¿QUÉ ES LA BIOLOGÍA CELULAR? 4

CITOESQUELETO 5

ACTINA 5
Drogas que afectan a la polimerización 7
Proteínas de unión a la actina 7
Proteínas de control de la polimerización 8
Entrecruzamiento de proteínas 8
Proteínas de control de interacción 8
Proteínas de unión a la membrana 8
Proteínas motoras 9
Estructuras y funciones asociadas a los filamentos de actina 11
Anillo contráctil de las células en división. 11
Citoesqueleto del eritrocito 11
Reacción acrosomal 12
Corrientes citoplasmáticas 13
Estructura de los microvilli 13
Fibras de estrés 14
Cinturones de adhesión 14
Movimiento celular 15
Movimiento ameboidal 15
Movimiento fibroblástico 15
Regulación 16
MICROTÚBULOS 17
Características de los microtúbulos 17
Inestabilidad dinámica 18
Explicación fisiológica 19
MAPs 19
MAPs estabilizadoras 19
MAPs desestabilizadoras 20
Motores microtubulares 20
Dineína 21
Dineína flagelar 21
Dineína citoplasmática 21
Kinesina 21
Drogas que afectan a los microtúbulos 21
Centros organizadores de microtúbulos (MTOC) 22
Centrosomas 22
Corpúsculos basales 22
Cilios y flagelos 23
FILAMENTOS INTERMEDIOS 24
Heterogeneidad de los Filamentos Intermedios 26
Queratinas 26
Proteínas relacionadas con la vimentina 26
Neurofilamentos 26
Internexina 26
Láminas nucleares 27
Nestina 27
Estructura de los filamentos intermedios 27
Dinámica de los filamentos intermedios 28
Proteínas asociadas a filamentos intermedios 28

RELACIONES CÉLULA – ENTORNO 29

MATRIZ EXTRACELULAR 29
Colágeno 29
Formación del colágeno 29
Glucosaminoglucanos 30
Ácido hialurónico 30
Proteoglucanos 31

Agrecano 31
CDC44 31
Sindecanos 31
GLUCOPROTEÍNAS DE ADHESIÓN 32
Fibronectina 32
Laminina 33
Tenascina 33
SISTEMAS DE ADHESIÓN CELULAR 34
Sistemas de adhesión con la matriz 34
Integrinas 34
Interacciones con el citoesqueleto 34
Regulación 35
Señalización intracelular 35
Proteoglucanos transmembrana 36
Adhesión célula - célula 36
Cadherinas 36
Cateninas 37
β catenina 38
Desmosomas 38
Miembros de la familia de las Inmunoglobulinas 38
Selectina 39
Integrinas 39
Uniones celulares 39
Uniones estancas 39
Uniones de comunicación 40
Uniones GAP 40
Plasmodesmas 40
REMODELACIÓN O DEGRADACIÓN DE LA MATRIZ 40

NÚCLEO 41

ESTRUCTURA 41
Cromatina 41
Origen de replicación 41
Telómeros 42
Proteínas del telómero 42
Centrómeros 42
Esqueleto nuclear 43
Láminas nucleares 43
NPC 43
Matriz nuclear 43
MITOSIS 44
NUCLEOLO 44

TRANSPORTE NUCLEAR 46

TRANSPORTE CITOSOL – NÚCLEO 46
M_9 51
TRANSPORTE NÚCLEO – CITOPLASMA 52

PROTEÍNAS CITOSÓLICAS 53

Modificaciones posttraduccionales 53
Glucosilación 53
Incorporación covalente de coenzimas 53
Procesos reversibles 53
Adición de ácidos grasos 53
Acción de chaperonas 54
Determinación de la vida media 54
DEGRADACIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN EL CITOSOL 54
Proteosoma 55
SÍNTESIS Y TRANSLOCACIÓN DE PROTEÍNAS 55
SRP 56

COMPLEJO DE GOLGI **59**

ESTRUCTURA DEL COMPLEJO DE GOLGI 59
FUNCIONES DEL COMPLEJO DE GOLGI 60
TRANSPORTE DE PROTEÍNAS RER – GOLGI 61
Etapas del transporte y sus características *61*
Mecanismos de transporte y retención *62*
MECANISMOS DE RETENCIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN EL GOLGI 63

LISOSOMAS **65**

TRÁFICO VESICULAR **66**

CLATRINA 66
COP 67
Localización de las distintas vesículas *67*

FUSIÓN DE MEMBRANAS **69**

EXOCITOSIS 69
Entrada de virus 69
ENDOCITOSIS 70
Endocitosis mediada por receptor *71*
Transcitosis *71*
Potocitosis *71*
Fagocitosis *72*

CLOROPLASTOS, MITOCONDRIAS Y PEROXISOMAS **73**

MITOCONDRIAS 73
CLOROPLASTOS 74
PEROXISOMAS 74

CICLO CELULAR **75**

MPF 76
APOPTOSIS 79

ESQUEMAS ..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

PRÁCTICAS DE BIOLOGÍA CELULAR ..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

DIRECCIONES WEB DE INTERÉS **80**

ARTÍCULOS CITADOS EN CLASE **83**

¿QUÉ ES LA BIOLOGÍA CELULAR?

La Biología Celular intenta conocer el funcionamiento de las células, intentando saber como encajan los diferentes componentes que forman las células, que son las unidades funcionales más complejas que se conocen ya que cada célula está compuesta por unidades muy diferentes, en un elevado número. Se ha de tener en cuenta además que las células no son estáticas, sino que varían con el tiempo, conformando una estructura dinámica. En la Biología celular se estudiarán principalmente las células eucariotas, sin hacer distinciones entre células animales y vegetales.

CITOESQUELETO

Es el elemento del citoplasma que más relaciones establece con los demás componentes celulares. Se trata, como muchos otros componentes, de una estructura dinámica. Es el componente más abundante a nivel celular. Inicialmente se identificó visualmente mediante el microscopio electrónico como una estructura fibrosa, por lo que la denominaron citoesqueleto, a pesar de que 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. Es fácil de identificar en su totalidad, pero no la identificación de sus componentes individualmente. Las técnicas que se emplean para identificar los componentes son las de inmunocitoquímica. El citoesqueleto se puede aislar sometiendo a la célula a una extracción diferencial, empleando un lavado con detergentes, con lo que todas las membranas lipídicas se verán destruidas, por lo que desaparecerán todos los orgánulos menos citoesqueleto y núcleo, que podrá ser eliminado posteriormente con facilidad.

A nivel de citoesqueleto distinguimos entre 3 componentes:

Microfilamentos de actina	∅ 5 – 9 nm
Microtúbulos	∅ 25 nm
Filamentos intermedios	∅ 8 – 11 nm

En ocasiones los filamentos se pueden agrupar formando estructuras de diámetro superior. Ocasionalmente se han considerado otros componentes del citoesqueleto, como la matriz citoplasmática, o incluso, la matriz nuclear.

Todas las células eucariotas tienen citoesqueleto en mayor o menor grado. Incluso las células procariotas han llegado a desarrollar estructuras similares. Es responsable de los mecanismos de comunicación y señalización, a la vez que interviene en el movimiento e incluso da forma.

ACTINA

Los filamentos de actina son los elementos más abundantes en el citoesqueleto, y por lo tanto la actina es la proteína más abundante en la célula, pudiendo ser el 5% o más de la proteína celular total. Se trata de una proteína muy versátil, con muchas funciones.

La actina se compone de 375 aminoácidos, codificado por un gen que se halla presenta en todos los organismos eucariotas, en menor o menor cantidad, pero siempre en un número mínimo de uno. Este hecho permite deducir que se trata de una proteína de gran importancia para la vida de la célula. Generalmente, el gen de la actina está muy conservado en todas las especies. En mamíferos y aves existen 6 tipos diferentes de actina:

4 actinas α	Músculo esquelético estriado
	Músculo cardíaco
	Músculo liso
	Músculo entérico liso
1 β actina	Todos los tipos celulares
1 γ actina	Todos los tipos celulares

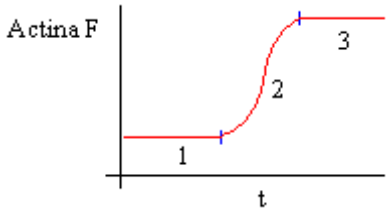
Las actinas presentes en todos los tipos celulares podrán desempeñar funciones muy parecidas, pero las actinas presentes en los tejidos musculares han tendido a una especialización, al igual que toda la actina.

Las diferencias entre las distintas cadenas de actina α pueden oscilar entre 1 – 2%, que serían de 4 a 6 aa, mientras que las diferencias con la β actina serían del 8%, de aproximadamente 25aa. La γ actina también se diferenciaría de la β actina en unos 25aa.

La actina pasará también por procesos de modificación posttraduccionales. En otros tipos de organismos existirán más diferencias, por lo que no se podrán realizar generalizaciones. En algunas plantas existen hasta 60 tipos de genes de la actina, mientras que las levaduras sólo tienen un tipo.

Todas las proteínas de actina tienen la capacidad de formar filamentos, pero distinguimos 2 tipos de proteínas de actina, la actina G o globular y la actina F, que forma las fibras. Actualmente se conoce muy bien la actina, incluso su forma tridimensional, para lo cual existen 2 técnicas básicas. Por un lado, mediante la difracción de rayos X se puede conocer muy bien la forma de la actina, pero no en condiciones fisiológicas, lo que sí se puede hacer mediante la técnica de la resonancia magnética nuclear. Se conoce en que punto de la actina está ubicada cada función de la proteína. Encontramos una región de unión al ATP, pero también encontramos 4 regiones de unión a la actina. La actina también tiene la capacidad de unirse a otras proteínas, como la miosina, que se une a la actina en puntos de unión cercanos al C terminal y al N terminal.

La actina se puede polimerizar formando filamentos *in vitro*, si en el medio hay ATP e iones, y, obviamente, actina.



En el gráfico se muestra la cinética de polimerización típica, que se repite en muchos casos. Existen 2 fases, identificadas con números en el gráfico.

1. En esta fase podemos encontrar pequeños polímeros de actina F, de 3 a 4 unidades cada uno. Se trata de una fase de nucleación.
   Es la fase más lenta de todo el proceso. También se conoce como fase lag.
   Una célula viva puede mantener una reserva de unidades pequeñas de actina, para polimerizar más rápido.
2. Es la fase exponencial típica de crecimiento, en la cual los monómeros se van uniendo a los extremos del polímero de actina.
3. Existe un equilibrio entre la actina F y la G, ya que el crecimiento del polímero mediante la adición de polímeros se iguala a la pérdida de monómeros en el otro extremo, con lo que no aumenta la longitud del filamento. El punto en que se estabiliza el crecimiento depende de la concentración de actina G, siendo esta concentración de equilibrio la denominada concentración crítica. Por lo tanto, la célula, si tiene que modificar la longitud del filamento sólo tendrá que regular la concentración de actina, G, alterando la concentración crítica.

Otro aspecto importante en los filamentos de actina es el hecho de saber si poseen o no polaridad en su crecimiento mediante la polimerización. Para estudiar este hecho se emplean cabezas de miosina S_1, que es una proteína que se une a la actina. La miosina se debe adicionar en el punto en que comienza la fase 3, después del cual volveremos a añadir actina G. En primer lugar, la miosina se unirá a los filamentos ya existentes, y al añadir nueva actina, los filamentos volverán a crecer, con lo que sí existe polaridad, la miosina estará en un extremo el filamento, ya que la polimerización se producirá principalmente en un extremo del filamento. Se asumió entonces que existía polaridad del filamento de actina, por lo que tenemos 2 extremos diferenciados. Por un lado, el extremo +, de polimerización rápida y lenta despolimerización, mientras que el lado contrario es el extremo -, cuya despolimerización es más rápida y su polimerización es más lenta. Los diferentes extremos tienen diferentes concentraciones críticas, por lo que se puede alterar el crecimiento de los filamentos, alterando las concentraciones de actina G a nivel local.

Debido a la polaridad de los filamentos de actina, poseen unos determinadas propiedades, diferentes en cada extremo. La polaridad de los filamentos está determinada, en parte, a la conformación de la actina, y a la situación de los distintos dominios de interacción. El ATP se hidroliza a ADP, a medida que la actina se va polimerizando, de manera que el ATP en el extremo del filamento facilitará la polimerización.

Drogas que afectan a la polimerización

Existen sustancias químicas que afectan a la actina.

Phaloidina, característica de *Amanita phalloides*	Se una a la actina en forma filamentosa, uniéndose a 2 monómeros a la vez. Con estas interacciones se evita la movilidad, propia de la actina, ya que se provoca rigidez, lo que impide la correcta relación entre las proteínas. Mediante esta sustancia se pueden estudiar los filamentos de actina.
Citocalasinas	Provocan la despolimerización de los filamentos. Se une a la atina G, provocando la despolimerización de la actina F.

Proteínas de unión a la actina

Los filamentos de actina forman estructuras entre los diferentes orgánulos de la célula, pero existen multitud de estructuras con diferentes funciones. Para poder realizar todas las funciones son necesarias las proteínas moduladoras que se unen a la actina.

Existen 2 mecanismos de regulación:

Acción competitiva y cooperativa de las proteínas de unión a la actina:

En el caso del músculo, la unión de la troponina facilita la entrada de otras proteínas a la actina, y así sucesivamente. Pero también impide la unión de la filamina, que provocaría una ordenación espacial específica de la actina.

Regulación del estado conformacional:

Si varía la conformación, variarán las capacidades de unión a otras proteínas. Existen muchos para alterar la conformación de la actina:

Fosforilación	
Regulación por calcio	Unión de Calcio a otras proteínas o iones. Muchas proteínas tienen dominios de unión a calcio. Un ejemplo sería la gelsolina, que es un dímero de unión a la actina, que rompe los filamentos, siempre que haya una elevada concentración de calcio.

Las proteínas de unión a la actina se pueden clasificar de diversas maneras. Un método útil de clasificación es la función:

Control de polimerización
Formación de haces
Control de interacción
Unión a membranas
Proteínas motoras

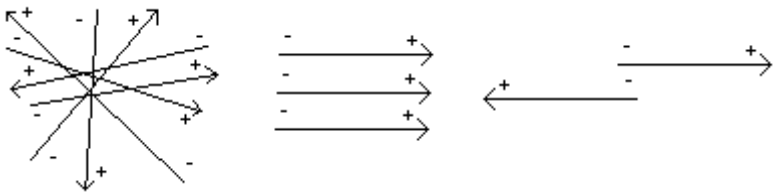
Proteínas de control de la polimerización

Podemos distinguir entre 3 tipos de proteínas de control de polimerización:

Capping	Se unen a los extremos del filamento. Si se une a ambos extremos, el filamento pasará a ser estable. Es muy importante esta función en las células musculares, para que se mantengan los filamentos de actina. En células del músculo las proteínas son 2 proteínas capping: CapZ y α actinina
Fragmentadoras	La Gelsolina es una proteína fragmentadora, en presencia de calcio. Se une a la actina, rompiendo los filamentos. Mientras que la concentración de calcio se mantenga alta, la gelsolina permanecerá unida a la actina, con lo que la actina se mantendrá fragmentada, pero al bajar la concentración, se formarán los filamentos de nuevo, muy rápidamente.
Secuestradoras	Una proteína secuestradora es la profilina, que está presente en todos los tipos celulares con variaciones locales de concentración. Estas proteínas se unen a los monómeros de actina, manteniendo por lo tanto un stock de actina sin polimerizar. La polimerización será más lenta que en el caso de la gelsolina.

Entrecruzamiento de proteínas

Existen 3 maneras de asociación de proteínas:



Todas las proteínas con estas funciones han de unirse a, como mínimo, dos filamentos de actina. Por un lado, la filamina sería la encargada de disponer los filamentos de actina como se observa en la primera figura, en una disposición desordenada. Esta proteína desempeña un importante papel en los procesos de migraciones celulares,... La segunda disposición muestra los filamentos de actina dispuestos de manera paralela. Todas las proteínas encargadas de colocar los filamentos de actina en esta posición, característica del músculo, provienen de una misma familia, conocida como las espectrinas. Se trata de proteínas tetraméricas, que se asocian en forma de 2 cadenas α y 2 cadenas β. Se trata de una proteína muy larga, de aproximadamente 100 nm. Existen otras proteínas, como la distrofina, que es la responsable de la distrofia muscular. Esta proteína está unida por un lado a la membrana muscular, mientras que por el otro lado forma uniones con la actina.

Proteínas de control de interacción

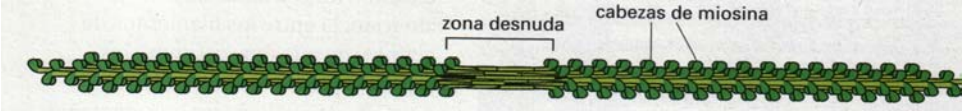
Algunas proteínas se unen a la actina, permitiendo así que otras proteínas puedan interaccionar con el filamento, como es el caso de la tropomiosina.

Proteínas de unión a la membrana

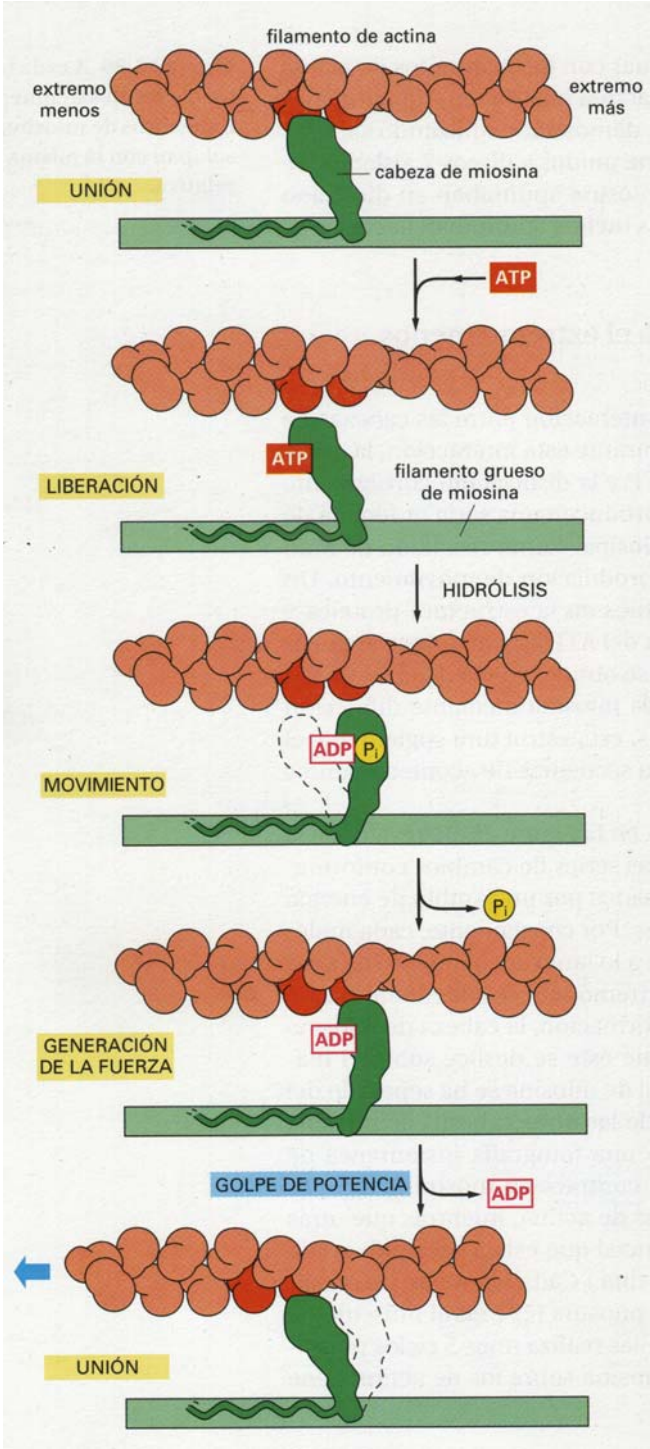
Los filamentos de actina suelen estar unidos también a la membrana plasmática, mediante proteínas de unión a ésta.

Proteínas motoras

Promueven el movimiento asociado a la actina. La más importante es la miosina, que actualmente se sabe que es en realidad una familia de proteínas con capacidad motora. Se distinguen 7 clases diferentes de miosina, de las que la muscular es la de tipo II.



En la imagen se muestra un filamento de miosina.



En primer lugar nos centraremos en al miosina de tipo II, que compone las fibras musculares. La miosina de tipo II consta de 2 subunidades idénticas. En el extremo N terminal encontramos un dominio globular, mientras que de este sale una cola que tiene forma de hélices α. Estas hélices α tienen tendencia a asociarse unas con otras. La proteína mide aproximadamente 130 nm. A cada una de las cabezas se asocia una cadena ligera. Existen además zonas flexibles en la cabeza y cerca de la cola. La miosina se asocia espontáneamente de manera bipolar. Las cabezas sobresalen por lo tanto del filamento. Si se somete a tratamiento de quimiotripsina, lo primero en romperse serán las partes flexibles. Los filamentos sólo se formarán por uniones a nivel de la cola. Si continuamos el tratamiento con pepsina, se romperá la hélice α en la zona cercana a la cabeza. La propiedad más importante de la miosina reside en las cabezas, que es la zona capaz de hidrolizar ATP en presencia de actina, uniéndose a ella. Cada una de las cabezas se compone de la cabeza de miosina, y de las 2 colas ligeras unidas a ella. La capacidad de hidrolizar ATP es de las más altas que se conocen, pudiendo llegar a hidrolizar, 1 sola molécula de miosina, entre 5 y 6 moléculas de ATP por segundo.

En la imagen de la izquierda se puede observar el proceso de funcionamiento de la miosina. Está dividido en 5 pasos.

UNIÓN: Una cabeza de miosina, sin ningún nucleótido unido se une a un filamento de actina, en la configuración de rigor, responsable del *rigor mortis*, En un músculo de contracción activa, este estado es de corta duración y finaliza rápidamente mediante la unión a la molécula de ATP.

LIBERACIÓN: Una molécula de ATP se une en el surco de la parte trasera de la cabeza de miosina, en la parte más alejada del filamento de actina, lo que provoca un cambio de conformación de los dominios, liberando el lugar de unión a la actina. Esto

reduce la afinidad de la cabeza por la actina, permitiendo así el desplazamiento a lo largo del filamento.
MOVIMIENTO: El surco se cierra 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 de ATP, pero el ADP y el Pi quedan unidos a la miosina.
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 Pi, producido por la hidrólisis de ATP, con lo que se refuerza la unión de la cabeza con la actina. Esta liberación provoca el golpe de potencia, originado en la cabeza de miosina al volver a su conformación original. Durante este golpe de potencia se desprende el ADP y se podrá iniciar un nuevo ciclo.
UNIÓN: Al final del ciclo, la cabeza de miosina se encuentra íntimamente relacionada con el filamento de actina en la configuración de rigor. Se ha desplazada la miosina una unidad de actina.

Una vez conocido el funcionamiento del movimiento, se ha de comentar que se da desplazamiento del extremo – al +. Estos procesos son comunes a todas las miosinas, lo que las diferencia unas de otras está en realidad a nivel conformacional.

A nivel de la miosina presente en las células musculares lisas, la principal diferencia con otros tipos de miosina son las 2 cadenas ligeras de la cabeza. En un principio, la molécula está inactiva, pero al recibir una serie de señales, que implicarán la fosforilación de 1 de las cadenas ligeras de la cabeza, se desplegará formando filamentos. Una vez fosforilada una de las cadenas ligeras, se producirá la unión a la actina, y mediante la entrada de calcio, se dará la contracción, que será más lenta que en el músculo estriado, ya que, por un lado, se han de formar los filamentos, pero también las cabezas de actina tienen una menor capacidad de hidrolizar ATP, del orden de unas 10 veces menos. Esto provocará que en ocasiones la contracción tarde más en llegar, puede que alrededor de un segundo, en comparación con los milisegundos del músculo esquelético estriado. La miosina de tipo II, es la presente en todos los tipos celulares, en una forma similar a la del músculo liso.

Se conocen 7 tipos de miosina, que en líneas generales son muy similares, sobre todo a la altura de la cabeza, donde todas se unen a cadenas ligeras, y donde todas tienen su capacidad de hidrolizar ATP. Las miosinas de tipo V y VI son dímeros, acabados en dominios globulares. La miosina I y la V monomérica tienen puntos de unión a fosfolípidos, es decir a membranas. Existe otro tipo de I, que tiene la capacidad de unirse a la actina por la cola. La miosina III tiene un dominio especial, y sólo pueden ser localizadas en los microvilli de los rabdomas. De las miosinas IV y VIII se desconoce su función, pese a saber que tienen dominios globulares.

La miosina es una proteína muy conservada a lo largo de la evolución. Todas las células tienen algunos genes que codifican en su interior la miosina. La levadura tiene tipo II, y algunos otros tipos de proteínas.

En algunos casos, como en la miosina de tipo V y VI, se puede asociar la cola con gránulos de pigmento, u otras vesículas. La miosina I se conocía anteriormente como ameboidal, pero actualmente se sabe que está presente en todas las especies.

Mediante miosinas podríamos provocar el deslizamiento de la actina sobre ella misma, o bien de una membrana sobre los filamentos.

Estructuras y funciones asociadas a los filamentos de actina

Anillo contráctil de las células en división.

Ocasionalmente se pueden formar en las células haces contráctiles organizados de actina y miosina, para realizar una función específica, deshaciéndose una vez cumplido su cometido. Una de estas estructuras es la del anillo contráctil, que se forma en las células en división. Aparece justo debajo de la membrana plasmática, durante la fase M del ciclo de división celular, concretamente en la anafase temprana. Este anillo provoca la estrangulación de la célula original formando dos células hijas, al acabar la división celular. El anillo contráctil se forma a partir de filamentos de actina, moléculas de miosina y otras proteínas como la radixidina, que es la responsable de la asociación a la membrana plasmática, permitiendo así el resultado final de la división de la célula. Se desconoce el mecanismo de regulación de este proceso, pero se cree que estaría vinculado con calcio, ya que la fosforilación de la miosina es dependiente de calcio, y tanto la fosforilación como el calcio aumentan la interacción de la miosina con la actina, favoreciendo así la formación de filamentos cortos bipolares. Una vez se ha completado la división, se dispersan las moléculas de miosina. La situación exacta del anillo contráctil depende de si se trata de una división simétrica o asimétrica.

Citoesqueleto del eritrocito

El eritrocito es una célula especializada en el transporte de gases. Además, debido a que deberá pasar por capilares de escaso diámetro, no podrá ser una estructura rígida, sino que deberá ser flexible. Una vez lisada la célula, podemos observar la membrana desde su cara interior. Una proteína importante para formar el citoesqueleto es la espectrina, que está unida tanto a actina, como a otra proteína llamada anquirina.

La espectrina es la más abundante de las proteína que están situadas en la membrana del eritrocito, siendo una barra larga, flexible, de unos 100nm de longitud. Constituye el 25% de la masa total de las proteínas de las proteínas asociadas a la membrana, con aproximadamente $2,5 \times 10^5$ copias por célula. Se trata de un heterodímero, formado por dos subunidades estructuralmente muy similares. Los heterodímeros se asocian cabeza con cabeza formando tetrámeros de 200nm de longitud. Las colas de 5 o 6 tetrámeros se enlazan entre sí mediante su unión a filamentos cortos de actina y otras proteínas citoesqueléticas. El resultado es un complejo de unión que se extiende como una red deformable por toda la cara citoplasmática de la célula. Es este citoesqueleto el que permite que los eritrocitos entre por los capilares del cuerpo. En ocasiones, algunos casos de anemia pueden estar originados por deficiencias en la espectrina, de manera que a mayor grado de deficiencia en la proteína, más grave será la anemia.

