

Micrografía de fluorescencia de la bacteria *Listeria monocytogenes*. La bacteria (en rojo) se desplaza induciendo la formación de filamentos de actina (en verde) en el citosol de las células huésped. Las regiones en las que se superpone la fluorescencia verde y la roja aparecen de color amarillo. (Por cortesía de Tim Mitchison y Julie Theriot.)

El citoesqueleto

16

- La naturaleza del citoesqueleto
- Filamentos intermedios
- Microtúbulos
- Cilios y centríolos
- Filamentos de actina
- Proteínas de unión a la actina
- El músculo

La capacidad de las células eucariotas de adoptar una gran variedad de formas y llevar a cabo movimientos direccionales y coordinados depende de una red muy compleja de filamentos proteicos que se extienden a través del citoplasma (Figura 16-1). Esta red recibe el nombre de **citoesqueleto**, aunque, a diferencia del esqueleto óseo, es una estructura sumamente dinámica que se reorganiza continuamente mientras la célula cambia de forma, se divide, y responde a su entorno.

De hecho, el citoesqueleto podría llamarse también “citomusculatura” ya que es el responsable directo de movimientos tales como el deslizamiento de las células sobre un sustrato, la contracción muscular, y todos los cambios de forma que ocurren durante el desarrollo embrionario de los vertebrados; también proporciona la maquinaria para los movimientos intracelulares, tales como el transporte de los orgánulos desde un lugar a otro del citoplasma y la segregación de los cromosomas durante la mitosis. Las bacterias carecen, aparentemente, de citoesqueleto, por lo que podría haber sido un factor decisivo en la evolución de las células eucariotas.

Las diversas actividades del citoesqueleto dependen de tres tipos de filamentos proteicos —los *filamentos de actina*, los *microtúbulos* y los *filamentos intermedios*. Cada tipo de filamento está formado por una subunidad proteica distinta: actina para los filamentos de actina, tubulina para los microtúbulos, y una familia de proteínas fibrosas relacionadas, tales como vimentina o láminas, para los filamentos intermedios.

La actina y la tubulina han sido altamente conservadas a lo largo de la evolución de los eucariotas; sus filamentos proteicos se unen a una gran variedad de proteínas accesorias, las cuales capacitan al mismo filamento para participar en distintas funciones en regiones diferentes de la célula.

Empezaremos este capítulo con una introducción sobre los tres principales tipos de filamentos del citoesqueleto e ilustrando algunos de los principios generales que rigen su funcionamiento.

Después de ello, consideraremos cada tipo de filamento por separado: en primer lugar, los filamentos intermedios, cuya estructura a modo de cuerda parece tener la función relativamente simple de proveer a las células de fuerza mecánica; en segundo lugar, los microtúbulos, los cuales se consideran los organizadores primarios del citoesqueleto; y finalmente, los filamentos de actina, que son esenciales para muchos de los movimientos celulares, especialmente los que se llevan a cabo en la superficie celular.

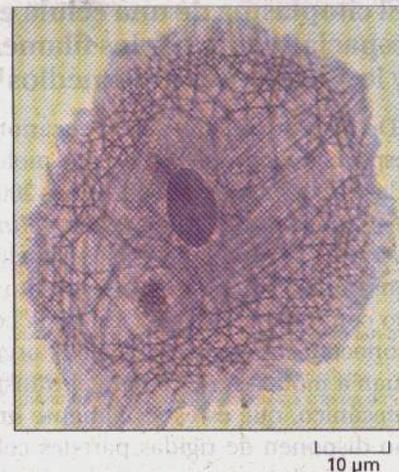


Figura 16-1 El citoesqueleto. Célula en cultivo fijada y marcada con el azul de Coomassie, colorante específico de proteínas. Podemos observar la gran variedad de estructuras filamentosas que se extienden a través de la célula. (Por cortesía de Colin Smith.)

La naturaleza del citoesqueleto

Una célula eucariota dispone de miles de millones de moléculas proteicas, las cuales constituyen cerca del 60% de su peso seco. Se cree que una célula individual de un vertebrado tiene aproximadamente 10 000 tipos de proteínas distintas, la mayoría de las cuales se encuentran organizadas en el espacio. Encontramos esta organización a distintos niveles. En todas las células, las proteínas forman complejos funcionales, la mayoría de los cuales están formados quizás por 5 a 10 proteínas, aunque otros complejos pueden ser tan grandes o incluso más que los ribosomas. El siguiente nivel de organización incluye la disposición de proteínas localizadas funcionalmente en la misma membrana o en el mismo compartimento acuoso de un orgánulo limitado por una membrana, como por ejemplo el núcleo, las mitocondrias o el complejo de Golgi. El citoesqueleto es el encargado de crear y mantener un nivel de organización todavía más elevado. Convierte la célula viva en una cosa muy parecida a una ciudad, con servicios especializados concentrados en áreas distintas pero totalmente interconectados mediante vías de comunicación. En esta sección, revisaremos algunas de las estrategias básicas que capacitan al citoesqueleto para controlar la localización de los complejos proteicos y los orgánulos así como para crear las vías de comunicación entre ellos.

El citoplasma de una célula eucariota está organizado espacialmente por los filamentos de actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios¹

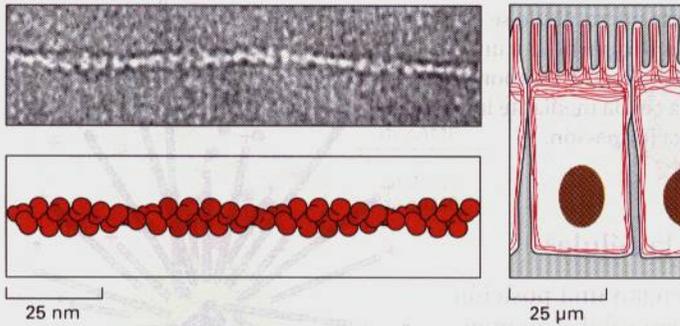
¿De qué formas una célula eucariota, de diámetro de 10 μm o más, puede estar espacialmente organizada por moléculas de proteína del citoesqueleto que son claramente más pequeñas (unas 2000 veces más pequeñas en dimensiones lineales)? La respuesta radica en la *polimerización*. En cada uno de los tres principales tipos de proteínas de citoesqueleto, miles de moléculas proteicas idénticas se ensamblan formando un filamento lineal, que puede ser lo suficientemente largo como para ir de un lado de la célula hasta el lado opuesto. Estos filamentos conectan complejos proteicos y orgánulos de regiones distintas de la célula y actúan a modo de raíles para el transporte entre ellos. Además, forman el soporte mecánico, que es especialmente importante en las células animales, las cuales no disponen de rígidas paredes celulares externas. El citoesqueleto forma una armazón interno que mantiene todo el volumen citoplasmático, de igual modo como el esqueleto formado por vigas contribuye a mantener un edificio.

Resulta sencillo determinar cómo aparecen los filamentos durante la evolución: cualquier proteína que disponga en su superficie de pares orientados de lugares de autounión complementarios puede formar un largo filamento helicoidal (véase pág. 131). Cada uno de los tres tipos principales de filamentos proteicos que forman el citoesqueleto es un polímero helicoidal que tiene una disposición diferente en la célula y una función distinta (Figura 16-2). Sin embargo, los tres tipos de filamentos, por sí mismos, no pueden ser responsables ni de la forma ni de la longitud de la célula. Sus funciones dependen de un gran séquito de proteínas accesorias que unen los filamentos a otros filamentos y a otros componentes celulares. Las proteínas accesorias son esenciales para el control del ensamblaje de los filamentos proteicos en lugares particulares, y proporcionan los motores que, o bien mueven los orgánulos a lo largo de los filamentos, o bien mueven los filamentos unos respecto a otros.

La dinámica de los microtúbulos emana del centrosoma²

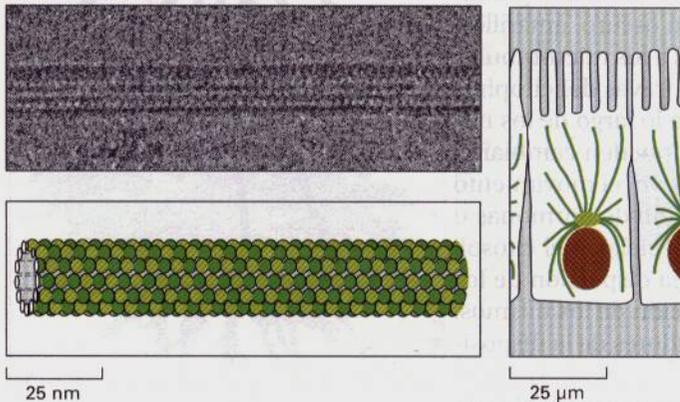
Los microtúbulos son estructuras polares: un extremo (el *extremo más*) es capaz de crecer a gran velocidad mientras que el otro extremo (el *extremo menos*) tiene tendencia a perder subunidades si no está estabilizado. En la mayoría de células,

FILAMENTOS DE ACTINA



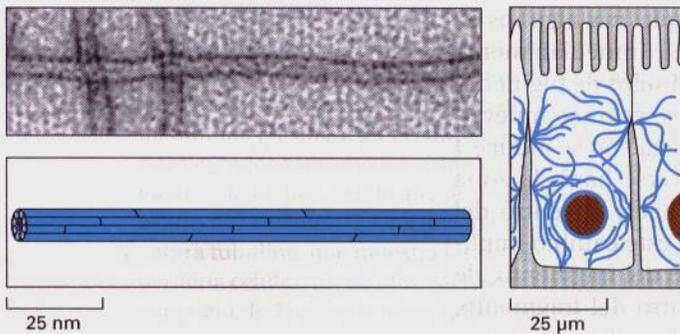
Los **filamentos de actina** (también conocidos como *microfilamentos*) son polímeros helicoidales, enroscados de dos en dos, de la proteína actina. Aparecen como estructuras flexibles, con un diámetro de 5 a 9 nm, que están organizadas en una gran variedad de haces, de redes bidimensionales y de geles tridimensionales. Aunque los filamentos de actina están dispersos por el citoplasma de la célula, están altamente concentrados en el **córtex**, justo por debajo de la membrana plasmática.

MICROTÚBULOS



Los **microtúbulos** son cilindros largos y huecos formados por una proteína tubulina. Su diámetro externo es de 25 nm y son mucho más rígidos que los filamentos de actina. Los microtúbulos son largos y rectos y típicamente disponen de un extremo unido a un centro organizador de microtúbulos (MTOC, de microtubule organizing center) llamado *centrosoma* tal como puede observarse en la imagen.

FILAMENTOS INTERMEDIOS



Los **filamentos intermedios** son estructuras parecidas a cuerdas, de un diámetro de aproximadamente 10 nm; están formados por las proteínas de los filamentos intermedios, que constituyen una gran familia heterogénea de proteínas. Uno de los tipos de filamentos intermedios forma una red llamada lámina nuclear que se localiza debajo de la membrana nuclear interna. Otros filamentos intermedios se extienden a lo largo del citoplasma proporcionando a las células resistencia mecánica y sosteniendo la tensión mecánica de los tejidos epiteliales mediante la unión de los citoplasmas de las células vecinas a través de las uniones celulares.

el extremo menos de los microtúbulos está estabilizado mediante la unión a una estructura que recibe el nombre de **centrosoma**, y los extremos con crecimiento rápido están entonces libres para añadir moléculas de tubulina (Figura 16-3). El centrosoma suele estar localizado cerca del núcleo, en la zona central de la célula.

En un momento determinado, centenares de microtúbulos crecen a partir de un centrosoma, alargándose muchas micras, con su "extremo más" dirigido hacia la periferia celular. Cada uno de estos microtúbulos es una estructura dinámica que tanto puede acortarse como alargarse: después de unos minutos de crecimiento durante los cuales se produce la adición de subunidades, su extremo más puede sufrir una repentina transición que implica una pérdida de tales subunidades, de forma que la longitud del microtúbulo disminuye rápidamente y puede llegar incluso a desaparecer.

La red microtubular que emerge a partir del centrosoma está enviando constantemente nuevos microtúbulos que reemplazan a los viejos que se han despolimerizado (Figura 16-4).

Figura 16-2 Los tres tipos de filamentos proteicos que constituyen el citoesqueleto. Se muestra una electronmicrografía de cada tipo de filamento y un diagrama esquemático de cómo están formados a partir de subunidades. También puede observarse esquemáticamente la distribución de cada filamento en un tipo de célula epitelial. Los colores utilizados para cada tipo de filamento se utilizan también en el resto del capítulo. (Las micrograffias de los filamentos de actina, de los microtúbulos y de los filamentos intermedios por cortesía de Roger Craig, Richard Wade y Roy Quinlan, respectivamente.)

Figura 16-3 Un centrosoma con microtúbulos adheridos. Como hemos indicado, el extremo menos, de crecimiento lento, de cada microtúbulo se encuentra inmerso en la matriz del centrosoma (*verde claro*) que rodea a un par de estructuras que reciben el nombre de *centríolos*. Esta matriz colabora en la determinación del número de microtúbulos de una célula mediante la nucleación del crecimiento de los microtúbulos de nueva formación.

La red microtubular puede encontrar el centro de la célula³

¿Qué es lo que determina que las hileras de microtúbulos tengan una posición determinada en la célula? Experimentos en los cuales se utilizan células pigmentarias aisladas a partir de las escamas de peces han proporcionado datos muy importantes: en la célula existen grandes células alargadas que contienen gránulos llenos de pigmento. Los gránulos, que pueden ser marrón oscuro, amarillos, rojos, o iridiscentes, dependiendo de la especie, están unidos a los microtúbulos y pueden agregarse en el centro de la célula o dispersarse a través del citoplasma. El movimiento de los gránulos de pigmento se produce a lo largo de los microtúbulos y puede ser controlado por el pez; de esta forma pueden cambiar el color de su piel. En una célula pigmentaria mantenida en cultivo, el movimiento puede ser controlado convenientemente mediante la aplicación de hormonas u otros reactivos, que hacen variar las concentraciones de AMP cíclico del citosol: un incremento de la concentración de AMP cíclico provoca la dispersión de los gránulos, mientras que una disminución implica una agregación de los mismos. Los gránulos de pigmento pueden ser utilizados como marcadores de la disposición de los microtúbulos en la célula (Figura 16-5).

Si cortamos, con una aguja, una porción de una célula pigmentaria, el fragmento celular restante puede sobrevivir durante largos períodos de tiempo incluso aunque desaparezca su núcleo. Si realizamos la misma operación cuando los gránulos pigmentarios se encuentran dispersos por el citoplasma, algunos de estos gránulos quedan atrapados en el fragmento celular. Si, inmediatamente después de la operación inducimos una agregación de los gránulos de pigmento en este fragmento celular mediante tratamientos hormonales, éstos se mueven hacia el lugar donde se ha producido el corte. Pero si esta agregación se induce 4 horas después de la operación, los gránulos en vez de moverse hacia la zona donde se ha producido la lesión, se mueven exactamente hacia el centro del fragmento celular. Investigaciones posteriores muestran que este cambio implica una redistribución importante de los microtúbulos dentro del fragmento, de forma que ahora su extremo menos se encuentra en el centro del fragmento, como si estuvieran en el centro de una célula intacta. En efecto, el fragmento celular aislado se ha convertido en una minicélula respecto a la organización de sus microtúbulos; los microtúbulos se han reorganizado alrededor de un nuevo centro organizador de microtúbulos (Figura 16-6).

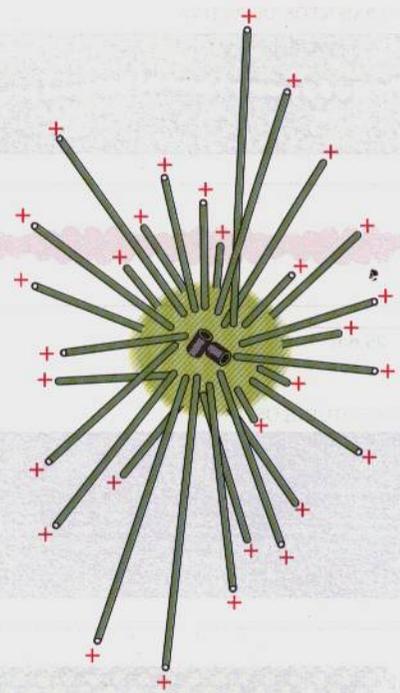
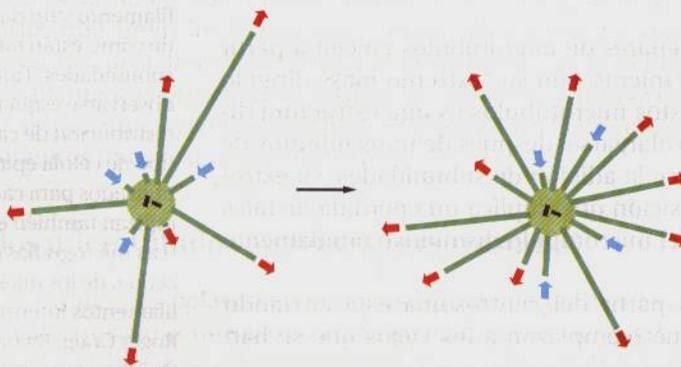


Figura 16-4 Crecimiento y acortamiento de un haz de microtúbulos. El haz de microtúbulos anclados en un centrosoma está en cambio continuo, mientras los nuevos microtúbulos crecen (*flechas rojas*) y los microtúbulos antiguos se acortan (*flechas azules*).



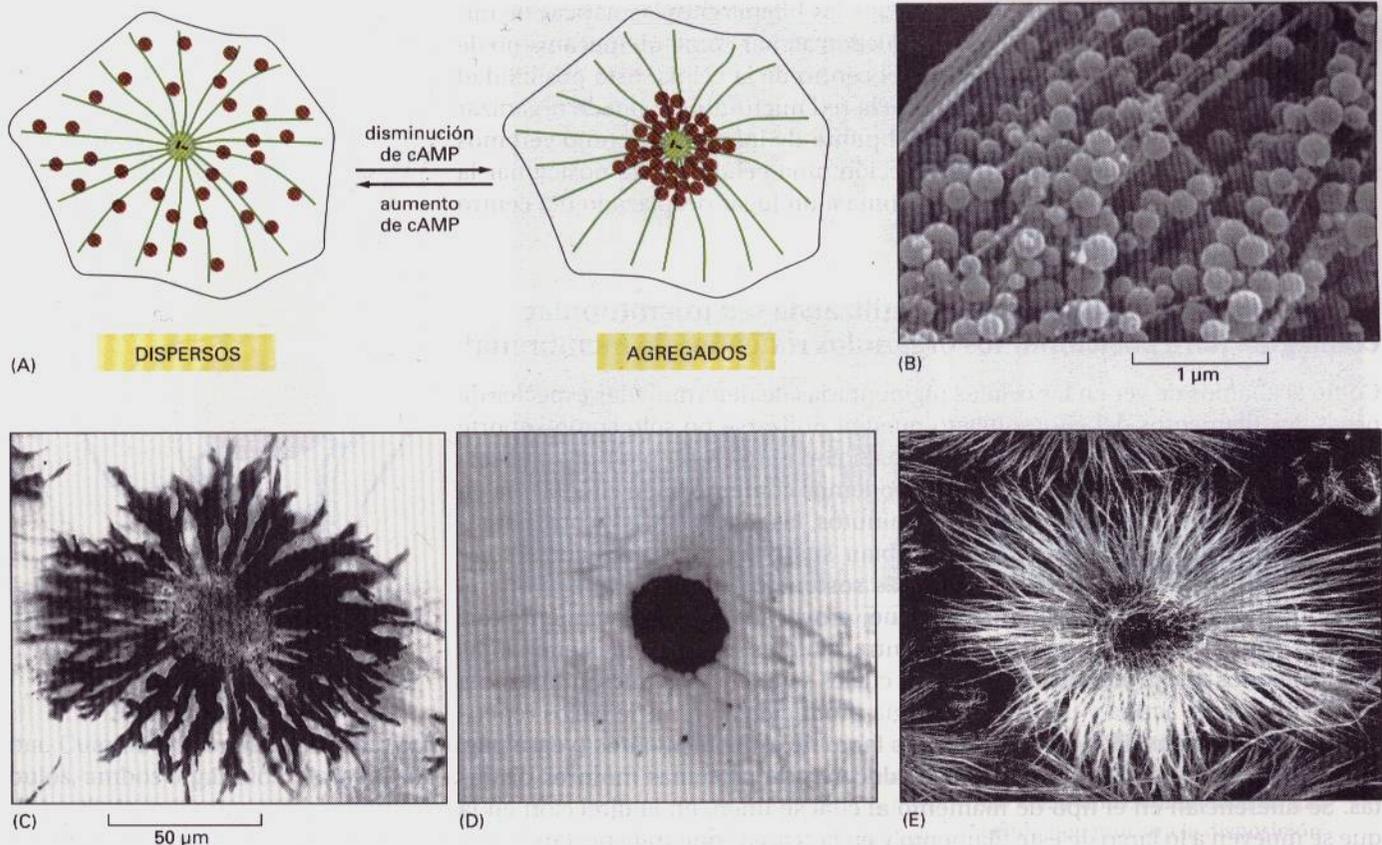


Figura 16-5 Células pigmentarias de peces. Estas células gigantes, responsables de los cambios de coloración de algunas especies de peces, disponen de grandes gránulos de pigmento (*marrón*), los cuales pueden cambiar su localización en respuesta a estímulos neuronales u hormonales. (A) Visión esquemática de una célula pigmentaria, que muestra la dispersión y la agregación de los gránulos de pigmento, que se producen a lo largo de los microtúbulos. (B) Electronmicrografía de barrido de una célula pigmentaria después de una breve exposición a un detergente. La membrana plasmática y el contenido soluble del citoplasma han sido eliminados y pueden observarse los haces de microtúbulos así como los gránulos de pigmento asociados. (C y D) Imágenes en campo claro de la misma célula en una escama de un pez cíclido africano, que muestra sus gránulos de pigmento dispersos por el citoplasma o agregados en el centro de la célula. (E) Una imagen de inmunofluorescencia de otra célula del mismo ejemplar marcada con anticuerpos contra tubulina, que muestra largos haces de microtúbulos paralelos extendiéndose a partir del centrosoma hacia la periferia celular. (B, de M.A. McNiven and K.R. Porter, *J. Cell Biol.* 103:1547-1555), 1986, reproducida con permiso de copyright de The Rockefeller University Press; C, D, y E, por cortesía de Leah Haimo.)

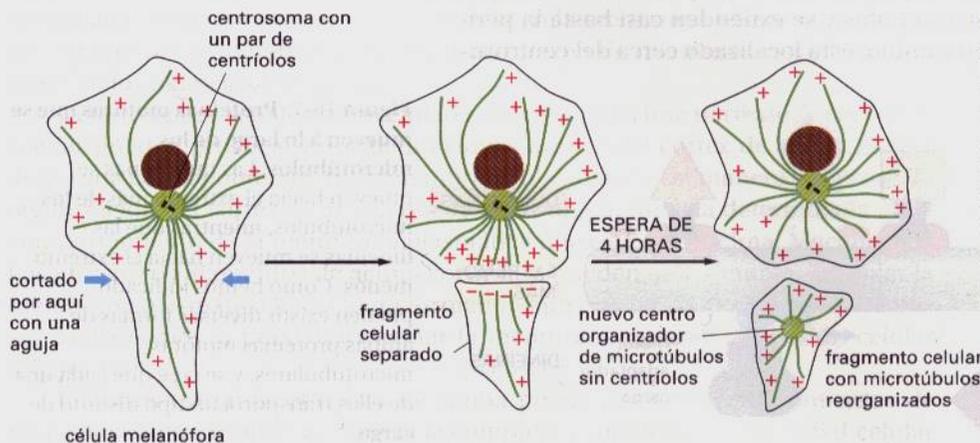


Figura 16-6 Un experimento que muestra de qué forma un haz de microtúbulos puede encontrar el centro de la célula. Después de que el extremo de una célula pigmentaria de un pez se corte con una aguja, los microtúbulos situados el fragmento celular aislado se reorientan, situando su extremo menos cercano al centro del fragmento.

Este experimento tan sencillo sugiere que las hileras citoplasmáticas de microtúbulos que emergen del centrosoma pueden actuar como un mecanismo de supervivencia que es capaz de encontrar el centro de la célula. Esta posibilidad es muy importante puesto que implica que la red microtubular puede organizar el interior de la célula. Pero esto sólo es el punto de inicio; tal y como veremos más adelante en esta sección de introducción, una célula puede posicionar la red moviendo específicamente su centrosoma a un lugar desplazado del centro celular.

Determinadas proteínas motoras utilizan la red microtubular como guía para posicionar los orgánulos rodeados de membrana⁴

Como acabamos de ver en las células pigmentarias de determinadas especies de peces, los filamentos del citoesqueleto pueden utilizarse no sólo como soporte estructural sino como líneas de transporte. Si con el microscopio óptico observamos una célula viva de un vertebrado, podemos contemplar su citoplasma en continuo movimiento. Después de unos minutos, las mitocondrias y otros orgánulos membranosos más pequeños cambian sus posiciones mediante *movimientos saltatorios* periódicos, mucho más sostenidos y direccionados que el continuo y pequeño movimiento browniano, provocado por el movimiento térmico al azar. Éstos y otros movimientos intracelulares en las células eucariotas son generados por **proteínas motoras**, las cuales se unen a los microtúbulos o a los filamentos de actina y utilizan la energía producida a partir de ciclos repetidos de hidrólisis de ATP para moverse a lo largo de estos filamentos (véase pág. 221). Actualmente han sido identificadas docenas de proteínas motoras distintas. Se diferencian en el tipo de filamento al cual se unen, en la dirección en la que se mueven a lo largo de este filamento y en la "carga" que transportan.

La primera proteína motora descubierta fue la *miosina*, una proteína que se desliza a lo largo de los filamentos de actina y que es especialmente abundante en el músculo esquelético donde constituye la parte más importante del aparato contráctil. Posteriormente se descubrieron otros tipos de miosinas en las células no musculares. Todas las miosinas tienen dominios motores semejantes (la parte de la proteína responsable del movimiento), pero presentan diferencias muy marcadas en los dominios a través de los cuales la molécula de miosina se une a otros componentes de la célula.

Las proteínas motoras que se mueven a lo largo de los microtúbulos son distintas a las miosinas y pertenecen a dos familias: las *quinasinas*, que generalmente se mueven hacia el extremo más de los microtúbulos (a partir del centrosoma), y las *dineínas*, que se desplazan hacia el extremo menos (hacia el centrosoma). Al igual que las miosinas, cada tipo de proteína motora dependiente de microtúbulos transporta una carga determinada con la cual se desplaza (Figura 16-7).

Las proteínas motoras microtúbulo-dependientes juegan un papel muy importante en el posicionamiento de los orgánulos membranosos dentro de la célula eucariota. Los túbulos membranosos del retículo endoplasmático (ER), por ejemplo, están alineados con los microtúbulos y se extienden casi hasta la periferia celular; el complejo de Golgi, en cambio, está localizado cerca del centrosoma-

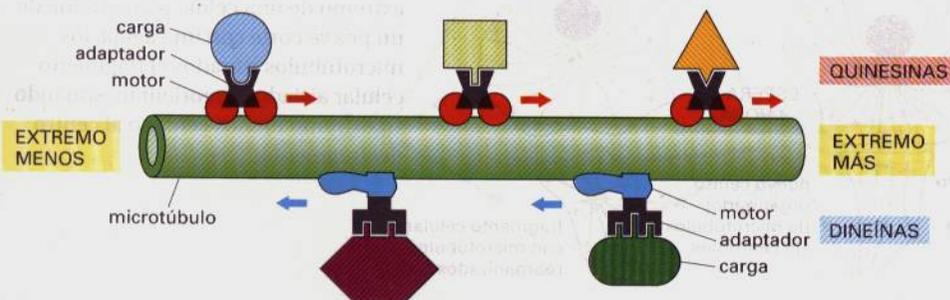
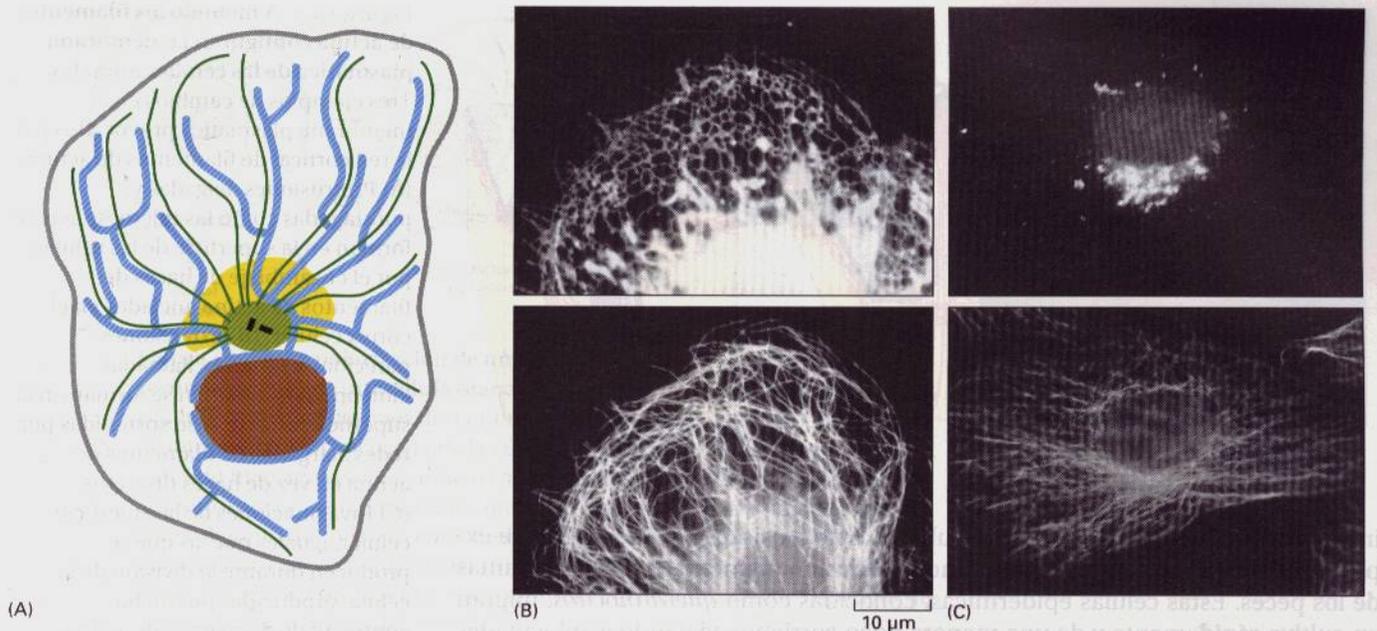


Figura 16-7 Proteínas motoras que se mueven a lo largo de los microtúbulos. Las quinasinas se mueven hacia el extremo más de los microtúbulos, mientras que las dineínas se mueven hacia el extremo menos. Como hemos indicado, pueden existir diversas formas de ambas proteínas motoras microtubulares, y se cree que cada una de ellas transporta un tipo distinto de carga.



ma. Cuando tratamos las células con una droga que despolimeriza los microtúbulos, ambos orgánulos cambian su localización: el ER se colapsa hacia el centro de la célula, mientras que el complejo de Golgi se fragmenta en múltiples vesículas de pequeño tamaño que se dispersan por todo el citoplasma. Cuando la droga es eliminada, los orgánulos recuperan su posición inicial, conducidos por proteínas motoras que se desplazan a lo largo de los microtúbulos nuevamente formados. Se cree que la posición de cada uno de estos orgánulos viene determinada por una proteína receptora que se encuentra localizada en la superficie citosólica de la membrana del orgánulo, la cual se une a una proteína motora microtúbulo-dependiente específica —una quinesina para el ER y una dineína para el complejo de Golgi (Figura 16-8).

El córtex de actina puede generar y mantener la polaridad celular⁵

En general, los microtúbulos funcionan como entidades individuales, mientras que los filamentos de actina actúan formando redes o haces. Los filamentos de actina que descansan debajo de la membrana plasmática, por ejemplo, están asociados a una red de proteínas que se unen a la actina formando el **córtex celular**. Como discutiremos más adelante, la red es altamente dinámica y funciona con diversos tipos de miosinas que controlan los movimientos de la superficie celular. La localización y orientación de los filamentos de actina corticales está controlada mediante lugares de nucleación en la membrana plasmática; distintas regiones de la membrana dirigen la formación de diferentes estructuras basadas en los filamentos de actina.

Determinadas señales extracelulares que afectan a una parte de la superficie celular pueden provocar reestructuraciones locales del córtex de actina debajo de la zona correspondiente de la membrana plasmática. De manera recíproca, la organización del córtex de actina puede tener una influencia determinada en el comportamiento de la membrana plasmática que está por encima. Mecanismos basados en los filamentos de actina corticales, pueden, por ejemplo, empujar la membrana plasmática hacia fuera formando largas y finas *microespinas* o extensiones *lamelipodios*, o pueden invaginar la membrana durante la división celular (Figura 16-9).

En casos extremos el córtex de actina puede integrar los movimientos de una célula animal sobre su superficie completa y mantener la polaridad celular

Figura 16-8 Distribución de los orgánulos por los microtúbulos.

(A) Diagrama esquemático de una célula que muestra la disposición típica de los microtúbulos (*verde*), el retículo endoplasmático (*azul*), y el complejo de Golgi (*amarillo*). Se muestra el núcleo en *marrón* y el centrosoma en *verde claro*. (B) Célula marcada con anticuerpos contra el retículo endoplasmático (*panel superior*) o contra los microtúbulos (*panel inferior*). Las proteínas motoras empujan al retículo endoplasmático a lo largo de los microtúbulos, tirando de ellos desde su localización hacia la membrana nuclear. (C) Célula marcada con anticuerpos contra el complejo de Golgi (*panel superior*) o contra los microtúbulos (*panel inferior*). En este caso las proteínas motoras mueven el complejo de Golgi hacia su posición cerca del centrosoma. (B, por cortesía de Mark Terasaki y Lan Bo Chen; C, por cortesía de Viki Allan y Thomas Kreis.)

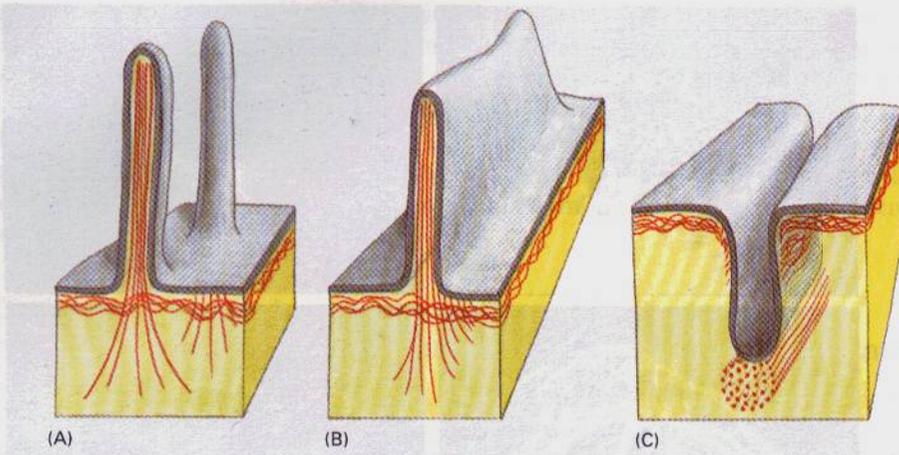


Figura 16-9 A menudo los filamentos de actina configuran la membrana plasmática de las células animales.

Tres ejemplos de cambios en la membrana plasmática provocados por la red cortical de filamentos de actina. (A) Protrusiones delgadas y puntiagudas como las microespinas se forman en la superficie de las células por el ensamblaje de haces de filamentos de actina anclados en el córtex celular. (B) Extensiones parecidas a sábanas, llamadas lamelipodios, también se forman en la superficie, en este caso sostenidas por redes alargadas de filamentos de actina en vez de haces discretos. (C) Invaginaciones de la superficie celular, iguales que las que se producen durante la división de la célula, producidas por un haz contráctil de filamentos de actina asociado con la proteína motora miosina.

independientemente de la red microtubular. Esto ha sido ilustrado mediante experimentos en los cuales se han utilizado células no pigmentadas de las escamas de los peces. Estas células epidérmicas, conocidas como *queratinocitos*, migran en cultivo rápidamente y de una manera poco corriente, viajando a velocidades iguales o superiores a 30 $\mu\text{m}/\text{minuto}$. Inmunomarcajes utilizando anticuerpos demuestran que los filamentos intermedios y los microtúbulos se encuentran sólo en la región posterior alrededor del núcleo, mientras que el extremo extendido de la célula es rico en filamentos de actina (Figura 16-10). Además, las células tratadas con una droga que despolimeriza los microtúbulos migran a la misma velocidad que las no tratadas, mientras que la migración se detiene totalmente si las células son tratadas con agentes que interfieren con los filamentos de actina. Evidentemente, los filamentos de actina (actuando con otras proteínas) son capaces de provocar el movimiento de los queratinocitos sobre una superficie y también de mantener su morfología diferencial y su polaridad; los detalles del mecanismo implicado no están aún totalmente esclarecidos.

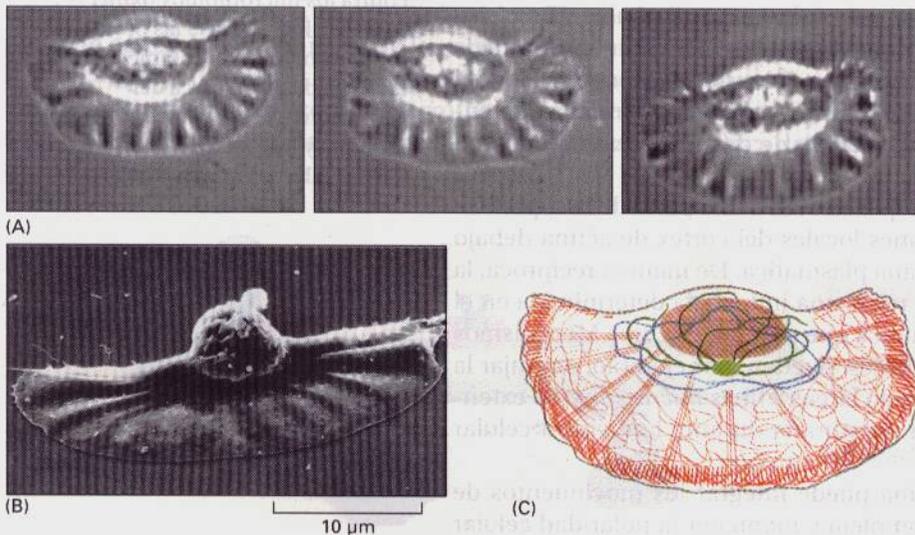
Normalmente los filamentos de actina y los microtúbulos actúan juntos polarizando la célula⁶

En una célula viva los tres tipos mayoritarios de filamentos del citoesqueleto están conectados los unos con los otros y sus funciones están coordinadas. La distribución de los filamentos intermedios en una célula epitelial en cultivo, por

Figura 16-10 La epidermis de los peces está formada por células migratorias. (A) Micrografías ópticas de un queratinocito en cultivo tomadas a intervalos de 15 segundos.

La célula está migrando aproximadamente a 15 $\mu\text{m}/\text{segundo}$. (B) Queratinocito observado con el microscopio electrónico de barrido, que muestra su extremo en avance altamente extendido, y con el cuerpo celular que contiene el núcleo cerca del extremo final de la célula.

(D) Distribución de los filamentos del citoesqueleto en este tipo inusual de célula. Los filamentos de actina (rojo) llenan el margen extendido de la célula y son los responsables de su migración. Los microtúbulos (verde) y los filamentos intermedios (azul) están restringidos en la zona próxima al núcleo. (Micrografía por cortesía de Juliet Lee.)



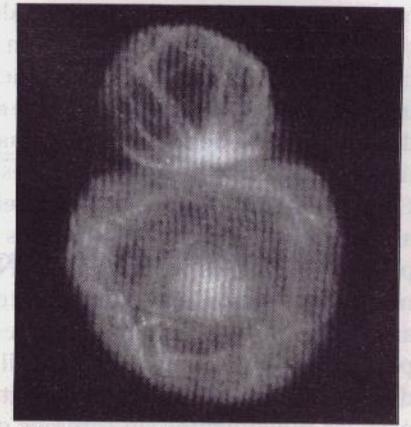
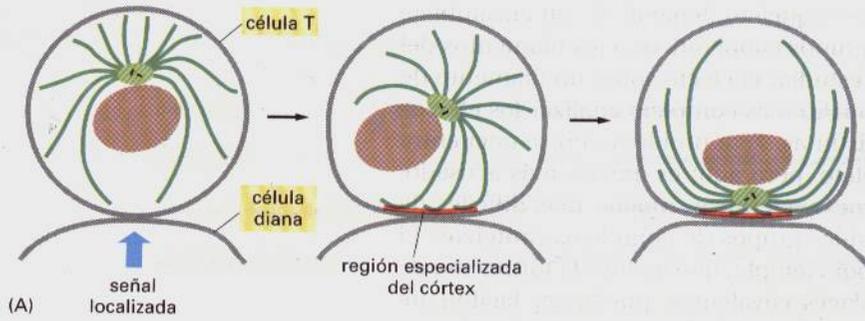


Figura 16-11 La polarización de una célula T citotóxica después del reconocimiento de una célula diana. (A) Cambios en el citoesqueleto de una célula T citotóxica después del contacto con una célula diana. (B) Micrografía de inmunofluorescencia en que la célula T (arriba) y su célula diana (abajo) han sido marcadas con un anticuerpo contra los microtúbulos. En la célula T el centrosoma y los microtúbulos que irradian a partir de él están orientados hacia el punto de contacto entre ambas células. En la célula diana el haz de microtúbulos no está polarizado. (B, reproducida de B. Geiger, D. Rosen, y G. Berke, *J. Cell Biol.* 95:137-143, 1982, reproducido con permiso de copyright de The Rockefeller University Press.)

ejemplo, puede verse radicalmente alterada si tratamos las células con una droga que provoca una despolimerización de los microtúbulos: los filamentos intermedios, que normalmente se distribuyen a lo largo del citoplasma, se agrupan en la región cercana al núcleo. Existen diversas situaciones en las cuales los microtúbulos y los filamentos de actina actúan de una manera coordinada polarizando la célula entera. Discutiremos únicamente un ejemplo: la muerte de una célula diana mediatizada por los linfocitos T citotóxicos.

Las células T citotóxicas matan a otras células que llevan antígenos extraños en su superficie. Esto constituye una parte importante de la respuesta inmune de los vertebrados a una infección, como se discute en el Capítulo 23. Cuando los receptores en la superficie de la célula T reconocen un antígeno en la superficie de la célula diana, la señal de los receptores hacia el córtex subyacente de la célula T altera el citoesqueleto de diversas maneras. Primero, las proteínas asociadas con los filamentos de actina en la célula T reorganizan la zona de contacto entre las dos células. Entonces, el centrosoma se reorienta y se mueve junto a los microtúbulos hacia la zona de contacto entre la célula T y la célula diana (Figura 16-11A). Los microtúbulos, colocan el complejo de Golgi correctamente debajo de la zona de contacto, dirigiendo la maquinaria asesina –que está asociada con una secreción del complejo de Golgi– hacia la célula diana.

En este ejemplo y en muchos otros, una célula se convierte en polarizada de la manera siguiente. Primero, la membrana plasmática detecta alguna diferencia en un lado de la célula y genera una señal transmembrana. El córtex de actina se reorganiza localmente debajo de la membrana afectada, con lo cual el centrosoma se desplaza hacia esta zona de la célula, probablemente con un movimiento de los microtúbulos. Entonces, el centrosoma posiciona los sistemas endomembranosos de una manera polarizada. El resultado final es una célula con un foco direccional muy marcado (Figura 16-11B).

Las funciones del citoesqueleto son difíciles de estudiar

Aunque las principales subunidades de los tres tipos de polímeros del citoesqueleto, así como los muchos cientos de proteínas que se asocian con ellos, han sido aislados y su secuencia de aminoácidos determinada, ha sido difícil establecer cómo funcionan estas proteínas dentro de la célula. Independientemente de la complejidad que implica la existencia de un número enorme de proteínas implicadas, la comprensión del citoesqueleto se ve dificultada por dos hechos princi-

pales. Primero, el funcionamiento del citoesqueleto depende de un ensamblaje complejo de proteínas, que se unen en grupos cooperativos a los filamentos del citoesqueleto. Es relativamente sencillo estudiar el efecto sobre un filamento de una única proteína accesoria, pero es mucho más complejo analizar los efectos de un conjunto de muchas proteínas distintas. Este problema no se encuentra únicamente en el estudio del citoesqueleto, pero aquí es mucho más acusado. En segundo lugar, las funciones del citoesqueleto son mucho más difíciles de analizar que las funciones de otros grandes grupos de complejos proteicos. El proceso de síntesis del RNA y del DNA, por ejemplo, que incluye la formación de nuevos polímeros unidos mediante enlaces covalentes, puede ser fácilmente analizado *in vitro*, en parte porque los productos de las reacciones *in vitro* se pueden medir de una manera fácil y comparar con los productos correspondientes fabricados en la célula. El citoesqueleto, por el contrario, ejerce fuerzas y provoca movimientos sin cambios químicos importantes. Esto hace que sea especialmente difícil estudiar la función de un sistema citoesquelético reconstituido *in vitro* a partir de los componentes purificados.

Resumen

Una red de proteínas filamentosas conocidas con el nombre de citoesqueleto organizan espacialmente el citoplasma de las células eucariotas. Esta red está formada por tres tipos de filamentos principales: microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios. Los microtúbulos son estructuras rígidas que, generalmente, disponen de un extremo unido al centrosoma y otro extremo libre en el citoplasma. En la mayoría de células los microtúbulos son estructuras altamente dinámicas que alternativamente crecen y se acortan mediante la adición y la pérdida de subunidades de tubulina. Algunas proteínas motoras se desplazan en ambas direcciones a lo largo de los microtúbulos, transportando orgánulos membranosos específicos hacia sus localizaciones determinadas en la célula. Los filamentos de actina son también estructuras dinámicas, pero normalmente forman haces o redes y no filamentos simples. Una capa llamada córtex se forma justo debajo de la membrana plasmática a partir de los filamentos de actina y de una variedad importante de proteínas que se unen a la actina. Esta capa rica en actina controla la forma y los movimientos superficiales de la mayoría de las células animales. Los filamentos intermedios son relativamente resistentes, estructuras a modo de cuerdas que proporcionan una estabilidad mecánica a las células y tejidos. Los tres tipos de filamentos están interconectados y sus funciones coordinadas.

Filamentos intermedios⁷

Los filamentos intermedios son fibras proteicas resistentes y duraderas que se encuentran en el citoplasma de la mayoría de las células eucariotas superiores. Reciben el nombre de "intermedios" porque en las micrografías electrónicas su diámetro aparente (8-10 nm) se encuentra entre el de los finos filamentos de actina y el de los gruesos filamentos de miosina de las células musculares, donde se descubrieron por vez primera (su diámetro es también intermedio entre el de los filamentos de actina y el de los microtúbulos). En la mayoría de células animales, una extensa red de filamentos intermedios rodea al núcleo y se extiende desde esta zona hacia la periferia celular, donde interacciona con la membrana plasmática (Figura 16-12). Además, un armazón densamente tejido de filamentos intermedios —la *lámina nuclear*— se encuentra debajo de la envoltura del núcleo.

Los filamentos intermedios son particularmente abundantes en las células que están sometidas a importantes tensiones mecánicas. Son muy abundantes, por ejemplo, en los epitelios, donde forman parte de las uniones especializadas entre dos células vecinas, a lo largo de los axones de las células nerviosas, y en todos los tipos de células musculares. Cuando las células se tratan con solucio-

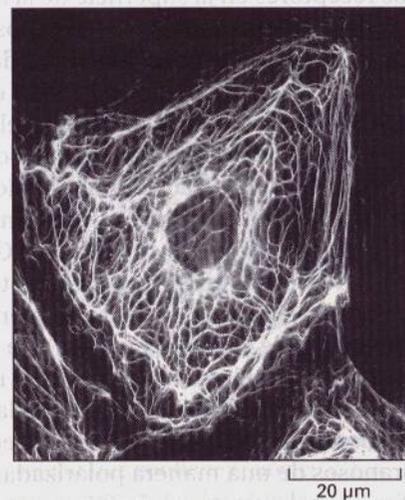
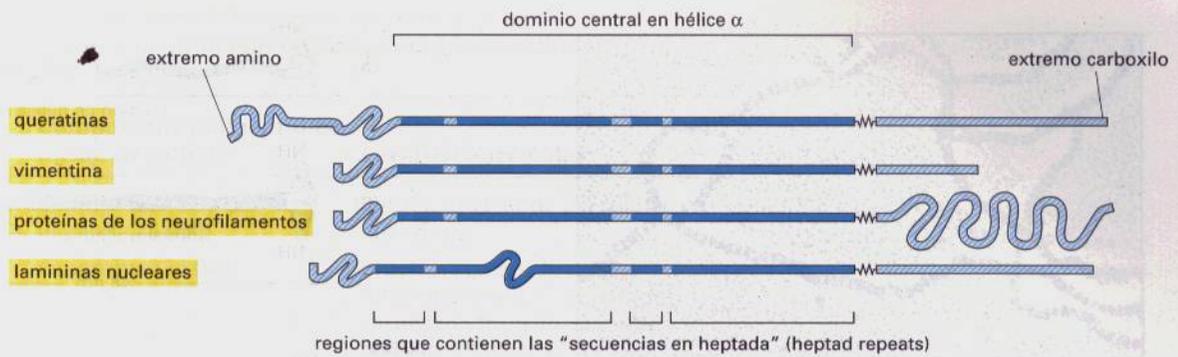


Figura 16-12 Filamentos intermedios en el citoplasma de una célula de un tejido en cultivo. Se marcaron células epiteliales de rata canguro (células PtK2) en interfase, con anticuerpos contra uno de los tipos de filamentos intermedios (llamados queratinas) y se observaron al microscopio de fluorescencia. (Por cortesía de Mary Osborn.)



nes salinas concentradas o bien con detergentes no iónicos, los filamentos intermedios se conservan mientras que los elementos restantes del citoesqueleto son solubilizados. De hecho, el término "citoesqueleto" se utilizó originalmente para describir a este sistema fibroso tan estable e insoluble.

Los filamentos intermedios son polímeros de proteínas fibrosas⁸

A diferencia de la actina y la tubulina, que son proteínas globulares, los tipos principales de monómeros proteicos de los filamentos intermedios son moléculas fibrosas muy alargadas que tienen una *cabeza* amino terminal, una *cola* carboxilo terminal, y un dominio central a modo de *varilla*. Este dominio central consta de una región extensa de hélice α que contiene largos tándems repetidos de secuencias aminoacídicas distintas, que reciben el nombre de "*repeticiones en heptada*". Como discutimos en el Capítulo 3, esta secuencia de 7 aminoácidos permite la formación de dímeros enrollados entre dos hélices α paralelas (véase Figura 3-48). Otros tipos de proteínas alargadas del citoesqueleto con estructuras dimericas enrolladas, como por ejemplo la tropomiosina y la cola de la miosina, contienen largas tiras de repeticiones en heptada, como discutiremos más adelante.

