TEMA 26

El Citoesqueleto II: Microfilamentos y filamentos intermedios

26.1.- Introducción al estudio del citoesqueleto.

El citoesqueleto se encuentra solo en células eucariotas. Las células eucariotas son células complejas que tienen que organizar sus orgánulos, mover vesículas de un lado a otro del citoplasma, moverse ellas mismas… Estas funciones se realizan gracias al citoesqueleto. El citoesqueleto es como un armazón intramolecular, responsable de:

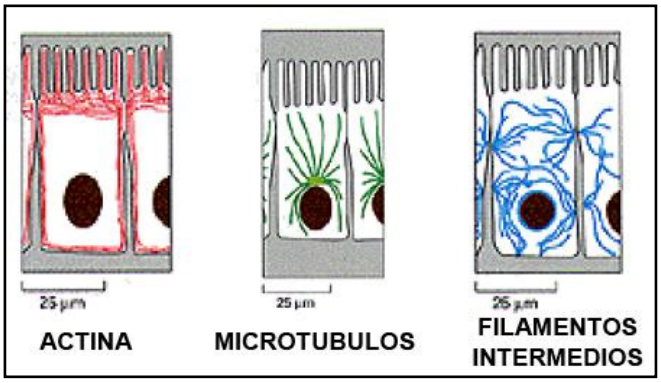
- Mantenimiento de la forma celular.
- Movimiento de la célula.
- Mantenimiento de la posición y movimiento, de las estructuras celulares.

Estas diferentes funciones se llevan a cabo mediante 3 tipos de filamentos proteicos, como son:

- **Finos:**
  - Tienen un diámetro de unos 7nm.
  - Están formados básicamente de actina.
  - Son responsables sobre todo del mantenimiento de la forma y superficie celular, así como de la contracción celular y de la locomoción celular (como ocurre en las amebas).

- **Microtúbulos:**
  - Tienen unos 25 nm de diámetro. Son los más gruesos.
  - Son responsables de la organización y del movimiento de las estructuras intracelulares.

- **Intermedios:**
  - Presentan un diámetro de entre 10 y 11 nm.
  - Son muy resistentes.
  - Se encargan del mantenimiento de la forma celular y tienen también una función mecánica que actúa también como respuesta al estrés celular.



Cada tipo de filamento se especializa en distintas funciones pero presentan una serie de características comunes:

- Son proteicos. Los filamentos son monómeros unidos entre si, es decir, se forman por polimerización de una estructura repetitiva (monómero), que dará lugar a largas fibras. Los monómeros se unirán entre sí mediante enlaces débiles, es decir, no covalentes.
- Se asocian a proteínas. Sus funciones dependen no solo de su estructura sino también de las proteínas con las que se asocian, las llamadas "proteínas asociadas". Hay muchas de estas proteínas y muy distintas:
    - Las que unen los filamentos entre si.
    - Otras que unen vesículas y orgánulos rodeados de membrana con los filamentos.
    - Algunas presentan función motora, que moverán diferentes estructuras sobre los filamentos.
    - Etc.

26.2.- Actina.

Morfología:

Podemos encontrar en la célula dos formas de presentación de la actina. La actina G, que se trata de la actina sin polimerizar, es decir, en forma de monómeros, y la actina F, que es la que está polimerizada formando los microfilamentos o filamentos de actina.

Los filamentos de actina son más flexibles que los microtúbulos (tubulina). Estos microfilamentos no son huecos, es decir, son sólidos, aunque su diámetro es menor: entre 5 y 9 nm.

A lo largo de los microfilamentos podemos encontrar bifurcaciones, es decir, brazos o ramificaciones que nacen de un haz de actina, del que partirán nuevos filamentos de actina, que presentan un ángulo de unos 70º.

Los filamentos de actina se presentan generalmente formando haces, igual que el resto de filamentos del citoesqueleto. Este hecho no solo depende del tipo de filamento, sino también de las proteínas con las que se acomplejan estos filamentos, que hacen que se estabilicen, los unen entre sí o con otros microfilamentos, etc.

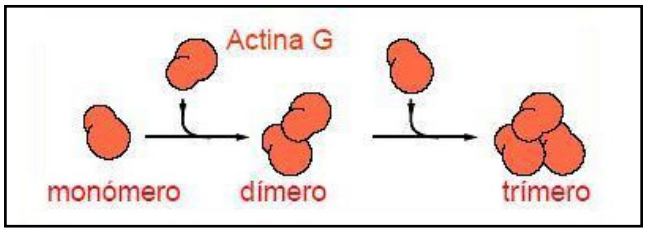
La distribución de los haces de microfilamentos se pueden observar a microscopía óptica, concretamente mediante técnicas de microscopía de fluorescencia utilizando como marcadores anticuerpos monoclonales o faloidina (toxina que proviene de la Amanita Faloide y que estabiliza los microfilamentos).

Organización molecular:

Los fenómenos de polimerización y despolimerización de los filamentos de actina son similares a los de los microtúbulos. En este caso partiremos de un monómero, que es la Actina G, que es una molécula de 375 aminoácidos, aunque podemos encontrar actinas ligeramente diferentes, que se expresan en según que células. Hasta el momento se han encontrado 6 genes de actinas diferentes.