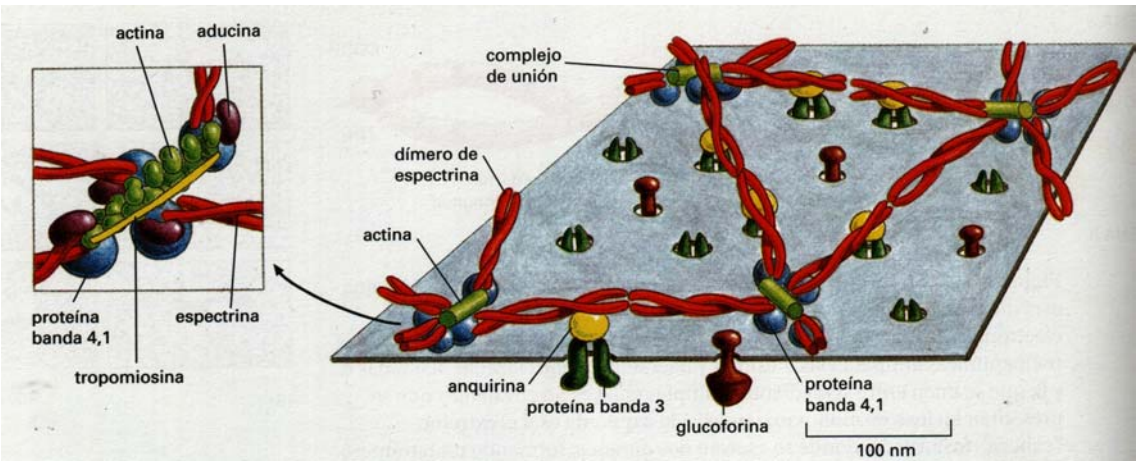
La proteína responsable de sujetar el citoesqueleto de espectrina a la membrana plasmática es la anquirina, que es una proteína intracelular de unión, tanto a espectrina como al dominio citoplasmático de la proteína transmembrana conocida como banda 3. La anquirina conecta por lo tanto el esqueleto de espectrina a la membrana, mediante su unión a la banda 3, a la vez que reduce la difusión de las moléculas de esa proteína en la membrana lipídica. El citoesqueleto de espectrina también se puede unir a la membrana mediante otra proteína, la banda 4,1. Esta proteína se une tanto a la espectrina como a la actina, a la vez que se une al dominio citoplasmático de la banda 3 y a la glucoforina, la otra proteína más abundante en los eritrocitos.

Por debajo de la membrana plasmática de muchas células nucleadas también existe una red de citoesqueleto análoga a la descrita, pero más elaborada y compleja. La red constituye la zona cortical o córtex del citoplasma, es rica en filamentos de actina, que se unen a la membrana de diferentes maneras. En el córtex existirán proteínas estructuralmente homólogas a la espectrina, a la anquirina o a la banda 4,1, pero su organización y función no son tan conocidas como en el caso de los eritrocitos.

Los filamentos de actina en el córtex del eritrocito son muy cortos, y tan solo actúan como elementos de entrecruzamiento entre los tetrámeros de espectrina, mientras que en el córtex de una célula más típica son mucho más largos y se proyectan hacia el citoplasma, donde forman la base de la red tridimensional

de los filamentos de actina. No está claro si moléculas parecidas a la anquirina servirían de anclaje a la membrana plasmática en esta disposición cortical más típica, pero se cree que en algunas células epiteliales, la ATPasa de Na^+ - K^+ transmembrana uniría la red cortical de actina a la membrana plasmática, mediante este tipo de proteínas.

Generalmente, la red cortical de los filamentos de actina determina la forma de la célula y las propiedades mecánicas de la membrana plasmática. Muchos tipos de uniones a membrana necesitan de los filamentos de actina para llevar a cavo sus diversas funciones en el córtex, siendo el acoplamiento de a las proteínas transmembrana como la anquirina tan solo uno de ellos. Existen otro tipo de uniones más dinámicas, pero tan solo están empezando a caracterizarse las proteínas que los median.



En la imagen se representa el citoesqueleto basado en la espectrina del lado citoplasmático de la membrana del eritrocito humano.

Reacción acrosomal

Este proceso se da en la fecundación. No se da en todas las especies, pero sí en todas con fecundación externa. Mediante la reacción acrosomal, se trata de atravesar la protección del oocito. En el espermatozoide encontramos el acrosoma, que es una vesícula llena de enzimas hidrolíticos. Por debajo del acrosoma encontramos la región periacrosómica, donde se puede observar tanto actina como profilina, que es una proteína secuestradora de actina. Estas 2 proteína se encuentran en una relación 1 a 1. Cuando se reconoce la cubierta vitelina, se liberan las sustancias del acrosoma, que degradarán dicha cubierta. A causa de todo esto, la profilina se separará de la actina, con lo que ésta comenzará a polimerizar, formando filamentos. Estos filamentos se dirigirán hacia el oocito, de manera que así se podrá conducir las sustancias acrosómicas hacia el interior de la cubierta, para que la degraden hasta llegar al oocito propiamente dicho.

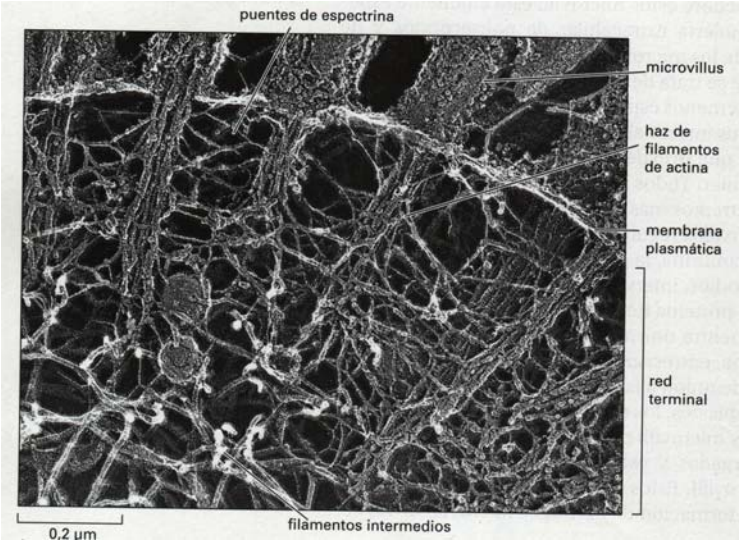
Corrientes citoplasmáticas

Son características de células grandes, donde tienen la función de mantener determinadas concentraciones de metabolitos,... Son muy comunes en células vegetales, cuando tienen una gran vacuola central. Parece ser que están relacionados con cambios locales repentinos de citoplasma, desde una consistencia gelificada a un estado más fluido. A partir de extractos, se han aislado proteínas celulares, que cuando se añaden a un gel de filamina y actina provocarán que cambie a un estado más fluido. La mejor caracterizada de estas proteínas es la gelsolina, que una vez activada por Ca^{2+}, separa los filamentos de actina y forma un casquete en el extremo más, separando así la red de filamentos. Este tipo de proteínas fragmentadoras se activan sólo por concentraciones de calcio que se alcanzan temporalmente en el citosol, como 10^{-6}M.

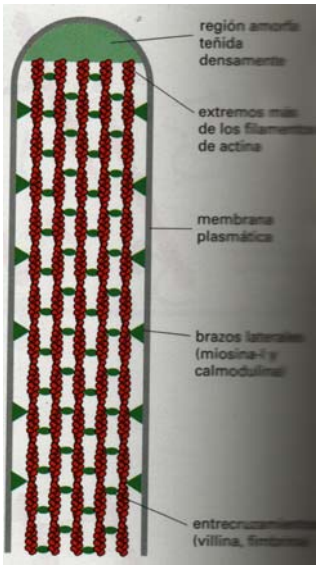
Parece ser que también pueden estar ocasionadas las corrientes citoplasmáticas por miosina I o V. Mediante técnicas con anticuerpos, específicos para uno de los dos tipos de miosina, que además son capaces de anular su función se observó que era la miosina de tipo I la implicada.

Estructura de los microvilli

Están presentes en todas las células que realizan un intercambio con el medio externo. Una forma de poder observarlos claramente es mediante la técnica conocida como Deep Etching o sublimación, mediante la cual se congela la muestra, posteriormente se rompe y se extrae el agua. De la muestra sin agua se realiza una réplica que se observará con el microscopio electrónico de transferencia, pudiendo de esa manera observar la estructura de los microvilli, tal y como se observa en la imagen.



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 correctamente han de presentar una gran superficie de membrana. Por ejemplo, una sola célula epitelial de intestino delgado humano tiene varios miles de microvilli, de aproximadamente 0,08 µm de ancho y 1 µm de largo. Con estos microvilli se consigue que la superficie de absorción sea aproximadamente 20 veces superior a lo que sería sin ellos. La membrana plasmática que recubre estos microvilli contiene una gruesa cubierta extracelular de polisacáridos y de enzimas digestivas, lo que la convierte en una región altamente especializada. Está región ha sido muy estudiada, de manera que actualmente se conoce con bastante detalle el citoesqueleto situado en la zona de los microvilli.



La zona central de cada microvilli contiene un haz rígido de entre 20 y 30 filamentos de actina, que se extiende desde la punta del microvilli hasta el córtex celular. Todos los filamentos están orientados de manera que sus extremos más apuntan hacia fuera del cuerpo celular, manteniéndose unidos por proteínas formadoras de haces de actina, situadas a intervalos regulares. La fimbrina es una de las proteínas que interviene en la formación de estos haces, pero la más importante de las proteínas formadoras de haces en los microvilli es la villina, que es característica de esta estructura celular.

La parte inferior del haz de filamentos de actina de los microvilli está anclada en la corteza especializada de la región que los presente, en la corteza conocida como red terminal. La red terminal contiene una densa trama de moléculas de espectrina, que recubre a su vez a una capa de filamentos intermedios. Se cree que la espectrina da estabilidad y rigidez al córtex, manteniendo los microvilli perpendiculares a esa capa. Encontramos también en la región inferior de los microvilli miosina de tipo II, que formará filamentos y podrá unirse a la actina, pudiendo provocar el movimiento de los microvilli.

Los filamentos de actina que conforman el microvilli están unidos a la membrana plasmática mediante puentes laterales, formados por un tipo de miosina I y calmodulinas unidas a su cola. La miosina está orientada de manera que su cola queda inmersa en la membrana, mientras que su cabeza, unida a un ATP activo, contacta con los filamentos de actina. Se cree que el hecho de que una proteína motora sea la encargada de unir la actina con la membrana puede estar relacionado con la formación de vesículas en los extremos de los microvilli.

Fibras de estrés

Pueden existir en la célula filamentos de actina que se extiendan por toda la célula, entrecruzándose. Estos filamentos reciben el nombre de fibras de estrés, y a que se observaron por vez primera en células que sufrían estrés nutricional. Estas fibras aparecen en el momento en que las células están adheridas al máximo al sustrato.

Estas fibras se aproximan y convergen en algunos puntos. Además, al analizar la estructura de estas fibras, se observó que tenían estructura similar a la de los sarcómeros, ya que se trata de filamentos de actina colocados antiparalelamente. Hay también filamentos de miosina de tipo II, lo que implica que puede existir actividad motora. Es posible que estas fibras tengan como función trasladar fuerzas de contracción de un lugar de la célula a otro.

Las fibras de estrés conforman una parte fundamental de los contactos focales o placas de adhesión. Uno de los extremos de la fibra de estrés se inserta en la membrana, en las uniones especiales de los contactos focales, mientras que el otro extremo se puede insertar en otro contacto focal o bien en la red de filamentos intermedios que rodea el núcleo celular. Mediante los contactos focales, que son estructuras altamente dinámicas, se produce contacto con el exterior.

Los filamentos de adhesión están unidos a proteínas puente, de las que se ha de destacar la vinculina y la talina. Además también existen proteínas integradas en la membrana, que serán discutidas más adelante, como las integrinas. Además, mediante los contactos focales se pueden transmitir señales desde la matriz celular hasta el citoesqueleto en el interior de la célula, mediante diferentes tipos de señales.

Existe otro tipo de estructura similar funcional y morfológicamente, que son los:

Cinturones de adhesión

Se trata de un conjunto de haces de actina asociados con la membrana formando un anillo. Se da en células que formen tejidos, principalmente en epiteliales. Si empelamos faloidina para localizar la actina, aparte de los filamentos podríamos ver la membrana marcada. En general tiene una estructura similar a la de las fibras de estrés, pero está asociada a la membrana por otras proteínas, las cadherinas. Las cadherinas de una célula se unen con las cadherinas de las células vecinas, tal y como veremos más adelante. Estas uniones permiten que las células actúen con coordinación.

Movimiento celular

El elemento más común relacionado con el movimiento es la actina. Incluso algunas bacterias intracelulares pueden aprovechar los filamentos de actina para desplazarse en el interior de la célula, para llegar a su destino, ya que no se mueven al azar. La bacteria aprovecha que en su genoma posee un gen de una proteína nucleadora de actina, el gen AcTA. Al presentar esta proteína en un costado de la bacteria permite el movimiento. Se ha visto que se trata de un mecanismo muy extendido.

En las células eucariotas existen 2 tipos básicos de movimiento:
Movimiento ameboidal
Movimiento fibroblástico

Movimiento ameboidal

La actina desempeña un papel básico en este tipo de movimiento, que ,pese a lo que pudiese pensarse a partir del nombre, no es exclusivo de las amebas. En una célula que se desplace de esta manera se podrán observar los pseudópodos. El citoplasma que entra en el pseudópodo no es el citoplasma normal, sino que no podemos encontrar ningún orgánulo en él. En el pseudópodo encontramos tanto actina como filamina, de manera que los orgánulos se mantendrán fuera del pseudópodo. Además se generará una presión osmótica muy elevada, al retener mucha agua.

Cuando la célula quiere avanzar, se forma la malla que permite la formación de pseudópodo. En un determinado momento, al alcanzar una determinada concentración de calcio, se activa la gelsolina, que fragmentará la actina. Al fragmentarse losa filamentos, se abre la malla que mantenía el citoplasma fuera del pseudópodo, con lo que todo el citoplasma irá entrando en la zona del pseudópodo. La célula avanza por lo tanto, debido a la presión que ejerce el citoplasma. La concentración de calcio bajará, con lo que la gelsolina se inactivará y por lo tanto se volverán a polimerizar filamentos de actina, que formarán un nuevo pseudópodo.

Movimiento fibroblástico

Todos los tipos de células, con muy pocas y marcadas excepciones, migran de la misma manera, mediante lo que se conoce como frente de avance. Las neuronas extienden sus conos de crecimiento neuronal de manera similar al movimiento de los fibroblastos. La función de este movimiento en as neuronas es establecer las sinapsis.

El borde frontal de avance 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 regiones delgadas y rígidas llamadas microespinas, de aproximadamente 0,1μm de diámetro y 5 – 10 μm de largo, y que en su interior contienen un haz laxo de aproximadamente 20 filamentos de actina orientado con sus extremos más hacia el exterior. El extremo en crecimiento de un axón nervioso extiende microespinas incluso más largas de hasta 50μm de largo.

Tanto los lamelipodios como las microespinas son estructuras móviles que pueden formarse y retraerse a una gran velocidad. Se cree que las microespinas y lamelipodios son generados por la polimerización de la actina local en la membrana plasmática, y que esta actina puede empujar la membrana plasmática sin romperla.

Los filamentos de actina están siempre orientados hacia la membrana plasmática, con su extremo + próximo a ella. Los métodos para desarrollar el avance pueden ser el mero avance de la actina por polimerización, la interacción de la actina con proteínas motoras, o incluso el hecho de que la miosina pueda estar integrada en la membrana. Se cree que es posible que actúen los 3 sistemas en la membrana plasmática, a la vez, coexistiendo. La membrana se va recuperando desde el extremo más lejano de la célula. En el caso de las neuronas, se ha de ir sintetizando nueva membrana, ya que la célula no se mueve.

REGULACIÓN

Existen 3 piezas claves en la regulación de estos procesos.

Filopodios	CDC42	
Lamelipodios	Rac	Son GTPasas, están activas si se unen a GTP
Contactos focales	Rho	

Cuando cualquiera de estas piezas está unida a GTP, se va uniendo a otras moléculas, y así sucesivamente. El proceso se dispara desde fuera de la célula, cuando se activan estas proteínas. La CDC42 activa la Rac. La CDC42 es la responsable de la formación de los filopodios. Si está activada con GTP se una a la proteína WASP, actuando como nucleadores de actina.

La proteína Rho se activa en presencia de GTP, pudiendo ser independiente de las anteriores o bien dependiente.

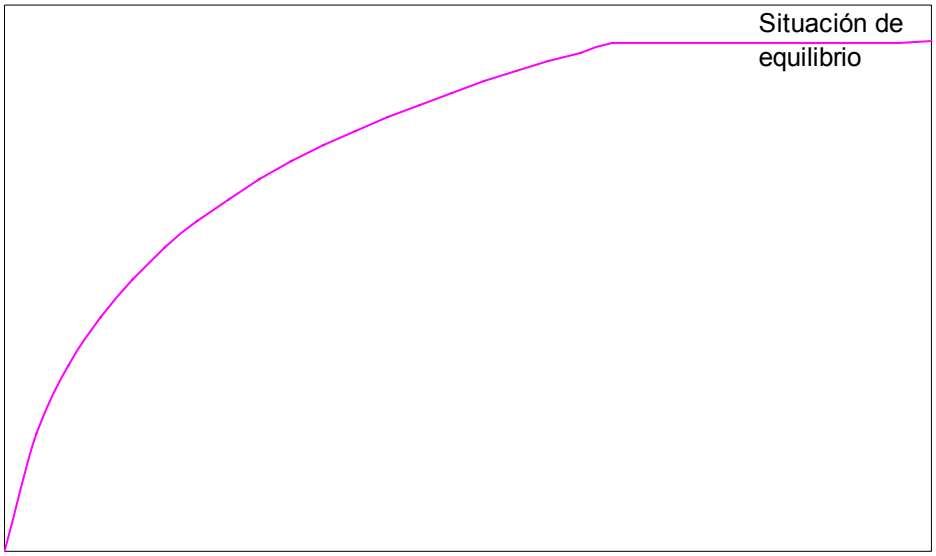
MICROTÚBULOS

Para poder detectar los microtúbulos se suelen emplear técnicas de inmunocitoquímica, en las cuales se usan sondas con marcadores. Dichas sondas suelen ser anticuerpos que serán capaces de detectar los microtúbulos. Todos los microtúbulos en la célula nacen en el centro organizador de microtúbulos, el MTOC, Microtubule organizing center. En una célula interfásica sólo hay un MTOC, A partir del cual los microtúbulos se reparten de manera radial por todo el citosol. Los microtúbulos podrán formar también el huso mitótico, cuando la célula se divida. Formarán as estructuras de cilios y flagelos.

Características de los microtúbulos

Están presentes en todos los tipos celulares eucariotas, con muy pocas excepciones, como los eritrocitos de los mamíferos. Se organizan formando un túbulo de aproximadamente 25nm de diámetro, que consta de diferentes unidades de tubulina. La tubulina es un dímero, cuyos monómeros están codificados por 2 genes, codificando cada uno de ellos las unidades α y β. LA unión de los monómeros α y β da lugar a la tubulina, mientras que la unión de distintos dímeros dará lugar a los protofilamentos. La agrupación de los protofilamentos, usualmente en grupos de 13, da lugar a los microfilamentos. Existe una tercera forma de tubulina, la tubulina γ, pero esta tubulina no se encuentra formando los Microtúbulos sino que está en el MTOC. En eucariotas superiores, la estructura del microtúbulo consta dela polimerización de α y β. En células vivas no se trata de un proceso tan monótono, ya que en realidad hay 6 tipos de tubulina α y 6 tipos de tubulina β. Las tubulinas α se diferencian unas de otras debido a 15 AA en el extremo N terminal. Los monómeros se unen desde el extremo COOH del monómero α al extremo NH del monómero β. Los monómeros α y β pesan aproximadamente 50KDa, y están formadas por 465 AA. Además en la tubulina pueden darse modificaciones posttraduccionales, como fosforilaciones, acetilaciones o poliglicinaciones. Una particularidad de los microtúbulos es la de que existen proteínas asociadas a ellos, que se conocen como MAPs, o microtubule associated proteins, de las que podemos distinguir 3 tipos: estructurales, reguladoras y motoras, ya que el microtúbulo actúa como una vía de desplazamiento rápida, que alcanza un máximo de 10μm/s.

La polimerización de tubulina se producirá en función de la concentración que tengamos de ésta. A bajas temperaturas, los microtúbulos se podrán desorganizar. Esto se puede emplear para aislar la tubulina de cultivos de células. Esta tubulina aislada, se podrá colocar en un tubo con Mg^{2+} y GTP, con lo que entonces se podrán formar los microtúbulos, siguiendo una dinámica específica.



La cantidad de microtúbulos que se formará dependerá de la concentración de tubulina libre que haya en las condiciones que estemos estudiando.

A partir del RNAm, se formará la tubulina α o la β, que se combinará para formar un dímero, pero primero deberá pasar por una serie de procesos.

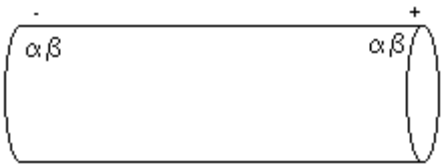
Las chaperonas son proteínas encargadas de ayudar al correcto plegamiento de otras proteínas, actuando sobre las proteínas mal plegadas, provocando que vuelvan a su conformación original, dándoles una nueva oportunidad de plegarse. Dentro de este grupo podemos encontrar también las Heat Shock Proteins, que fueron las primeras en descubrirse, accidentalmente. Estas proteínas, en condiciones de calor ven incrementada su síntesis, debido a que las proteínas sin plegar son más abundantes ahora, a causa del proceso de desnaturalización ocasionado por el calor.

En el caso de los microtúbulos, es necesaria la intervención de una chaperona, la CCT, a la vez que se requieren otros factores, para que la tubulina llegue a formarse como le corresponde, formando el dímero que formará los microtúbulos. Esto permite que exista un tercer almacén de tubulina en la célula, de manera que serían:

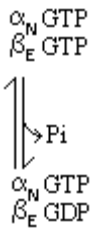
Tubulina polimerizada formando microtúbulos
Tubulina no polimerizada, formando heterodímeros
Tubulina que aún no está suficientemente madura para formar el dímero

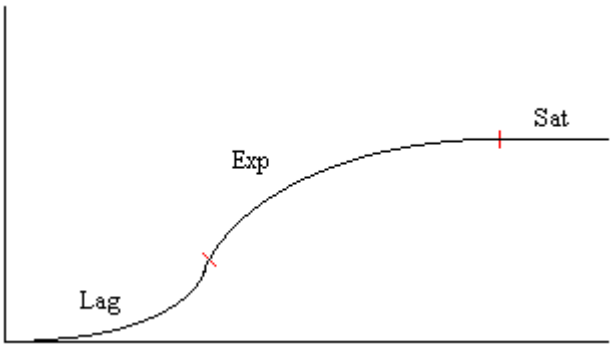
En condiciones in vitro se produce una situación de inestabilidad dinámica, al llegar al punto de equilibrio, de manera que algunos microtúbulos seguirán creciendo, mientras que otros decrecerán..

Inestabilidad dinámica



En los microtúbulos existe inestabilidad dinámica, cuyo origen está debido a la capacidad que tienen los microtúbulos de unirse a GTP. El GTP se puede unir a α en el sitio N, mientras que a β se une GTP en el sitio E. Tan solo el GTP unido a β es hidrolizable. La gráfica de polimerización es por lo tanto.





La primera fase es la fase lag o de latencia, que no se da nunca en condiciones in vivo, ya que es cuando se da la reacción de nucleación, cuando a partir de la tubulina se forman los microtúbulos. La fase lag no se da in vivo, ya que existe un centro de nucleación, la γ TURC o γ tubulin ring complex. Este centro de nucleación está situado a nivel de los centros organizadores de microtúbulos, donde existe un anillo de γ tubulinas. El microtúbulo tiene un anillo de γ tubulinas situado en el extremo -, contactando por lo tanto con el MTOC. En condiciones in vivo, el microtúbulo sólo podrá crecer por el lado +, mientras que in vitro podrá crecer por ambos lados. Pero se debe demostrar que crecer por el lado + en condiciones in vivo. Para comprobar esto, se deberá marcar la tubulina de alguna manera, por ejemplo con un cromóforo, es introducirla en la célula por microinyección. Otra opción sería alterar la secuencia de la tubulina, de manera que se sintetice tubulina cuando se desee, por ejemplo en presencia de algún metal.

Para reconocer después la tubulina se puede añadir AA a la tubulina, formando un epitopo, que será reconocido posteriormente por los anticuerpos. A esta técnica se la conoce como epitope tagging.

La inestabilidad dinámica de los microtúbulos viene provocada por el GTP cap. La hidrólisis del GTP unido a los microtúbulos permite que se una nueva unidad de $\alpha + \beta$ al extremo β de los microtúbulos, donde se habrá producido la hidrólisis. Por lo tanto, En todo el microtúbulo encontraremos GDP, a excepción de la última fila, donde habrá GDP. Pasado un cierto tiempo, el GTP se hidrolizará, con lo que se iniciará un proceso de despolimerización. A este proceso de hidrólisis del GTP se le llama catástrofe, mientras que al proceso inverso se le llama recuperación o rescue.

In vivo, la velocidad de polimerización es entre 4 y 10 veces superior a la que se observa in vitro, mientras que la tasa de catástrofe es entre 10 y 20 veces superior en las células vivas.

Explicación fisiológica

Se emplean principalmente los microtúbulos en el haz mitótico, que se constituye mediante un mecanismo de acierto – error, de manera que si el microtúbulo no contacta con el cromosoma se despolimerizará, para volverse a formar, hasta conseguir contactar con el cromosoma.

La vida media de los microtúbulos es muy variable, dependiendo de la fase del ciclo celular en que se encuentre la célula, ya que en una célula interfásica, un microtúbulo vive alrededor de 10 minutos, mientras que en una célula en mitosis no pasa de los 30 segundos.

MAPs

Se denomina MAP, microtubule associated protein, a cualquier proteína capaz de asociarse a los microtúbulos, que en el proceso no consuma energía. Esta definición tiene como excepción a las MAPs motoras. Distinguimos 3 familias de MAPs:

Desestabilizantes Estabilizantes	No consumen energía
Motoras	Consumen energía

Para tratar de identificar MAPs, un punto muy importante radica en la purificación de los MT, que se podría conseguir mediante una serie de lavados suaves, seguidos de otros más fuertes. Para identificar las proteínas se podría emplear un proceso de autorradiografía, si se han marcado las proteínas radiactivamente. Una vez se han asilado las proteínas se podrá emplear un espectrofotómetro de masas para identificarlas. Este proceso se puede emplear para identificar las MAPs de una línea de células tumorales.

MAPs estabilizadoras

Algunas MAPs estabilizadoras son: MAP_1, MAP_2, Tau, que está en neurona, MAP_4, que está en todos los tipos celulares, $XMAP_{125}$. Estas proteínas se unen a l microtúbulo en una relación de 1 MAP/ 4 – 10 tubulinas. Impiden físicamente la despolimerización de los microtúbulos. Podemos encontrar formas fosforiladas inactivas. MAP_4 es activa principalmente en la mitosis. Existe una quinasa que fosforila MAP_4, provocando la entrada en mitosis.

Las MAPs estabilizadoras reducen la tasa de catástrofe, posiblemente actuando directamente a nivel de los microtúbulos, mediante interacción directa. Existen 2 hechos que refuerzan esta hipótesis:
1. Hay 1 MAP / 4 – 10 unidades de tubulina
2. La estructura de aminoácidos indica que es posible que se unan directamente al microtúbulo, ya que se observan secuencias repetidas.

Se cree que es posible que las MAPs actúen como una grapa a nivel de los microtúbulos, manteniendo diversas unidades juntas.

La regulación de las MAPs se da en muchos casos por fosforilación, ya que como se ha indicado, las MAPs fosforiladas son inactivas.

En el ciclo celular, en la fase S, se activa una quinasa, que activará los enzimas de replicación, mientras otra quinasa, la cdc2, se encarga de fosforilar MAP_4, de manera que se entrará en la fase M del ciclo celular.