En la siguiente etapa del ensamblaje, dos de los dímeros enrollados interactúan antiparalelamente formando un tetrámero (Figura 16-14). Se encuentran pequeñas cantidades de tetrámeros solubles en las células, lo cual sugiere que la subunidad tetramérica constituye la unidad fundamental para el ensamblaje de los filamentos intermedios. La disposición antiparalela de los dímeros implica que el tetrámero y, por consiguiente, el filamento que forma, es una estructura no polarizada—esto es, es la misma estructura en ambos extremos y es simétrica en toda su longitud. Esto distingue los filamentos intermedios de los microtúbulos y los filamentos de actina, que son estructuras polarizadas, cuya función depende de esta polaridad. La etapa final del ensamblaje de los filamentos intermedios no está aún completamente caracterizada, pero parece que los tetrámeros se añaden al filamento intermedio en crecimiento mediante una reacción de unión sencilla, alineándose a lo largo del eje del filamento y uniéndose siguiendo un patrón helicoidal (véase Figura 16-14).

El dominio central a modo de varilla, cuya estructura es parecida en todos los tipos de filamentos intermedios, interviene en las interacciones laterales que forma el filamento ensamblado. Los dominios globulares de la cabeza y de la cola pueden variar significativamente tanto en el tamaño como en la secuencia de aminoácidos, sin que esto afecte la estructura axial básica del filamento; a menudo se proyectan desde la superficie del filamento e intervienen en las uniones con otros componentes. Este diseño experimental implica la existencia de una sorprendente variedad de tamaños de las proteínas que los forman (desde 40 000 a 200 000 daltons).

En la mayoría de células, casi todas las proteínas de los filamentos intermedios se encuentran totalmente polimerizadas, con muy pocas subunidades te-

Figura 16-13 Organización de los dominios de los monómeros proteicos de los filamentos intermedios. La mayoría de las proteínas de los filamentos intermedios disponen de una región central similar que tiene generalmente unos 310 aminoácidos y que forma una larga hélice α . Los dominios amino terminal y carboxilo terminal no presentan esta estructura en hélice α y son variables en cuanto a tamaño y secuencia en los distintos tipos de filamentos intermedios.

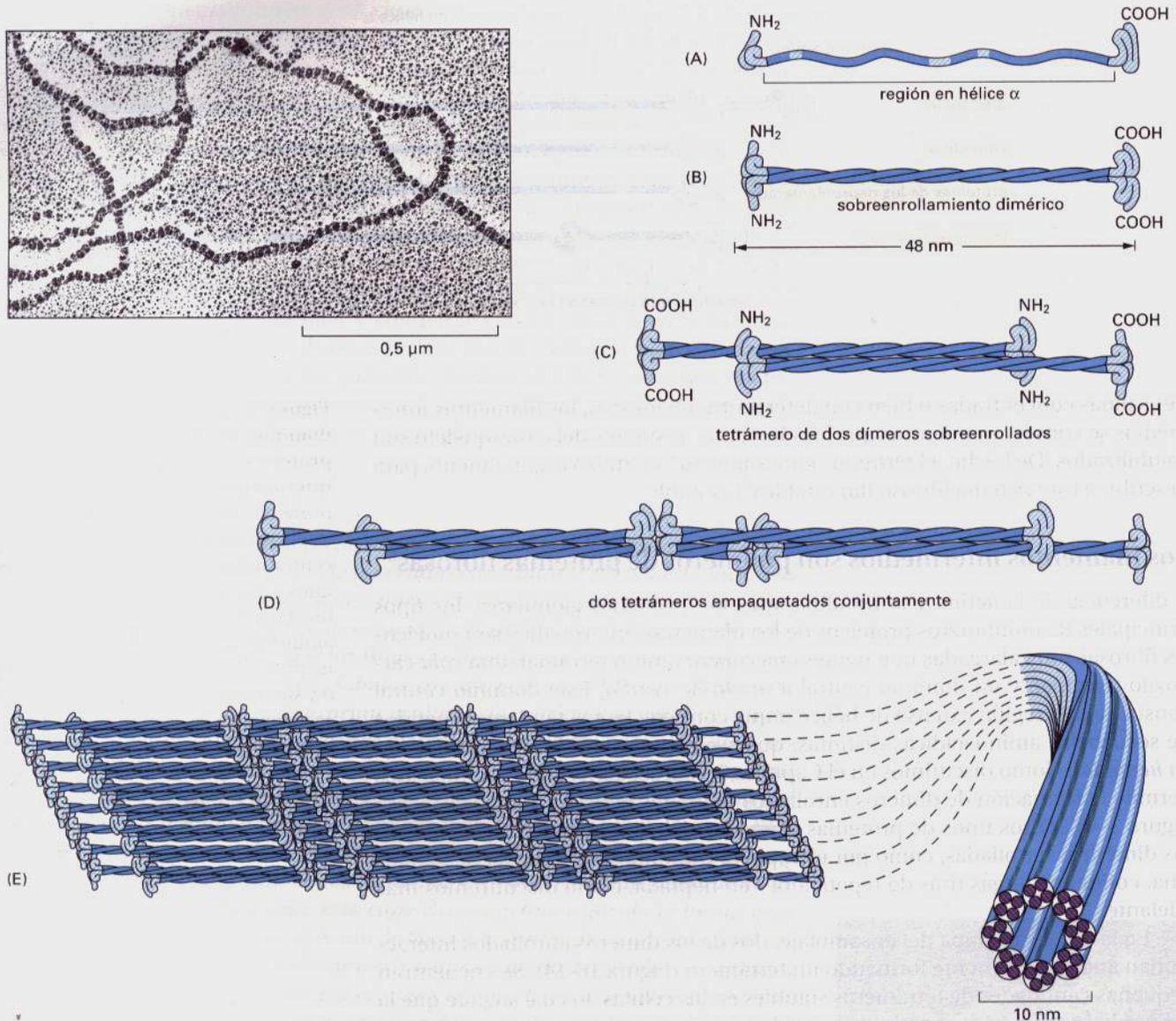


Figura 16-14 Modelo habitual de ensamblaje de un filamento intermedio.

El monómero mostrado en (A) se empareja con un monómero idéntico a él, formando un dímero (B), de forma que la región central –conservada– se alinea en paralelo y se empaqueta conjuntamente formando un sobreenrollamiento. Entonces, dos dímeros se alinean, lado contra lado, y forman un tetrámero antiparalelo de cuatro cadenas polipeptídicas (C). Dentro de cada tetrámero los dímeros están distanciados suficientemente uno con respecto a otro permitiendo la asociación con otro tetrámero, como puede observarse en (D). En el filamento intermedio final de 19 nm los tetrámeros están unidos formando un haz helicoidal (E). Se muestra una electronmicrografía del filamento final en el margen superior izquierdo. (Diagrama basado en datos de Murray Stewart; micrografía por cortesía de Roy Quinlan.)

traméricas libres. Sin embargo, una célula puede controlar el ensamblaje de sus filamentos intermedios y decidir su cantidad, longitud y posición. Uno de los mecanismos de control se basa en la fosforilación de residuos de serina en el dominio amino terminal de las proteínas de los filamentos intermedios. En un caso extremo, la fosforilación de las subunidades proteicas que forman la lámina nuclear provoca un desensamblaje total de los filamentos durante la mitosis; cuando ésta termina, las serinas específicas son desfosforiladas y se produce la formación *de novo* de la lámina nuclear (véase Figura 12-18). Los filamentos intermedios citoplasmáticos pueden sufrir también una reorganización radical durante la mitosis como respuesta a algún tipo de señal extracelular. Aunque estos cambios suelen ir acompañados de un incremento en la fosforilación de las subunidades, otros factores pueden intervenir también en este proceso.

Las células epiteliales presentan una familia muy diversa de filamentos de queratina⁹

En las células de los vertebrados, los filamentos intermedios citoplasmáticos pueden agruparse en tres clases: (1) *filamentos de queratina*, (2) *filamentos de vimentina* y *filamentos relacionados con la vimentina* y (3) *neurofilamentos*, cada uno de los cuales está formado por la polimerización de sus correspondientes

Tabla 16-1 Principales tipos de proteínas de filamentos intermedios en las células de los vertebrados

Tipo de filamento intermedio	Componente polipeptídico (masa en daltons)	Localización celular
Láminas nucleares	lamininas A, B, y C (65 000 - 75 000)	lámina nuclear de las células eucariotas
Proteínas relacionadas con la vimentina	vimentina (54 000)	muchas células de origen mesenquimático, a menudo expresada transitoriamente durante el desarrollo
	desmina (53 000)	músculo
	proteína glial ácida fibrilar (50 000)	células gliales (astrocitos y células de Schwann)
	periferina (66 000)	neuronas
Queratinas	tipo I (ácidas) (40 000 - 70 000)	células epiteliales y sus derivados (p. ej., el pelo y las uñas)
	tipo II (neutras/básicas) (40 000 - 70 000)	
Filamentos intermedios neuronales	proteínas de los neurofilamentos NF-L, NF-M y NF-H (60 000 - 130 000)	neuronas

subunidades proteicas (Tabla 16-1). La familia más diversa de subunidades proteicas la constituyen las **queratinas** (también llamadas *citoqueratinas*), que forman **filamentos de queratina**, principalmente en las células epiteliales. Hay más de 20 tipos distintos de queratinas en los epitelios humanos. Al menos, otras 8 queratinas, llamadas *queratinas duras*, son específicas del pelo y de las uñas. (Las queratinas de las células epiteliales, pelo, y uñas reciben también el nombre de α -queratinas para distinguirlas de las β -queratinas, evolutivamente distintas, que se encuentran en las plumas de las aves y que presentan una estructura totalmente distinta que no discutiremos en este capítulo).

Las queratinas se subdividen en dos tipos, si nos basamos en su secuencia de aminoácidos: *queratinas del tipo I (ácidas)* y *queratinas del tipo II (neutras/básicas)*. Mediante experimentos de reensamblaje se ha encontrado que los heterodímeros formados por queratinas del tipo I y del tipo II pueden formar filamentos mientras que los homodímeros no los forman, hecho que permite explicar por qué los filamentos de queratina son siempre heteropolímeros formados por la misma cantidad de polipéptidos de queratina del tipo I y del tipo II.

Cualquier célula epitelial puede disponer de una gran variedad de queratinas, todas ellas copolimerizando en un único sistema filamentoso de queratina. Los epitelios más simples, como los que encontramos en los embriones tempranos o en algunos tejidos adultos como por ejemplo el hígado, disponen de un solo tipo de queratina del tipo I y uno solo también de queratina del tipo II. Otros epitelios, como el de la lengua, el de la vejiga, y el de las glándulas sudoríparas, contienen 6 o más tipos de queratinas –cuya combinación particular depende de la localización de la célula dentro del órgano. Esta diversidad es aún más pronunciada en la piel, donde en las células de las distintas capas de la epidermis se expresan mediante distintos tipos de queratinas (véase Figura 22-19). Existen también queratinas que son características de los epitelios en proliferación. Esta heterogeneidad de queratinas es muy útil clínicamente: en el diagnóstico de los cánceres epiteliales (*carcinomas*), el tipo concreto de queratinas que se expresa puede ser utilizado para determinar el tejido epitelial a partir del cual se ha originado el tumor, lo cual puede servir de ayuda en el momento de decidir el tipo de tratamiento que resultará más efectivo.

Muchas células no epiteliales presentan sus propios filamentos intermedios citoplasmáticos diferenciales¹⁰

A diferencia de las queratinas, la *vimentina* y las *proteínas relacionadas con la vimentina*, pueden formar filamentos intermedios que son polímeros de un único tipo de especie proteica. La *vimentina* es la proteína de los filamentos intermedios citoplasmáticos más abundante y se encuentra en la mayoría de células de origen mesodérmico, incluyendo fibroblastos, células endoteliales, y células sanguíneas de la línea blanca; además muchas células expresan la vimentina transitoriamente durante el desarrollo. La *desmina* se encuentra principalmente en las fibras musculares: se encuentra distribuida por todo el citoplasma de las fibras musculares lisas, y se une a las miofibrillas adyacentes (haces ordenados de actina y miosina filamentosas que discutiremos más adelante) en las fibras del músculo esquelético y cardíaco. La *proteína glial ácida fibrilar* forma los filamentos gliales en los astrocitos del sistema nervioso central y en algunas células de Schwann de los nervios periféricos (Figura 16-15). Todas estas proteínas pueden polimerizar correctamente entre ellas; en algunos tipos celulares adultos se han encontrado copolímeros formados por vimentina y por proteínas relacionadas con la vimentina. Por el contrario, ninguna de estas proteínas copolimeriza con las queratinas: cuando queratinas y proteínas relacionadas con la vimentina se expresan en la misma célula, forman sistemas filamentosos independientes.

Las células nerviosas disponen de una variedad única de filamentos intermedios, que se expresan en distintas regiones del sistema nervioso central en estadios específicos del desarrollo. Los *neurofilamentos* son los más abundantes; se extienden a lo largo del axón y forman su componente citoesquelético primario, especialmente en las células nerviosas maduras. En los mamíferos, se han descrito tres tipos de *proteínas de los neurofilamentos*: llamadas *NF-L*, *NF-M* y *NF-H*, debido a diferencias en su peso molecular (L de bajo, "low", M de medio, "middle" y H de alto, "high", respectivamente). Normalmente los tres tipos de proteínas se encuentran en cada neurofilamento. *NF-M* y *NF-H* tienen largas colas carboxilo terminales; se cree que se proyectan desde el eje del neurofilamento y contribuyen a regular el espaciamiento lateral de los neurofilamentos en el axón (Figura 16-16).

Si marcamos una célula en cultivo con un anticuerpo contra las proteínas de los filamentos intermedios del citoplasma, podremos observar una red delicada de filamentos fibrosos que envuelve el núcleo y se extiende a través del citoplasma hasta la membrana plasmática (véase Figura 16-12). En las células epi-

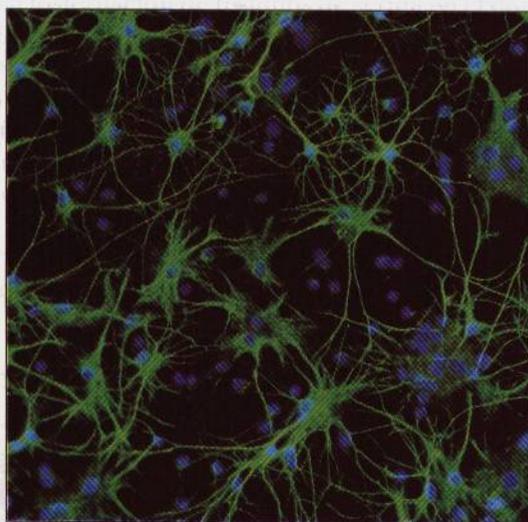


Figura 16-15 Micrografía de inmunofluorescencia de filamentos gliales en astrocitos cultivados. Los haces de filamentos intermedios (*verde*) se han marcado con anticuerpos contra la proteína glial ácida fibrilar. Los núcleos se han marcado con un colorante *azul* de unión al DNA. (Por cortesía de Nancy L. Kedersha.)

100 μ m

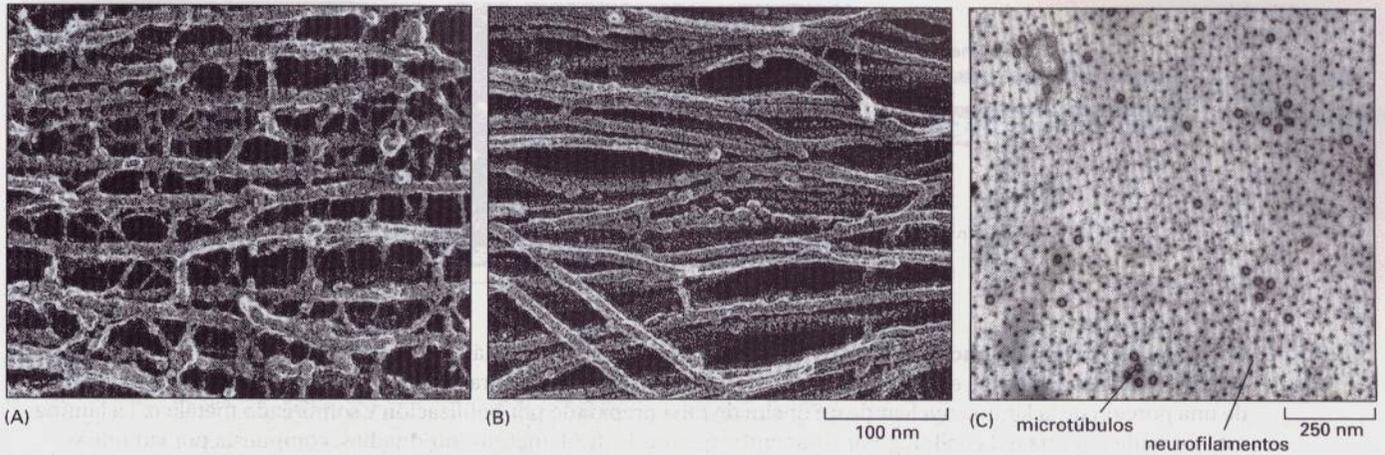


Figura 16-16 Electronmicrografías de dos tipos de filamentos intermedios en células del sistema nervioso. (A) Imagen de neurofilamentos preparados mediante congelación rápida y sublimación profunda de un axón de una célula nerviosa, mostrando el extraordinario entrecruzamiento de los haces a través de puentes de proteína –una configuración que probablemente proporciona una gran resistencia a la tensión en este largo apéndice celular. Las uniones cruzadas están formadas por largas extensiones no helicoidales del extremo carboxilo terminal de las proteínas más grandes del neurofilamento. (B) Imagen de filamentos gliales en una célula glial obtenida mediante congelación rápida y sublimación profunda ilustrando que estos filamentos son lisos y tienen menos puentes cruzados. (C) Electromicrografía convencional de un corte de un axón que muestra la distancia de separación regular de los neurofilamentos, mucho más abundantes que los microtúbulos. (A y B, por cortesía de Nobutaka Hirokawa; C, por cortesía de John Hopkins.)

teliales, los filamentos de queratina están unidos a las uniones celulares especializadas –los *desmosomas* que unen células vecinas y los *hemidesmosomas*, que unen las células a la lámina basal (se discuten en el Capítulo 19). Dado que en cada célula los filamentos de queratina están conectados a través de los desmosomas con las células vecinas, forman una red continua a través de todo el epitelio (Figura 16-17). De forma parecida, los filamentos de desmina se encuentran a menudo anclados en las uniones celulares especializadas de las fibras musculares.

La lámina nuclear está constituida por un tipo especial de proteínas de filamentos intermedios: las lamininas¹¹

La **lámina nuclear** es una red proteica que limita la superficie interna de la membrana nuclear interna en las células eucariotas (Figura 16-18). Presenta un grosor típico de 10-20 nm y está interrumpida en la zona de los poros nucleares, permitiendo la libre entrada y salida de macromoléculas del núcleo. En los mamíferos la lámina nuclear está formada por las **lamininas**, proteínas homólogas a las de los filamentos intermedios, de las cuales difieren al menos en cuatro puntos: (1) el dominio central en forma de varilla es algo más largo (véase Figura

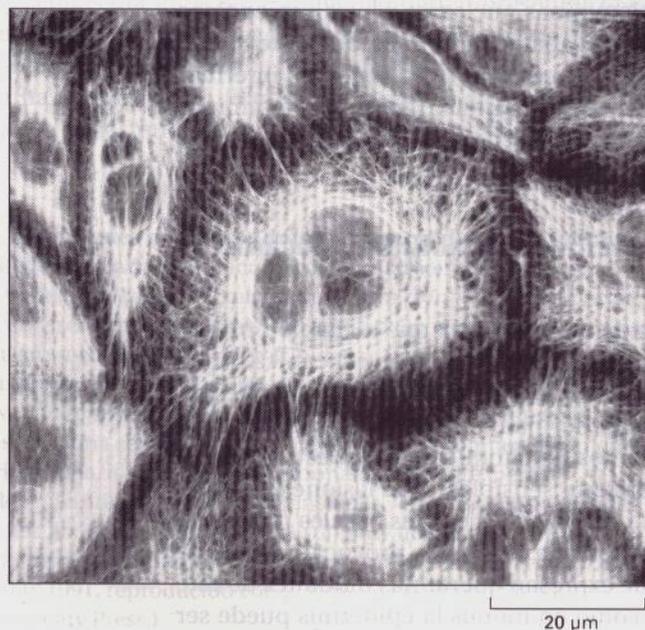


Figura 16-17 Los filamentos de queratina mantienen unidas las células, formando las capas celulares. Micrografía de inmunofluorescencia de una red de filamentos de queratina en una monocapa de células epiteliales en cultivo. Los filamentos de cada célula están conectados indirectamente con los de las células vecinas, a través de los desmosomas. (Por cortesía de Michael Klymkowsky.)

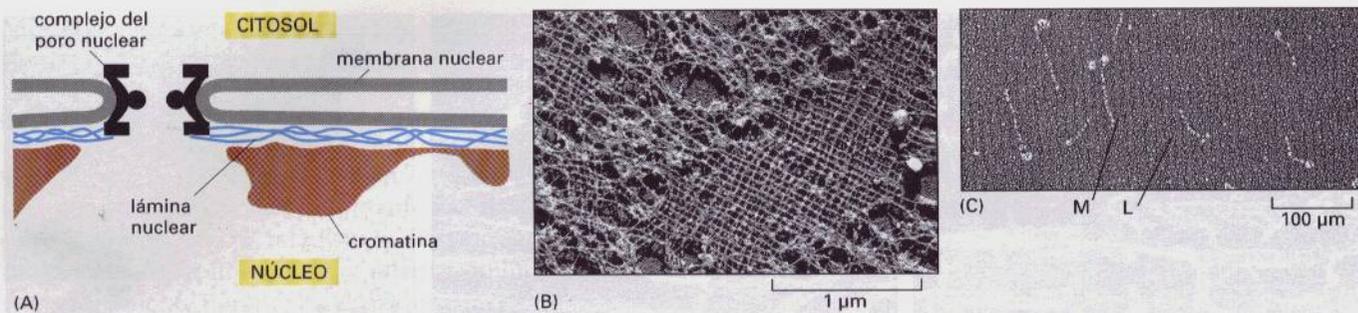


Figura 16-18 La lámina nuclear. (A) Dibujo esquemático que muestra la lámina nuclear a través de un corte en la región del poro nuclear. La lámina está asociada con la cromatina y con la membrana nuclear interna. (B) Electronmicrografía de una porción de la lámina nuclear de un oocito de rana preparado por liofilización y sombreado metálico. La lámina está formada por una red cuadrangular altamente organizada de filamentos intermedios, compuesta por lamininas nucleares (no siempre tan altamente organizada como aquí se presenta). (C) Electronmicrografía de dímeros aislados de laminina, sombreados metálicamente (marcados como L). Presentan una forma general semejante a la miosina muscular (marcados como M), con una cola en forma de varilla y dos cabezas globulares. Sin embargo, son mucho menores que las moléculas de miosina. Las cabezas globulares están formadas por los dos largos dominios carboxilo terminales. (B y C, por cortesía de Ueli Aebi).

16-13). (2) Presentan una señal de transporte hacia el núcleo que las dirige desde el citosol, donde son sintetizadas, hasta el núcleo. (3) Se ensamblan formando una red bidimensional parecida a una lámina y necesitan de la asociación de otras proteínas para el ensamblaje. (4) La red que forman es extraordinariamente dinámica y rápidamente se produce el desensamblaje al iniciarse la mitosis y el reensamblaje cuando ésta ha terminado; como ya hemos mencionado, el desensamblaje y reensamblaje vienen determinados por la fosforilación y desfosforilación de algunos residuos de serina en las lamininas.

A diferencia de los microtúbulos y de los filamentos de actina, que se encuentran en todas las células eucariotas, los filamentos intermedios citoplasmáticos han sido descritos sólo en animales pluricelulares, y en ellos no son necesarios en cada uno de los tipos celulares que los forman. Por ejemplo, las células gliales especializadas del sistema nervioso central que fabrican mielina no disponen de filamentos intermedios. Además, si desorganizamos los filamentos intermedios de fibras musculares, fibroblastos o células epiteliales en cultivo, no se produce ningún efecto en el comportamiento celular.

Parece ser que la primera clase de proteínas de los filamentos intermedios que apareció en la evolución fueron las lamininas nucleares y los diversos tipos de filamentos intermedios citoplasmáticos aparecieron más adelante como adaptaciones de esta forma primitiva. Las proteínas de los filamentos intermedios en los invertebrados, por ejemplo, se parecen mucho más a las lamininas que a las proteínas de los filamentos intermedios citoplasmáticos de los vertebrados.

Los filamentos intermedios proporcionan estabilidad mecánica a las células animales¹²

Cada día disponemos de mayor número de evidencias de que la función principal de los filamentos intermedios es la de soportar la tensión mecánica. En la enfermedad genética humana *epidermolisis bullosa simple*, las mutaciones en los genes de las queratinas que se expresan normalmente en la capa basal de la epidermis desorganizan la red de filamentos de citoqueratina en estas células, transformándolas en células extremadamente sensibles a las lesiones mecánicas: una ligera presión puede provocar la rotura de las células basales mutantes, y la piel se llena de ampollas en la zona afectada. Podemos provocar una situación parecida en monos transgénicos que expresan queratinas mutantes de este tipo (Figura 16-19). Tanto en humanos como en monos la epidermis puede ser

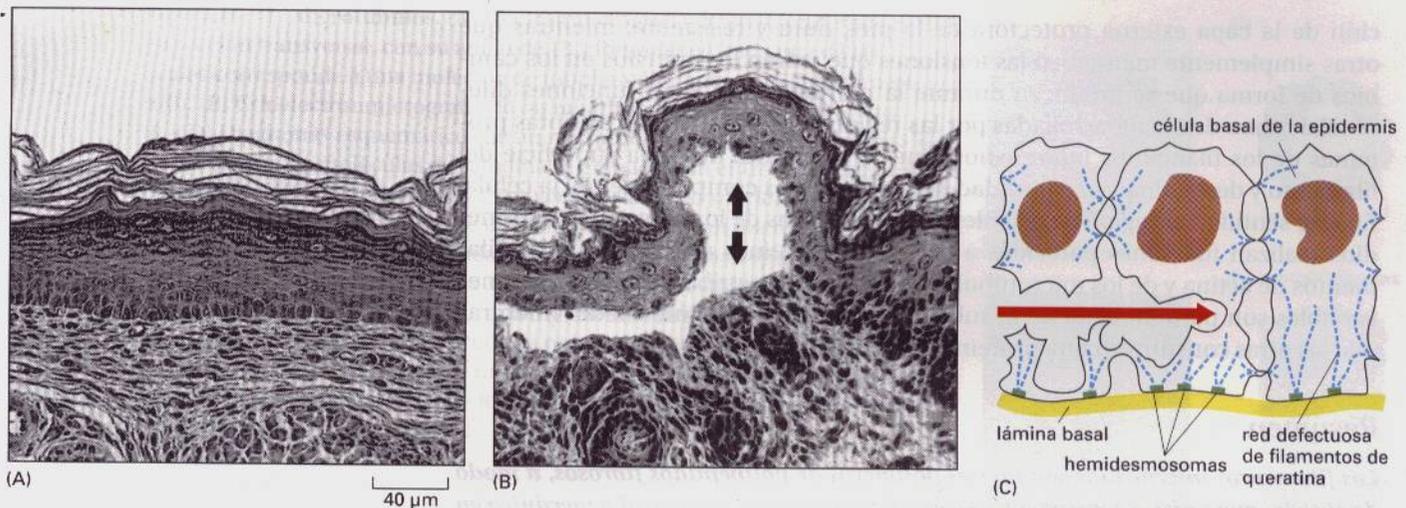


Figura 16-19 Aparición de ampollas en la piel provocadas por un gen mutante de queratina. Un gen mutante que

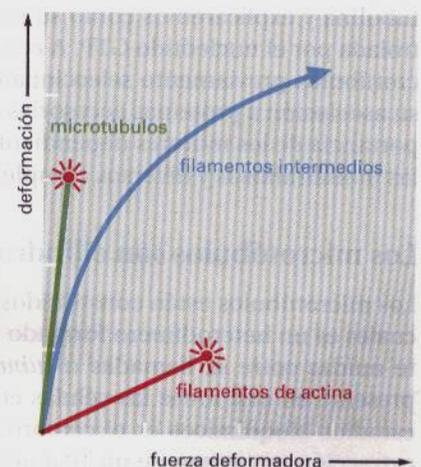
codifica una queratina truncada (sin dominios amino y carboxilo terminales) ha sido expresado en un ratón transgénico. La proteína defectuosa se ensambla con las moléculas de queratina normales y desorganiza la red de filamentos de queratina en las capas celulares basales. Micrografías ópticas de piel normal (A) y mutante (B) muestran que las ampollas se producen a partir de la ruptura de las células en la capa basal de la epidermis mutante. El dibujo en (C) de tres células de la capa basal de la epidermis mutante observadas mediante microscopía electrónica muestra que las células se rompen entre el núcleo y los hemidesmosomas, que conectan los filamentos de queratina con la lámina basal subyacente. (De P.A. Coulombe, M.E. Hutton, R. Vassar y E. Fuchs, *J. Cell Biol.* 115:1661-1674, 1991, reproducido con permiso de copyright de The Rockefeller University Press.)

tan frágil que el individuo mutante puede morir por un trauma mecánico. Se cree que los filamentos intermedios citoplasmáticos juegan un papel semejante en las células no epiteliales.

La estructura que presentan los filamentos intermedios es la ideal para desarrollar este tipo de funciones mecánicas. Las subunidades fibrosas se asocian de manera paralela formando haces superpuestos, lo cual les permite resistir tensiones mecánicas mucho más intensas que las que resisten los microtúbulos o los filamentos de actina (Figura 16-20). En la piel, los filamentos de queratina de las capas más externas de la epidermis se entrecruzan covalentemente entre sí y con proteínas asociadas, y a medida que las células de la capa exterior van muriendo, las queratinas entrecruzadas persisten como la parte principal de la capa protectora externa del animal. Las células epiteliales especializadas de lugares específicos de la piel proporcionan variaciones regionales, y generan apéndices superficiales tales como los pelos y las uñas.

Sin embargo, si la función de los filamentos intermedios es simplemente la de resistir las tensiones mecánicas en las células y tejidos, ¿por qué existen tantos tipos de subunidades proteicas? Además, ¿cuál es la función de los dominios variables de la cabeza y de la cola de estas proteínas? En la actualidad estas preguntas no pueden contestarse detalladamente, pero está claro que la manera en que los filamentos intermedios se unen a otros componentes de la célula varía de un tipo celular a otro. Los filamentos de desmina que unen entre sí los bordes de las miofibrillas en las células del músculo esquelético deben presentar lugares de unión para proteínas específicas asociadas a las miofibrillas. Los neurofilamentos en los axones están unidos entre sí a través de sus dominios carboxilo terminales y forman un haz continuo de filamentos, a modo de cuerda de un metro o más de longitud. Algunas queratinas están especializadas en la forma-

Figura 16-20 Propiedades mecánicas de los polímeros de actina, tubulina y vimentina. Redes formadas por microtúbulos o filamentos de actina o filamentos de vimentina, todas a la misma concentración, fueron expuestas a una fuerza en un viscómetro, y se calculó el grado de tensión resultante. Los resultados muestran que la red de microtúbulos se deforma fácilmente pero que cuando la tensión sobrepasa el 50% de su longitud original (indicada mediante la *estrella roja que estalla*) se rompen y empiezan a fluir sin límite. Los filamentos de actina son mucho más rígidos, pero se rompen fácilmente. Las redes de vimentina, al contrario, se deforman fácilmente, pero a diferencia de los microtúbulos, soportan tensiones y esfuerzos muy grandes sin romperse. Los filamentos de vimentina son muy necesarios para el mantenimiento de la integridad celular. (Adaptado de P. Jamney et al., *J. Cell Biol.* 113:155-160, 1991, reproducido con permiso de copyright de The Rockefeller University Press.)



ción de la capa externa protectora de la piel, dura y resistente, mientras que otras simplemente mantienen las tensiones que sufren los epitelios en los cambios de forma que se producen durante la morfogénesis. Estas funciones diferenciales han de ser desarrolladas por las regiones variables de las distintas proteínas de los filamentos intermedios, que se proyectan desde la superficie del filamento y determinan su capacidad de unión a otros componentes de la célula. En este sentido, las regiones variables de las proteínas de los filamentos intermedios realizan funciones parecidas a las de las proteínas accesorias de los filamentos de actina y de los microtúbulos. La diferencia estriba en que las regiones variables son parte integral de la subunidad del filamento intermedio mientras que las otras constituyen una proteína independiente.

Resumen

Los filamentos intermedios son fuertes polímeros de polipéptidos fibrosos, a modo de cuerda, que resisten tensiones y desempeñan un papel estructural o mecánico en la célula. Se conocen distintas formas específicas de filamentos intermedios que difieren en el tipo de polipéptido que los forma: entre las que se encuentran los filamentos de queratina de las células epiteliales, los neurofilamentos de las células nerviosas, los filamentos gliales de los astrocitos y las células de Schwann, los filamentos de desmina de las fibras musculares, y los filamentos de vimentina de los fibroblastos y de otros muchos tipos celulares. Las lamininas nucleares, que forman la lámina fibrosa subyacente a la envoltura nuclear, son una familia diferente de proteínas de los filamentos intermedios.

Los monómeros de los distintos tipos de filamentos intermedios tienen secuencias de aminoácidos distintas y difieren en sus pesos moleculares. Sin embargo, todos ellos presentan un dominio central homólogo que, cuando dimeriza, forma una estructura de sobreenrollamiento rígido. Estas subunidades diméricas se asocian unas con otras formando tetrámeros simétricos, los cuales se ensamblan en haces superpuestos formando el filamento intermedio no polarizado. Los dominios fibrosos de las subunidades forman el eje estructural de los filamentos intermedios, mientras que los dominios globulares se proyectan hacia el exterior. Una función de estos dominios variables puede ser la de permitir a cada tipo de filamento intermedio la asociación con otros componentes específicos de la célula y la de posicionar estos filamentos en el lugar adecuado dentro de la célula.

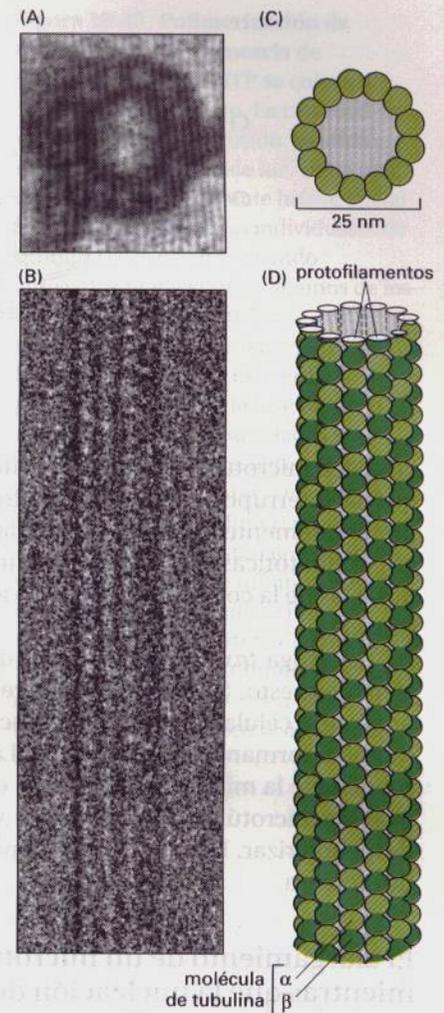
Microtúbulos¹³

Los microtúbulos, como hemos visto, son polímeros largos y rígidos que se extienden a través del citoplasma y dirigen la localización de los orgánulos delimitados de membrana y de otros componentes celulares. En este apartado discutiremos el ensamblaje de estas importantes estructuras a partir de moléculas de tubulina y explicaremos cómo su polimerización y despolimerización está controlada por el nucleótido GTP. A continuación examinaremos cómo algunos microtúbulos previamente seleccionados son estabilizados en la célula mediante su asociación a proteínas accesorias específicas. Finalmente, discutiremos la importancia de los motores dependientes de microtúbulos que transportan vesículas membranosas y diversos complejos proteicos a lo largo de los microtúbulos.

Los microtúbulos son cilindros huecos formados por tubulina¹⁴

Los microtúbulos están constituidos por moléculas de **tubulina**, cada una de las cuales es un heterodímero formado por dos subunidades globulares fuertemente unidas entre sí, llamadas α -tubulina y β -tubulina. Aunque la tubulina está presente en casi todas las células eucariotas, la fuente más abundante para los estudios bioquímicos es el cerebro de los vertebrados. Los procedimientos de extracción recuperan de un 10 a un 20% de la proteína soluble total del cerebro

Figura 16-21 Microtúbulos. (A) Electronmicrografía de un microtúbulo visto en sección transversal, con su anillo de 13 subunidades, cada una de las cuales corresponde a una molécula de tubulina diferente (un heterodímero α/β). (B) Crio-electronmicrografía de un microtúbulo ensamblado *in vitro*. (C y D) Diagramas esquemáticos de un microtúbulo, en los que se muestra la forma en que las moléculas de tubulina se empaquetan entre sí formando la pared cilíndrica. (C) muestra las 13 moléculas vistas en sección transversal. (D) muestra una visión lateral de una corta sección de un microtúbulo, con las moléculas de tubulina alineadas formando largas hileras paralelas o *protofilamentos*. Cada uno de los 13 protofilamentos está compuesto por series de moléculas de tubulina, cada una de las cuales es un heterodímero α/β . Un microtúbulo es una estructura polar, ya que cada uno de sus extremos tiene una molécula de tubulina (α o β) diferente. (A, por cortesía de Richard Linck; B, por cortesía de Richard Wade; D, dibujado a partir de datos proporcionados por Joe Howard.)



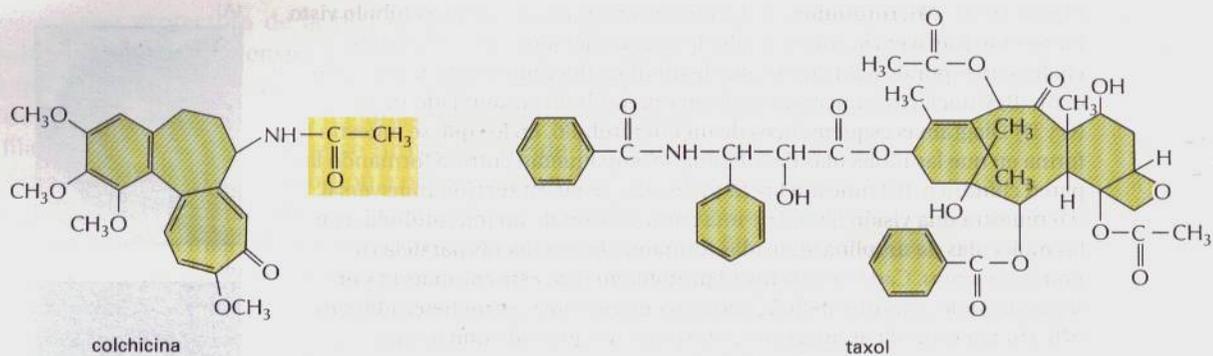
en forma de tubulina, lo cual refleja la elevada y poco usual densidad de microtúbulos que existe en los apéndices alargados de las células nerviosas.

Las moléculas de tubulina, en sí mismas, son diversas. En los mamíferos existen como mínimo seis formas de α -tubulina y un número parecido de formas de β -tubulina, cada una de las cuales está codificada por un gen distinto. Las distintas formas de tubulina son muy parecidas, y todas ellas copolimerizan en ensayos *in vitro*, formando un mismo microtúbulo, aunque pueden encontrarse en distintas regiones de la célula y llevar a cabo funciones sutilmente distintas. Por ejemplo, en seis neuronas especializadas que presentan sensibilidad por contacto del nemátodo *Caenorhabditis elegans*, los microtúbulos están formados por una forma específica de β -tubulina; las mutaciones en el gen que codifica esta proteína implican la pérdida de la sensibilidad por contacto específica, sin ningún efecto aparente en otras funciones celulares.

Un microtúbulo puede ser considerado como una estructura cilíndrica en la cual los heterodímeros de tubulina están empaquetados alrededor de un núcleo central, que aparece vacío en las micrografías electrónicas. De una forma quizás más detallada, uno puede observar cómo esta estructura se construye a partir de 13 protofilamentos lineales, cada uno de los cuales está formado por subunidades alternadas de α - y β -tubulina, dispuestos paralelamente formando un cilindro (Figura 16-21). Dado que los 13 protofilamentos están alineados en paralelo con la misma polaridad, los microtúbulos son estructuras polares, y es posible distinguir un extremo más (de crecimiento rápido) y un extremo menos (de crecimiento lento).

Los microtúbulos son estructuras muy lábiles, sensibles a drogas antimitóticas específicas¹⁵

Muchas de las disposiciones de los microtúbulos celulares son lábiles y esta labilidad es imprescindible para que puedan desarrollar su función. Uno de los ejemplos más notables de este hecho es el huso mitótico, que se forma después del desensamblaje de los microtúbulos al comienzo de la mitosis. El huso mitótico es la diana de una gran variedad de *drogas antimitóticas* específicas que actúan interfiriendo en el recambio entre las subunidades de tubulina de los microtúbulos y el acervo de tubulina libre. Una de estas drogas es la *colchicina* (Figura 16-22), alcaloide que se extrae del azafrán silvestre y que ha sido utilizada como planta medicinal para el tratamiento de la gota desde la época de los antiguos egipcios. Cada molécula de colchicina se une fuertemente a una molécula de tubulina e impide su polimerización, pero no puede unirse a la tubulina una vez la tubulina ha polimerizado formando un microtúbulo. La exposición de una célula en división a la colchicina, o a la *colcemida*, droga íntimamente relacionada con ella, produce una desaparición rápida del huso mitótico, e indica que el equilibrio químico se mantiene mediante el recambio continuo de subunidades



entre los microtúbulos del huso mitótico y el acervo de tubulina libre. Debido a que la interrupción temporal de los microtúbulos del huso mitótico provoca preferentemente la muerte de células que se dividen de forma anormal, las drogas antimitóticas, como la vinblastina y la vincristina (cuyos efectos son parecidos a los de la colchicina), han sido ampliamente utilizadas en el tratamiento del cáncer.

La droga *taxol* (Figura 16-22), que se extrae de la corteza del tejo, tiene un efecto opuesto. Se une fuertemente a los microtúbulos y los estabiliza; cuando se añade a células, provoca que muchas de las moléculas de tubulina libre se ensamblen formando microtúbulos. La estabilización de los microtúbulos con *taxol* detiene la mitosis de las células en división, lo cual indica que durante la mitosis los microtúbulos deben ser capaces no sólo de polimerizar sino también de despolimerizar. El *taxol* ha sido también ampliamente utilizado como droga anticancerosa.

El alargamiento de un microtúbulo es un proceso rápido, mientras que la nucleación de un nuevo microtúbulo es un proceso lento¹⁶

La polimerización y despolimerización de los microtúbulos es compleja e interviene en procesos interesantes con importantes papeles biológicos. Una buena parte de los conocimientos actuales acerca del comportamiento dinámico de los microtúbulos ha sido obtenida en estudios de polimerización *in vitro* a partir de moléculas de tubulina purificadas. La tubulina pura polimeriza a 37°C en el tubo de ensayo, formando microtúbulos, siempre y cuando estén presentes tanto Mg^{2+} como GTP. Si seguimos la polimerización ya sea midiendo la luz dispersada o a través del microscopio, podremos observar una fase inicial (fase lag), después de la cual los microtúbulos se forman rápidamente hasta llegar a un nivel de polimerización determinado. La fase inicial se produce porque es mucho más fácil añadir moléculas de tubulina a un microtúbulo existente, proceso llamado *alargamiento*, que iniciar un nuevo microtúbulo *de novo*, proceso llamado *nucleación*.

Durante la fase de polimerización rápida, las concentraciones elevadas de tubulina libre provocan que la polimerización de los microtúbulos sea más rápida que la despolimerización (véase más adelante). Sin embargo, cuando se ha llegado al nivel de polimerización más elevado, no toda la tubulina habrá polimerizado puesto que las subunidades se están disociando (despolimerizando) a partir de los extremos de los microtúbulos y, al mismo tiempo, añadiéndose a ellos. La velocidad de polimerización decae con el tiempo porque es proporcional a la concentración de tubulina libre; la concentración de tubulina libre en el nivel más alto, en el cual las velocidades de polimerización y despolimerización se encuentran en equilibrio, recibe el nombre de *concentración crítica* (Figura 16-23).

Al iniciar este capítulo vimos que normalmente en una célula los microtúbulos crecen a partir de un lugar específico de nucleación (generalmente el cen-

Figura 16-22 Estructuras químicas de la colchicina y del taxol. La colcemida, una tercera droga, está íntimamente relacionada con la colchicina y en ella el grupo que se muestra en *amarillo* está substituido por un $-CH_3$. Se une a la tubulina, pero a diferencia de la colchicina, su unión es fácilmente reversible.

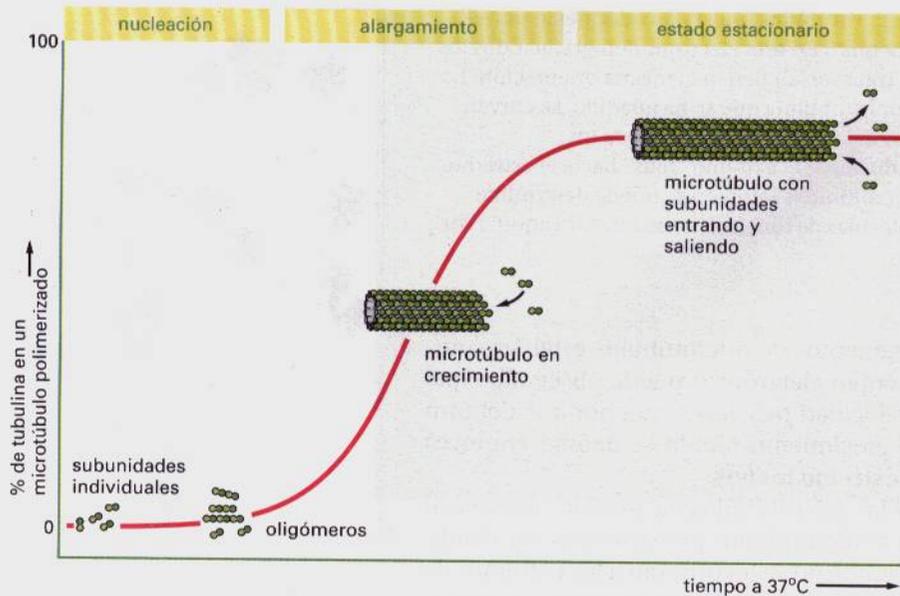


Figura 16-23 Polimerización de tubulina pura. Una mezcla de tubulina, tampón y GTP se coloca a 37°C en el tiempo cero. La cantidad de microtúbulo polimerizado, medida mediante dispersión de luz, sigue una curva sigmoide. Durante la fase inicial (fase lag) las moléculas individuales de tubulina se asocian formando agregados metaestables, algunos de los cuales continúan y nuclean microtúbulos. La fase lag refleja una barrera cinética para este proceso de nucleación. Durante la fase rápida de alargamiento, las subunidades se añaden a los extremos libres de los microtúbulos existentes. Durante la fase de meseta, la polimerización y la despolimerización están en equilibrio ya que la cantidad de tubulina libre ha llegado al punto en que se ha conseguido la *concentración crítica*. Para simplificar, las subunidades que se añaden y que se pierden de un microtúbulo se muestran siempre en el mismo extremo.

trosoma); puesto que existe una barrera cinética para la nucleación en solución, la polimerización de la tubulina se produce únicamente en este lugar. Como en el tubo de ensayo, no toda la tubulina de la célula se encuentra polimerizada. Una fibroblasto típico dispone aproximadamente de una concentración de tubulina 20 micromolar (2 mg/ml), de la cual un 50% está en los microtúbulos y el 50% restante se encuentra libre.

Los dos extremos de un microtúbulo son diferentes y crecen a velocidades diferentes¹⁷

La polaridad estructural de un microtúbulo, reflejo de la orientación regular de las subunidades de tubulina, hace que los dos extremos del polímero sean distintos, lo cual tiene un efecto profundo en su velocidad de crecimiento. Si se permite que moléculas de tubulina purificada polimericen durante un corto pe-

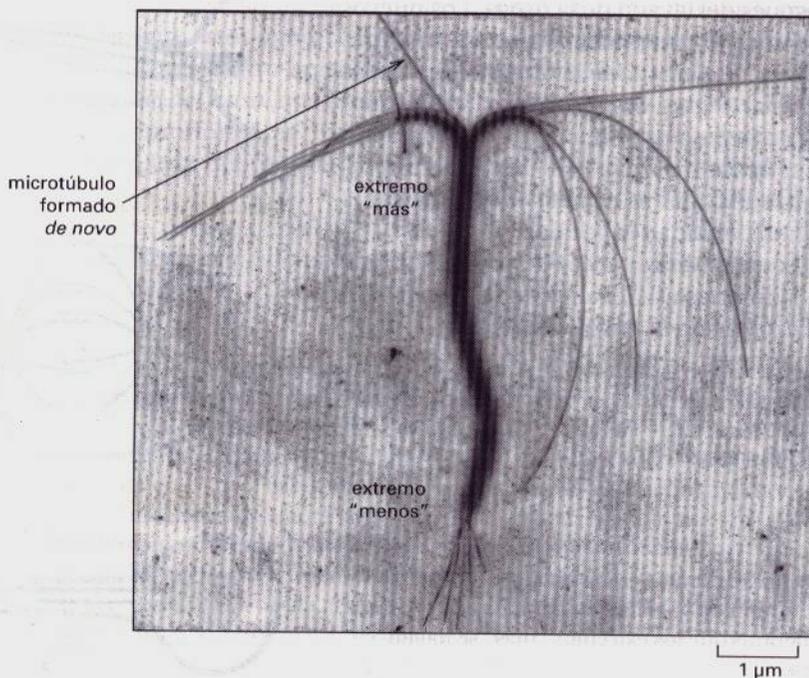


Figura 16-24 Electronmicrografía que muestra la polimerización preferencial de tubulina en los extremos "más" de los microtúbulos. Un haz estable de microtúbulos obtenido del núcleo de un cilio (se discute más adelante) se incubó con subunidades de tubulina en condiciones de polimerización. Los microtúbulos crecen más rápidamente en el extremo "más" del haz de microtúbulos (extremo que se encuentra sobre el haz en esta figura). (Por cortesía de Gary Borisy.)

Figura 16-25 Polaridad de los microtúbulos puesta de manifiesto por el método de “decoración con ganchos”. En esta electronmicrografía todos los microtúbulos (vistos en sección transversal) tienen la misma orientación. Los pequeños ganchos, formados por la tubulina que se ha añadido, se curvan siguiendo el sentido de las agujas del reloj, lo cual indica que los microtúbulos se están observando desde el extremo “más” hacia el extremo “menos”. La polaridad de los microtúbulos también se puede determinar mediante la decoración con moléculas de dineína (no se muestra aquí). (Por cortesía de Ursula Euteneuer.)



ríodo de tiempo en los extremos de fragmentos de microtúbulos estables y entonces se examina la mezcla al microscopio electrónico puede observarse que un extremo se alarga al menos a una velocidad tres veces superior a la del otro (Figura 16-24). Por ello, el extremo de crecimiento rápido se definió entonces como el **extremo más** y el otro como el **extremo menos**.

