{2+} y se da sólo cuando la concentración de dicho ión es mayor de 10^{-6}M . La capacidad de la gelsolina de romper filamentos de actina es probablemente importante en la regulación de las propiedades de viscosidad y de elasticidad del citoplasma y en la remodelación del citoesqueleto.

Posee otras dos actividades adicionales dependientes de calcio. En primer lugar la gelsolina se une al extremo con púas de los filamentos de actina, bloqueando la agregación en ese extremo y provocando el acortamiento de los filamentos debido a la deagregación de los monómeros de actina en el extremo apuntado. Esta actividad de ligarse a los extremos disminuye cuando la concentración de calcio es menor de 10^{-6}M y aumenta considerablemente cuando es mayor. Al igual que la actividad lítica de filamentos, la actividad de ligarse a los extremos promueve el paso a sol de la actina en gel. En segundo lugar, cuando la gelsolina se añade a la actina G en presencia de una concentración de calcio en el medio de aproximadamente 10^{-6}M , forma un complejo con dos moléculas de actina G que promueve la polimerización de la actina al actuar como un núcleo para la agregación. Esta actividad de la gelsolina parece ser antagonista de sus dos primeras actividades, y aún no está claro si tiene importancia fisiológica. Además de la gelsolina, se conocen otras muchas proteínas ligantes de actina sensibles a calcio. Las actividades de estas proteínas demuestran que además del papel que juegan en la contracción muscular, los iones calcio son importantes en la agregación y desagregación de los filamentos de actina no musculares.

Un ejemplo de su acción se da en el proceso de relajación de la corteza celular en procesos de fusión de membrana como en los fagocitos al engullir un microorganismo. También ayuda a formar el núcleo de polimerización de microfilamentos cuando no hay suficiente actina (1 gelsolina+ 2 actinas).

- **Miosina II:** hace deslizar los microfilamentos (contracción muscular).
- **Miosina I:** Son las cabezas globulares de la miosina. Desplaza vesículas por encima de los microfilamentos.
- **Espectrina:** une los lados de los microfilamentos a la membrana plasmática.
- **Timosina y profilina:** secuestra monómeros de actina impidiendo la polimerización de los microfilamentos.
- **Proteínas taponadoras:** taponan el filamento porque impiden la unión o desensamblaje.

Las zonas de las proteínas que se unen a actina, es decir, el dominio de unión a actina está muy

conservado. Además, la fimbrina, alfa-actinina, espectrina (tetrámero), distrofina (dímero), filamina, presentan todas un par de dominios de unión a actina. Se diferencian 3 grupos, I (proteínas dispersas), II, III (a pares o en parejas).

Los filamentos de actina se encuentran presentes en la mayor parte de las células no musculares

Además de participar en la contracción de las fibras musculares, los filamentos de actina están implicados en muchos aspectos de la arquitectura y función de las células no musculares. Por ejemplo:

Citocinesis

La microscopía de inmunofluorescencia demuestra que el surco de división se halla circundado por un cinturón de actina-miosina. Se hablará con más detalle de esto en el tema 11.

Plaquetas sanguíneas

También contienen actomiosina que, tras la formación del coágulo sanguíneo se contrae para fortalecer ese coágulo. La contracción se inicia con la activación, por parte de la calcio-calmodulina, de la quinasa de la cadena ligera de la miosina, del mismo modo que ocurre en el músculo liso (músculo liso en los temas de contracción y motilidad, tema 11). Estos son ejemplos de funciones de la actina en asociación con la miosina en células no musculares, comentadas en el tema 11, pero tiene otras muchas, como ahora comentaremos.

Las microvellosidades

La superficie de una célula epitelial del intestino se conoce como borde en cepillo. Las microvellosidades intestinales tienen aproximadamente 0,1 micras de diámetro y una micra de longitud; aumentan muy considerablemente la superficie interna del intestino, incrementando así la absorción de nutrientes por el intestino delgado.

El núcleo central de una microvellosidad contiene un haz de alrededor de 20 filamentos de actina, el cual mantiene la estructura de la misma. La polaridad de esos filamentos de actina se revela añadiendo subfragmentos S1 de miosina a los filamentos. Las cabezas de flechas resultantes apuntan al lado contrario del extremo de la microvellosidad.

Otras proteínas presentes en las microvellosidades ayudan a mantener la rigidez estructural de estas. La fimbrina (PM 60.000) proporciona uniones transversales entre los filamentos de actina y el núcleo de la microvellosidad. La vilina, al igual que la fimbrina, une filamentos de actina en haces a concentraciones bajas de calcio. Sin embargo, a concentraciones altas de calcio, la vilina promueve la disociación de los filamentos de actina. La longitud de las microvellosidades podría así regularse de esta forma. La calmodulina y una proteína aún sin nombre (PM 110.000) forman un complejo que une haces de filamentos de actina a la membrana plasmática. Otra proteína sin nombre (PM 80.000) es una ATPasa que hidroliza ATP cuando se une a la actina. Así mismo parece que participa en la unión de los haces de filamentos de actina a la membrana plasmática.

El extremo proximal del núcleo central de una microvellosidad termina en una densa maraña de filamentos que se denomina entramado terminal. El entramado terminal contiene filamentos de actina, miosina, otras proteínas ligantes de actina y filamentos intermedios. Los bordes en cepillo aislados son capaces de contraerse en presencia de ATP, presumiblemente debido al deslizamiento entre la actina y la miosina que compone el entramado terminal. Sin embargo, aún no está claro si los bordes en cepillo pueden contraerse *in vivo* o no.

Aunque la actina y la miosina son más destacables en el músculo, también se encuentran en otros tejidos. De hecho, la actina ubicua y normalmente es la proteína citoplasmática más abundante en las células eucarióticas,

constituyendo típicamente del 5–10% de su proteína total. La miosina, en cambio, está presente normalmente en sólo la décima parte de la cantidad de actina. Esta relación refleja el hecho de que la actina, además de su papel en los sistemas contráctiles basados en la actomiosina, participa en varios sistemas de motilidad independientes de miosina, siendo, además, el **principal componente del citoesqueleto**.

Tipos de disposiciones corticales de los filamentos de actina (figuras 9, 10, también mirar algo en las 11, 12)

- **Filopodio**: los filamentos de actina se disponen en haces paralelos. Se da la participación de fimbrina, proteína bifuncional que da lugar a un haz denso, es decir, que el espacio entre los filamentos de actina es pequeño y no permite la unión al conjunto de otras proteínas.
- **Fibras de estrés**: se da lugar a haces contráctiles. Participa la alfa-actinina, que en forma de dímero une los filamentos de actina, dando un haz menos denso, con los filamentos de actina más espaciados y dejando la unión al conjunto de otras proteínas como por ejemplo la actina.
- **Corteza celular**: con la participación de homodímeros de filamina y permite la formación de redes al unir dos filamentos de actina entrecruzándoles (transiciones sol–gel).