MAPs desestabilizadoras

Las MAPs desestabilizadoras pueden actuar de dos manera diferenciadas:

Aumentar la tasa de catástrofe
Romper los microtúbulos

Existen 3 grandes grupos, según su función:

1. Op18 / stathmina, que son moléculas pequeñas. Existen diferentes posibilidades, entre las que se ha de destacar que actúen secuestrando α o β, o incluso GTP, de manera que no puedan unirse a los microtúbulos. Otras posibilidad es que actúen impidiendo la unión de la tubulina al extremo del microtúbulo.
2. Superfamilia de las kinesinas. Este grupo aúna un gran conjunto de proteínas, que son las kinesinas. En *Drosophila* se conocen 37 kinesinas, mientras que se cree que en el hombre hay entre 50 y 150. Las kinesinas son proteínas motoras de los microtúbulos que se dirigen siempre al extremo +. Pero existe una Kinesina desestabilizadora de los microtúbulos, la kin 3, que además tiene función motora en dirección -. Durante la mitosis se han de tensar los microtúbulos, para aproximar los cromosomas a los polos de la célula, función que realiza la kin 3.
3. Severing o fragmentadoras. No despolimerizan, sino que cortan los microtúbulos. Además, ya que se forman extremos GDP, los fragmentos se despolimerizarán. Un ejemplo sería katanin.

Motores microtubulares

Ha de existir algún sistema que una los diferentes orgánulos de la célula, permitiendo la relación entre ellos. El sistema que los relaciona es la red de microtúbulos. El sistema de microtúbulos está relacionado con el movimiento intracelular, principalmente, y hay 3 o 4 sistemas básicos:

Sistema microtubular de la célula interfásica
Haz mitótico en las células en división
Cilios y flagelos

Si inhibimos los microtúbulos, todos los orgánulos se desorganizarán: tanto el retículo endoplasmático como el complejo de Golgi se fragmentarán, no habrá circulación de vesículas, las mitocondrias se desorganizarían y el núcleo se rompería.

Para explicar todos los procesos de movimiento relacionados con los microtúbulos son básicas 2 tipos de proteínas motoras:

Dineína
Kinesina

Las estructuras de estas proteínas son similares a las de la miosina, una cabeza con actividad ATPasa y una cola con capacidad de carga.

DINEÍNA

Existen 2 tipos básicos de dineínas:

Dineína flagelar

Tiene una cabeza con capacidad ATPasa, de muy alta frecuencia, si está unida a microtúbulos. Provoca el movimiento de cilios y flagelos, generando una fuerza de deslizamiento en los microtúbulos que los componen. Como la dineína citoplasmática se desplaza por el microtúbulo hacia el extremo -. Es una proteína más larga que su homóloga citoplasmática.

Dineína citoplasmática

Cabeza con 2 subunidades, 2 estructuras similares a antenas y una cola. Tiene la capacidad de unirse a otros componentes de la célula. La especificidad de unión viene dada por la presencia de cadenas intermedias.

La primera de las dos en descubrirse fue la dineína de cilios y flagelos, para después conseguir aislar la citoplasmática, radicando la diferencia entre ambas, por un lado en el tamaño, y por otro, la cola que no es de unión a MT. La dineína citoplasmática se desplaza de + a -, por lo que tenía que existir una proteína encargada de desplazarse en dirección contraria, que es la kinesina, que fue descubierta aproximadamente hace 10 años.

KINESINA

Se compone de 2 cabezas globulares y una cola de unos 30 nm. En la cabeza encontramos las funciones de unión a ATP y de unión a microtúbulos. En la cola encontramos el dominio de unión a las vesículas, mediante una cadena ligera. Se demostró fácilmente que la kinesina era la encargada del transporte de – a +, mediante su unión a vesículas marcadas o a bolas de látex, y su posterior observación. Otro método fue fijar la kinesina a un portaobjetos y depositar microtúbulos por encima. Esto daba como resultado que los microtúbulos se movían.

Para poder visualizar estos resultados, se desarrollaron nuevas técnicas de visualización. Un método desarrollado fue la videoamplificación.

El mecanismo empleado para conseguir la especificidad es la abundancia de proteínas, ya que en realidad no existe un solo tipo de proteínas, sino que se trata de una familia de proteínas. Todas las proteínas de esa familia llevan carga de – a +. En un mismo tipo celular podemos encontrar 3 o 4 isoformas de la kinesina. La característica común que tienen todas las kinesinas es la capacidad hidrolítica que se encuentra ubicada en la cabeza, mientras que las diferencias se encuentran en las diferentes colas de la kinesina, que tienen la capacidad de cargarse de diferente manera. En una célula interfásica puede haber hasta 6 tipos de kinesinas diferentes y 2 tipos distintos de dineínas.

Drogas que afectan a los microtúbulos

Diferentes sustancias químicas tienen distintos efectos sobre los microtúbulos. Por un lado, el taxol tiene efectos estabilizadores, mientras que la vinblastina o la colchicina desestabilizan los microtúbulos. Estas drogas permiten el tratamiento de tumores. Se ha identificado el mecanismo de funcionamiento de estas proteínas, por ejemplo, la colchicina actúa sobre la unión de α y β.

Centros organizadores de microtúbulos (MTOC)

En una célula podemos encontrar los microtúbulos formando 3 estructuras básicas:

Red de microtúbulos citoplasmática
Haz mitótico de las células en división
Cilios y flagelos

Detrás de todos estos sistemas podemos encontrar un centro organizador de microtúbulos o MTOC. El centro organizador de microtúbulos controla la polimerización y la distribución de los microtúbulos. Podemos encontrar en el MTOC un tipo especial de tubulina, que sólo está presente allí, que es la γ tubulina. Además encontramos una proteína, la centrina. Los MTOC son todavía bastante desconocidos para la biología celular.

Centrosomas

Los centrosomas son el MTOC más importante de una célula. En su interior podemos encontrar dos estructuras de forma cilíndrica, situadas perpendicularmente, que se conocen como centríolos. Durante la interfase podemos encontrar el centrosoma en la proximidad del núcleo, muy cercano a la envoltura nuclear. El centriolo tiene estructura cilíndrica de aproximadamente 0,2μm de ancho y 0,4 μm de longitud. La pared del centríolo está formada por nueve grupos de 3 microtúbulos, distribuido en tripletes. Cada triplete está inclinado hacia el eje central. Los tripletes adyacentes están unidos a intervalos a lo largo de su longitud. En electromicrografías se pueden ver radios proteicos irradiando desde el núcleo central hasta cada triplete.

Alrededor del centrosoma encontramos la región pericentriolar o matriz del centrosoma, que es la región del centrosoma que nuclea la polimerización de los microtúbulos. La composición proteica de esta matriz sólo es parcialmente conocida, igual que el mecanismo a partir del cual se produce la nucleación de los microtúbulos. Sin embargo sí es conocido el hecho de que está formada por proteínas específicas del centrosoma, entre ellas una forma poco frecuente de tubulina, la γ tubulina, que puede actuar con el dímero α / β, colaborando en la nucleación de los microtúbulos.

No todos los centros organizadores de microtúbulos tienen centríolos. En las células mitóticas de las plantas superiores, los microtúbulos terminan en zonas electrodensas pobremente definidas, totalmente desprovistas de centríolos. El huso meiótico del oocito de ratón tampoco presenta centríolos, aunque estos aparecerán más tarde, en el embrión en desarrollo. Pese a las diferencias de forma, todos los centros organizadores poseen una matriz que nuclea la polimerización de microtúbulos y que normalmente está formada por γ tubulina y otras proteínas específicas del centrosoma. Parece que el mecanismo celular de nucleación de los microtúbulos se ha conservado relativamente intacto a lo largo del proceso evolutivo.

En las células con centríolos, la duplicación de estos se da, junto con toda la región pericentriolar, en la interfase. Al inicio de la fase M del ciclo celular se dividirá el resultado. Pese a darse de manera simultánea en el tiempo, la duplicación del DNA y de los centríolos es independiente.

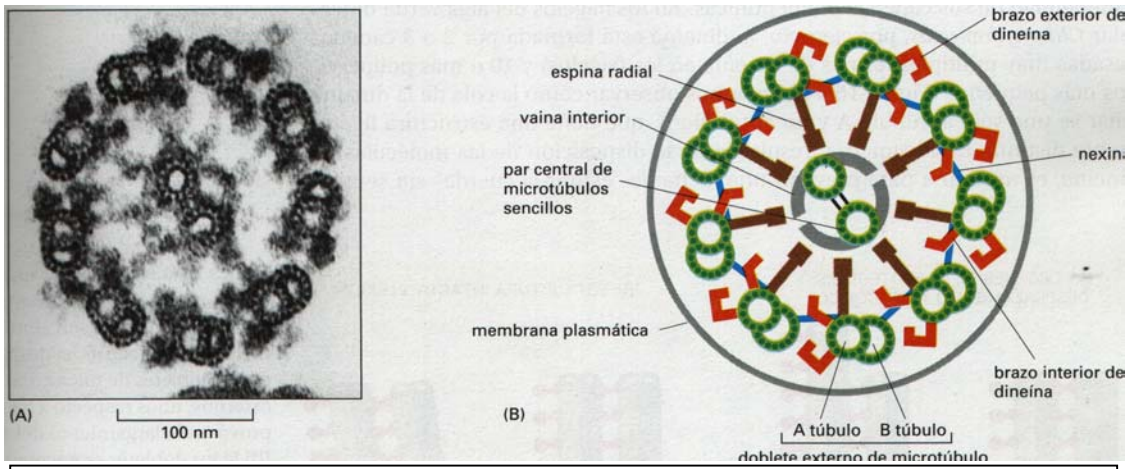
Corpúsculos basales

Los corpúsculos basales se sitúan en la base de cilios y flagelos. Están formados a partir de microtúbulos, y, básicamente, no son más que MTOC. De hecho se trata de centríolos que se van transformando, hasta adquirir la estructura de cilios o flagelos. Este centríolo tiene su origen en los centrosomas, a partir del cual se duplicará todas las veces que sea necesario, hasta formar los cilios y flagelos de la célula.

Los MTOC han seguido una evolución independiente del núcleo. Se trata de estructuras independientes e interconvertibles, en la mayoría de los casos.

Cilios y flagelos

Tanto cilios como flagelos son muy similares en su ultraestructura, pero los flagelos tienden a ser más largos y a estar en menor número en la célula. El movimiento de un cilio o flagelo está producido por la flexión de su eje, conocido como axonema, que está formado por microtúbulos y por sus proteínas asociadas. Los microtúbulos está modificados y están dispuestos siguiendo un patrón que sigue una estructura en forma de nueve dobletes de microtúbulos, situados alrededor de 2 microtúbulos simples. Esta disposición de "9+2" es característica de casi todas las formas de cilios y flagelos de las células eucariotas, desde los protozoos hasta los organismos más evolucionados. Los microtúbulos se extienden ininterrumpidamente a lo largo de la longitud de todo el axonema, que suele ser de 10µm, aunque puede llegar a ser de 200µm.



En A se muestra la sección transversal del flagelo de *Chlamydomonas* en la que se puede observar la disposición de "9+2" de los microtúbulos. B es un diagrama de las partes que componen el axonema. Las diversas proyecciones de los microtúbulos los mantienen unidos y se producen a intervalos regulares a lo largo del axonema.

Cada miembro del par de microtúbulos sencillos que componen el par central son microtúbulos completos, pero los componentes de los microtúbulos exteriores están formados por un microtúbulo completo y uno parcial, fusionados, de manera que comparten una pared, tal y como se aprecia en el esquema. En secciones transversales, cada microtúbulo está formado por un anillo de 13 subunidades, pero los parciales están formados por 11 subunidades.

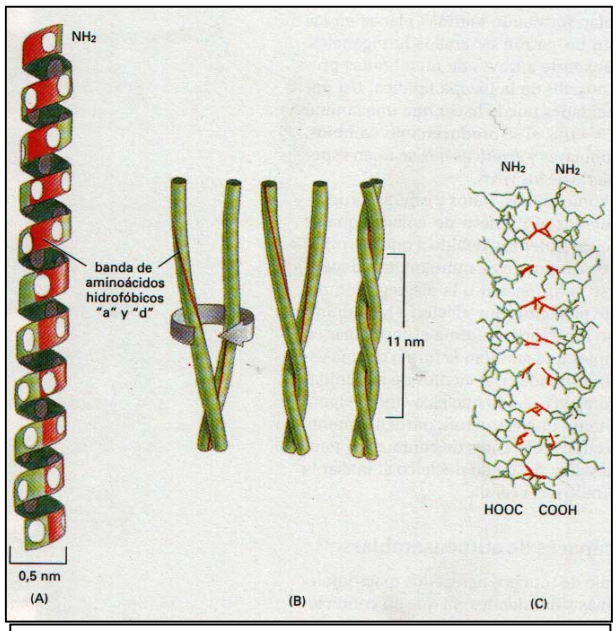
El microtúbulo completo de cada doblete está relacionado con el parcial del doblete vecino mediante la dineína ciliar. La cola se une al completo, mientras que la cabeza se une al microtúbulo parcial. Existen 2 brazos de dineína, el interior con 2 cabezas y el exterior con 3. Otra proteína que desempeña un importante papel es la nexina, que es una proteína extensible. Los 9 dobletes periféricos han de estar relacionados con el par central mediante otros puentes proteicos.

El movimiento flagelar se da por la acción de la dineína, que permite el desplazamiento de los microtúbulos, unos sobre otros. Este desplazamiento permite la flexión del cilio, y se da hasta que la nexina alcanza su límite de extensión, momento en que deja de darse.

FILAMENTOS INTERMEDIOS

El diámetro de estos filamentos está situado entre los de actina y los microtúbulos, de ahí el nombre que se les dio. El diámetro está entre 8 y 10 nm. Es un grupo muy heterogéneo, ya que hay muchas proteínas implicadas, que tienden a ser alargadas. Se trata de estructuras menos lábiles que la actina o la tubulina, de hecho, el término citoesqueleto se acuñó con la observación de estas proteínas tan estables e insolubles. En la mayoría de las células animales, una extensa red de filamentos intermedios rodea al núcleo y se extiende desde esta zona hacia la periferia nuclear, donde interacciona con la membrana plasmática. Además, un armazón de filamentos intermedios, conocido como lámina nuclear se encuentra bajo la envoltura del núcleo. Los filamentos intermedios son más abundantes en células que están sometidas a importantes tensiones mecánicas, como ocurre muchas veces con los epitelios. Son también abundantes a lo largo de los axones de las células nerviosas y en todos los tipos musculares.

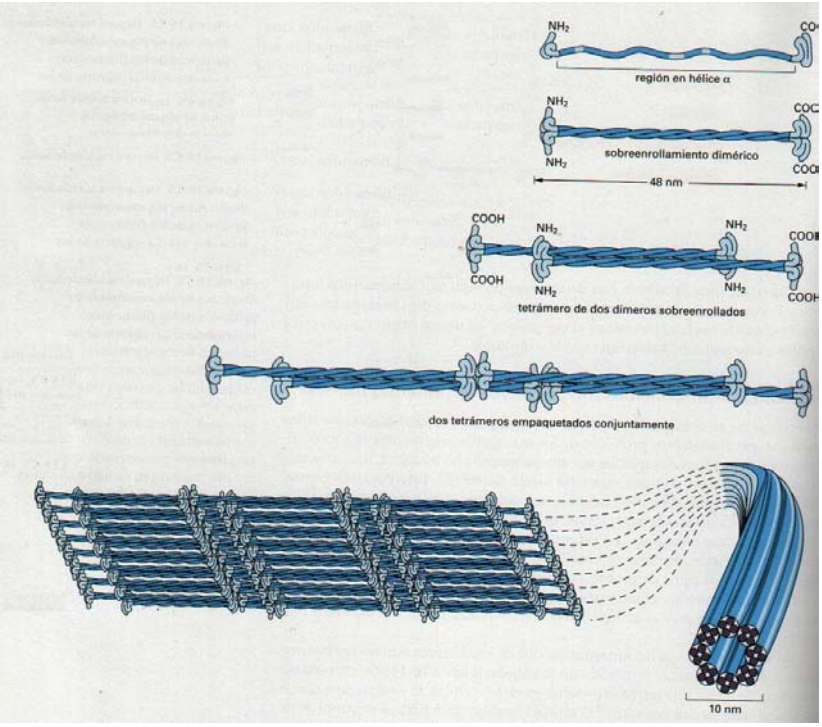
A diferencia de la actina y de la tubulina, que son globulares, los tipos principales de monómeros que componen los filamentos intermedios son moléculas fibrosas muy alargadas, con dominios amino y carboxilo terminales, y con un dominio intermedio, a modo de varilla. Este dominio central consta de una región extensa de hélice α, que contiene largos tándems repetidos de secuencias aminoacídicas distintas, que reciben el nombre de repeticiones en heptada. Estas secuencias de 7 aminoácidos permiten la formación de dímeros enrollados entre 2 hélices α paralelas. En la siguiente etapa del ensamblaje, dos dímeros interaccionarán antiparalelamente, formando un tetrámero. Es posible que la subunidad tetramérica constituya la unidad fundamental en la formación de los filamentos, ya que se encuentran ciertas cantidades de los tetrámeros dispersas por la célula. La disposición antiparalela indica que el tetrámero, y, por consiguiente, el filamento carecerá de polaridad, a diferencia de los filamentos de actina y los microtúbulos. Los tetrámeros se irán uniendo a un filamento de manera sencilla, alineándose a lo largo del filamento y siguiendo un patrón helicoidal.



En A se presenta la hélice α sencilla, formada por la repetición de secuencias de aminoácidos en heptada. Los aminoácidos que propician la formación de la hélice α son hidrofóbicos y son el primero y el cuarto, indicados en el gráfico como a y d. En B se muestra como dos cadenas se pueden unir para formar una hélice, compuesta por las dos cadenas proteicas, unidas por los aminoácidos hidrofóbicos, dejando expuestos los hidrófilos. En C se muestra la estructura atómica de una de esas cadenas.

El dominio central, cuya estructura es muy similar en todos los tipos de filamentos intermedios, interviene en las interacciones laterales que forma el filamento ensamblado, ya que los aminoácidos que componen los dominios globulares de la cabeza y la cola pueden variar significativamente, sin que ello afecte a la estructura axial básica del filamento. A menudo se proyectan desde la superficie del filamento, interviniendo en las uniones con otros componentes. Esto implica una gran variedad de tamaños de las proteínas que los componen, desde 40000 a 200000 daltons.

En la mayoría de células, casi todas las proteínas de los filamentos intermedios se encuentran polimerizadas, con muy pocas subunidades tetraméricas libres. Sin embargo, una célula puede regular el ensamblaje de los filamentos intermedios, controlando la cantidad, longitud y posición. Uno de los mecanismos mediante los cuales la célula puede ejercer este control es mediante la fosforilación de los 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 componen la lámina nuclear provoca un desensamblaje de esta, lo que sucede durante la mitosis. Después de este proceso, las serinas serán desfosforiladas, con lo que se producirá la formación *de novo* de la lámina nuclear. Los filamentos intermedios citoplasmáticos pueden sufrir también alguna modificación durante la mitosis, debido a alguna señal extracelular. Estos procesos suelen ir acompañados de fosforilación de las subunidades, aunque pueden intervenir otros procesos reguladores.



Existen muchos tipos diferentes de filamentos intermedios:

Tipo de Filamento Intermedio		*Localización Celular*	*Masa (en daltons)*
Queratinas	Ácidas (Tipo I)	Células epiteliales y sus derivados, como pelo o uñas.	40000 – 70000
	Neutras o básicas (Tipo II)		40000 – 70000
Vimentina (Tipo III)		Muchas células de origen mesenquimático, expresada transitoriamente en el desarrollo.	54000
Proteínas relacionadas con la vimentina :			
	Desmina	Músculo	53000
	Proteína glial acídica fibrilar	Células gliales (astrocitos y cel. Schwann)	60000
	Periferina	Neuronas	56000
Proteínas de neurofilamentos (Tipo IV)	NF-L NF-M NF-H	Neuronas	60000 – 13000
Láminas nucleares (Tipo V)	A B C	Lámina nuclear de las células eucariotas	65000 – 75000

Heterogeneidad de los Filamentos Intermedios

Queratinas

Queratinas ácidas (Tipo I) 15 tipos
Queratinas básicas (Tipo II) 15 tipos

Forman un heterodímero: una ácida se une a una básica. Existen muchas combinaciones. En el hombre se conocen 20 tipos diferentes de queratinas en los epitelios, junto con otras 8 queratinas, llamadas queratinas duras, en pelo y uñas. A estas queratinas se las ha llamado también α queratinas, para diferenciarlas de las β queratinas de las plumas de las aves, que tienen un origen evolutivo distinto.

Cada epitelio tiene una combinación de queratinas diferente, que variará también en función del estado de diferenciación. En el caso de los tumores se pueden emplear las queratinas a modo de marcadores, ya que permiten determinar el origen de las células tumorales, a la vez que pueden determinar su malignidad, ya que está puede depender del grado de diferenciación.

Una queratina en una célula epitelial forma una compleja red desde la lámina nuclear hasta la periferia de la célula. Esta red permite organizar los desmosomas y hemidesmosomas a nivel de la membrana. Encontramos, por lo tanto, diferentes tipos de proteínas de asociación de la membrana y de los filamentos de queratina.

Proteínas relacionadas con la vimentina

Vimentina
Desmina
Proteína **G**lial **A**cídica **F**ibrilar (PAGF)
Periferina

Son de tipo III. Las podemos encontrar en diferentes tipos celulares, tal y como se indica en el esquema de la página anterior. Se unen formando homódimeros. Su organización en la célula es similar a la de las queratinas, ya que se distribuyen formando una compleja red desde el núcleo hasta la periferia celular. La desmina es una excepción, ya que envuelve la estructura del sarcómero.

Mediante ingeniería genética se han creado ratones que no tienen vimentina, y su desarrollo es normal. Si la deficiencia que se induce es de la PAGF pasa igual. En un principio se creía que la vimentina mantenía las gotas de lípidos en los adipositos, pero en los casos de deficiencia en vimentina los adipositos son normales.

Neurofilamentos

Son proteínas de tipo IV. Los podemos encontrar en todas las neuronas del SNC.

Existen 3 tipos: L, M y H. Sólo L forma los filamentos, a los que se pueden unir M y H para formar brazos laterales. Se trata, por lo tanto, de estructuras filamentosas con brazos laterales que sobresalen. Los distintos brazos laterales se pueden asociar entre ellos, formando haces de neurofilamentos, a los que también se asociarán microtúbulos. Estos haces se extenderán a lo largo del axón y de las dendritas, manteniendo su estructura.

Internexina

Se trata de una especialización de neurofilamentos de algunas células del SNC.

Láminas nucleares

Se trata de filamentos intermedios de tipo V. Es posible que se trate del filamento intermedio ancestral. Se conocen 3 tipos de proteínas: A, B y C. De las 3, sólo B forma filamentos, que son cortos y forman tupidas redes. A y C mantienen la estructura en forma de red. La función de estas proteínas es servir de punto de anclaje al resto de filamentos intermedios, con lo que permite que se establezca la estructura radial del citoplasma.

Nestina

Son filamentos intermedios de tipo VI. La podemos encontrar en algunas células madre del SNC. Permite diferenciar neuroblastómeros, de los que se diferenciarán hasta formar células adultas.

Estructura de los filamentos intermedios

Como ya se ha dicho, los filamentos intermedios forman una estructura que va desde el núcleo hasta la periferia, llegando a conectar con la membrana plasmática. Ha de haber algo que mantenga la estructura de estos filamentos. Mediante estudios de colocalización, es decir, de estudios que permiten ubicar y observar la organización de 2 estructuras en una misma célula, se ha observado que los microtúbulos siguen estructuras similares. Estos estudios se realizan con diferentes anticuerpos, marcados con diferentes fluorocromos. Se observa que la vimentina y la tubulina están colocalizadas, pero no tienen idénticas estructuras, sino sólo muy similares. Se intenta observar entonces, si alterando la distribución de una de las 2 proteínas se afecta a la otra. Mediante colchicina o bajas temperaturas se puede provocar la despolimerización de los microtúbulos. La bajada de temperatura no afecta a la estructuración de los filamentos intermedios, ya que para afectar a estos y provocar su desorganización se han de microinyectar anticuerpos específicos anti filamentos intermedios o anti proteínas asociadas a ellos.

Como resultado se obtiene que la modificación de los filamentos intermedios no afecta a la distribución de los microtúbulos, pero la desestructuración de los microtúbulo provoca el colapso de las estructuras de los filamentos intermedios, por lo que se puede afirmar que la organización de los filamentos intermedios está gobernada por los microtúbulos.

El proceso para aislar los filamentos intermedios es bastante complejo, ya que se trata de estructuras poco solubles y muy estables. En primer lugar se ha de tratar la muestra de la que queremos aislar los filamentos intermedios con un detergente, como el Tritón X – 100. Mediante este proceso se solubilizarán los lípidos, con lo que podremos obtener una fracción soluble, que contendrá los lípidos de membrana y las proteínas solubles del citoplasma, así como todas aquellas que estuviesen integradas en la membrana. Seguiremos trabajando con la fracción sobrante, que contendrá El citoesqueleto, formado por actina y filamentos intermedios, y las proteínas asociadas. Además todavía tendremos el núcleo, con todas sus estructuras, cromatina, DNA,... El siguiente paso para aislar los filamentos intermedios es tratar con más detergente y ácido, ya que así podremos eliminar la actina y las proteínas asociadas, que estarán en la fracción soluble. La fracción no soluble se tratará con DNAasas, de manera que eliminaremos el DNA, que quedará en la fracción soluble, por lo que en la fracción no soluble sólo habrá filamentos intermedios. Sólo después de este proceso podremos estudiar los filamentos intermedios aislados y sus proteínas asociadas.

Dinámica de los filamentos intermedios

Al dividirse la células, la lámina media se deshace y con ella la membrana nuclear. Las estructuras de los filamentos intermedios son muy similares en la parte central, tal y como ya se ha dicho, pero en las partes globulares, son más variables. Los extremos pueden ser fosforilados por quinasas celulares, con lo que se desorganizan los filamentos, por lo que otro método de control de los filamentos es la fosforilación. Existen diferentes quinasas, al igual que existen diferentes filamentos intermedios. Una vez se ha acabado el ciclo celular, y se ha finalizado la mitosis, una fosfatasa elimina el fosfato del los filamentos, por lo que volverán a polimerizarse.

Los filamentos intermedios sufren un recambio de subunidades constante. Esto se demostró por el experimento que se conoció como fotoblanqueamiento. Se inyectan subunidades del filamento a estudiar marcadas con fluorescencia, dejando un tiempo que se formen los filamentos. Después se retira la fluorescencia y se observa como evolucionan los filamentos intermedios. Mediante un láser se suprime la fluorescencia de los filamentos, con lo que queda una zona blanqueada. Si seguimos observando, veremos que en la parte blanqueada se vuelven a colocar filamentos marcados.

Los aminoácidos de los extremos amino y carboxi terminales se fosforilan, con lo que se disgrega el filamento. Mediante la fosforilación por una quinasa activa, se impide que el filamento actúe con los demás filamentos colindantes.

Proteínas asociadas a filamentos intermedios

Existen diferentes tipos de proteínas asociadas a los filamentos intermedios:

La filagrina es una proteína de agregación de filamentos intermedios, situada en epitelios queratinizados, como la piel, el pelo y las uñas. Su función es formar haces de FI.

Existen también proteínas que se encargan de establecer el entrecruzamiento entre FI y otras estructuras, como la plectina, que actúa en todo tipo de FI, siendo universal. Se pueden detectar estas proteínas mediante extracción diferencial con detergentes, o bien con anticuerpos marcados que permitan la detección de la plectina. Otra opción es la de usar marcadores de oro coloidal, lo que la haría visible. La ubicación más común de la plectina es en los nudos de FI, pero la podemos encontrar a lo largo de toda la red. Tiene la capacidad de asociarse MAPs, lo que permite la interacción entre FI y MT.

En los extremos de los filamentos encontramos la lámina β, responsable de la asociación a la lámina nuclear. La lámina β es en sí misma un FI. En el otro extremo de los FI encontramos la desmoplaquina, que se asocia a desmosomas y hemidesmosomas, en la membrana plasmática de muchos tejidos epiteliales. También es otra proteína de unión a FI la anquirina, situada en la membrana plasmática.

Algunas proteínas de origen vírico pueden tener también un efecto desorganizador de FI.

RELACIONES CÉLULA – ENTORNO

MATRIZ EXTRACELULAR

Es la propia célula la que fabrica el hábitat de su alrededor, pero a la vez se ve fuertemente influenciada por él. La matriz celular se puede encontrar en todo tipo de células, y es sintetizada por ellas. En todas las matrices extracelulares podemos encontrar tanto colágeno como proteoglucanos.