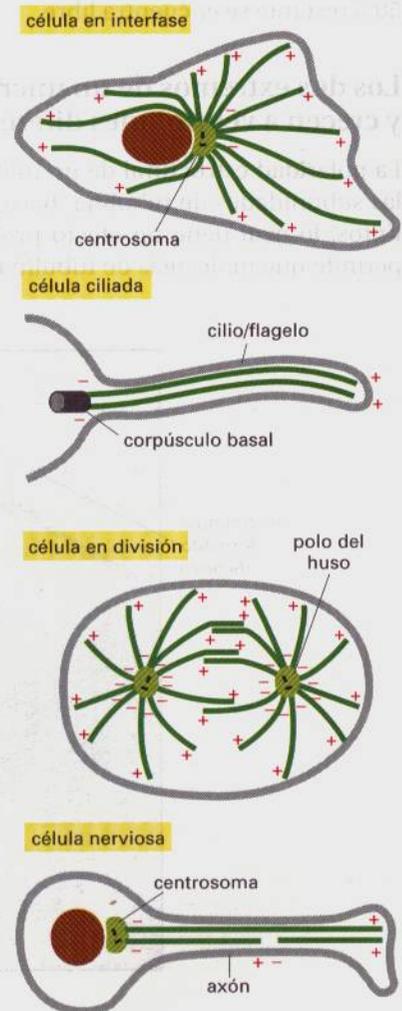
Es posible detectar la polaridad de los microtúbulos en sección transversal añadiendo moléculas de tubulina libre a microtúbulos preexistentes: en condiciones especiales los monómeros de tubulina no se incorporan a los extremos de los microtúbulos sino a los lados, formando láminas de protofilamentos curvados. Estas láminas observadas en sección transversal parecen pequeños ganchos y, dependiendo de la orientación del microtúbulo, siguen la misma dirección de las agujas del reloj o van en sentido contrario (Figura 16-25). De esta forma se ha demostrado que en una célula, los extremos más de los microtúbulos se extienden a partir de los lugares de nucleación de los microtúbulos como por ejemplo el centrosoma, los polos del huso mitótico o el corpúsculo basal de un cilio (Figura 16-26).

Los centrosomas son el lugar primario de nucleación de los microtúbulos en las células animales¹⁸

En el citoplasma de una célula interfásica podemos observar los microtúbulos mediante tinción de la célula con anticuerpos anti-tubulina fluorescentes, después de que las células hayan sido fijadas. Se observa una elevada densidad de microtúbulos alrededor del núcleo, desde donde irradian hacia la periferia celular, en forma de finas hebras (Figura 16-27). El origen de los microtúbulos se puede observar claramente si éstos se despolimerizan primero con colcemida y luego se permite su repolimerización después del lavado de la droga. Los nuevos microtúbulos crecen a partir del centrosoma y forman una estructura con apariencia de estrella llamada **áster** y entonces se alargan hacia la periferia celular hasta que se restablece su distribución inicial (Figura 16-28). Si los microtúbulos de células en cultivo se “decoran” con ganchos de tubulina para determinar su polaridad, se observa que todos tienen sus extremos “más”, alejado del *centrosoma*, lo cual indica que este centro organizador tiene la capacidad de nuclear la polimerización de los microtúbulos con una polaridad específica.

En la mayoría de células animales el **centrosoma** es el centro organizador de microtúbulos más importante. Durante la interfase se localiza en la proximidad del núcleo, muy cercano a la superficie externa de la envoltura nuclear. Inmersas en el centrosoma se encuentran un par de estructuras cilíndricas, dispuestas en ángulo recto una respecto a otra, en una configuración en forma de L. Son los *centríolos*, que discutiremos más adelante. El centrosoma se duplica y se divide en dos partes iguales durante la interfase de manera que cada mitad contiene un

Figura 16-26 Orientación de los microtúbulos en las células. Normalmente los extremos “menos” de los microtúbulos se hallan embebidos en un centro organizador de microtúbulos, mientras que los extremos “más” se hallan cerca de la membrana plasmática.



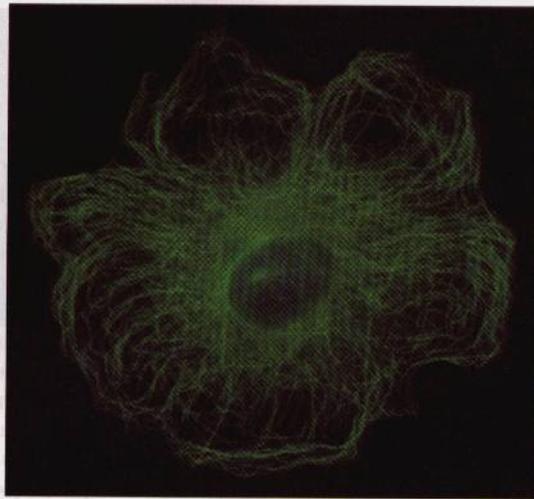


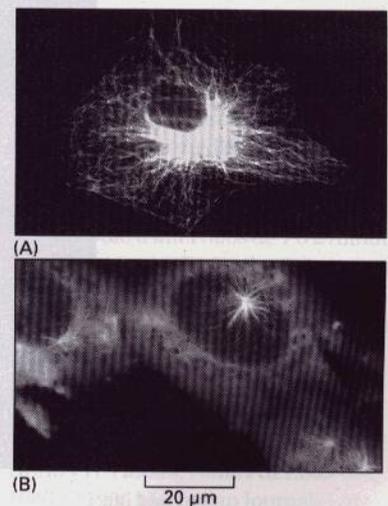
Figura 16-27 Distribución interfásica de los microtúbulos en un fibroblasto en cultivo. Los microtúbulos (en verde) han sido marcados con un anticuerpo contra la tubulina; el núcleo celular (en azul) se ha marcado con un colorante fluorescente que se une al DNA. (Por cortesía de Nancy L. Kedersha.)

par de centríolos duplicados. Estos dos centrosomas hijos se dirigen hacia lados opuestos del núcleo al empezar la mitosis, y forman los dos polos del huso mitótico (véase Figura 18-5).

Durante la interfase y la metafase se distingue una región de citoplasma mucho más oscura rodeando cada par de centríolos; en las mejores electronmicrografías se puede distinguir en esta región una red de pequeñas fibras (Figura 16-29A). Es el **materias pericentriolar**, o **matriz del centrosoma**, y es la región del centrosoma que nuclea la polimerización de los microtúbulos. La composición proteica de la matriz del centrosoma sólo es parcialmente conocida, igual que el mecanismo a partir del cual se produce la nucleación de los microtúbulos. Sin embargo, sabemos que está formada por proteínas específicas del centrosoma, incluyendo una forma minoritaria de la tubulina, llamada γ -tubulina (Figura 16-29B), que puede interactuar con el dímero α/β -tubulina colaborando en la nucleación de los microtúbulos.

No todos los centros organizadores de microtúbulos contienen centríolos. En las células mitóticas de plantas superiores, por ejemplo, los microtúbulos terminan en regiones electrodensas pobremente definidas, completamente desprovistas de centríolos. El huso meiótico de los oocitos de ratón tampoco presenta centríolos, aunque éstos aparecen más tarde en el embrión en desarrollo. En hongos y diatomeas el centro organizador de microtúbulos es una placa llamada *corpúsculo polar del huso*, que se encuentra en la envoltura nuclear. A pesar de las diferencias morfológicas (Figura 16-30), todos los centros organizadores contienen una matriz que nuclea la polimerización de los microtúbulos, y que normalmente está formada por γ -tubulina y otras proteínas específicas del centrosoma. Así pues, parece que el mecanismo molecular de la nucleación de los microtúbulos se ha conservado notablemente durante la evolución.

Figura 16-28 Microtúbulos creciendo a partir del centrosoma después de retirar la colcemida. Micrografías de inmunofluorescencia que muestran la distribución de los microtúbulos en células cultivadas, detectados mediante tinción con anticuerpos contra tubulina. En (A) se muestra una célula normal de un tejido en cultivo. Las células que se muestran en (B) fueron tratadas con colcemida durante 1 hora para despolimerizar sus microtúbulos, y posteriormente se permitió que se recuperaran; los microtúbulos aparecen en primer lugar en una estructura en forma de estrella, y luego se alargan hacia la periferia de la célula. (A, por cortesía de Eric Karsenti y Marc Kirschner; B, de M. Osborn y K. Weber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:867-871, 1976.)



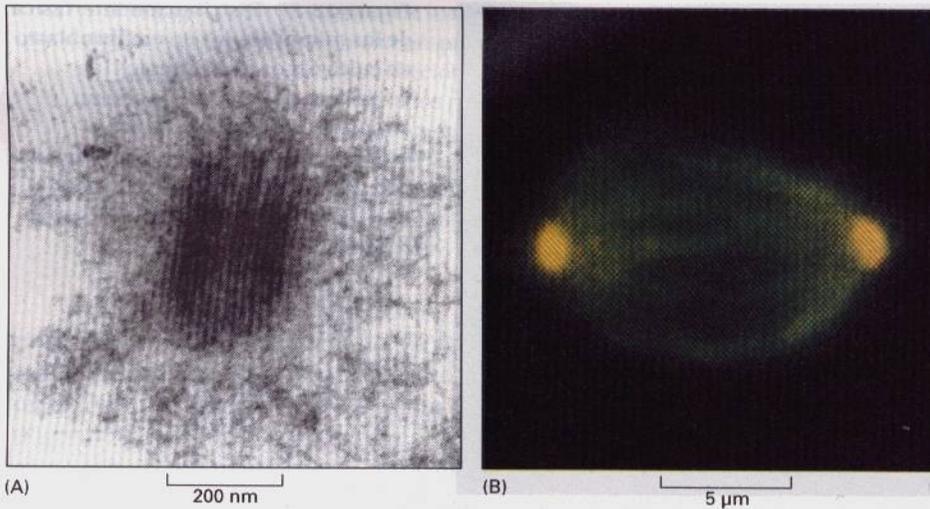


Figura 16-29 La matriz del centrosoma. (A) Electronmicrografía de un centrosoma en una preparación purificada. La matriz envuelve un centríolo en forma de barril y aparece como un material fibroso que contiene gránulos finos. (B) Micrografía óptica de una célula humana dividiéndose en cultivo, teñida con un anticuerpo contra la β -tubulina (verde) y con un anticuerpo contra la γ -tubulina (rojo), una proteína que se localiza en el centrosoma de las células de una gran variedad de organismos. La superposición del marcaje rojo y verde provoca que las regiones que contienen la γ -tubulina en los polos del huso sean amarillas. (A, cortesía de Stephen Fuller; B, cortesía de M. Katherine Jung y Berl R. Oakley.)

En las células animales los microtúbulos se despolimerizan y repolimerizan continuamente¹⁹

En una célula, como por ejemplo un fibroblasto en cultivo, se produce un recambio continuo de la red de microtúbulos. La vida media de un microtúbulo individual es aproximadamente de 10 minutos, mientras que la vida media de una molécula de tubulina, desde su síntesis hasta su degradación proteolítica, es de más de 20 horas. Así pues cada molécula de tubulina participa en la formación y desmantelamiento de muchos microtúbulos durante su período de vida, proceso que puede ser estudiado mediante la observación directa de células vivas. Así por ejemplo, a una célula podemos inyectarle tubulina que ha sido unida covalentemente a un colorante fluorescente y seguir, utilizando un microscopio de fluorescencia, el comportamiento de los microtúbulos que incorporan la tubulina marcada. Alternativamente, en algunas células muy extendidas los microtúbulos pueden observarse directamente, sin necesidad de ningún tipo de marcaje, utilizando la microscopía de contraste interferencial-diferencial vídeo amplificada (véase Figura 4-12). Cuando se sigue el comportamiento de los microtúbulos mediante alguno de estos métodos, se observa un fenómeno importante. Los microtúbulos individuales crecen hacia la periferia celular a una velocidad constante durante un cierto período de tiempo y entonces de repente se

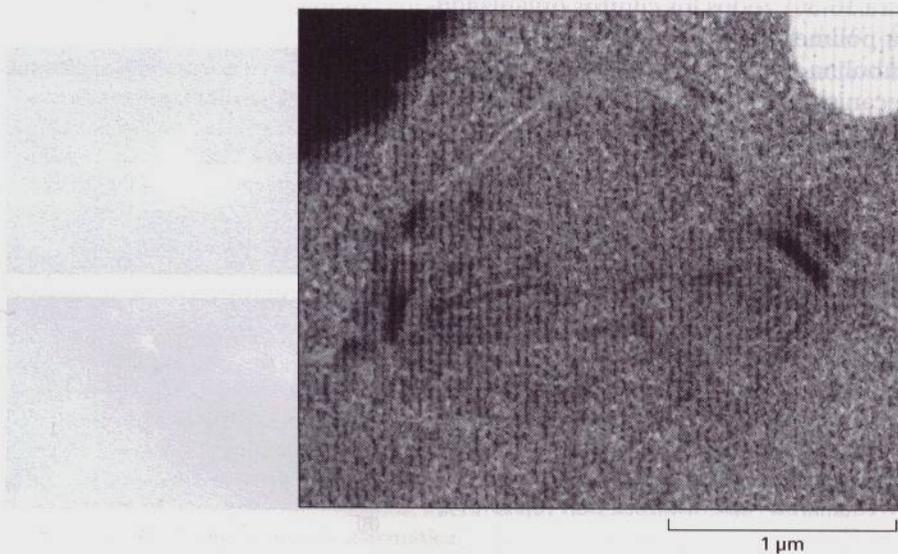


Figura 16-30 Un centro organizador de microtúbulos en una célula de un hongo. Electronmicrografía del corpúsculo polar del huso en la levadura. (Cortesía de John Kilmartin.)

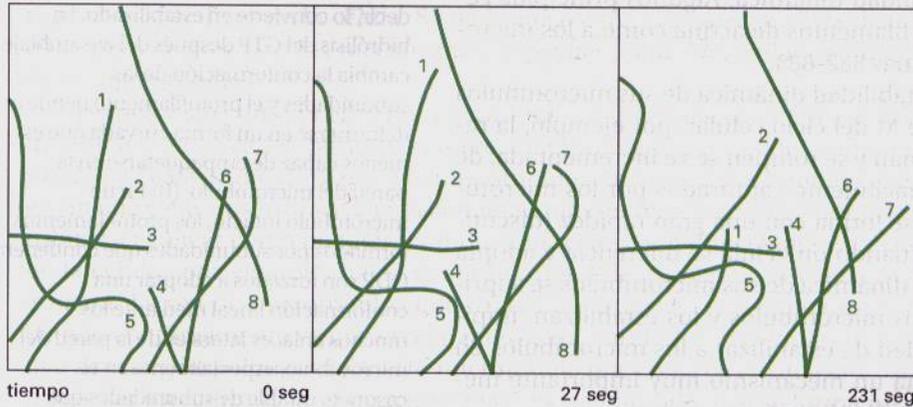
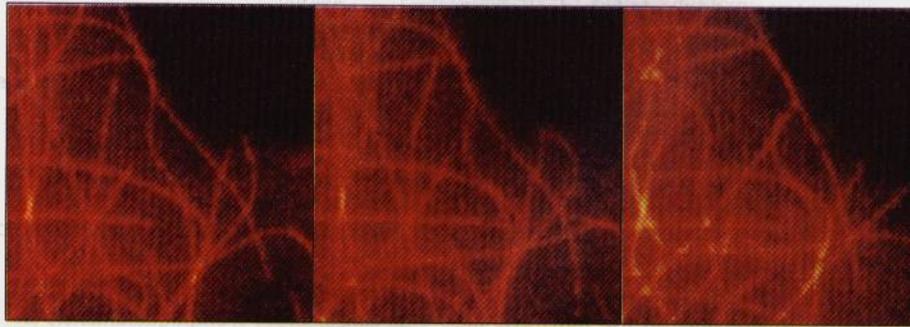


Figura 16-31 Dinámica de los microtúbulos en una célula viva. Se ha inyectado tubulina a un fibroblasto, que ha sido ligada covalentemente a rodamina, de manera que aproximadamente una subunidad de tubulina de cada 10 de la célula está marcada con el colorante fluorescente. Se observa entonces la fluorescencia en un extremo de la célula mediante un sistema de imagen electrónica extremadamente sensible. Debajo de las micrografías se muestran trazos que permiten ver los microtúbulos seleccionados más detalladamente. Podemos observar, por ejemplo, cómo el microtúbulo 1 crece primero y luego se acorta rápidamente, mientras que el microtúbulo 4 crece continuamente. (De P.J. Sarnak y G.C. Borisy, *Nature* 332:724-736, 1988. © 1988 Macmillan Journals Ltd.)

acortan rápidamente hacia el centrosoma. Pueden acortarse parcialmente y entonces continuar el crecimiento, o desaparecer por completo, siendo substituidos por un microtúbulo distinto (Figura 16-31). Estas fluctuaciones de tamaño pueden abarcar algunos micrómetros de longitud e incluyen la polimerización y después la despolimerización de miles de subunidades de tubulina. Cuando se han estudiado en un tubo de ensayo microtúbulos purificados, se han podido observar transiciones entre períodos prolongados de polimerización y despolimerización (Figura 16-32). Este comportamiento, llamado *inestabilidad dinámica*, juega un papel muy importante en el posicionamiento de los microtúbulos en la célula, tal como discutiremos más adelante.

La hidrólisis de GTP puede explicar la inestabilidad dinámica de los microtúbulos individuales²⁰

La **inestabilidad dinámica** de los microtúbulos necesita un aporte de energía para equilibrar el balance químico entre la polimerización y la despolimerización—energía que proviene de la hidrólisis de GTP. El GTP se une a la subunidad β -tubulina de la molécula de tubulina heterodimérica y, cuando la molécula de tubulina se incorpora al extremo de un microtúbulo, esta molécula de GTP es hidrolizada a GDP. (La subunidad α -tubulina también transporta GTP, pero no puede ser intercambiado por GTP libre y no es hidrolizado, por lo cual puede considerarse como una parte fija de la estructura proteica de la tubulina.)

Se ha estudiado el papel de la hidrólisis del GTP en la polimerización de los microtúbulos, utilizando análogos no hidrolizables del GTP. Las moléculas de tubulina que contienen estos análogos no hidrolizables de GTP forman microtúbulos normalmente, lo cual indica que la unión del nucleótido es necesaria para la polimerización del microtúbulo, pero su hidrólisis no lo es. Sin embargo, estos microtúbulos son anormalmente estables y no se despolimerizan igual que los microtúbulos normales cuando la concentración de tubulina en el fluido que los rodea es menor o cuando se tratan con colchicina. Así pues, aparentemente el papel normal de la hidrólisis del GTP es el de permitir la despolimerización de los microtúbulos debilitando las uniones entre las subunidades de tubulina.

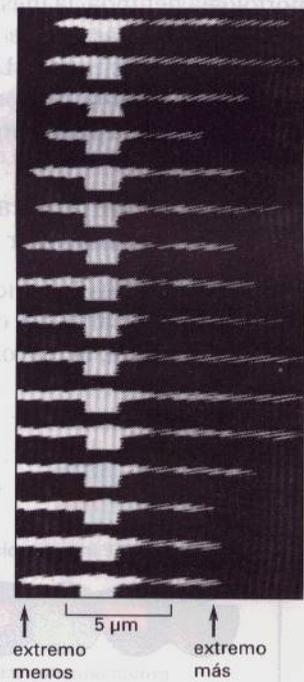


Figura 16-32 La inestabilidad dinámica del crecimiento de los microtúbulos. Fluctuaciones de la longitud de un microtúbulo en una solución de tubulina pura observadas mediante microscopía de campo oscuro vídeo-amplificada. Se recogieron imágenes del mismo microtúbulo a intervalos de 1 o 2 minutos y se presentaron siguiendo una secuencia ordenada en la pantalla del monitor. Los dos extremos del microtúbulo estuvieron sometidos a ciclos de acortamiento y alargamiento, de forma independiente, siendo el extremo "más" el que experimentó las mayores fluctuaciones. (De T. Horio y H. Hotani, *Nature* 321:605-607, 1986. © 1986 Macmillan Journals Ltd.)

Se cree que la inestabilidad dinámica es una consecuencia de la hidrólisis retrasada del GTP después del ensamblaje de la tubulina. Cuando un microtúbulo crece rápidamente, la incorporación de moléculas de tubulina en el extremo del polímero es más rápida que la velocidad de hidrólisis del GTP que transportan. Esto implica la formación de un “casquete” de GTP en el extremo del microtúbulo y, puesto que las moléculas de tubulina que contienen GTP se unen unas a otras con mayor afinidad que las que contienen GDP, el casquete de GTP estimula al microtúbulo a continuar su crecimiento. Por el contrario, cuando un microtúbulo ha perdido su casquete de GTP –por ejemplo, si la velocidad de polimerización baja lentamente– empezará a acortarse y luego tenderá a seguir acortándose.

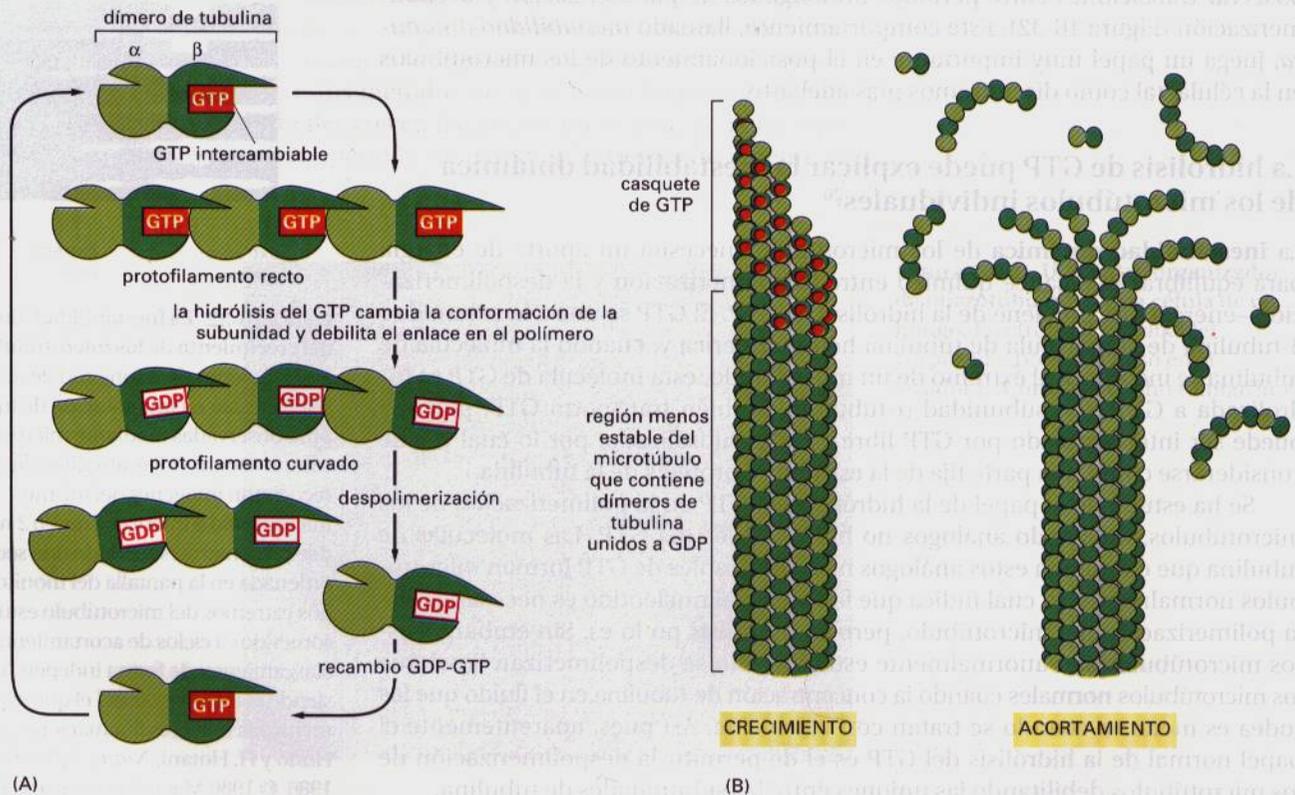
En la Figura 16-33 se muestra un modelo esquemático de los cambios estructurales que acompañan a la inestabilidad dinámica. Algunos principios generales que pueden aplicarse tanto a los filamentos de actina como a los microtúbulos se discuten en el Panel 16-1, páginas 882-883.

Las células pueden modificar la inestabilidad dinámica de sus microtúbulos para propósitos específicos. En cada fase M del ciclo celular, por ejemplo, la rapidez con la que los microtúbulos se forman y se rompen se ve incrementada, de forma que los cromosomas pueden ser fácilmente capturados por los microtúbulos en crecimiento y el huso mitótico se forma con una gran rapidez (discutido en el Capítulo 18). Contrariamente, cuando un célula se diferencia y adopta una morfología definida, la inestabilidad dinámica de sus microtúbulos se suprime mediante proteínas que se unen a los microtúbulos y los estabilizan, impidiendo su despolimerización. La capacidad de estabilizar a los microtúbulos en una configuración particular proporciona un mecanismo muy importante mediante el cual la célula puede organizar su citoplasma.

La inestabilidad dinámica de los microtúbulos proporciona un principio organizador para la morfogénesis celular²¹

En las células animales los microtúbulos citoplasmáticos tienden a irradiar en todas direcciones a partir del centrosoma, donde están anclados sus extremos “menos”. No obstante, la mayoría de las células animales están polarizadas, y el

Figura 16-33 La hidrólisis del GTP después de la polimerización desestabiliza los microtúbulos. El análisis del crecimiento y acortamiento de los microtúbulos *in vitro* sugiere el siguiente modelo para la inestabilidad dinámica. (A) La adición de los heterodímeros de tubulina transportando GTP a un extremo del protofilamento provoca su crecimiento en una conformación lineal, lo cual favorece el empaquetamiento en la pared cilíndrica del microtúbulo, es decir, lo convierte en estabilizado. La hidrólisis del GTP después del ensamblaje cambia la conformación de las subunidades y el protofilamento tiende a deformarse en un forma curvada que es menos capaz de empaquetarse en la pared del microtúbulo. (B) En un microtúbulo intacto, los protofilamentos formados por subunidades que contienen GDP son forzados a adoptar una conformación lineal mediante los muchos enlaces laterales de la pared del microtúbulo, especialmente en el casquete estable de subunidades que contienen GTP. La pérdida del casquete de GTP permite que los protofilamentos que contienen GDP se relajen y adopten su conformación curvada. Esto conduce a una disrupción progresiva del microtúbulo y al desensamblaje final de los protofilamentos, formando dímeros de tubulina libres.



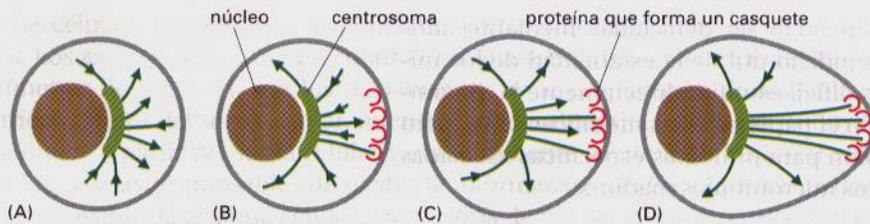


Figura 16-34 La estabilización selectiva de los microtúbulos puede polarizar una célula. Un microtúbulo acabado de formar sólo persistirá si sus dos extremos están protegidos de la despolimerización. En las células, los extremos menos de los microtúbulos generalmente están protegidos por los centros organizadores, a partir de los cuales crecen. Los extremos más son inicialmente libres pero pueden ser estabilizados por otras proteínas. Aquí por ejemplo en (A) se representa una célula no polarizada con nuevos microtúbulos creciendo y rompiéndose en todas direcciones. Los haces de microtúbulos encuentran entonces estructuras hipotéticas en una región específica del córtex celular que pueden unir (estabilizar) los extremos más de los microtúbulos (B). La estabilización selectiva de estos microtúbulos, que sucede al encontrar estas estructuras, comportará una redistribución rápida de los haces de microtúbulos y convertirá a la célula en una forma polarizada (C y D).

ensamblaje y desensamblaje de las moléculas de tubulina están controlados espacialmente de manera que predomina la extensión de los microtúbulos hacia regiones específicas de la célula. Se desconoce como se consigue esta distribución, pero se cree que los mecanismos dependen de la inestabilidad dinámica de los microtúbulos.

Hemos visto como *in vitro* los microtúbulos individuales tienden a existir en uno de los dos estados posibles –de crecimiento regular o rápido, y de desensamblaje “catastrófico”– y que los microtúbulos en las células también existen en una de estas dos formas. La inestabilidad inherente de los microtúbulos contribuye a explicar cómo pueden ser inducidos a crecer en direcciones específicas de la célula –por ejemplo, hacia el borde frontal de avance de la célula que se arrastra. La red de microtúbulos que irradia a partir del centrosoma está cambiando continuamente ya que crecen nuevos microtúbulos y reemplazan a otros que se están despolimerizando. Un microtúbulo que crece desde un centrosoma puede ser estabilizado si su extremo “más” es estabilizado, o si se forma un casquete, de manera que se impida su despolimerización. Si es recubierto por una estructura de una región particular de la célula, se establecerá un punto de unión relativamente estable entre esta estructura y el centrosoma. Así pues, los microtúbulos originados en el centro organizador pueden estabilizarse selectivamente por diferentes fenómenos en cualquier lugar de la célula. Se cree que la polaridad celular está determinada de esta manera, por medio de estructuras o factores desconocidos localizados en regiones particulares del córtex celular que “capturan” los extremos más de los microtúbulos (Figura 16-34).

Tal como discutiremos a continuación, en muchas células la estabilización inicial de los extremos más de los microtúbulos se consolida, produciéndose una polarización más permanente de la misma.

Los microtúbulos sufren una lenta “maduración” como resultado de modificaciones post-traduccionales de sus subunidades de tubulina²²

Las subunidades de tubulina pueden ser modificadas covalentemente después de su polimerización. Dos de estas modificaciones son especialmente interesantes puesto que proporcionan una forma de reloj molecular, que puede usarse para explicar cuánto tiempo ha transcurrido desde que un microtúbulo determinado ha polimerizado. Estas modificaciones son la acetilación de la α -tubulina en un residuo determinado de lisina y la eliminación de un residuo de tirosina del extremo carboxilo terminal de la α -tubulina. Ambas, *acetilación* y *destirosinación*, son reacciones enzimáticas lentas que tienen lugar sólo en los microtúbulos y no se producen sobre moléculas de tubulina libres; además, su acción revierte rápidamente cuando la molécula de tubulina se despolimeriza. Así pues, cuanto más tiempo haga que un microtúbulo particular ha polimerizado, mayor será el porcentaje de sus subunidades que están acetiladas y destirosinadas. Las modificaciones tardan diversas horas en producirse, de forma que en los fibroblastos, donde los microtúbulos se recambian rápidamente, relativamente pocos de ellos están modificados. Al contrario, en los axones de las células nerviosas, la mayoría de los microtúbulos son estables por lo que muchos de ellos se hallan modificados.



La acetilación y la destirosinación pueden ser detectadas mediante anticuerpos específicos, y proporcionan un indicio útil de la estabilidad de los microtúbulos en aquellas células en que es difícil estudiar directamente la dinámica de los microtúbulos. Se desconoce aún el papel de estas modificaciones, pero se cree que proporcionan lugares de unión para proteínas específicas asociadas a microtúbulos que podrían estabilizar los microtúbulos maduros.

Las proteínas asociadas a microtúbulos (MAP) se unen a los microtúbulos y modifican sus propiedades²³

Mientras la modificación post-traduccional de la tubulina marca ciertos microtúbulos como “maduros” y puede aumentar su estabilidad, las modificaciones más extendidas y versátiles de los microtúbulos son las conferidas por la unión de otras proteínas. Estas **proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP)**, de Microtubule-Associated Proteins), actúan tanto estabilizando los microtúbulos contra el desensamblaje como mediando su interacción con otros componentes celulares. Como cabría esperar de la diversidad de funciones de los microtúbulos, hay muchos tipos de MAP; algunas de ellas están ampliamente distribuidas en la mayoría de células, mientras que otras se encuentran tan sólo en algunos tipos celulares específicos.

Los dos principales tipos de MAP se pueden aislar a partir de cerebro, asociadas a microtúbulos: las *proteínas HMW* (proteínas de alto peso molecular, de High Molecular Weight), que tienen pesos moleculares de 200 000 a 300 000 daltons o más; y las *proteínas tau*, de pesos moleculares entre 55 000 y 62 000 daltons. Ambos tipos de proteínas tienen dos dominios, y sólo uno de ellos se une a los microtúbulos; se cree que el otro dominio permite a los microtúbulos unirse a otros componentes celulares (Figura 16-35). Puesto que este dominio de unión a los microtúbulos se une simultáneamente a varias moléculas de tubulina no polimerizada, estas MAP aceleran *in vitro* el proceso de nucleación durante la polimerización de la tubulina. Mucho más importante es el hecho que estas MAP inhiben la disociación de la tubulina de los extremos de los microtúbulos, por lo cual estas proteínas los estabilizan una vez formados. Anticuerpos contra la MAP-2 y contra tau muestran que ambas proteínas se unen a lo largo de toda la extensión de los microtúbulos citoplasmáticos.

Se han aislado muchas otras MAP. Algunas actúan como componentes estructurales y proporcionan uniones permanentes con otros componentes celulares, incluyendo otras partes del citoesqueleto. Otras son motores microtubulares, y utilizan la energía que proporciona la hidrólisis del ATP para desplazarse a lo largo de los microtúbulos, tal y como discutiremos más adelante.

Las MAP colaboran en la generación de regiones citoplasmáticas funcionalmente distintas²⁴

Muchos tipos celulares estabilizan específicamente los microtúbulos en regiones especializadas del citoplasma. Un ejemplo especialmente bien estudiado es

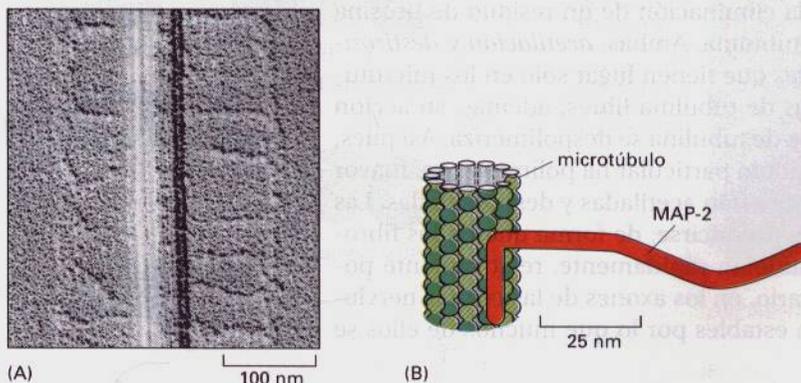


Figura 16-35 Una proteína asociada a los microtúbulos.

(A) Electronmicrografía que muestra los brazos laterales distribuidos uniformemente a lo largo de un microtúbulo, y formados por una gran proteína asociada a los microtúbulos (denominada MAP-2) aislada a partir del cerebro de los vertebrados. Porciones de la proteína se proyectan hacia el exterior del microtúbulo, como se muestra esquemáticamente en (B). (Micrografía electrónica por cortesía de William Voter y Harold Erickson.)

el de las células nerviosas, que disponen de dos tipos de apéndices –*axones* y *dendritas*. Los axones, uniformes en cuanto a su diámetro y que pueden tener varios centímetros de longitud, son los responsables de la propagación de las señales eléctricas a partir del soma celular, mientras que las dendritas, que se distribuyen radialmente a partir del soma celular y que raramente sobrepasan los 500 μm de longitud, son las responsables de recibir la información eléctrica de otras neuronas y retransmitirla al soma celular. La mayoría de células nerviosas disponen de varias dendritas pero tienen solamente un único axón (véase Figura 11-20).

Ambos, axones y dendritas, están formados por microtúbulos, aunque con disposiciones distintas. En los axones, los microtúbulos son muy largos y todos están orientados con su extremo “más” alejado del cuerpo celular. En las dendritas, los microtúbulos son más cortos y su polaridad es mixta: algunos de los extremos “más” se alejan del cuerpo celular, mientras que otros dirigen su extremo “más” hacia este cuerpo celular. Cuando se estudia la distribución de las MAP en neuronas cultivadas mediante anticuerpos específicos, se observa cómo ciertas formas de la proteína tau se encuentran solamente en los axones; por otro lado, la MAP-2 se encuentra sólo en las dendritas y en el soma celular y está totalmente ausente en los axones (Figura 16-36). Axones y dendritas se diferencian también en otros aspectos: por ejemplo, en las dendritas y en el soma celular, pero no en los axones, se encuentran las moléculas de mRNA, los ribosomas y algunos tipos de canales iónicos mientras que ciertos tipos de moléculas implicadas en la adhesión celular y los canales de sodio implicados en la generación de potenciales de acción están localizados selectivamente en los axones. De este modo tanto el citoplasma como la membrana plasmática de las células nerviosas se dividen en *compartimientos* axonales y dendríticos. Estos compartimientos en una célula individual se diferencian de los compartimientos delimitados por membrana, tales como el retículo endoplasmático o las mitocondrias, en que no están separados los unos de los otros por membranas; de hecho, la diferencia radica en la organización estructural y en los tipos de proteínas que se encuentran presentes.

La formación de los axones y de las dendritas durante la diferenciación de las células nerviosas se discute en el Capítulo 21. Aunque todavía no conocemos cómo se compartimentan el citoplasma y la membrana plasmática de una célula nerviosa, las MAP podrían ser esenciales en este proceso. Cuando se inhibe la producción de la proteína tau en neuronas cultivadas mediante tratamiento con oligonucleótidos antisentido específicos, se suprime la formación de los axones mientras que no se ve afectada la de las dendritas. Contrariamente, cuando células no neuronales son manipuladas genéticamente de manera que se expresa en ellas la proteína tau (que normalmente se expresa solamente en las células nerviosas), forman largos apéndices parecidos a los axones, que están formados por haces de microtúbulos dispuestos con sus extremos “más” partiendo hacia fuera del cuerpo celular, al igual que en las células nerviosas.

Debido a que diferentes componentes de la célula se desplazan en distintas direcciones a lo largo de los microtúbulos, se puede postular que una diferencia inicial en la polaridad de los microtúbulos está generada por la distribución diferencial de las MAP, que comportará una diferencia posterior entre axones y dendritas. Las vesículas secretoras, por ejemplo, se desplazan hacia el extremo más de los microtúbulos y son transportadas desde el axón hasta los terminales nerviosos donde desarrollan su función; contrariamente, si los ribosomas y los mRNA se desplazan hacia el extremo menos de los microtúbulos, podrían ser excluidos de los axones.

La quinesina y la dineína dirigen el movimiento de los orgánulos a lo largo de los microtúbulos²⁵

A menudo ocurre que la aparición de una nueva técnica experimental ha comportado avances muy importantes en la biología celular. Con la microscopía óptica vídeo-amplificada se ha mejorado la capacidad de observación de objetos

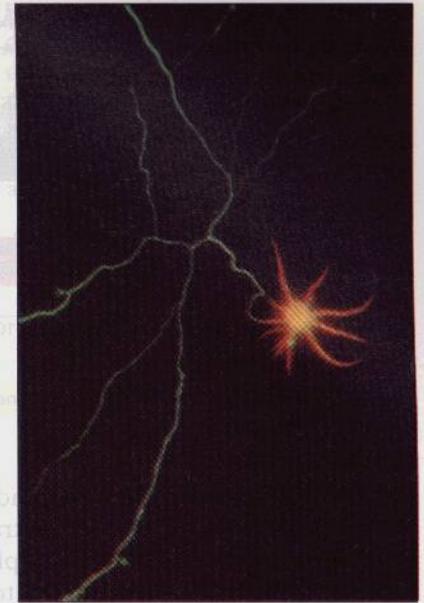


Figura 16-36 Un ejemplo de la compartimentación citoplasmática de una célula nerviosa. Esta micrografía muestra la distribución de la proteína tau (verde) y de la MAP-2 (naranja) en una neurona de hipocampo, en cultivo. Mientras que tau se encuentra confinada al axón, MAP-2 se encuentra localizada en el soma celular y en las dendritas. El anticuerpo que se ha utilizado para detectar tau se une únicamente a tau desfosforilada, que se encuentra en el axón; otros datos muestran que tau fosforilada también puede encontrarse en las dendritas. (Por cortesía de James W. Mandell y Gary A. Banker.)

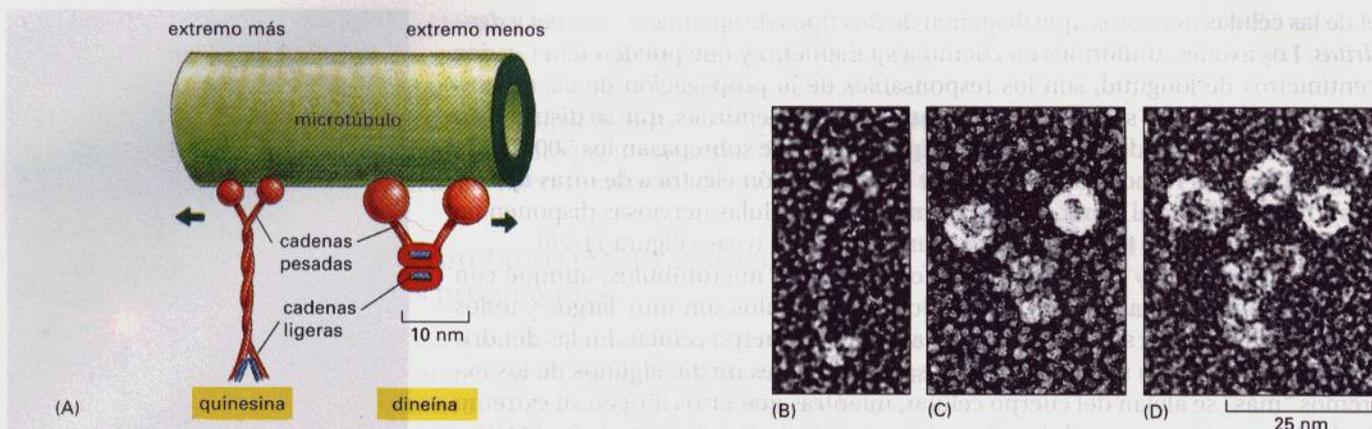


Figura 16-37 Proteínas motoras de los microtúbulos. Las quinesinas y las dineínas citoplasmáticas son proteínas motoras de los microtúbulos que generalmente se desplazan en direcciones opuestas a lo largo de un microtúbulo (A). Estas proteínas (aquí dibujadas a escala) son complejos compuestos por dos cadenas pesadas idénticas y algunas cadenas ligeras más pequeñas. Cada cadena pesada forma una cabeza globular que une la proteína a los microtúbulos de forma dependiente de ATP. (B y C) Electronmicrografías de grabado por congelación de una molécula de quinesina (B) y de una molécula de dineína citoplasmática (C). Mientras que la quinesina y la dineína citoplasmática tienen dos cabezas, la dineína ciliar (D) tiene tres. (véase Figura 16-44). (Las micrografías electrónicas de grabado por congelación fueron preparadas por John Heuser.)

débiles y diminutos, lo cual ha conducido al descubrimiento de los motores de los microtúbulos responsables del transporte de los orgánulos. Cuando fue posible visualizar los microtúbulos simples en un espécimen no fijado, los investigadores pudieron seguir el movimiento de los orgánulos y otras partículas a lo largo de los microtúbulos *in vitro*. Alternativamente, pudieron observar y medir el deslizamiento de microtúbulos individuales sobre superficies de cristal recubiertas con extractos celulares.

Estos estudios *in vitro* sirvieron para identificar y aislar dos tipos de proteínas motoras dependientes de microtúbulos –las *quinesinas* y las *dineínas citoplasmáticas*. Las **dineínas citoplasmáticas** están implicadas en el transporte de los orgánulos y en la mitosis y están muy íntimamente relacionadas con la *dineína ciliar*, proteína motora de los cilios y flagelos (se discute más adelante). Las **quinesinas** son mucho más diversas que las dineínas; algunos miembros de esta familia están implicados en el transporte de los orgánulos en la mitosis y en la meiosis y en el transporte de las vesículas sinápticas a lo largo de los axones. Tanto las dineínas citoplasmáticas como las quinesinas están formadas por dos cadenas pesadas y algunas cadenas ligeras. Cada cadena pesada contiene una cabeza globular muy conservada de unión al ATP y una cola formada por dominios a modo de varillas. Las dos cabezas globulares son motores ATPasa que se unen a los microtúbulos, mientras que las colas generalmente se unen a componentes celulares específicos, determinando así la carga que cada proteína transporta (Figura 16-37).

La velocidad y la dirección de desplazamiento a lo largo de los microtúbulos son específicos del dominio globular de las proteínas motoras²⁶

La mayoría de proteínas motoras conocidas se mueven únicamente en una dirección a lo largo de los microtúbulos –hacia su extremo más o hacia su extremo menos. Esta direccionalidad se puede analizar *in vitro* si se permite que bolas de poliestireno recubiertas con proteínas motoras se desplacen a lo largo de microtúbulos polimerizados en centrosomas. Los microtúbulos así dispuestos tienen su extremo más dirigido hacia al exterior y es fácil determinar la dirección del movimiento con un microscopio óptico. Mientras que las bolas de poliestireno que han sido recubiertas con extractos crudos de citoplasma se mueven en ambas direcciones, las que han sido recubiertas con quinesina aislada de axones se mueven únicamente hacia el extremo más de los microtúbulos. Al contrario, bolitas recubiertas con dineínas citoplasmáticas se mueven hacia los extremos menos de los microtúbulos, embebidos en el centrosoma.

Estudios con axones nerviosos intactos han confirmado los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro*: la quinesina conduce, principalmente, el movimiento de los orgánulos hacia el exterior del soma celular, mientras que la dineína citoplasmática conduce el movimiento de los orgánulos desde los extre-

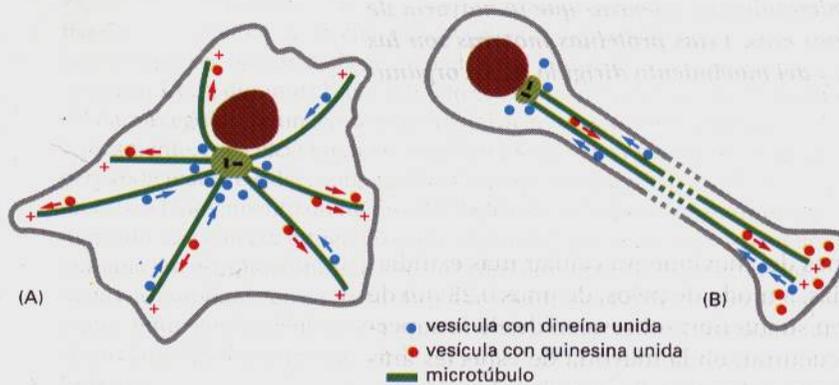


Figura 16-38 Transporte vesicular en dos direcciones. La quinesina y la dineína citoplasmática transportan su carga en direcciones opuestas a lo largo de los microtúbulos, tal y como se muestra en un fibroblasto (A) y en el axón de una neurona (B).

mos del terminal nervioso hacia el soma celular (Figura 16-38). La dineína citoplasmática se sintetiza, igual que el resto de proteínas, en el soma celular nervioso, y entonces debe ser transportada en un estado no funcional hacia el terminal nervioso antes de que empiece su función transportando orgánulos de regreso al cuerpo celular.

Sorprendentemente no todas las quinesinas desplazan los orgánulos hacia el extremo más de los microtúbulos. Por ejemplo en *Drosophila*, una quinesina llamada *Ncd*, que es necesaria para la meiosis normal, se diferencia de la quinesina axonal tanto en la dirección como en la velocidad a la que se desplaza a lo largo de los microtúbulos: mientras que la quinesina axonal se dirige hacia el extremo más a una velocidad aproximada de 2 $\mu\text{m}/\text{segundo}$, la proteína *Ncd* lo hace hacia el extremo *menos* a 0,1 $\mu\text{m}/\text{segundo}$, aproximadamente.

Se desconoce el mecanismo mediante el cual estas proteínas convierten la energía de la hidrólisis del ATP en movimiento vectorial. Serán necesarios estudios estructurales más detallados para determinar cómo las cabezas globulares tan íntimamente relacionadas de estas proteínas pueden desplazarse en direcciones opuestas a lo largo de los microtúbulos y quizás esto aporte algún conocimiento sobre el proceso de transducción de energía.

Resumen

Los microtúbulos son polímeros rígidos de moléculas de tubulina. El ensamblaje se produce mediante la adición al extremo libre de los microtúbulos de moléculas de tubulina que contienen GTP y que disponen de un extremo (el extremo "más") que crece más rápidamente que el otro extremo (el "menos"). Después del ensamblaje se produce la hidrólisis del GTP y debilita los enlaces que mantienen unidos a los microtúbulos. Los microtúbulos de crecimiento lento son muy inestables y están sujetos a un desensamblaje catastrófico; pueden estabilizarse dentro de la célula si se asocian con otras estructuras que recubren sus dos extremos. Los centros organizadores de microtúbulos, tales como los centrosomas, protegen los extremos menos y continuamente nuclean nuevos microtúbulos, que crecen en todas direcciones. Si un microtúbulo encuentra una estructura que estabiliza su extremo "más" libre, será selectivamente retenido, mientras que otro microtúbulo se despolimerizará. Se cree que este proceso selectivo determina la posición de los haces de microtúbulos dentro de la célula.

Las subunidades de tubulina de los microtúbulos que han sido selectivamente estabilizadas se modifican mediante acetilación y destirosinación. Se cree que estas alteraciones marcan a los microtúbulos como "maduros" y proporcionan lugares de unión para las proteínas específicas de unión a los microtúbulos (MAP), lo cual también estabiliza al microtúbulo frente al desensamblaje. Las proteínas motoras microtubulares constituyen una clase importante de MAP que utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para desplazarse unidireccionalmente a lo largo de los microtúbulos, llevando una carga específica. En general, las dineínas desplazan su

carga hacia los extremos menos de los microtúbulos, mientras que la mayoría de las quinesinas lo hacen hacia los extremos más. Estas proteínas motoras son las responsables de la organización espacial y del movimiento dirigido de los orgánulos del citoplasma.