Citoesqueleto de membrana (figura 12, 13, toda esa hoja)

Es muy abundante en eritrocitos (sin núcleo, sólo tienen información genética para la síntesis de hemoglobina). Así, si aplicamos a estos eritrocitos un choque osmótico, provocamos la lisis de estos de modo que se pierde la hemoglobina y queda una estructura denominada fantasma. Este fantasma presenta en su citoesqueleto mucha espectrina. La espectrina es una proteína periférica del citoesqueleto asociada no covalentemente a la cara citoplasmática de la membrana del eritrocito. Es un heterodímero ($\alpha + \beta$) que presenta dos cadenas antiparalelas (alfa–beta) que se unen por enlaces no covalentes, por los dos lados de la molécula, a actina F. Las espectrinas se unen por microfilamentos formados por actina estabilizados longitudinalmente por tropomiosina y por moléculas protectoras como la tropomodulina. La proteína encargada de sujetar el citoesqueleto de espectrina a la membrana es la anquirina que es una tanto a la espectrina como al dominio citoplasmático de la proteína transmembranosa banda 3. El citoesqueleto de espectrina también se une a la membrana a través de otro mecanismo que depende de la proteína periférica banda 4.1. Esta proteína, que se une a la espectrina y a la actina también se une al dominio citoplasmático de la proteína glucoforina.

Resumiendo o repitiendo: forma una red bajo la membrana del eritrocito, unido a ella por una proteína integral (transportador aniónico de banda 3) y por anquirina (prot periférica interna). También participan la banda 4.1, la adductina y la glucoforina. En las uniones de la red hay complejos conectores: Act F+ tropomiosina, tapón de tropomodulina y glucoforina + adductina.

Esta estructura no es exclusiva de eritrocitos. Las plaquetas y el músculo esquelético también presentan citoesqueleto asociado a membrana. Las plaquetas en reposo al activarse por factores de coagulación cambian su forma. El músculo esquelético tiene una proteína parecida a la espectrina, y que actúa como ella: distrofina. Su ausencia produce la **distrofia muscular de Duchene**.

Microtúbulos

Introducción (figura 1)

Los microtúbulos son los componentes esenciales del citoesqueleto. Casi todas las células eucarióticas contienen microtúbulos, la clase de filamento proteico más larga. Los microtúbulos participan en muchas funciones celulares, incluyendo el movimiento de los cromosomas a los polos opuestos durante la división celular y el mantenimiento de la estructura de la célula. Los microtúbulos son también unidades estructurales de los cilios y de los flagelos en los organismos eucariontes. Los microtúbulos de los cilios y de los flagelos

son estables; los otros microtúbulos de las células eucarióticas son lábiles.

Los microtúbulos son cilindros huecos, no ramificados, de unos 25 nm de diámetro (14nm de diámetro interno) y muchísimos de micrómetros de longitud. Se distribuyen por todo el citoplasma en patrones no siempre obvios, pero que reflejan sus funciones especiales. Además de su distribución general en el citoplasma, también hay microtúbulos cortos organizados en tripletes en los centriolos y en los cuerpos basales. Se los encuentra, asimismo, en los cilios y en los flagelos, y forman los filamentos del huso acromático de la mitosis. Los microtúbulos participan en la elongación de las células, el movimiento de los cilios y flagelos, el mantenimiento de la asimetría celular, el transporte intracelular de los gránulos de secreción y el movimiento de los cromosomas durante la mitosis.

Los microtúbulos están compuestos de una proteína llamada **tubulina** que se presenta en dos formas: alfa-tubulina, beta-tubulina. Dos proteínas que apenas difieren en su composición y que se organizan en dímeros que constituyen la subunidad básica del microtúbulo. La formación de los microtúbulos se inhibe o detiene con drogas que se unen a los dímeros (ej: vinblastina, colchicina). Los microtúbulos se disocian con facilidad en sus subunidades diméricas a bajas temperaturas o altas presiones hidrostáticas. Cuando los microtúbulos se desorganizan por estos medios, la mitosis se detiene porque los filamentos del huso se disocian y los cromosomas no se separan; los gránulos de secreción no llegan a la superficie celular por la ausencia de los microtúbulos que guían su desplazamiento; y la formación axónica se detiene debido a la ausencia de los microtúbulos (neurotúbulos) que intervienen en la elongación celular. En estos procesos, los microtúbulos son considerados como guías de motores moleculares, que están unidos a las estructuras móviles y son impulsados por la hidrólisis de ATP(mirar tema 12).

Las funciones de los microtúbulos son: (figura 1)

- Motricidad intracelular y transporte (microfilamentos y microtúbulos interaccionan con proteínas motoras para esta motricidad).
- Dan la forma celular.
- Segregación de cromosomas.
- Movimientos de pigmentos.
- Exocitosis (secreción de hormonas y neurotransmisores).

Los microtúbulos son muy abundantes en células anisométricas como neuronas, bastones. En las neuronas, se extienden por todo el axón, utilizándose estas células para la purificación de microtúbulos.

Purificación de microtúbulos (figura 2)

- Los microtúbulos se despolimerizan en frío.
- Los microtúbulos también se despolimerizan en presencia de calcio, por lo tanto al proceso se le añade EGTA: agente quelante de iones divalentes, calcio, magnesio (tiene una afinidad de 100 más por el calcio que por el magnesio).
- Para el proceso de purificación se utilizan ambos conocimientos, para así poder aislar los microtúbulos de un homogeneizado celular.

Tubulina & Microtúbulos (estructura, dinamismo)

Tabla de diferencias entre microtúbulos y microfilamentos

Actina Tubulina

PM 42.000 50.000 x2

Forma no polimerizada globular monomérica globular dimérica

Unen nt 1ATP/monómero 2GTP/dímero

Forma polimerizada filamento cilindro hueco

Diámetro 8nm 25nm

Los microtúbulos son polímeros de tubulina, un dímero de subunidades globulares de alfa y beta tubulina de 55 o 50 kD cada una (el dímero tiene un peso alrededor de los 100 kD). Cada subunidad alfa y beta está codificada por muchos genes (multigénicas). Cada uno de estos dos tipos de subunidades está muy conservado dentro del reino eucariótico, siendo menos homólogos cuando se comparan entre sí. En humanos hay 6 isoformas con un 90% de identidad (las distintas subunidades alfa tienen un 90% de sus aa iguales y las beta también) y pueden formar copolímeros. Así la identidad entre las subunidades alfa y beta baja hasta entre el 50–60%.