Colágeno

El colágeno está presente en cierta medida en todo tipo de matriz extracelular. Existen 19 tipos de colágeno conocidos. En cada tejido podemos encontrar diferentes tipos de colágeno. En un mismo tejido será mayoritaria una forma del colágeno, que uniéndose a las demás formas minoritarias formará la matriz extracelular.

Todos los tipos de colágeno son fruto de la unión de 3 cadenas polipeptídicas, que se combinan en forma de hélice α, con lo que el colágeno será una estructura alargada. En la parte central de la proteína encontramos la secuencia Gly – X – Y, que formará una hélice que se agrupará en forma de una triple hélice. X suele ser prolina, aunque en muchos casos será hidroxiprolina. El tipo de colágeno variará en función de las cadenas α que lo compongan. En principio, se cree que el colágeno derivaría de un mismo gen ancestral.

Formación del colágeno

El colágeno puede ser sintetizado por cualquier célula del organismo en un momento u otro.

Se sintetiza en forma de cadenas α en el retículo endoplasmático rugoso. Se hidroxilarán prolinas y glicinas y después, casi simultáneamente, glucosilarse. Se formarán también en este punto puentes disulfuro que provocarán la formación de la triple hélice. En el Golgi se glucosilará de manera definitiva. Una vez abandone el Golgi, se dirigirá al exterior de la célula, donde se empezarán a unir los diferentes colágenos, formando la matriz extracelular.

En muchos casos se formarán estructuras de tipo fibrilar, para lo cual se deberán separar primero los propéptidos, proceso en el que actuarán enzimas. Las triple hélices que han salido de la célula reciben el nombre de tropocolágeno. La primera estructura que se formará serán las fibrillas de 50nm de diámetro.

Quedará una estructura en la que el colágeno se une cabeza con cola, de forma escalonada, con formación de puentes entre las diferentes unidades, con lo que quedará una estructura muy resistente. Si realizamos una observación mediante el microscopio electrónico, veremos una serie de bandas, debido a la necesidad de contrastar: en las zonas oscuras veremos las cabezas y las colas del colágeno. El paso de fibrilla de colágeno a fibra requiere la presencia de algún enzima que catalice la reacción.

Los colágenos se pueden agrupar de diferentes formas:

I, II, III, V y XI	Se forman como se ha descrito, formando fibrillas. Los podemos encontrar en estructuras especializadas como: huesos, tendones,...
IV	Forma láminas. Es característico de todos los epitelios. Forma la lámina basal, que sostiene los epitelios.
VII y X	Forman láminas, características de las células endoteliales
VI	Forman filamentos que únicamente se asocian longitudinalmente. Se asocian con las fibras de colágeno de tipo I principalmente.
IX, XII, XV, XVI y XIX	No forman estructuras superiores, sino que se unen a otros colágenos, como los de tipo fibrilar.
VIII	Se encuentra en forma de dímeros, son estructuras muy largas entre 700 y 8000 nm. Su función es relacionar las matrices extracelulares.

Existen otras moléculas que tienen un origen similar, pero que no tienen las mismas funciones, que son los colágeno no colagénicos.

Glucosaminoglucanos

Se trata de disacáridos repetidos n veces. Se denominan así, ya que normalmente uno de los residuos glucídicos tiene un grupo amino. Distinguimos entre 2 grupos básicos:

No sulfatados — Sólo se conoce 1, el ácido hialurónico. No está unido a ninguna proteínas, sino que está asociado.

Sulfatados — Sí que están unidos a proteínas, con una sola excepción, la heparina.

Los proteoglucanos son proteínas unidas a glucosaminoglucanos.

Ácido hialurónico

Consta de una secuencia repetida de hasta 25000 unidades de residuos no sulfatados. Se encuentra en todos los tejidos y fluidos de los animales adultos, siendo más abundante en las fases embrionarias, donde participa de manera activa en la síntesis de nuevos tejidos. Su simplicidad induce a considerarlo como una forma en la evolución de los GAG, aunque su estructura no es la típica de los GAG de los que se diferencia en 4 puntos básicos:

- No contiene azúcares sulfatados
- No presenta ciertos disacáridos diferentes dispuestos en secuencias más complejas
- No presenta numerosas cadenas cortas de menos de 300 residuos glucídicos.
- No está unido covalentemente a otras proteínas, no forma los proteoglucanos.

Además, mientras que los demás GAG son sintetizados dentro de la célula y expulsados mediante un proceso de exocitosis, el ácido hialurónico es alargado desde la membrana mediante un complejo enzimático integrado en ella, la ácido hialurónico sintasa. Debido a la gran cantidad de grupos COO^-, tendrá diferentes propiedades, como que será más larga, debido a las fuerzas de repulsión. Además, tendrá una alta capacidad de retención. El peso del ácido hialurónico puede variar desde los 4000 Da a los 8 x 10^6 Da.

Se cree que el ácido hialurónico actúa ofreciendo resistencia a las fuerzas de compresión en tejidos y articulaciones. También tiene una función importante durante el desarrollo embrionario, como rellenador de espacio, pudiendo ser utilizado para forzar un cambio en una estructura.

El ácido hialurónico puede ser producido de manera rápida y barata. Al hidratarse, una pequeña cantidad de ácido hialurónico, aumentará considerablemente de tamaño. Esto se emplea a veces para crear espacio libre, donde las células puedan migrar, lo que sucede en la formación de algunos órganos, como el corazón y la córnea, entre otros. Cuando finaliza la migración celular, el exceso de ácido hialurónico es degradado mediante la hialuronidasa. Este GAG se sintetiza también en cantidades considerables en los proceso de cicatrización de heridas, y es un importante constituyente de los fluidos articulares, donde actúa como lubrificante.

El ácido hialurónico se puede asociar a proteoglucanos, ya sean de la matriz o de la membrana celular.

Proteoglucanos

La mayoría de los GAG restantes están unidos a proteínas, siendo sintetizadas ambas partes en el interior de la células, ya unidas covalentemente. La cadena polipeptídica es sintetizada por ribosomas asociados a la membrana plasmática del retículo endoplasmático. Todos los GAG que se unen a proteínas están sulfatados, por lo que tienen una carga negativa mayor que la del ácido hialurónico. Los GAG son:

Condroitín sulfato
Dermatán sulfato
Heparán sulfato
Queratán sulfato

La heparina es idéntica en composición al heparán sulfato, pero no está unida a proteínas.

Lo que determina la unión de GAG a una proteína es la presencia en esta proteína de una secuencia consenso de unión a GAG que suele ser Ser – Gly – Ser, aunque se cree que en ocasiones puede ser más larga y compleja. Esta secuencia consenso permite el reconocimiento de la proteína que se está sintetizando por parte de enzimas, que serán los encargados de añadir los GAG. La adición del GAG se da en Ser, mediante la unión, en primer lugar de Xil – Gal – Gal al residuo de serina, para finalmente añadir a la última galactosa el disacárido. El número de cadenas laterales que presentará un proteoglucano será muy variable. También es muy variable la distribución de los proteoglucanos, peor los podemos encontrar en todos los tejidos.

Agrecano

Es un proteoglucano de la matriz celular que se asocia al ácido hialurónico. Se sintetiza a nivel de RER como una molécula alargada, que pasará por un proceso de plegamiento.

Es una molécula N – Glucosilada y O – Glucosilada. Entre el RER y el Golgi se añade la xilulosa, para que en el principio del Golgi se produzca la adición de azúcares que formarán el condroitín sulfato. Será también en el Golgi donde se produzca la sulfatación.

Se asocia al ácido hialurónico, lo que le confiere diferentes propiedades, lo que en este caso se traducirá en la función que desempeña en la célula, que es la dar soporte mecánico, gracias a los grandes agregados que forma.

Las propiedades de los proteoglucanos vienen dadas por los GAG que los componen, mientras que el núcleo proteico tiene como función dirigir el complejo.

CDC44

Proteoglucano de la membrana plasmática.

Sindecanos

Proteoglucanos de la membrana plasmática.

Otros proteoglucanos se pueden asociar a la membrana mediante grupos lipídicos. Algunos pueden asociarse con proteínas integradas en la membrana. Existen pocos proteoglucanos internos.

Todas las funciones de los proteoglucanos están relacionadas con los GAG que los componen. Tienen una alta capacidad de unirse a moléculas cargadas positivamente, por lo que podrán actuar como receptores ya sea en la matriz celular como en la membrana. Sus posibles funciones son:

Proliferación
Migración y adhesión
Metabolismo extracelular
Coagulación sanguínea
Fenómenos patológicos

Muchos factores de crecimiento tienen cargas positivas, como el FGF. Los proteoglucanos de la membrana actuarán como receptores, mientras que los de la matriz podrán funcionar como almacén. Casi todas las proteínas de adhesión celular tiene dominios de unión a proteoglucanos. Muchas proteínas pueden necesitar unirse a proteoglucanos para poder funcionar correctamente. En el proceso de coagulación es básica la intervención de estas moléculas. Algunos virus pueden aprovechar los proteoglucanos para infectar una célula.

GLUCOPROTEÍNAS DE ADHESIÓN

Se trata de proteínas que relacionan la matriz y las células. Se conocen entre 30 y 40 proteínas distintas. Lo único que tienen en común todas estas proteínas es la función. Las más importantes son:

Fibronectina
Laminina
Tenascina

También es destacable la vitronectina.

Fibronectina

Es la más abundante de estas proteínas. Está relacionada con la coagulación sanguínea. Muchos tipos celulares emplean esta proteínas para relacionarse con la matriz. Se trata de un dímero de 2 subunidades idénticas, con uniones disulfuro entre ellas, estando situadas las uniones cerca de los extremos C terminal de los monómeros. El extremo N terminal posee un dominio de unión a heparán sulfato o a fibrina. En este dominio es donde radica la capacidad anticoagulante de la heparina. Existe otro dominio que es de unión a colágeno fibrilar. Otro dominio, cuya función desconocemos, está situado cerca de la zona donde la proteínas se une a la célula, donde podemos encontrar la secuencia de aminoácidos responsable de esa función, que es -RGD- o -Arg-Gly-Asp. Si se altera la secuencia de unión, esos 3 aminoácidos, la célula perderá su capacidad de unirse.

La pérdida de la capacidad de unión al alterar los aminoácidos es debida a la presencia en la membrana celular de receptores específicos, las integrinas. Muchas proteínas de adhesión emplean estos receptores.

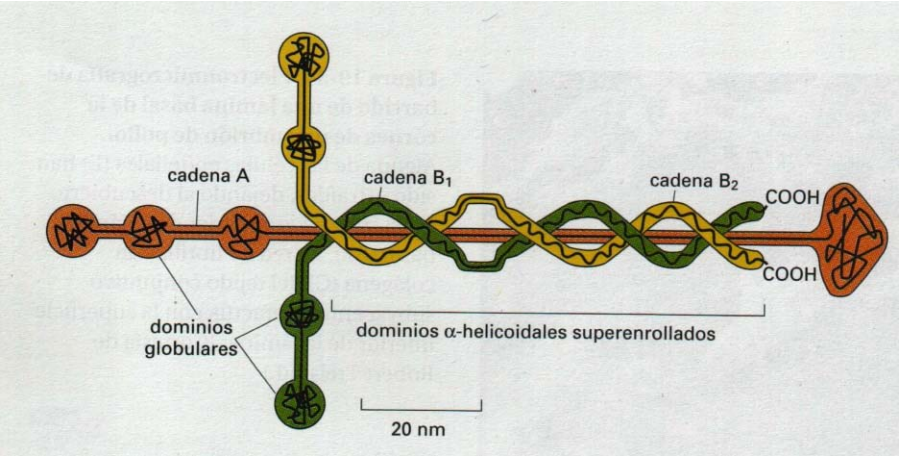
En las zonas de los contactos focales podemos encontrar acumulaciones de fibronectina, por o que esta es un punto de convergencia entre la matriz y el citoesqueleto.

Cada célula tiene sus receptores específicos de fibronectina. En los procesos de migración celular, se sintetiza fibronectina, que se va dejando atrás al avanzar la célula. Durante procesos de embriogénesis se dan también estos mecanismos.

Los 20 tipos de fibronectinas que se conoce provienen del splicing diferencial. La fibronectina puede formar oligómeros, o incluso fibras. La fibronectina se sintetiza en el interior de la célula, pero es expulsada al exterior, donde por acción de otras proteínas se aproximarán distinta moléculas, para acabar formando uniones de varias moléculas de fibronectina, mediante unión por puentes disulfuro.

Laminina

Es una proteína propia de epitelios. Su función es relacionar la célula con la lámina basal. Está formada por 3 polipéptidos diferentes, con lo que queda una estructura en forma de cruz.



Es cuerpo de la proteína es la asociación de las 3 cadenas que la componen, la α, la β y la γ. Se puede unir a la célula, a los proteoglucanos, ... Tiene incluso la capacidad de autoensamblarse. El punto de unión a las células está en el cuerpo de la cruz, siendo una serie de residuos RGD. La unión a la célula está mediada por un proteoglucano, que es el distrogluceano, que modula la unión de la célula y la laminina. Se trata de un proteoglucano que no es integral a la membrana, pero que está asociado a otro elemento que sí está integrado en la membrana.

Es una de las primera proteínas sintetizadas en el proceso embrionario. En las primeras etapas del desarrollo embrionario, la lámina basal tiene poco o ningún colágeno de tipo IV, estando formada principalmente por laminina. La laminina es un gran complejo flexible, de unos 850000 KDa, formado por tres largas cadenas polipeptídicas , dispuestas en forma de cruz y unidas por enlaces disulfuro. Presenta varios dominios funcionales, uno de unión a colágeno de tipo IV, otro de unión a heparán sulfato, otro a entactina, y 2 o más a los receptores de la laminina situados en la superficie celular. Como el colágeno de tipo IV, las moléculas de laminina pueden autoensamblarse, en gran parte gracias a través de las interacciones entre los extremos de los brazos de laminina. Cada molécula de entactina, se une a cada molécula de laminina donde los brazos cortos se entrecruzan con los largos. La entactina se une también al colágeno de tipo IV, por lo que se cree que actúa como puente adicional entre el colágeno y la red de laminina de la lámina basal.

Tenascina

Se trata en realidad de una molécula de no adhesión. Su función es la de separar y compartimentar.

Es un gran complejo polipeptídico de 6 cadenas muy similares o idénticas, unidas mediante radios disulfuro, que irradian desde el centro, como los radios de una rueda. De manera similar a la fibronectina, cada una de las cadenas polipeptídicas está formada a partir de secuencias cortas de aminoácidos, repetidas muchas veces. Cada cadena polipeptídica se pliega en un número de dominios funcionales distintos, uno de los cuales se une a proteoglucanos transmembrana de tipo sindecanos, ,mientras que otro se une a la fibronectina. La tenascina presenta una distribución mucho más restrictiva que la fibronectina, y es mucho más abundante en la matriz extracelular de tejidos embrionarios. A diferencia de la fibronectina puede estimular o inhibir la adhesión celular, dependiendo del tipo celular; se cree que las funciones adhesivas o antiadhesivas están mediadas por diferentes dominios proteicos. Existen evidencias de que ambos tipos de interacciones pueden jugar un importante papel en los procesos de migración celular. Tienen capacidad de unirse a colágeno y a heparán sulfato.

SISTEMAS DE ADHESIÓN CELULAR

	Algunos miembros de la familia	Dependencia de Ca^{2+} o Mg^{2+}	Homofílica o heterofílica	Asociaciones con el citoesqueleto	Asociaciones de uniones celular
Adhesión Célula - Célula					
Cadherinas	Cadherinas E, N, P	Sí	Homofílica	Filamentos de actina	Bandas de adhesión
	Cadherinas desmosomales	Sí	Homofílica	Filamentos intermedios	Desmosomas
Miembros de la familia de las Ig	N – CAM, L1	No	Homofílica o heterofílica	Desconocida	No
Selectinas (Células de la sangre y células endoteliales exclusivamente)	Selectina P	Sí	Heterofílica	Desconocida	No
Integrinas de las células sanguíneas	LFA – 1 (α_1 β_2), Mac –1 ($\alpha_M\beta_2$)	Sí	Heterofílica	Filamentos de actina	No
Adhesión Célula – Matriz					
Integrinas	Muchos tipos	Sí	Heterofílica	Filamentos de actina	Contactos focales
	$\alpha_6\beta_4$	Sí	Heterofílica	Filamentos intermedios	Hemidesmosomas
Proteoglucanos transmembrana	Sindecanos	No	Heterofílica	Filamentos de actina	No

Sistemas de adhesión con la matriz

Integrinas

Se trata de los principales receptores de los componentes de la matriz celular, como el colágeno, la fibronectina o la laminina. Son proteínas de unión, transmembrana y homólogas, que componen una gran familia de proteínas. Las integrinas se diferencias de otros receptores en que tienen una menor afinidad por los ligandos, pero se presentan en la membrana en concentraciones entre 10 y 100 veces superiores.

Están constituidas por2 subunidades glucoproteicas transmembrana, unidas entre sí de manera no covalente, denominadas α y β; ambas contribuyen a la unión de las células a las proteínas de la matriz. Parece que algunas integrinas se unen únicamente a un tipo de macromolécula de la matriz, como la fibronectina o la laminina, mientras que otras se unen a más de una macromolécula, de manera que una integrina se podría unir a colágeno, fibronectina y laminina, indiferentemente. Una subfamilia de integrinas reconoce la secuencia RGD presente en éstas y otras proteínas de la matriz, mientras que otras integrinas reconocen otras secuencias o dominios. Una misma molécula de integrina localizada en diferentes tipos celulares puede presentar diferentes afinidades por el ligando, por lo que puede especularse que determinados factores adicionales pueden interactuar con las integrinas, modulando su actividad.

La unión de las integrinas a sus ligando depende de cationes bivalentes extracelulares, como el Ca^{2+} o el Mg^{2+}, según el tipo de integrina, lo cual refleja la presencia de 3 o 4 dominios de unión a cationes divalentes en la gran región extracelular de la cadena α. Esta propiedad puede utilizarse para purificar integrinas, de manera que las proteínas de membrana plasmática solubles en detergente se hacen pasar por una columna de afinidad que contenga una proteína de la matriz extracelular o un péptido con la señal RGD, de manera que se unirán las integrinas. Estas integrinas podrán ser eluidas de la columna mediante un lavado con una solución libre de cationes divalentes. El tipo de cationes divalentes puede afectar tanto a la afinidad como a la especificidad de la integrina por sus ligandos.

Muchas proteínas de la matriz son reconocidas por diferentes integrinas. Se han definido alrededor de 20 heterodímeros de integrinas, compuestos por 9 tipos de subunidades α y 14 tipos de β. Además, se continúa la caracterización de estas proteínas, que pese a conocerse hace poco, unos 15 años, han sido muy estudiadas.

Interacciones con el citoesqueleto

Las integrinas actúan como acopladores transmembrana, mediando las interacciones entre el citoesqueleto y la matriz extracelular que son necesarias para que la célula se adhiera a la matriz. La mayoría de las integrinas se asocian a filamentos de actina, con excepción de la $\alpha_6\beta_4$, situada en hemidesmosomas, que se asocia a filamentos intermedios. Tras la unión de la integrina a su ligando en la matriz, la cola citoplasmática de la unidad β se une a la talina y a la α actinina, iniciando el ensamblaje de un complejo de proteínas de unión intracelulares que unen la integrina a los filamentos de actina en el córtex celular. Se cree que así es como se forman los contactos focales entre las células y la matriz extracelular. Las integrinas han de interactuar con el citoesqueleto para que las células permanezcan unidas a la matriz.

La matriz extracelular puede influir en el citoesqueleto de la célula. Los haces de actina pueden influir sobre los filamentos de fibronectina secretados, lo que también sucede a la inversa. Las integrinas actúan como adaptadores de estos procesos de ordenamiento, mediando las interacciones entre las células y la matriz que las rodea.

Regulación

Mientras que las integrinas de la mayoría de las células están constantemente en un estado competente agresivo, las integrinas de algunos tipos celulares, como las sanguíneas, han de ser activadas antes de poder mediar en la adhesión celular. Estas adhesiones reguladas permiten a las células sanguíneas circular libremente hasta que son activadas por un estímulo adecuado. Debido a que las integrinas no necesitan ser sintetizadas de novo, la respuesta puede ser rápida. Por ejemplo, las plaquetas pueden ser activadas por el contacto con un vaso sanguíneo dañado, o bien por alguna de las moléculas de señalización solubles. El estímulo activa vías de señalización intracelular, que activarán de manera rápida y permanente una integrina de tipo β_3 en la membrana de la plaqueta, de manera que se alterará su conformación, por lo que ahora su dominio extracelular puede unirse al fibrinógeno con gran afinidad y formar el coágulo sanguíneo. La mayoría de los mecanismos mediante los cuales algunas señales intracelulares activan los lugares de unión a la integrina en una célula sanguínea son desconocidos.

Otros fenómenos intracelulares pueden inactivar las integrinas. La fosforilación de un residuo de serina en el extremo citoplasmático de una integrina de tipo β_1 durante la mitosis de células en cultivo debilita la capacidad de unión de la integrina a la fibronectina, lo cual puede explicar por qué estas células se redondean y se liberan del sustrato en la mitosis.

Señalización intracelular

Las macromoléculas de la matriz extracelular presentan notables efectos sobre la conducta de las células en cultivo, afectando a su forma, su polaridad, su movimiento, su desarrollo y otras funciones específicas. Muchos de estos efectos implican cambios en la expresión génica, y son llevados a cabo por integrinas. Por un lado, mediante la unión con el citoesqueleto pueden afectar el movimiento o la forma de las células. Pero se cree que es posible que las integrinas activen otras vías de señalización.

En los contactos focales se produce un proceso de interpretación de señales desde el exterior celular hacia el interior. Una proteína importante es la FAK, la kinasa de adhesión focal. Este enzima se activará cuando la señal llegue a la integrina, de manera que en ese momento se traspasará la señal desde la integrina, ya que se fosforilará un residuo de tirosina, por lo que se unirán algunas moléculas citoplasmáticas, como los filamentos de actina y la proteína Sac, de señalización celular. Se empezarán a actuar entonces sobre moléculas de señalización intracelulares, generando una cascada de señales que llegará al núcleo, con lo que se activarán genes específicos de momentos de adhesión. Cuando desparezca la señal, cesará a expresión de los genes. La activación diferencial se cree que puede estar debida a que haya diferentes tipos de integrinas, unidas a diferentes sustratos de la FAK. Este es el proceso de transmisión de señales desde el exterior hacia el interior.

Un fenómeno de transmisión de señales desde el interior hacia el exterior sería el caso de las plaquetas, como ya se ha mostrado anteriormente

Proteoglucanos transmembrana

Se trata de los sindecanos principalmente. Un ejemplo es el CD 44. Son del tipo heparán sulfato. Son moléculas heterofílicas, que están asociadas a actina en sus extremos citoplasmáticos. No forman estructuras especiales de unión.

Adhesión célula - célula

Cadherinas

Estas proteínas son las responsables de la unión intercelular dependiente de calcio en los vertebrados. Las 3 primeras cadherinas que se descubrieron fueron nombradas en función de los principales tejidos en los que se encontraron.

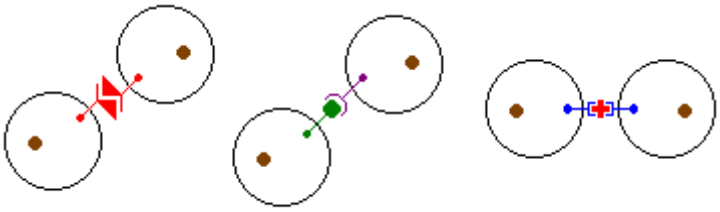
Cadherina E	Tejidos epiteliales
Cadherina N	Células nerviosas, musculares y del cristalino
Cadherina P	Células placentarias y epidérmicas

Todas estas moléculas pueden ser detectadas transitoriamente en otros tejidos durante el desarrollo. Además, se siguen descubriendo nuevas cadherinas, de las que actualmente se conocen alrededor de 12. Parecer ser que casi todas las células de los vertebrados expresan una o más cadherinas, cada una de las cuales codificada en un gen distinto, siendo la expresión de cada grupo concreto una característica del tipo celular. Se ha demostrado experimentalmente que las cadherinas son las principales responsables de los procesos de adhesión entre distintas células.

La mayor parte de las cadherinas son glucoproteínas, con un único dominio transmembrana, constituidas por entre 700 y 750 residuos aminoacídicos. La voluminosa fracción extracelular de la cadena polipeptídica está normalmente plegada en 5 dominios, cada uno de los cuales suele contener 100 aminoácidos. 4 de estos dominios son homólogos entre sí y probablemente tienen lugares de unión a calcio. En ausencia de calcio, las cadherinas sufren un importante cambio conformacional, como resultado del cual son rápidamente degradadas por enzimas proteolíticos. Se desconoce el significado biológico de esta gran dependencia de calcio.

Se conocen entre 18 y 20 cadherinas, lo que no explica la cantidad de tejidos existentes. Se cree que es posible que la diferente combinación de cadherinas determina la formación de un tejido u otro. La cadherina E es la mejor caracterizada de todas las cadherinas. También recibe el nombre de uvomorulina. Se suele concentrar en las bandas de adhesión de los tejidos epiteliales maduros, donde conecta los filamentos de actina de los citoesqueletos corticales de las células adyacentes, manteniéndolas unidas. Es la primera cadherina que se expresa en el desarrollo de los mamíferos. Es probable que las cadherinas estén relacionadas también con los últimos estadios del proceso de desarrollo de los vertebrados, ya que su presencia o ausencia están relacionadas con los principales procesos morfogenéticos implicados en la segregación tisular. Así, por ejemplo, una vez formado el tubo neural e independizado del ectodermo, las células del neuroepitelio en desarrollo pierden la cadherina E inician la síntesis de la cadherina N, mientras que las células de la capa ectodérmica continúan expresando al cadherina E. Además, las células de la cresta neural que forman el sistema nervioso periférico, cuando están asociadas al tubo neural tienen grandes acúmulos de cadherina N en su superficie, para dejar de expresarla cuando inician la migración, y volver a expresarla cuando se agreguen formando un ganglio nervioso. Así pues, los 3 tipos celulares que se segregan a partir de un tipo inicial presentan patrones diferentes de expresión de cadherinas, lo que hace suponer que puede estar implicada en los procesos de separación celulares.

Existen 3 métodos por los cuales se puede dar la unión entre diferentes células, ilustrados en la figura inferior:



La primera imagen muestra la unión entre 2 células, a través de una misma molécula, presente en las dos células. Este tipo de uniones se llaman homofílicas. La segunda imagen muestra un receptor situado en una de las células, que permite la unión de otra molécula situada en la otra célula. Este tipo de uniones se llaman heterofílicas. Por último, la tercera imagen muestra una unión entre 2 células a través de la unión de una molécula de cada membrana a una molécula del medio extracelular, secretada por las mismas células. Las cadherinas emplean el primer tipo de mecanismo para producir la adhesión.

Se ha demostrado experimentalmente que la tanto el tipo como la cantidad de cadherina pueden favorecer una u otra agregación de células, y por lo tanto en la formación de los tejidos.

Muchas cadherinas actúan como proteínas de unión transmembrana, mediando las interacciones de los filamentos de actina de del citoesqueleto de las células que están unidas. Son las proteínas de adhesión alrededor de las cuales se construyen las uniones adherentes intercelulares. Un dominio citoplasmático muy conservado de las cadherinas interactúa con el córtex de actina, mediante 3 proteínas de unión intracelular, llamadas cateninas. Esta interacción es necesaria para que se produzca adhesión intracelular. Las cadherinas que se encuentran en los desmosomas no interactúan con filamentos de actina, sino que lo hacen con filamentos intermedios, ya que su dominio citoplasmático es distinto, y por lo tanto se unen a grupos diferentes de proteínas de unión, las cuales se unen a filamentos intermedios.

Se desconocen los posibles mecanismos de regulación de la actividad de las cadherinas, pero se considera posible que tengan mecanismos similares a los descritos en las integrinas. Se sabe además que en la zona extracelular de estas proteínas existe un punto de rotura proteolítico, relacionado muy posiblemente con la regulación.