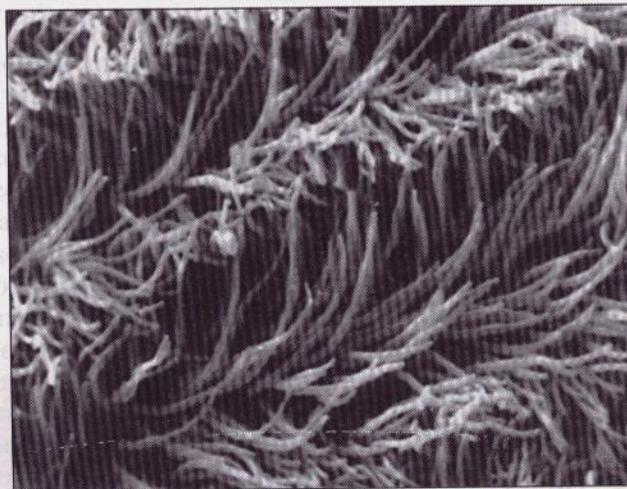
Cilios y centríolos²⁷

El batido de los cilios es una de las formas del movimiento celular más estudiadas. Los **cilios** son evaginaciones delgadas, a modo de pelos, de unos 0,25 μm de diámetro, con un haz de microtúbulos en su interior; sobresalen desde la superficie de muchos tipos celulares y se encuentran en la mayoría de especies animales, muchos protozoos, y algunas plantas inferiores. Su principal función estriba en desplazar fluidos sobre la superficie de la célula o en propulsar a una célula aislada a través de un líquido. Los protozoos, por ejemplo, utilizan los cilios tanto para capturar partículas alimenticias como para la locomoción. En las células epiteliales del tracto respiratorio humano, grandes cantidades de cilios ($10^9/\text{cm}^2$ o más) trasladan hacia la boca capas de mucus que contienen partículas atrapadas de polvo o células muertas. En la boca son engullidas y eliminadas. Los cilios participan en el proceso de trasladar los oocitos a lo largo del oviducto. Una estructura relacionada, el flagelo, propulsa el espermatozoide humano.

Los cilios se mueven por el batido de un axonema –un complejo haz de microtúbulos²⁷

Los campos de cilios se inclinan siguiendo ondas coordinadas, unidireccionales (Figura 16-39). El movimiento de cada cilio es semejante al de un látigo: un golpe activo hacia adelante, durante el cual el cilio está totalmente extendido y es capaz de ejercer una fuerza máxima sobre el líquido circundante, seguido de una fase de recuperación, durante la cual el cilio recupera su posición original gracias a un movimiento de desenrollamiento que minimiza la resistencia viscosa (Figura 16-40A). Los ciclos de los cilios adyacentes son casi sincrónicos, aunque no los son totalmente. Este sincronismo da lugar a unos patrones parecidos a olas, que se pueden observar al microscopio óptico.

El único **flagelo** de los espermatozoides y de muchos protozoos es muy parecido a los cilios en cuanto a su ultraestructura interna, pero normalmente los flagelos son mucho más largos que los cilios. Los flagelos no presentan un movimiento parecido al de un látigo, sino que generalmente propagan ondas casi sinusoidales (Figura 16-40B). Sin embargo, la base molecular de su movimiento es

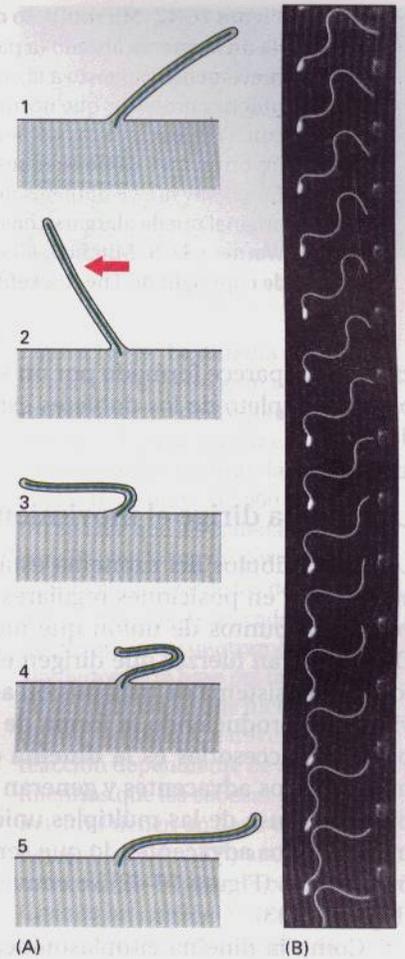


2 μm

Figura 16-39 Cilios.

Electronmicrografía de barrido de un área ciliar del intestino de un gusano marino. (De J.S. Mellor y J.S. Hyams, *Micron* 9:91-94, 1978. © 1978, con autorización de Pergamon Press Ltd.)

Figura 16-40 Contraste entre los movimientos de batido de un cilio y de un flagelo. (A) El batido de un cilio de una célula epitelial del tracto respiratorio humano parece una brazada de un nadador. El golpe de una *brazada* (estadios 1 y 2), durante el cual el fluido es empujado sobre la superficie de la célula, va seguido de un lento *movimiento de recuperación* (estadios 3, 4 y 5). Típicamente, cada ciclo tarda entre 0,1 y 0,2 segundos y genera una fuerza perpendicular al eje del axonema. Para efectos comparativos en (B) se muestra el movimiento ondulante del flagelo de un espermatozoide de un tunicado. La célula se fotografió sobre una película en movimiento con una iluminación estroboscópica de 400 destellos por segundo. Nótese que las ondas de amplitud constante se desplazan desde la base del flagelo hasta su punta. Entonces, la célula es empujada directamente desde su axonema, un efecto muy diferente del que produce un cilio. (B, por cortesía de C.J. Brokaw.)



la misma que la de los cilios. Los flagelos de las bacterias, sin embargo, (descritos en el Capítulo 15) son completamente diferentes a los cilios y a los flagelos de las células eucariotas.

El movimiento de un cilio o de un flagelo está producido por la flexión de su eje, llamado **axonema**. El axonema está formado totalmente por microtúbulos y por sus proteínas asociadas. Los microtúbulos están modificados y se hallan dispuestos siguiendo un patrón cuyo aspecto curioso y característico fue una de las más notables revelaciones de los inicios de la microscopía electrónica: nueve dobletes de microtúbulos especiales están dispuestos en círculo alrededor de un par de microtúbulos sencillos (Figura 16-41). Esta disposición de "9 + 2" es característica de casi todas las formas de cilios y de flagelos eucariotas, desde los protozoos hasta los que existen en los humanos. Los microtúbulos se extienden ininterrumpidamente en toda la longitud del axonema, que suele ser de 10 μm , aunque en algunas células puede alcanzar los 200 μm .

Cada miembro del par de microtúbulos sencillos (el *par central*) es un microtúbulo completo pero cada uno de los dobletes exteriores está compuesto por un microtúbulo completo y un microtúbulo parcial fusionados, de tal forma que ambos comparten una pared común. En secciones transversales, cada mi-

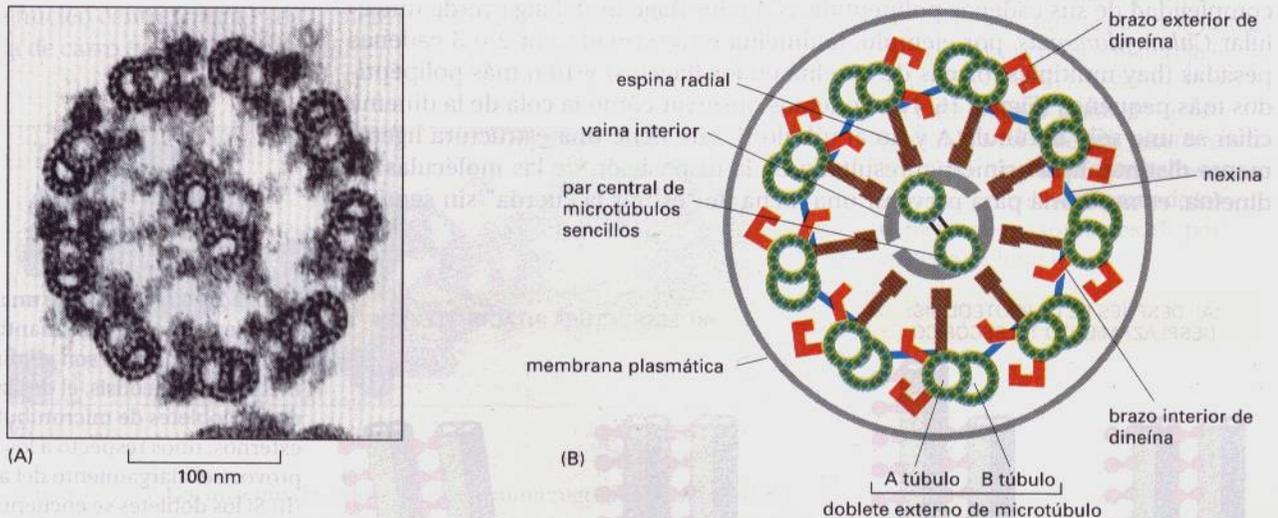


Figura 16-41 La disposición de los microtúbulos en un cilio o en un flagelo. (A) Electronmicrografía que muestra una sección transversal del flagelo de un alga verde (*Chlamydomonas*) en la que se puede observar la disposición característica de "9 + 2" de los microtúbulos. (B) Diagrama de las partes. Las diversas proyecciones de los microtúbulos los mantienen unidos y se producen a intervalos regulares a lo largo del axonema. (A, por cortesía de Lewis Tilney.)

Figura 16-42 Microtúbulo deslizando en un axonema. Electronmicrografía de un axonema aislado (a partir de un cilio de *Tetrahymena*) que ha sido brevemente expuesto a la enzima proteolítica tripsina para romper las uniones proteicas que normalmente lo mantienen unido. Tras el tratamiento con ATP, los distintos dobletes de microtúbulos se deslizan unos respecto a los otros, tal y como se muestra esquemáticamente en la Figura 16-43A. Como hay nueve dobletes de microtúbulos en el axonema, la estructura original puede alargarse hasta nueve veces su longitud inicial. (De F.D. Warner y D. R. Mitchell, *J. Cell Biol.* 89:35-44, 1981. Reproducido con permiso de copyright de The Rockefeller University Press.)



cro-túbulo aparece formado por un anillo de 13 subunidades, mientras que el túbulo incompleto de los dobletes exteriores está formado sólo por 11 subunidades.

La dineína dirige el movimiento de los cilios y de los flagelos²⁸

Los microtúbulos del axonema están asociados a numerosas proteínas, que se encuentran en posiciones regulares a lo largo de los microtúbulos. Algunas sirven como puntos de unión que mantienen juntos los haces de microtúbulos. Otras generan fuerzas que dirigen el movimiento de flexión, mientras que otras forman un sistema de transmisión activado mecánicamente que controla el movimiento, produciendo la forma de onda deseada. La más importante de estas proteínas accesorias es la **dineína ciliar**, cuyas cabezas interaccionan con los microtúbulos adyacentes y generan una fuerza de deslizamiento entre microtúbulos. A causa de las múltiples uniones que mantienen unidos los dobletes de microtúbulos adyacentes, lo que sería un movimiento deslizante entre microtúbulos libres (Figura 16-42) se convierte en un movimiento de flexión en el cilio (Figura 16-43).

Como la dineína citoplasmática, la dineína ciliar tiene un dominio motor que hidroliza ATP para desplazarse a lo largo del microtúbulo hacia su extremo menos, y una cola que transporta la carga, la cual en este caso es un microtúbulo adyacente. La dineína ciliar es considerablemente más larga que la dineína citoplasmática, tanto en la medida de sus cabezas pesadas como en el número y complejidad de sus cadenas polipeptídicas. En los flagelos del alga verde unicelular *Chlamydomonas*, por ejemplo, la dineína está formada por 2 o 3 cadenas pesadas (hay múltiples formas de dineína en los flagelos) y 10 o más polipéptidos más pequeños (Figura 16-44). Podemos observar cómo la cola de la dineína ciliar se une sólo al túbulo A y no al túbulo B, que tiene una estructura ligeramente distinta. Esta asimetría, resultado de la disposición de las moléculas de dineína, es necesaria para prevenir una lucha de "estirar la cuerda" sin sentido

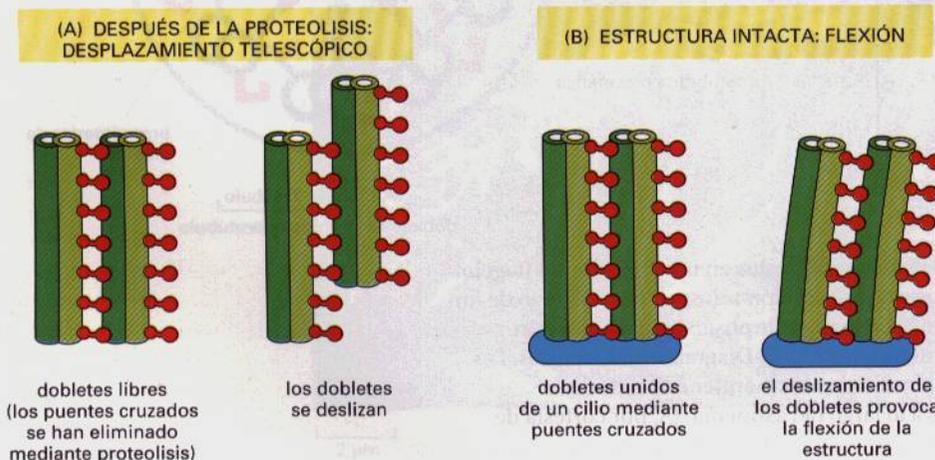


Figura 16-43 Flexión de un axonema.

(A) Si las proteínas que mantienen unidos los dobletes son eliminadas mediante proteólisis, el deslizamiento de los dobletes de microtúbulos externos, unos respecto a los otros, provoca el alargamiento del axonema. (B) Si los dobletes se encuentran unidos entre sí, el axonema se flexiona.

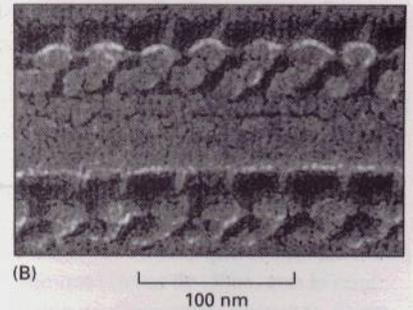
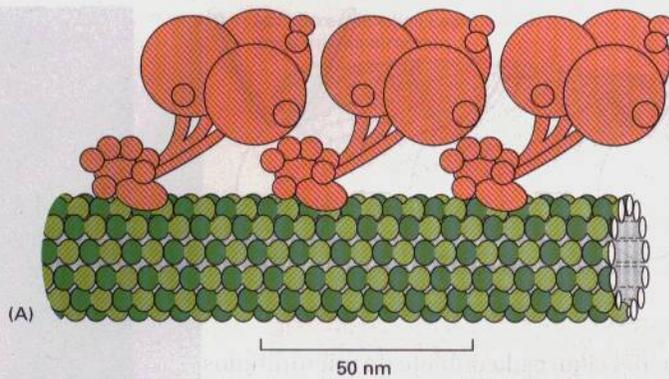


Figura 16-44 La dineína cililar. La dineína cililar es un gran complejo proteico (cerca de 2 millones de daltons) compuesto por entre 9 y 12 cadenas polipeptídicas, la mayor de las cuales tiene unos 512 000 daltons.

(A) Se cree que las cadenas pesadas constituyen la mayor parte de la cabeza globular y de los dominios del tallo, y muchas de las cadenas más pequeñas se encuentran agrupadas alrededor de la base del tallo. La base de la molécula se une fuertemente a un microtúbulo A, a través de una reacción dependiente de ATP, mientras que las cabezas globulares mayores tienen un lugar de unión dependiente de ATP para un microtúbulo B (véase Figura 16-41). Cuando las cabezas hidrolizan el ATP que tienen unido, se desplazan hacia el extremo menos de este segundo microtúbulo, produciendo así una fuerza de deslizamiento entre los dobletes de microtúbulos adyacentes de un cilio o de un flagelo (véase Figura 16-43). Aquí se ilustra la forma de tres cabezas de la dineína cililar, formada por tres cadenas pesadas. (B) Electronmicrografía de un cilio sometido a criofractura, mostrando los brazos de dineína proyectándose a intervalos regulares a partir de los dobletes de microtúbulos. (B, por cortesía de John Heuser.)

entre microtúbulos vecinos, lo cual posiblemente explicaría por qué cada uno de los nueve microtúbulos externos es un doblete A-B.

Cilios y flagelos crecen a partir de corpúsculos basales que están muy íntimamente relacionados con los centríolos²⁹

Si los dos flagelos del alga verde *Chlamydomonas* se separan de la célula, vuelven a formarse rápidamente por elongación a partir de unas estructuras llamadas *corpúsculos basales*. Los corpúsculos basales poseen la misma estructura que los centríolos que encontramos inmersos en el centro de los centrosomas animales. De hecho, en algunos organismos, corpúsculos basales y centríolos parecen tener funciones intercambiables: durante cada una de las mitosis en *Chlamydomonas*, por ejemplo, los flagelos son reabsorbidos y los corpúsculos basales se mueven hacia el interior de la célula y se convierten en los generadores de los polos del huso mitótico.

Centríolos y corpúsculos basales son estructuras cilíndricas de aproximadamente 0,2 μm de ancho y 0,4 μm de longitud. La pared del centríolo está formada por nueve grupos de tres microtúbulos, distribuidos en tripletes. Cada triplete está inclinado hacia el eje central, como las aletas de una turbina (Figura 16-45). Los tripletes adyacentes están unidos a intervalos a lo largo de su longitud. En electronmicrografías se pueden observar finos radios proteicos irradiando desde un núcleo central hasta cada triplete y dando lugar a un patrón semejante a una rueda de carro (véase Figura 16-45A).

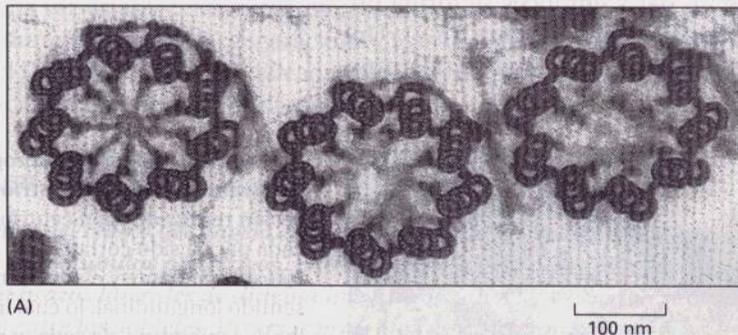
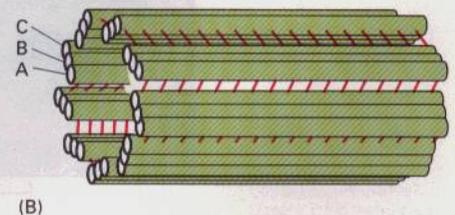
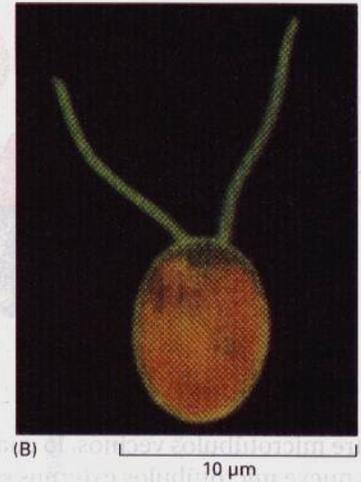
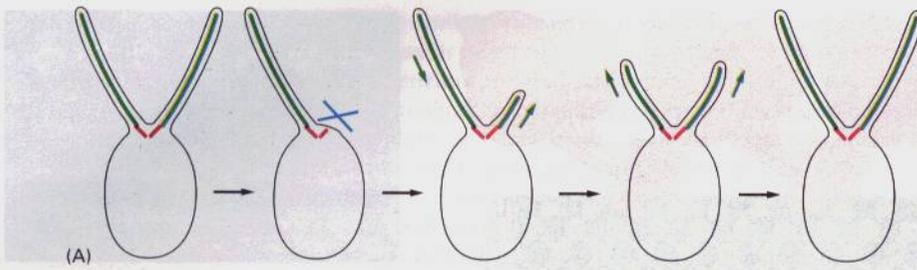


Figura 16-45 Corpúsculos basales. (A) Electronmicrografía de una sección transversal a través de tres centríolos del córtex de un protozoo. (B) Diagrama de un corpúsculo basal visto lateralmente. Cada corpúsculo basal constituye la porción inferior de un axonema cililar, y está formado por nueve tripletes de microtúbulos, cada uno de los cuales tiene un microtúbulo completo (el túbulo A) fusionado con dos microtúbulos incompletos (los túbulos B y C). Otras proteínas [marcada en rojo en (B)] forman puentes que mantienen unida la disposición cilíndrica de microtúbulos. La estructura del centríolo es esencialmente la misma. (A, por cortesía de D.T. Woodrow y R.W. Linck.)





Durante la formación o regeneración del cilio, cada doblete de microtúbulos del axonema crece a partir de dos de los microtúbulos del triplete del corpúsculo basal, de manera que se preserva la simetría nonagonal de los microtúbulos del axonema ciliar. Los estudios autorradiográficos sugieren que la incorporación de tubulina y de otras proteínas del axonema tiene lugar en la punta distal de la estructura, en el extremo más de los microtúbulos. Se desconoce cómo se forma el par central de microtúbulos aislados del axonema, ya que en el centríolo y en los corpúsculos basales no existe ningún par central.

Se desconoce cómo se determina la longitud de los cilios y de los flagelos. La longitud es constante para unas células determinadas, y no está limitada por la disponibilidad de componentes o por la cinética del alargamiento. Si separamos uno de los dos flagelos de *Chlamydomonas*, por ejemplo, el flagelo restante empieza a reabsorberse mientras que, simultáneamente, el flagelo perdido se regenera. Una vez el flagelo que se reabsorbe alcanza la misma longitud que el flagelo que se regenera, los dos crecen juntos hasta conseguir la longitud final característica. Este experimento sugiere que la longitud flagelar está constantemente controlada de la misma forma (Figura 16-46).

Figura 16-46 La longitud del flagelo está controlada mediante un proceso activo.

(A) Cuando se separa físicamente uno de los flagelos (*aspa azul*), empieza a crecer mediante polimerización a partir del corpúsculo basal (*rojo*). Al mismo tiempo, el flagelo restante empieza a reabsorberse. Cuando ambos miden la mitad de su longitud original, empiezan a crecer juntos. El crecimiento se detiene cuando ambos flagelos han conseguido la longitud final, cuidadosamente especificada.

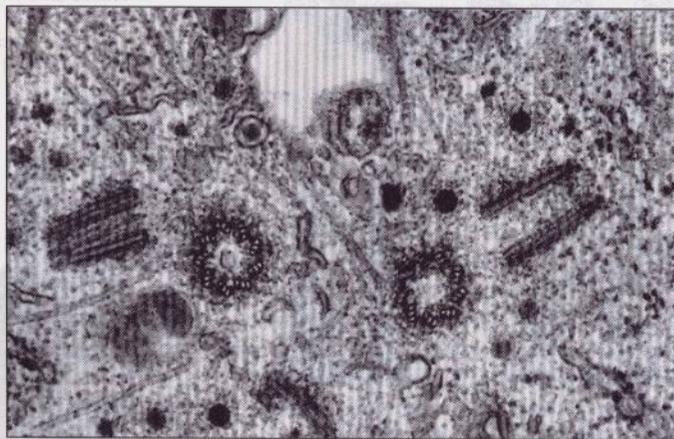
(B) Fotografía en color del alga *Chlamydomonas*, donde el color anaranjado es el resultado de la autofluorescencia de la clorofila y el verde proviene de la unión de un anticuerpo fluorescente contra una proteína de la membrana plasmática. (B, por cortesía de Robert A. Bloodgood.)

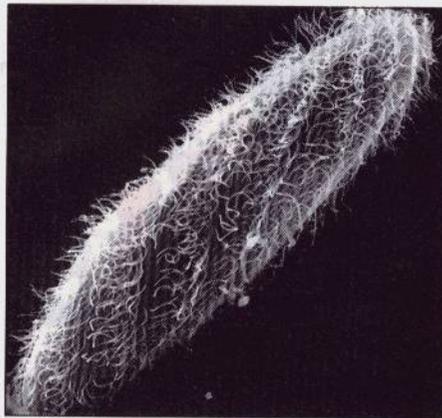
Los centríolos suelen aparecer por duplicación de los centríolos preexistentes³⁰

El incremento continuo de la masa celular a lo largo de todo el ciclo celular animal presenta dos acontecimientos discretos de duplicación: la replicación del DNA y la duplicación del centrosoma, que normalmente tiene un par de centríolos en su interior. Los dos centríolos del par están dispuestos perpendicularmente uno respecto al otro (Figura 16-47). En los fibroblastos en cultivo la duplicación del centríolo empieza casi al mismo tiempo que empieza la síntesis de DNA: primero se separan los dos miembros de un par y entonces se forma un centríolo hijo perpendicular a cada centríolo original (véase Figura 18-4). Un centríolo inmaduro muestra una disposición en simetría nonagonal de microtú-

Figura 16-47 Electronmicrografía mostrando un par de centríolos recién replicados.

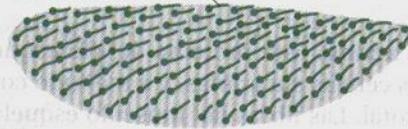
Un centríolo de cada par ha sido cortado transversalmente y el otro cortado en sentido longitudinal, lo cual indica que los dos miembros de cada par están colocados formando un ángulo recto. (De M. McGill, D.P. Highfield, T.M. Monahan, and B.R. Brinkley, *J. Ultrastruct. Res.* 57:43-53, 1976.)





(A)

las hileras de cilios baten todas en la misma dirección



PARAMECIUM NORMAL

las hileras de cilios invertidas baten en direcciones opuestas



PARAMECIUM ALTERADO

(B)

Figura 16-48 Herencia cortical del patrón en un protozoo ciliado.

(A) Electronmicrografía de barrido de un *Paramecium*, que nada mediante el batido sincrónico de sus cilios.

(B) Dibujo esquemático de las hileras de cilios de la superficie de un *Paramecium* normal y de un *Paramecium* en el que se han invertido algunas hileras de cilios, con lo cual baten en direcciones opuestas. Estos patrones alterados se propagan indefinidamente mientras el *Paramecium* se divide, aunque la información a nivel de DNA no haya cambiado. (A, por cortesía de Sidney Tamm.)

bulos sencillos; probablemente cada microtúbulo actúa como plantilla para el ensamblaje de los tripletes de microtúbulos típicos de los centriolos maduros.

Los dos centriolos que forman un par no son idénticos: el centriolo hijo no solamente tiene una orientación distinta sino que también se diferencia en detalles concretos de su morfología y de su función. En muchos tipos celulares de los vertebrados, por ejemplo, uno de los dos centriolos se distingue por su capacidad para nuclear el llamado *cilio primario*—cilio aislado inmóvil cuya función es desconocida.

Estas diferencias padres/hijos también se presentan en los corpúsculos basales, lo cual puede conducir a las asimetrías del citoesqueleto. En los protozoos ciliados, la replicación de los corpúsculos basales está coordinada con la división celular y se cree que la estereoespecificidad del proceso de duplicación puede ser importante para mantener la orientación del cilio en la superficie celular. Esto fue claramente demostrado en un experimento clásico llevado a cabo durante los años 1960 en *Paramecium*, protozoo cuya superficie esta cubierta por hileras de cilios móviles. Normalmente, todas las hileras están alineadas con la misma polaridad a través de la replicación coordinada de los corpúsculos basales, los cuales producen corpúsculos basales hijos con la misma orientación relativa respecto a la superficie celular. Los haces de cilios que crecen a partir de los corpúsculos basales proporcionan a la célula la capacidad para nadar con una gran eficiencia. Mediante experimentos de microinyección, es posible alterar este patrón y producir hileras de cilios invertidos que baten en direcciones opuestas a las de sus vecinos (Figura 16-48). Una vez establecidas, estas alteraciones pasan de padres a hijos en el *Paramecium* durante más de 100 generaciones. Este tipo de herencia no tiene nada que ver con el DNA: las células modificadas heredan un patrón particular de hileras de cilios gracias a la replicación estereoespecífica de sus corpúsculos basales.

Resumen

El axonema del cilio y del flagelo eucariota contiene un haz cilíndrico de nueve dobletes de microtúbulos periféricos. Entre los dobletes de microtúbulos adyacentes se extienden brazos laterales de dineína que hidrolizan ATP y generan fuerza de deslizamiento entre los dobletes. Diversas proteínas accesorias mantienen unido el anillo de dobletes de microtúbulos y convierten la fuerza de deslizamiento en un movimiento inclinado que genera el batido de los cilios. La compleja estructura del axonema ciliar se forma por un autoensamblaje de sus componentes proteicos y está nucleada por un centriolo (corpúsculo basal), que sirve de plantilla para el patrón característico de 9 + 2 microtúbulos que forman el núcleo del axonema. Los centriolos se duplican mediante un proceso altamente controlado en el cual el centriolo hijo se nuclea a partir de un centriolo padre que se encuentra a su lado y crece perpendicularmente a él. La replicación orientada de los corpúsculos basales comporta un patrón heredable de batido de los cilios en la superficie de protozoos ciliados.

Filamentos de actina³¹

Todas las especies eucariotas contienen **actina**. Esta proteína del citoesqueleto es la proteína más abundante en muchas células eucariotas, y a menudo constituye el 5% o más de la proteína celular total. Las fibras del músculo esquelético de los vertebrados son la fuente más común de actina para los experimentos que se realizan *in vitro*, puesto que la actina constituye el 20% de su masa. Si se trata polvo seco de músculo con una solución salina muy diluida, los *filamentos de actina* se disocian en sus subunidades de actina. Cada molécula de actina es un único polipéptido de 375 aminoácidos de longitud y está asociada muy íntimamente con una molécula de ATP.

En las células los filamentos de actina pueden formar estructuras estables y estructuras lábiles. Los filamentos estables de actina forman el eje de los microvilli y son un componente crucial del aparato contráctil de las células musculares. Sin embargo, muchos de los movimientos celulares dependen de estructuras lábiles formadas por filamentos de actina. Dedicaremos esta sección a ver cómo la célula controla el ensamblaje de los filamentos dinámicos de actina a partir de subunidades de actina solubles en el citosol.

Los filamentos de actina son delgados y flexibles³²

En las electronmicrografías los **filamentos de actina** aparecen como hebras de 8 nm de diámetro. Están formados por una apretada hélice de monómeros de actina orientados uniformemente (también conocida como actina globular, o *actina G*) (Figura 16-49). Al igual que los microtúbulos, un filamento de actina es una estructura polar, con dos extremos estructuralmente distintos –un extremo “menos”, relativamente inerte y de crecimiento lento y un extremo “más”, de crecimiento rápido. A causa de la apariencia de flecha del complejo formado entre los filamentos de actina y la proteína motora miosina, que describiremos más adelante, el extremo menos se conoce también como el extremo en punta y el extremo más como extremo ancho o barbado. La estructura tridimensional de la molécula de actina ha sido analizada mediante análisis de difracción de rayos X, y esta información ha sido utilizada para deducir la estructura de un filamento de actina a nivel de sus aminoácidos individuales (Figura 16-50).

Algunos eucariotas inferiores, como las levaduras, tienen un único gen para la actina, que codifica una única proteína. Sin embargo, todos los eucariotas superiores tienen algunas isoformas codificadas por una familia de genes de actina. Al menos hay seis tipos distintos de actina en los tejidos de los mamíferos; se agrupan en tres clases, dependiendo de su punto isoeléctrico. Las alfa actinas se encuentran en diversos tipos de músculo, mientras que las beta y las gamma son los constituyentes principales de las células no musculares. Aunque las distintas formas de actina presentan sutiles diferencias en sus propiedades, las secuencias de aminoácidos han sido altamente conservadas durante la evolución, y todas se ensamblan en filamentos que son esencialmente idénticos en la mayoría de estudios llevados a cabo *in vitro*.

La longitud total de todos los filamentos de actina de una célula es al menos 30 veces mayor que la longitud total de los microtúbulos, lo cual refleja una diferencia fundamental en la manera como estos polímeros del citoesqueleto están organizados y funcionan en la célula. Los filamentos de actina son más delgados y más flexibles, y normalmente más cortos, que los microtúbulos. Veremos que raramente los filamentos de actina se encuentran aislados en la célula, sino que generalmente forman agregados y haces, con puentes entrecruzados, que son mucho más fuertes que los filamentos individuales.

La actina y la tubulina polimerizan por mecanismos parecidos³³

La polimerización de la actina pura *in vitro* necesita ATP y también cationes monovalentes y divalentes, que normalmente son el K^+ y el Mg^{2+} . La reacción puede

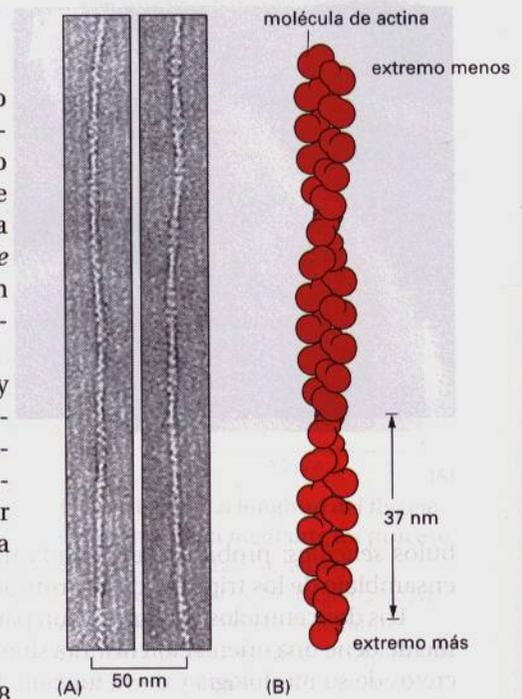


Figura 16-49 Filamentos de actina.

(A) Electronmicrografía de filamentos de actina contrastados negativamente.

(B) Disposición helicoidal de las moléculas de actina en un filamento.

(A, por cortesía de Roger Craig.)

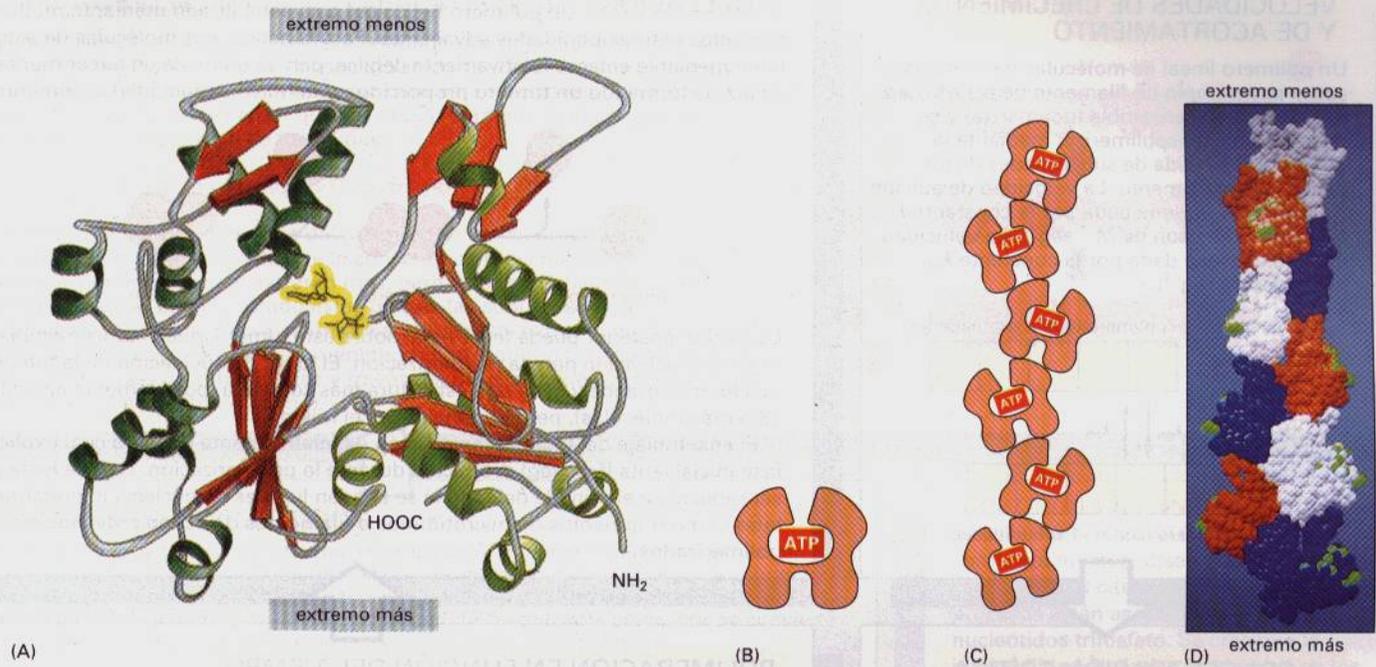


Figura 16-50 Estructura de la actina.

(A) Estructura tridimensional de la molécula de actina, deducida mediante análisis de difracción de rayos X. Una molécula aislada de ATP (*amarillo*) está estrechamente unida en una fisura entre los dos dominios de la proteína. (B) Dibujo esquemático de una molécula de actina que pone de manifiesto sus dos dominios y el lugar de unión al ATP que se encuentra entre ellos. (C) Dibujo esquemático del filamento de actina que muestra cómo las moléculas de actina interactúan unas con otras formando el polímero helicoidal. Adviértase que de la misma manera que las moléculas de actina se ensamblan en el polímero, hidrolizan sus moléculas de ATP estrechamente unidas (véase Figura 16-51). (D) Estructura de la molécula de actina basada en la imagen de un filamento obtenida mediante microscopia electrónica. Cada bola del modelo representa a un aminoácido; los que interactúan con la miosina (se discute más adelante) se han marcado en *verde*. La diferencia entre los extremos más y menos es aparente. (A, adaptado de W. Kabsch et al., *Nature* 347:37-44, 1990. © 1990 Macmillan Magazines Ltd.; B, de K.C. Holmes et al., *Nature* 347:44-49, 1990. © Macmillan Magazines Ltd.)

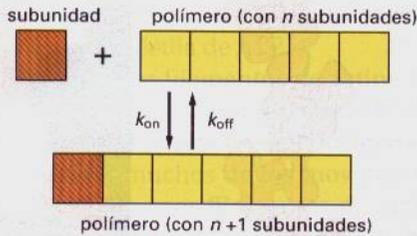
estudiarse mediante la observación del cambio de luz emitida desde una sonda fluorescente que ha sido covalentemente unida a la actina o mediante el seguimiento del gran incremento de viscosidad provocado por la polimerización. Cuando se añade K^+ y Mg^{2+} a la actina monomérica en presencia de ATP, se produce una fase lenta (lag), mientras se nuclean los nuevos filamentos, y luego una fase de polimerización rápida, mientras los cortos filamentos se alargan. La fase lag que encontramos en la polimerización de la actina pura es debida a la misma barrera cinética para la nucleación que discutimos para la polimerización de la tubulina (véase Figura 16-23). Para la actina, la velocidad de 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 pura es un trímero de moléculas de actina. Al contrario, la velocidad con la cual un filamento se alarga es proporcional, igual que para los microtúbulos, a la concentración de la subunidad libre indicando que el filamento se alarga mediante adición de moléculas de actina, de una en una.

La velocidad de polimerización es distinta en los dos extremos del filamento de actina, y esta diferencia es mucho mayor que en los microtúbulos: el extremo "más" o "barbado", la actina polimeriza unas 10 veces más rápidamente que el extremo "menos" o "puntiagudo". La *concentración crítica* para la polimerización de la actina—esto es, la concentración del monómero de actina libre en la cual la proporción de actina polimerizada detiene su incremento— está alrededor de 0,2 micromolar (alrededor de 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Esta concentración es mucho más baja que la concentración de actina no polimerizada de la célula, por lo que la célula ha desarrollado mecanismos especiales para impedir que la mayoría de esta actina monomérica se ensamble formando filamentos, tal y como discutiremos más adelante.

Rápidamente después de la polimerización, el fosfato terminal del ATP unido a la molécula de actina es hidrolizado, quedando un ADP atrapado en el polímero. La hidrólisis del ATP durante la polimerización de la actina es análoga a la hidrólisis del GTP que acompaña el ensamblaje de los microtúbulos, pero en el caso de la actina podemos comprender los cambios conformacionales implicados puesto que conocemos la estructura tridimensional de la proteína. La molécula de actina tiene forma de almeja y el ATP se halla situado en la charnela situada entre las dos mitades; como la concha de una almeja, puede abrirse y cerrarse. Cuando la actina polimeriza, la concha está totalmente cerrada por in-

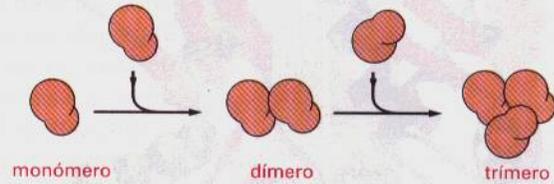
VELOCIDADES DE CRECIMIENTO Y DE ACORTAMIENTO

Un polímero lineal de moléculas de proteína, como por ejemplo un filamento de actina o un microtúbulo, se ensambla (polimeriza) y se desensambla (despolimeriza) mediante la adición y la pérdida de subunidades de los extremos del filamento. La velocidad de adición de monómeros viene dada por la constante k_{on} , cuyas unidades son de $M^{-1} \text{seg}^{-1}$. La velocidad de pérdida viene dada por la constante k_{off} (unidades de seg^{-1}).



NUCLEACIÓN

Un polímero helicoidal está estabilizado mediante múltiples contactos entre subunidades adyacentes. Para la actina, dos moléculas de actina se unen mediante enlaces relativamente débiles, pero la unión de un tercer monómero de actina formando un trímero proporciona una mayor estabilidad al conjunto.



La adición posterior puede tener lugar sobre este trímero, que entonces actúa como **lugar de nucleación** para la polimerización. El lugar de nucleación de la tubulina es mucho más grande y tiene una estructura más compleja (posiblemente un anillo de 13 o más moléculas), pero el principio es el mismo.

El ensamblaje del lugar de nucleación es relativamente lento, lo cual explica la fase inicial lenta (fase lag) producida durante la polimerización. La fase lenta puede ser reducida o eliminada del todo si se añaden lugares de nucleación prefabricados, tales como fragmentos de microtúbulos o filamentos de actina previamente polimerizados.

LA CONCENTRACIÓN CRÍTICA

El número de subunidades que se adicionan por segundo al polímero (filamento de actina o microtúbulo) será proporcional a la concentración de las subunidades libres ($k_{on}[C]$), pero las subunidades abandonarán el extremo del polímero a una velocidad constante (k_{off}) que no depende de $[C]$. A medida que el polímero va creciendo, las subunidades se van incorporando de forma que $[C]$ cae hasta alcanzar un valor constante, llamado **concentración crítica** (C_c). A esta concentración la velocidad de adición de subunidades se iguala a la velocidad a la que el polímero pierde subunidades.

En este punto de equilibrio,

$$k_{on} [C] = k_{off}$$

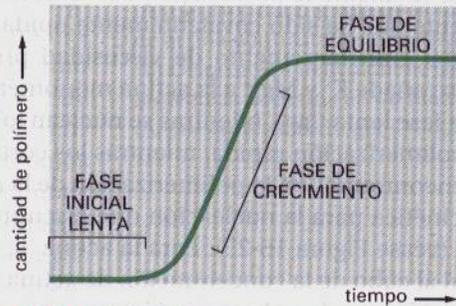
de forma que

$$C_c = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{1}{K}$$

(donde K es la constante de equilibrio para la adición de subunidades, véase Figura 3-9).

POLIMERIZACIÓN EN FUNCIÓN DEL TIEMPO

El ensamblaje de una proteína en un largo polímero helicoidal, (p. ej., un filamento del citoesqueleto o un flagelo bacteriano) muestran esta curva dependiente del tiempo:



La **fase inicial lenta (fase lag)** es debida a la barrera cinética para la nucleación. La **fase de crecimiento** se produce mientras los monómeros se añaden a los extremos expuestos del polímero en crecimiento. La **fase de equilibrio** se consigue cuando el crecimiento del polímero debido a la adición de monómeros está precisamente en equilibrio con el acortamiento del polímero debido a la pérdida de monómeros.

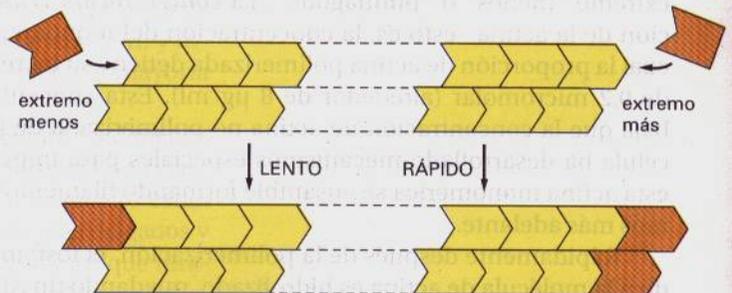
EXTREMO MÁS Y EXTREMO MENOS

Los dos extremos de un filamento de actina o de un microtúbulo polimerizan a velocidades distintas. El extremo de crecimiento rápido se llama **extremo más**, y el de crecimiento lento se llama **extremo menos**. La diferencia de velocidad de crecimiento de ambos extremos se debe a cambios conformacionales de cada subunidad cuando se incorpora al polímero.



Este cambio conformacional afecta a la velocidad a la cual las subunidades se añaden a los dos extremos.

Aunque k_{on} y k_{off} tendrán valores distintos para el extremo menos del polímero, la relación k_{off}/k_{on} —y, por tanto, C_c — debe ser igual en ambos extremos. Ello es debido a que cuando se pierde una subunidad en uno de los extremos se rompen exactamente el mismo número de interacciones entre subunidades, y el estado final de la



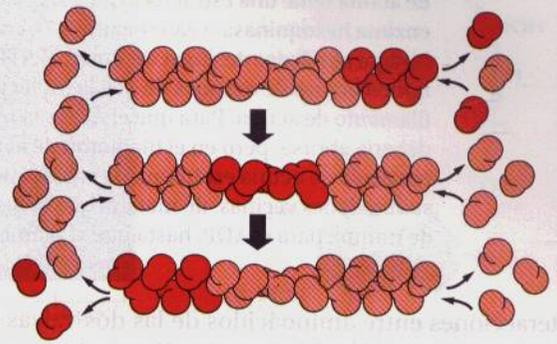
subunidad después de la disociación es idéntico. Así pues, la ΔG de la subunidad perdida, que determina la constante de equilibrio para su asociación al extremo (véase Tabla 3-3, página 101), es idéntica en ambos extremos; si el extremo más crece cuatro veces más rápidamente que el extremo menos, también debe disociarse cuatro veces más rápidamente. Por tanto, para $[C] > C_c$ ambos extremos crecen; para $[C] < C_c$, ambos extremos decrecen.

INTERCAMBIO ROTATORIO (TREADMILLING)

Una consecuencia de la hidrólisis del nucleótido que acompaña la formación de un polímero es el cambio de la concentración crítica en los dos extremos del polímero. Debido a que k_{off}^D y k_{on}^T se refieren a reacciones diferentes, la relación k_{off}^D/k_{on}^T no tiene por qué ser necesariamente la misma en los dos extremos del polímero, de forma que:

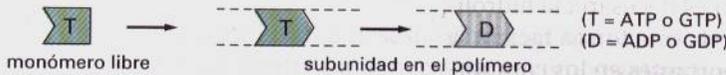
$$C_c \text{ (extremo menos)} > C_c \text{ (extremo más)}$$

Asumiendo que ambos extremos del polímero se hallan asequibles, la polimerización procederá hasta que la concentración del monómero libre supere el valor de C_c para el extremo más, pero esté por debajo de C_c para el extremo menos. En este estado estacionario, las subunidades se ensamblarán al extremo más y se desensamblarán del extremo menos a velocidades idénticas. El polímero mantendrá una longitud constante, aunque exista un flujo neto de subunidades a través del polímero que se conoce como **intercambio rotatorio (treadmilling)**.

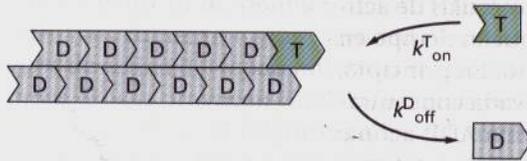


HIDRÓLISIS DE NUCLEÓTIDOS

Cada molécula de actina transporta una molécula de ATP fuertemente unida, la cual, en cuanto se produce el cambio de conformación que acompaña al ensamblaje de subunidades formando el polímero, es hidrolizada hasta una molécula de ADP. De manera similar, cada molécula de tubulina transporta una molécula de GTP fuertemente unida, que se convierte en una molécula de GDP cuando la molécula se ensambla en el polímero.



La hidrólisis del nucleótido unido reduce la afinidad de unión de cada subunidad respecto a la subunidad vecina, haciéndola más fácilmente disociable de cada uno de los extremos del filamento (véase Figura 16-33 para el posible mecanismo). Es habitual que la forma **T** se añada al filamento y que la forma **D** se disgregue del filamento. Consideremos sólo los acontecimientos del extremo más:



Como antes, el polímero crecerá hasta que $[C] = C_c$. Por motivos didácticos, podemos considerar que k_{on}^D y k_{off}^T son insignificantes, de forma que podemos decir que el crecimiento del polímero cesa cuando

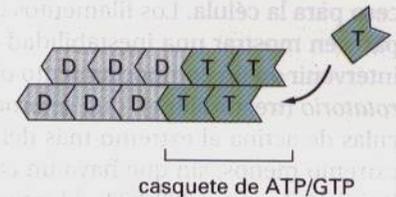
$$k_{on}^T C = k_{off}^D \quad \text{o} \quad C_c = \frac{k_{off}^D}{k_{on}^T}$$

Es un estado estacionario y no un equilibrio ya que el ATP o el GTP hidrolizados pueden ser reemplazados por una reacción intercambiadora de nucleótidos sobre la subunidad libre ($D \rightarrow T$).

La **INESTABILIDAD DINÁMICA** y el **INTERCAMBIO ROTATORIO** son dos comportamientos observados en los polímeros del citoesqueleto. Ambos procesos están asociados a la hidrólisis de nucleótidos trifosfato. Se cree que la inestabilidad dinámica predomina en los microtúbulos mientras que el intercambio rotatorio podría predominar en los filamentos de actina

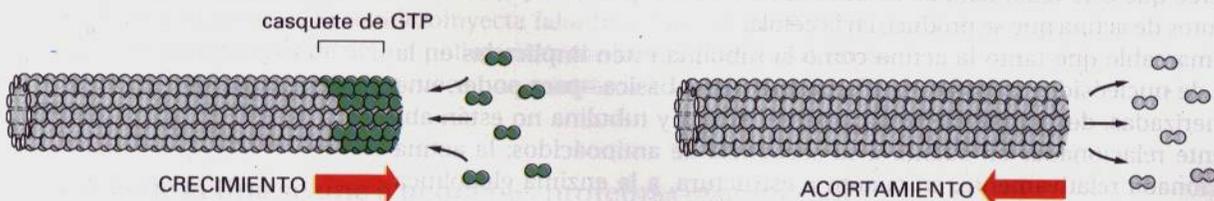
CASQUETES DE ATP Y DE GTP

La velocidad de adición de subunidades a un filamento de actina o a un microtúbulo en crecimiento puede ser más rápida que la velocidad a la cual se hidroliza el nucleótido que llevan unido. En estas condiciones, las subunidades de los extremos del filamento forman un casquete de subunidades que tienen unido el nucleósido trifosfato —un casquete de ATP en el filamento de actina y un casquete de GTP en el microtúbulo.