A bajas temperaturas, y en presencia de calcio, la tubulina adopta una forma protomérica soluble (los dímeros alfa-beta se disocian sólo en presencia de agentes desnaturalizantes) y esto es aprovechado para su purificación. Sin embargo, en condiciones fisiológicas, la tubulina polimeriza formando microtúbulos, mediante un proceso en el cual cada molécula de tubulina se une a 2 GTPs e hidroliza uno de ellos a GDP+Pi, durante o poco después de la incorporación del dímero al microtúbulo. La subunidad beta une un GTP denominado GTPe o intercambiador ya que se puede intercambiar con GTP libre, mientras que la subunidad alfa se une a un GTPn o no intercambiador, el cual si se separa se destruye el dímero.

Aunque la polimerización está asociada a la hidrólisis de GTP esto no es desde el punto de vista energético, sino por los cambios conformacionales que sufren los dímeros para poder polimerizarse y despolimerizarse, al igual que en los microfilamentos. Esta hidrólisis es la que regula la afinidad de la tubulina por el microtúbulo, ya que existen 4 estados para la tubulina: en solución, T-GTP, con mucha afinidad por el microtúbulo, y T-GDP con poca afinidad por el microtúbulo. Y unida al microtúbulo, T-GTP y T-GDP, con las mismas afinidades que antes por el microtúbulo.

Los estudios de microscopía electrónica y de rayos X indican que los microtúbulos constan de 13 protofilamentos paralelos y escalonados, que se ordenan alrededor de un núcleo hueco. Los protofilamentos, que constan de **subunidades alternas de alfa y beta tubulina unidas cabeza con cola**, están todos orientados en la misma dirección (figura 3). La orientación es C -N ---C -N , así la interacción C -N es mucho más fuerte que la interacción C -N . Por consiguiente, los microtúbulos, como los microfilamentos, son entidades polares: el extremo que crece más rápidamente es llamado extremo +, y el otro es denominado extremo - (figura 10). **Esta organización polar del microtúbulo es necesaria para el tráfico de moléculas en determinadas direcciones.** Generalmente, en una célula, los microtúbulos están orientados con sus extremos menos hacia un centrosoma y con sus extremos + hacia la periferia celular. (figura 7)

La polaridad se puede detectar en sección transversal añadiendo tubulina libre a microtúbulos preexistentes. Así, en condiciones especiales los monómeros de tubulina no se incorporan a los extremos de los microtúbulos sino a los lados: **Técnica de los ganchos o garfios** (figura 5): si los ganchos están en el sentido de las agujas del reloj, observamos los microtúbulos desde el lado +, es decir, lado de crecimiento rápido. Si por el contrario los ganchos están en el sentido contrario a las agujas del reloj observamos el extremo de crecimiento lento o -.

Los microtúbulos experimentan un ensamblaje y desmontaje continuos (figura 10). En efecto, en una determinada población de microtúbulos, algunos pueden crecer mientras que otros se acortan simultáneamente. Esta inestabilidad dinámica se origina debido a que si el segundo GTP de una subunidad de tubulina, en el extremo + del microtúbulo, se hidroliza a GDP antes de que otras subunidades de tubulina se

añadan al extremo, y la subunidad unida a GDP resultante se disocia rápidamente del microtúbulo. En una célula, el equilibrio entre el crecimiento o el acortamiento netos del microtúbulo depende, por tanto, de la velocidad con que la tubulina hidroliza el segundo GTP unido, junto con la disponibilidad de subunidades de GTP-tubulina. Incluso cuando los microtúbulos mantienen una longitud constante, no se encuentran estáticos en absoluto: experimentan un desplazamiento, a modo de escalera mecánica, impulsado por GTP, en el cual las subunidades de tubulina se añaden al extremo más a la misma velocidad con que se disocian del extremo menos. Probablemente, regulando la velocidad de polimerización de la tubulina, las células varían sus formas e inducen la formación y disolución de aparatos celulares tales como el huso mitótico.

Comportamiento cinético de los microfilamentos y los microtúbulos (*in vivo/in vitro*)

Figura 6:

- **Nucleación:** formación de los primeros núcleos. Fase lenta.
- **Elongación:** crecimiento rápido del filamento.
- **Equilibrio entre polímeros y monómeros.**
- **Redistribución de longitudes.**

Se requiere NTP para que los dímeros de tubulina y la actina G estén en la conformación adecuada. La hidrólisis no es para conseguir energía sino para que tengan menor afinidad por el polímero y se despolimericen.

El proceso de polimerización es espontáneo. Para ello tiene que aumentar la entropía, esto lo consigue aumentando la entropía del entorno, como suele ocurrir. Al polimerizarse, las moléculas de agua que solvatan a la tubulina y a la actina G se desorganizan, y aumenta la entropía. También se puede conseguir la espontaneidad aumentando la temperatura. En definitiva que el sistema, como debe de ser, gane entropía, aunque el polímero en sí la pierda respecto a su estado de despolimerización, puesto que el agua del medio aumenta su entropía.

Para que se produzca la polimerización debe de haber una concentración mínima de tubulina o de actina, denominada **concentración crítica** (figura 10'). Esta concentración mínima se puede expresar matemáticamente como la inversa de la constante de equilibrio para la adición de subunidades. La concentración mínima se podría definir como: la concentración mínima hasta que el microtúbulos polimeriza o la concentración residual en el equilibrio protómero-polímero.

En esta figura se puede observar a grandes rasgos la cinética de la formación de microfilamentos y microtúbulos:

[Subunidad actina G o tubulina- NTP]libre ensamblaje
[Subunidad-NTP]ensamblada

DIFERENTES CONFORMACIONES

[Sub-NDP]libre
[Subunidad-NDP]ensamblada

Posibles explicaciones del dinamismo de microfilamentos y microtúbulos:

- **Efecto noria (o escalera mecánica), por el extremo + se incorporan y por el extremo – se desensamblan** (nota: Parece según lo que dijo el profesor, que aceptaría esto para los microfilamentos y el punto siguiente para los microtúbulos, como hipótesis de sus respectivos comportamientos cinéticos). Esto

no parece que suceda en microtúbulos, puesto que en las células están unidos a centros de organización microtubular, y crecen por el extremo + alargándose y luego se despolimerizan, también por ese extremo (el extremo – es estable, centro de organización microtubular, los centriolos).

– + – +

subunidad marcada radiactivamente.