Cateninas

Son las responsables de la unión de las cadherinas y la actina en la zona cortical de la célula. Existen 3 tipos de cateninas, la α, la β y la γ. La β catenina es la principal en las bandas de adhesión, mientras que en los desmosomas la γ catenina, que también se conoce como placoglobulina, es la predominante. La α catenina está en ambos tipos de uniones. β o γ se unen a la cola citoplasmática de la cadherina, mientras que α se une a una de ellas. α hace de puente con el citoesqueleto, pero no de manera indirecta, sino a través de otras proteínas, algunas de las cuales se desconocen. Se tarta de 3 proteínas muy similares entre sí, pero también parecidas a la vinculina.

Tal y como ya se ha dicho, una célula tendrá una respuesta diferente en función de si está unida con otras células. Existe por lo tanto relación entre las cadherinas y la respuesta que dará la célula.

β CATENINA

Podemos encontrar la β catenina en 3 formas en el citoplasma:
Unida a cadherinas
En proceso de degradación
Entrando en el núcleo celular y activando factores de transcripción

Si las cadherinas se desprenden de las otras células, la β catenina se desprenderá del extremo citoplasmático, para dirigirse hacia el núcleo, donde actuará como reguladora de la expresión de algunos genes. En muchos casos, la regulación positiva de las integrinas implica la regulación negativa de las cadherinas. La β catenina está relacionada también con las proteínas Rho, que se unen con el citoesqueleto.

Desmosomas

Placas de unos 300 nm, donde confluyen muchos filamentos intermedios, principalmente queratinas. Se trata de estructuras más sólidas que las bandas de adhesión. Las proteínas que median estas uniones son características de los desmosomas. Encontramos, entre otras, a la desmopollina,... La principal diferencia de estas proteínas con otras similares es la longitud de la cola citoplasmática, ya que en el caso de los desmosomas es más larga. Podemos encontrar puntos de unión a calcio y a otras moléculas típicas. La unión a los filamentos intermedios está mediada por γ catenina, aunque hoy en día se desconoce el mecanismo exacto de funcionamiento.

En un mismo desmosoma encontramos diferentes cadherinas, que también variarán en función del estado de la célula. Desmosomas y hemidemosomas no son estructuras comparables, lo único que tienen en simún es que ambas se unen en el dominio citoplasmático con filamentos intermedios.

Miembros de la familia de las Inmunoglobulinas

Se trata de uniones independientes de calcio. Estas proteínas se denominan así porque tienen, como mínimo, un dominio análogo con las inmunoglobulinas. Derivan del gen que sintetiza las inmunoglobulinas. Parece ser que un tipo de estas proteínas, llamado N-CAM, une las distintas células mediante uniones homofílicas, de manera similar a las cadherinas. Sin embargo, otras proteínas de esta familia emplean un sistema heterofílico para realizar las uniones, como en el caso de células endoteliales que expresan este tipo de Ig, de manera que se unirán a integrinas de los glóbulos blancos, colaborando así a producir los estados inflamatorios.

En la mayoría de las proteínas de este tipo, el gran dominio extracelular de la proteína está plegado en 5 dominios más pequeños, homólogos a los de las inmunoglobulinas. La mayoría son proteínas transmembrana, con un solo paso, con dominio intracelular de tamaño variable que parecen estar relacionados con la señalización celular o con la unión al citoesqueleto. En alguno casos puede no darse un paso transmembrana, sino que se une a la membrana mediante un enlace covalente el glucosilfosfatidilinositol (GPI), mientras que en otros casos pueden ser simplemente secretadas a la matriz extracelular.

A pesar de que las cadherinas y las proteínas de esta familia se expresan muy a menudo en los mismos tipos celulares, las uniones mediadas por cadherinas son mucho más fuertes y con toda seguridad las responsables de mantener las células unidas. La familia de las integrinas no forma estructuras específicas para mediar las uniones.

Selectina

Se trata de una familia de unión a carbohidratos, las lectinas, denominadas en este caso selectinas, actúan en un gran número de interacciones celulares transitorias en la circulación sanguínea, permitiendo a los glóbulos blancos unirse a las células endoteliales de vasos sanguíneos pequeños, de manera que podrán migrar hacia el interior del tejido y zonas inflamadas. Se conocen tres tipos:

P selectina: Plaquetas
L selectina: Leucocitos
E selectina: Endotelio.

Las selectinas contienen un gran dominio de lectina, altamente conservado, que en presencia de calcio se unirá a un oligosacárido específico de otra célula, con lo que tenemos un nuevo ejemplo de uniones heterofílicas. Requieren la presencia de calcio. No forman estructuras específicas.

La P selectina y la E selectina son características de las células endoteliales, mientras que la L selectina es característica de los leucocitos. Los receptores de la L selectina son están muy glucosilados y forman estructuras muy complejas. También es muy complejo el receptor de la P selectina, mientras que el receptor de la E selectina se desconoce por completo.

Mediante este tipo de uniones, los leucocitos se adentran en el tejido donde es necesaria su presencia, dirigiéndose específicamente a ese lugar. Los leucocitos, en condiciones normales, circulan por la sangre rodando por encima de las células endoteliales, mediante los microvilli. Cuando reciben la señal, se unen a las células endoteliales, para, más adelante, separarlas y penetrar en el tejido donde se les requiere. En este proceso interviene una elevada cantidad de moléculas.

Las selectinas que intervienen en estos procesos sufren mecanismos de regulación, ya que se almacenan en gránulos de secreción hasta que son necesitadas, momento en que son expuestas.

Integrinas

Las cadherinas no son las únicas proteínas que median la adhesión intercelular dependiente de calcio, ya que algunas integrinas pueden también unir células entre sí mediante interacciones heterofílicas con otras proteínas de superficie celular. Este tipo de integrinas es característico de las células sanguíneas.

Uniones celulares

Uniones estancas

También reciben el nombre de uniones cerradas, entre otros. Se trata de uniones impermeabilizadas. Su función es separar 2 espacios diferentes, actuando como barrera entre ellos. No permiten el paso de moléculas o iones a través suyo. Hay una relación directa entre el número de uniones cerradas y la impermeabilización de las células.

Siempre las encontramos próximas a la parte apical de la célula. Están formadas por moléculas que cierran físicamente el espacio entre las células. Estas guiones están vinculadas con el citoesqueleto. Se conocen 2 moléculas relacionadas con este tipo de uniones, la ocludina y la claudina. Tienen 4 pasos transmembrana, por lo que dejan 2 dominios expuestos en el exterior de la célula, que tendrán formas similares a asas. Se unen con las asas que dejan otras moléculas de otras células, delimitando así un espacio impermeable. La zonula ocludens relaciona ocludina y claudina con el citoesqueleto. A partir de esas uniones se pueden transmitir señales hacia el interior de las células, o hacia otras células. A pesar de todo, estas uniones se desconocen en gran medida.

Uniones de comunicación

Uniones GAP

Se dan en células animales. Relacionan células en contacto, de manera sincronizada, permitiéndoles intercambiar moléculas de bajo peso molecular, de algunos daltons. Permite el intercambio de metabolitos y algunos azúcares, pero poca cosa más. Son canales regulables, que pueden abrirse y cerrarse. Durante los procesos de la embriogénesis se van formando y destruyendo estos canales.

La formación de estas uniones se da gracias a una proteína, la conexina, que tiene 4 pasos transmembrana, con lo que quedan 2 dominios en forma de asa en el exterior y 1 en el interior. Cada unión consta de 6 conexinas por célula, por lo que en total se requerirán 12 para formar el canal. Por cambios estructurales de la conexina se puede abrir o cerrar la unión. Estos cambios pueden estar ocasionados por calcio o por fosforilaciones de la proteína. Se puede asociar a calmodulinas o fosforilasas.

Plasmodesmas

Se dan en células vegetales, por lo que han de atravesar la totalidad de la pared. Debido a eso existe continuidad en las membranas de las diferentes células, lo que implica que hay un paso directo de moléculas de una célula a otra. Incluso moléculas de RNA pueden pasar por este tipo de uniones, moléculas mucho más grandes que en el caso de las uniones de tipo GAP.

REMODELACIÓN O DEGRADACIÓN DE LA MATRIZ

Es un proceso necesario para el organismo, tanto a nivel fisiológico como patológico. Un claro ejemplo de esto se da en los huesos.

La degradación de la matriz se da mediante la acción de enzimas denominados metaloproteinasas, de las que se conocen entre 17 y 20 diferentes. Son enzimas especializados en degradar la matriz, normalmente atacando a una única molécula. Las colagenazas, por ejemplo, solo pueden degradad un tipo de molécula, teniendo preferencia por una forma u otra de colágeno.

Estos enzimas están sujetos a una estricta regulación. Cuando una célula tiene necesidad de degradar la matriz que la rodea, sintetiza formas inactivas de estos enzimas, que se acumularán en el interior de la célula. Para activarse y secretarse al exterior se deberá dar un proceso de regulación en cascada.

La degradación celular juega un papel importante en la vida de las células, ya que para que estas puedan migrar se deberá degradar la matriz. En los tumores la regulación se ha de ver afectada. En los procesos de reparación de las heridas es también importante la remodelación de la matriz. En los procesos de migración intervendrán también integrinas, que jugarán un papel importante, permitiendo a la célula seguir el camino que debe.

NÚCLEO

Es una estructura característica de las células eucariotas. Su función es la de preservar la integridad estructural del material genético, ya que le DNA es muy frágil. También en el núcleo se da la expresión génica. En el núcleo se asegura también que los caracteres genéticos se transfieran correctamente de una a otra generación, ya que es allí donde se replica el DNA. En el núcleo se puede dar incluso la reparación del DNA.

ESTRUCTURA

Consta de una doble membrana nuclear o envuelta nuclear, externa e interna. Esta estructura es discontinua, ya que hay perforaciones. En las perforaciones podemos encontrar el complejo de poro nuclear o NPC, que es una estructura muy compleja, cuya función se estudiará más adelante. El NPC consta de más de 150 proteínas y un peso de entre 100 y 150 x 10^6 Daltons. En el interior nuclear encontramos:

Cromatina

Se denomina cromatina al conjunto de ácidos nucleicos, de cualquier tipo, y a las proteínas que los acompañan. Estas proteínas que los acompañan pueden ser histonas o no serlo. Podemos ver entonces los siguientes tipos de proteínas:

Histonas	
Nucleosomales	H2A, H2B, H3, H4
No nucleosomales	H1
No histonas	
Factores, polimerasas,...	

El DNA es bastante más grande que el núcleo, por lo que ha de ser compactado, para poder meterse en su interior. Mediante una serie de proteínas se compacta el DNA, para pasar desde el grado de máximo estiramiento al grado de máxima compactación, que se da cuando se ve el cromosoma en la mitosis. En las primeras fases se forman las estructuras conocidas como nucleosomas, gracias a las histonas. En la interfase podemos encontrar todo tipo de estructuras, aunque la compactación total, en forma de cromosoma condensado sólo se da en la mitosis.

Una de los grados de compactación se da gracias al hecho de que existe la matriz nuclear, donde se une el DNA, que forma bucles. Cada bucle, que mide 300 nm se une al esqueleto mediante regiones específicas, la SAR: Scaffold attached region y la MAR: Matriz Attached Region. Los bucles son unidades de compactación o descompactación. Los genes activos son sensibles a la DNAasa I, de manera que si un gen en un bucle hay un gen que se expresa, este bucle será sensible a la acción de la DNAasa I.

En cada cromosoma encontramos, al menos, un origen de replicación, mediante el cual se podrá replicar. Además, encontraremos 1 centrómero y si no es circular 2 telómeros.

Origen de replicación

Tiene afinidad por los factores que hacen que se replique el DNA. En cromosomas eucariotas encontramos miles de orígenes de replicación. Están agrupados en grupos, que constan de entre 80 y 100 orígenes adyacentes. Se activan cuando la célula entra en la fase S, pero no lo hacen de manera simultánea, sino que primero se activan unos y después otros, de manera que el cromosoma se replicará de manera secuencial. Lo que se replica primero en un núcleo que entra en S es la región de cromatina abierta o eucromatina, para pasar después a replicar desde los orígenes de la región de heterocromatina. Durante toda la fase S, toda la cromatina ha de haberse descondensado al menos una vez.

Para evitar que las zonas que están expuestas desde un principio no se repliquen más de una vez, se marcan esas zonas como DNA nuevo. Las histonas que se incorporan están acetiladas, lo que hace que sean más estables de lo normal. Todo el DNA que sale de la fase S está marcado con histonas acetiladas, pero en el inicio de la fase G2, una acetilasa retirará los grupos acetilo de las histonas. Las histonas que forman parte del DNA replicado se sintetizan al final de la fase G1 y en la fase S. El enzima que las acetila es el HAT (histone acetil transferase). Las histonas nuevas se colocan en ambas cadenas, con lo que queda marcado el DNA. La relación de histonas nuevas y viejas no acaba de estar clara, pero se saber que la relación es de 1:1, lo que no se sabe es la manera de distribuirlas.

Telómeros

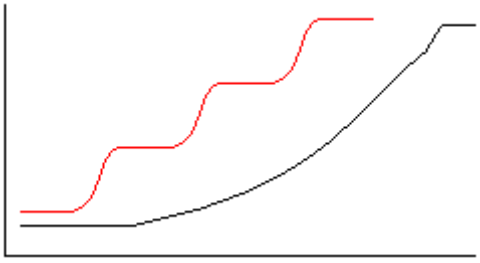
Se encuentran en número de 2 en cromosomas lineales. Son secuencias de DNA repetidas, cortas, ricas en G y C, junto con algunas proteínas. Su función es la de proteger el extremo de cromosoma, asegurando que la región terminal del cromosoma se podrá replicar correctamente y que no se irán perdiendo partes en cada replicación. Al final de la síntesis, al llegar al final del cromosomas, la polimerasa no puede seguir sintetizando, ya que le falta el molde. En este punto interviene la telomerasa, que es la encargada de la síntesis de telómeros o de su replicación. Se trata de una polimerización de DNA, dependiendo de RNA. Es por lo tanto una retrotranscriptasa. Tiene RNA y una ribonucleoproteína. Cada telómero tiene una secuencia repetida, que es complementaria de la de la telomerasa, por lo que se puede sintetizar el telómero.

Proteínas del telómero

Los telómeros de los cromosomas se encuentran agrupados en ciertas regiones del núcleo Estas asociaciones están debidas a la acción de las proteínas del telómero. De hecho, en estudios hechos se diferentes células, los centrómeros siempre se agrupan en la misma posición. Una de las proteínas que intervienen en el proceso es RAP1.

Centrómeros

Construcción estructural de todos los cromosomas, formada por DNA centromérico y las proteínas del centrómero. No se ha de confundir el centrómero con el cinetocoro, que es una estructura característica de las células en división, que está formado por Microtúbulos, MAPs y centrómero. El DNA centromérico es muy repetitivo, con asta 170 pb repetidos. Se conoce como DNA α en el ser humano.



Se hicieron experimentos de reasociación en centrómeros, con los resultados que se muestran en la gráfica superior. La gráfica negra muestra como esperaríamos que transcurriese la reasociación si cada fragmento de la cadena sólo tuviese un complementario. En cambio, en rojo se muestra que hay zonas que se ensamblan de nuevo de inmediato, ya que están muy repetidas, por lo que encuentran una región similar muy rápidamente. Es una secuencia repetida interna, lo que determina que se formen pequeños loops en esa zona.

Mediante el estudio de una enfermedad se pudo aislar diferentes proteínas:

Centroméricas (constitutivas)
A, B, C, D, E,...
Facultativas (en algún momento del ciclo celular)
MAPs en la mitosis
INCENP de G2 a M (Intercentromeric proteins)

Las INCENPs permiten que los cinetocoros permanezcan unidos, desde la fase S hasta la fase M, al final de la metafase. Se sitúan entre ambos cinetocoros.

Esqueleto nuclear

En el citoplasma encontramos citoesqueleto y uniones entre las células. En el núcleo podemos encontrar el esqueleto nuclear y el complejo de poro. El esqueleto nuclear se compone de:

Láminas nucleares

Están formadas por filamentos intermedios, que no se agrupan en forma de filamentos, sino que forman redes por el interior de la envoltura nuclear, formando una malla.

Se trata de FI de disposición periférica. Esta compuesta por laminina A, B y C. La B está presente en todos los tipos celulares. A y C están presentes tan solo en células que han comenzado el proceso de diferenciación. Se expresan a partir de 2 genes, 1 para A y otro para B, ya que C se forma a partir de splicing alternativo de A. Tanto A como C contienen aminoácidos alifáticos, con isoprenilaciones, con ácido mevalónico. Estas uniones son reversibles regulables. Al foforilarse las 3 láminas se desorganizan y el núcleo entra en mitosis.

NPC

Hacen de punto de unión entre los FI citosólicos y los FI nucleares.

Matriz nuclear

Es lo que queda en el núcleo después de extraer todos los contenidos solubles, por lo que se trata de una estructura muy insoluble, muy compleja y, aún hoy, poco conocida. La obtención de la matriz extracelular a partir de núcleos es relativamente sencilla, pero ya que es insoluble no se podrá hacer ninguna electroforesis con ella. Existen técnicas que permiten al solubilización, pero destruyen parcialmente la matriz.

Se estudia a partir de una enfermedad autoinmune, el lupus. En el estado de feto, todos los linfocitos que fabrican Ac contra las proteínas de feto mueren, y quedan sólo los que reconocen cuerpos extraños. Por error, en el caso de esta enfermedad, quedan linfocitos que no deberían. Estos fabrican Ac que reconocen un enzima, la topoisomerasa I, que es un enzima nuclear, que se puede localizar sobre los filamentos de la matriz nuclear. La función de la topoisomerasa I es la de liberar tensiones del DNA. Existen 2 tipos de topoisomerasas, la I y la II. Son enzimas de replicación o de transcripción.

Se cree que la matriz celular en interfase estaría compuesta principalmente por los elementos que constituirían el esqueleto del cromosoma.

MITOSIS

Se condensan los cromosomas, debido a la acetilación de H1. Se produce también una desorganización de la envoltura nuclear, debido a la hiperfosforilación de la lámina por p34 y cdc2, que es en realidad una CDK. Las lamininas A y C se solubilizan, mientras que B pasar a estar unida a la membrana por el receptor de la lámina, que es una proteína transmembrana.

La doble membrana se romperá en vesículas que contendrán en su interior laminina B. Al acabar la mitosis, una fosfatasa desfosforilará las lamininas. Las vesículas se situarán en las regiones determinadas del citoplasma, volviendo a formar la envoltura nuclear. A y C dejarán de estar solubles por la acción de fosfatasas. El complejo de poro nuclear y parte de la membrana nuclear quedan integrados en el RE, por lo que pierden parte de su especialidad.

Para llegar a formular estos modelos, se ha partido de dos modelos de estudio:

Por un lado, se estudiaron células de mamífero en cultivo, a partir de un cultivo sincronizado, donde todas las células están en la misma fase del ciclo celular a la vez. Esto se puede hacer fácilmente deteniendo el ciclo en alguno de los dos puntos críticos de regulación, ya sea en G2 – M o bien en G1 – S. Si retiramos los factores de crecimiento, las células no entrarán en división, por lo que si esperamos un tiempo y después los volvemos a poner, todas las células estarán sincronizadas. Se observó que aparecía un receptor para B en el retículo endoplasmático rugoso. Se trata de una situación casi fisiológica, por lo tanto, observamos que en condiciones normales el receptor irá al RER.

El segundo modelo que se empleó fue el de los oocitos de *Xenopus*. Estas células son muy ricas en factores de crecimiento y en nutrientes, ya que el desarrollo ha de ser rápido e independiente del medio, por lo que la célula tiene todo lo que necesita para crecer. Una vez fecundado entra en un proceso en el que realiza una serie de divisiones seguidas, casi sin crecer, por lo que es relativamente sencillo observar el proceso mitótico en estas células. Los receptores de B aparecen en estructuras en el citoplasma que podrían ser vesículas. La explicación a este proceso está en que en el oocito ya hay una serie de vesículas dispuestas para favorecer una tasa mitótica más elevada.

NUCLEOLO

Se trata de cromatina con una función especial, la síntesis de ribosomas, que son orgánulos citoplasmática situados en la cara citoplasmática del RER, cuya función es la de traducir proteínas. Están formados por proteínas, más de 70 y 4 tipos de rRNA: 28s, 18s, 5,8s y 5s. Es en el nucleolo donde encontramos la información para que todo esto se sintetice, desde el DNA para transcribir el RNA, hasta los enzimas necesarios para el montaje de las subunidades del ribosoma. Dentro del nucleolo identificamos 3 componentes, el fibrilar, el densofibrilar y el granular.

Para sintetizar ribosomas necesitamos rRNA. Tanto el 28s como el 18s como el 5,8s se sintetizan en el nucleolo a partir de un tránscrito primario de 13000 nucleótidos que se rompe. El 5s se sintetiza en otro lugar, mediante una polimerasa diferente. Se denomina rDNA al DNA donde podemos encontrar la secuencia para sintetizar rRNA. Encontramos diferentes zonas, situadas en cromosomas distintos, implicadas en la síntesis de rRNA. De hecho, en el ser humano están repartidos en 7 cromosomas distintos. Si bloqueamos la RNA polimerasa I, el n8ucleolo, con el tiempo, desaparecerá.

Para saber donde se sintetiza RNA emplearíamos UTP marcado, pero no con P^{32}, ya que es demasiado potente y no permitiría ver bien el marcaje, si lo empleasemos lo pondríamos en α. Lo que emplearemos para hacer el marcaje será C^{14} o bien H^{3}. Con tiempos de exposición cortos, pero con marcaje largo, veremos como el marcaje sale del núcleo y se dirige al RER, ya que allí es donde se dará la síntesis de proteínas por parte de los ribosomas.

Existen dos tipos diferentes de experimentos de marcaje
Pulso: ponemos la molécula y comprobamos donde está, pasado un tiempo hacemos lo mismo
Pulso y caza: ponemos una molécula, y, pasado un tiempo la quitamos. Dejamos tiempos diferentes y al observar la célula veremos el camino que ha hecho la molécula

Para saber si lo que hemos marcado es la síntesis de rRNA o no se podría emplear una sonda contra rDNA; se marcaría el interior del nucleolo, el componente fibrilar.

Las copias de los 13000 bp las podemos encontrar en diferentes partes del genoma. Pueden existir cuerpos pronucleares, que estarán en igual número al número de cromosomas con fragmentos de DNAr. Los cuerpos pronucleares se van uniendo.

Una secuencia de DNAr, de 13000bp, insertadas en un plásmido, es capaz de inducir la formación de un nuevo cuerpo pronuclear.

Existe una zona conocida como NOR, que es la nucleolar organizing region. El nucleolo es por lo tanto el encargado de sintetizar rRNA, y está muy vinculado a la síntesis de ribosomas, siendo el nucleolo la expresión morfológica de estos procesos de síntesis.

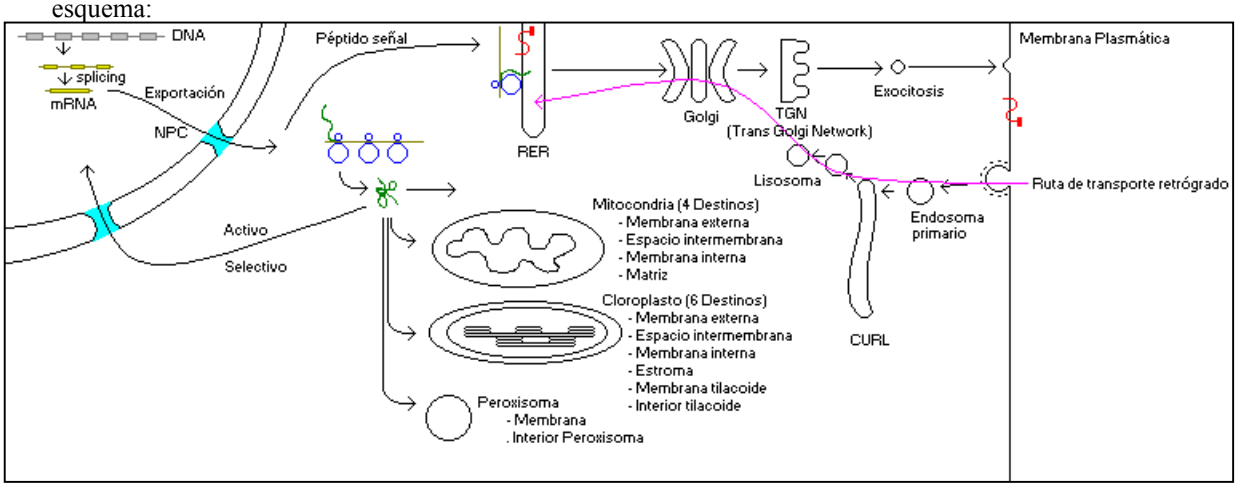
Pero el nucleolo tienes otras funciones, que son las de regulación. Actúa como compartimento de retención. Los elementos de regulación del núcleo son almacenados en este compartimento.

TRANSPORTE NUCLEAR

Ya desde un principio se supuso, que, dado que existían diferentes orgánulos, debía haber un sistema de transporte entre ellos. El estudio del transporte se centrará básicamente en las proteínas, aunque los lípidos juegan también un importante papel en la vida de la célula, ya que las membranas que componen la célula son lípidos.

La síntesis de proteínas se da principalmente en el citosol, pudiendo ser libre o bien unida a membrana. Definiremos 2 grupos básicos, en función de si ha de atravesar alguna membrana para llegar a su objetivo. Por un lado, las proteínas de acceso libre están restringidas al citosol al núcleo, que a pesar de formar dos regiones claramente diferenciadas, son sólo un compartimento. Estas proteínas no tienen que atravesar ninguna membrana. El otro grupo, ha de atravesar alguna membrana para llegar a su objetivo. Un proteína puede dirigirse a mitocondria, cloroplasto, peroxisoma o a la ruta exocítica o endocítica, pasando por todos los compartimentos que la componen, como el RE, Golgi, vesículas y membrana plasmática.

Una proteína puede diferenciar entre 5 compartimentos. El transporte de las proteínas sigue el siguiente esquema:



La mayoría de las proteínas de membrana se sintetizan en el RE, pero algunas se sintetizan en el citosol y se integran en el RE posteriormente.

TRANSPORTE CITOSOL – NÚCLEO

Se realiza a través del complejo de poro:
Metazoos 125 MDa
Levaduras 60 MDa

Esta formado por más de 100 proteínas, las nucleoporinas, que forman 3 dominios:
Cilindro central
Filamento basket o fishtrap
Filamentos citosólicos

La estructura es la de un cilindro central, del que salen filamentos, que se unen en un anillo, que forma el basket. Existen también 8 filamentos en el lado citosólico.

Se distinguen 2 tipos de transporte, el pasivo, que dependerá de los gradientes, y el activo. El pasivo tiene unos límites, de 22 Kda en proteínas fibrilares, y 40 Kda en proteínas globulares. El hecho de que haya estas diferencias implica que no se ha de tener en cuenta únicamente el tamaño o diámetro de la proteína, sino que se ha de tener en cuenta la forma del tubo. El conducto será, por lo tanto, curvo lo que explica los problemas que tienen las proteínas fibrilares para atravesarlo. El transporte activo se realiza por el canal central, que tiene un tamaño variable, mientras que el pasivo se realiza por los canales laterales, que son de diámetro fijo.

Muchas nucleoporinas son modificadas en el citosol, pasando por procesos de ortoglucosilación, en residuos de Ser o Thr. Esto implica que sean proteínas reconocidas por la lectina o WGA, wheat germen agglutinin. Las lectinas son capaces de detectar glúcidos de manera muy específica. En principio se pensó que eran proteínas exclusivamente vegetales, pero actualmente se sabe que también hay en células animales.

Se emplearon 3 métodos para el estudio de este transporte:
Oocitos de *Xenopus*
Células de mamífero en cultivo
Transporte *in vitro*

Los más importantes son lo que se realizaron in vitro, ya que en ellos se conoce perfectamente el modelo, se sabe todas las moléculas que hay en el experimento. Ya que se trata de transporte núcleo citoplasma, necesitaremos:
Núcleos purificados
Sustrato a transportar, convenientemente marcado.
ATP
Otras sustancias, necesarias para que funcione el experimento.