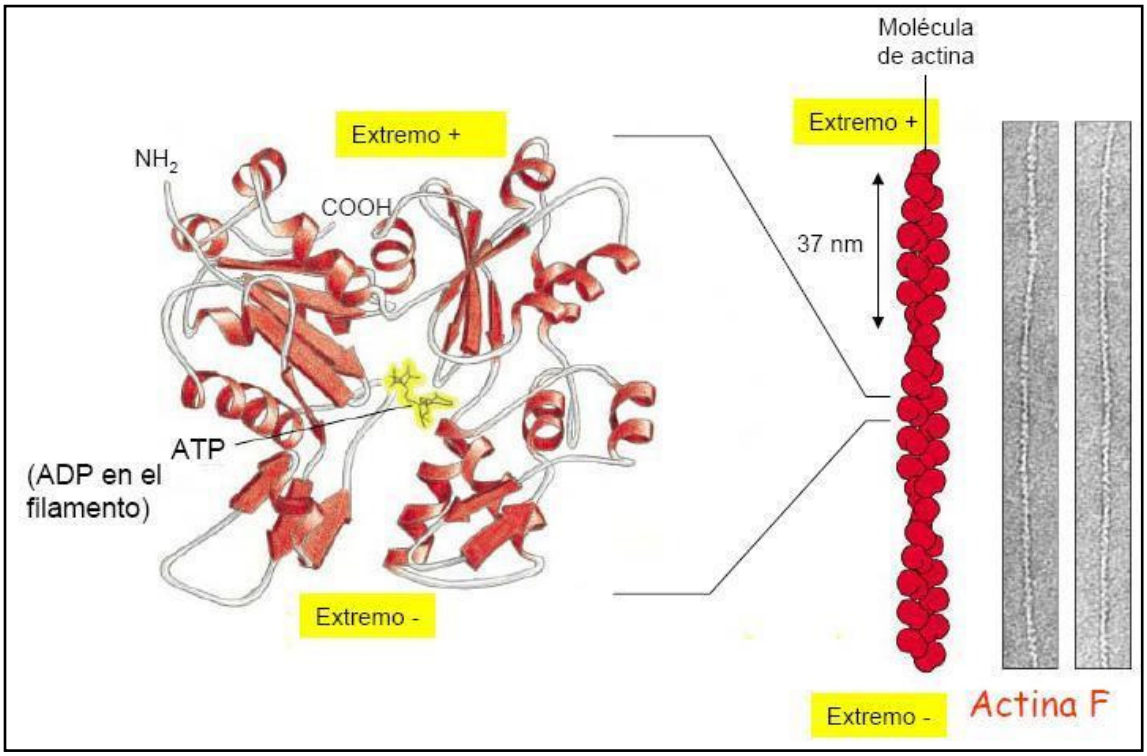
El primer paso para la polimerización es esencial para que el microfilamento adquiera estabilidad. A partir de dos monómeros se formará un

dímero, y tras la unión de otro monómero se formará el trímero, que es una estructura estable. A partir de aquí se formará el filamento mediante las sucesivas incorporaciones de monómeros. Las moléculas de actina van a unirse mediante fuerzas de tipo iónico o mediante fuerzas de Van der Waals.



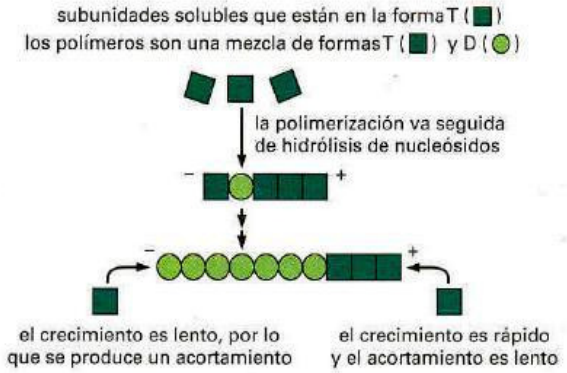
Los monómeros de actina tienen en su estructura un nucleótido trifosfato (ATP), pero al polimerizarse, este ATP va a hidrolizarse para convertirse en ADP, molécula que estará presente en el microfilamento. Este fenómeno de la hidrólisis va a permitir regular la polimerización y la despolimerización, de forma similar a como ocurría con los microtúbulos.

De igual modo que en los microtúbulos, los filamentos de actina presentan una polaridad. Primeramente encontramos polaridad en el monómero de actina, que presenta extremo más y extremo menos. Ya en el filamento polimerizado encontramos también una polaridad que expresamos mediante la distinción de extremo menos, como aquella parte del filamento de actina que se polimeriza más lentamente, y extremo más, que es por el contrario, la zona del microfilamento que se polimeriza más rápidamente.

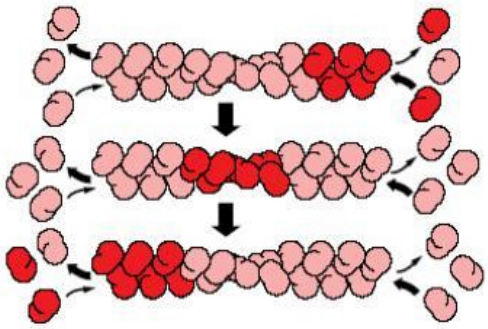


▲ Aunque a menudo el filamento se describe como una hélice simple de monómeros, también se puede imaginar como dos protofilamentos que se mantienen unidos entre sí por contactos laterales y que se enroscan uno alrededor del otro, como dos hebras paralelas de una hélice, con un giro repetido cada 37 nm. Dentro del filamento todas las subunidades tienen la misma orientación.