- **Inestabilidad dinámica**(figuras 11, 12): cuando un microtúbulo crece rápidamente, la incorporación de moléculas de tubulina en el extremo del polímero es más rápida que la hidrólisis de GTP que transportan, es decir, existe un desfase entre la unión y la hidrólisis de GTP. Esto implica la formación de un casquete de GTP en el extremo + (estabilidad en el extremo + y en el extremo – unido al COMT) y como las moléculas de tubulina que tienen GTP se unen unas a otras con mayor afinidad que las que contienen GDP, el microtúbulo continúa su crecimiento. Cuando pierde el casquete (si disminuye la velocidad de crecimiento o si baja el GTP en el medio) se despolimeriza de forma catastrófica: ***Inestabilidad dinámica/teoría de la catástrofe.***

In vivo, el extremo – está unido al centrosoma, por lo tanto, el + crece (figuras 7, 8, 9) hasta lo indicado anteriormente, momento en que empieza a despolimerizar. Se estabilizan si se unen en su extremo + a otra estructura como, por ejemplo, lo que ocurre en la segregación cromosómica. En los microfilamentos se cree que este proceso podría ocurrir así, pero a una velocidad tan grande que no sería observable, por lo que se sigue con el modelo del efecto noria.

Los fármacos antimitóticos inhiben la formación de microtúbulos

Las drogas mitóticas detienen la mitosis en la metafase. Así, se utilizan para el recuento de cromosomas.

Tenemos diferentes ejemplos como son los alcaloides: colchicina, colcemida, alcaloides de la vinca (vinblastina y vincristina). Provocan estos la despolimerización de microtúbulos.

La colchicina (figura 5'), un alcaloide producido por el azafrán de otoño, inhibe los procesos celulares dependientes de microtúbulos, mediante la inhibición de la polimerización de los protómeros de tubulina. Ha sido utilizado durante más de 2000 años para tratar la gota. La colchicina detiene la mitosis, tanto en células vegetales como animales, en la metafase, impidiendo la formación del huso acromático. También inhibe la motilidad celular. La colchicina actúa uniéndose a un sitio específico de alta afinidad de la tubulina. La velocidad de polimerización de la tubulina disminuye a la mitad cuando alrededor del 2% de la tubulina citoplasmática se encuentra unida a la colchicina. Parece que un complejo colchicina–tubulina se incorpora en el extremo A en crecimiento del microtúbulo. Una vez que esto ocurre, la subunidad colchicina–tubulina bloquea el proceso de polimerización.

Los alcaloides de la vinca, la vinblastina y la vincristina, producidos por la *Vincapervinca malgache* y *Vinca rosae*, también inhiben la polimerización de los microtúbulos, uniéndose a la tubulina. Estas sustancias son ampliamente utilizadas en la quimioterapia del cáncer, ya que el bloqueo de la mitosis mata preferentemente a las células de crecimiento rápido. Curiosamente, la colchicina no es selectivamente tóxica para las células cancerosas.

También cabe destacar drogas como el Nocodazol, utilizado para quimioterapia en el cáncer, y el Taxol, que se extrae de la corteza del tejo. Este último se une lateralmente a los microtúbulos y los estabiliza (impidiendo su dinamismo y, por tanto, impidiendo realizar sus funciones que derivan de este dinamismo).

La estramustina es una droga antimitótica que se une a la MAP2.

Los microtúbulos están asociados a proteínas específicas (figura 4)

Los microtúbulos se unen a proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs, microtubule-associated proteins). Ya que todos los microtúbulos parecen estar hechos a partir del mismo pool de dímeros de tubulina, parece probable que las funciones de un microtúbulo dado dependen de su asociación con una MAP específica.

Muchas MPAs han sido aisladas a partir de extractos de cerebro, órgano que es particularmente rico en microtúbulos. Entre otras se conocen la MAP1, MAP2, Factor tau, y la MAP3.

Una de las MPAs mejor caracterizada es la MAP2 (figura 4). Esta es una molécula alargada que forma proyecciones sobre los microtúbulos, al asociarse a su pared, y estimula la polimerización de los mismos. El dominio de proyección de la MAP2 se une a las subunidades reguladoras de una proteína quinasa dependiente de cAMP y posee sitios que se encuentran fosforilados; el dominio de unión a los microtúbulos de la MAP2 se une a la calmodulina y también contiene sitios fosforilados.

Otra MAP, denominada factor Tau, es un oligómero que contiene de tres a seis polipéptidos dependiendo de la especie de la que haya sido aislada. Al igual que la MAP2, la proteína Tau tiene sitios de fosforilación y une calmodulina. Se ha propuesto que la proteína Tau cumple un papel en la iniciación de la polimerización de los microtúbulos, es decir, permitiría la unión de subunidades al microtúbulo. Ya que las proteínas quinasas dependientes de cAMP y la calmodulina responden a señales hormonales y se encuentran implicadas en la transducción de señales, podrían jugar un papel en la regulación de la polimerización de los microtúbulos. Sin embargo, aún no se ha aclarado como se regula la agregación y la desagregación de los microtúbulos en la célula. Según se dio en clase, podría ser una proteína reticulante de microtúbulos pues sirven para su unión.

Otras MAPs parecen estar implicadas en los movimientos de los orgánulos celulares a lo largo de los microtúbulos. Una de estas proteínas es la MAP 1C, una ATPasa con propiedades muy similares a las de la dineína de los cilios y de los flagelos. Al igual que la dineína del axonema, la MAP 1C ejerce una fuerza a lo largo de los microtúbulos en un único sentido, desde el extremo - al extremo +. Otras ATPasa asociada a los microtúbulos, la quinesina, ejerce fuerza sólo desde el extremo + al -. Estas proteínas podrían unirse a vesículas y a otras pequeñas partículas, haciéndolas caminar a lo largo del microtúbulo, al igual que la dineína del axonema camina a lo largo de la subfibra adyacente en el axonema. En conjunto, la MAP 1C y la quinesina hacen posible que la célula pueda verificar el transporte intracelular de partículas en los dos sentidos a lo largo de un microtúbulo.

¿A qué se debe la versatilidad funcional de los microtúbulos?