Antes de empezar a investigar hemos de considerar el problema al que nos enfrentamos, confrontarlo con una hipótesis y formular un modelo experimental:

Problema
Transporte Citoplasma – Núcleo
Hipótesis
La señal para importar una proteína está en la proteína.
Modelo experimental
Trabajaremos con células de mamífero, microinyectadas con nucleoplasmina marcada fluorescente

Se observa entonces que la nucleoplasmina marcada ha entrado en el núcleo. Se podría considerar entonces que el experimento ha sido un éxito, ya que la proteína ha hecho lo que debía hacer, pero se ha de considerar que al microinyectar la nucleoplasmina se podría haber dañado la membrana nuclear, por lo que se ha de inyectar otra proteína marcada, pero que permanezca en el citosol. Si esa proteína permanece en el citosol, entonces se habrá comprobado que la membrana nuclear está entera.

Actualmente no se purifica la proteína a partir de células, sino que se trabaja a partir de sistemas procariotas, donde se inserta el gen de la proteína que queremos, detrás de alguna otra proteína de la célula procariota, de manera que la célula procariota sintetice nuestra proteína. Una vez sintetizada, tendremos una proteína híbrida, con una parte del gen de la célula procariota y la otra parte, nuestra proteína. Ahora sólo tendremos que separar ambas partes, fácilmente.

Mediante ingeniería genética podemos crear proteínas a las que les falte alguna parte de la cadena, ya sea el extremo amino o el carboxilo. Se continuó el trabajo anterior, de la nucleoplasmina, tratando de averiguar donde estaba la señal de entrada al núcleo. Para eso se extrajeron los extremos de la nucleoplasmina, y se observó su reacción en las condiciones anteriores:

NP – C-Ter Citosol → Citosol
NP – N-Ter Citosol → Núcleo

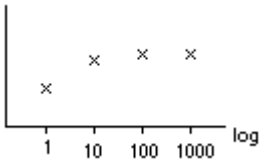
Se observó por lo tanto, que a las proteínas a las que se les extraía el extremo C terminal, perdían su capacidad de entrar en el núcleo. Es necesaria por lo tanto una señal situada en el extremo C terminal, en este caso.

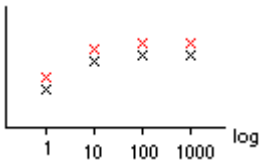
Pero se tenía que demostrar que no era únicamente necesaria esa señal, sino que era suficiente, para lo que se necesitaba usar una proteína citoplasmática, a la que se le insertase esa región.

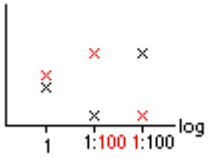
X+(C-Ter(NP)) Citosol → Núcleo

En el extremo C terminal de la NP encontramos la secuencia NLS o Nuclear Localization Signal. Esta señal está situada en el extremo C terminal. No existe una secuencia de aminoácidos consenso para esta señal. Es suficiente una sola copia por complejo para que todo un complejo multiproteico entre en el núcleo.

Sabemos por lo tanto que existe señal, por lo tanto hemos de saber si existe un receptor para la NLS. La forma de saber si existe un receptor es la de intentar saturarlo, poniendo tantas moléculas hasta que llegado a un punto, la tasa de entrada en el núcleo no pueda seguir aumentando, ya que habrá una limitación física. Tal y como se observa en la gráfica de la derecha, con concentraciones superiores a 10 casi no aumenta. Se trabaja entonces con 2 proteínas, de manera independiente, en lugar de una, con lo que los resultados son los de la tabla de la izquierda. Se podría suponer que la entrada de las proteínas se da de manera independiente, por 2 receptores, de manera que cada una irá por su cuenta. Mediante el siguiente experimento se demostró lo contrario. En este experimento se inyectaron a la vez ambas proteínas, con lo que se observa que existe competencia entre ellas, de manera que siempre entrará más rápido en el núcleo la que esté más concentrada. La entrada no es dependiente de la proteínas, ya que siempre entra la que está a mayor concentración. Es muy probable que exista un receptor para la NLS.



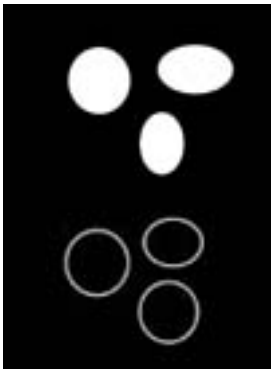




El siguiente paso es, obviamente, localizar e identificar el receptor de la NLS. En primer lugar se permeabilizó la célula con digitonina, de manera que se eliminó la parte soluble de la célula. En este modelo se empleó:

Células permeabilizadas con digitonina
ATP
Nucleoplasmina marcada
Extracto de citoplasma de oocitos de *Xenopus*

Pasado un tiempo, se observó todo esto mediante un microscopio de fluorescencia confocal. Para evitar que el citosol de la célula la abandone, se pone la célula en una solución extracto de ooctios de *Xenopus*. Mediante este sistema se podrá mantener las células vivas durante unas 12 horas. El uso de la microscopia de fluorescencia confocal permitirá ver si el marcaje está situado en el interior del núcleo, o bien si está situado periféricamente a este, ya que con un microscopio normal no se podría observar. El microscopio de fluorescencia confocal permite obtener secciones muy finas de la célula. Si se trata del marcaje en el interior del núcleo se observaba como la figura superior, mientras que el marcaje periférico era similar a la figura de abajo.



Cuando empleaban todos los materiales necesarios, la nucleoplasmina entraba en el núcleo, mientras que si trabajaban sin ATP, el marcaje quedaba de manera periférica, se trataba por lo tanto de transporte activo.

El siguiente paso fue el trabajar con fracciones de oocitos de *Xenopus*, para tratar de identificar algún elemento necesario para el transporte. Usaron 2 fracciones, la A y la B, que eran complementarias, con los siguientes resultados:

Sistema + Fracción A

Sistema + Fracción B No había señal

Sistema + Fracción A + Fracción B

Mediante la tercera prueba se demostraba que no se había dañado ningún componente al hacer el fraccionamiento.

En resumen:

Sistema + Extracto de oocitos

Sistema + Extracto de oocitos – ATP

Sistema + Fracción A

Sistema + Fracción B No hay señal

Sistema + Fracción A + Fracción B

Cuando quitamos ATP demostramos que existen 2 fases en el transporte, una independiente de ATP, mientras que la otra es ATP dependiente. Se supone por lo tanto que existen 2 elementos esenciales para el transporte, uno en la fracción A y otro en la B, para lo que se hace el siguiente experimento.

Sistema + Fracción A /Lavado/ Fracción B

Sistema + Fracción B /Lavado/ Fracción A No hay señal

En primer lugar actuaba el componente de A, y después lo hacía el que estaba en B. Gracias a todo esto se consiguió aislar 2 proteínas:

Importina (60 Kda)
Ran

La acción de la importina es independiente de ATP, y su función es unir la nucleoplasmina a la membrana nuclear. Si se eliminan los 100 últimos residuos del extremo carboxiterminal de la nucleoplasmina, no se formará la unión a la importina, ya que la señal está ahí.

Si ponemos nucleoplasmina no marcada en alta concentración y nucleoplasmina marcada en menor concentración, no habrá señal en el núcleo, ya que habrá competencia y ganará la no marcada. Se han hecho muchos experimentos con BSA, para estudiar mejor este transporte. Si ponemos el sistema completo, con nucleoplasmina marcada y BSA al que se le ha introducido la secuencia NLS de la nucleoplasmina, peor en mayor concentración, no habrá señal, ya que existirá competencia y ganará BSA, ya que está en mayor concentración.

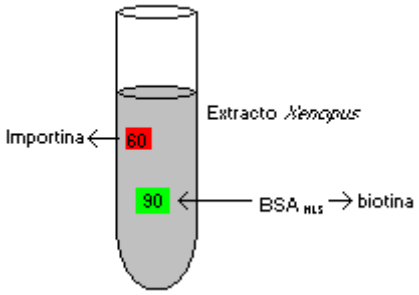
Se han hecho experimentos con BSA, al que se la ha agregado la secuencia NLS invertida, y se ha observado la señal de la nucleoplasmina, porque la BSA no compite con la NP, pese a tener la secuencia de aminoácidos. De aquí se deduce que la importina es seguramente el receptor.

El siguiente paso es aislar el cDNA de la importina, para, mediante técnicas de DNA recombinante, producirlo en bacterias. Después se puede comparar la importina natural con la producida en bacterias, y se observan los siguientes resultados:

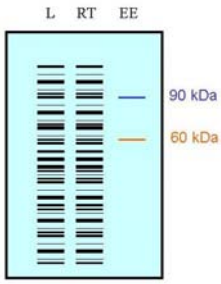
1	+ Ran	no hay
2	+ Ran + 30 microg/mL importina recombinante	20
3	+ Ran + 100 microg/mL importina recombinante	53
4	+ Ran + 250 microg/mL importina recombinante	69
5	+ Ran + 30 microg/mL importina nativa	39
6	+ Ran + 100 microg/mL importina nativa	69
7	+ Citosol completo (30 microg/mL importina nativa)	100
8	+ Citosol empobrecido (2,5 microg/mL importina nativa)	12
9	+ Citosol empobrecido + 30 microg/mL importina recombinante	132
10	+ Citosol empobrecido + 100 microg/mL importina recombinante	273
11	+ Citosol empobrecido + 250 microg/mL importina recombinante	410
12	+ Citosol empobrecido + 30 microg/mL importina nativa	116
13	+ Citosol empobrecido + 100 microg/mL importina nativa	298

De esta tabla se puede deducir que la importina natural es aproximadamente 2 veces más eficiente que la importina recombinante. Una proteína producida en bacterias podrá ser igual o menos eficiente que una natural, en función de si requiere o no modificaciones posttraduccionales, que en muchos casos no podrá hacer la bacteria. En los citosoles empobrecidos se ha provocado la inmunoprecipitación de la importina. En esta tabla se observa también que en el citosol hay elementos que aumentan la efectividad de la importina, tal y como se ve en los casos 5 y 12. No se trata de elementos críticos, sino que únicamente aumentan la efectividad de la proteína.

Se hizo un nuevo experimento, que se publicó al año siguiente:



Se puso, en extracto de Xenopus, importina, y otra proteína de peso molecular de 90Kda. Se añadía entonces BSA_{NLS}. Se marcó BSA con biotina que tiene un elevado índice de afinidad por la streptamidina. Se hacía pasar la solución por un tubo que contenía esa sustancia, para que el BSA se quedase enganchado, y después se hacía un gel con el eluido específico (EE), lo que se quedaba enganchado; lo que pasaba a través del tubo (RT) y una alícuota del tubo original (L). Observamos que en el gel también aparece, junto a la banda de 60, la banda de 90. Por lo tanto existen diferentes posibilidades. Por un lado, es posible que la BSA se uniese a ambas proteínas, de manera indiferente, pero también es posible que 60 y 90 estuviesen unidas. Se esperaría que sólo estuviese la de 60. Para poder saber cual de los dos casos es, se puede hacer lo mismo, pero sin poner importina en el tubo, lo que hará que la marca de 90 sea casi nula. Si ponemos importina recombinante veremos que sí está la marca de 90. Eso demuestra que es el modelo en que 60 y 90 están unidas.



Se ha identificado por lo tanto un receptor para la NLS, pero no todas las proteínas que entran en el núcleo pasa por la importina. Se sabe que existen otros mecanismos que intervienen en la entrada de proteínas al núcleo. La más conocida es la familia de las hnRNP. Dentro de este grupo podemos distinguir entre:

c_1, c_2, u: Reconocen la señal NLS
A_1: Reconoce la señal M_9
A_2
K: reconoce la señal kNS

Las secuencias M_9 y kNS son señales de entrada o salida del núcleo. Se las conoce como señales shuttling, ya que la misma señal determina la entrada y la salida.

M_9

Son 38 AA en el extremo C terminal. No son básicos. Si destruimos o afectamos de alguna manera a alguno de los 38 AA, esto repercutirá en la entrada como en la salida del núcleo. Se conoce el receptor, que es homólogo a la importina y tienen los mismos requerimientos. Es la transportina.

En resumen, hay 6 mecanismos de entrada al núcleo:

Pasivo 22 Kda fibrilar / 40 Kda globulares
Activo ATP / GTP
Ha de existir una señal. Citoplasma → Núcleo
NLS
Receptor de NLS: importina de 60 Kda y un factor no crítico en importina 90Kda
Citoplasma ⇔ Núcleo
A_1: M_9
Receptor de M_9: Transportina, se desconoce si requiere cofactores
K: kNS
Tep
Helicasa

TRANSPORTE NÚCLEO – CITOPLASMA

Puede ser activo o pasivo. El activo es dependiente de ATP o GTP. El transporte de RNA siempre se da de manera activa. El transporte pasivo se da igual que el transporte hacia el interior del núcleo, con las mismas limitaciones de 22 Kda en proteínas fibrilares y 40 Kda en las globulares. Distinguimos 2 tipos de señales:

NES: Nuclear export sequence	Son las encargadas de exportar proteína. Si se provoca una mutación, la proteína permanecerá en el núcleo.
NRS: Nuclear retention signal	Son secuencias que mantienen a las proteínas en el núcleo. Si se provoca una mutación, la proteína será expulsada.

Tanto el RNAm como el RNAt se sacan del núcleo unidos a proteínas, mientras que el RNAr se extrae ya formando parte de los ribosomas. Cada tipo de RNA tiene un método para salir del núcleo, no compiten entre si para salir. De hecho, la señal que provoca la salida del núcleo no está en el RNA, sino en la proteína a la que se une.

Para atacar patógenos, se buscan dianas adecuadas, que no sea compartidas por el paciente y el patógeno, de manera que se pueda atacar sólo al patógeno. En el caso de HIV-1, un ejemplo sería la transcriptasa inversa. Otra posible diana terapéutica sería Rev. Rev es una proteína nuclear, implicada en el proceso de salida de los transcritos virales. Posee puntos de unión a RNA y RRE, Rev response element. Además tiene una señal NES, de mucha efectividad.

Ran es una proteína crítica en lo que se refiere a la entrada de elementos al núcleo, tal y como ya se vio anteriormente. Forma parte de una familia, las smGTPases, o GTPasas pequeñas. Son diferentes GTPasas heterotriméricas. La función es aproximadamente la misma en todos los casos, pero en diferente sustrato. Se unen a complejos proteicos y los mantienen unidos. Su función dependerá de si están unidos o no a GTP, es decir, si están unidos a GTP realizarán su función. Este proceso está regulado por varios enzimas, uno de los cuales es el encargado de sustituir GDP por GTP.

PROTEÍNAS CITOSÓLICAS

Un proteína alcanzará una conformación determinada, en función de las modificaciones a las que se vea sometida y el medio en que este. Para que una secuencia polipeptídica alcance su correcta conformación, habrá dos procesos básicos:

Modificaciones posttraduccionales
Acción de chaperonas (hsp)

Si no se produce un correcto plegamiento, la proteína será degradada, al igual que lo será una vez acabe su vida. La vida media de cada proteína varía en función de la proteína.

Modificaciones posttraduccionales

Se conocen más de 100. Es un proceso enzimático que tiene como resultado la modificación de la proteína.

Glucosilación

Se añaden glúcidos de manera secuencial. En el RER se dan glucosilaciones en grupo. En el citosol se dan ortoglucosilaciones, en residuos de Thr o Ser. La glucosilación juega un importante papel para el correcto plegamiento de la proteína, ya que los glúcidos restringen las capacidades de plegamiento de la proteína, favoreciendo así la correcta. Es un proceso irreversible.

Incorporación covalente de coenzimas

Se trata de un proceso irreversible. Entre los coenzimas que se pueden incorporar destaca la biotina,...

Procesos reversibles

Existen muchos procesos de modificaciones que son reversibles, como las fosforilaciones, metilaciones o acetilaciones. Son procesos muy específicos, que están regulado por enzimas muy controlados.

Adición de ácidos grasos

Es un proceso reversible.

Se ha de distinguir entre protooncogen y oncogen. No son lo mismo. Los resultados de los protooncogenes suelen ser o bien citosólicos, o bien nucleares, en forma de factores de transcripción. Los protooncogenes expresan proteínas normales pare el funcionamiento de la célula, pero si se da una mutación en alguno de estos genes, aumentarían las probabilidades de padecer un tumor. Uno de estos protooncogenes es ras, que es una proteína unida a la cola citoplasmática de algunos receptores. Oscila entre la unión al receptor y un estado libre en el citosol. Esto se da gracias a la adición de algún ácido graso, que suele ser ácido palmítico. Si se da alguna mutación ras pasará a ser un oncogen, ya que perderá su capacidad de unirse o no al receptor. Por lo tanto ras es un protooncogen.

Acción de chaperonas

En el proceso de plegamiento, las proteínas pueden alcanzar estados metaestables, que podrán requerir de cierta energía para superarlos. Esta es la misión de las chaperonas, que son ATPasas. Su sustrato son proteínas mal plegadas, y como producto tienen proteínas totalmente desplegadas. Todas las chaperonas citosólicas son hsp, heat shock proteins. Se trata de un conjunto de proteínas que se sobreexpresan en células cometidas a estrés térmico. Al calentar las células, se desnaturalizarán las proteínas, por lo que será necesaria una mayor cantidad de hsp para volver a plegarlas a su estado correcto. Si la proteína consigue alcanzar su estado plegado correcto, funcionará correctamente durante toda su vida media.

Determinación de la vida media

Se puede emplear una aproximación bioinformática. Ya sea partiendo de DNA o de proteínas, se pueden consultar diferentes bases de datos, como el GeneBank, o el EMBLDatabank, o el PDB, protein data bank. Se observa que hay una serie de aminoácidos más frecuentes, en el extremo Nter, como Met, Ala, Ser o Thr, mientras que otros como Glu o Gln son más infrecuentes. Estos últimos se consideran aminoácidos desestabilizantes, ya que se ha observado que si a una proteína se le añade uno de estos aminoácidos, su vida se acorta.

Por lo tanto, existen una serie de factores:

1. Si existe una serie de aminoácidos desestabilizantes en el extremo N – terminal.
2. Si existe una secuencia interna accesible, que se conoce como la caja de destrucción de las ciclinas (RXALGXIXN). Provoca la degradación de la proteína en minutos. Algunas de las proteínas que la presentan son las ciclinas, que están involucradas en el ciclo celular, y tienen una vida muy corta.

La degradación de las proteínas se da en las estructuras conocidas como proteosomas. Las proteínas que tienen que pasar por esta estructura e marcan mediante la ubicuitina ligasa, que les añade varias moléculas de ubicuitina. En el proteosoma transformarán la proteína en aminoácidos libres o el péptidos cortos.

DEGRADACIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN EL CITOSOL

La ubicuitina está formada por 76 aminoácidos. Se une a las proteínas que deben ser degradadas mediante un enzima, la ubicuitina ligasa, que consta de 3 subunidades: E_1, E_2, y E_3. El proteosoma tiene dos estados, el 20 s y el 26 s. Tiene función proteolítica, al estar formado por proteasas.

$$E_1 + ATP + Ubic \longrightarrow E_1 - Ubic + ADP + Pi$$
$$E_1 - Ubic + E_2 \longrightarrow E_1 + E_2 - Ubic$$
$$X + E_3 + E_2 - Ubic \longrightarrow E_2 + E_3 + X - Ubic$$

E_1 actúa como activador, E_2 actúa como transportador, mientras que E_3 es un enzima de reconocimiento de sustrato. La ubicuitina se une a nivel de una cisteína. Este ciclo se repite unas cuantas veces. Se supone que hay diferentes E_3, ya que puede haber diferentes sustratos. Mediante estudios vía bioinformática se ha observado que hay 13 o 15. El marcaje de ubicuitina para degradar una proteína ha de ser de más de una ubicuitina.

Proteosoma

Tiene un peso molecular de entre 2000 y 3000 Da. Su estructura es en forma de anillo. Es bastante abundante, pudiendo llegar a ser hasta el 1% de la proteína total de la célula. Consta de 2 subunidades.

La unidad central es en forma de 4 anillos. Tiene 6 dominios diferentes:

2 quimiotripsina like
2 tripsina like
2 caspasa like

Tienen además unidades reguladoras, que poseen dominios de reconocimiento del sustrato, de desplegamiento de la proteína y un dominio para despoliubicuitinizar.

Podemos encontrar proteosomas tanto en el citosol como en el núcleo. El lisosoma sólo se encarga de entre el 10 y el 18 % de la degradación proteolítica de la célula. Si se produjese un acumulamiento de proteínas en el RE, se generaría una respuesta de estrés en la célula que provocaría la degradación de estas proteínas en proteosomas.

Existen sustancias inhibidoras de la función del proteosoma, como el MG13. Existe un factor, el mediador de la inflamación, que está activado principalmente por el TNF_{α}. Este factor está unido a una proteína que se poliubicuitinizará cuando la célula reciba la señal, con lo que se activará el factor.

El caso del papilomavirus de DNA es diferente. Este virus induce la formación de tumores. Existe una proteína en la cápsula, la E6, cuyo primer AA es desestabilizante. Tiene además una elevada afinidad por p53, que es un antioncogen. Por lo tanto, se poliubicuitinizará esta proteína, pero no podrá sino que reconocerá una cisteína de p53, por lo que el proteosoma degradará a p53 y E6 quedará libre.

SÍNTESIS Y TRANSLOCACIÓN DE PROTEÍNAS

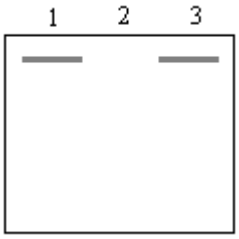
Existen diferentes tipos de síntesis proteica. Por un lado, se puede dar síntesis en el citosol, mientras que por otro se puede dar síntesis de manera conjunta al RE. En realidad, cuando al sintetizar una proteína en el citosol aparece un péptido señal, se continuará la síntesis de manera anexa al RE. La hipótesis del péptido señal la propuso Dobberstein hará unos 20 años. Se basó en unos experimentos de síntesis in vitro de Ig. Las proteínas sintetizadas in vitro se desplazaban de manera diferente en el gel, siendo menos veloces. Se supuso entonces que debían sufrir algún tipo de modificación posterior a la traducción.

Existe una señal que determina la entrada de una proteína en la ruta de secreción. Cuando al sintetizar la proteína entra el péptido señal y pocos aminoácidos más en el RER, se elimina la señal, en un proceso cotraduccional.

El reconocimiento inicial del péptido señal se da por la SRP, signal recognition particle. Esta partícula está compuesta por RNA y proteínas. Tiene la capacidad de reconocer el péptido señal y detener la síntesis de la proteína. La existencia del SRP se demostró mediante la producción in vitro, simulando las condiciones del RER. Emplearemos microsomas rugosos, que se obtiene mediante homogeneización y posterior centrifugación en gradiente de densidad.

Colocamos los microsomas rugosos en una solución con ribosomas libres y todo lo que se requiere para un sistema de traducción in vitro, como mRNA, ATP, buffer, tRNA-AA, factores y Met-S^{35}-tRNA. Ponemos los ribosomas libres para que cojan más rápido el mensajero y lo traduzcan y no tengamos que esperar a que los ribosomas unidos al microsoma acaben la síntesis que estaban realizando, ya que si están unidos al microsoma es que estaban traduciendo.

Obtendremos un gel en el que no podremos distinguir si la proteína está situada dentro o fuera del microsoma. Para poder distinguir, si está en el interior o es soluble o está unida a la vesícula, podremos añadir a la solución una proteasa, que sólo podrá degradar la proteína si ésta es accesible para ella, por lo que si está en el interior del microsoma, podremos observar la señal en la autorradiografía. También haremos un control con la proteinaza K y un detergente para permeabilizar la membrana, de manera que si aparece señal la proteinaza no era activa. A la derecha se muestran los resultados de los siguientes experimentos. En 1 tenemos el resultado del experimento anterior, con microsomas rugosos, momento en que aparece la banda, ya que ha habido síntesis proteica y se ha translocado la proteína resultante al interior de la vesícula, donde será inaccesible para la proteinaza. En 2 se emplean microsomas rugosos, pero que se han lavado. En este caso no aparece nada, por lo que en el lavado se ha de haber eliminado alguna sustancia importante para la translocación. En 3 se han empleado microsomas similares a 2, pero que se han incubado con la solución de salino resultante del lavado. En esta caso aparece la banda, por lo que ha de tratarse de alguna partícula soluble.



De la solución de salino se pudo aislar la SRP, receptor de la secuencia señal de la proteína, que provoca que se continúe la síntesis en el microsoma. Se trata de un receptor de unión débil al RER.

SRP

Contiene RNA, de filamento único, que contiene regiones antiparalelas, por lo que se forma un doble filamento, al que se asocian 6 proteínas. Cuando el péptido señal sale por la superficie del ribosoma, SRP lo detecta, y la síntesis se detiene hasta que SRP se une a él. Finalmente SRP se separa, y el ribosoma libre se une al elemento de translocación. SRP es dependiente de GTP. La entrada de proteínas al RER es por lo tanto dependiente de GTP y de su hidrólisis. GTP es necesario para que se de la unión al translocador del ribosoma, a la vez que es necesaria su hidrólisis para que se libere de nuevo. Existe una proteína, la DP, docking protein, que es la receptora de SRP. Un tipo de DP es la que se conoce como sec61. Para estudiar estas proteínas se trabajaba con mutantes de levaduras, que tenían afectada la vía de síntesis de las proteínas.

Mediante cultivo de diferentes levaduras, se identificaron 79 grupos de complementación entre ellas, con lo que existen 79 fases o elementos críticos en la secreción. Dependiendo del grupo de complementación al que pertenezcan, recibirán un número u otro, que dependerá de la proteína que impida el correcto funcionamiento. De manera que la sec61 es la proteína de translocación de la proteína del ribosoma al RER. El 99% de las proteínas de la célula usan esta vía.

En lavaduras se ha observado que existe un profactor α, que no posee péptido señal, pero que, no obstante, entra en el RER, no siendo dependiente de SRP, sino de sec61, 62 y 63.

La hsp70, una chaperona, se une al RER por los receptores sec61 y 63. Esta chaperona despliega la proteína sintetizada en el citoplasma, y la inyecta en el canal para que entre en el RER. Es la vía de entrada a cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas. Se trata no obstante de una vía poco efectiva.

En bacterias, al igual que en mitocondrias y cloroplastos, existen remanentes de las proteínas sec62 y sec63, por lo que la aparición de la sec61 es posterior.

A nivel de retículo endoplasmático existen otros procesos:

Síntesis de proteínas de secreción
Eliminación del péptido señal, de manera cotraduccional.
Glucosilación: N – Glucosilación en residuos de Asn
Modificaciones posteriores: Eliminación terminal de glucosa
Formación de puentes disulfuro
Plegamiento mediante chaperonas BiP / GRA78 y Calnexina / Calreticulina
Oligomerización

La eliminación del péptido señal se da de manera cotraduccional en cuanto es posible. En cuanto han entrado pocos aminoácidos más que el péptido señal, se elimina este mediante la peptidasa señal. Este proceso se da en la mayoría de los casos, con algunas excepciones, como la ovoalbúmina.

La N – glucosilación se da sólo si en la proteína existe una determinada secuencia de aminoácidos, Asn – X – Thr o Asn – X – Ser. Un enzima reconoce esta señal, añade a la proteína, en el residuo de Asn un dolicol fosfato, un fosfolípido con abundantes hexosas saliendo de él, dispuestas de una manera ramificada. El dolicol fosfato se forma en la cara citosólica del RE, de manera progresiva, mediante adición de las hexosas. La entrada al interior del RE se da mediante el movimiento más improbable de los fosfolípidos de una membrana, el Flip – Flop, mediado por un enzima conocido como flipasa. Este movimiento invierte los fosfolípidos del exterior al interior. Sin embargo, en el complejo de Golgi, se procesarán de manera diferente las proteínas, dependiendo de la proteína. En el RE, todas las proteínas que se glucosilan, lo hacen de la misma manera.

También en el retículo endoplasmático se da la eliminación de las 3 glucosas terminales del dolicol fosfato, mediante 3 glucosidasas. La eliminación de la última glucosa es reversible, con lo que está relacionado con los procesos de regulación.

El objetivo del RE es que las proteínas este correctamente plegadas, por lo que actúa como control de calidad, mediante las chaperonas situadas en su interior. Estos procesos están relacionados con la calnexina y la calreticulina. Estas proteínas tienen actividad chaperona, así como actividad lectina, por lo que pueden reconocer las glucosas a las que está unida la proteína. Existen en el retículo chaperonas con funcionas más amplias como BiP.