EQUILIBRIO DINÁMICO

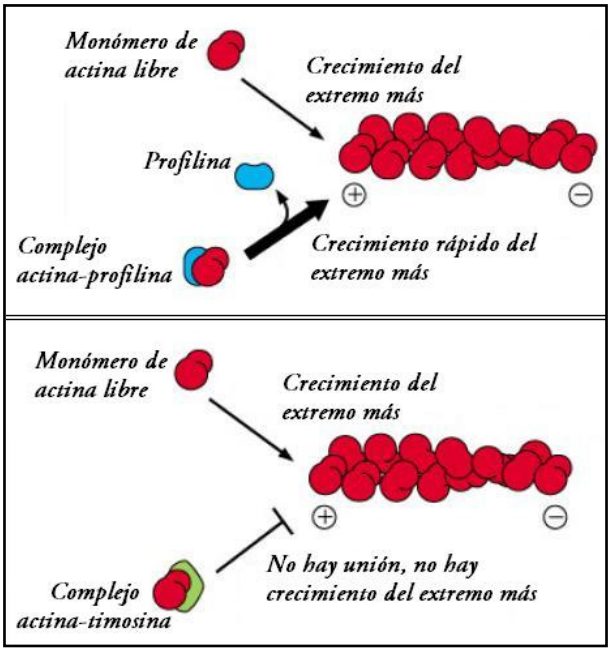


◄ Las subunidades de actina que presentan ATP unido a ellas polimerizan en ambos extremos del filamento en crecimiento. Una vez incorporadas al polímero se hidroliza el ATP, que se convierte en ADP. A medida que crece el filamento, la elongación es más rápida que la hidrólisis en el extremo más por lo que las subunidades están en forma T. en el extremo menos la hidrólisis es más rápida que la elongación por lo que las subunidades terminales están en forma D.
La concentración crítica para la polimerización en un extremo con forma T es más baja que para la forma D. Si la concentración de subunidades en el citosol está entre ambos valores, el extremo más crece y el extremo menos se acorta.



◄ Si ningún extremo está protegido y el filamento de actina alcanza la longitud estable, la incorporación en el extremo es igual a la pérdida en el extremo menos. Se crea un desplazamiento continuo de subunidades manteniendo estable la longitud total, que se conoce como recambio rotatorio, o *treadmilling*.

En condiciones in vitro, si que se polimeriza por el extremo menos, pero solo cuando aumenta mucho la concentración de actina unida a ATP. In vivo es más complicado todo el proceso ya que en la célula encontramos proteínas que se van a unir a la actina G y a la actina F, y que de alguna manera van a regular la polimerización y la despolimerización. Son las llamadas proteínas asociadas a la actina.



En este caso vamos a referirnos a las proteínas que se unen a la actina G, y que van a modificar el fenómeno de la polimerización. Estas proteínas son:

- **Profilina**. Va a permitir la polimerización del microfilamento. Su actividad puede modificarse mediante fosforilación.
- **Timosina**. Su unión va a impedir la polimerización. Presenta una unión competitiva con la profilina.

La unión de una de las proteínas con la actina libre va a modificar su concentración.

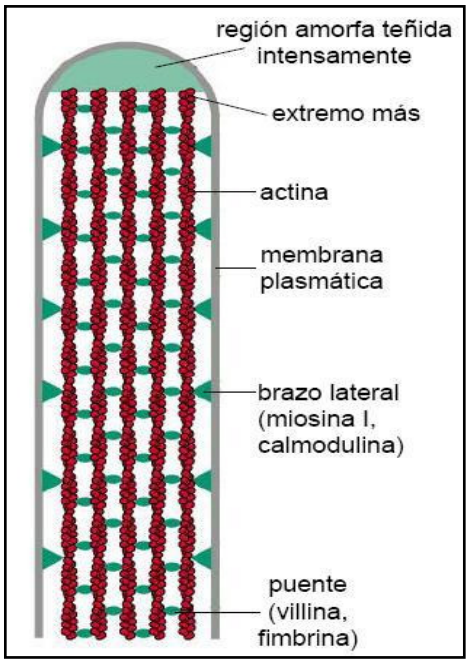
Disposición en las células:

Los microfilamentos o filamentos de actina se van a disponer en la célula formando estructuras de dos tipos:

- Lábiles.
- Estables.

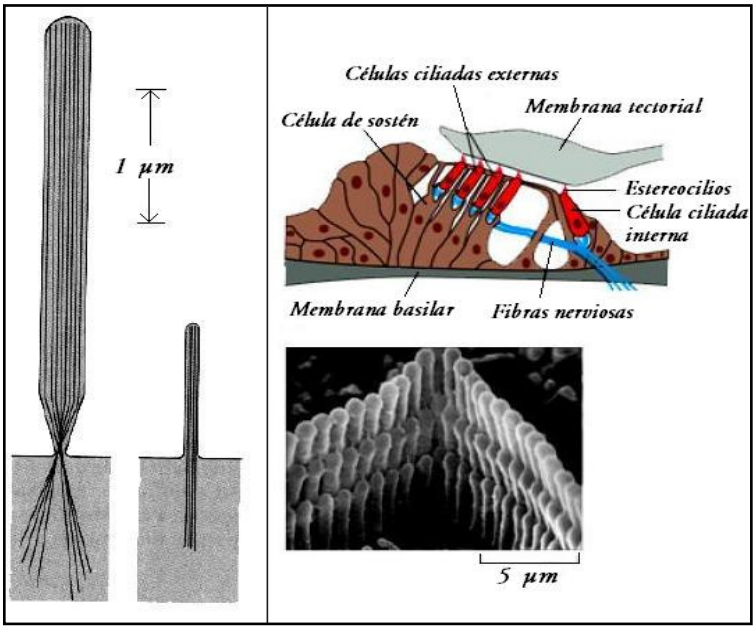
La asociación de proteínas a los filamentos de actina modificará la estabilidad de las estructuras. Las diferentes estructuras que encontramos en las células son:

- Microvellosidades:

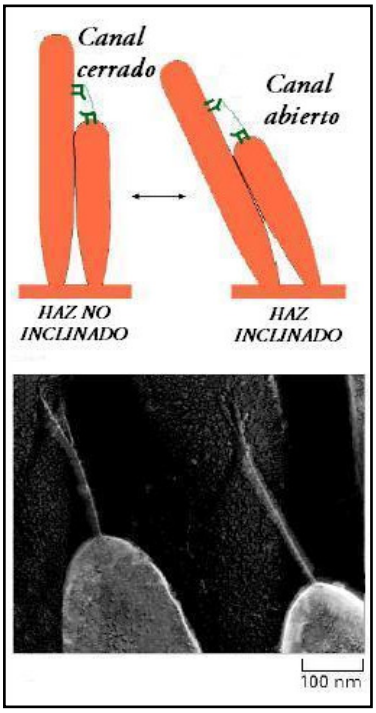


La parte central de las microvellosidades está formada por un haz de filamentos de actina paralelos, que se mantienen mediante proteínas formadoras de haces de actina (villina y fimbrina), que forman puentes. Los brazos laterales, formados por miosina I y por la proteína de unión al Ca^{2+} calmodulina, 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 de las microvellosidades, donde están inmersos en una sustancia amorfa, muy electrodensa, de composición desconocida.

- Estereocilios:

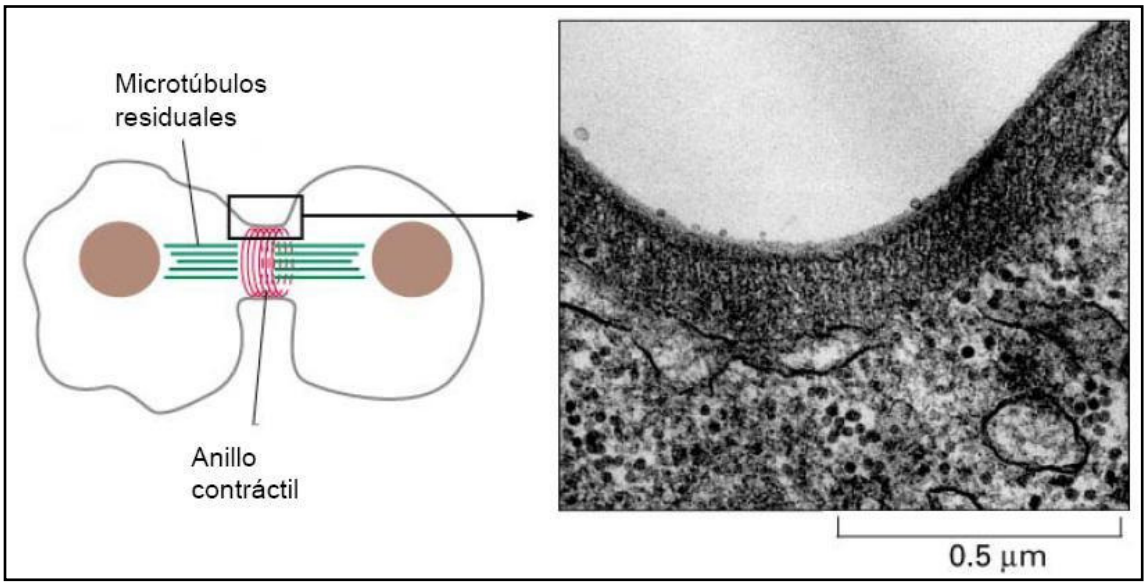


◄ Esquema de la sección transversal del aparato auditivo (el órgano de Corti) en el oído interno de un mamífero, en el que se observan las células ciliadas del oído situadas en una intrincada estructura epitelial de células de sostén y recubiertas por una masa de matriz extracelular (la membrana tectorial). El epitelio que tiene las células ciliadas se halla en la membrana basilar: una capa delgada y elástica de tejido que forma una división larga y estrecha entre dos canales llenos de fluido. El sonido provoca cambios de presión en estos canales y hace vibrar la membrana basilar hacia arriba y hacia abajo.



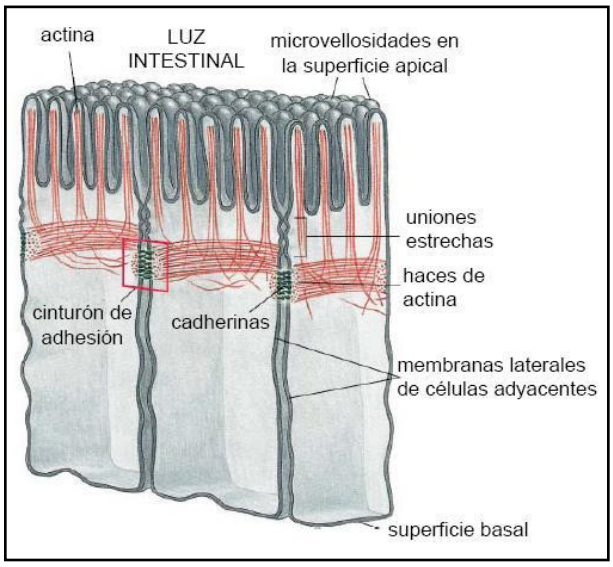
◄ La célula actúa como un transductor, generando una señal eléctrica en respuesta a las vibraciones de sonido que hacen vibrar el órgano de Corti, lo cual provoca la inclinación de los estereocilios (que son de distintos tamaños). Un filamento delgado se eleva más o menos en vertical desde el extremo de cada estereocilio inferior y se adhiere a un punto más elevado en el cilio adyacente más alto. La inclinación del haz tensa los filamentos, que tiran mecánicamente de los canales iónicos cerrados de la membrana de los estereocilios. La abertura de estos canales permite un flujo de cargas positivas que despolariza la membrana de la célula ciliada, es decir, se forma un estímulo nervioso que al pasar por las fibras nerviosas y llegar al cerebro generará, tras un mecanismo de procesamiento, la sensación de audición.