- **Gracias a las MAPs:** la tubulina tiene zonas de unión a secuencias conservadas en las distintas proteínas que interaccionan con ella.
- **A la propia diversidad génica de las distintas tubulinas:** 90% de identidad, posibilidad de formar copolímeros.
- **A las modificaciones postraduccionales:**
 - **Acetilación:** acetilación de la **alfa-tubulina** en un residuo determinado de Lys (40). Sólo se produce cuando la tubulina está formando parte del microtúbulo. Se ve en cilios y flagelos. En los flagelos se acetila la lisina para incrementar la estabilidad del microtúbulo mediante la acetil transferasa que se localiza en estos flagelos. En el citoplasma hay una enzima desacetilante.
 - **Destirosilación:** eliminación de Tyr en uno de los isotipos de tubulina alfa mediante una carboxipeptidasa, que elimina el residuo de tirosina del C-terminal. No se suelen dar en tubulina recién sintetizada. También se encuentran en estructuras estables. Da estabilidad frente a colchicina.
 - **Fosforilación:** en un isotipo beta (beta III) se fosforila Ser, Thr.
 - **Glutaminación:** se añaden hasta 6 restos de Glu en algunos isotipos de alfa y beta, para así incrementar las cargas negativas y modificar sus propiedades al interaccionar con moléculas que se

unen a esas cargas.

Centros organizadores de microtúbulos: Centríolo, etc (figuras 7, 8, 9)

Podemos tratar con colcemida, a una célula en división, y ver los centros organizadores, después eliminamos la colcemida y podemos ver el áster. Además, en una célula en interfase podemos observar mediante detección con anticuerpos anti-tubulina fluorescente una elevada densidad de microtúbulos cerca del núcleo que irradian hacia la periferia. Si aplicamos esto a células en cultivo y se decoran con ganchos se observa, lo que se puede ver en las figuras 7, 8, 9, es decir, identificar los centros organizadores de microtúbulos, *in vivo*, en las células vivas.

En la mayoría de las células animales, el centrosoma es el COMT (centro organizador de microtúbulos), figuras 7, 8. En esas figuras se observa, el material pericentriolar que es la región que nuclea la polimerización de los microtúbulos. En este material hay unos anillos formados por gamma tubulina que puede interaccionar con los dímeros alfa-beta para la nucleación (cumplen la función que *in vitro* hacen los 13 protofilamentos). La **gamma tubulina** tiene un 40% de identidad con las subunidades alfa y beta. Se localiza en los centrosomas en forma de anillos estables que se pueden asociar a la pericentrina. La gamma globulina va a formar los núcleos de polimerización *in vivo*, a diferencia de *in vitro* que es la semilla o círculo de 13 dímeros, a partir de cual se forma el microtúbulo con sus anillos de 13 protofilamentos, ya que en estas condiciones hay suficiente concentración de tubulina. Está en la base de cada microtúbulo, y define el extremo -.

Los vegetales superiores no tienen centriolos pero si material pericentriolar para organizar los microtúbulos. **Figura 8.** Acoplado al ciclo celular que dura unas 18 a 20 horas, está el ciclo de duplicación de centriolos. La estructura de los centriolos es de 9x3 microtúbulos, que son dan lugar a cilindros 0,1 de diámetro x 0,3 de ancho, que se disponen de manera suplementaria (la estructura viene en cualquier libro). Los centriolos se empiezan a duplicar en el final de la G1 porque en la G2 y M tiene que estar ya duplicado.

A veces hay una interconversión entre centriolos y cuerpos basales, por ejemplo (figura 9): Chlamydomonas, alga verde con dos flagelos cada uno con su corpúsculo basal. Al iniciarse la mitosis los flagelos son reabsorbidos y los corpúsculos basales migran a una posición cercana al núcleo donde organizan el huso mitótico. Después de la mitosis, los centriolos se convierten de nuevo en cuerpos basales y los flagelos reaparecen.

Ampliación sobre los centriolos por el Ross: Los citólogos clásicos identificaron una parte de la célula cercana al núcleo que consideraron importante para las primeras etapas de la división celular. Esta parte de la célula se llama centro celular, centrosoma o centrósfera. Los componentes estructurales especiales del centro celular que intervienen en la mitosis son los centriolos. Cada uno está compuesto de nueve tripletes de microtúbulos dispuestos de manera que forman un estructura cilíndrica corta. Los centriolos se presentan en pares, en donde los dos componentes se orientan formando un ángulo recto y parecen dibujar una T. Dos de los microtúbulos de cada triplete comparten una pared con un microtúbulo adyacente. Por lo tanto, en un corte transversal, los dos microtúbulos se parecen a letras C, mientras que el tercero tiene forma de O (CCO). Antes de la división celular, cada centriolo se duplica. La duplicación comienza con la formación de un procentriolo en ángulo recto a la superficie de cada uno de los centriolos originales. En un principio, el procentriolo consiste en nueve túbulos simples dispuestos formando un cilindro. En asociación con cada uno de ellos se forma un par adicional, con lo que se consiguen los nueve tripletes de microtúbulos característicos del centriolo maduro. Después de la duplicación, los dos pares centriolares se mueven hacia polos opuestos de la célula y actúan como centros organizadores de los husos acromáticos de la mitosis.

También se sabe que los centriolos son igualmente importantes para organizar el nuevo sistema microtubular que se forma en las células hijas a partir de los dímeros de tubulina provenientes del dismantelamiento del huso mitótico. En el centriolo y el material pericentriolar constituyen así un centro organizador microtubular general (COMT) tanto en la interfase como en la mitosis. La presencia de un único COMT en las células en

interfase, junto con la polaridad inherente de los microtúbulos derivada de la polaridad de los dímeros de tubulina, proporciona un sistema de coordenadas radial por el cual la célula puede distinguir entre centro y periferia para la localización de sus organelas y enzimas.

Durante la formación de los cilios y flagelos los centriolos se replican y migran hacia la superficie de las células que serán ciliadas. Cada centriolo sirve como organizador para el ensamblaje de los microtúbulos del cilio. La estructura ciliar central es un conjunto de microtúbulos de organización compleja, que consiste en un par central rodeado por dobles periféricos. La función organizadora es diferente de la del COMT porque en este caso los microtúbulos axonémicos se continúan con los microtúbulos del centriolo, que permanece como el cuerpo basal del cilio.

Ampliación del RAWN: Los microtúbulos citoplasmáticos son estructuras dinámicas

Al contrario que los microtúbulos estables del axonema de los cilios y de los flagelos, muchos microtúbulos en el citoplasma son estructuras dinámicas que experimentan agregación y desagregación. Estas propiedades dinámicas son muy importantes en la morfogénesis y en la función de los microtúbulos del citoesqueleto. La polimerización de la tubulina puede estudiarse *in vitro* añadiendo fragmentos de microtúbulos a una disolución de dímeros de tubulina. Los fragmentos de microtúbulos pueden ser utilizados como sitios de iniciación para la polimerización. La agregación y la desagregación de los microtúbulos se produce continuamente, y sólo aproximadamente la mitad de la tubulina celular se agrega en los microtúbulos en un momento dado. En esta ampliación extremo A = + y extremo D = -.