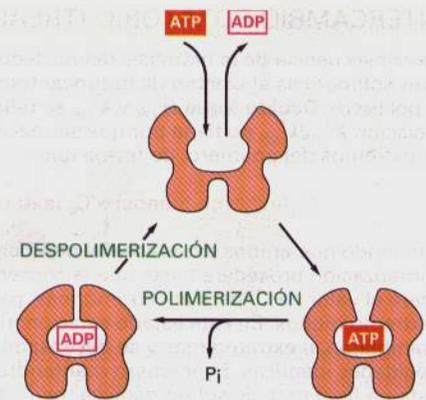
INESTABILIDAD DINÁMICA

Los microtúbulos se despolimerizan unas 100 veces más rápidamente del extremo que contiene tubulina GDP que del que contiene tubulina GTP. Un casquete de GTP favorece el crecimiento, pero si se pierde, entonces se produce la despolimerización.



Los microtúbulos individuales pueden alternar períodos de crecimiento lento y de desensamblaje rápido, fenómeno llamado **inestabilidad dinámica**.

Figura 16-51 La trampa de ADP en un filamento de actina. Una molécula de actina tiene una estructura que está relacionada con la de la ubiquina enzima hexoquinasa (véase Figura 5-2), con dos dominios que forman una bisagra alrededor del lugar de unión al ATP. El ATP es hidrolizado a ADP inmediatamente después de que la molécula se ha incorporado a un filamento de actina. Para que el ADP sea reemplazado por un ATP, la bisagra debería abrirse, pero en el filamento de actina los dos dominios de cada molécula de actina están unidos entre sí por interacciones con las subunidades vecinas, de manera que la bisagra se mantiene cerrada y actúa de trampa para el ADP, hasta que el filamento se despolimeriza.



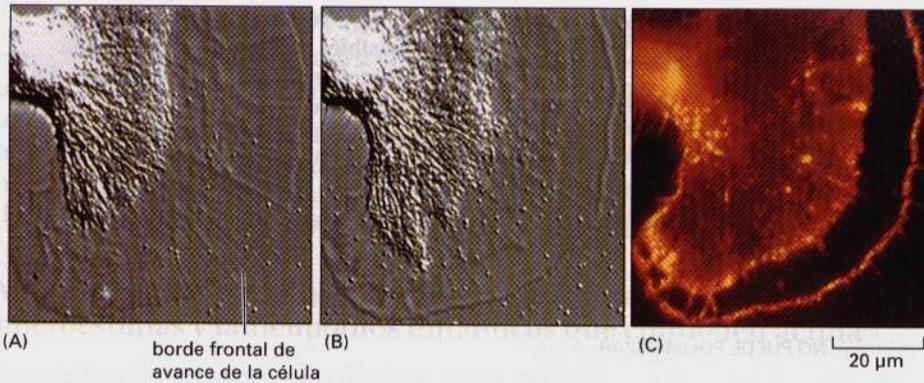
teracciones entre aminoácidos de las dos valvas de la almeja y la zona posterior de la siguiente subunidad en el polímero. Se cree que la hidrólisis del ATP se desencadena por el cierre de la concha mientras cada molécula de actina se incorpora al filamento, y deja el ADP atrapado dentro (Figura 16-51).

El comportamiento dinámico de los filamentos de actina requiere la hidrólisis del ATP³⁴

En la polimerización de la actina, la hidrólisis del ATP juega un papel parecido al de la hidrólisis del GTP en la polimerización de la tubulina, como explicamos en el Panel 16-1 (págs. 882-883). Para formar el filamento no es necesaria la hidrólisis del ATP: de hecho, debilita los enlaces del polímero y de esta forma facilita la despolimerización. Sin embargo, existen diferencias importantes en los comportamientos del nucleótido que está unido a las subunidades de estos dos polímeros. Una diferencia especialmente interesante es que el recambio ATP-ADP (la sustitución del ADP unido por ATP) es relativamente lenta para la actina libre (del orden de minutos), mientras que el recambio GTP-GDP es muy rápido para la tubulina libre (del orden de segundos); así pues, cuando las moléculas de actina son liberadas por el desensamblaje de un filamento, tardan mucho tiempo en poder volver a ser reutilizadas en el ensamblaje de un filamento. En principio, esta propiedad de la actina permite a la célula mantener una elevada concentración citosólica de moléculas de actina no polimerizadas en forma ADP-actina; además, el monómero ADP-actina puede ser estabilizado en la célula mediante su unión a otra proteína, lo cual podría proporcionar una manera para regular la polimerización de la actina.

El efecto que la hidrólisis del ATP tiene sobre la actina es sutil, y quedan muchas preguntas sin responder sobre las consecuencias precisas de este proceso para la célula. Los filamentos de actina, a diferencia de los microtúbulos, no parecen mostrar una inestabilidad dinámica drástica *in vitro*. De hecho, pueden intervenir en un comportamiento dinámico interesante denominado *intercambio rotatorio* (treadmilling), que se produce cuando se añaden continuamente moléculas de actina al extremo más del filamento y se pierden continuamente por el extremo menos, sin que haya un cambio neto de longitud en el filamento (véase Panel 16-1, págs. 882-883). El intercambio rotatorio, al igual que la inestabilidad dinámica, es un comportamiento de no equilibrio que requiere un aporte de energía, el cual proviene de la hidrólisis de ATP que acompaña a la polimerización. Se cree que este fenómeno contribuye al recambio rápido de subunidades de filamentos de actina que se produce en la célula.

Es remarcable que tanto la actina como la tubulina estén implicadas en la hidrólisis de nucleósidos trifosfato por la misma razón básica —para poder, una vez polimerizadas, despolimerizarse fácilmente. Actina y tubulina no están absolutamente relacionadas en cuanto a su secuencia de aminoácidos: la actina está relacionada relativamente, en cuanto a estructura, a la enzima glucolítica hexoquinasa, mientras que la tubulina está distantemente relacionada con una gran familia de GTPasas que incluye la proteína G heterotrimérica y GTPasas monoméricas como la proteína Ras. (Ambos tipos de estructura se discuten con detalle en el Capítulo 5.) La evolución convergente de la capacidad de hidrólisis



de un nucleótido en la actina y en la tubulina demuestra lo importante que resulta la función de los microtúbulos y de los filamentos de actina: el ensamblaje y desensamblaje dinámicos de estos polímeros del citoesqueleto en los que la hidrólisis hace posible que se encuentren en el corazón de la organización citoplasmática.

Las funciones de los filamentos de actina son inhibidas por drogas estabilizadoras y desestabilizadoras del polímero³⁵

Las drogas que estabilizan o desestabilizan los filamentos de actina constituyen herramientas importantes para investigar el comportamiento dinámico de estos filamentos en las células. Las *citocalasinas* son productos sintetizados por hongos, que impiden la polimerización de la actina ya que se unen al extremo más de los filamentos de actina. Las *faloidinas* son toxinas aisladas del hongo *Amanita*, que se unen muy fuertemente a los lados de los filamentos de actina y los estabilizan, impidiendo su despolimerización. (Un remedio contra el veneno del hongo *Amanita* es comer una gran cantidad de carne cruda: la elevada cantidad de filamentos de actina del tejido muscular se une a la faloidina y reduce su toxicidad.) Ambas drogas provocan cambios dramáticos en el citoesqueleto de actina. Anteriormente vimos, al referirnos a los microtúbulos, que tanto las drogas desestabilizadoras del polímero, por ejemplo la colchicina, como las drogas que los estabilizan, por ejemplo el taxol, son tóxicas para las células. Lo mismo sucede con las drogas que afectan la estabilidad de los filamentos de actina, lo cual indica que la función de los filamentos de actina también depende de un equilibrio dinámico entre el filamento y el monómero de actina.

La citocalasina es de gran utilidad para el estudio del movimiento celular. En particular, el borde frontal de avance de una célula en movimiento contiene filamentos de actina que continuamente polimerizan y son muy sensibles a la citocalasina. En la mayoría de células en movimiento la citocalasina provoca la retracción de este borde frontal de avance. Sin embargo, si la membrana plasmática de este borde está fuertemente unida al substrato, la citocalasina provoca la retracción de los filamentos de actina pero deja la membrana pegada al substrato (Figura 16-52).

La faloidina también se utiliza ampliamente, como derivado fluorescente, para marcar los filamentos de actina de células fijadas, y tiene también un efecto profundo en las células vivas. Si se microinyecta faloidina a un fibroblasto vivo, por ejemplo, los monómeros de actina polimerizan formando filamentos situados al azar en el citoplasma, lo cual provoca una contracción brusca que destruye la célula.

La molécula de actina se une a pequeñas proteínas que ayudan a controlar su polimerización³⁶

En un fibroblasto, aproximadamente el 50% de la actina se encuentra en forma de filamentos, mientras que el 50% restante está monomerizada. En una gran

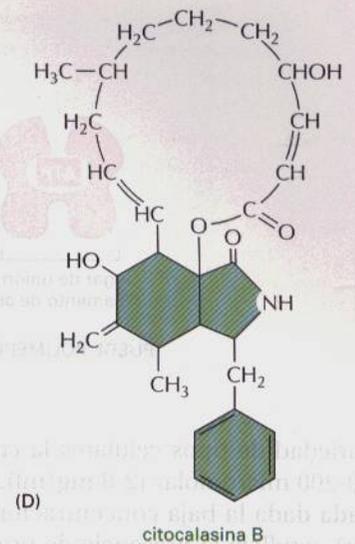


Figura 16-52 El efecto de la citocalasina sobre el borde frontal del cono en crecimiento de una célula nerviosa en cultivo. Observación de un cono vivo en crecimiento mediante microscopía de contraste interferencial de Nomarsky antes (A) y después (B) del tratamiento con citocalasina. La célula en (B) ha sido marcada después con faloidina ligada a rodamina para revelar los filamentos de actina (C). Puede observarse cómo la región detrás del borde frontal de avance del cono en crecimiento tratado con citocalasina está desprovista de filamentos de actina. La estructura química de la citocalasina B se muestra en (D). (A, B, y C, por cortesía de Paul Forscher.)

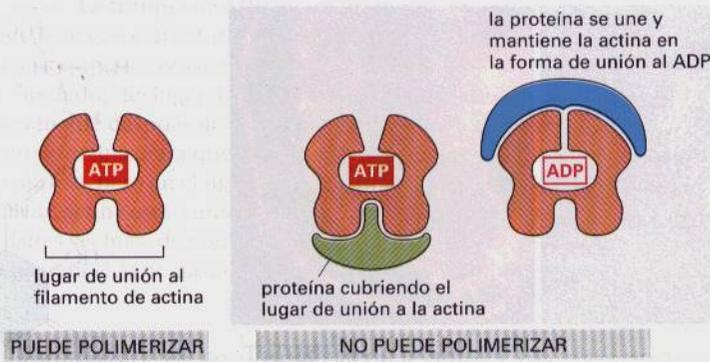


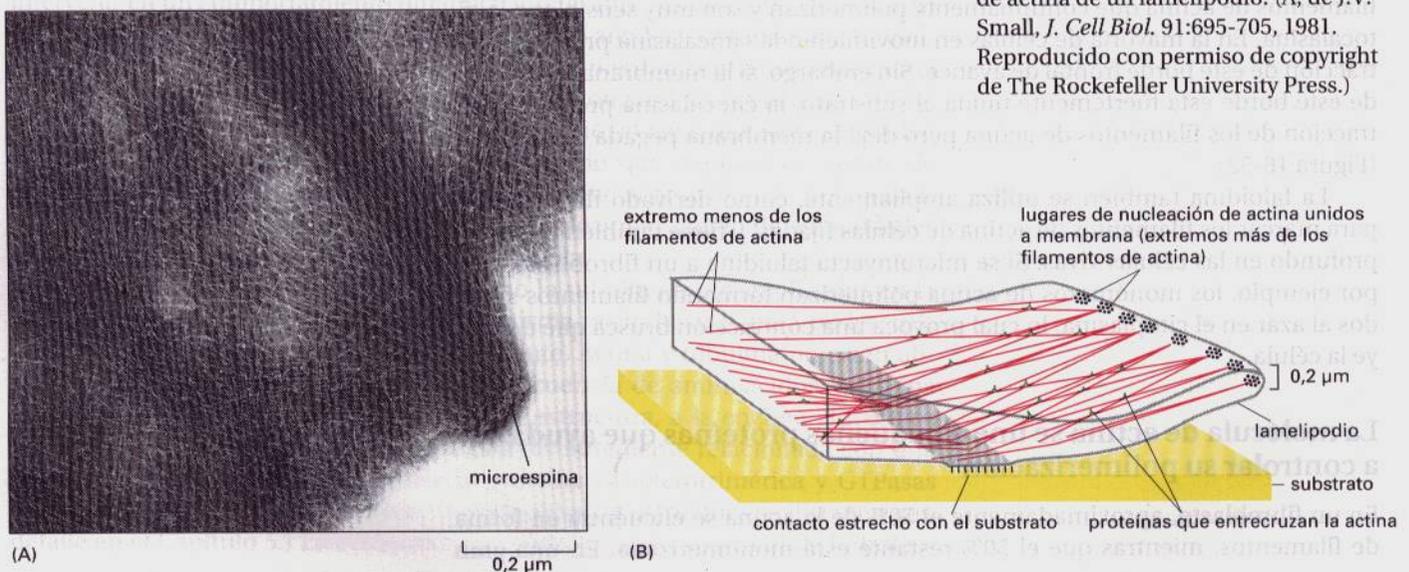
Figura 16-53 Dos mecanismos posibles mediante los cuales una proteína de unión al monómero de actina puede inhibir la polimerización de la actina. Se cree que la timosina inhibe la polimerización de la actina mediante uno de estos dos mecanismos.

variedad de tipos celulares la concentración del monómero es típicamente de 50-200 micromolar (2-8 mg/ml). Esta concentración es sorprendentemente elevada dada la baja concentración crítica de actina pura (menos de 1 micromolar), y refleja la presencia de proteínas especiales que se unen a la molécula de actina e inhiben su unión en los extremos de los filamentos de actina. La más abundante de estas proteínas de unión al monómero de actina en muchos tipos celulares es la **timosina**, una pequeña proteína poco común, de un peso molecular de aproximadamente 5000 daltons. En las células en que ha sido cuidadosamente estudiada (las plaquetas sanguíneas y los neutrófilos), se encuentra a una concentración que es suficiente para secuestrar toda la actina monomérica. Se desconoce cómo esta proteína inhibe la polimerización de la actina: podría bloquear estéricamente la polimerización cubriendo el lugar donde un monómero se une al otro, o podría secuestrar el ADP unido a la actina impidiendo el recambio ADP-ATP, con lo cual la molécula de actina no podría polimerizar (Figura 16-53).

Otra proteína de unión al monómero de actina es la **profilina**, que se encuentra en todas las células y se cree que controla la polimerización de la actina como respuesta a estímulos extracelulares. La profilina, que en muchas células está asociada a la membrana plasmática, acelera el recambio de ATP por ADP cuando se une a la actina monomérica y se cree que facilita la polimerización regulada de actina durante el movimiento celular, aunque esto es tema de controversia. Un mutante de levadura deficiente en profilina tiene un déficit de filamentos de actina, lo cual apoya el papel de esta molécula en la estimulación de la polimerización de la actina.

Figura 16-54 Filamentos de actina en el borde frontal de avance de un fibroblasto en cultivo.

(A) Electronmicrografía del extremo delantero de avance de una célula en cultivo, tratada con un detergente no iónico para eliminar la membrana plasmática y la mayoría de las proteínas solubles. Nótese la trama orientada de los filamentos de actina que se presenta en el lamelipodio, en el que se halla incrustada la microesquina. En (B) se presenta una visión esquemática de los filamentos de actina de un lamelipodio. (A, de J.V. Small, *J. Cell Biol.* 91:695-705, 1981. Reproducido con permiso de copyright de The Rockefeller University Press.)



Además de la timosina y de la profilina, las células disponen de otras muchas proteínas capaces de unirse a los monómeros de actina, y algunas de estas proteínas, como el *factor despolimerizador de la actina* (ADF, de Actin-Depolymerizing Factor), inhibe el ensamblaje de los filamentos de actina. Evidentemente las células disponen de una gran variedad de mecanismos, cuyos detalles no comprendemos todavía, mediante los cuales la célula controla el ensamblaje de los filamentos de actina sólo, cuándo y dónde es necesario.

Muchas células emiten, desde su borde frontal de avance, microespinas y lamelipodios dinámicos que contienen actina³⁷

Las expansiones superficiales dinámicas que contienen filamentos de actina son una característica común de las células animales, especialmente cuando las células están migrando o cambiando de forma. Las voluminosas células vivas de *Amoeba proteus*, por ejemplo, producen *pseudópodos* –extensiones cortas y gruesas del córtex de actina– con los cuales se mueven sobre las superficies. En los tejidos de los vertebrados, muchas células también son capaces de desplazarse sobre una superficie, especialmente cuando se cultivan. El borde frontal de avance de un fibroblasto que se arrastra extiende regularmente delgadas protuberancias laminares conocidas como **lamelipodios**, que poseen una densa red de filamentos de actina. Muchas células emiten también protrusiones delgadas y rígidas llamadas *microespinas*, de aproximadamente 0,1 μm de diámetro y entre 5 y 10 μm de largo y que contienen un haz laxo de aproximadamente 20 filamentos de actina orientado con su extremos más hacia el exterior (véase Figura 16-9). El extremo en crecimiento (núcleo de crecimiento) de un axón nervioso extiende microespinas incluso más largas, llamadas *filopodios*, que pueden tener hasta 50 μm de largo.

Un lamelipodio puede ser considerado como una versión bidimensional de una microespina; de hecho, a menudo este borde de la célula está delimitado por cortas microespinas. Cuando una célula en movimiento es fijada y contrastada cuidadosamente para ser examinada al microscopio electrónico, se observa cómo los filamentos de actina de los lamelipodios parecer estar más organizados que en otras regiones de la corteza celular. Muchos de los filamentos se proyectan hacia el exterior siguiendo una disposición ordenada, con sus extremos “más” insertados en el borde frontal de avance de la membrana plasmática (Figura 16-54). Los lamelipodios se comportan como una unidad estructural; si se pierde su adhesión al sustrato, normalmente se retraen rápidamente hacia atrás y se enrollan de nuevo sobre la célula como un “rizo” (Figura 16-55).

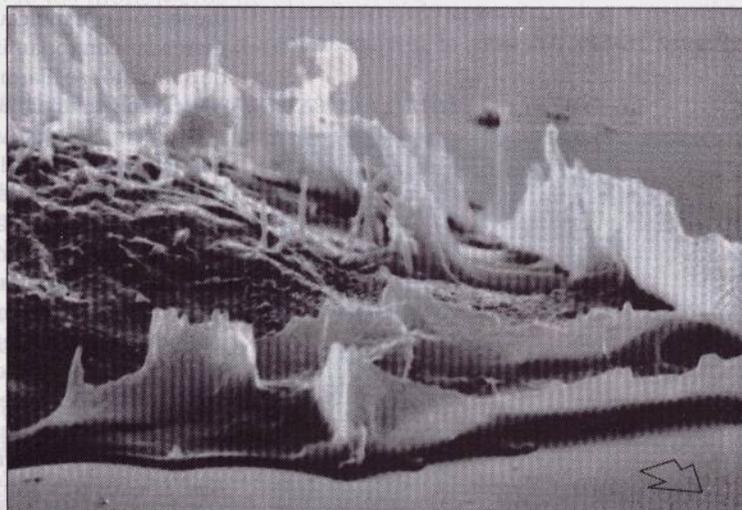


Figura 16-55 Lamelipodios y microespinas del borde frontal de avance de un fibroblasto humano en cultivo que está migrando. La flecha indica la dirección del desplazamiento de la célula. A medida que la célula va avanzando, los lamelipodios y las microespinas pierden su unión a la placa de cultivo y se enrollan sobre la superficie dorsal –un movimiento conocido como *rizado* (ruffling). (Por cortesía de Julian Heath.)

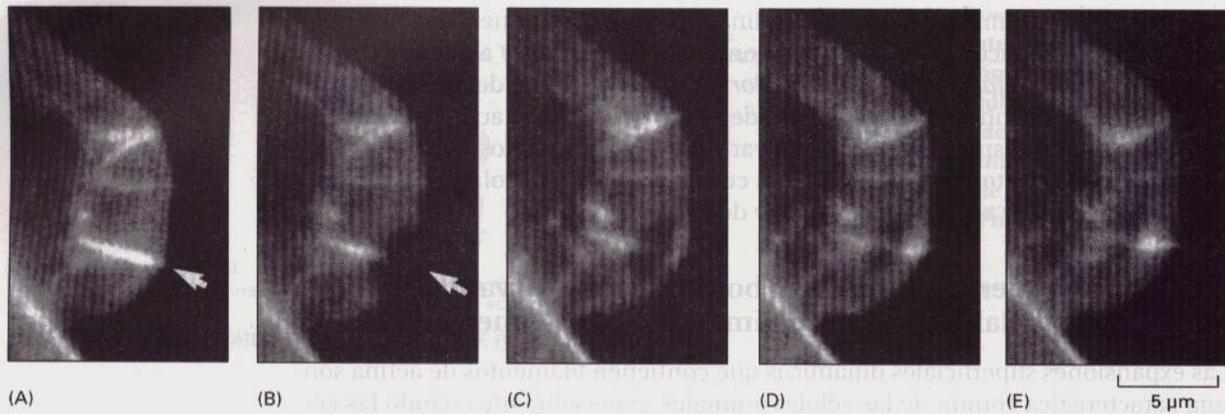


Figura 16-56 Dinámica de un filamento de actina en el lamelipodio de un fibroblasto en cultivo. Las moléculas de actina marcadas con el colorante fluorescente rodamina fueron microinyectadas en una célula, donde fueron incorporadas a los filamentos de actina. Utilizando un rayo láser se produce una pequeña mancha (por eliminación del marcate fluorescente) sobre los filamentos de actina en el extremo anterior de la célula. Entonces la célula se fotografía a intervalos de tiempo utilizando un microscopio fluorescente equipado con un intensificador de imágenes. El rápido movimiento hacia atrás de la mancha sugiere que las moléculas de actina polimerizan continuamente en el extremo del borde frontal de avance y se despolimerizan en su base. (Por cortesía de Y.L. Wang.)

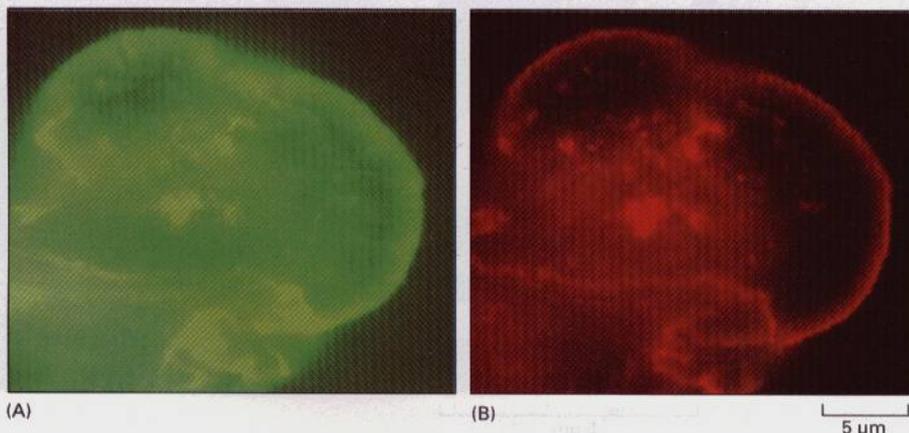
Tanto los lamelipodios como las microespinas son estructuras móviles que pueden formarse y retraerse a una gran velocidad. Tal como discutiremos más adelante, se cree que estas microespinas y lamelipodios son generados por la polimerización de la actina local en la membrana plasmática y que esta actina puede rápidamente empujar la membrana plasmática hacia adelante sin rasgarla.

El borde frontal de avance de las células móviles nuclea la polimerización de la actina³⁸

Cuando se estudia el comportamiento de los filamentos de actina en el borde frontal de avance, marcando una pequeña parte de la actina y siguiendo su movimiento, puede verse cómo la actina se mueve continuamente de regreso hacia el cuerpo celular a una velocidad de aproximadamente 1 µm/minuto, lo que sugiere que esta actina está continuamente polimerizando cerca del borde frontal de avance y continuamente despolimerizándose en lugares más internos (Figura 16-56). Se cree que este comportamiento altamente dinámico de los filamentos de actina en el borde frontal de avance es crucial para procesos tales como la locomoción celular y la quimiotaxis. La impresión general es que el borde frontal de avance se impulsa a sí mismo hacia delante empujando los filamentos de actina hacia atrás.

Parece que el borde frontal de avance de una célula organiza los filamentos de actina al igual que un centrosoma organiza los microtúbulos, pero con una diferencia crucial: no nuclea únicamente el crecimiento de nuevos filamentos sino que también parece ser el lugar en que los monómeros se van añadiendo, permitiendo el alargamiento de los filamentos. Esta función puede demostrarse si lisamos ligeramente un fibroblasto y entonces añadimos monómeros de actina unidos a rodamina, los cuales se ha visto que polimerizan preferentemente en el límite del borde frontal de avance (Figura 16-57). Además, si se marcan los

Figura 16-57 El extremo del borde frontal de avance nuclea filamentos de actina. Fibroblastos en cultivo se permeabilizaron ligeramente con un detergente no iónico y entonces se incubaron con moléculas de actina marcadas con rodamina (rojo). Al cabo de 5 minutos se fijaron las células y se marcaron con faloidina marcada con fluoresceína (verde). (A) Todos los filamentos de actina, la mayoría de ellos formados antes de la lisis, se marcan en verde. (B) La localización de los filamentos de actina nuevamente formados (rojo) polimerizados a partir de la actina marcada con rodamina añadida permite observar que el borde frontal de avance predomina de nucleación de filamentos de actina en la célula. (De M.H. Symons y T.J. Mitchison, *J. Cell Biol.* 114:503-513, 1991, reproducido con permiso de copyright de The Rockefeller University Press.)



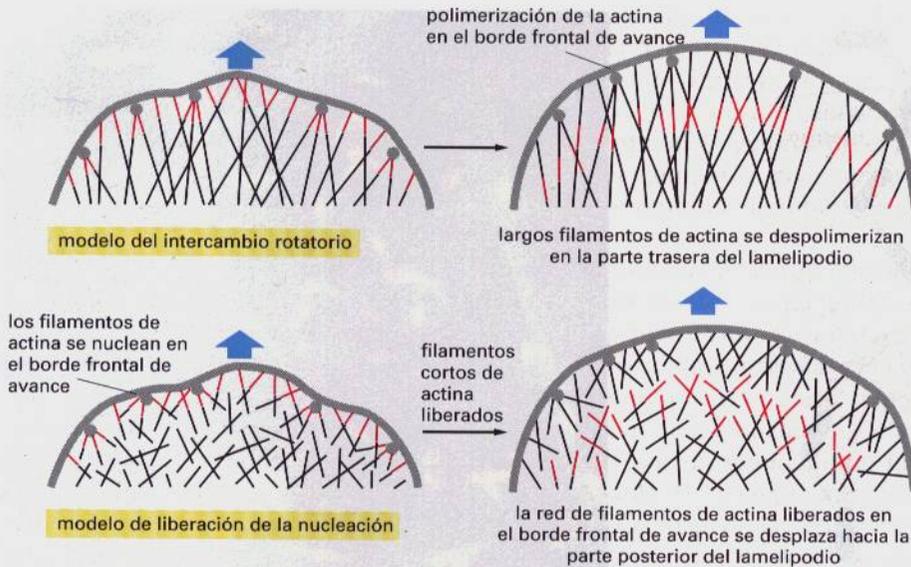


Figura 16-58 Dos modelos que podrían explicar el flujo retrógrado de actina en un lamelipodio. Las flechas azules indican la dirección del movimiento de la célula. Aunque aquí se muestran las diferencias entre los dos modelos, ambos procesos pueden darse simultáneamente en la célula. (Adaptado de J.A. Theriot y T.J. Mitchison, *Nature* 352:126-131, 1991. Reproducido con el permiso de *Nature*. © 1991 Macmillan Magazines Ltd.)

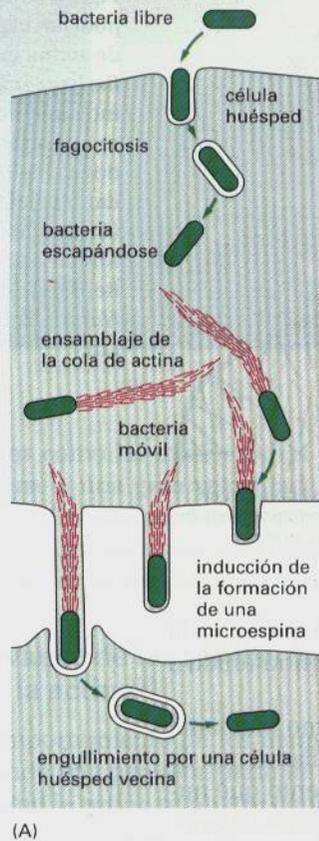
filamentos de actina para poder observar su polaridad, se encuentra que en cada filamento de actina, el extremo más de rápido crecimiento se encuentra unido a la membrana en el borde frontal de avance.

Hay aún muchas cuestiones sin respuesta acerca del mecanismo mediante el cual el borde frontal de avance nuclea la polimerización de los filamentos de actina. ¿El borde frontal de avance se une al extremo más del filamento que nuclea, o nuclea un nuevo filamento y rápidamente se libera de él? A causa del movimiento retrógrado de la actina (véase Figura 16-56), algún modelo postula que, para que el borde frontal de avance se agarre a los extremos de los filamentos de actina se necesitaría que los filamentos del lamelipodio estuvieran en continuo intercambio rotatorio mediante la inserción de monómeros de actina en los lugares donde los filamentos están unidos a la membrana. En un modelo alternativo, los filamentos de actina individuales serían liberados en cuanto se formaran y se desplazarían alejándose de la membrana (seguramente como una red de puentes cruzados) (Figura 16-58).

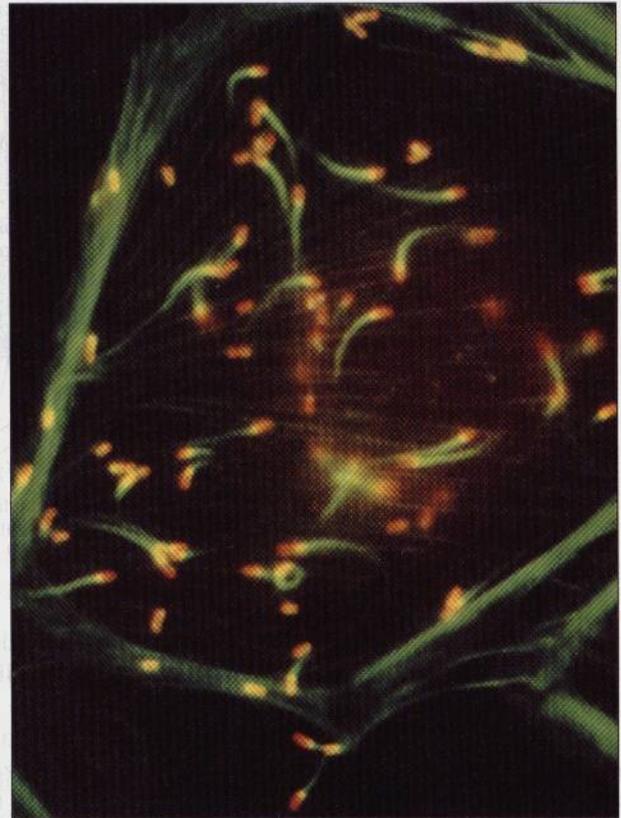
El rápido ensamblaje de los filamentos de actina en el borde frontal de avance de una célula en movimiento implica la liberación de los monómeros de actina de las proteínas de unión al monómero, que normalmente impiden la polimerización de los filamentos de actina. Discutiremos más adelante cómo las señales del ambiente celular externo pueden regular esta liberación y permitir la polimerización de los monómeros de actina en el extremo del borde frontal de avance.

Algunas bacterias patógenas utilizan la actina para moverse dentro y entre las células³⁹

Listeria monocytogenes, una bacteria que provoca una forma aguda de envenenamiento alimentario, ha proporcionado datos inesperados acerca del mecanismo mediante el cual la célula controla la polimerización local de la actina. Esta bacteria patógena penetra por fagocitosis en la célula; entonces secreta enzimas que rompen la membrana del fagosoma y se libera en el citosol de la célula huésped. Una vez en el citosol, no solamente crece y se divide, sino que se desplaza hacia las células adyacentes movilizándolo el sistema de motilidad basado en los filamentos de actina de la célula huésped. Mediante la nucleación de los filamentos de actina en una región de su superficie, una bacteria individual se desplaza por el citosol a una velocidad de 10 μm por minuto o más, dejando tras ella una cola de filamentos de actina. Cuando colisiona con la membrana plasmática de la célula huésped, se desplaza hacia el exterior induciendo la forma-



(A)



(B)

10 μm

ción de una larga y fina microesquina, en cuyo extremo se sitúa la bacteria. A menudo esta proyección es engullida por una célula vecina, con lo cual la bacteria puede entrar en su citoplasma sin exponerse al ambiente extracelular donde podría ser reconocida por anticuerpos producidos por el organismo huésped (Figura 16-59).

Este tipo de movimiento sugiere que la bacteria puede estar usando la actina para impulsarse, de la misma forma en que la membrana plasmática de una célula eucariota la utiliza para impulsarse durante la formación de una microesquina normal o un lamelipodio.

Si marcamos con fluorescencia los filamentos de actina de la cola que deja atrás la bacteria *Listeria* cuando migra por el citosol y los observamos con el microscopio de fluorescencia, podremos observar que son estacionarios. Los filamentos se forman en la parte trasera de la bacteria y se quedan atrás como la cola de un cohete mientras la bacteria avanza, despolimerizándose de nuevo al cabo de aproximadamente un minuto o en cuanto encuentran factores despolimerizantes en el citosol. El ensamblaje se induce por una proteína específica de la superficie de la bacteria que actúa indirectamente secuestrando las proteínas de la célula huésped, incluida la profilina. Si el movimiento inducido por la bacteria pudiera ser reproducido en un extracto libre de células concentrado, se podrían conocer los detalles del mecanismo a partir de estudios bioquímicos. Estos detalles ayudarían a comprender cómo se producen la nucleación de la actina y la polimerización en las microesquinas y lamelipodios de una célula normal, no infectada, y cómo estos procesos capacitan a la célula para avanzar.

La polimerización de la actina en el córtex celular está controlada por receptores de la superficie celular⁴⁰

La producción de movimiento es poco útil a menos que esté de acuerdo directa y adecuadamente con el ambiente. Como hemos discutido anteriormente, la red

Figura 16-59 Movimiento basado en la actina de una bacteria dentro y entre células de mamífero. (A) La bacteria *Listeria monocytogenes* viaja de una célula a otra induciendo el ensamblaje de filamentos de actina en el citosol de la célula huésped. (B) Micrografía de fluorescencia de la bacteria desplazándose en el interior de una célula que ha sido marcada para poder observar tanto a la bacteria como a los filamentos de actina. Nótese la cola, parecida a un cometa, de los filamentos de actina (verde) detrás de cada bacteria en movimiento (rojo). Las regiones en las que ambas fluorescencias se superponen, se observan en amarillo. (B, por cortesía de Tim Mitchison y Julie Theriot.)

cortical dinámica de filamentos de actina se ordena de nuevo rápidamente como respuesta a señales que vienen del exterior de la célula y que inciden sobre la membrana plasmática. Por lo tanto, el citoesqueleto de actina puede ser considerado como una parte de los sistemas de transducción de señales celular, discutidos en el Capítulo 15: cuando se añaden determinados factores de crecimiento al medio de cultivo de células quiescentes, por ejemplo, inmediatamente se forman lamelipodios que contienen actina y se mueven sobre la superficie celular.

La respuesta del córtex de actina a las señales externas que llevan información espacial puede ser altamente localizada. Anteriormente consideramos un ejemplo cuando discutimos la polarización de una célula T citotóxica inducida por el contacto con su célula diana, a la que seguidamente matará (véase Figura 16-11). En las células animales capacitadas para la quimiotaxis también se produce una polarización del córtex de actina inducida por una señal, que se define como un movimiento en una dirección controlado por un gradiente de una sustancia química difusible al que la célula es sensible. Un ejemplo muy bien estudiado es el movimiento quimiotáctico de ciertas células de la serie blanca (*neutrófilos*) hacia la fuente de infección bacteriana. Los neutrófilos tienen proteínas receptoras en su superficie que les permiten detectar muy bajas concentraciones de péptidos N-formilados derivados de proteínas bacterianas (sólo los procariontes empiezan la síntesis proteica con una N-formil-metionina). Los neutrófilos pueden ser guiados hacia sus dianas con sólo una diferencia de concentración de un 1% de estos péptidos difundibles, entre un lado de la célula y el otro.

Otro ejemplo de quimiotaxis es el proporcionado por el moho del cieno, *Dictyostelium discoideum*. Estos eucariotas viven en el suelo de los bosques como células móviles independientes llamadas *amoebae* (amebas). Se alimentan de bacterias y de levaduras y, en condiciones óptimas, se dividen cada pocas horas. Cuando su suministro alimentario se agota, la ameba interrumpe su división y se agrupa formando estructuras minúsculas (1-2 mm), pluricelulares, parecidas a gusanos, que se arrastran como babosas y dejan rastros de cieno detrás de ellas (Figura 16-60). Mientras la babosa migra, las células comienzan a diferenciarse e inician un proceso que finaliza con la producción de una estructura muy pequeña parecida a una planta que consiste en un tallo y un *cuerpo fructífero* unas 30 horas después de haberse iniciado la agregación (Figura 16-61). El cuerpo fructífero contiene un número muy grande de esporas, que pueden sobrevivir largos períodos de tiempo en condiciones ambientales extremadamente hostiles. Sólo cuando las condiciones son favorables, las esporas germinan y producen las amebas libres que empiezan el ciclo de nuevo.

Las amebas *Dictyostelium* se agregan mediante quimiotaxis migrando hacia una fuente de AMP cíclico, secretada por las amebas hambrientas. Al igual que los neutrófilos, las amebas reorientan su borde frontal de avance para migrar hacia el gradiente quimioatrayente superficial. Y cuando se exponen a una fuente local de AMP cíclico que sale de una micropipeta, las amebas extienden apéndices que contienen actina, directamente hacia la pipeta (Figura 16-62). Este experimento demuestra que la quimiotaxis eucariota implica la detección directamente de un gradiente espacial de una concentración de atrayente, a diferencia de la quimiotaxis bacteriana, que utiliza una variación de la concentración dependiente del tiempo para detectar los gradientes, como discutimos en el Capítulo 15.

La reacción del citoesqueleto de *Dictyostelium* al AMP cíclico puede examinarse mediante lisados de estas células poco después de su estimulación con una solución rica en AMP cíclico. Como se muestra en la Figura 16-63, a los 5-10 segundos de añadir el AMP cíclico se produce un estallido dramático de polimerización de actina, que corresponde al tiempo necesario para la extensión de la célula en el substrato. Entre los 20 y 40 segundos después del pulso de AMP cíclico, la actina se despolimeriza y la célula se redondea. Entonces se produce un estallido de polimerización de actina más prolongado, en forma de un reclutamiento en el citoesqueleto de proteínas de unión a la actina a partir de acervos

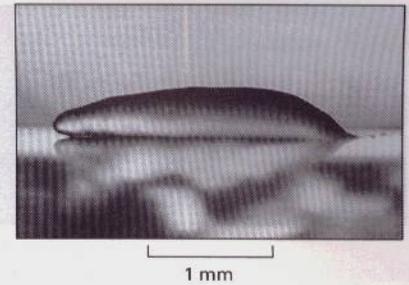


Figura 16-60 Micrografía óptica de una babosa del moho del cieno *Dictyostelium discoideum* migrando. (Por cortesía de David Francis.)

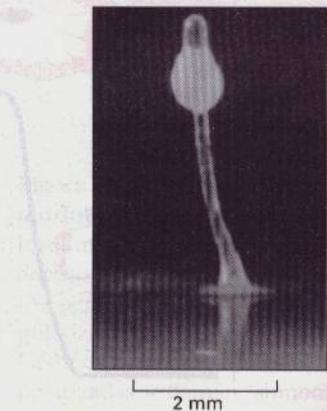


Figura 16-61 Micrografía óptica del cuerpo fructífero de *Dictyostelium discoideum*. (Por cortesía de John Bonner.)

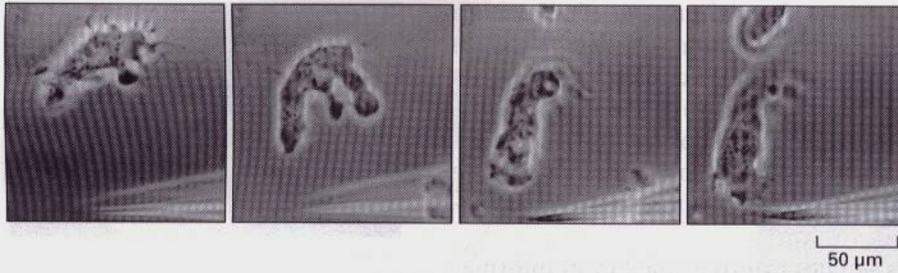


Figura 16-62 Respuesta quimiotáctica de la ameba *Dictyostelium discoideum*. La ameba tiene receptores para el AMP cíclico en su membrana plasmática, que la capacitan para arrastrarse hacia una fuente extracelular de AMP cíclico. En este experimento se libera AMP cíclico desde la punta de una micropipeta, que puede verse en la parte inferior de las micrografías; la respuesta que se muestra se produce en menos de un minuto. (Por cortesía de Günther Gerisch.)

solubles; durante este último período las células que responden al AMP cíclico empiezan a formar lamelipodios y otras expansiones ricas en actina.

Proteínas G heterotriméricas y pequeñas GTPasas transmiten señales desde la superficie celular al córtex de actina⁴¹

¿De qué forma la unión del AMP cíclico a su receptor desencadena la polimerización masiva de actina en la ameba de *Dictyostelium*? Se sabe que el receptor activa una proteína G heterotrimérica. El citoplasma contiene una reserva de monómeros de actina, los cuales, tal y como vimos anteriormente, están estabilizados mediante proteínas de unión al monómero de actina. La estimulación de la polimerización de la actina supone que estas moléculas de actina tienen que estar disponibles para polimerizar y también será necesario superar la barrera cinética para la nucleación. La proteína de unión al monómero de actina, profilina, se une estrechamente a los fosfolípidos de inositol de la membrana plasmática, que generan señales intracelulares como respuesta a ligandos extracelulares (véase Figura 15-30). De acuerdo con una hipótesis, la activación de esta vía de señal (que se produce a través de una proteína G heterotrimérica) podría liberar la profilina de la membrana plasmática y dejarla libre en el citosol. La profilina puede catalizar el recambio ATP-ADP de la actina *in vitro*, así que cuando es liberada desde la membrana plasmática puede, rápidamente, convertir la actina inactiva unida a ADP en actina activa unida a ATP, induciendo la formación local de filamentos de actina.

Las proteínas G también están implicadas en los procesos de señalización que activan el córtex de actina durante la respuesta quimiotáctica de los neutró-

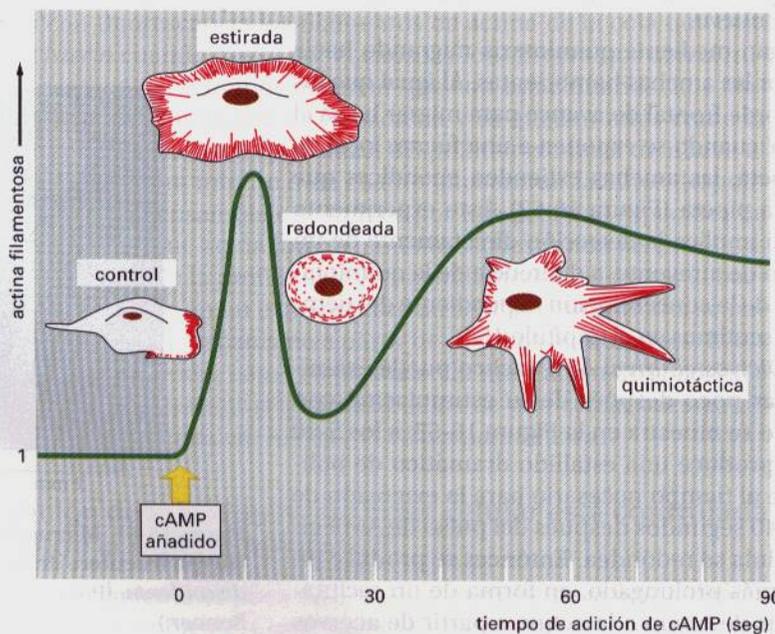


Figura 16-63 Efecto del AMP cíclico sobre el córtex de actina de la ameba *Dictyostelium discoideum*. La gráfica (línea verde) muestra las cantidades relativas de actina filamentososa asociada con el citoesqueleto a distintos tiempos de la adición repentina de AMP cíclico.

filos y en la activación de las plaquetas sanguíneas. Disponemos de datos evidentes de que dos pequeñas GTPasas relacionadas con la proteína Ras conocidas como **Rho** y **Rac**, intervienen en este proceso; se ha visto que estas proteínas tienen diversos efectos sobre el citoesqueleto de actina en los fibroblastos. La microinyección de la proteína Rac en células en cultivo provoca, al cabo de 5 minutos, un incremento dramático de la formación de lamelipodios. Además, un mutante dominante negativo de Rac inhibe la formación de lamelipodios inducida normalmente por diversos factores de crecimiento. Esto indica que la respuesta a los factores de crecimiento es dependiente de la proteína Rac. La microinyección de la proteína Rho comporta la aparición de grandes haces de filamentos de actina conocidos como *fibras de estrés* y el incremento de *contactos focales*, lugares donde la célula se une al substrato externamente y donde las fibras de estrés están ancladas interiormente (como veremos más adelante). Se cree que la proteína Rho también es necesaria para la formación del anillo contráctil durante la división celular. Sin embargo, Rac y Rho no sólo controlan la polimerización de los filamentos de actina sino que también dirigen la organización de estos filamentos formando algunos tipos determinados de estructuras.

Los mecanismos de polarización celular pueden ser analizados en las células de levadura⁴²

Se han obtenido indicaciones adicionales sobre cómo las células pueden orientar las actividades de su citoesqueleto, a partir del estudio del comportamiento de las células de levadura. La facilidad de realizar un análisis genético en las levaduras ha proporcionado una fuente importante de información fundamental acerca de los mecanismos biológicos comunes a todas las células eucariotas. Concretamente, estudios acerca de las interacciones entre levaduras durante el apareamiento han iniciado la identificación de mecanismos mediante los cuales las células eucariotas se convierten en estructuras polarizadas. En la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*, células con dos tipos de apareamiento distintos, α y β , secretan hormonas conocidas como factor α y factor β , respectivamente. Estas hormonas actúan a través de su unión a receptores de la superficie celular que pertenecen a la gran familia de receptores relacionados con proteína G, discutidos en el Capítulo 15. Una consecuencia de la unión del factor β a su receptor en una célula α es la conversión de la célula en una célula polarizada que adopta una forma conocida como "shmoo" (Figura 16-64). Si existe un gradiente de factor β , el extremo de "shmoo" se dirige hacia la zona donde se encuentra la concentración más elevada de esta molécula.

Durante esta polarización la levadura sufre reorganizaciones del citoesqueleto que son paralelas a las que aparecen en las células animales cuando se convierten en polarizadas. Los filamentos de actina se congregan en la punta del borde "shmoo", desde donde se cree que dirigen la secreción local de componentes de la pared celular —dirigiendo posiblemente el transporte de vesículas portadoras de estos componentes hacia el borde de "shmoo". Al mismo tiempo, el centro organizador de microtúbulos [en este caso, el *corpúsculo polar del huso* (spindle pole body)], véase Figura 17-24) se desplaza hacia el lado del núcleo que está muy relacionado con el borde de "shmoo", y los microtúbulos se extienden

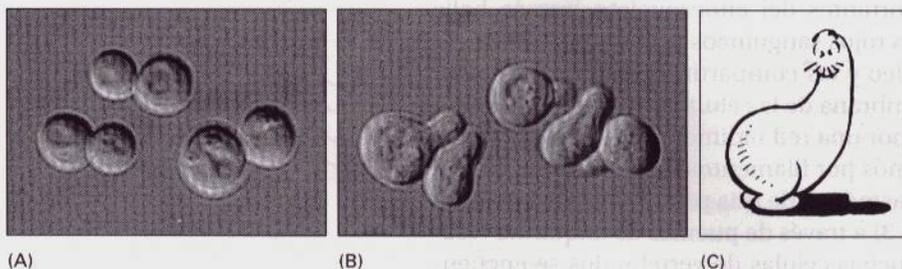


Figura 16-64 Polarización morfológica de las células de levadura. Normalmente las células de *Saccharomyces cerevisiae* son esféricas (A), pero pueden convertirse en polarizadas cuando se tratan con un factor de apareamiento (B). Las células polarizadas se llaman "shmoos", debido al famoso personaje de cómic de Al Capp (C). (A y B, cortesía de Michael Snyder; C, © 1948 Capp Enterprises, Inc., reservados todos los derechos.)

desde allí hacia el borde de la célula. Mediante la observación de células mutantes que no forman shmoo durante el apareamiento, se han identificado muchos de los genes implicados en la polarización de las levaduras. Parece que algunas de las proteínas que codifican estos genes estarían implicadas en la polarización en las células animales.

Resumen

La actina es una proteína del citoesqueleto altamente conservada que se encuentra a concentraciones elevadas en casi todas las células eucariotas. La actina purificada se encuentra en forma de monómero en soluciones de baja fuerza iónica y al añadir una sal que contenga ATP se ensambla espontáneamente formando filamentos de actina. Al igual que la tubulina, la polimerización de la actina es un proceso dinámico que se encuentra regulado por la hidrólisis de un nucleótido al que cada molécula está estrechamente unida (el ATP en este caso). En las células, aproximadamente la mitad de la actina se encuentra en forma monomérica gracias a su unión a determinadas proteínas de bajo peso molecular como la timosina. En el córtex de las células animales, las moléculas de actina polimerizan y despolimerizan continuamente generando proyecciones en la superficie celular tales como los lamelipodios y las microespinas. La polimerización puede ser regulada por señales extracelulares que se unen a receptores de la superficie celular y que actúan a través de proteínas G heterotriméricas y de pequeñas GTPasas como Rac y Rho.

Proteínas de unión a la actina⁴³

La actina está implicada en un abanico notablemente amplio de estructuras, desde extensiones rígidas y relativamente permanentes de la superficie celular hasta redes tridimensionales dinámicas en el borde frontal de avance de una célula que está migrando. En cada célula viva coexisten estructuras muy distintas, basadas en la actina. En cada caso la estructura fundamental del filamento de actina es la misma. Lo que varía es la longitud de estos filamentos, su estabilidad y el número y la geometría de sus uniones (tanto las uniones de unos filamentos con otros como las uniones con otros componentes celulares). Estas propiedades dependen, a su vez, de una gran grupo de **proteínas de unión a la actina**, que se unen a la actina y modulan sus propiedades y sus funciones.