- Anillo contráctil:



▲ El anillo contráctil empieza a ensamblarse por debajo de la membrana plasmática. Pero muchos de los preparativos para la citocinesis se producen prematuramente durante la mitosis, antes de que la división del citoplasma empiece realmente. En las células en interfase, los filamentos de actina y de miosina están ensamblados formando una red cortical.
En cuanto las células entran en mitosis, estas formaciones se desensamblan; la mayor parte de la actina se reorganiza y se liberan los filamentos de miosina II. Cuando las cromátidas se separan durante la anafase, empieza la acumulación de miosina II formando inmediatamente el anillo contráctil.

- Uniones adherentes:



Recuerdos de temas anteriores:

Ocupa una superficie de zónula, ya que está junto a las uniones estrechas. Esta estructura está rodeando toda la célula, formando el llamado *cinturón de adhesión*. Durante el desarrollo embrionario tiene capacidad contráctil, lo que le confiere funciones específicas.

Proteínas intracelulares de anclaje: cateninas α, cateninas β y cateninas γ, vinculina y α-actinina.

Proteínas transmembrana: cadherina, que se encuentra formando homodímeros entre células vecinas constituyendo la unión entre las células.

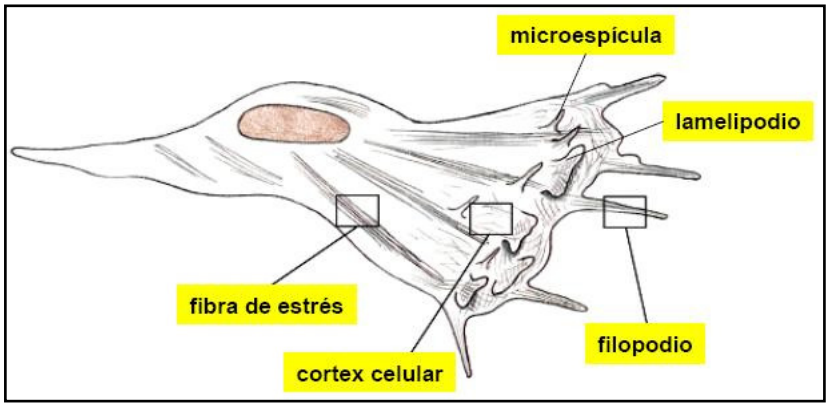
Filamentos del citoesqueleto: actina.

▲ En la imagen vemos uniones adherentes, en forma de bandas de adhesión, localizadas entre las células epiteliales del intestino delgado.
La banda o cinturón de adhesión rodea cada una de las células que interactúan. Su característica principal es la de constituir un anillo contráctil de filamentos de actina, situado en la cara citoplasmática de la región membranosa implicada en la unión.

- Células en cultivo:

Las células en cultivo, en muchos casos presentan alteraciones en la membrana plasmática o modificaciones en la disposición de los filamentos:

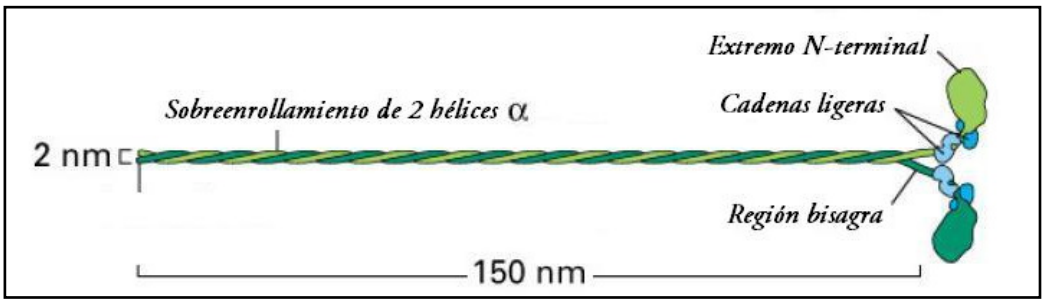
- Fibras de estrés, que son haces de actina que aparecen en la zona de la célula por la que se pega al frasco de cultivo.
- Córtex celular, que es una acumulación de filamentos de actina situados justo debajo de la membrana plasmática
- Filopolios, que son estructuras alargadas unidimensionales, parecidas a las microvellosidades, solo que más largas, más delgadas y más dinámicas.
- Microespículas, que son parecidas a los filopodios pero más cortas.
- Lamelipodios, estructuras en forma de lámina, formados por una red octogonal de filamentos de actina entrecruzados, que permiten a la célula extenderse a través de una superficie sólida.
- Pseudópodos, son otras prolongaciones pero con forma vesicular.