Cada subunidad del dímero de tubulina alfa-beta se une a una molécula de GTP. Un GTP está unido muy fuertemente y se intercambia con GTP del medio muy lentamente; el otro GTP se intercambia con el GTP soluble de forma rápida. Una vez que la tubulina se ha incorporado a los microtúbulos, la molécula de GTP intercambiable es hidrolizada a GDP, que no es intercambiable en el polímero. Esta reacción proporciona una forma de seguir la naturaleza dinámica del proceso de agregación del microtúbulo mediante experimentos de intercambio isotópico. En un experimento, los microtúbulos se agregaron *in vitro* hasta llegar aparentemente al equilibrio en presencia de GTP frío. Después se dio un pulso de Tritio-GTP. Los microtúbulos incorporaron Tritio-GTP de forma lineal durante un largo periodo de tiempo. En un segundo experimento, los microtúbulos se agregaron en presencia de Tritio-GTP, por lo que contenían marcaje en toda su longitud. Cuando se añadió GTP frío se perdió el GTP marcado de los microtúbulos. La velocidad de pérdida de GTP marcado en el segundo experimento fue igual a la velocidad de incorporación en el primer experimento. Estos datos sugieren que cuando el sistema está en el equilibrio, las subunidades se añaden a un extremo de un microtúbulo, mientras que el otro extremo las pierde a la misma velocidad. La velocidad de flujo neto es de aproximadamente 0.9 micromoles por hora. Podemos así imaginar un proceso en el que los dímeros de tubulina migran a través del microtúbulo como si fuera una noria. Este proceso cíclico seguido por los dímeros a lo largo de los microtúbulos se denomina, de hecho, **mecanismo de noria**. Este mecanismo seguido por las subunidades del microtúbulo y sugerido por los experimentos de intercambio isotópico ha sido demostrado directamente por inmunomicroscopía electrónica.

El proceso antes descrito tiene lugar, debido a que los extremos A (+) y D (-) de un microtúbulo poseen diferentes concentraciones críticas. La concentración crítica de un extremo puede ser definida como la concentración de tubulina libre a la que la velocidad total de agregación y la de desagregación en el extremo se encuentran equilibradas. La concentración de tubulina en el estado estacionario está por encima del valor de la concentración crítica para el extremo A, pero por debajo del valor de la concentración crítica para el extremo D. Como resultado de ello, las subunidades de tubulina se unen al extremo A a la misma velocidad que las pierde el extremo D, repitiéndose el proceso de la misma forma que da vueltas una noria indefinidamente.

Aunque ha sido confirmada la existencia de este mecanismo de noria *in vitro*, no está claro aún que se dé *in vivo*. La mayor parte de los microtúbulos del interior de la célula poseen probablemente los extremos anclados

a algún tipo de centro de nucleación, por lo que no habría cabida para que se diera este mecanismo de noria. Sin embargo, las propiedades de los microtúbulos que conducen a la aparición de este mecanismo *in vitro* tienen importantes implicaciones en la localización y en la polaridad de los microtúbulos *in vivo*. Si un microtúbulo está anclado por su extremo D y tiene el extremo A libre, puede alargarse mientras que la concentración de tubulina libre permanezca por encima de la concentración crítica del extremo A. La elongación reducirá la concentración de tubulina no agregada hasta que la concentración de tubulina libre alcance esa concentración crítica, momento en el que cesará el proceso de elongación. Así, mientras una célula contenga microtúbulos anclados por su extremo D, la concentración de tubulina libre en la célula tenderá hacia la concentración crítica para el extremo A. Sin embargo, la formación espontánea de microtúbulos con dos extremos libres no podrá darse a valores de la concentración de tubulina del orden de la concentración crítica para el extremo A, debido a que la velocidad de desagregación en el extremo D libre superaría a la de agregación en el extremo A, y el nuevo microtúbulo formado sería inestable. De forma similar, cualquier microtúbulo anclado por el extremo A, y con su extremo D libre, se acortaría y desaparecería. Teniendo en cuenta este modelo se podría predecir que todos los microtúbulos dentro de una célula estarán anclados por microtúbulos su extremo D. En efecto, este parece ser el caso para la mayor parte de los microtúbulos. La naturaleza dinámica de los microtúbulos proporciona así un mecanismo por el cual la célula puede controlar tanto la distribución espacial como la direccionalidad de estas estructuras del citoesqueleto.

Se ha dilucidado una propiedad dinámica adicional de los microtúbulos mediante experimentos en los que estos se formaban a concentraciones altas de tubulina y posteriormente se les introducía en un medio con una concentración baja de tubulina. Bajo estas condiciones, algunos microtúbulos desaparecían, pero otros se alargaban. Dicho comportamiento no había sido predicho a partir del modelo de mecanismo de noria, surgiendo así el **modelo de inestabilidad dinámica (parece el aceptado por el profesor)** para la agregación y desagregación de los microtúbulos. Este modelo propone que cada extremo de un microtúbulo puede existir bajo dos estados. En un estado, el microtúbulo se encuentra cubierto por GTP-tubulina; en el otro estado, la malla de GDP-tubulina se extiende hasta el extremo del microtúbulo. Los microtúbulos cubiertos con GTP-tubulina a modo de caperuza son relativamente estables debido a que la velocidad de disociación de las subunidades de GTP-tubulina del microtúbulo es muy lenta. Por el contrario, los microtúbulos en los que falta la caperuza de GTP-tubulina son inestables debido a que GDP-tubulina se desprende rápidamente del extremo del microtúbulo, por lo que este se despolimeriza. El que el microtúbulo tenga o no caperuza de GTP-tubulina dependerá de la velocidad relativa de adición de la GTP-tubulina al microtúbulo y de la velocidad de hidrólisis del GTP una vez que haya tenido lugar su adición. La hidrólisis del GTP se produce algo después de que subunidad de GTP-tubulina haya sido incorporada en el microtúbulo. Este retraso en la hidrólisis implica que bajo condiciones de elongación rápida (concentración alta de tubulina libre), la porción terminal del microtúbulo contendrá GTP-tubulina. A concentraciones de tubulina más bajas, los monómeros de GTP-tubulina se unirán al extremo en crecimiento más lentamente y la caperuza se acortará. Lo más probable es que la velocidad de hidrólisis del GTP alcance a la de adición de las subunidades, haciendo que la GDP-tubulina quede expuesta y conduciendo a la desagregación del microtúbulo. En el experimento del que se habla arriba, las fluctuaciones al azar en la longitud de las caperuzas de GTP-tubulina producidas tras la dilución resultan probablemente en la aparición de microtúbulos con y sin caperuza. Los primeros se alargan, mientras que los últimos se acortan y acaban desapareciendo. La inestabilidad dinámica parece ser un importante mecanismo mediante el cual la célula puede reordenar la disposición de los microtúbulos. Por ejemplo, el hecho de que las fibras del huso se recambien con una velocidad demasiado rápida es difícilmente explicable por el modelo de la noria, mientras que si puede justificarse fácilmente basándose en el modelo de inestabilidad dinámica.