La formación de puentes disulfuro se da exclusivamente en el RER ya que en él se dan las condiciones adecuadas, y además, es el único sitio donde se puede encontrar la disulfuro isomerasa.

Si la proteína no se pliega correctamente entrará en la vía de degradación. Podemos actuar sobre las proteínas, influyendo sobre su plegamiento, como por ejemplo, actuando sobre la glucosilación. Otra posibilidad radica en el empleo de DTT, que inhibe la acción de la disulfuro isomerasa. Si la síntesis de proteínas no funciona, se acumularán proteínas en el RE, lo que inducirá que se produzca la expresión de una serie de genes en el núcleo. Existe un receptor de la acumulación, situado posiblemente en la membrana nuclear interna. Como resultado de la acumulación, se sintetizarán proteínas del proteosoma y chaperonas, que se dirigirán al RE. Se cree que un posible funcionamiento del receptor estaría basado en el hecho de que normalmente hay pocas proteínas mal plegadas, lo que provoca que haya chaperonas libres, que se unen al receptor, con lo que impiden su funcionamiento. Cuando no haya chaperonas libres, se formará un dímero en el receptor, con lo que actuará sobre el núcleo. El receptor actúa favoreciendo el splicing de un gen que saldrá del núcleo para sintetizar un factor de transcripción, que volverá al núcleo, donde provocará la expresión de los otros genes. Como respuesta al estrés por la acumulación de proteínas, se sintetizarán chaperonas y proteínas del proteosoma. Pero las proteínas que no se plieguen correctamente deberán ser degradadas por el proteosoma, para lo que deberán salir del RE, ya que el proteosoma no puede entrar.

Para estudiar estos procesos de degradación, se ha estudiado el ciclo normal de la proteína CFTR, que puede verse afectada por una mutación, que puede provocar una fibrosis quística. Se ve afectado el residuo 508, Met. La proteína no llega a plegarse correctamente, por lo que no sale del RE. Se ha observado, que en células transfectadas se va degradando la proteína, de manera dependiente de proteosoma. El proteosoma podría actuar sobre la región externa de la proteína, pero la proteína deberá ser poliubicuitinizada para que este proceso funcione. Para estudiar este proceso, se emplean dominants negativos de Ub, añadiendo Ub que carecen del punto donde se une la otra Ub, de manera que no se podrá dar la poli – Ub, con lo que no habrá degradación. El problema es que las proteínas situadas en el RE también son degradadas por proteosomas. Cuando se produce la síntesis, el extremo C – Terminal no abandona la proteína sec61, de manera que si las chaperonas no pueden plegarla correctamente, la volverán a enviar al citosol por el mismo camino. En el citosol será recogida por chaperonas de la familia de las hsp, asociadas al sistema de poli – Ub, que provocarán su degradación en el proteosoma. Se trata de un modelo, no están demostrados todos los pasos.

COMPLEJO DE GOLGI

Los primeros trabajos para intentar describir el transporte intracelular de proteínas fueron realizados por Caro y colaboradores, pero eran poco resolutivos, ya que se empleaban animales enteros, lo que impedía usar tiempos cortos. Más adelante, en 1975, Palade hizo novedosas aportaciones, al emplear discos de tejido a los que se exponía a trazadores radiactivos. Realizó es estudio sobre la secreción de proteínas en el páncreas exocrino de conejo de indias.

Después de realizar un seguimiento del marcaje después de pulsos cortos, concluye que existen 6 etapas en el proceso.

1. Síntesis: correspondería a la síntesis de proteínas en el retículo endoplasmático
2. Segregación: correspondería a la translocación de proteínas en el retículo endoplasmático, que hoy se sabe que es cotraduccional
3. Transporte intracelular: desde el retículo endoplasmático, más concretamente desde los elementos transicionales del RER, al Golgi y, de allí, hasta las vesículas de secreción
4. Concentración: que tiene lugar en las vesículas de secreción. Lo determina por la mayor densidad de señal autorradiográfica
5. Almacenamiento intracelular: se trata de vesículas de secreción regulada.
6. Descarga: inducida o regulada por mensajeros extracelulares vía un mensajero intracelular, y que supone la fusión a la membrana de la vesícula de secreción, de forma que se libera al exterior el producto, manteniendo la integridad de la membrana. Este proceso se denomina exocitosis

Palade planteó ya las dos posibilidades:

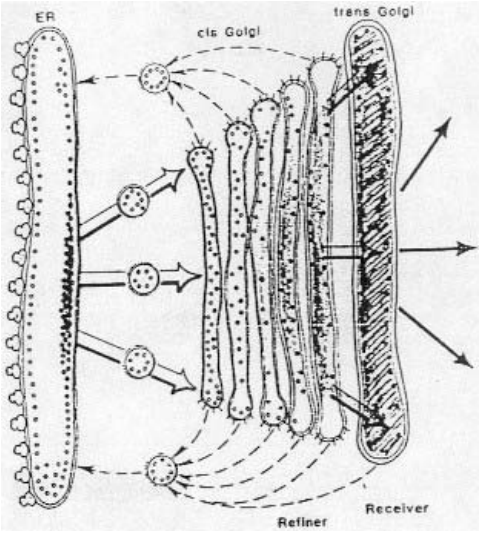
Los diferentes compartimentos en una célula están físicamente unidos por un sistema tubular
Los diferentes compartimentos están conectados vía tráfico vesicular que actúa a modo de lanzadera

El complejo de Golgi fue descrito por Camilo Golgi en 1898. Durante los 70 – 80 años posteriores, fue considerado un órgano celular de naturaleza y función misteriosa. Es a partir del estudio de las funciones biosintéticas en los últimos años en los que se profundiza en su función en el tráfico celular.

ESTRUCTURA DEL COMPLEJO DE GOLGI

El complejo de Golgi se caracteriza por:

1. Estar formado por unos acúmulos de 3 – 8 cisternas planas, que forman los denominados dictiosomas, que se presentan en número variable dependiendo del estado celular y el tipo celular.
2. Su heterogeneidad de composición. Actualmente sabemos que las proteínas residentes, especialmente los enzimas detectados por enzimo – citoquímica o inmunolocalización, no son los mismos en las diferentes cisternas del dictiosoma.
3. La polaridad. Una de sus caras, la llamada cis se dirige hacia el retículo endoplasmático, mientras que la cara trans se dirige a las vesículas de secreción y los centríolos.



En la cara cis se reciben las vesículas que transportan las proteínas procedentes del retículo endoplasmático, mientras que en la cara trans se liberan las vesículas que se fundirán para dar lugar a las vesículas de secreción o bien se dirigirán al lisosoma.

FUNCIONES DEL COMPLEJO DE GOLGI

Las funciones del complejo de Golgi son fundamentalmente la modificación secuencial de los sustratos de transporte y su distribución. Los avances en la comprensión del Golgi proceden fundamentalmente de la existencia de una serie de modelos para su estudio:

- Sistemas libres de células, como los desarrollados por Balch et al. Se empleaban mutantes defectivos en actividades propias de la cisterna media y trans.
- Uso de drogas que bloquean el transporte en el complejo de Golgi, como son la monensina (ionóforo carboxílico) que equilibra el gradiente Na^+/K^+, y provoca la detención del transporte en el complejo, o la colchicina, que desorganiza los microtúbulos, su efecto es posterior, porque el transporte dentro del Golgi es independiente de microtúbulos.
- Inmunocitoquímica para la detección de los marcadores en sus compartimentos.
- Seguimiento del procesamiento por los productos modificados en la vía de secreción, como por ejemplo el experimento de la catepsina – D KDEL (endoH / fosfatasa alcalina)

Así se sabe que existe una distribución de proteínas y de funciones de modificación posttraduccional diferentes entre RE y Golgi, y que la distribución en el espacio es un reflejo de las etapas de la síntesis. En el complejo de Golgi se realizan las siguientes modificaciones covalentes de las proteínas que lo atraviesan:

- Proteolisis: Muchas proteínas de secreción son proteolizadas durante su paso a través del Complejo de Golgi, como por ejemplo la proalbúmina, glucoproteínas "spike" de al cubierta de algunos virus,... Este proceso está catalizado por proteasas desconocidas en la mayoría de los casos. Podría tratarse de situaciones de cotransporte: sustrato + proteasa. Parece que una correcta proteolísis no es requisito para el correcto transporte.
- Iniciación y elongación de oligosacáridos ricos en xilosa. Característico de heparinas, condroitín sulfato y dermatán sulfato. Se trata del oligosacárido Xyl – Gal – Gal – GlucUA, ligado a múltiples serinas de una proteína "core". Se han aislado las 4 transferasas y existen evidencias de que se encuentran juntas. Algunos de los productos de este proceso de síntesis son de gran tamaño, como es el caso del monómero de cartílago proteoglucano, que dispone de una proteína "core" de unos 300 nm de longitud y unas 80 cadenas laterales, cada una de unos 100 residuos. El ácido hialurónico carece de "core protein". Este proceso queda afectado por monensina, por reducción de pools de ATP, fosfoadenosina y fosfosulfato.

- Modificación de los oligosacáridos ligados a Asn. La modificación del oligosacárido ligado a Asn se ha dilucidado completamente en 3 modelos diferentes, como los siguientes:
    - Proteínas de secreción. Se producen modificaciones muy diversas, incluso difieren en los diversos N – glúcidos que puede presentar la misma proteína. En diferentes tejidos, la misma proteína puede sufrir diferentes modificaciones. Se cree que es debido a la competición entre transferasas de especialidades solapadas. Es un problema no resuelto.
    - Enzimas lisosomales. En todos los casos, las hidrolasas lisosomales siempre presentan manosa 6P como glúcido terminal en sus N glúcidos. En el síndrome de la célula I, la célula carece de N – acetil – glucosamina – fosfotransferasa y no se produce la adición de manosa 6P, como consecuencia de esto, la mayoría de los enzimas lisosomales son liberados por la célula.

- Adición de lípidos a las proteínas de membrana. Se han descrito numerosos casos de glucoproteínas que presentan unidos lípidos, aunque no es exclusivo de las que siguen la ruta de secreción. Este proceso se produce en la cisterna cis.

Este esquema ampliamente aceptado, no recoge respuestas a todas las preguntas que se hacen sobre el funcionamiento de la vía de secreción de las células.

TRANSPORTE DE PROTEÍNAS RER – GOLGI

Concretamente nos centraremos en el problema de cómo se seleccionan las proteínas que, que sintetizadas en el RER han de ser transportadas hacia el Golgi, donde, tras ser modificadas, permanecerán en algún compartimento, si son residentes en el Golgi, o serán transportadas a lisosomas o a vesículas de secreción. O, lo que es lo mismo, como el sistema de transporte sabe que proteínas han de abandonar el RE y cuales han de permanecer en él. Estudiaremos básicamente 2 aspectos del transporte de proteínas del RER al Golgi:

Etapas del transporte y sus características

Se trata de un transporte bloqueable por temperaturas inferiores a 15º C. Se trata de un tráfico vesicular, mediatizado por vesículas revestidas, no por clatrina. Entre las dos posibilidades, de tráfico tubular y de tráfico vesicular entre el RE y el Golgi, las evidencias se pueden agrupar en do tipos:

- Evidencia morfológico: Presencia de un gran número de vesículas de transporte en la cara cis del complejo de Golgi.
- Evidencia genética: Novick et al. Desarrollaron una estrategia para el aislamiento de mutantes de la vía de secreción de proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* sensibles a la temperatura. Después de mutagenización con etil – metasulfonato se crecen los cultivos a temperatura permisiva y después de aumentar notablemente la población se centrifugan en un gradiente de densidad. Las células que no pueden secretar las proteínas, las acumulan en el citoplasma, en vesículas membranosas, aumentando su densidad, por lo que son fácilmente diferenciables por gradiente de densidad.

Se han aislado de esta forma una serie de mutantes sensibles a la temperatura en levaduras deficientes en secreción, los mutantes sec. Novick et al identificaron 23 grupos de complementación. Actualmente se sabe que los mutantes que afectan al transporte entre el RER y el Golgi se pueden agrupar en dos grupos: aquellos implicados en la formación de vesículas y aquellos otros implicados en la fusión de dichas vesículas con la membranas diana. Asimismo se han identificado los genes BET, YPT1, SAR1 y ARF.

Sec 18 es homólogo a NSF, requerido para el transporte intra – Golgi, y se requiere para la correcta fusión de las vesículas del ER al Golgi. Para funcionar NSF requiere la presencia de un receptor, proteína integral de la membrana y una pequeña proteína soluble SNAP, de la que al menos es homóloga sec 17. Los productos sec 12, 13, 16 y 23 forman un grupo de proteínas requeridas para la formación de vesículas de ER a Golgi. Existen 3 líneas de evidencia.

- No forman vesículas de transporte en condiciones restrictivas.
- Los mutantes no forman vesículas intermediarias de transporte in vitro.
- Parejas de mutantes no son letales, lo que parece indicar una acción cooperativa.

Cuando las células de levaduras mutantes para genes importantes en la fusión vesicular se exponen a temperatura restrictiva, aparecen abundantes vesículas entre el RE y el Golgi. Balch en 1990 indicó que a pesar de que el papel exacto de los componentes requeridos en la fusión vesicular es desconocido, parece que como si tanto el transporte entre el RE y el Golgi como el transporte entre las cisternas del Golgi requiriera componentes similares. Sería una misma maquinaria molecular la responsable de la formación de vesículas y de la fusión entre los diferentes compartimentos de la vía exocítica.

También conocemos que existirían 2 tipos de partículas recubiertas en la vía endocítica: aquellas derivadas de endosomas, recubiertas de clatrina, y aquellas otras de transporte anterógrado en la vía que estarían recubiertas de otros componentes moleculares, entre los que cabe destacar la proteína COP.

Uno de los descubrimientos más importantes referidos al transporte entre RE y Golgi y a través del Golgi es el papel que juegan las proteínas “Ras related small GTP – binding proteins”, que son requeridas para la regulación de la vía exocítica a todos los niveles. En levaduras incluyen a las proteínas YPT1, ARF y SAR1, anteriormente citadas, todas ellas implicadas en el paso de RE a Golgi, y sec4, que está implicada en la fusión de membranas. En mamíferos estas proteínas incluyen miembros de la familia rab y posiblemente elementos homólogos a ARF y SAR1.

Se trata además de un tráfico sensible a ATP, calcio, GTP y N – etilmaleimida:

- Se requiere ATP para que se produzca el transporte
- Se requiere Calcio en el paso de RE a Golgi, y parece relacionado con la etapa de fusión de vesículas y con el papel de YPT1.
- Requiere GTP. Análogos de GTP como GTP – gamma – S, no hidrolizable, bloquean el transporte, lo que está en relación con las small GTP binding proteins.
- N – etilmaleimida. Tratamientos con Ac. anti – NSF, N – etilmaleimida sensitive factor, son capaces de bloquear el paso de RE a Golgi El tratamiento con N – etilmaleimida también inhibe el transporte.

Existe una droga que bloquea el transporte anterógradao del RE al Golgi. Se desconoce el funcionamiento de la brefeldina A, droga sintetizada por algunos hongos, derivada de ácido graso. La brefeldina desorganiza el Golgi, induciendo la rápida redistribución del Golgi en el RE, desapareciendo las estructuras reconocibles como Golgi e impidiendo el transporte de proteínas a cualquier compartimento post – Golgi. Se propone que podría actuar o bien por el bloqueo del movimiento anterógrado o por activación del movimiento retrógrado. Su eficacia a concentraciones de 10^{-8} M sugieren que la unión al receptor se produce con elevada afinidad. El efecto de la brefeldina es rápido, en 30 minutos, todo el marcador del cis – medio Golgi manosidasa II ha pasado a tener una distribución en el RE, así como otros marcadores trans como la galactosil transferasa. Para poder actuar, la brefeldina A depende de la disponibilidad de ATP. El efecto de la brefeldina A es dependiente también de Microtúbulos , ya que agentes disruptores de microtúbulos como el nocodazol destruyen la vía retrógrada, impidiendo la desorganización del Golgi. El mismo efecto producen los bloqueadores de la disponibilidad de energía como la azida sódica o la deoxi – d – glucosa. La desorganización es dependiente también de temperatura, de manera que a 16ºC, aún habiendo pasado 2 horas, la manosidasa dará señal en el Golgi.

El transporte anterógrado es independiente de microtúbulos. Se demostró que el movimiento anterógrado es independiente de MT, mediante el seguimiento de la señal de manosidasa II en células NRK tratadas con BfA durante 1h y dejadas en un medio libre de BfA con y sin nocodazol, inhibidor de la polimerización de tubulina. Se observó que el nocodazol no afectaba a la recuperación de la distribución normal del marcador de manosidasa II.

En resumen:

- Existe un transporte anterógrado en dos fases:
    - Paso a un compartimento intermedio. No se ve afectado por el bloque a 15ºC
    - Desde el compartimento intermedio al cis Golgi, bloqueable por temperatura.
- Existe un transporte retrógrado, posiblemente sea el mecanismo de recuperación de las proteínas que siendo residentes en el RER escapan de él. Es dependiente de MT.

Mecanismos de transporte y retención

El mecanismo de transporte ha de ser capaz de discernir entre las proteínas residentes en el RER y aquellas que pasarán al Golgi. Existen evidencias que las proteínas residentes en el RER no suelen alcanzar el Golgi, sino que son retenidas en el RER. Esto se basa en que:

- Nunca se han detectado en el Golgi.
- Las proteínas residentes en el RER no presentan modificaciones posttraduccionales que se realicen en el Golgi, como la por ejemplo las etapas posteriores de la maduración de las cadenas de glucopolisacáridos.

Esto conduce a la idea de que el transporte entre RER y Golgi es unidireccional y selectivo, por lo tanto, ha de existir un mecanismo capaz de seleccionar las proteínas que siguen hacia el Golgi y cuales no.

Existen 2 posibilidades básicas:

- Transporte selectivo. Implicaría que cada proteína es reconocida a lo largo de la vía por un receptor que le permite el paso a la siguiente etapa. La ausencia de reconocimiento supondrá la retención.
- Transporte masivo. Por el contrario, todas las proteínas seguirían un flujo masivo, excepto aquellas que fueran reconocidas como propias en el compartimento en el que son residentes. Según este modelo, el contenido de cada compartimento pasa al siguiente por defecto.

Algunos autores estiman que en el RER normal de una célula, sólo 1 de cada 1000 moléculas de proteína está destinada al transporte al Golgi, el resto son residentes en el RER. El proceso de selección de estas proteínas deber ser por lo tanto muy eficiente para poder mantener esta relación. Rothmann propuso la denomina hipótesis de "destilación", según la cual, el cis golgi actuaría como destilador, seleccionado las proteínas residentes en el RER, y devolviéndolas, dejando pasar al trans Golgi sólo las proteínas seleccionadas. Diversos autores han cuantificado los tiempos de residencia de las proteínas sintetizadas en el RER y observan que diferentes proteínas de secreción salen del RER a diferente velocidad.

Existe una secuencia, que provoca que la proteína que la presente quede retenida en el RE. Esta secuencia es la secuencia KDEL. Los receptores de KDEL están situados tanto en RE como en Golgi. Los receptores de KDEL están expresados en levaduras mediante el gen erd1.

MECANISMOS DE RETENCIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN EL GOLGI

Las proteínas residentes en el Golgi son de los tipos siguientes:

- Glucosidasas. Enzimas implicados en procesos de glucosilación. Todos los conocidos son de tipo II, transmembrana, con el dominio catalítico, C – terminal, en el lumen de la cisterna. Asociados con éstos se encuentran los transportadores de glúcidos del citosol al lumen.
- Proteínas del TGN. Proteínas para el procesamiento de prohormonas, como Kexp1, Kexp2,... son de tipo I. El enzima dipeptidilaminopeptidasa es de tipo II... Se propuso en un principio que las proteínas de tipo I iban al TGN y las de tipo II al Golgi, pero se incumple a medida que se van conociendo más secuencias.
- Proteínas virales. Algunos virus recubiertos presentan "budding" gracias a proteínas que son dirigidas a algún compartimento del Golgi. Cuando son recubiertas es posible que sigan la vía de secreción.

Han de existir señales de retención en el Golgi. Existen 4 modelos.

- Modelo I. Proteína E1 del coronavirus causante de la bronquitis infecciosa de las aves. Dirigido hacia el cis Golgi, presenta 3 dominios transmembrana de los cuales el primero es necesario y suficiente para retener la proteína en el cis Golgi. En el primer dominio transmembrana tiene 3 aminoácidos polares: Asn, Thr y Gln, que son críticos. Cualquier cambio provoca su secreción.. En este caso no se requiere la cola ni ningún otro dominio. Es de tipo I.
- Modelo II. La proteína M, equivalente a E1, del coronavirus murino es dirigida al trans Golgi. Requiere el dominio transmembrana, incapaz de retenerla en el cis Golgi. Es de tipo I.
- Modelo III. Retención de glucosiltransferasas, de tipo II. Confirma que son los dominios transmembrana los responsables de su direccionamiento, aunque en algunos casos parece existir requerimientos de zona no transmembrana.
- Modelo IV. TGN38, proteína transmembrana propia del TGN. Si se quita la cola citoplasmática se secreta. En la cola hay una señal Tyr, Tyr – Gln – Arg – Leu, similar a la de endocitosis de receptores de la membrana. Si se muta esta secuencia, la proteína va a membrana, pero se endocita. Las proteínas Kes1p, Kex2p y DPAP – A, proteasas de procesamiento, requieren de las colas citoplasmáticas para ser retenidas en el TGN.

Se trata de un mecanismo de retención no saturable. La hipótesis más aceptada es que las proteínas del Golgi, de las que no se conoce ninguna soluble en el lumen, formarían una estructura oligomérica incompatible con el transporte. La explicación más plausible sería que los dominios transmembrana serían los responsables de solubilizar las proteínas en aquellas cisternas cuyas membranas tuvieran el espesor y la composición apropiada. La disposición lateral de los dominios transmembrana permitiría la agregación y la formación de los oligómeros.

Anteriormente se ha hablado de proteínas de tipo I y de tipo II. Estas proteínas se diferencian por la posición de los extremos de la proteína. En las proteínas de tipo I, el extremo N – terminal está en el lumen, mientras que en la de tipo II está en el citosol.

Las secuencia intermembrana son básicas, pero se observa que los dominios transmembrana son diferentes, incluso en una misma cisterna. Lo único que tienen en común es la longitud en nm. Es como si el espesor de las diferentes membranas fuese diferente de cisterna a cisterna. La membrana son diferentes, ya que tienen una composición fosfolipídica diferente, por lo que tendrán diferente solubilidad, como ya se ha dicho.

LISOSOMAS

Vesícula con enzimas hidrolíticos activos, debido al pH ácido, a la que llegan sustratos por la vía endocítica. El pH ácido se origina por bombas transportadoras de H^+. Además habrá otros transportadores para sacar las moléculas más pequeñas del lisosoma. El tamaño del lisosoma varía entre 0,05 – 0,5 μm, dentro de una célula de entre 10 – 40 μm. El tamaño del lisosoma varía en función de lo que este degradando en su interior. Su forma también es muy variable. Son difíciles de identificar, a no ser que se vea el interior. Los enzimas del lisosoma vienen de la TGN.

El descubrimiento de los lisosomas es reciente, y se descubrieron por casualidad, mientras se estudiaba las fosfatasa ácida. En una célula normalmente se tenía que observar una actividad de x, pero había muestras que daban valores de 1000x. El origen de esta observación fue la elaboración de un tampón más diluido de lo normal, lo que provocó la rotura de las vesículas, con lo que se descubrieron los lisosomas.

Existen enfermedades genéticas lisosomales, que afectan a los genes que codifican los enzimas hidrolíticos del lisosoma. Suelen ser enfermedades recesivas no ligadas al sexo. Un ejemplo de estas enfermedades es la enfermedad de la célula I, I cell disease. Esta enfermedad afecta a todos los enzimas hdrolíticos, provocando además que haya lisosomas enormes, que no contienen hidrolasas solubles, ya que estas han sido vertidas al medio. El origen del problema es que los enzimas normales poseen una cadena glucosilada, acabada en manosa 6P, mientras que las células enfermas tienen la cadena acabada en manosa, ya que no pueden fosforilarla. Pese a lo que pudiese parecer, no está dañada ninguna kinasa, ya que el proceso de fosforilación es diferente.

Cis

$$\text{Enz - Man + N - Acetil - Glucosamina - P} \xrightarrow{\text{NAcGln fosfotransferasa}} \text{Enz - Man - P - NAcGln}$$

Trans

$$\text{Enz - Man - P - NAcGln} \xrightarrow{\text{Glucosidasa}} \text{Enz - Man - P + NAcGln}$$

Los enfermos de la célula I no pueden añadir NacGln – P, por lo que no podrán llegar al paso final. Todas las proteínas solubles de lisosoma tienen manosa 6P. Existe una región señal que determina el reconocimiento y la adición de P – NAcGln a nivel del cis Golgi. En la TGN existe un receptor de M6P, que conducirá a las proteínas que se le unan al lisosoma. Existe otro receptor de M6P en la membrana plasmática mirando hacia fuera, cuya función es captar enzimas hidrolíticos que haya en el exterior, que hayan podido ser expulsados por error. La vía principal es la que va directamente al lisosoma. Las vesículas situadas entre la TGN y el lisosoma y la membrana y el lisosoma están forradas de clatrina, lo que variará será la recepción. En levaduras no existen lisosomas, sino que hay una vacuola central encargada de la misma función. Suele haber entre 1 y 3 vacuolas. Existen mutantes en levaduras para las vacuolas, que son los VPS, vacuole protein sorting.

VPS A: 1 – 3 vacuolas. Deficientes en actividad de : 1 hidrolasa
Muchas hidrolasas
B: 30 – 40 vacuolas
C: no tienen vacuolas

Si queremos estudiar el transporte a vacuolas deberíamos emplear la VPS A, con deficiencias en muchas hidrolasas. Se han identificado 2: VPS 15 y VPS 34.

VPS 15 es una kinasa autofosforilable, pero con capacidad de fosforilar VPS 34. VPS 34 es una PI kinasa. Ambas proteínas coprecipitan al hacer una inmunoprecipitación, ya que forman un complejo.

Cuando una M6P se une al receptor se autofosforila VPS 15 y se fosforila VPS 34, lo que provoca que haya una elevada afinidad por proteínas de cubierta, como la clatrina, de manera que se formarán vesículas. El complejo de VPS 15 y 34 recibe el nombre de sortosoma, y se descubrió en levaduras. El receptor, una vez llegue a su destino, será devuelto a la membrana para ser reciclado. Muchas pasos del parte final del transporte dependen de PI kinasas. Existen inhibidores de las kinasas de membrana, como la worthmanina, de manera que si se mantiene el tratamiento, será un fenotipo similar al de la célula I.

TRÁFICO VESICULAR

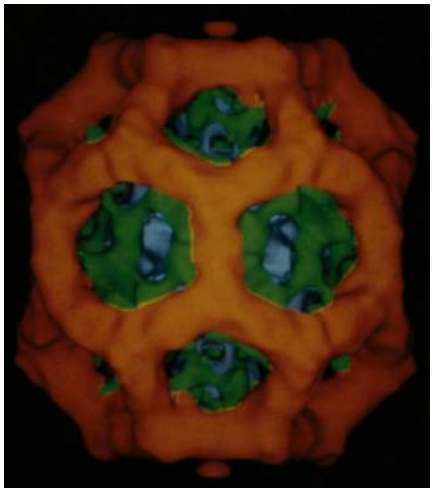
El transporte en el interior de las células se da por vesículas. Un claro ejemplo de esto es el transporte de la carboxipeptidasa, que es transportada en forma de proenzima por el interior de la célula, en el interior de vesículas.