26.3.- Miosina.

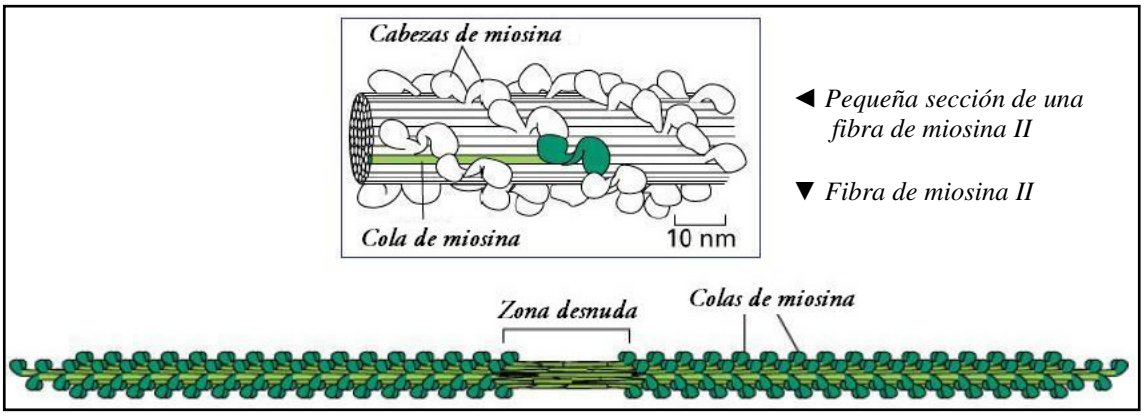
La miosina es una superfamilia de proteínas motoras basadas en la actina. La primera proteína identificada de este grupo fue la miosina del músculo esquelético, responsable de la generación de la fuerza de contracción muscular. Esta miosina, llamada *miosina II*, es una proteína alargada dimérica, formada por dos cadenas pesadas (cada una de las cuales presenta alrededor de 2.000 aminoácidos) y dos copias de dos cadenas ligeras (dos cadenas ligeras por cada cadena pesada).

Cada una de las cadenas pesadas dispone de un dominio apical globular en su extremo N-terminal que contiene la maquinaria generadora de la fuerza, seguido de una secuencia de aminoácidos muy larga que forman un dominio helicoidal que favorecen la dimerización de la cadena pesada. Esta asociación está mediada por la asociación de aminoácidos hidrofóbicos localizados regularmente.



▲ Molécula de *miosina II.*

Las dos cadenas ligeras se unen cerca del dominio apical N-terminal, mientras que la cola helicoidal se empaqueta con las colas de otras moléculas de miosina. Estas interacciones cola-cola permiten la formación de filamentos gruesos bipolares formados por cientos de cabezas globulares, que en los extremos del filamento grueso se hallan orientadas en direcciones opuestas.



Cada cabeza de miosina une e hidroliza ATP, utilizando la energía de la hidrólisis para "caminar" hacia el extremo *más* del filamento de actina. La orientación opuesta de las cabezas en el filamento grueso hace que el filamento sea eficiente para deslizar pares de filamentos de actina orientados de forma opuesta, acercándolos entre sí. En el músculo esquelético, en el cual los filamentos de actina están organizados cuidadosamente y alineados formando filamentos finos que envuelven los gruesos filamentos de miosina, el deslizamiento dirigido por el ATP de los filamentos de actina provoca lac contracción muscular. Los músculos cardiaco y liso tienen también miosinas dispuestas de forma parecida, aunque están codificadas por genes distintos.

Se han descubierto multitud de miosinas diferentes. En la actualidad se conocen al menos 18 tipos de estas proteínas motoras, que pueden ser tanto monoméricas como diméricas. Entre ellas hay algunas diferencias pero la estructura es similar.

Algunas miosinas aparecen solo en plantas, y otras solo en vertebrados, pero la mayoría se encuentran en todas las células eucariotas. El genoma humano contiene unos 40 genes de miosina.

Todas las miosinas se desplazan hacia el extremo *más* de los microfilamentos, excepto una, la miosina VI, que lo hace hacia el extremo *menos*. Independientemente de la dirección y sentido del desplazamiento, cada una de las miosinas lo hace a velocidad diferente.

Según el tipo de miosina al que nos refiramos, podremos citar unas funciones u otras, aunque muchas de las funciones de la mayoría de las miosinas se desconocen. Las más importantes son:

- *Miosina II*: su actividad siempre está asociada a la actividad contráctil en células musculares y no musculares. También es necesaria para la citocinesis, para dividir el citoplasma de la célula en dos, y para desplegar el soma celular durante la migración.
- *Miosina I*: contiene un segundo lugar de unión a actina o un lugar de unión a la membrana en sus regiones de cola y generalmente está implicada en la organización intracelular y la protrusión de estructuras ricas en actina de la superficie
- *Miosina V*: interviene en el transporte de orgánulos y vesículas.
- *Miosina VII*: se encuentra en el oído interno de los vertebrados, y su falta provoca sordera en ratones y humanos.

26.4.- Filamentos intermedios.

Características generales:

Todas las células eucariotas presentan actina y tubulina. Sin embargo, el tercer tipo principal de filamentos del citoesqueleto, los filamentos intermedios, sólo se encuentran en algunos metazoos, entre los que están vertebrados, nematodos y moluscos. Incluso en estos organismos, los filamentos intermedios no son necesarios para todos los tipos celulares. Por ejemplo, las células gliales altamente especializadas, llamadas oligodendrocitos, que fabrican mielina en el sistema nervioso central de los vertebrados no tienen filamentos intermedios. Se piensa que sus genes son duplicaciones con algunas modificaciones, de los genes de las laminas nucleares.