En este apartado describimos algunas de las proteínas de unión a la actina más importantes y las estructuras que forman. Muchas de estas proteínas se encuentran en el perímetro celular, en la capa rica en actina que se encuentra justo debajo de la membrana plasmática, llamada *córtex celular*. Esta capa proporciona fuerza mecánica a la célula animal y le permite llevar a cabo una gran variedad de movimientos superficiales, tales como la fagocitosis, la citocinesis (división celular), y el movimiento celular.

Un citoesqueleto unido de manera sencilla a la membrana proporciona soporte mecánico a la membrana plasmática de los eritrocitos⁴⁴

Como se explicó en el Capítulo 10, las proteínas **espectrina** y **anquirina** fueron descubiertas como componentes importantes del citoesqueleto que se halla asociado a la membrana de los glóbulos rojos sanguíneos (eritrocitos). Estas células excepcionales han perdido el núcleo y los compartimentos membranosos internos de tal manera que la única membrana de la célula es la membrana plasmática. Esta membrana está sostenida por una red bidimensional de tetrámeros de espectrina conectados por sus extremos por filamentos muy cortos de actina. La espectrina está unida a la cola citoplasmática de una proteína transportadora transmembrana muy abundante (banda 3) a través de puentes de anquirina (véase Figura 10-26). En la superficie de muchas células de vertebrados se encuen-



tran parientes muy próximos de la espectrina (también llamada *fodrina*) y de la anquirina. Así, la disposición detallada de las proteínas en la corteza del eritrocito también proporciona un modelo simplificado de la red del citoesqueleto basado en actina que sostiene la membrana plasmática en todas las demás células animales.

Los filamentos de actina en el córtex del eritrocito son muy cortos, y tan sólo actúan como elementos de entrecruzamiento entre los tetrámeros de espectrina. Al contrario, en el córtex de una célula más típica, son mucho más largos y así se proyectan hacia el citoplasma, donde forman la base de una red tridimensional de filamentos de actina. No está nada claro si las moléculas parecidas a la anquirina servirían de anclaje a la membrana plasmática para esta disposición cortical más típica, aunque se cree que en algunas células epiteliales la ATPasa de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ transmembrana (discutida en el Capítulo 11) uniría esta red cortical de actina a la membrana plasmática a través de este tipo de proteínas.

Generalmente la red cortical de filamentos de actina determina la forma y las propiedades mecánicas de la membrana plasmática. Muchos tipos de uniones a membrana necesitan de los filamentos de actina para llevar a cabo sus diversas funciones en el córtex; el acoplamiento a proteínas transmembrana a través de la anquirina es únicamente uno de ellos. Existen otros tipos de uniones más dinámicas, pero tan sólo empiezan a ser caracterizadas las proteínas que los median.

Proteínas de entrecruzamiento con diferentes propiedades organizan ensamblajes particulares de actina⁴³

En las células animales los filamentos de actina corticales están organizados en tres tipos generales de disposiciones (Figura 16-65). En *haces paralelos*, tal como se encuentran en las microespinas y en los filopodios: los filamentos están orientados con la misma polaridad y están espaciados muy regularmente (separados 10-20 nm). En *haces contráctiles*, encontrados en las fibras de estrés y en el anillo contráctil que divide la célula en dos durante la mitosis: los filamentos se encuentran orientados con polaridades opuestas, mucho más espaciados (separados 30-60 nm) y presentan la proteína motora miosina-II (se discute más adelante). En las *redes parecidas a geles* del córtex celular: los filamentos están dispuestos de forma relativamente más relajada, en disposiciones abiertas con interconexiones ortogonales. ¿Cómo se generan y se mantienen estas diferentes disposiciones del mismo filamento de actina en una misma célula? Aunque no

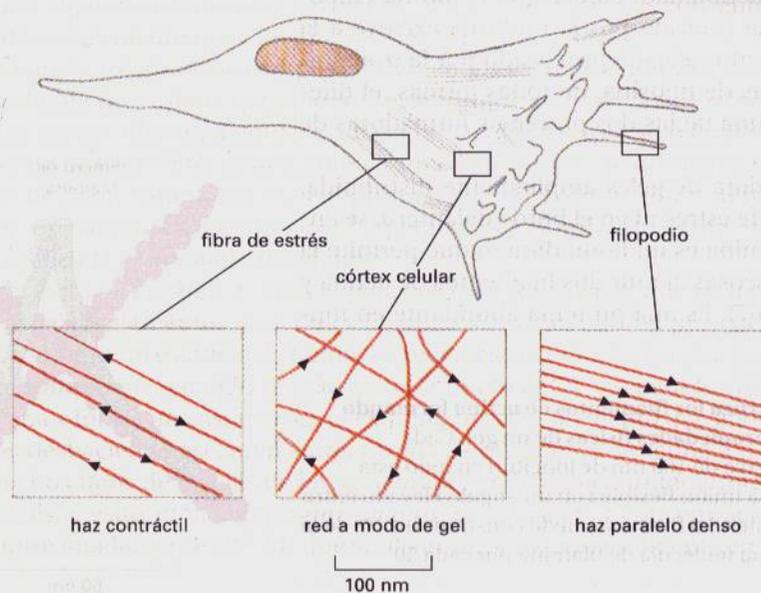


Figura 16-65 Tres tipos de disposiciones corticales de los filamentos de actina. Se muestra una célula arrastrándose, con tres áreas ampliadas para evidenciar la disposición de los filamentos de actina dibujados a escala. Las puntas de flecha apuntan hacia el extremo más de los filamentos.

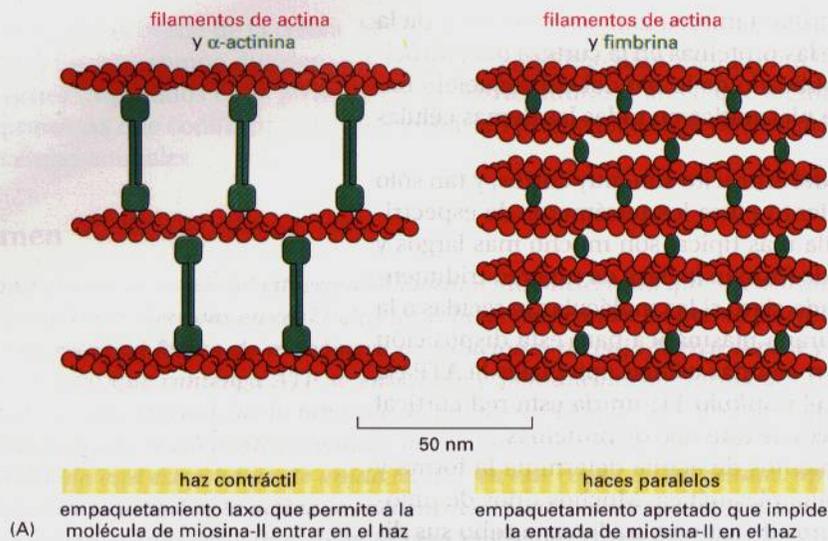


Figura 16-66 La formación de dos tipos de haces de filamentos de actina.

(A) La α -actinina, que es un homodímero, entrecruza los filamentos de actina en haces laxos, que permiten a la proteína motora miosina-II (no se muestra) participar en el ensamblaje. La fimbrina entrecruza los filamentos de actina en haces apretados, que excluyen a esta proteína. La fimbrina y la α -actinina tienden a excluirse la una a la otra a causa del espaciado de los diferentes haces de filamentos de actina que forman. (B) Electronmicrografía de moléculas de α -actinina purificadas. (B, por cortesía de John Heuser.)

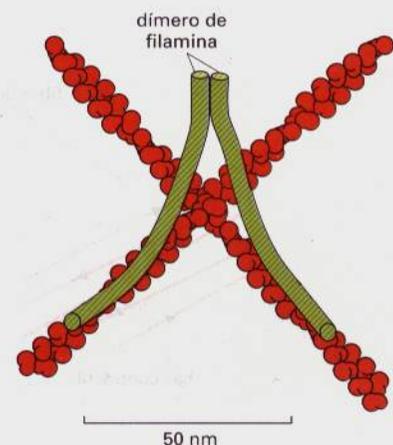
conozcamos totalmente la respuesta, las *proteínas de entrecruzamiento de los filamentos de actina* tienen claramente una gran importancia.

Las proteínas de entrecruzamiento pueden dividirse en dos clases –*proteínas que forman haces* y *proteínas que forman geles*– de acuerdo con su efecto *in vitro* sobre los filamentos de actina puros. Las proteínas que forman haces entrecruzan los filamentos de actina en disposiciones paralelas y son importantes en la formación tanto de las íntimas disposiciones paralelas como de los haces contráctiles más espaciados descritos anteriormente. Al contrario, las proteínas que forman geles entrecruzan los filamentos de actina en intersecciones en diagonal, creando los geles laxos.

La *fimbrina* y la *α -actinina* son proteínas formadoras de haces ampliamente distribuidas. La **fimbrina** se encuentra en los haces de filamentos paralelos del borde frontal de las células, particularmente en las microespinas y en los filopodios, y se cree que es la responsable de la asociación íntima de los filamentos de actina en estas disposiciones. La segunda proteína formadora de haces, la **α -actinina**, se concentra en las fibras de estrés, donde se cree que es la responsable, en parte, de los entrecruzamientos relajados de los filamentos de actina en estos haces contráctiles; también interviene en el anclaje de los extremos de las fibras de estrés en los *contactos focales*. Tal y como explicaremos más adelante, la miosina es la proteína motora en las fibras de estrés y en otras disposiciones contráctiles y es la responsable de su contractibilidad. Parece que el íntimo empaquetamiento de los filamentos de actina causado por la fimbrina excluye a la miosina, mientras que el empaquetamiento relajado provocado por la α -actinina permitiría la entrada de las moléculas de miosina; de todas formas, el diferente espaciado provoca que cada una de las dos proteínas formadoras de haces excluya a la otra (Figura 16-66).

La **filamina** es una proteína formadora de geles ampliamente distribuida. Aunque no se encuentra ni en las fibras de estrés ni en el borde delantero, se encuentra enriquecida en el córtex. La filamina es un homodímero que permite la formación de redes laxas y altamente viscosas al unir dos filamentos de actina y entrecruzarlos uno con otro (Figura 16-67). Es una proteína abundante en mu-

Figura 16-67 La filamina entrecruza los filamentos de actina formando una red tridimensional con las propiedades físicas de un gel. Cada homodímero de filamina tiene cerca de 160 nm de longitud cuando está totalmente extendido y forma una unión flexible con un ángulo elevado entre dos filamentos de actina adyacentes. La filamina puede constituir un 1% de la proteína total de la célula. Hay una molécula de filamina por cada 50 monómeros de actina.



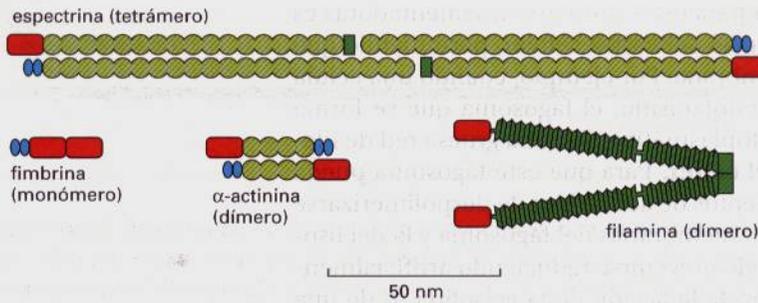


Figura 16-68 Estructuras modulares de cuatro proteínas de unión a la actina. Cada una de las proteínas mostrada tiene dos lugares de unión a la actina (en rojo) que están relacionados entre sí en cuanto a su secuencia. La fimbrina tiene dos lugares de unión a la actina, adyacentes, de forma que une sus dos filamentos de actina muy juntos (14 nm de separación), alineados con la misma polaridad (véase Figura 16-66). Los dos lugares de unión a la actina de la molécula de α -actinina están más separados, conectados por un espaciador flexible de 30 nm de longitud, con lo cual forman haces de filamentos de actina con una mayor separación entre los filamentos (40 nm de separación). La filamina tiene dos lugares de unión a la actina que están muy separados, con una unión en forma de V entre ellos, y así entrecruza filamentos de actina formando una red con los filamentos orientados casi en ángulo recto el uno respecto al otro (véase Figura 16-67). La espectrina es un tetrámero de dos subunidades α y dos subunidades β , y el tetrámero tiene dos lugares de unión a la actina separados unos 200 nm. Las regiones espaciadoras de estas proteínas se construyen de manera modular a partir de unidades de repetición que incluyen zonas en hélice α (verde claro), zonas de lámina β (verde oscuro), y dominios de unión al Ca^{2+} (óvalos azules).

chas células animales, lo cual refleja el predominio de las redes laxas en la organización de la actina.

Las proteínas de unión a la actina con propiedades diferentes están construidas a partir de módulos semejantes⁴⁵

La fimbrina, la α -actinina, la filamina y la espectrina presentan todas ellas dos dominios de unión al filamento de actina, con lo cual no es de extrañar que cada una necesite entrecruzar dos filamentos. Sorprendentemente, la estructura de los dominios de unión a la actina de estas proteínas es parecida. En estas cuatro proteínas, la longitud y la flexibilidad de las secuencias espaciadoras que separan los dos lugares de unión a la actina son distintas, y estas diferencias determinan las propiedades diferenciales de los cuatro entrecruzamientos. Evidentemente, estas proteínas han derivado a partir de una proteína de unión a la actina ancestral común mediante la adición de secuencias espaciadoras distintas (Figura 16-68).

La gelsolina, cuando se activa por Ca^{2+} , fragmenta los filamentos de actina⁴⁶

Cuando se calientan a 37°C en presencia de ATP extractos preparados a partir de alguno de entre muchos tipos celulares, forman un gel. Aunque esta *gelificación* depende tanto de los filamentos de actina como de una proteína de entrecruzamiento como la filamina, el gel presenta un comportamiento más complejo que las mezclas simples de filamentos de actina y de filamina. Por ejemplo, si se incrementa la concentración de Ca^{2+} por encima de 10^{-7}M , el gel semisólido de actina empieza a licuar —proceso conocido como *solación*. Al microscopio se puede observar que algunas regiones del gel solante presentan vigorosas corrientes locales. Así pues, es evidente que, además de la actina y de la filamina, en el extracto celular han de existir otros componentes responsables de este comportamiento. Es probable que estos componentes estén implicados en las *corrientes citoplasmáticas* observadas en algunas células grandes, en las que se requieren vigorosos movimientos de flujo para mantener una distribución determinada de metabolitos y de otros componentes citoplasmáticos. Al parecer estos movimientos están asociados a un cambio local repentino del citoplasma desde una consistencia gelificada a un estado más fluido.

A partir de extractos se han aislado algunas proteínas celulares que cuando se añaden a un gel de filamentos de actina y filamina provocan que, en presencia de Ca^{2+} , el gel cambie a un estado más fluido. La mejor caracterizada de estas proteínas es la **gelsolina**, que, cuando se activa por la unión al Ca^{2+} , separa los filamentos de actina y forma un casquete en el extremo más del filamento que ahora está asequible, deshaciendo así la red entrecruzada de filamentos de actina. En la corteza de muchos tipos de células de los vertebrados se han encontrado proteínas similares a ésta; estas *proteínas fragmentadoras* se activan por concentraciones de Ca^{2+} (aproximadamente 10^{-6}M) que se alcanzan sólo temporalmente en el citosol.

Una de las funciones que se postula para estas proteínas fragmentadoras es la de ayudar a la relajación o licuación local del córtex celular, permitiendo que se produzcan procesos de fusión de membrana. Por ejemplo, cuando una célula fagocítica sanguínea engulle a un microorganismo, el fagosoma que se forma está inicialmente cubierto, por el lado citoplasmático, por una gruesa red de filamentos de actina originados a partir del córtex. Para que este fagosoma pueda fusionarse con los lisosomas, estos filamentos de actina han de despolimerizarse para permitir el contacto íntimo entre las membranas del fagosoma y la del lisosoma. Esta desaparición de la actina puede prevenirse reduciendo artificialmente la concentración del ion Ca^{2+} , a través de la acción de la gelsolina (o de una proteína similar). Se cree que la gelsolina también es necesaria para que la célula se arrastre a lo largo de un sustrato, aunque se desconoce su papel exacto en este proceso.

Una mezcla de filamentos de actina purificada, filamina, y gelsolina es capaz de experimentar transiciones de gel a sol dependientes de Ca^{2+} , pero no puede contraerse ni presentar los movimientos de flujo que presentan los geles crudos ricos en actina obtenidos a partir de la célula. Estas actividades requieren la presencia de otro tipo de proteína de unión a la actina –la proteína motora miosina. Si la miosina se elimina selectivamente de los geles crudos ricos en actina, desaparecen completamente las contracciones y las corrientes, lo cual sugiere que la fuerza que provoca las corrientes citoplasmáticas está generada por una interacción entre la actina y la miosina.

En las células eucariotas se han encontrado múltiples tipos de miosina⁴⁷

La cinematografía a intervalos de tiempo revela que el córtex de las células está en continuo movimiento. En la sección anterior remarcamos la importancia de la polimerización y despolimerización de la actina en estos movimientos, pero, al igual que en los microtúbulos, las proteínas motoras también son muy importantes. Todas las proteínas motoras de los filamentos de actina que han sido identificadas pertenecen a la familia de las *miosinas*. Las **miosinas** fueron aisladas originalmente gracias a su capacidad para hidrolizar el ATP a ADP i P_i cuando se unen a la actina, y esto se ha mantenido como criterio bioquímico útil para su identificación. Esta actividad motora de las miosinas también se puede observar directamente si son adsorbidas encima de un cubreobjetos de cristal: cuando se añade ATP a una preparación de filamentos de actina fluorescentes, se puede observar con un microscopio de fluorescencia cómo los filamentos se deslizan sobre la superficie del cristal cubierta por la miosina. Las miosinas descubiertas más recientemente también se han identificado mediante la secuenciación de su DNA antes incluso de su caracterización funcional o bioquímica.

La miosina, distribuida a lo largo de la actina, fue descubierta en el músculo esquelético, y es en este tejido donde se ha aprendido la mayor parte de lo que se conoce acerca de la interacción entre estas dos proteínas. La miosina muscular pertenece a la subfamilia **miosina-II** de las miosinas. Todas ellas tienen dos cabezas y una larga cola, parecida a una varilla: cada cabeza presenta tanto la actividad ATPasa como la motora. Una proteína del tipo miosina-II está formada por dos cadenas pesadas idénticas, cada una de las cuales está complejada a un par de cadenas ligeras. El fragmento amino terminal de la cadena pesada forma el dominio motor mientras que la mitad del extremo carboxilo terminal de la cadena pesada se extiende en forma de hélice α . Dos cadenas pesadas se entrelazan a través de sus dominios de cola en hélice α formando un sobre enrollamiento que da lugar a un dímero estable formado por dos cabezas y una única cola parecida a una varilla (Figura 16-69).

La función más importante de la cola semejante a una varilla de la miosina-II es la de permitir la polimerización de las moléculas formando filamentos bipolares. Esta polimerización es crucial para el desarrollo de la función de la miosina-II, es decir, la de mover grupos de filamentos de actina opuestos, tal y como su-

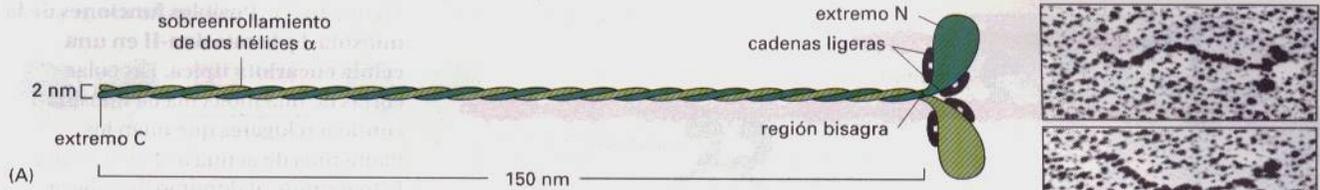
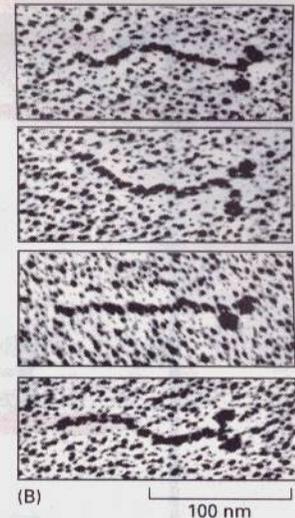


Figura 16-69 Miosina-II. (A) Una molécula de miosina está compuesta por dos cadenas pesadas (cada una de las cuales tiene alrededor de 2000 residuos de aminoácido de longitud) y cuatro cadenas ligeras. Las cadenas ligeras son de dos tipos (unas contienen alrededor de 190 residuos de aminoácidos y las otras alrededor de 170). En cada cabeza de miosina se halla presente una molécula de cada tipo (véase Figura 5-23). La dimerización se produce cuando las dos hélices α se enrollan la una alrededor de la otra formando un sobreenrollamiento en hélice α mediado por la asociación de aminoácidos hidrofóbicos separados regularmente. La disposición en sobreenrollamiento produce en solución una extensa cuerda; esta parte de la molécula se denomina el dominio de cuerda, o cola. Este tipo de estructura se encuentra en otras proteínas del citoesqueleto y les permite formar una estructura extendida. (B) Las dos cabezas globulares y la cola pueden observarse claramente en electronmicrografías de moléculas de miosina sombreadas con platino. (B, por cortesía de David Shotton.)



cede durante la contracción muscular. La miosina es relativamente abundante en el córtex celular; en los fibroblastos, por ejemplo, existe una molécula de miosina-II por cada 100 moléculas de actina. En el anillo contráctil los filamentos de miosina son los responsables del movimiento de la membrana en el surco central durante la división celular, como discutimos en el Capítulo 18. Se cree que estos filamentos generan tensión en las fibras de estrés y también mucha tensión cortical que comportaría el tensamiento de la superficie celular. Su papel en la contracción muscular se describe al final de este capítulo.

Además de la miosina-II, que generalmente es la miosina más abundante de la célula, las células no musculares disponen de diversas miosinas más pequeñas, la mejor caracterizada de las cuales es la llamada **miosina-I** (Figura 16-70). Se cree que la miosina-I es más parecida a la original, a una miosina más primitiva a partir de la cual habría evolucionado la miosina-II. Una única célula puede disponer de múltiples miosinas más pequeñas, cada una de las cuales está codificada por un gen distinto y también lleva a cabo una función diferente; la célula del moho del cieno *Dictyostelium*, por ejemplo, tiene al menos nueve de ellas. La característica más común de todas las miosinas es la de presentar un dominio motor muy conservado; el resto de dominios varían de una miosina a otra y determinan el papel específico de la molécula en la célula. Además, las colas de miosina pueden presentar un lugar de unión a la membrana y/o un lugar de unión a un segundo filamento de actina independientemente del dominio de cabeza. Dependiendo de su cola, una molécula de miosina puede mover una vesícula a lo largo de un filamento de actina, unir un filamento de actina a la membrana plasmática, o hacer que dos filamentos de actina queden íntimamente alineados y entonces se deslicen uno con respecto al otro (Figura 16-71).

Todas las miosinas conocidas hidrolizan ATP para deslizarse a lo largo de los filamentos de actina desde el extremo menos hacia el extremo más. Dada la importancia de las proteínas motoras que se desplazan en direcciones opuestas

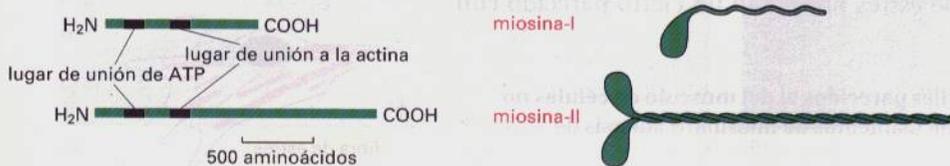


Figura 16-70 Dos miembros de la familia de las miosinas. A la izquierda, se muestran la miosina-I y la miosina-II, dibujadas a escala, y alineadas respecto a sus lugares de unión al ATP y a la actina, altamente conservados. Las formas relativas de las proteínas completas se muestran a la derecha.

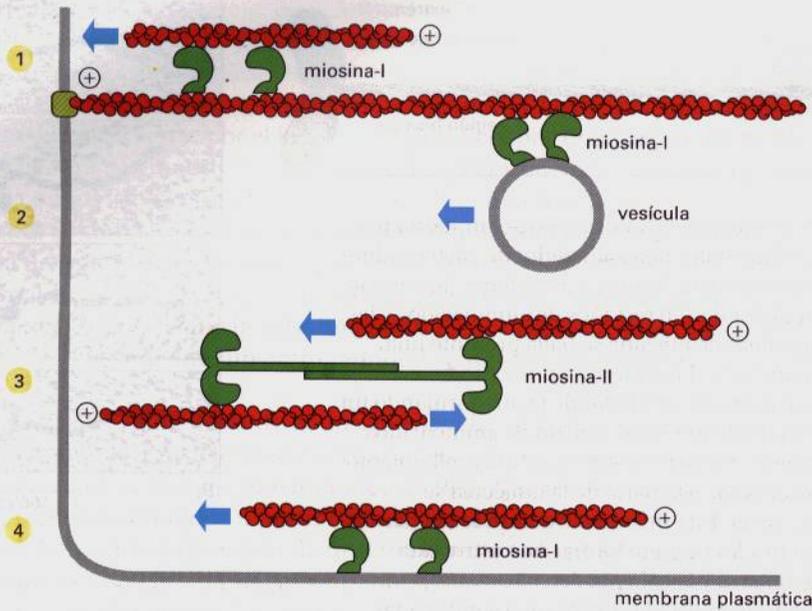


Figura 16-71 Posibles funciones de la miosina-I y la miosina-II en una célula eucariota típica. Las colas cortas de una molécula de miosina-I contienen lugares que unen los filamentos de actina a la membrana. Esto permite al dominio de cabeza desplazarse de un filamento de actina a otro (1), desplazar una vesícula a lo largo de un filamento de actina (2) o desplazar un filamento de actina hacia la membrana respecto a otro filamento de actina (4). Además, los pequeños ensamblajes antiparalelos de las moléculas de miosina pueden deslizar unos filamentos de actina sobre los otros, con lo cual median contracciones locales en un haz de filamentos de actina (3). En todos los casos el grupo de cabeza “camina” hacia el extremo más del filamento de actina con el que contacta.

a lo largo de los microtúbulos (véase Figura 16-37), no sería sorprendente descubrir un tipo adicional de proteínas motoras que se desplazaran hacia el extremo menos de los filamentos de actina.

En células no musculares pueden formarse transitoriamente ensamblajes semejantes a los musculares⁴⁸

En las células eucariotas superiores se forman transitoriamente haces contráctiles organizados de filamentos de actina y de filamentos de miosina para realizar una función específica y luego se deshacen. Más destacado aún, la división celular en las células animales es posible gracias a un haz a modo de cinturón de filamentos de actina y de miosina, conocido como el **anillo contráctil**. Este anillo aparece justo debajo de la membrana plasmática durante la fase M del ciclo de división celular; las fuerzas generadas por este anillo constriñen la mitad de la célula conduciendo a la eventual separación de las dos células hijas mediante un proceso conocido como citocinesis (Figura 16-72). El anillo contráctil se forma al iniciarse la división celular a partir de actina, miosina y otras proteínas. Este proceso puede seguirse mediante la tinción con anticuerpos fluorescentes anti-miosina de las células en división. Por ejemplo, en los huevos del erizo de mar que están próximos a dividirse, las moléculas de miosina están al principio distribuidas uniformemente por debajo de la membrana plasmática y luego, a medida que se forma el anillo contráctil, se desplazan a la región ecuatorial de la célula. Una vez se ha completado la división celular, las moléculas de miosina se dispersan de nuevo. Se desconoce cómo se controla este proceso, pero parece que estaría implicado el catión Ca^{2+} ya que la fosforilación de la miosina-II es dependiente de Ca^{2+} y tanto el Ca^{2+} como la fosforilación incrementan la interacción de la miosina con la actina lo cual comporta la formación de filamentos bipolares cortos (Figura 16-73).

Otro ejemplo de haces contráctiles temporales de filamentos de actina y de miosina son las **fibras de estrés**, que son componentes mayoritarios del citoesqueleto de los fibroblastos en cultivo (Figura 16-72). Aunque mucho más pequeñas y menos organizadas, las fibras de estrés presentan un cierto parecido con

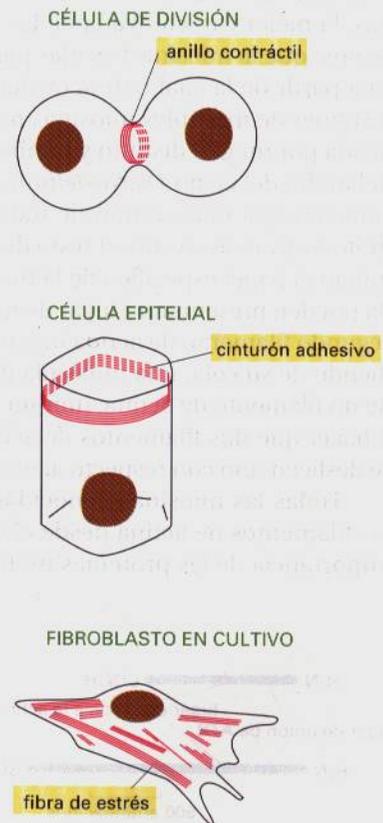


Figura 16-72 Haces contráctiles parecidos al del músculo en células no musculares. Cada haz contiene filamentos de miosina-II además de filamentos de actina.

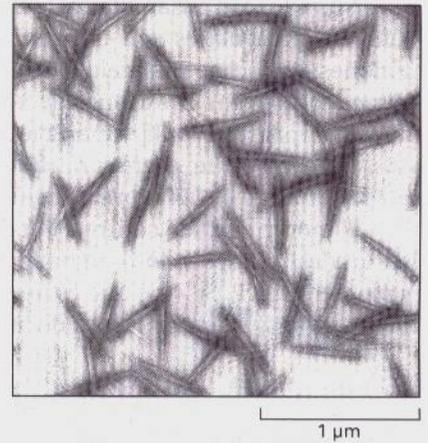
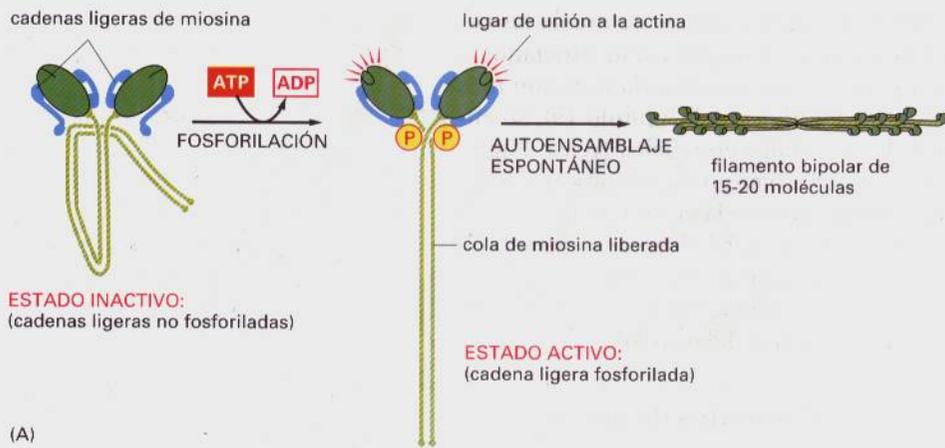


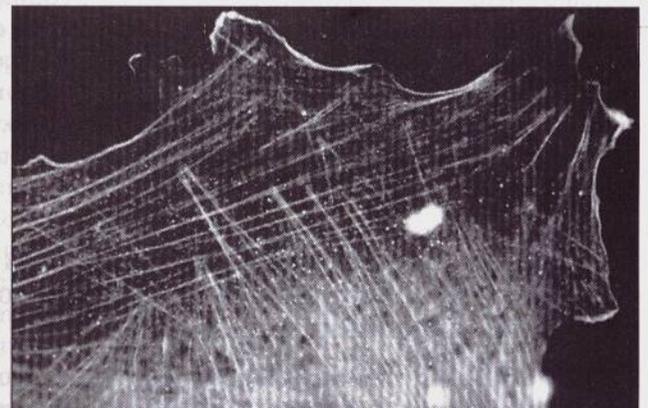
Figura 16-73 Ensamblaje controlado de la miosina-II, formando filamentos. (A) La fosforilación controlada de una de las dos cadenas ligeras tiene al menos dos efectos *in vitro*: provoca un cambio en la conformación de la cabeza de miosina, exponiendo su lugar de unión a la actina, y libera la cola de miosina de la “zona pegajosa” de la cabeza de miosina, permitiendo así a la molécula de miosina ensamblarse formando cortos filamentos bipolares. La enzima responsable de esta fosforilación (la quinasa de la cadena ligera de la miosina) se describe en relación con el músculo liso (véase Figura 16-98). (B) Tinción negativa de filamentos cortos de miosina-II que han sido inducidos a ensamblarse por fosforilación de sus cadenas ligeras. (Por cortesía de John Kendrick-Jones.)

las minúsculas *miofibrillas* del músculo (discutido más adelante) en cuanto a su estructura y a su función. Por uno de sus extremos se insertan en la membrana plasmática, mediante unas uniones especiales llamadas *contactos focales*, lugar donde la cara externa de la célula está íntimamente unida a la matriz extracelular (Figura 16-74); por el otro extremo se insertan en un segundo contacto focal o en una red de filamentos intermedios que rodea el núcleo celular. Las fibras de estrés se forman en respuesta a la tensión generada a través de la célula y se desensamblan durante la mitosis cuando la célula se redondea y pierde sus uniones al sustrato. También desaparecen rápidamente si se libera la tensión mediante un rayo láser, separando súbitamente un extremo de la fibra del contacto focal. Se cree que las fibras de tensión de los fibroblastos tisulares se contraen permitiendo a las células ejercer tensión sobre la matriz de colágeno que las rodea –un proceso esencial en la curación de las heridas y en la morfogénesis (véase Figura 19-48). En los epitelios, los haces de filamentos de actina que se extienden desde el citoplasma de una célula hasta el citoplasma de la célula vecina a través de las uniones celulares pueden aparecer y desaparecer de una manera semejante; estos haces de filamentos, ligados de extremo a extremo a través de las uniones célula-célula, pueden formar cables y generar tensión a lo largo de líneas de estrés particulares en las láminas multicelulares.

Figura 16-74 Relación entre los contactos focales y las fibras de estrés en fibroblastos en cultivo. Los contactos focales puede observarse de forma óptima en células vivas mediante microscopio de contraste interdifereencial (A). En esta técnica, la luz se refleja a partir de la superficie inferior de una célula unida a un soporte de vidrio, y los contactos focales aparecen como manchas negras. (B) La tinción de la misma célula (tras su fijación) con anticuerpos anti-actina muestra que la mayoría de los haces de filamentos de actina de la célula (o fibras de estrés) acaban en o cerca de un contacto focal. (Por cortesía de Grenham Ireland.)



(A)



(B)

10 μm

No todos los ensamblajes contráctiles de los filamentos de actina de las células no musculares son transitorios. Por ejemplo, los que están asociados a uniones de anclaje intercelulares, los llamados *cinturones de adhesión*, son más permanentes. Los cinturones de adhesión (discutidos en el Capítulo 19), se encuentran próximos a la superficie apical de las células epiteliales (véase Figura 16-72). Se cree que, entre otras funciones, desempeñan un papel importante en el plegamiento de las capas de células epiteliales durante la embriogénesis.

El mecanismo de contracción de todos estos haces del citoesqueleto se basa en un deslizamiento interdigitado de los filamentos de actina y miosina impulsado por el ATP. Se cree que es necesario un tipo particular de ensamblaje ordenado, que explicaremos más adelante cuando tratemos del músculo.

Los contactos focales permiten que los filamentos de actina se extiendan hacia el sustrato⁴⁹

Para extenderse sobre la matriz extracelular o sobre la superficie de otra célula, una fibra de estrés ha de estar firmemente unida a un lugar adecuado de la membrana plasmática. Los anclajes entre los filamentos de actina del interior de la célula y la matriz extracelular exterior están mediados por proteínas transmembrana unidas a glucoproteínas de la membrana plasmática. Los anclajes mejor caracterizados son los que forman los fibroblastos en cultivo. Cuando los fibroblastos crecen en una placa de cultivo, la mayoría de su superficie está separada del sustrato por un espacio de más de 50 nm; pero en las zonas de los **contactos focales** (*placas de adhesión*), este espacio se reduce a entre 10 y 15 nm. En estas zonas la membrana plasmática está unida a componentes de la matriz extracelular que se han adsorbido en la placa de cultivo. Mediante tinción con anticuerpos anti-actina, puede observarse cómo estas regiones son los lugares donde los extremos de las fibras de estrés se unen a la membrana plasmática (véase Figura 16-74).

Las principales proteínas de unión transmembrana de los contactos focales pertenecen a la familia de las *integrinas*, cuyo dominio externo se une a un componente de la matriz extracelular mientras que el dominio citoplasmático se une a los filamentos de actina de las fibras de estrés. La unión es indirecta y está mediada por múltiples *proteínas de anclaje* (Figura 16-75). El dominio citoplasmático de la integrina se une a una proteína llamada *talina*, que a su vez se une a la *vinculina*, proteína que se encuentra también en otras uniones que contienen filamentos de actina, como por ejemplo las *uniones adherentes* (discutido en el Capítulo 19). La vinculina se une a la α -actinina que también está unida a un filamento de actina. Aunque la topología exacta de las interacciones proteicas en los contactos focales no está establecida, en la Figura 16-75B se muestra una posible disposición de todas estas proteínas.

Además de su papel como anclas para la célula, los contactos focales pueden también transmitir señales desde la matriz hasta el citoesqueleto. Algunas proteína quinasa, incluyendo la tirosina quinasa codificada por el gen *src*, se localizan en los contactos focales, y existen indicios de que su actividad cambia con el tipo de sustrato sobre el cual la célula descansa. Estas quinasas pueden fosforilar diversas proteínas diana, incluyendo algunos componentes del citoesqueleto, y así regular la supervivencia, el crecimiento, la morfología, el movimiento, y la diferenciación de las células como respuesta a la matriz extracelular de su entorno.

Los microvilli ilustran de qué forma los haces de filamentos entrecruzados de actina pueden estabilizar zonas locales de la membrana plasmática⁵⁰

Los **microvilli** son extensiones digitiformes que se encuentran en la superficie de muchas células animales. Son especialmente abundantes en las células epiteliales que para funcionar de una manera eficiente han de presentar una gran

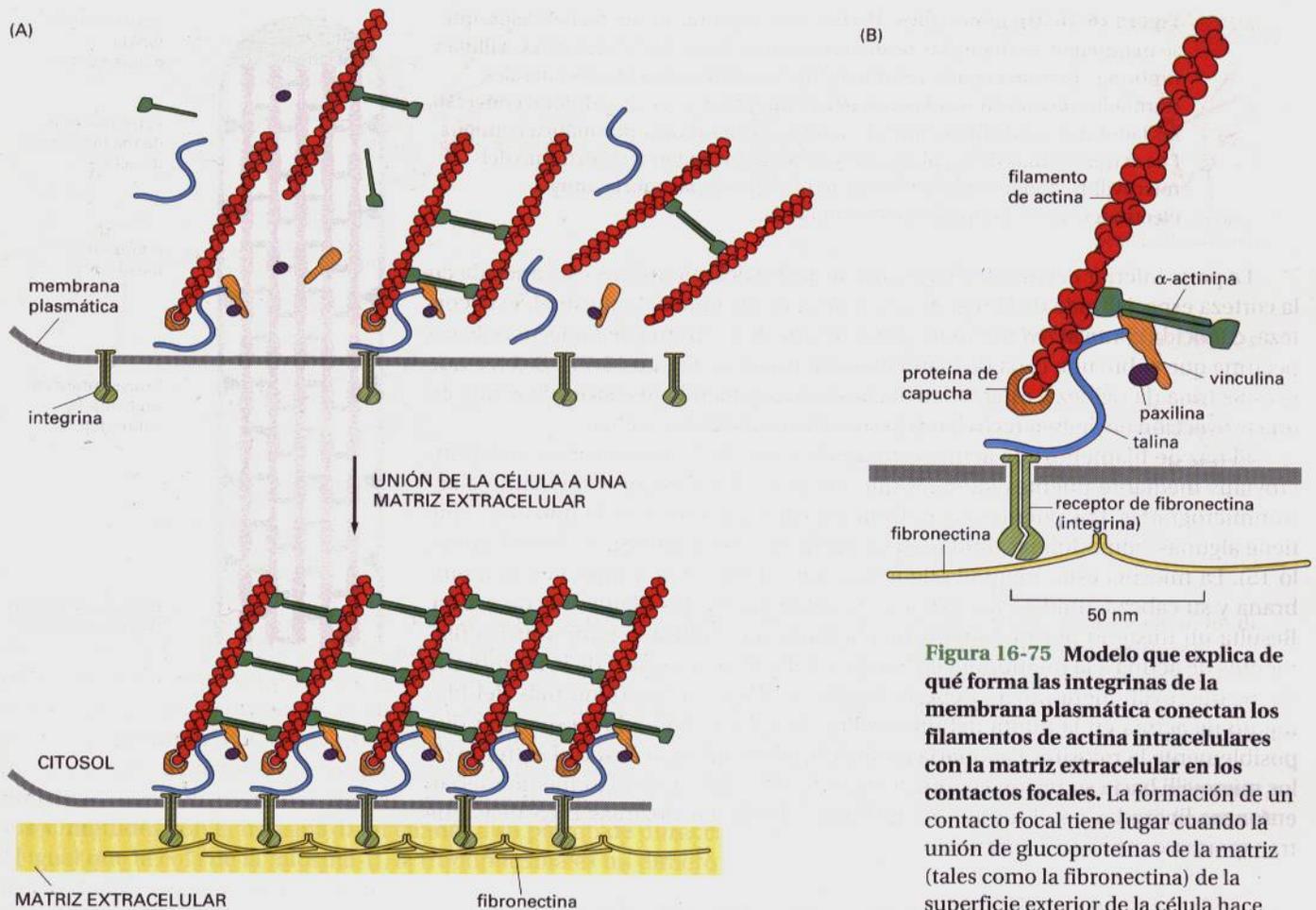
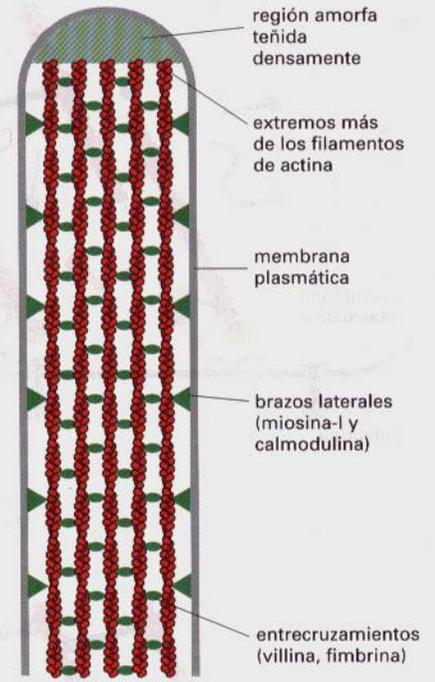


Figura 16-75 Modelo que explica de qué forma las integrinas de la membrana plasmática conectan los filamentos de actina intracelulares con la matriz extracelular en los contactos focales. La formación de un contacto focal tiene lugar cuando la unión de glucoproteínas de la matriz (tales como la fibronectina) de la superficie exterior de la célula hace que las moléculas de integrina se agreguen en el lugar de contacto, tal como se ilustra esquemáticamente en (A). En (B) se muestra una posible disposición de las proteínas de unión intracelular que median la unión entre una integrina y un filamento de actina.

área superficial. Por ejemplo, una sola célula epitelial del intestino delgado humano tiene varios miles de microvilli en su superficie apical. Cada uno de ellos tiene aproximadamente $0,08 \mu\text{m}$ de ancho y $1 \mu\text{m}$ de largo, de forma que la superficie de absorción de la célula es 20 veces mayor de lo que sería sin los microvilli. La membrana plasmática que recubre estos microvilli está altamente especializada, y contiene una gruesa cubierta extracelular de polisacáridos y de enzimas digestivas. El citoesqueleto de los microvilli ha sido estudiado con detalle —labor que no ha sido difícil ya que se trata de una estructura altamente especializada, comparada con las regiones menos especializadas del córtex celular.

La zona central de cada microvillus intestinal contiene un haz rígido de entre 20 y 30 filamentos paralelos de actina que se extiende desde la punta del microvillus hasta el interior de la corteza celular. Todos los filamentos de actina del haz están orientados de forma que sus extremos más apuntan hacia fuera del cuerpo celular y se mantienen unidos a intervalos regulares mediante proteínas formadoras de haces de actina. Aunque la fimbrina, la proteína formadora de haces de actina en las microespinas y los filopodios, interviene en la formación de los filamentos de actina en los microvilli, la proteína formadora de haces de actina más importante es la **villina**, que se encuentra únicamente en los microvilli (Figura 16-76). La villina, igual que la fimbrina, entrecruza filamentos de actina en haces paralelos, pero tiene una secuencia de unión a la actina diferente. Cuando se introduce villina en un cultivo de fibroblastos, los cuales normalmente no presentan villina y sólo tienen unos cuantos microvilli pequeños, los microvilli existentes se convierten en microvilli alargados y estabilizados e incluso se puede inducir la aparición de nuevos microvilli. Estos datos sugieren que la villina es principalmente la responsable de la formación de los largos microvilli de las células epiteliales.

Figura 16-76 Un microvillus. Un haz de filamentos de actina paralelos, que se mantienen mediante las proteínas formadoras de haces de actina –villina y fimbrina– forman la parte central de un microvillus. Los brazos laterales (formados de miosina-I y la proteína de unión al Ca^{2+} , calmodulina) conectan los lados del haz de filamentos de actina a la membrana plasmática contigua. Los extremos más de los filamentos de actina se hallan en el extremo del microvillus, donde están inmersos en una sustancia amorfa, muy electrodensa, de composición desconocida.



La parte inferior del haz de filamentos de actina del microvillus está anclada en la corteza especializada de la región apical de la célula epitelial intestinal. Esta corteza, conocida como la *red terminal*, contiene una densa trama de moléculas de espectrina que cubre una capa de filamentos intermedios (Figura 16-77). Se cree que la espectrina da rigidez y estabilidad al córtex, manteniendo los haces de actina en una proyección en ángulo recto hacia la superficie apical de la célula.

El haz de filamentos de actina está unido a la membrana plasmática del microvillus mediante puentes laterales que pueden ser observados mediante electronmicrografía. Los puentes están formados por una forma de la miosina-I que tiene algunas calmodulinas unidas en la región de su cola (discutido en el Capítulo 15). La miosina está orientada de forma que su cola está inmersa en la membrana y su cabeza, unida a un ATP activo, contacta con los filamentos de actina. Resulta un misterio por qué una proteína motora es utilizada para unir los filamentos de actina a la membrana de los microvilli. Si la miosina-I de la membrana de los microvilli fuera móvil, debería desplazarse hacia el extremo más del filamento de actina en la punta del microvillus. Esto ha conducido a especular que posiblemente la miosina-I ayudaría a transportar membrana desde el extremo de los microvilli hacia su región central, formando vesículas en su extremo que serían entonces liberadas en el lumen del intestino, donde las enzimas digestivas que transportan continúan su acción.

El comportamiento de la corteza celular depende de un equilibrio de interacciones cooperativas y competitivas entre una gran colección de proteínas de unión a la actina

Los ejemplos precedentes muestran que un mismo filamento de actina puede unirse a diferentes tipos de proteínas de unión a la actina, localizadas en distin-

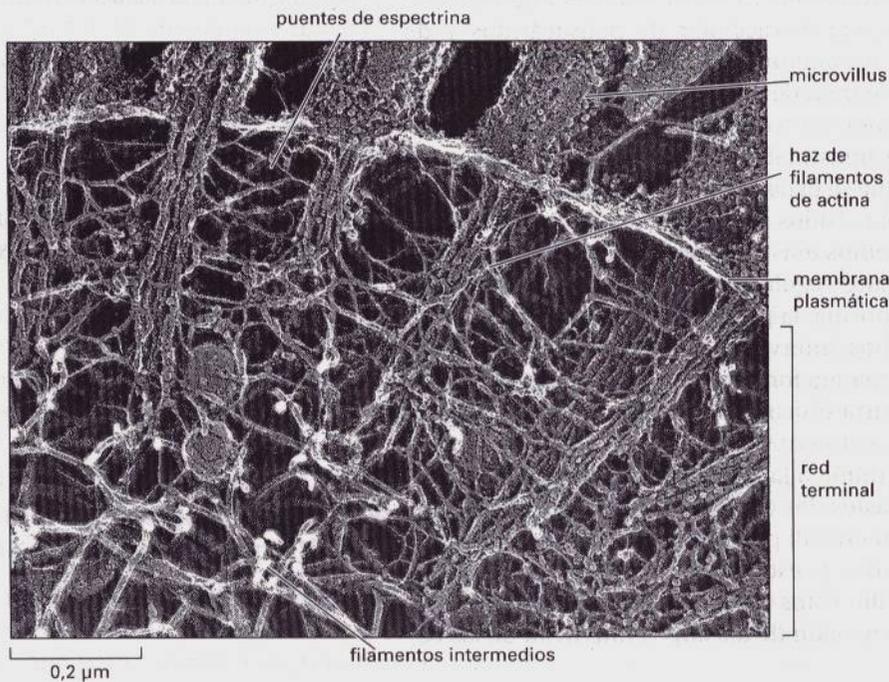
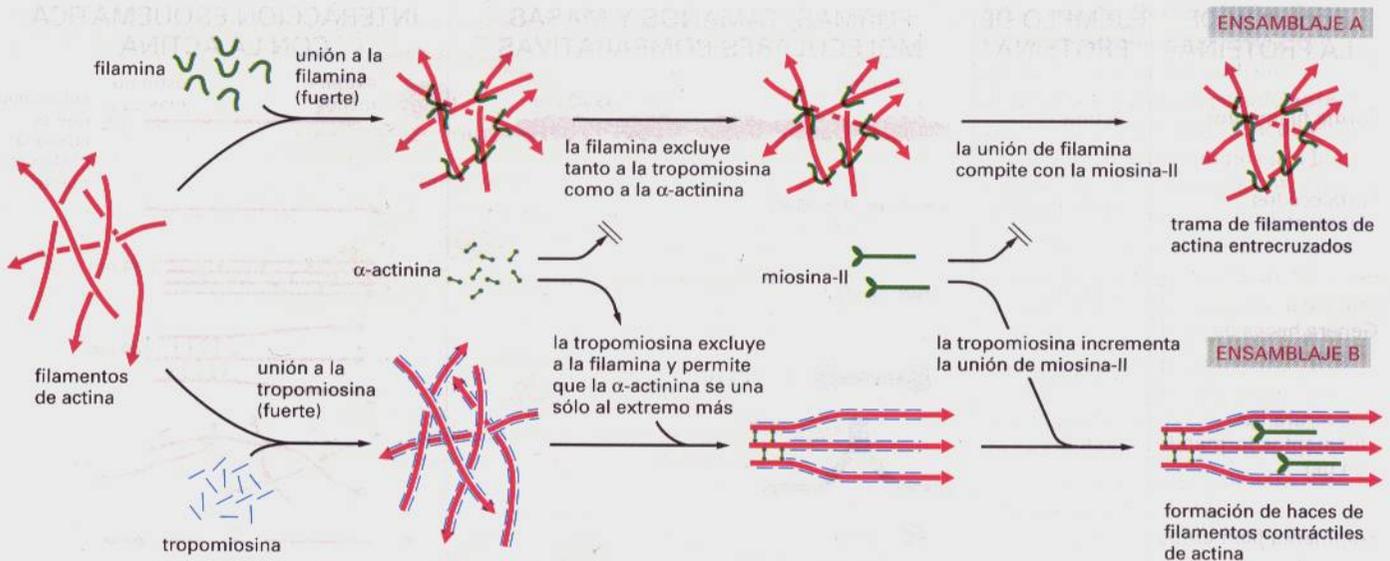


Figura 16-77 Electronmicrografía por congelación de una célula epitelial intestinal, en la que se muestra la red terminal por debajo de la membrana plasmática apical. Los haces de filamentos de actina que forman el núcleo del microvillus se extienden entre la red terminal, donde se unen conjuntamente mediante un grupo complejo de proteínas del citoesqueleto, que incluyen la espectrina y la miosina-II. Por debajo de la red terminal se encuentra una capa de filamentos intermedios. (De N. Hirokawa y J.E. Heuser, *J. Cell Biol.* 91:399-409, 1981. Reproducido con permiso de copyright de The Rockefeller University Press.)