Aunque ambos modelos podrían parecer incompatibles, los experimentos indican que bajo algunas condiciones el comportamiento de los microtúbulos podría corresponder a cualquiera de los dos mecanismos. Los mecanismos moleculares de este fenómeno no han sido clarificados todavía.

Nota: los mecanismos teóricos que explican el dinamismo de microt. y microf. no están muy claros, el

profesor parece aceptar la inestabilidad dinámica. Lo que si está claro en ambos casos es que la adición de subunidades se da, preferentemente, en un extremo (+) y la eliminación se da preferentemente en otro extremo (-).

Filamentos intermedios

Introducción.

Los filamentos intermedios son componentes estructurales estables del citoesqueleto (figuras 1–7)

Los filamentos intermedios son llamados así debido a su tamaño relativo respecto a los microfilamentos y los microtúbulos. El diámetro característico de los filamentos intermedios es de aproximadamente 10 nm; así, son menores que los microtúbulos, pero mayores que los microfilamentos. Al contrario que los microtúbulos y los microfilamentos, los filamentos intermedios son muy estables. Ellos no sufren agregación o desagregación durante el ciclo celular, y su papel parece ser más estructural que dinámico. Hay muchos tipos de filamentos intermedios, cada uno con una diferente composición proteica.

Los filamentos intermedios forman un grupo heterogéneo. Sobre la base de su composición proteica y su distribución celular se han identificado cinco clases principales de filamentos intermedios: **citoqueratinas (o prequeratinas), vimentina, desmina, neurofilamentos y proteína gliofibrilar ácida.**

Estos tipos de filamentos químicamente distintos están compuestos de subunidades de diferente peso molecular. Para determinar su distribución se han utilizado técnicas de inmunomarcación. Los anticuerpos, que son específicos para los diversos tipos de filamentos, también han sido útiles en la clínica para el diagnóstico de tumores. Por ejemplo, en el diagnóstico de los gliomas, el patólogo puede emplear técnicas de inmunomarcación para buscar las células que sean reactivas al anticuerpo antiproteína gliofibrilar ácida.

Los filamentos intermedios parecen tener una función de sostén o estructural general. Las diversas clases de filamentos difieren en su secuencia de aminoácidos y presentan gran variedad en sus pesos moleculares. Todos comparten una región homóloga, que es importante para el autoensamblaje del filamento, y contienen una región de longitud variable disponible para el contacto molecular con otras estructuras intracelulares y otras funciones dentro de la célula. Los filamentos intermedios miden aproximadamente 8 a 11 nm de diámetro. Los filamentos intermedios de las neuronas y células de la neuroglia se llaman neurofilamentos y gliofilamentos, respectivamente. En las células epidérmicas están los filamentos intermedios llamados tonofibrillas, que se componen de proteínas de la familia de las citoqueratinas. Algunos de los filamentos intermedios de las células musculares y epidérmicas conectan organelas o estructuras internas a proteínas transmembranales que están unidas a proteínas transmembranales similares de células vecinas o a filamentos de la matriz extracelular. Los filamentos intermedios tampoco desaparecen y se vuelven a formar de la manera continua característica en que lo hace la mayoría de los microtúbulos y los microfilamentos. Es por estas razones que se cree que los filamentos intermedios desempeñan un papel estructural muy importante dentro de la célula y que constituyen el enlace citoplasmático de una unidad filamentosa textural que incluye los filamentos del citoplasma, núcleo y el compartimento extracelular.

Características básicas

- Estables con altas I.
- Las subunidades de los filamentos intermedios no son proteínas globulares sino que son proteínas fibrosas que se encuentran en el citoplasma de la mayoría de las células eucariotas superiores. También se encuentran en la lámina nuclear.
- Los filamentos intermedios no son tan lábiles como los microtúbulos y microfilamentos.
- La evolución de las distintas subunidades no es convergente, sino divergente.
- No tienen unión a NTP. No realizan intercambio dinámico de subunidades.

- No son estructuras polares (no sirven de raíl para un motor molecular).

Localización y función (figuras 5, 6, 7)

- Su distribución es bastante paralela a los microtúbulos ya que hay moléculas que interaccionan con microtúbulos y filamentos intermedios. Al tratar con colchicina y desaparecer la red de microtúbulos también desaparece la de filamentos intermedios. Sus redes están interconectadas y probablemente los microtúbulos organizan los filamentos intermedios.
- Forman redes de FI que conectan células en tejidos que están sometidos a tensiones mecánicas, de modo que reparten tensiones localizadas en un punto entre varias células gracias a esos filamentos intermedios, y así evitan la rotura del tejido en un punto (con participación de desmosomas: unión célula-célula a través de filamentos intermedios). Ejemplo: epitelios.
- También abundan a lo largo de los axones de neuronas y en todos los tipos de célula musculares.
- Organizadores mecánicos de la célula (jaulas de estructuras celulares: jaulas de estructuras determinadas, como gotas de lípido).

Estructura (figuras 1-4)

- Los tipos principales de monómeros proteicos de filamentos intermedios son moléculas fibrosas alargadas con una cabeza N-terminal, una cola C-terminal y un dominio central a modo de varilla.
- El dominio central consta de una región extensa de alfa hélice que contiene largos tándenes repetidos de secuencias de aminoácidos distintas (pero siempre hidrofóbicos) donde cada siete aminoácidos hay una leucina que es el punto de anclaje para formar dímeros enrollados entre dos alfa hélices paralelas (cremalleras de leucina). **Las alfa hélices se interrumpen para permitir la flexión.** Otros tipos de proteínas alargadas del citoesqueleto con estructuras diméricas enrolladas, como la tropomiosina y la cola de la miosina, que contienen largas tiras de repeticiones en heptadas.
- Dos de los dímeros superenrollados interaccionan antiparalelamente (cabeza-cola) para formar un tetramero o protofilamento. Se encuentran pequeñas cantidades de tetrameros libres en las células, lo cual sugiere que la subunidad tetramérica es la unidad fundamental de ensamblaje de los filamentos intermedios. Esta disposición antiparalela, implica que el filamento intermedio no sea una estructura polarizada. Se observa, en el protofilamento, siempre una hélice alfa superenrollada de 42nm de longitud que se conserva, y cambia la zona N y C terminal.
- Los tetrameros se añaden o asocian, contrapeados, al filamento intermedio en crecimiento, esto se traduce en una periodicidad que se observa en el filamento intermedio. Los filamentos presenta una periodicidad cada 21nm.
- Con los filamentos intermedios, la distinta funcionalidad no depende de las proteínas asociadas como en el caso de los microfilamentos y microtúbulos. La distinta funcionalidad depende en este caso de los distintos extremos N y C terminales de cada monómero (figura 2). Esto también implica la selección o incompatibilidad de polimerización, por ejemplo, la vimentina no puede dar lugar a queratina.
- Se sabe también que tienen proteínas asociadas, como las de las placas de los desmosomas puntuales (placoglobina, desmoplaquina).