Estos filamentos presentan propiedades mecánicas que los hacen especialmente útiles para los animales de cuerpo blando como los nematodos y vertebrados, que no tienen exoesqueleto. Los filamentos intermedios son particularmente abundantes en el citoplasma de las células sometidas a estrés mecánico y parece que su función más importante consiste en proporcionar resistencia física a las células y a los tejidos.

Son filamentos de entre 8 y 12 nm de diámetro (10 nm aproximadamente). Debido a su gran resistencia, los encontramos por ejemplo en los desmosomas y hemidesmosomas, donde se encargan de unir fuertemente la célula a otra célula vecina o a la matriz extracelular, respectivamente.

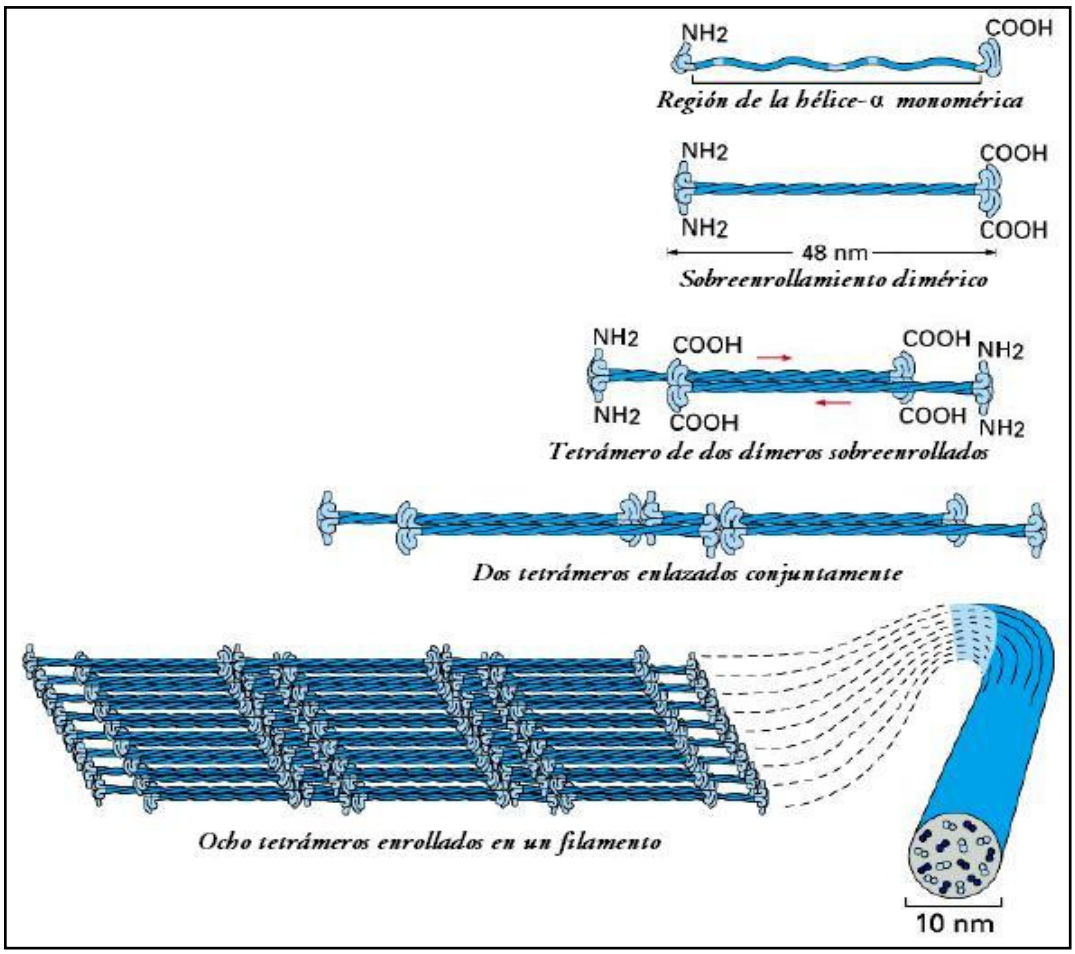
Podemos encontrar diferentes filamentos intermedios, que conservando la parte central, difieren en los extremos, según diferentes tipos celulares. Según

el tipo de filamento, podremos identificar el tipo celular, algo que será de gran utilizad en anatomía patológica, para identificar anomalías.

Organización molecular:

Los polipéptidos individuales de los filamentos intermedios son moléculas alargadas que presentan un dominio central en hélice α que se enrosca con otro monómero igual formando una superhélice (dimérica). Entonces, un par de dímeros paralelos se asocian de modo antiparalelo formando un tetrámero inestable. Este tetrámero representa la subunidad soluble que sería análoga al dímero de tubulina αβ, o al monómero de actina.

La subunidad tetramérica está formada por dos dímeros que apuntan en direcciones opuestas, por lo que sus dos extremos son iguales. Así, el filamento intermedio una vez ensamblado no tiene polaridad estructural (no tiene extremo *más* ni extremo *menos*) que es crítica para los filamentos de actina y los microtúbulos. Los tetrámeros se empaquetan lateralmente entre sí dando lugar al filamento, que tiene aspecto de cuerda, y que está formado por ocho protofilamentos en paralelo constituidos por 2 tetrámeros. Así, cada filamento intermedio tiene una sección transversal de 32 hélices enrolladas. Este gran número de polipéptidos alineados, unidos mediante interacciones hidrofóbicas laterales fuertes típicas de las proteínas con sobreenrollamientos, proporciona a los filamentos intermedios su resistencia. Se pueden formar fácilmente, pero es muy difícil romperlos, por lo que son los filamentos más estables de todo el citoesquelete.