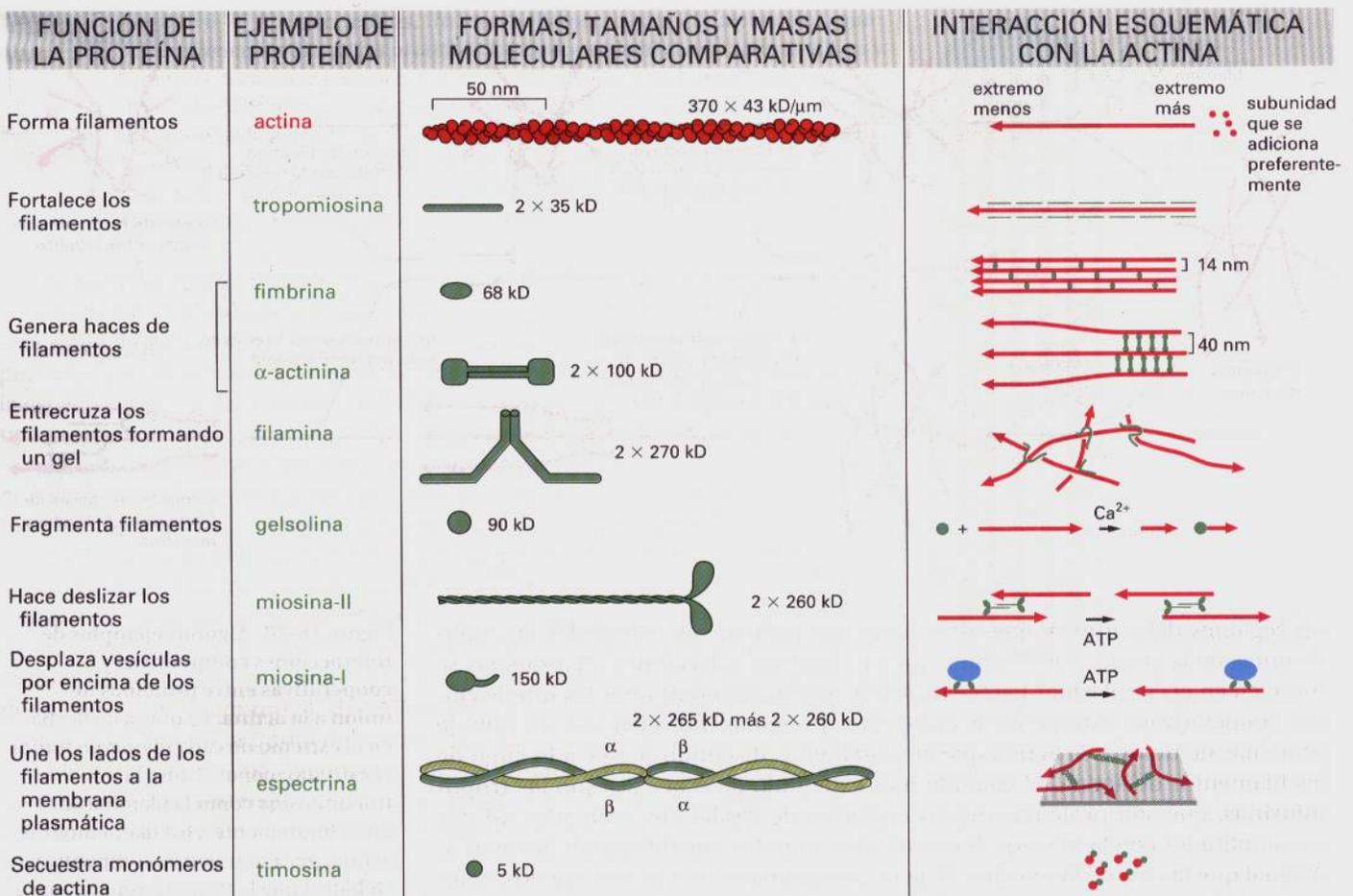


tas regiones del córtex, y que estas proteínas pueden ser segregadas en zonas distintas de la célula. ¿Qué impide que las distintas colecciones de proteínas se mezclen en el citoplasma? Parece probable que sean importantes las interacciones cooperativas y competitivas entre estas proteínas. Por ejemplo, un tipo de proteínas de unión a la actina que aún no hemos discutido se une a lo largo de los filamentos de actina. El ejemplo más extendido de esta clase son las **tropomiosinas**, que son proteínas rígidas en forma de varilla, denominadas así por sus similitudes con la miosina-II en cuanto a su patrón de difracción de rayos X. Al igual que la cola de la miosina-II, la tropomiosina es un dímero con dos cadenas en hélice α idénticas que se enrollan una sobre la otra formando un sobre-enrollamiento. Al unirse a lo largo del filamento de actina, lo estabilizan y le dan consistencia. También inhiben la unión de la filamina a los filamentos de actina, lo cual explica probablemente por qué la tropomiosina y la filamina están distribuidas de forma diferencial en la célula. Por el contrario, la unión de la tropomiosina al filamento de actina incrementa la unión de la miosina-II al filamento —un ejemplo de interacción *cooperativa* (Figura 16-78).

Así ahora podemos empezar a comprender cómo las fibras de estrés y las redes corticales de filamentos de actina pueden coexistir en un mismo citoplasma. En un lado de la célula —quizás nucleados en las adhesiones focales que se forman por la influencia de la proteína Rho activada— la tropomiosina, la miosina-II, y la α -actinina se asocian con los filamentos de actina e impiden la unión de la filamina; entonces, la actividad contráctil de la miosina-II favorece cambios en la organización que comportan la producción de las fibras de estrés. En otro lugar de la célula los filamentos de actina, deficientes en tropomiosina, se unen a la filamina, y producen una red laxa que proporciona un bajo número de lugares donde la α -actinina puede unirse a dos filamentos a la vez, con lo cual queda excluida; la inclinación de los filamentos en una red laxa también puede impedir la unión de la tropomiosina, que prefiere los filamentos rígidos. Aunque esta explicación es parcialmente especulativa, puede ilustrar la vía básica por la cual una combinación de interacciones cooperativas y competitivas puede producir disposiciones de los filamentos de actina espacialmente diferenciadas en un mismo citoplasma. Se desconoce cómo se establecen estas diferencias locales postuladas que inician la formación de estos ensamblajes. También se desconoce cuántos tipos distintos de disposiciones de los filamentos de actina pueden coexistir en una célula —hay ciertamente algunos más de los dos que hemos mencionado.

En la Figura 16-79 se resumen algunas de las proteínas de unión a la actina discutidas en esta sección.

Figura 16-78 Algunos ejemplos de interacciones competitivas y cooperativas entre proteínas de unión a la actina. La punta de flecha en el extremo de cada filamento indica el extremo de cada filamento. Tanto la tropomiosina como la filamina se unen fuertemente a los filamentos de actina, pero su unión es competitiva. Debido a que la tropomiosina se une a los filamentos de actina de forma cooperativa, tanto la tropomiosina como la filamina predominan sobre largas zonas de la red de filamentos de actina. Otras proteínas de unión a la actina, como la α -actinina y la miosina, serán excluidas de sus lugares específicos por interacciones competitivas. Así, por ejemplo, la α -actinina se une *in vitro* a todo lo largo de los filamentos purificados de actina pero en la célula, debido a la competencia con otras proteínas, solamente se une de forma muy débil a los filamentos de actina, en los que está confinada a lugares cercanos a los extremos más. Alternativamente, la unión puede verse reforzada a través de uniones cooperativas; así, la tropomiosina incrementa la unión de la miosina a los filamentos de actina. Se cree que las múltiples interacciones que se producen entre los diferentes tipos de proteínas de unión a actina son los responsables de la compleja variedad de redes de actina encontradas en todas las células eucariotas (véase Figura 16-79 para las claves de los símbolos).



La migración de las células animales comporta tres subprocesos distintos dependientes de actina⁵¹

Los movimientos de deslizamiento de las células animales son de muy difícil explicación a nivel molecular. Diferentes partes de la célula cambian a la vez, y además no hay un único orgánulo locomotor fácilmente identificable (análogo al flagelo, por ejemplo). Aunque la actina es la base de la migración celular animal, puede sufrir diferentes tipos de modificaciones mientras la célula migra, ensamblándose en forma de lamelipodios o microespinas, asociándose con los contactos focales, formando las fibras de estrés y otras muchas estructuras. Un informe completo tendría que dar una explicación molecular a estas transformaciones, explicar cómo están coordinadas en el tiempo y en el espacio y también informar de parámetros bioquímicos importantes tales como el desarrollo de la tensión cortical y la formación de fuertes uniones entre la célula y el substrato.

Hay, a grandes rasgos, tres procesos distintos que pueden identificarse en los movimientos deslizantes de las células animales: la *protrusión*, en que los lamelipodios y las microespinas (o filopodios) se extienden desde la parte anterior de la célula; la *adhesión*, en que el citoesqueleto de actina conecta con el substrato; y la *tracción*, en que el cuerpo celular se mueve hacia adelante.

La protrusión es una función del borde frontal de avance de la célula. Los lamelipodios y las microespinas (o filopodios) ricos en actina se extienden hacia adelante sobre el substrato, proceso que va acompañado de la polimerización de la actina, descrita anteriormente. Parece probable que la protrusión sea conducida por la polimerización de la actina en el borde frontal (Figura 16-58), pero ello aún es discutido. Los motores proteicos del tipo miosina-I se adhieren a la membrana plasmática y podrían conducir a la célula hacia adelante moviéndose activamente a lo largo de los filamentos de actina. Aún existe otra posibilidad,

Figura 16-79 Algunos de los tres tipos de proteínas que se unen a la actina hallados en la mayoría de células de los vertebrados. La actina se muestra en rojo, mientras que las proteínas de unión a la actina se muestran en verde. El peso molecular de cada proteína se da en quilodaltons (kD).

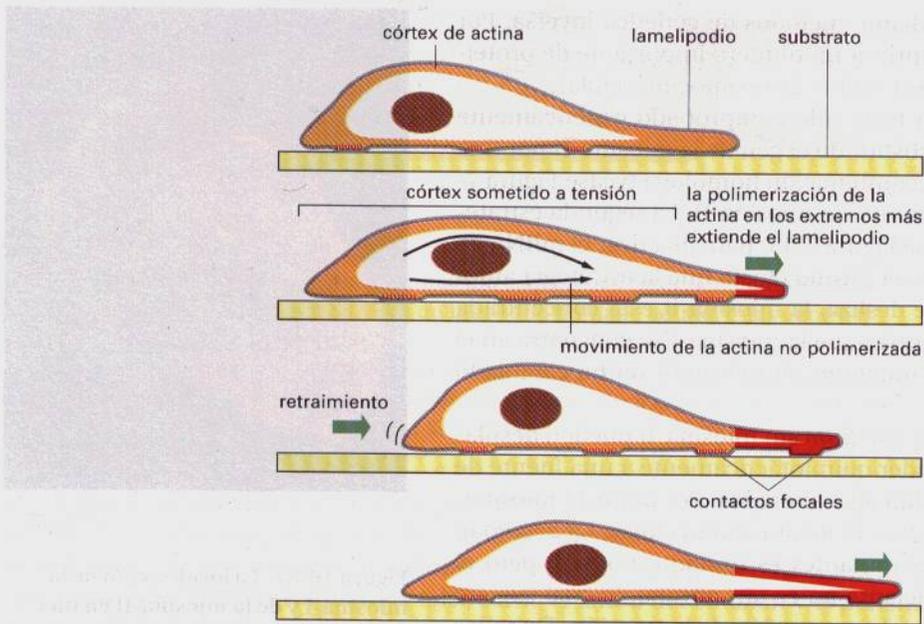


Figura 16-80 Modelo que explica cómo las fuerzas generadas en el córtex rico en actina podrían desplazar la célula hacia adelante. La extensión dependiente de actina y la fijación de un lamelipodio en el borde frontal de avance estirarían el córtex de actina. La tensión cortical dirigiría el cuerpo de la célula hacia adelante disipando parte de la tensión. Se forman nuevos contactos focales y los viejos se desensamblan mientras la célula se mueve hacia adelante. Este mismo ciclo se repetiría una y otra vez, desplazando la célula hacia adelante de una forma gradual. Se muestra en rojo la actina cortical polimerizada nuevamente.

que ha sido sugerida a partir del movimiento de amebas gigantes, y es que las protrusiones aparezcan en el frente celular mediante la presión hidrostática generada por la contracción del córtex celular.

La adhesión al sustrato de los filamentos de actina corticales se ha discutido anteriormente cuando se describían los contactos focales, aunque hay estructuras de adhesión especializadas presentes en los fibroblastos en cultivo que están asociadas a los extremos de las fibras de estrés. Rápidamente las células móviles –como las amebas *Dictyostelium* y los glóbulos blancos– realizan más contactos difusos con el sustrato. Se cree que a estos contactos pueden aplicarse principios similares: receptores transmembrana de proteínas de la matriz extracelular unen la membrana plasmática con el sustrato, y los filamentos de actina del citoplasma interactúan con los dominios citoplasmáticos de estos receptores a través de las proteínas de unión a la actina. Se desconocen aún algunos de los detalles de estas interacciones tan importantes, pero está claro que los contactos celulares con el sustrato deben estar formándose y rompiéndose continuamente mientras la célula se mueve.

La tracción es quizás la parte más enigmática del movimiento celular. En muchos casos se cree que la fuerza para la locomoción celular se genera cerca del extremo anterior de la célula y que el núcleo y el volumen citoplasmático son arrastrados pasivamente en este movimiento. Se puede observar esta fuerza generadora de distintas formas. El extremo anterior de una célula puede contraerse activamente igual que una fibra muscular y entonces tirar de la parte trasera de la célula. Desde otro punto de vista, la polimerización de los filamentos de actina en el borde frontal de avance de la célula extiende también el córtex de actina hacia adelante, y la parte trasera de la célula es entonces arrastrada hacia adelante por la fuerza contráctil resultante de la tensión cortical (Figura 16-80).

El mecanismo de la locomoción celular puede ser diseccionado genéticamente⁵²

Una de las vías más poderosas para analizar el mecanismo de procesos celulares complejos es examinar el efecto de las mutaciones que resultan de supresiones, sobreexpresiones, o modificaciones de proteínas específicas. En el caso del movimiento de las células animales, las células ameboides del mohó del cieno *Dictyostelium* son particularmente adecuadas para los análisis genéticos. Estas células tienen una forma y una manera de desplazarse que está íntimamente relacionada con la de las células de los organismos superiores. Además son haploides y, por

tanto, son fácilmente manipulables mediante métodos de genética inversa. Por tanto, en estas células ha sido posible suprimir un número importante de proteínas de unión a la actina y examinar su efecto sobre la locomoción celular.

Por ejemplo, el papel de la miosina-II ha sido comprobado genéticamente mediante dos métodos. En uno, se ha substituido el gen de la miosina-II por una forma defectiva de este gen, mediante recombinación homóloga (véase Figura 7-47), comportando la aparición de un mutante sin miosina-II. La segunda estrategia es la de utilizar RNA antisentido (véase Figura 7-43) para inactivar el mRNA de la miosina-II, lo cual tiene esencialmente el mismo efecto que la estrategia anterior. En un *Dictyostelium* normal que se desliza, la miosina-II está concentrada cerca de la parte trasera de la célula mientras que la miosina-I se concentra en el extremo anterior (Figura 16-81). En los mutantes, la miosina-I no ha cambiado pero no existe la miosina-II.

Es de destacar que las células de *Dictyostelium* sin miosina-II pueden desplazarse todavía sobre el substrato y responder quimiotácticamente a una fuente de AMP cíclico, aunque ambos procesos están algo alterados. Por tanto, la miosina-II no es absolutamente imprescindible para la locomoción celular. La actividad protrusiva del extremo anterior de tales mutantes es bastante normal, pero el movimiento del cuerpo celular hacia adelante no es tan normal, lo cual sugiere que la miosina-II puede jugar un papel en la generación de la tracción. De todas formas, la miosina-I y la polimerización de la actina pueden conducir la célula hacia adelante a una velocidad razonable sin la ayuda de la miosina-II.

Como era de esperar, las células mutantes son incapaces de formar el anillo contráctil después de la mitosis y entonces se forma una célula gigante multinucleada. Estas células se dividen finalmente utilizando la locomoción celular que las rompe en dos partes. Es interesante especular que esta citocinesis dependiente del movimiento puede representar un mecanismo de división celular primitivo y que la miosina-II podría haber evolucionado a partir de la miosina-I mediante selección natural, formando un aparato citocinético más eficiente.

Resumen

Las múltiples formas y variadas funciones de la actina en las células eucariotas dependen de un repertorio versátil de proteínas de unión a la actina que entrecruzan los filamentos de actina formando geles laxos, los unen en forma de haces rígidos, los adhieren a la membrana plasmática, o los desplazan a la fuerza uno respecto al otro. Por ejemplo, la tropomiosina se une a lo largo de los filamentos de actina, convirtiéndolos en estructuras más rígidas y alterando su afinidad hacia otras proteínas. La filamina entrecruza los filamentos de actina formando geles laxos. La fimbrina y la α -actinina forman haces de filamentos de actina paralelos. La gelsolina media una fragmentación dependiente de Ca^{2+} de los filamentos de actina, lo que provoca la solación de los geles de actina. Diversas formas de miosina utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para desplazarse a lo largo de los filamentos de actina, transportando orgánulos rodeados de membrana de una región a otra de la célula o desplazando filamentos de actina adyacentes, uno contra otro. Se cree que colecciones de proteínas de unión a la actina actúan cooperativamente generando movimientos de la superficie celular, incluyendo la citocinesis, la fagocitosis y la locomoción celular. Estos movimientos son difíciles de analizar a causa de los muchos componentes implicados en ellos, pero aproximaciones genéticas, en las cuales se han mutado los genes que codifican proteínas de unión a la actina específicas, pueden mostrar la función individual de las proteínas en cada proceso.

El músculo⁵³

Muchas de las proteínas que se asocian a los filamentos de actina en las células eucariotas fueron descubiertas por primera vez en el músculo. La contracción muscular es el movimiento más familiar y mejor conocido de todos los tipos de

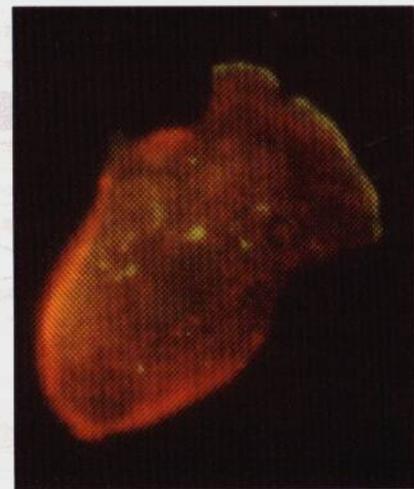
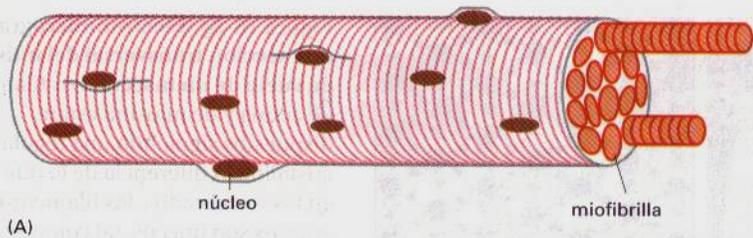
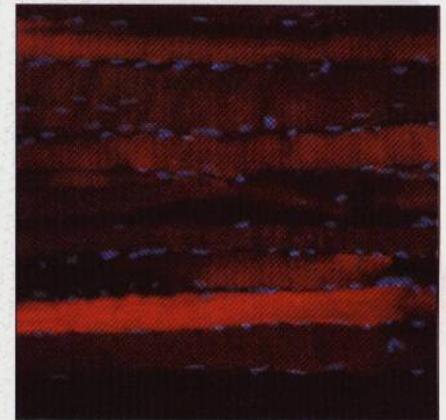


Figura 16-81 La localización de la miosina-I y de la miosina-II en una ameba deslizando normal de *Dictyostelium*. Se han marcado las dos formas de la miosina con anticuerpos específicos, cada uno acoplado a un marcador fluorescente distinto, y se han observado con el microscopio de fluorescencia. La miosina-II (rojo) se presenta a una elevada acumulación en el córtex posterior, mientras que la miosina-I (verde) está principalmente restringida al extremo anterior. También puede verse algo de miosina en vesículas endocíticas dentro del citoplasma. (Por cortesía de Yoshio Fukui.)



(A)

Figura 16-82 Células del músculo esquelético (también denominadas fibras musculares). (A) En un individuo humano adulto, estas enormes células plurinucleadas tienen típicamente 50 μm de diámetro y pueden llegar a tener algunos centímetros de longitud. (B) Micrografía fluorescente que muestra la localización periférica del núcleo en el músculo de la rata (*azul*). (B, por cortesía de Nancy L. Kedersha.)

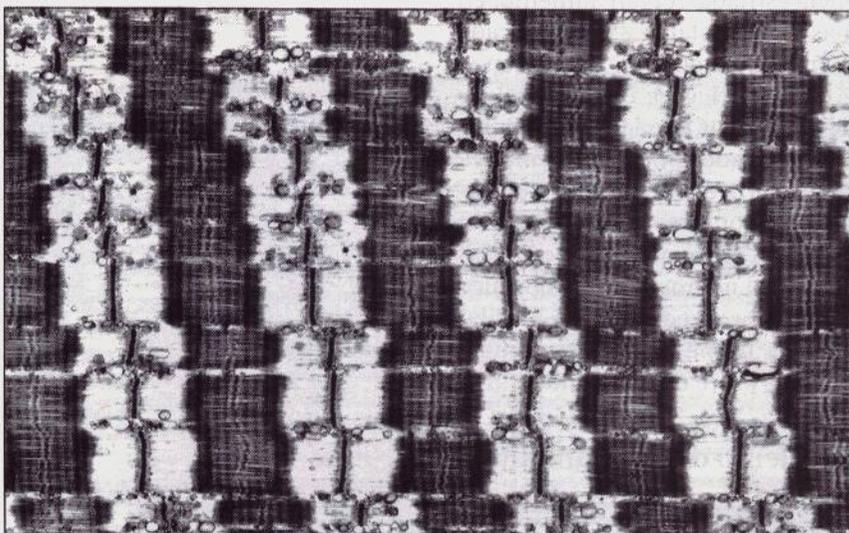


(B)

50 μm

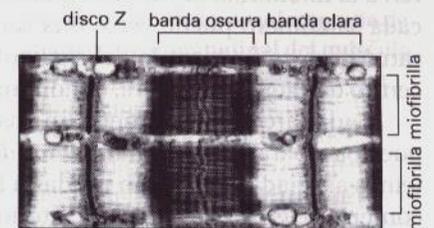
movimiento de que son capaces los animales. En los vertebrados, por ejemplo, el correr, el andar, el nadar y el volar son dependientes de la capacidad del *músculo esquelético* de contraerse rápidamente en su andamiaje de hueso, mientras que los movimientos involuntarios tales como el latido del corazón y el peristaltismo del intestino, dependen de la contracción del *músculo cardíaco* y del *músculo liso*, respectivamente.

Figura 16-83 Miofibrillas del músculo esquelético. (A) Electronmicrografía a bajos aumentos de una sección longitudinal de una fibra muscular esquelética de conejo, mostrando el patrón regular de bandas transversales. La célula contiene numerosas miofibrillas alineadas en paralelo (véase Figura 16-82). (B) Detalle de la fibra muscular esquelética de (A), mostrando porciones de dos miofibrillas adyacentes y la definición de sarcómero. (C) Diagrama esquemático de un sarcómero, mostrando el origen de las bandas oscuras y de las bandas claras observadas en las electronmicrografías. Los discos Z, en cada extremo del sarcómero, son los lugares de unión de los filamentos delgados (filamentos de actina); la línea M, o línea media, es el lugar donde se localizan las proteínas específicas que unen los filamentos gruesos adyacentes (filamentos de miosina-II) unos con otros. Las *bandas verdes anchas*, que marcan la localización de los filamentos gruesos, son denominadas a veces *bandas A*, porque aparecen como anisótropas a la luz polarizada (es decir, su índice de refracción varía con el plano de polarización). Las *bandas rojas delgadas*, formadas únicamente por filamentos delgados y con una densidad de proteínas menor, son relativamente isotrópicas a la luz polarizada, y a veces se denominan *bandas I*. (A y B, por cortesía de Roger Craig.)



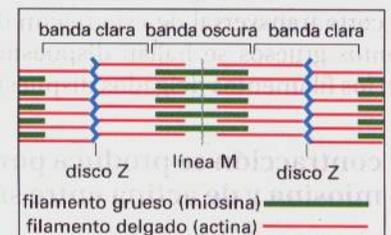
(A)

2 μm



(B)

sarcómero ~2,2 μm



(C)

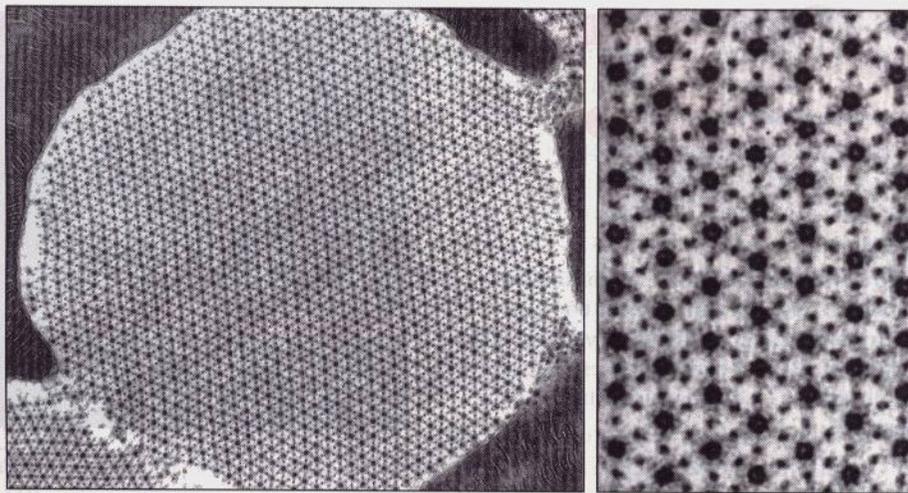


Figura 16-84 Electronmicrografía de una sección transversal del músculo de vuelo de un insecto. Los filamentos de actina y de miosina están dispuestos siguiendo una regularidad cristalina. A diferencia de lo que ocurre en los vertebrados, los filamentos gruesos son huecos, tal como se observa en la ampliación de la derecha. En la Figura 16-86 se muestra una sección longitudinal del músculo. La geometría de la trama hexagonal es ligeramente diferente en el músculo de los vertebrados. (De J. Auber, *J. de Microsc.* 8:197-232, 1969.)

Aunque el músculo es el ejemplo mejor comprendido del movimiento basado en la actina, fue desarrollado relativamente tarde en la evolución y está altamente especializado si lo comparamos en las diversas células animales. En particular, las unidades contráctiles de las células musculares, basadas en la actina y en la miosina, las *miofibrillas*, no son lábiles como las estructuras basadas en la actina y en la miosina de las células no musculares.

Las miofibrillas están formadas por ensamblajes repetitivos de filamentos gruesos y delgados⁵⁴

Las esbeltas *fibras musculares* del músculo esquelético son enormes células individuales formadas durante el desarrollo embrionario, resultantes de la fusión de células individuales (discutido en el Capítulo 22). El núcleo de las células integrantes permanece en esta gran célula y se dispone justo debajo de la membrana plasmática. Pero la mayor parte del citoplasma (unas dos terceras partes de su masa) está formado por **miofibrillas**, que son los elementos contráctiles de la célula muscular. Las miofibrillas son estructuras cilíndricas de 1 a 2 μm de diámetro, que a menudo son tan largos como la célula muscular (Figura 16-82).

Cada miofibrilla está formada por una cadena de minúsculas unidades contráctiles, o **sarcómeros**, cada uno de ellos de unas 2,2 μm de longitud, que confieren a la miofibrilla de los vertebrados su apariencia estriada. A gran aumento, en cada sarcómero puede verse una serie de anchas bandas claras y oscuras; cada sarcómero está separado del siguiente por una línea electrodensa, situada en el centro de cada banda clara, denominada línea Z o *disco Z* (Figura 16-83).

Cada sarcómero contiene un ensamblaje de filamentos parcialmente superpuestos y paralelos. Los *filamentos delgados* están formados por actina con proteínas asociadas que están unidas a los discos Z en uno de los extremos del sarcómero. Se extienden hacia el interior del sarcómero, donde se superponen con los filamentos gruesos, que son polímeros de isoformas de la miosina-II específicas del músculo (Figura 16-83C). Cuando se observa al microscopio electrónico un corte transversal de esta región de superposición, se puede ver que los filamentos gruesos se hallan dispuestos siguiendo una trama hexagonal regular, con los filamentos delgados dispuestos regularmente entre ellos (Figura 16-84).

La contracción se produce por el deslizamiento de los filamentos de miosina y de actina entre sí

El acortamiento del sarcómero se produce por el deslizamiento de los filamentos de miosina sobre los de actina, sin que se produzca ningún cambio en la lon-

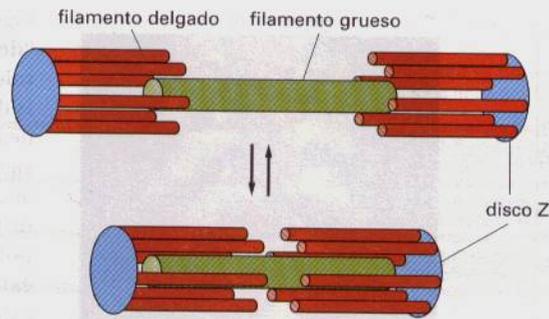


Figura 16-85 Modelo de deslizamiento de los filamentos de la contracción muscular. Los filamentos de actina y de miosina se deslizan unos sobre otros, sin que se reduzca su longitud.

gitud de cada tipo de filamento (Figura 16-85). Este *modelo de deslizamiento de los filamentos*, propuesto por primera vez en 1954, fue crucial para entender el mecanismo de la contracción muscular.

En las micrografías electrónicas a gran aumento se puede observar la base ultraestructural de la interacción generadora de la fuerza. Se puede observar cómo los filamentos de miosina presentan numerosos brazos laterales diminutos, o *puentes cruzados*, que atraviesan la separación de unos 13 nm, entrando en contacto con los filamentos de actina adyacentes (Figura 16-86). Estos puentes cruzados son las cabezas de la miosina-II, y cuando el músculo se contrae, los filamentos de actina y de miosina se empujan los unos a los otros mediante la acción cíclica de los puentes cruzados, a modo de baterías de diminutos remos.

Como ya hemos mencionado anteriormente, la cabeza globular, o dominio motor, de la molécula de miosina-II se une a los filamentos de actina e hidroliza ATP. Las cabezas de miosina-II aisladas, que pueden prepararse mediante digestión con papaína, retienen tanto la actividad ATPasa como las propiedades de unión al filamento de actina y pueden utilizarse para analizar la interacción entre la actina y la miosina.

Cada molécula de actina de un filamento es capaz de unir una cabeza de miosina-II formando un complejo que permite ver la polaridad estructural del filamento de actina. Mediante tinciones negativas, estos complejos se pueden observar al microscopio electrónico y tienen una forma regular y característica: cada cabeza de miosina forma una proyección lateral y la imagen superpuesta de muchas de estas proyecciones toma la apariencia de unas cabezas de flecha a lo largo de los filamentos de actina. El *extremo puntiagudo* creado por estas fle-

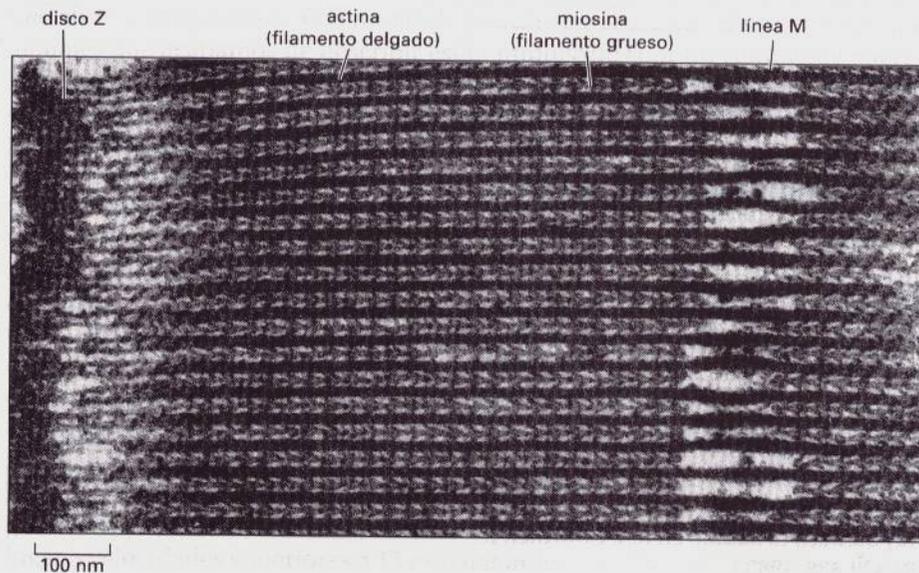


Figura 16-86 Electronmicrografía de una sección longitudinal del músculo de vuelo de un insecto. Esta sección ultrafina muestra claramente la alternancia entre los filamentos de actina y de miosina, así como los puentes que los unen. Véase que el músculo de vuelo de un insecto tienen un elevado grado de superposición inusual entre los dos tipos de filamentos. (Por cortesía de Mary C. Reedy.)

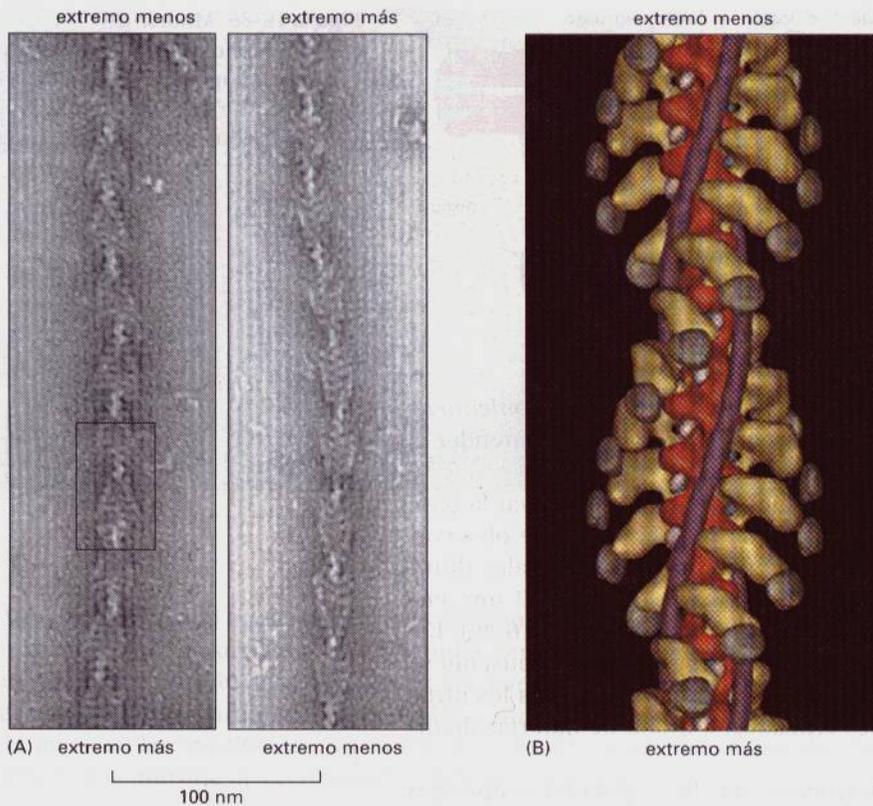


Figura 16-87 Filamentos de actina “decorados” con cabezas aisladas de miosina. (A) En la electronmicrografía la disposición helicoidal de las cabezas de miosina unidas, inclinadas siguiendo una sola dirección, confiere al conjunto una apariencia de puntas de flecha y pone de manifiesto la polaridad del filamento de actina. El extremo de la punta corresponde al *extremo menos*, mientras que el extremo ancho corresponde al *extremo más*. (B) Reconstrucción tridimensional a partir de las micrografías electrónicas, de un filamento de actina decorado de una manera parecida. La región que se muestra corresponde al área marcada en (A). El filamento de actina se muestra en *rojo*, las cabezas de miosina son *amarillas*, las cadenas ligeras de miosina son *grises*, y la posición de la tropomiosina se muestra en *morado*. (A, por cortesía de Roger Craig; B, por cortesía de Ron Milligan.)

chas de miosina corresponde al extremo “menos”, de crecimiento lento, del filamento de actina descrito anteriormente (véase pág. 880). El otro, *el extremo barbado*, corresponde al extremo “más”, de crecimiento rápido (Figura 16-87).

Como se muestra en la Figura 16-88, las cabezas de miosina se orientan en direcciones opuestas a cada lado de la zona central desnuda del filamento de

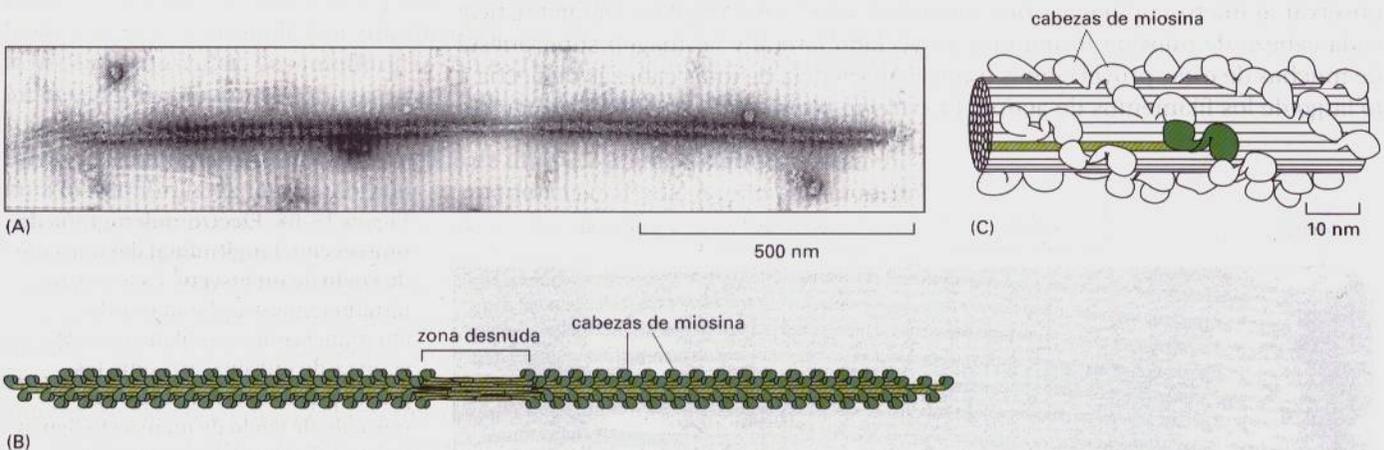


Figura 16-88 El filamento grueso de miosina. (A) Electronmicrografía de un filamento grueso de miosina-II aislado de un músculo de rana. Nótese la zona central desnuda. (B) Diagrama esquemático, no dibujado a escala. Las moléculas de miosina-II se agregan conjuntamente a través de sus colas, de forma que sus cabezas se proyectan hacia el exterior. La zona desnuda del centro del filamento está formada enteramente por colas de miosina-II. (C) Pequeña sección de un filamento de miosina-II, reconstruido a partir de electronmicrografías. Se ha dibujado en *verde* una molécula individual de miosina. (A, por cortesía de Murray Stewart; C, basado en R.A. Crowther, R. Padron, y R. Craig, *J. Mol. Biol.* 184:429-439, 1985.)

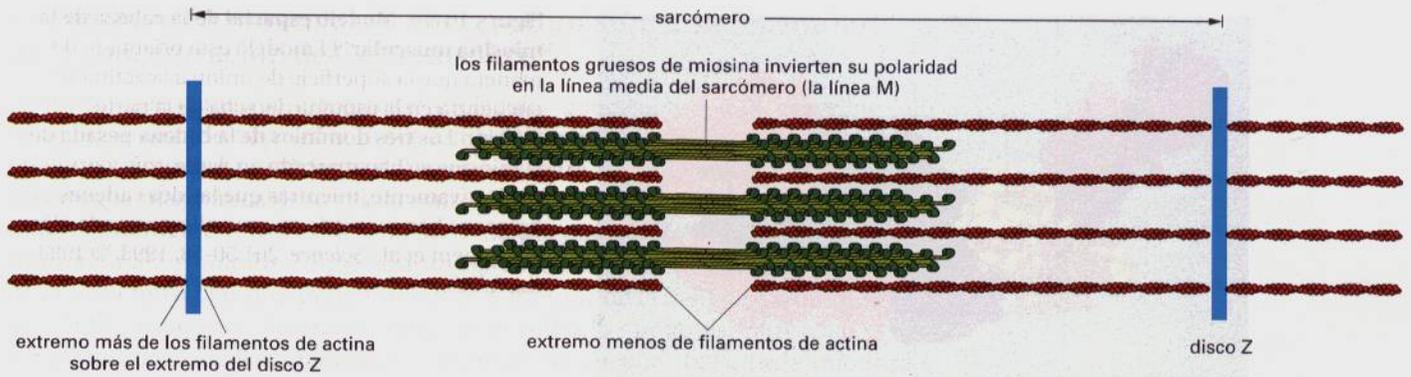


Figura 16-89 A cada lado de la línea media de un sarcómero los filamentos de miosina y de actina se solapan con la misma polaridad relativa.

miosina-II. Dado que las cabezas deben interactuar con los filamentos de actina en la región de solapamiento, los filamentos de actina han de tener polaridades opuestas a cada lado del sarcómero. Esto ha sido demostrado utilizando cabezas de miosina para “decorar” los filamentos de actina unidos a discos Z aislados. Se encontró que todas las puntas de flecha de la miosina apuntaban en dirección opuesta a las bandas Z mientras que los extremos menos apuntaban hacia los filamentos de miosina (Figura 16-89).

Las cabezas de miosina “caminan” hacia el extremo menos de los filamentos de actina⁵⁵

La contracción muscular está impulsada por la interacción entre las cabezas de miosina y los filamentos de actina adyacentes. Durante esta interacción, la cabeza de miosina hidroliza ATP. La hidrólisis del ATP y la disociación consiguiente de los productos fuertemente unidos (ADP i P_i) producen una serie ordenada de cambios alostéricos en la conformación de la miosina. Como resultado de todo ello, parte de la energía liberada se acopla a la producción de movimiento. Un mayor avance en la comprensión de estos cambios en la estructura proteica y también en la comprensión de cómo la hidrólisis del ATP está acoplada al movimiento direccionado de la molécula de miosina, se obtuvo con la determinación de la estructura tridimensional de la cabeza de la miosina mediante difracción de rayos X (Figura 16-90). Con éstos y otros datos, esta estructura sugiere que el movimiento unidireccional se genera mediante la secuencia de acontecimientos ilustrada en la Figura 16-91.

Dado que cada vuelta del ciclo que se ilustra en la Figura 16-91 resulta de la hidrólisis y liberación de una molécula de ATP, las series de cambios conformacionales que acabamos de describir están impulsados por un cambio de energía libre muy favorable, que los hace unidireccionales. Por consiguiente, cada molécula de miosina “camina” en una única dirección a lo largo del filamento de actina adyacente, desplazándose siempre hacia el extremo más del filamento (véase Figura 16-89). Al sufrir un cambio cíclico de conformación, la cabeza de miosina va estirando el filamento de actina, haciendo que éste se deslice sobre el filamento de miosina. Cuando una cabeza individual de miosina se ha separado del filamento de actina, es arrastrada por la acción de las otras cabezas de miosina del mismo filamento de miosina, de modo que una fotografía instantánea de todo un filamento de miosina de un músculo en contracción mostraría algunas de las cabezas de miosina unidas a los filamentos de actina, mientras que otras estarían separadas. (Para que esto suceda es esencial que exista un cierto grado de elasticidad en el salto de las moléculas de miosina.) Cada filamento de miosina tiene aproximadamente unas 300 cabezas de miosina (294 en el músculo de la rana); en una contracción rápida cada una de ellas realiza unos 5 ciclos por segundo —el deslizamiento de los filamentos de miosina sobre los de actina tiene lugar a velocidades superiores a 15 $\mu\text{m}/\text{segundo}$.

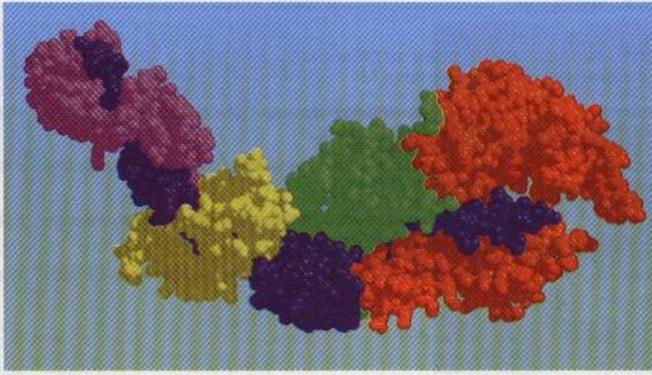
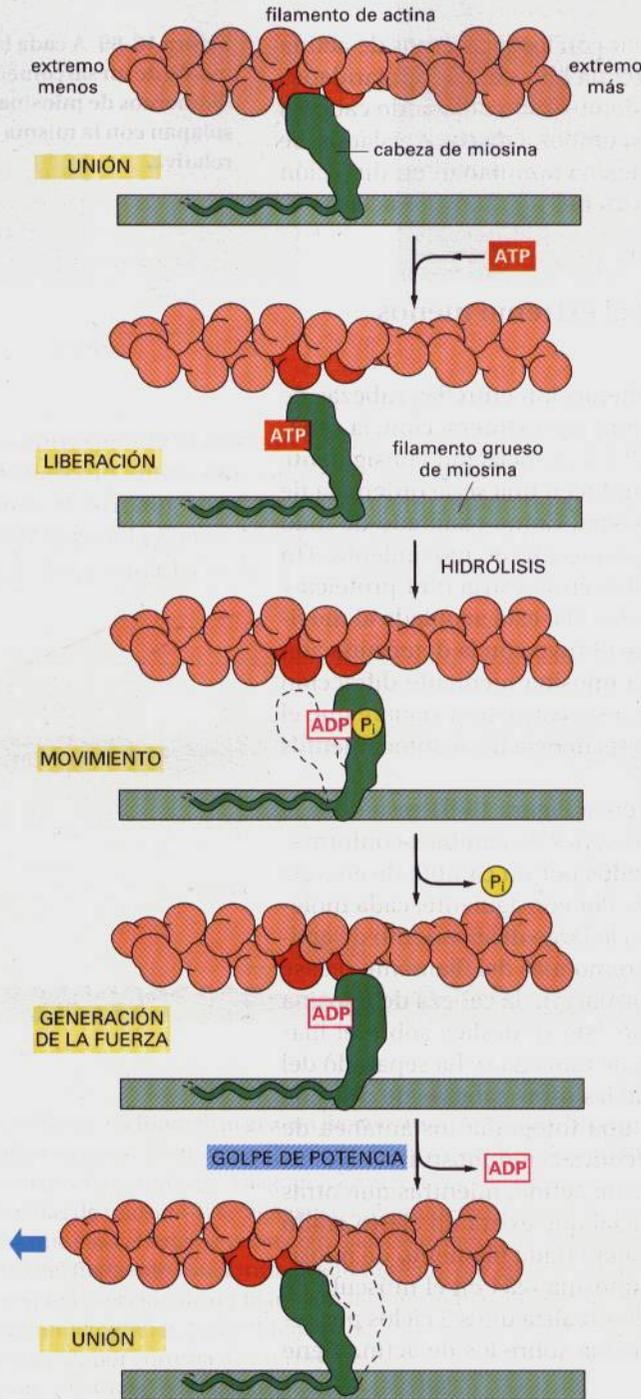


Figura 16-90 Modelo espacial de la cabeza de la miosina muscular. El modelo está orientado de manera que la superficie de unión a la actina se encuentra en la esquina derecha de la parte inferior. Los tres dominios de la cadena pesada de la miosina se han marcado en *verde, rojo y azul*, respectivamente, mientras que las dos cadenas ligeras se han marcado en *amarillo y morado*. (De I. Rayment et al., *Science*, 261:50-58, 1993. © 1993 the AAAS.)



UNIÓN—Al iniciarse el ciclo que se muestra en la figura, una cabeza de miosina, sin ningún nucleótido unido, se une fuertemente a un filamento de actina en una configuración de *rigor* (así llamada porque es la responsable del *rigor mortis*, la rigidez de la muerte). En un músculo en contracción activa este estado es de corta duración y finaliza rápidamente mediante la unión de una molécula de ATP.

LIBERACIÓN—Una molécula de ATP se une en el surco de la “parte trasera” de la cabeza (es decir, en la parte más alejada del filamento de actina) e inmediatamente provoca un cambio ligero en la conformación de los dominios, que libera el lugar de unión a la actina (véase Figura 16-90). Esto reduce la afinidad de la cabeza por la actina y le permite desplazarse a lo largo del filamento. (El espacio aquí dibujado entre la cabeza y la actina enfatiza este cambio, aunque en la realidad probablemente se mantiene muy cerca de la actina.)

MOVIMIENTO—El surco se cierra como la concha de una almeja alrededor de la molécula de ATP, induciendo un gran cambio morfológico que provoca el desplazamiento de la cabeza a lo largo del filamento a una distancia de unos 5 nm. Se produce la hidrólisis del ATP, pero el ADP y el P_i producidos se mantienen íntimamente unidos a la proteína.