Subunidades de filamentos intermedios (figura 8)

Citoplasmáticas

- **Filamentos de queratina:** Las células epiteliales y sus derivadas (pelos, uñas). Contienen grandes cantidades de filamentos de queratina. Estos filamentos intermedios están compuestos por haces de alfa-queratinas de una diámetro aproximado de 8 nm. Los filamentos de queratina forman una densa maraña de proteína en las células epiteliales y proporcionan a dichas células la mayor parte de su fuerza mecánica. En los epitelios humanos hay más de 15 ó 20 tipos distintos de queratina (isoformas) pero se

subdividen en 2 tipos:

- **Queratinas de tipo I (ácidas).**
- **Queratinas de tipo II (neutras/básicas).**

El elemento básico de las queratinas es un heterodímero formado por un monómero de tipo I y otro de tipo II. En células epiteliales los filamentos de queratina de distintas células y de la lámina basal con los celulares se unen por desmosomas (cel-cel) y hemidesmosomas (cel-lámina basal) donde hay proteínas asociadas: placoglobina, desmoplaquina, anquirina, receptor de lámina B.

- **Filamentos de vimentina y proteínas relacionadas. Filamentos de desmina:** en fibras musculares. Las células del músculo liso, cardíaco, esquelético contienen filamentos intermedios cuyo principal componente es la desmina (PM 50.000). El disco Z de las células musculares se divide en tres dominios. Uno de estos, el dominio periférico, contiene filamentos de desmina. Estos filamentos se unen lateralmente a los discos Z contiguos y mantienen el correcto alineamiento de las miofibrillas en la fibra muscular. **Filamentos de vimentina:** células de origen mesodérmico. Todas las células que crecen en los cultivos de tejidos, y muchas células del cuerpo, contienen filamentos intermedios cuyo principal componente es la vimentina (PM 52.000). Se cree que los filamentos de vimentina están implicados en el mantenimiento tanto de la estructura de la célula como de la posición del núcleo en la misma. También se han de destacar:

- **Proteína glial ácida fibrilar:** en filamentos gliales de astrocitos del SNC y en algunas células de Schwann.
- **Periferina:** en neuronas.

Todas estas proteínas pueden polimerizar entre ellas (copolímeros) pero ninguna de ellas copolimeriza con queratinas.

- **Neurofilamentos:** Los principales filamentos intermedios que existen en las neuronas, se extienden a lo largo del axón determinando su sección. Están formados por subunidades de distinto peso molecular (NF-Low, NF-Middle, NF-High), así están compuestos por tres proteínas cuyos pesos moleculares son 210.000, 160.000, 68.000 kD (según lo dado en clase son 130, 100, 60 kD). Los neurofilamentos podrían entrecruzarse con los microtúbulos por medio de la MAP2, que posee sitios de unión para ambos tipos de filamentos. Se cree que los filamentos intermedios de las neuronas proporcionan fuerza de tensión a los axones y a las dendritas neuronales, además de definir la sección del axón (regulable).

Nucleares

- **Lamininas A,B,C:** Forman la lámina nuclear (envoltura nuclear: membrana nuclear doble + lámina nuclear + complejo de poros). Las lamininas tienen en C-terminal el reconocimiento del núcleo, cromatina, membrana.
 - **Diferencias con los citoplasmáticos:**
 - El dominio central en forma de varilla es más largo.
 - Presentan una señal de transporte hacia el núcleo que las dirige desde el citosol, donde son sintetizadas, hasta el núcleo.
 - Se ensamblan formando una red tridimensional parecido a una lámina y necesitan otras proteínas para el ensamblaje.
 - La red que forman es muy dinámica, se desensambla al iniciarse la mitosis y se reensambla cuando esta ha terminado (por fosforilación o defosforilación de residuos de serina).

Control de ensamblaje

En la mayoría de las células, casi todas las proteínas de los filamentos se encuentran totalmente polimerizadas, con muy pocas subunidades tetraméricas libres (parece que hay unas unidades estructurales libres, posiblemente los tetrámeros, libres con capacidad de recambio con los filamentos intermedios), sin embargo, cuando se inicia la mitosis, el citoesqueleto de filamentos intermedios y lámina nuclear se tiene que desorganizar.

Las subunidades de filamentos intermedios se pueden fosforilar, *in vitro*, por una amplia gama de quinasas (ejemplo: p34cdc2: fosforila todo excepto queratinas). Se fosforilan las serinas del N-terminal. Hay una relación entre el estado de fosforilación de filamentos intermedios y el estado de agregación de las láminas nucleares, ya que al fosforilar se inhibe la agregación de las láminas. Esto también se ha observado en la vimentina, ya que la fosforilación desorganizan la vimentina. En neurofilamentos al fosforilar se produce un cambio en la distancia que hay entre los filamentos (disminuye la distancia), agrandándose el diámetro del axón y aumenta la velocidad de transmisión de impulsos.

Funcionamiento coordinado de estructuras citoesqueléticas.

En la división y movimiento celular, todas las estructuras citoesqueléticas actúan de manera coordinada. Se cree que hay una estructura superior que organiza estos movimientos (red microtubular). El citoesqueleto organiza todo en la célula, se cree que incluso hasta las rutas metabólicas. Se cree que también intervienen en la generación de cambios morfológicos en el desarrollo embrionario. También se cree que estructura las membranas internas (RE, Golgi).

1

1

SB

SB con subunidades de mT

SD con restos de proteínas que pudieran quedar

SD, con los mT polimerizados

SB que se elimina

SD, con los mT polimerizados y purificados

GTP, EGTA, calentar

GTP, EGTA, calentar

SD con otras proteínas

SB con subunidades de mT

Homogeneizado de cerebro

Frío