Todavía conocemos muy poco acerca del mecanismo de ensamblaje y desensamblaje de los filamentos intermedios. Sin embargo sabemos que la mayoría de tipos celulares son estructuras muy dinámicas (presenta un elevado recambio de subunidades). En condiciones normales probablemente su desensamblaje está regulado por fosforilación de proteínas, al igual que la fosforilación regula el desensamblaje de las laminas nucleares durante la mitosis.

Tipos:

Existen una gran variedad de formas de filamentos intermedios, los cuales además presentan bastantes más variaciones de secuencia en sus isoformas que las que existían en las isoformas de actina y de tubulina. Como hemos dicho, en los diferentes filamentos intermedios, la parte central (dominio en hélice α) es similar en todos, mientras que los extremos (dominios globulares N-terminal y C-terminal) son muy diversos, según los tipos celulares.

Los diferentes tipos celulares expresan familias distintas de filamentos intermedios.

- Nucleares:
  Su componente polipeptídico son las laminas A, B y C, que se localizan en las células eucariotas en la lámina nuclear, rodeando la capa interna de la envoltura nuclear. Se regulan por fosforilación.

- Proteínas relacionadas con la vimentina:
  Son un conjunto de proteínas diversas, que se localizan cada una de ellas en un tipo celular diferente, y de las que podemos destacar:
  - Vimentina, que se encuentra en células de origen mesenquimático como los fibroblastos.
  - Desmina, que se localiza en células musculares.
  - Proteína glial ácida fibrilar, que aparece en células gliales (astrositos y células de Schwann).
  - Periferina, que las encontramos en algunas neuronas.

- Epiteliales:
  La familia de filamentos intermedios más diversa es la de las queratinas. En las células epiteliales humanas hay cerca de 20 tipos distintos de citoqueratinas, de los cuales, más de 10 son específicos de las uñas y del cabello. Una sola célula epitelial puede producir muchos tipos de queratinas, las cuales copolimerizan formando una red única. Cada filamento de queratina está formado por una cantidad idéntica de cadenas de queratina de tipo I (acídicas) y de tipo II (neutras/básicas); estas forman heterodímeros, que se unen dos a dos para formar la subunidad tetramérica fundamental. Las redes de queratina entrelazadas se mantienen unidas mediante puentes disulfuro y pueden sobrevivir incluso después de la muerte de sus células, formando cubiertas resistentes en los animales, como es el caso de las capas externas de la piel y del cabello, las uñas, las garras, y las escamas.

PATOLOGÍA

Las mutaciones en los genes que codifican las queratinas pueden provocar algunas enfermedades genéticas humanas. Así, cuando se expresan queratinas anómalas en las capas basales de la epidermis, se produce una *epidermólisis bullosa simple*, en la que la piel se descama en respuesta a un estrés mecánico muy débil, el cual rompe las células basales.

Existen otros tipos de enfermedades parecidas entre las que se encuentran trastornos de los epitelios que revisten el esófago, la boca y la cornea; están causados por mutaciones en diferentes queratinas cuya expresión es específica de esos tejidos. Todas estas enfermedades se caracterizan por una rotura celular como consecuencia de una lesión mecánica y una desorganización o alteración del citoesqueleto de filamentos de queratina. Muchas de las mutaciones específicas que pueden producir estas enfermedades alteran los extremos del dominio central, lo cual pone de manifiesto la importancia de esta zona especial de la proteína para el correcto ensamblaje del filamento.

La diversidad de las queratinas es clínicamente muy útil para el diagnóstico de los cánceres epiteliales (carcinomas), puesto que el patrón particular de queratinas expresado proporciona una indicación del tejido epitelial en el que puede haberse originado el cáncer, lo cual puede ser de gran ayuda para escoger el tratamiento más adecuado.

- Axonales:

  Este tipo de filamentos intermedios, también llamados neurofilamentos, se encuentran en concentraciones elevadas distribuidos a lo largo de los axones de las neuronas de los vertebrados. *In vivo* se ensamblan conjuntamente tres tipos de proteínas de los neurofilamentos:

  - NF-L
  - NF-M
  - NF-H

  } Las letras L, M, y H, vienen dadas por el peso molecular; así, L es ligero (*light*), M es medio y H es pesado (*heavy*).

  Forman heteropolímeros que contienen NF-L y uno de los otros dos monómeros. Las proteínas NFH y NF-M tienen dominios C-terminales muy largos que se unen a los filamentos vecinos, generando estructuras alineadas con un espacio entre filamentos uniforme. Durante el crecimiento axonal se incorporan nuevas subunidades de neurofilamento a lo largo del axón en un proceso dinámico que implica la unión de nuevas subunidades a lo largo del neurofilamento, y de subunidades a los extremos del filamento. Después de que un axón haya crecido y haya conectado con su célula diana, el diámetro del axón puede aumentar hasta 5 veces. Parece ser que el nivel de expresión del neurofilamento está directamente controlado por el diámetro axonal, que a su vez controla la velocidad a la que viaja la señal eléctrica a lo largo del axón.