GENERACIÓN DE LA FUERZA—La unión débil de la cabeza de miosina a un nuevo lugar en el filamento de actina provoca la liberación del fosfato inorgánico producido por la hidrólisis del ATP, con lo cual se refuerza la unión de la cabeza con la actina. Esta liberación proporciona el golpe de potencia —el cambio de forma generado por la fuerza durante el cual la cabeza recupera su conformación original. Durante el golpe de potencia, la cabeza pierde el ADP unido y se inicia un nuevo ciclo.

UNIÓN—Al final del ciclo, la cabeza de miosina se encuentra de nuevo íntimamente unida al filamento de actina en la configuración de *rigor*. Nótese que la cabeza se ha desplazado hacia una nueva posición en el filamento de actina.

Figura 16-91 El ciclo de cambios por los cuales una molécula de miosina “camina” a lo largo de un filamento de actina. (Basado en I. Rayment et al., *Science* 261:50-58, 1993. © 1993 the AAAS.)

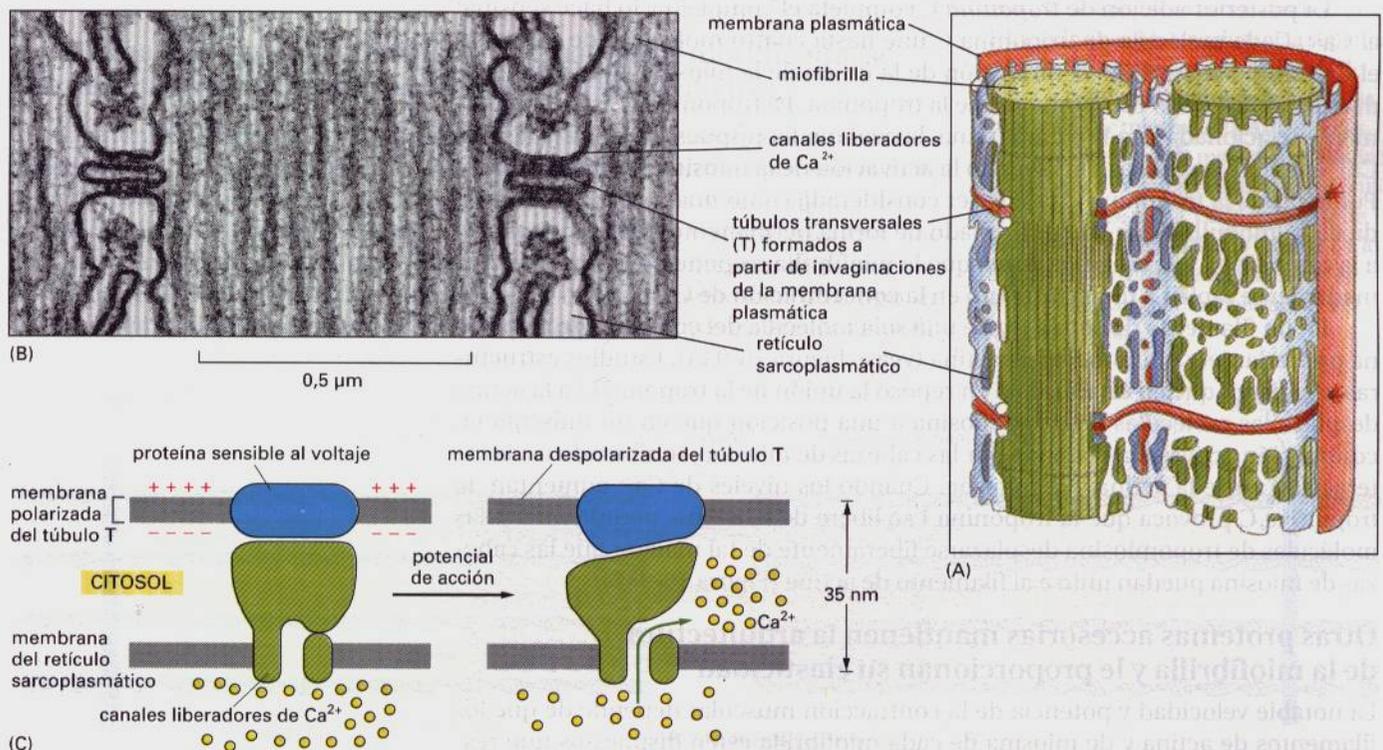
La contracción muscular se inicia por un aumento repentino de la concentración de Ca^{2+} citosólico⁵⁶

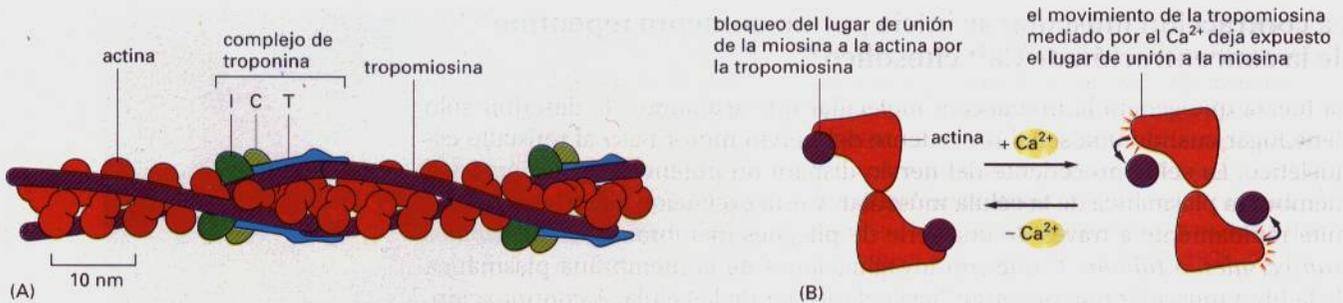
La fuerza que genera la interacción molecular que acabamos de describir sólo tiene lugar cuando una señal procedente del nervio motor pasa al músculo esquelético. La señal procedente del nervio dispara un potencial de acción en la membrana plasmática de la célula muscular, y esta excitación eléctrica se transmite rápidamente a través de una serie de pliegues membranosos, los *túbulos transversales*, o *túbulos T*, que son invaginaciones de la membrana plasmática de la fibra muscular que penetran hacia el interior de la célula. A continuación, la señal se transfiere, de alguna manera, al **retículo endoplasmático**, una capa adyacente de vesículas aplanadas y anastomosadas que rodea cada miofibrilla como una funda (Figura 16-92A).

En la región de unión, grandes *canales de liberación de Ca^{2+}* se extienden como pilares desde la membrana del retículo endoplasmático contactando con la membrana del túbulo T del otro lado (Figura 16-92C). Cuando diversas proteínas sensibles al voltaje en la membrana del túbulo T se activan por el incremento del potencial de acción, desencadena la apertura de alguno de los canales de liberación de calcio, probablemente mediante un acoplamiento mecánico directo. Entonces, los iones Ca^{2+} se escapan del retículo endoplasmático (donde se almacenan en grandes cantidades) al lugar de la unión, provocando que se abran más canales de liberación de calcio, con lo cual se amplifica la respuesta. El flujo de iones Ca^{2+} en dirección al citosol, inicia la contracción de cada una de las miofibrillas.

La señal se transmite desde la membrana plasmática de la fibra muscular hasta cada sarcómero, en cuestión de milisegundos (vía los túbulos T y el retículo endoplasmático), por lo que todas las miofibrillas se contraen simultáneamente. El incremento de la concentración de Ca^{2+} es transitorio, ya que el Ca^{2+} es rápidamente bombeado de nuevo hacia el retículo endoplasmático mediante una ATPasa dependiente de Ca^{2+} , presente en cantidades abundantes en la membrana de este retículo sarcoplasmático (discutido en el Capítulo 11). Típicamente, la concentración de Ca^{2+} citosólico se restablece hasta sus niveles de reposo, en unos 30 milisegundos, lo cual provoca la relajación de las miofibrillas.

Figura 16-92 Los túbulos T y el retículo sarcoplasmático. (A) Dibujo esquemático de los dos sistemas de membrana que transmiten la señal de contracción desde la membrana plasmática de la fibra muscular a todas las miofibrillas de la célula. (B) Electronmicrografía que ilustra dos túbulos T. Nótese la posición de los grandes canales liberadores de Ca^{2+} en la membrana del retículo sarcoplasmático; parecen "pies" de forma cuadrangular que están conectados a la membrana del túbulo T adyacente. (C) Diagrama esquemático que muestra cómo puede abrirse un canal liberador de Ca^{2+} de la membrana del retículo sarcoplasmático mediante una proteína transmembrana sensible al voltaje localizada en la membrana del túbulo T adyacente. (B, por cortesía de Clara Franzini-Armstrong.)





La troponina y la tropomiosina median la regulación de la contracción del músculo esquelético por el Ca^{2+} ⁵⁷

La dependencia respecto al Ca^{2+} de la contracción muscular de los vertebrados, y por consiguiente su dependencia respecto a las órdenes motoras transmitidas a través de los nervios, es debida exclusivamente a un grupo de proteínas accesorias especializadas, estrechamente asociadas con los filamentos de actina. Si en un tubo de ensayo se mezcla miosina con filamentos de actina purificada, la ATPasa de la miosina se activa tanto si existe Ca^{2+} en el medio como si no; por otro lado, en una miofibrilla normal, en la que los filamentos de actina están asociados a proteínas accesorias, la activación de la ATPasa de la miosina es dependiente de Ca^{2+} .

Una de estas proteínas accesorias es una forma muscular de la *tropomiosina*, la molécula en forma de varilla que hemos introducido anteriormente y que se une al surco de la hélice de actina (véase Figura 16-78). La otra proteína accesorias principal implicada en la regulación del músculo esquelético de los vertebrados por el Ca^{2+} es la *troponina*, un complejo de tres polipéptidos –troponinas T, I, y C (llamadas así por sus actividades de unión a la Tropomiosina, actividad Inhibidora, y de unión al Calcio, respectivamente). El complejo de la troponina tiene forma alargada, con las subunidades C e I formando una región de cabeza globular y la subunidad T formando una cola larga. La cola de *troponina T* se une a la tropomiosina y, al parecer, es la responsable de situar el complejo sobre el filamento delgado (Figura 16-93A). La *troponina I* se une a la actina, y cuando se añade a la troponina T y a la tropomiosina, el complejo inhibe la interacción entre la actina y la miosina, incluso en presencia de Ca^{2+} .

La posterior adición de *troponina C* completa el complejo y lo hace sensible al Ca^{2+} . Cada molécula de troponina C une hasta cuatro moléculas de Ca^{2+} ; con el Ca^{2+} unido se suprime la inhibición de la unión de la miosina a la actina producida por los otros componentes de la troponina. La troponina C está estrechamente relacionada con la calmodulina, la cual media respuestas señalizadas por Ca^{2+} en todas las células, incluyendo la activación de la miosina del músculo liso. Por lo tanto, la troponina C puede ser considerada como una forma especializada de calmodulina que ha desarrollado de forma permanente un lugar de unión a la troponina I y T, asegurando así que la miofibrilla responda de manera extremadamente rápida a un incremento en la concentración de Ca^{2+} .

En un filamento de actina existe una sola molécula del complejo de troponina por cada siete monómeros de actina (véase Figura 16-93A). Estudios estructurales sugieren que en un músculo en reposo la unión de la troponina I a la actina desplaza las moléculas de tropomiosina a una posición que en un músculo en contracción activa está ocupada por las cabezas de miosina, inhibiendo así la interacción entre la actina y la miosina. Cuando los niveles de Ca^{2+} aumentan, la troponina C provoca que la troponina I se libere de la actina, permitiendo a las moléculas de tropomiosina desplazarse liberamente de tal manera que las cabezas de miosina puedan unirse al filamento de actina (Figura 16-93B).

Otras proteínas accesorias mantienen la arquitectura de la miofibrilla y le proporcionan su elasticidad⁵⁸

La notable velocidad y potencia de la contracción muscular depende de que los filamentos de actina y de miosina de cada miofibrilla estén dispuestos uno res-

Figura 16-93 El control de la contracción del músculo esquelético por la troponina. (A) Filamento delgado que muestra la posición de la tropomiosina y de la troponina a lo largo del filamento de actina. Cada molécula de tropomiosina tiene siete regiones de secuencias homólogas, espaciadas regularmente. Se cree que cada una de estas secuencias se une a un monómero de actina, tal como se muestra en el dibujo. (B) Un filamento delgado que ilustra cómo la unión del Ca^{2+} a la troponina se cree que libera el bloqueo de la interacción de la cabeza de la miosina con la actina. (A, adaptada de G.N. Phillips, J.P. Fillers, y C. Cohen, *J. Mol. Biol.* 192: 111-131, 1986.)

pecto al otro a una distancia óptima y en una alineación correcta. La organización exacta de la miofibrilla se mantiene gracias a más de una docena de proteínas estructurales: el orden en que se ensamblan y los controles sobre el proceso son temas importantes de la investigación contemporánea.

Los filamentos de actina están anclados por sus extremos más en el disco Z, donde se mantienen mediante proteínas que forman una trama cuadrangular. Una de las proteínas más importantes de esta región es la α -actinina, proteína que entrecruza la actina, que hemos discutido anteriormente y que es abundante en la mayoría de células animales. Se concentra en la región del disco Z de la miofibrilla (Figura 16-94). Los filamentos de miosina están también mantenidos mediante una trama regular—en este caso, hexagonal—a través de proteínas asociadas que se unen en la zona media, a lo largo de los filamentos gruesos bipolares.

Las células del músculo esquelético contienen dos proteínas extraordinariamente abundantes, llamadas *titina* y *nebulina*, que forman una red de fibras asociada con los filamentos de actina y de miosina. La titina, que tiene un peso molecular de 3×10^6 , es el polipéptido más grande descrito hasta ahora. Las moléculas de titina, a modo de cuerdas, se extienden desde los filamentos gruesos del disco Z; se cree que actúan a modo de muelles manteniendo los filamentos de miosina centrados en el sarcómero (Figura 16-95). Al contrario, la nebulina, que también es muy grande, está íntimamente asociada con los delgados filamentos de actina, y está formada casi enteramente en una secuencia repetida de 35 aminoácidos que se unen a la actina. El número de estos motivos, y por tanto la longitud total de la molécula de tubulina, es el necesario para extenderse desde un extremo del filamentos de actina hasta el otro. De este modo, la nebulina podría actuar como una “regla molecular” para regular el ensamblaje de actina y la longitud de los filamentos de actina durante el desarrollo del músculo (véase Figura 3-52).

Las miofibrillas se unen unas a las otras, lado a lado, mediante un sistema de filamentos intermedios de desmina, y toda esta disposición se ancla entonces en la membrana plasmática de la célula muscular mediante diversas proteínas, incluyendo una proteína de unión a la actina alargada y flexible, llamada *distrofina*. Esta proteína, que se encuentra ausente en aquellos pacientes con distrofia muscular, tienen un enorme parecido con la espectrina, y puede unir proteínas específicas de la membrana muscular a los filamentos de actina de la miofibrilla.

La misma maquinaria contráctil, en una forma modificada, se encuentra en el músculo cardíaco y en el músculo liso⁵⁹

Hasta ahora sólo hemos explicado uno de los tres tipos principales de músculo presentes en los vertebrados—el *músculo esquelético*. Los otros tipos son el *músculo del corazón* (o *músculo cardíaco*), que se contrae unos 3 mil millones de veces en el curso de una vida humana de duración media, y el *músculo liso*, que produce las contracciones lentas y prolongadas típicas de órganos tales como el intestino. Los tres tipos de fibras musculares, conjuntamente con otro tipo de células contráctiles conocidas como *células mioepiteliales* (véase Figura 22-36E),

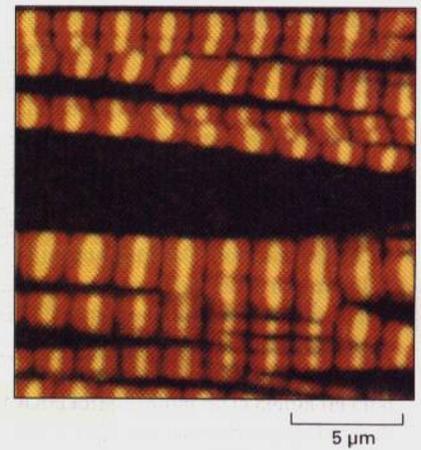
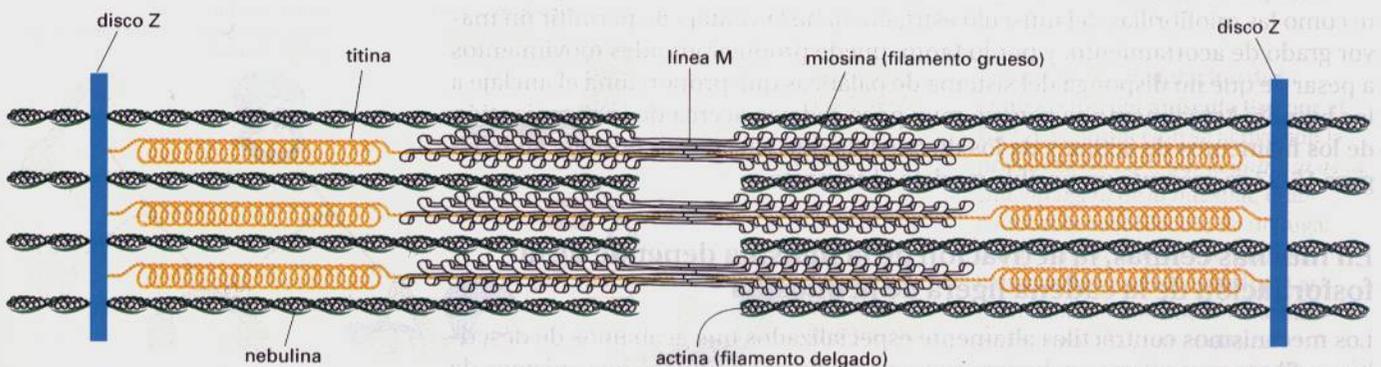


Figura 16-94 Localización de la α -actinina en el músculo. Imagen de inmunofluorescencia confocal que muestra un grupo de miofibrillas de células del músculo cardíaco cultivadas. La actina se ha marcado en rojo con faloidina unida a rodamina, y la α -actinina se ha marcado en verde, con un anticuerpo ligado a fluoresceína, pero como la actina y la α -actinina se colocan en el disco Z, esta región aparece realmente como amarilla. (De M.H. Lu et al., *J. Cell Biol.* 117:1017-1022, 1992, con el permiso de copyright de The Rockefeller University Press.)

Figura 16-95 Localización de la titina y de la nebulina en un sarcómero del músculo esquelético. Cada molécula gigante de titina se extiende desde el disco Z hasta la línea M—una distancia superior a $1 \mu\text{m}$. Una parte de cada molécula de titina está íntimamente asociada con las moléculas de miosina de los filamentos gruesos; el resto de la molécula es elástico y cambia de longitud mientras el músculo se contrae y se relaja. Cada molécula de nebulina se extiende desde el disco Z a lo largo de la longitud de un filamento de actina delgado y podría determinar la longitud de éste.



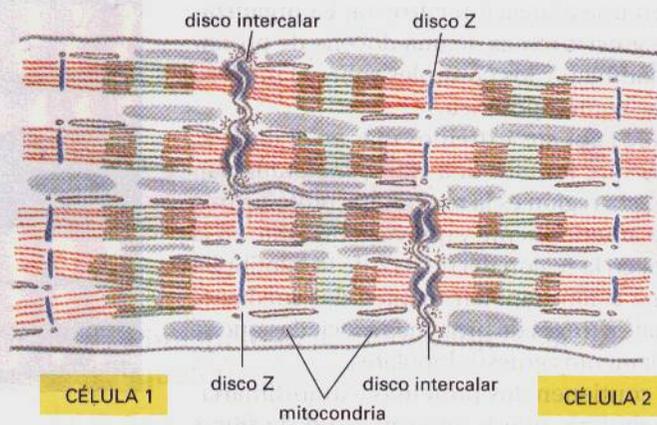


Figura 16-96 Estructura del músculo cardíaco. Diagrama esquemático del músculo cardíaco que muestra dos células unidas, extremo con extremo, mediante uniones especializadas conocidas como discos intercalares. Los filamentos de actina de los sarcómeros de células adyacentes se insertan en el denso material asociado con la membrana plasmática de la región de cada disco intercalar, como si se tratara de discos Z. Así, las miofibrillas continúan a través del núcleo, sin tener en cuenta los límites celulares.

se contraen mediante un mecanismo de deslizamiento de filamentos de actina y filamentos de miosina.

Al igual que el músculo esquelético, el **músculo del corazón** es estriado, reflejando una organización de filamentos de actina y de miosina muy similar. También es estimulado a contraerse mediante un mecanismo parecido: un potencial de acción de los túbulos T dispara de alguna manera la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático, lo cual activa la contracción por medio de un complejo troponina-tropomiosina. No obstante, las células musculares del corazón no son plurinucleadas, y están unidas por sus extremos mediante unas estructuras especiales llamadas *discos intercalares* (Figura 16-96). Los discos intercalares realizan al menos tres funciones. (1) Unen una célula a la siguiente por medio de desmosomas (discutido en el Capítulo 19). (2) Conectan los filamentos delgados de las miofibrillas de las células adyacentes (realizando una función análoga a la que desempeñan los discos Z en el interior de las células). (3) Presentan uniones de tipo gap que permiten la transmisión rápida del potencial de acción desde una célula a la siguiente, sincronizando las contracciones de las células musculares cardíacas.

El tipo de músculo más “primitivo”, en el sentido de ser más parecido a las células no musculares, no presenta estriaciones por lo que se le denomina **músculo liso**. Forma la porción contráctil del estómago, del intestino y del útero, las paredes de las arterias, los conductos de las glándulas secretoras y muchas otras regiones en las que es necesaria una contracción lenta y sostenida. Está formado por capas de células alargadas y fusiformes, cada una de las cuales presenta un solo núcleo. Las células contienen filamentos de miosina y de actina, pero estos filamentos no están dispuestos siguiendo la distribución altamente ordenada del músculo esquelético y del músculo cardíaco, y no forman miofibrillas. Por el contrario, los filamentos forman un aparato contráctil dispuesto de forma más laxa, que se halla alineado, aproximadamente, con el eje largo de la célula pero que está anclado oblicuamente a la membrana plasmática en uniones discoidales que agrupan conjuntos de células.

Aunque el aparato contráctil del músculo liso no se contrae tan rápidamente como las miofibrillas del músculo estriado, tiene la ventaja de permitir un mayor grado de acortamiento, y por lo tanto, puede producir grandes movimientos a pesar de que no disponga del sistema de palancas que proporciona el anclaje a los huesos. Actualmente se conoce muy poco todavía acerca de la organización de los filamentos de actina y de los de miosina que hacen esto posible; en la Figura 16-97 se presenta un posible modelo al respecto.

En muchas células, la activación de la miosina depende de la fosforilación de la cadena ligera de la miosina⁶⁰

Los mecanismos contráctiles altamente especializados que acabamos de describir en fibras musculares evolucionaron a partir de unos simples mecanismos de

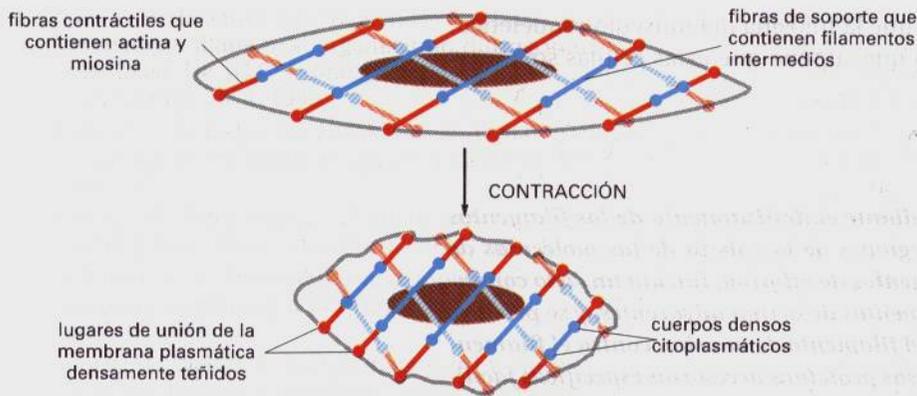


Figura 16-97 Modelo del aparato contráctil de una célula del músculo liso. Según esta hipótesis, haces de filamentos contráctiles que contienen actina y miosina (rojo) se hallan anclados por un extremo a los cuerpos densos de la membrana plasmática, y por el otro extremo, atravesando los "cuerpos densos" citoplasmáticos, se hallan unidos a haces no contráctiles de filamentos intermedios (azul). Los haces contráctiles de actina-miosina se hallan orientados de forma oblicua al eje longitudinal de la célula (el cual, generalmente, es mucho más largo de lo que aquí se muestra), de forma que su contracción acorta notablemente la célula. En la figura se presentan únicamente unos cuantos de los haces existentes.

generación de fuerza que se encuentran en todas las células eucariotas. No es sorprendente que la miosina-II de las células no musculares se parezca a la miosina-II de las células musculares lisas, el tipo menos especializado de músculo. Como en el músculo esquelético y en el cardíaco, la contracción en las células musculares lisas se dispara por un incremento del Ca^{2+} citosólico; pero, al contrario que en el mecanismo del músculo esquelético y del cardíaco, la contracción se inicia principalmente por la fosforilación de una de las dos cadenas ligeras de la miosina-II, la cual a su vez controla la interacción de la miosina con la actina. Un mecanismo parecido regula la actividad de la miosina-II no muscular.

Las dos cadenas ligeras de cada cabeza de la molécula de miosina-II (véase Figura 5-23) son diferentes, y sólo una de ellas es fosforilada durante la contracción no muscular y durante la contracción del músculo liso. Cuando esta cadena ligera se fosforila, la cabeza de miosina interactúa con un filamento de actina por lo que se genera la contracción; cuando la cadena se desfosforila, la cabeza de miosina tiende a disociarse de la actina y se vuelve inactiva. La fosforilación está catalizada por la enzima *quinasa de la cadena ligera de la miosina*, cuya unión requiere la unión de un complejo Ca^{2+} -calmodulina. Como resultado de ello, la contracción está controlada por los niveles de Ca^{2+} citosólicos, tal como ocurre en el músculo esquelético y en el músculo cardíaco (Figura 16-98).

La fosforilación de la cadena ligera puede tener influencia sobre el estado de agregación de las moléculas de miosina-II en la célula, mencionado anteriormente en relación con la motilidad de las células no musculares (véase Figura 16-73). La fosforilación de la miosina-II se produce de una manera relativamente lenta, de modo que a menudo la contracción máxima se alcanza aproximadamente un segundo después del estímulo (respecto a los pocos milisegundos necesarios para el caso de la célula del músculo estriado). Sin embargo, en las células musculares lisas y en las no-musculares, la activación rápida de la contracción no es importante: en estas células las miosinas-II hidrolizan ATP apro-

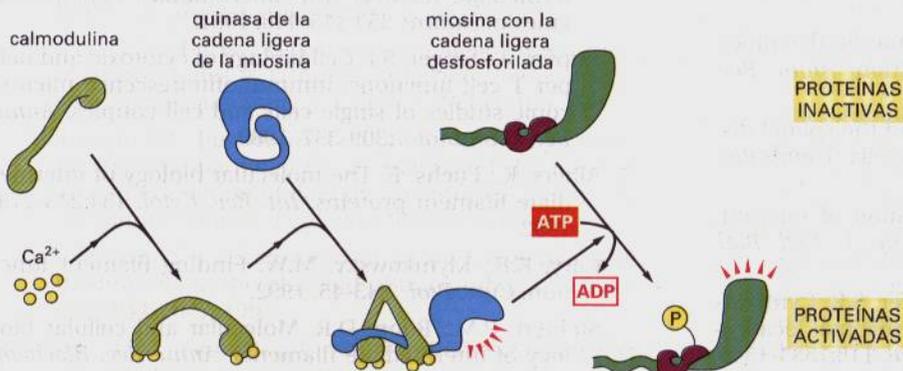


Figura 16-98 Regulación de la contracción del músculo liso por el Ca^{2+} . La contracción se activa con la presencia de Ca^{2+} , por la *quinasa de la cadena ligera de la miosina*, que cataliza la fosforilación de un lugar particular en uno de los dos tipos de cadenas ligeras de la miosina. Las moléculas de miosina no muscular están reguladas por el mismo mecanismo (véase Figura 16-73).

ximadamente 10 veces más lentamente que la miosina del músculo esquelético, lo cual produce un ciclo de unión lento que supone que estas células sólo pueden contraerse lentamente.

Resumen

La contracción muscular se produce mediante el deslizamiento de los filamentos de actina respecto los de miosina. La regiones de la cabeza de las moléculas de miosina, que se proyectan desde los filamentos de miosina, inician un ciclo conducido por el ATP en que se unen a los filamentos de actina adyacentes, y se produce un cambio conformacional que empuja el filamento de miosina contra el filamento de actina, y entonces se separan. Diversas proteínas accesorias específicas facilitan este ciclo en el músculo y mantienen los filamentos de actina y de miosina en disposiciones superpuestas y paralelas con la orientación correcta para que se produzca el deslizamiento. Otras dos proteínas accesorias -troponina y tropomiosina- permiten que la contracción del músculo esquelético y del músculo cardíaco esté regulada por el Ca^{2+} .

En las fibras del músculo liso, y en la mayoría de células no musculares, la actina y la miosina producen la contracción de una forma similar a la del músculo esquelético y cardíaco. Sin embargo, las unidades contráctiles son más pequeñas y menos organizadas en estas células; tanto su actividad como su estado de ensamblaje están controlados por una fosforilación de la cadena ligera de la miosina dependiente de Ca^{2+} .

Bibliografía

General

- Amos, L.A.; Amos, W.B. Molecules of the Cytoskeleton. New York: Guilford Press, 1991.
- Bershadsky, A.D.; Vasiliev, J.M. Cytoskeleton. New York: Plenum Press, 1988.
- Bray, D. Cell Movements. New York: Garland Publishing, 1992.
- Kreis, T.E.; Vale, R.D., eds. Guidebook to Cytoskeletal and Motor Proteins. Oxford, UK: Oxford University Press, 1993.

Citas

1. Cell motility. *Trends Cell Biol.* 3:363-412, 1993.
Elson, E.L. Cellular mechanics as an indicator of cytoskeletal structure and function. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 17:397-430, 1988.
Ingber, D.E. Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 104:613-627, 1993.
2. Gelfand, V.I.; Bershadsky, A.D. Microtubule dynamics: mechanisms, regulation, and function. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7:93-116, 1991.
Karsenti, E.; Maro, B. Centrosomes and the spatial distribution of microtubules in animal cells. *Trends Biochem. Sci.* 11:460-463, 1986.
3. McNiven, M.A.; Porter, K.R. Organization of microtubules in centrosome-free cytoplasm. *J. Cell Biol.* 106:1593-1605, 1988.
4. Corthésy-Theulaz, I.; Pauloin, A.; Pfeffer, S.R. Cytoplasmic dynein participates in the centrosomal localization of the Golgi complex. *J. Cell Biol.* 118:1333-1345, 1992.
5. Kreis, T.E. Role of microtubules in the organization of the Golgi apparatus. *Cell Motil. Cytoskeleton* 15:67-70, 1990.
6. Lee, C.; Chen, L.B. Dynamic behavior of endoplasmic reticulum in living cells. *Cell* 54:37-46, 1988.
7. Terasaki, M. Recent progress on structural interactions of the endoplasmic reticulum. *Cell Motil. Cytoskeleton* 15:71-75, 1990.
8. Vale, R. Intracellular transport using microtubule-based motors. *Annu. Rev. Cell Biol.* 3:347-378, 1987.
9. Euteneuer, U.; Schliwa, M. Persistent, directional motility of cells and cytoplasmic fragments in the absence of microtubules. *Nature* 310:58-61, 1984.
10. Lee, J.; Ishihara, A.; Threiot, J.A.; Jacobson, K. Principles of locomotion for simple-shaped cells. *Nature* 362:167-171, 1993.
11. Euteneuer, U.; Schliwa, M. Mechanisms of centrosome positioning during the wound response in BSC-1 cells. *J. Cell Biol.* 116:1157-1166, 1992.
12. Gyoeva, F.K.; Gelfand, V.I. Coalignment of vimentin intermediate filaments with microtubules depends on kinesin. *Nature* 353:445-448, 1991.
13. Kupfer, A.; Singer, S.J. Cell biology of cytotoxic and helper T cell functions: immunofluorescence microscopic studies of single cells and cell couples. *Annu. Rev. Immunol.* 7:309-337, 1989.
14. Albers, K.; Fuchs, E. The molecular biology of intermediate filament proteins. *Int. Rev. Cytol.* 134:243-279, 1992.
15. Cary, R.B.; Klymkowsky, M.W. Finding filament function. *Curr. Biol.* 2:43-45, 1992.
16. Steinert, P.M.; Roop, D.R. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu. Rev. Biochem.* 57:593-625, 1988.

8. Chou, Y.-H.; Bischoff, J.R.; Beach, D.; Goldman, R.D. Intermediate filament reorganization during mitosis is mediated by p34^{cdc2} phosphorylation of vimentin. *Cell* 62:1063-1071, 1990.
- Okabe, S.; Miyasaka, H.; Hirokawa, N. Dynamic of the neuronal intermediate filaments. *J. Cell Biol.* 121:375-386, 1993.
- Stewart, M. Intermediate filament structure and assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:3-11, 1993.
9. Coulombe, P.A. The cellular and molecular biology of keratins: beginning a new era. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:17-29, 1993.
- Osborn, M.; Weber, K. Tumor diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology. *Lab. Invest.* 48:372-394, 1983.
10. Cleveland, D.W.; Monteiro, M.J.; Wong, P.C.; et al. Involvement of neurofilaments in the radial growth of axons. *J. Cell Sci. Suppl.* 15:85-95, 1991.
- Garrod, D.R. Desmosomes and hemidesmosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:30-40, 1993.
11. Nigg, E.A. Assembly and cell cycle dynamics of the nuclear lamina. *Semin. Cell Biol.* 3:245-253, 1992.
12. Fuchs, E.; Coulombe, P.A. Of mice and men: genetic skin diseases of keratin. *Cell.* 69:899-902, 1992.
- Janmey, P.A. Mechanical properties of cytoskeletal polymers. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3:4-11, 1991.
13. Dustin, P. Microtubules, 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 1984.
- Hyams, J.F.; Lloyd, C.W. Microtubules. New York: Wiley-Liss, 1993.
14. Amos, L.A.; Baker, T.S. The three-dimensional structure of tubulin protofilaments. *Nature* 279:607-612, 1979.
- Luduena, R.F. Are tubulin isotypes functionally significant? *Mol. Biol. Cell* 4:445-457, 1993.
- Sullivan, K.F. Structure and utilization of tubulin isotypes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:687-716, 1988.
- Wade, R.H.; Chrétien, D. Cryoelectron microscopy of microtubules. *J. Struct. Biol.* 110:1-27, 1993.
15. DeBrabander, M. Microtubule dynamics during the cell cycle: the effects of taxol and nocodazole on the microtubule system of Pt K2 cells at different stages of the mitotic cycle. *Int. Rev. Cytol.* 101:215-274, 1986.
- Inoué, S. Cell division and the mitotic spindle. *J. Cell Biol.* 91:131s-147s, 1981.
- Salmon, E.D.; McKeel, M.; Hays, T. Rapid rate of tubulin dissociation from microtubules in the mitotic spindle *in vivo* measured by blocking polymerization with colchicine. *J. Cell Biol.* 99:1066-1075, 1984.
16. Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E. Microtubule oscillations. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 22:235-244, 1992.
17. Bergen, L.G.; Borisy, G.G. Head-to-tail polymerization of microtubules *in vitro*. Electron microscope analysis of seeded assembly. *J. Cell Biol.* 84:141-150, 1980.
- McIntosh, J.R.; Euteneuer, U. Tubulin hooks as probes for microtubule polarity: an analysis of the method and an evaluation of data on microtubule polarity in the mitotic spindle. *J. Cell Biol.* 98:525-533, 1984.
- Mitchinson, T.J. Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science* 261:1044-1047, 1993.
18. Glover, D.M.; González, C.; Raff, J.W. The centrosome. *Sci. Am.* 268(6):62-68, 1993.
- Joshi, H.C.; Palacios, M.J.; McNamara, L.; Cleveland, D.W. γ -tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation. *Nature* 356:80-83, 1992.
- Mazia, D. Centrosomes and mitotic poles. *Exp. Cell Res.* 153:1-15, 1984.
19. Sammak, P.J.; Borisy, G.G. Direct observation of microtubule dynamics in living cells. *Nature* 332:724-726, 1988.
- Tanaka, E.M.; Kirschner, M.W. Microtubule behavior in the growth cones of living neurons during axon elongation. *J. Cell Biol.* 115:345-363, 1991.
20. Erickson, H.P.; O'Brien, E.T. Microtubule dynamic instability and GTP hydrolysis. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21:145-166, 1992.
- Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E.; Milligan, R.A. Microtubule dynamics and microtubule caps—a time-resolved cryo-electron microscopy study. *J. Cell Biol.* 114:977-991, 1991.
- Mitchison, T.J.; Kirschner, M.W. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312:237-242, 1984.
21. Gelfand, V.I.; Bershadsky, A.D. Microtubule dynamics: mechanism, regulation, and function. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7:93-116, 1991.
- Kirschner, M.W.; Mitchison, T.J. Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell* 45:329-342, 1986.
22. Greer, K.; Rosenbaum, J.L. Post-translational modifications of tubulin. In *Cell Movement, Vol. 2: Kinesin, Dynein, and Microtubule Dynamics* (F.D. Warner, J.R. McIntosh, eds.), 47-66. New York: Wiley-Liss, 1989.
- MacRae, T.H. Towards an understanding of microtubule function and cell organization: an overview. *Biochem. Cell Biol.* 70:835-841, 1992.
23. Drechsel, D.N.; Hyman, A.A.; Cobb, M.H.; Kirschner, M.W. Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol. Biol. Cell* 3:1141-1154, 1992.
- Lee, G. Non-motor microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:88-94, 1993.
- Olmsted, J.B. Microtubule-associated proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* 2:421-457, 1986.
24. Chen, J.; Kanai, Y.; Cowan, N.J.; Hirokawa, N. Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* 360:674-677, 1992.
- Knops, J.; Kosik, K.S.; Lee, G.; et al. Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes. *J. Cell Biol.* 114:725-733, 1991.
25. Skoufias, D.A.; Scholey, J.M. Cytoplasmic microtubule-based motor proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:95-104, 1993.
- Vale, R.D.; Reese, T.S.; Sheetz, M.P. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42:39-50, 1985.
- Vallee, R.B.; Wall, J.S.; Paschal, B.M.; Shpetner, H.S. Microtubule-associated protein 1C from brain is a two-headed cytosolic dynein. *Nature* 332:561-563, 1988.
26. Bloom, G.S. Motor proteins for cytoplasmic microtubules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:66-73, 1992.
- Endow, S.A.; Titus, M.A. Genetic approaches to molecular motors. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8:29-66, 1992.
- Gelfand, V.I.; Scholey, J.M. Every motion has its motor. *Nature* 359:480-482, 1992.

27. Blair, D.F.; Dutcher, S.K. Flagella in prokaryotes and lower eukaryotes. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 2:756-767, 1992.
- Fawcett, D.W.; Porter, K.R. A study of the fine structure of ciliated epithelia. *J. Morphol.* 94:221-281, 1954.
- Gibbons, I.R. Cilia and flagella of eukaryotes. *J. Cell Biol.* 91:107s-124s, 1981.
28. Burgess, S.A.; Dover, S.D.; Woolley, D.M. Architecture of the outer arm dynein ATPase in an avian sperm flagellum, with further evidence for the B-link. *J. Cell Sci.* 98:17-26, 1991.
- Smith, E.F.; Sale, W.S. Regulation of dynein-driven microtubule sliding by the radial spokes in flagella. *Science* 257:1557-1559, 1992.
- Warner, F.D.; Satir, P.; Gibbons, I.R., eds. *Cell Movement, Vol. 1. The Dynein ATPases.* New York: Wiley-Liss, 1989.
- Witman, G.B. Axonemal dyneins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:74-79, 1992.
29. Huang, B. *Chlamydomonas reinhardtii*: a model system for genetic analysis of flagellar structure and motility. *Int. Rev. Cytol.* 99:181-215, 1986.
- Johnson, K.A.; Rosebaum, J.L. Polarity of flagellar assembly in *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.* 119:1605-1611, 1992.
- Ringo, D.L. Flagellar motion and the fine structure of flagellar apparatus in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* 33:543-571, 1967.
30. Beisson, J.; Sonnenborn, T.M. Cytoplasmic inheritance of the organization of the cell cortex in *Panamecium aurelia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53:275-282, 1965.
- Holmes, J.A.; Dutcher, S.K. Cellular asymmetry in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Sci.* 94:273-285, 1989.
- Palazzo, R.E.; Vaisberg, E.; Cole, R.W.; Rieder, C.L. Centriole duplication in lysates of *Spisula solidissima* oocytes. *Science* 256:219-221, 1992.
31. Kabsch, W.; Vandekerckhove, J. Structure and function of actin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21:49-76, 1992.
32. Bonder, E.M.; Fishkind, D.J.; Mooseker, M.S. Direct measurement of critical concentrations and assembly rate constants at the two ends of an actin filament. *Cell* 34:491-501, 1983.
- Janmey, P.A. Mechanical properties of cytoskeletal polymers. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3:4-11, 1991.
- Kabsch, W.; Mannherz, H.G.; Suck, D.; Pai, E.F.; Holmes, K.C. Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* 347:37-44, 1990.
33. Carlier, M.-F. Actin: protein structure and filament dynamics. *J. Biol. Chem.* 266:1-4, 1991.
- Mitchison, T.J. Compare and contrast actin filaments and microtubules. *Mol. Biol. Cell* 3:1309-1315, 1992.
- Oosawa, F.; Asakura, S. *Thermodynamics of the Polymerization of Protein.* London: Academic Press, 1975.
34. Carlier, M.-F. Role of nucleotide hydrolysis in the dynamics of actin filaments and microtubules. *Int. Rev. Cytol.* 115:139-170, 1989.
- Wegner, A. Head to tail polymerization of actin. *J. Mol. Biol.* 108:139-150, 1976.
35. Cooper, J.A. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J. Cell Biol.* 105:1473-1478, 1987.
- Forscher, P.; Smith, S.J. Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone. *J. Cell Biol.* 107:1505-1516, 1988.
- Wehland, J.; Weber, K. Actin rearrangement in living cells revealed by microinjection of a fluorescent phalloidin derivative. *Eur. J. Cell Biol.* 24:176-183, 1981.
36. Cassimeris, L.; Safer, D.; Nachmias, V.T.; Zigmond, S.H. Thymosin β_4 sequesters the majority of G-actin in resting human polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell Biol.* 119:1261-1270, 1992.
- Fechheimer, M.; Zigmond, S.H. Focusing on unpolymerized actin. *J. Cell Biol.* 123:1-5, 1993.
- Goldschmidt-Clermont, P.J.; Furman, M.I.; Wachsstock, D.; et al. The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells. *Mol. Biol. Cell* 3:1015-1024, 1992.
37. Abercrombie, M. The crawling movement of metazoan cells. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)* 207:129-147, 1980.
- Fukui, Y. Toward a new concept of cell motility: cytoskeletal dynamics in amoeboid movements and cell division. *Int. Rev. Cytol.* 144:85-127, 1993.
- Small, J.V. Microfilament-based motility in non-muscle cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1:75-79, 1989.
38. Cao, L.; Fishkind, D.J.; Wang, Y.-L. Localization and dynamics of nonfilamentous actin in cultured cells. *J. Cell Biol.* 123:173-181, 1993.
- Condeelis, J. The formation of cell protrusions. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9:441-444, 1993.
- Theriot, J.A.; Mitchison, T.J. The nucleation-release model of actin filament dynamics in cell motility. *Trends Cell Biol.* 2:219-222, 1992.
39. Kocks, C.; Helio, R.; Gounon, P.; Ohayon, H.; Crossart, P. Polarized distribution of *Listeria monocytogenes* surface protein ActA at the site of directional actin assembly. *J. Cell Sci.* 105:699-710, 1993.
- Theriot, J.A.; Mitchison, T.J.; Tilney, L.G.; Portnoy, D.A. The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. *Nature* 357:257-260, 1992.
- Tilney, L.G.; Portnoy, D.A. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* 109:1597-1608, 1989.
40. Devreotes, P.N.; Zigmond, S.H. Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and *Dictyostelium*. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:649-686, 1988.
41. Ridley, A.J.; Hall, A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70:389-399, 1992.
- Zigmond, S.H., ed. *Sensory Adaptation and Motor Activation in Chemotaxis. Semin. in Cell Biol., Vol. 1(2),* 1990.
42. Chenevert, J.; Corrado, K.; Bender, A.; Pringle, J.; Herskowitz, I. A yeast gene (*BEM1*) necessary for cell polarization whose product contains two SH domains. *Nature* 356:77-79, 1992.
- Flescher, E.G.; Madden, K.; Snyder, M. Components required for cytokinesis are important for bud site selection in yeast. *J. Cell Biol.* 122:373-386, 1993.
43. Bretscher, A. Microfilament structure and function in the cortical cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7:337-374, 1991.

- Hartwig, J.H.; Kwiatkowski, D.J. Actin-binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3:87-97, 1991.
44. Bennett, V.; Gilligan, D.M. The spectrin-based membrane structure and micron-scale organization of the plasma membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9:27-66, 1993.
- Carraway, K.L.; Carraway, C.A.C. Membrane-cytoskeleton interactions in animal cells. *Biochim. Biophys. Acta* 988:147-171, 1989.
45. Matsudaira, P. Modular organization of actin crosslinking proteins. *Trends Biochem. Sci.* 16:87-92, 1991.
- Vandekerckhove, J.; Vancompernelle, K. Structural relationships of actin-binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:36-42, 1992.
46. McLaughlin, P.J.; Gooch, J.T.; Mannherz, H.-G.; Weeds, A.G. Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature* 364:685-692, 1993.
- Matsudaira, P.; Janmey, P. Pieces in the actin-severing protein puzzle. *Cell* 54:139-140, 1988.
47. Cheney, R.E.; Riley, M.A.; Mooseker, M.S. Phylogenetic analysis of the myosin superfamily. *Cell Motil. Cytoskeleton* 24:215-223, 1993.
- Korn, E.D.; Hammer, J.A., 3d. Myosin I. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2:57-61, 1990.
- Pollard, T.D.; Doberstein, S.K.; Zot, H.G. Myosin-I. *Annu. Rev. Physiol.* 53:653-681, 1991.
- Titus, M.A. Myosins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:77-81, 1993.
48. Langanger, G.; Moeremans, M.; Daneels, G.; et al. The molecular organization of myosin in stress fibers of cultured cells. *J. Cell Biol.* 102:200-209, 1986.
- Strome, S. Determination of cleavage planes. *Cell* 72:3-6, 1993.
49. Burridge, K.; Fath, K.; Kelly, T.; Nuckolls, G.; Turner, C. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:487-525, 1988.
- Burridge, K.; Turner, C.E.; Romer, L.H. Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125^{FAK} accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J. Cell Biol.* 119:893-903, 1992.
50. Mooseker, M.S. Organization, chemistry, and assembly of the cytoskeletal apparatus of the intestinal brush border. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1:209-241, 1985.
51. Heath, J.P.; Holifield, B.F. Cell locomotion: new research tests old ideas on membrane and cytoskeletal flow. *Cell Motil. Cytoskeleton* 18:245-257, 1991.
- Lackie, J.M. *Cell Movement and Cell Behavior*. London: Allen and Unwin, 1986.
- Stossel, T.P. On the crawling of animal cells. *Science* 260:1086-1094, 1993.
- Trinkaus, J.P. *Cells into Organs: The Forces That Shape the Embryo*, 2nd ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 1984.
52. Brown, S.S. Phenotypes of cytoskeletal mutants. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:129-134, 1993.
- DeLozanne, A.; Spudich, J.A. Disruption of the *Dictyostelium* myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science* 236:1086-1091, 1987.
- Gerisch, G.; Noegel, A.A.; Schleicher, M. Genetic alteration of proteins in actin-based motility systems. *Annu. Rev. Physiol.* 53:607-628, 1991.
- Knecht, D.A.; Loomis, W.F. Antisense RNA inactivation of myosin heavy chain gene depression in *Dictyostelium discoideum*. *Science* 236:1081-1086, 1987.
53. Cooke, R. The mechanism of muscle contraction. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 21:53-118, 1986.
- Huxley, A.F. *Reflections on Muscle*. Princeton, NJ: Princeton University Press, 1980.
- Squire, J.M. *Muscle: Design, Diversity and Disease*. Menlo Park, CA: Benjamin-Cummings, 1986.
54. Amos, L.A. Structure of muscle filaments studied by electron microscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 14:291-313, 1985.
55. Burton, K. Myosin step size: estimates from motility assays and shortening muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 13:590-607, 1992.
- Holmes, K.C.; Popp, D.; Gebhard, W.; Kabsch, W. Atomic model of the actin filament. *Nature* 347:44-49, 1990.
- Irving, M. Muscle mechanics and probes of the cross-bridge cycle. In *Fibrous Protein Structure* (J.M. Squire; P.J. Vibert, eds.). San Diego, CA: Academic Press, 1987.
- Pollard, T.D. The myosin crossbridge problem. *Cell* 48:909-910, 1987.
- Rayment, I.; Rypniewski, W.R.; Schmidt-Base, K.; et al. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* 261:50-58, 1993.
56. Katz, B. *Nerve, Muscle and Synapse*. New York: McGraw-Hill, 1966.
- Lai, F.A.; Erickson, H.P.; Rousseau, E.; Liu, Q.-Y.; Meissner, G. Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature* 331:315-319, 1988.
57. Murray, J.M.; Weber, A. The cooperative action of muscle proteins. *Sci. Am.* 230(2):59-71, 1974.
- Phillips, G.N.; Fillers, J.P.; Cohen, C. Tropomyosin crystal structure and muscle regulation. *J. Mol. Biol.* 192:111-131, 1986.
- Zot, A.S.; Potter, J.D. Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 16:535-559, 1987.
58. Ervasti, J.M.; Campbell, K.P. Dystrophin and the membrane skeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:82-87, 1993.
- Trinick, J. Molecular rulers in muscle? *Curr. Biol.* 2:75-77, 1992.
- Wang, K. Sarcomere-associated cytoskeletal lattices in striated muscle. Review and hypothesis. In *Cell and Muscle Motility* (J.W. Shay, ed., Vol. 6), New York: Plenum Press, 1985.
59. Fawcett, D.W. *A Textbook of Histology*, 11th ed. Philadelphia: Saunders, 1986.
- Korn, E.D.; Hammer, J.A. Myosins of nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 17:23-45, 1988.
- Sellers, J.R.; Adelstein, R.S. Regulation of contractile activity. In *The Enzymes* (P. Boyer; E.G. Krebs, eds.), San Diego, CA: Academic Press, 1987.
60. Citi, S.; Kendrick-Jones, J. Regulation of non-muscle myosin structure and function. *Bioessays* 7:155-159, 1987.
- Fishkind, D.J.; Cao, L.G.; Wang, Y.-L. Microinjection of the catalytic fragment of myosin light chain kinase into dividing cells: effects on mitosis and cytokinesis. *J. Cell Biol.* 114:967-975, 1991.