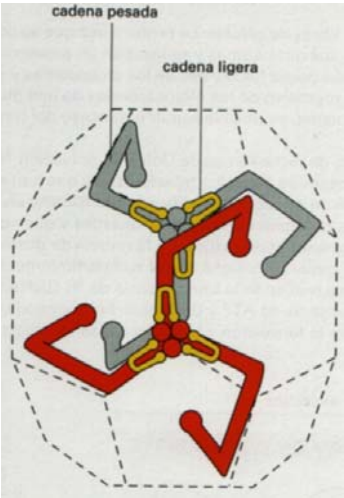
El proceso de formación de vesículas consta de 6 etapas básicas:

1. "Sorting" o clasificación
2. Vesiculación o "budding"
   Se requieren proteínas de cubierta "coat"
   - ccv: clathrin coated vesicles
   - cop I y II: Permiten el transporte entre el RE y el Golgi y por el interior de Golgi
3. Desprendimiento de la cubierta
   Las proteínas de cubierta se desprenden una vez formada la vesícula.
4. Direccionamiento o transporte
5. Reconocimiento de la membrana receptora o diana
   Se trata de las proteínas conocidas como SNARE, de la que encontramos 2 tipos t y v, target y vesicular. Son las proteínas de reconocimiento.
6. Fusión

CLATRINA

Está formada por 6 cadenas polipeptídicas, formando una estructura que se conoce como trischelion. Cuando polimeriza el trischelion se obtienen estructuras hexagonales. A continuación se muestra una reconstrucción tridimensional de la clatrina, formando una vesícula. En el dibujo la cubierta exterior está formada por 12 pentágonos y 6 hexágonos. En rojo se muestran las patas superpuestas de los trischelions, mientras que el verde muestra los dominios terminales de la clatrina. La parte interna azul muestra las proteínas adaptadoras, que ya se verán más adelante. La cubierta mostrada es muy pequeña para contener una vesícula, pero el diseño en una vesícula es similar. El dibujo mide 50 nm de lado. La clatrina se aisló a partir de lo que se conocía como "coated pits".





La clatrina no se une directamente a la membrana, sino que lo hace mediante adaptadores, formados por 4 tipos de proteínas diferentes. Adaptadores de tipo I: α y β. Adaptadores de tipo II: β y γ. Los adaptadores pueden reconocer a los receptores y/o a la membrana. Existen 3 tipos de adaptadores. Existen diferencias en las posibilidades de maduración. α puede madurar de 5 maneras, β tiene diferentes posibilidades. Se tratan básicamente de familias de proteínas.

En principio se creía que había sólo 1 tipo de clatrina, pero actualmente se sabe que hay como mínimo 3 tipos diferentes. Según se va uniendo la clatrina, irá sufriendo cambios conformacionales, lo que provocará que se forme una estructura en forma de cúpula, lo que provocará la aparición de las vesículas. Actuará entonces la hsp70, desplegando la clatrina, separándola y secuestrándola hasta que vuelva a ser necesaria.

CoP

Las proteínas CoP de tipo I fueron identificadas por Rothmann cuando estaba intentando hacer un modelo de transporte intragolgi. Trabajaba con 2 líneas celulares, la A con una mutación en NAcGln transferasa, es decir, la célula I, defecto que se sitúa en el cis Golgi, y la línea B, que tenía un defecto en la glucosilasa situada en el trans, que es la encargada de separar NAcGln. Trabajando con Golgi extraídos de estas células observó que se producía una correcta síntesis de los enzimas, ya que pasaban de una Golgi a otro. A partir de esto identificó el coatómero. Está compuesto por 7 proteínas diferentes: α, β, γ, δ, ε, p20 y ARF1, ADP ribosilation factor; es el elemento regulador, se trata de una small GTPasa.

Se observaron más adelante otras vesículas que iban del RER al Golgi. Estas vesículas no tienen los coatómeros CoP I, sino que poseen coatómeros CoP II. No existen las proteínas CoP, sino que hay dos complejos, sec 13 y sec 23, que son estrucuturalmente similares a CoP. Además hay otra proteína pequeña, la SarI, de 20Kda, que actúa como regulador. Se trata de una small GTPasa.

Para que se forme la vesícula, se une ARF a la membrana, mediante una cola lipófila. ARF reclutará a los coatómeros. Una vez se une ARF, recibe de la proteína intercambiadora de nucleótidos un GTP, con lo que la unión a membrana será más fuerte y se reclutarán los coatómeros. El desprendimiento de la cubierta se suele dar por hidrólisis del GTP unido a ARF. Las membranas con CoP II se suelen formar de manera similar.

Localización de las distintas vesículas

Las vesículas formadas por CoP I son las encargadas del transporte en el interior del Golgi. Son las únicas que se han encontrado en modelos "in vitro" de Golgi. CoP II es la encargada del transporte desde e RE al Golgi, pero parece muy posible que CoP I también intervenga en ese proceso.

A principios de los 80, Rothmann trató su modelo con N – etilmaleimida, con lo que el modelo dejaba de funcionar. Identificó por lo tanto un factor sensible a la N etilmaleimida, el NSF; N – etilmaleimida sensitive factor. Mientras tanto, Schekman aisló una proteína similar a NSF, que era sec 18, que si se ponía en el modelo que no funcionaba, sec 18 sustituía a NSF, y el modelo funcionaba. También se identificaron otras proteínas, un complejo de unión a NSF, las SNAPs (α, β y γ). SNAP α es homóloga a sec 17, mientras que sec 4 resultó ser homóloga a ras, una GTP binding protein.

Se identificaron muchas proteínas homólogas a ras, que se asociaron con vesículas en células animales. Entre estas se han de destacar:

Ras
Rac, Rho, CDC42
Rab ("ras genes from rat brain")

En todas las proteínas pequeñas de unión a GTP se da la siguiente reacción:

$$Rab-GDP \underset{GDP}{\overset{NEF}{\rightleftarrows}} Rab-GTP$$

Esas proteínas actúan sobre otros complejos de proteínas, estabilizándolos. Se identificaron muchas proteínas similares, a las que se denominó Rab. Hasta ahora tenemos por lo tanto, 3 factores implicados: NSF, SNAP y rab.

Neurofisiólogos identificaron entonces algunas proteínas de la terminales sinápticas y de las vesículas, a las que llamaron syntaxin, situada en la membrana plasmática, que se une a synaptotagmina, situada en la vesícula. Syntaxin es también homóloga a SED 5, también situada en la membrana plasmática. Otra proteína que identificaron fue VAMP, que es esencial para la unión de vesículas secretoras a la membrana y que es la diana de dos neurotoxinas. Observaron entonces con NSF y SNAP, que estas moléculas tenían una elevada afinidad por VAMP y syntaxin. Llamaron a este tipo de moléculas, similares a VAMP y a syntaxin SNAREs; SNAPs receptors. Existen 2 tipos de SNAREs diferentes v y t, vesicular y target.

Las vesículas unidas a SNARE serán capaces de unirse a la membrana, siempre y cuando haya reconocimiento entre SNAREs. Existe una proteína Rab, que va unida a la vesícula, unida a GDP. Cuando se produce el reconocimiento de ambas proteínas de unión, se cambiará el GDP por un GTP, estabilizando la unión.

La toxina botulínica, mortal para humanos en concentraciones fentomolares, destruye el complejo SNARE vesicular, con lo que no habrá reconocimiento de la membrana, por lo que no habrá contracción muscular, ni respiración, ni función cardiaca...

Cuando se da la fusión con la membrana, el SNARE queda unido a la membrana del receptor, por lo que se deberá reciclar.

FUSIÓN DE MEMBRANAS

Clásicamente se distinguía entre 2 tipos de fusiones de membrana, dependiendo de la monocapa que actuase primero, pero no aporta mucha información:

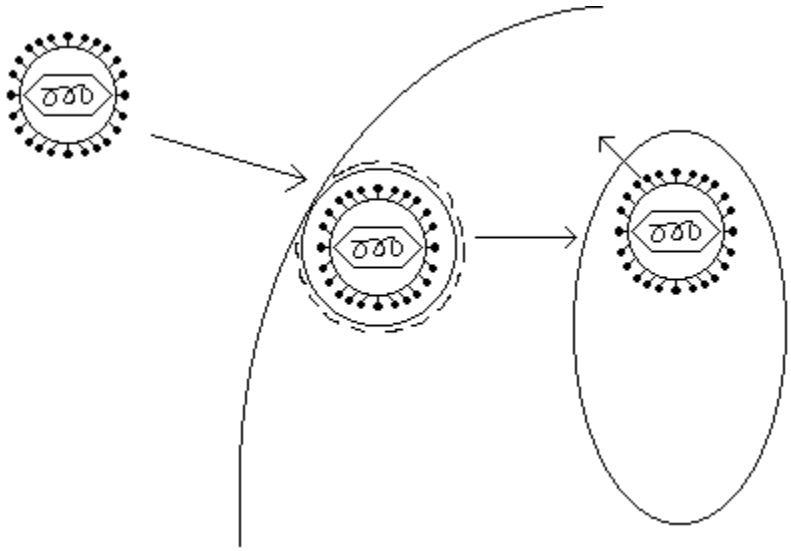
- Fusión ectoplásmica: monocapa exterior
- Fusión endoplásmica: monocapa intracelular.

EXOCITOSIS

Se ha estudiado en una serie de modelos:

- Mastocito: presenta secreción de histamina, aunque también puede secretar heparina,...
- Terminal sináptico: estructura que se forma al final de un tubo nervioso.
- Sistemas virales: han permitido estudiar el proceso de infección y proliferación vírica.

Entrada de virus



La cubierta del virus presenta una proteína, conocida como proteína G, que tiene función hemaglutinina, y, que, a pH ácido, sufre un cambio conformacional, que provoca que se ancle a la membrana vesicular. Las proteínas G son contráctiles, y aproximan al virus a la membrana vesicular, para que se produzca la fusión. Se requiere que se establezcan entre 8 y 10 puentes de esas proteínas G para que se puede dar este proceso. Es posible que en la célula exista este tipo de proteínas, pero no se ha demostrado.

Mediante la técnica de Patch Clamp se pueden detectar los procesos de fusión de las membranas, ya que permite medir intensidades eléctricas muy bajas, pA, en períodos de tiempo muy pequeños, 10 ms. Permite detectar las fusiones de las membranas, ya que cada vesícula tiene características iónicas diferentes. El primer paso es la formación de un pequeño poro, de 1 nm, durante aproximadamente 1 – 2 ms. Este poro se abre y se cierra durante 5 ms. Si se ha de producir la fusión, se abre más y si no se cierra. El primer proceso esta regulado por hemaglutinina, el segundo se desconoce.

Dentro de los procesos de exocitosis distinguimos 2 tipos:

- Secreción constitutiva: se secreta el producto continuamente.
- Secreción regulada: a causa de una señal se inicia una liberación de las sustancias a secretar.

La secreción regulada se da en células muy especializadas y diferenciadas, no se pueden cultivar, ya que no se dividen. No se pueden estudiar procesos regulados en sistemas heterólogos.

El mecanismo que permite diferenciar entre secreción constitutiva y regulada es la presencia de un receptor poco específico, sino más bien generalizado.

En un tipo celular, donde se localizan cerca de 20.000 vesículas, cuando llega el impulso de secreción se liberarán 800. Si se hace con inhibidores de ATP o de actina, se dará la descarga de las 800 vesículas, pero no se situarán otras vesículas listas para salir. La célula, una vez le llega la señal, descarga las vesículas que tiene listas, pero después desplaza una serie de vesículas a la parte del espacio submembranal, para liberarlas con futuros estímulos, en un proceso de recarga. Por un lado existen una serie de vesículas listas para salir de la célula, mientras que hay otras vesículas de recarga, que están unidas a la actina mediante una proteína motora, por lo que necesitarán ATP para desplazarse.

Mediante técnicas de Patch Clamp, se puede estimar el tamaño del poro, y conociendo las concentraciones se puede estimar el tiempo de descarga, suponiendo que éste dependa sólo del tamaño del poro. Se observa que el tiempo de descarga real es 50 veces el tiempo de descarga teórico. Se deduce a partir de esto, que se trata de una salida controlada, es decir, hay algo que regula la salida. En el interior de las proteínas encontramos heparán sulfato, que es que retiene la salida de las proteínas. Los proteoglucanos son poco específicos, pero tienen fuerza y afinidad suficiente como para desviar a las proteínas de la ruta constitutiva a la regulada. El proteoglucano del interior de la vesícula libera el sustrato en función de la fuerza iónica. Cada célula tiene un sistema que secreta uno o muy pocos productos, por lo que expresan el producto, su receptor y las modificaciones

ENDOCITOSIS

Se ha de observar este proceso desde criterios fisiológicos, que no morfológicos. Se ha de tener en cuenta que la célula necesita precursores, que en muchos casos no podrá sintetizar. Necesita por lo tanto extraerlos de las macromoléculas. Existe un tipo especial de endocitosis que permite a las macromoléculas pasar a través de las células, para llegar a otro tejido. Este proceso de transcitosis se suele dar en algunos tejidos que hacen función de barrera, como los siguientes:

- Piel
- Epitelio intestinal
- Barrera hematoencefálica
- Placentaria

Las vesículas se forman en la entrada en la parte apical de la célula y salen por la parte basal.

Existen diferentes procesos de endocitosis:

- Endocitosis mediada por receptor
- Endocitosis no mediada por receptor, Pinocitosis
- Fagocitosis
- Potocitosis: endocitosis mediada por caveola, que actúa como centro de señalización
- Transcitosis

Endocitosis mediada por receptor

Se da mediante vesículas de clatrina. Existen diferentes vías:

- Vía de degradación:
    - Uno de los primeros mecanismos que se descubrió fue el LDL – R, hace unos 15 años. Este mecanismo permite el transporte de colesterol y otras sustancias similares hacia las células extrahepáticas. Se forman vesículas de clatrina que van al CURL, compartiment of uncoupling receptor / ligand, donde se separa al receptor del ligando, para pasar después al lisosoma y regenerar el receptor a la membrana. En este caso, lo receptores van entrando de manera continua, y a estén cargados o no. En muchos otros receptores no es así.
- Vía de reciclaje:
    - Permite la entrada de Fe a la célula. El Fe circula por la sangre unido a transferrina, de la que diferenciamos 2 estados: Apotransferrina si no está unida a Fe y Ferrotransferrina si está unida. Las células poseen un receptor de transferrina, con lo que entra Fe a la célula. En este proceso no se degrada el ligando, sino que se separa Fe y se vuelve a enviar le ligando al exterior. Estas células no suelen tener diferentes dominios

Transcitosis

Se da en tejidos con uniones estrechas, que determinen diferentes dominios. El caso más común es el caso de los tejidos epiteliales, que forman barreras. Se trata de un proceso similar a la vía de reciclaje, pero el punto de origen y el punto de destino están en diferentes dominios.

Uno de los casos más estudiados es el traspaso de Ig desde la madrea la niño entre el 7,5 y el 9 mes de embarazo. Se trata de IgC. Interviene la fosfatasa alcalina placentaria, que es un receptor apara una amplia gama de Ac.

También se está estudiando mucho la toxina diftérica, compuesta por 2 factores, A y B. A es la unidad catalítica, que afecta al EF2 de la RNA polimerasa, causando la muerte celular. B es un translocador, que a pH ácido sufre un cambio conformacional , por lo que se une a la membrana, translocando a A. Se está estudiando este sistema, porque se podría estudiar para tratar patologías en células tumorales. Si localizamos un receptor que esté sólo situado en células neoplásicas, podemos añadir un receptor específico para un marcador, unido a la subunidad B, para que la subunidad A mate a las células tumorales.

Potocitosis

Están implicadas las caveolas, que son depresiones de la membrana de las células. Se aisló hace poco la caveolina, una proteína de cubierta, que cubre las caveolas por el interior. En las caveolas existe un receptor que se conoce como GPI. Es periférico a la membrana, a la cual está unido por un glúcido con un fosfolípido insertado en ella. Se trata del GPI, glucanofosfatidil inositol. La función es facilitar la entrada en endocitosis en la célula. La segunda función es la de concentrar señales en su interior. La señal exacta que transmitirá dependerá de lo que reciba.

El ácido fólico entra en la célula por transporte pasivo, pero la concentración exterior es menor que la interior, por lo que será en contra de gradiente. Para permitir la entrada se acumula el ácido fólico, que se unirá a receptores. Finalmente se inyectan protones, para provocar la separación de receptor y ligando, y debido a la alta concentración, el ácido fólico entrará. Esta sería la primera función de la caveola, pero como ya se ha dicho tiene otra que es la concentración de señales.

La célula ha de tener muchas señales, tanto hacia el exterior como hacia el interior. No existen centros de señalización, sino que la integración se puede dar en el origen o en el transporte. En las caveolas hay una serie de receptores, de los cuales cada uno actúa sobre una vía. Si hay varas señales, éstas actuarán de forma conjunta.

Fagocitosis

Permite a la célula captar moléculas de gran tamaño. En organismos unicelulares libres, la fagocitosis tiene un importante papel, ya que es la fuente de alimentación. En mamíferos tiene principalmente una función defensiva, ya que hay una serie de tipos celulares especializados en defensa y que son capaces de realizar procesos de fagocitosis. Estos tipos celulares son monocitos / macrófagos, y algunas células del pulmón.

El monocito, cuando detecta que es posible que haya problemas en algún tejido, mediante mecanismos ya vistos, se fija al endotelio del vaso sanguíneo y penetra en el tejido. Cuando se produce este procesos que se conoce como extravasación, el monocito pasa a ser un macrófago, que va liberando proteínas que van degradando la matriz para permitir el avance del macrófago por el tejido. Al llegar al origen de los problemas, este puede ser una bacteria, que estará rodeada de Acs. Los receptores para estos anticuerpos serán RcFc. Los macrófagos englobarán a la bacteria, que pasará al compartimento lisosomal. El macrófago puede llegar a bloquearse, en caso de que haya muchas bacterias, o que no pueda degradarlas.

CLOROPLASTOS, MITOCONDRIAS Y PEROXISOMAS

Tanto mitocondrias como peroxisomas están en todas las células, pero los cloroplastos están sólo en células fotosintéticas. Se trata de 3 orgánulos cuyo origen es endosimbioente, ya que hay muchas evidencias que apuntan en esa dirección, como el DNA similar al bacteriano que tienen en su interior,...

En los peroxisomas no tenemos indicios tan claros de su origen endosimbionte, ya que no tienen DNA, pero hay otros mecanismos moleculares que apuntan hacia el origen endosimbionte.

MITOCONDRIAS

Encontramos 4 espacios diferentes:

- Membrana mitocondrial externa: Es una membrana muy permeable, de las más permeables que se conocen.
- Membrana mitocondrial interna: Es una de las membranas más impermeables que se conocen, para poder generar el gradiente para generar ATP. Encontramos muchos componentes del metabolismo en ella.
- En la matriz mitocondrial encontramos enzimas responsables de muchos ciclos celulares, como el ciclo de Krebs.
- En el espacio intermembrana encontramos muchos enzimas intercambiadores de nucleótidos.

El genoma de las mitocondrias de las levaduras es más lago que en humanos, debido a que a lo largo de la evolución, las mitocondrias han cedido sus genes al núcleo. En levaduras, el 80% de sus funciones están en el núcleo, mientras que en humanos asciende hasta el 95%, incluyendo 8 de 9 partes de los citocromos. En el núcleo también se sintetiza el tRNA específico de la mitocondria, que será necesario para que la mitocondria exprese sus genes. Se deberá transportar hacia la mitocondria.

Se desconocen exactamente los mecanismos de regulación.

Se empezó a estudiar el transporte con destino a mitocondrias a raíz de una deficiencia génica, que impide la expresión de la L – Ala – glioxilato – aminotransferasa. En algunos casos el enzima no se enviaba al peroxisoma, sino que iba a la mitocondria. Una vez se secuenció se observó que la diferencia radicaba en el cambio de un solo aminoácido, que supone la destinación mitocondria con respecto peroxisoma.

Las membranas de la mitocondria pueden llegar a contactar, en las proteínas TOM y TIM, translocator outer / inner membrane. Estas uniones duran poco, pero permiten a las proteínas atravesar las dos membranas a la vez. Las proteínas que llegan a la mitocondria o bien quedarán en la MME o bien entrarán en la matriz. Las proteínas que quedan retenidas en la matriz tienen una señal de entrada en el TOM, pero tienen otra señal que indica que la proteína deberá quedarse anclada en la membrana, inhibiéndose el transporte por TIM. Las proteínas que llegan a la matriz eliminarán su señal de entrada en la mitocondria, y a continuación habrá 2 posibilidades. O bien han llegado ya a su destino, que es la matriz, o bien tienen otra señal de destino, que podrá ser el espacio intermembrana o la MMI. El mecanismo de transporte al espacio intermembrana se da de manera similar a los mecanismos de las bacterias.

La inserción en los complejos TOM y TIM se da en forma de proteína desplegada, gracias a chaperonas de tipo 70. Cuando llegue a la matriz, la proteína podrá entrar en un complejo de plegamiento, a no ser que tenga señal de redirección a otro destino. En el interior de la matriz, las proteínas son recogidas por chaperonas, que guiarán a la proteína al complejo de plegamiento. Pero en primer lugar se eliminará la señal de entrada, y si aparece la señal de redirección, la proteína no llegará al complejo de plegamiento, sino que se dirigirá hacia el espacio intermembrana o bien la MMI, mediante sistemas similares a las bacterias.

No solo se han de llevar proteínas a la mitocondria, sino que también se ha de llevar el tRNA, del que encontramos 4 tipos:

	Síntesis	Función
A	Núcleo	Citosólica
B	Mitocondria	Mitocondrial
C	Núcleo	Citosólica / Mitocondrial
D	Núcleo	Mitocondrial

En algunos protozoos encontramos una función de edición, ya que pueden intercambiar el código genético, en proceso conocido como RNA editing.

El tRNA se sintetiza en forma de cruz, pero con una cadena de 180 nucleótidos en el extremo 5'. Se han propuesto 2 sistemas de entrada del tRNA a la mitocondria.

- Unido a una proteína que tenga señal de entrada.
- Se cree posible que la secuencia de 180 nucleótidos mimetice la secuencia señal, que podría ser reconocida por la proteína de transporte, que de alguna manera desplegaría el RNA y lo insertaría en la mitocondria.

En caso de demostrarse la segunda teoría, eso permitiría usa la secuencia de 18' nucleótidos para afectar el interior de la mitocondria, facilitando así la terapia génica.

CLOROPLASTOS

Existen no 4, sino 6 destinos posibles, ya que se ha de tener en cuenta que los tilacoides delimitan un nuevo espacio, a la vez que son otra membrana en sí. El transporte de proteínas hacia el interior de los cloroplastos se da de manera similar a las mitocondrias, anteriormente descrito, pero mediante las proteínas OEP y OIP.

Muchas de las cosas dichas anteriormente para las mitocondrias son válidas también en este apartado, teniendo en cuenta que hay 2 destinos más.

PEROXISOMAS

En un peroxisoma sólo hay una membrana, por lo que sólo hay 2 destinos diferentes. Debido a esto, hay mecanismos de entrada similares a la mitocondria, pero sólo a través de una membrana. El transportador es similar a TOM. En los peroxisomas se expresa la catalasa, ya que estos orgánulos son los encargados de eliminar el ion peróxido. En algunos tipos celulares, el peroxisoma podrá desempeñar otras funciones. En mamíferos se encarga de la β oxidación. Existen 2 posibles señales diferentes en una proteína, pero nunca se dan las 2 a la vez. En el extremo N terminal son de 20 a 30 AA, mientras que en el C terminal son 3 AA. Cualquiera de las dos señales es reconocida por la proteína DEX, que une a la proteína que presenta la señal con el sistema de translocación análogo a TOM.

CICLO CELULAR

Se entiende como ciclo celular a la suma de todos los procesos que permitirán a una célula convertirse en dos. Se necesitará un mecanismo de control para impedir que se produzca el crecimiento de manera descontrolada, que serán los mecanismos de control de ciclo. La célula se mantiene siempre al tanto de lo que ocurre en el exterior y en su interior, gracias a un elevado número de receptores, de los cuales, cada uno controlará uno o pocos factores. En las células de nuestro organismo no podemos hablar de potencialidad genética, sino que debemos hacerlo de características fenotípicas, ya que hay genes que no se expresarán al estar bloqueados, la respuesta variará en función de la condición de la célula, o, incluso, del daño celular. Podemos encontrar 4 tipos diferentes de respuesta n una célula:

- Mantener el estado actual o quiescencia
- División
- Diferenciación
- Apoptosis o muerte celular programada.

Dentro del mismo ciclo celular podemos encontrar diferentes procesos:

- Ciclo cromosómico: permite la oscilación entre el estado 2n al 4n y de vuelta al 2n. El paso de 2n a 4n se produce al duplicarse el DNA, mientras que el paso de 4n se produce en la mitosis.
- Ciclo citosólico: permite la duplicación de orgánulos.
- Ciclo centromérico: implica la duplicación del centrómero.

Existen una serie de parámetros que son de importancia a la hora de considerar el ciclo celular:

- Índice mitótico: % de células en mitosis en una población. Una manera de observarlo es mediante tinción de microtúbulos. Valores altos de índice mitóticos implican ciclos celulares cortos.
- Longitud del ciclo celular: Un método para observar este factor sería hacer un cultivo sincronizado con adenina tritiada.
- Otro método interesante para estudiar el ciclo celular es emplear la citometría de flujo, mediante la cual se tiñe el DNA con yoduro de propidio, para lo que se ha de permeabilizar antes la célula, con lo que el yoduro podrá teñir el DNA, para poderlo observar después con el citómetro de flujo.

De nuevo, como en muchos casos anteriores, un modelo importante lo representan los oocitos de Xenopus o de almeja. Se trata de especies de fecundación externa, con los oocitos bloqueados en la metafase II de la meiosis. Mientras están en el ovario, los oocitos reciben una señal de progesterona que provoca la entrada en meiosis, que seguirán hasta quedar bloqueados en la metafase II de la meiosis. Cuando se produce la fecundación, se eliminará el bloqueo, por lo que se podrá continuar la meiosis hasta el final. Podemos emplear 2 oocitos, en función de su estado. Por un lado, el preoocito será el oocito de la fase G2 del ciclo celular, al que se le administra progesterona, para que entre en meiosis. Otro oocito será el oocito activado, que será el oocito en la metafase II de la meiosis, que habrá sido fertilizado además.

Otros modelos importantes para estudiar el ciclo celular son algunas levaduras:

- *Saccharomyces cerevisiae* (“budding yeast”) se divide por gemación.
- *Saccharomyces pombe* (“fisión yeast”) se divide por fisión.

Un último modelo que se puede emplear es el de la células de mamífero, haciendo experimentos de fusión celular:

- Se provoca la fusión de 2 células mediante el tratamiento con polietilenglicol. Dependiendo del estado de los núcleos que fusionemos obtendremos diferentes resultados:

$$G1 + S \rightarrow \begin{matrix} S \rightarrow S \\ G1 \rightarrow S \end{matrix} \Rightarrow \text{Podría indicar la presencia de algún factor de entrada en S}$$

$$G1 + G2 \rightarrow \begin{matrix} G1 \rightarrow G1 \\ G2 \rightarrow G2 \end{matrix} \Rightarrow \text{El factor no está presente, cada uno sigue su ciclo}$$

$$G2 + S \rightarrow \text{Se retrasa la mitosis} \Rightarrow \text{Es posible que en S haya algún elemento inhibidor de G2}$$

$$M + \begin{pmatrix} G1 \\ G2 \\ S \end{pmatrix} \rightarrow \text{Condensación de cromosomas} \Rightarrow \text{En M hay algún factor que provoca la condensación}$$

Si se hace lo mismo con microinyecciones de citoplasma de otras células, los resultados son los mismos, por lo que se deduce que los factores están en el citoplasma.

Otro experimento que apunta en la misma dirección es el que se realizó con preoocitos y oocitos maduros. Los preoocitos normalmente requieren progesterona para entrar en meiosis, pero se realizó un experimento en el que se inyectaba citoplasma de un oocito maduro en un preoocito, con lo que se provocaba la entrada en meiosis, sin necesidad de progesterona. Otros experimentos demuestran que es necesario que la célula sea capaz de sintetizar proteínas para que la progesterona puede actuar sobre ella, provocando la división. Si al inyectar desde el oocito maduro, el preoocito no es capaz de sintetizar proteínas, entrará igualmente en división, ya que se inyecta un factor desde el oocito maduro, que es una proteína, que es el MPF, maduration promoting factor.

MPF

MPF es el elemento que regula el paso de G2 a M. Se trata de un complejo proteico formado por 2 proteínas:

- CDK, cyclin dependent kinase
- Ciclina

A partir de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* se aislaron mutantes, que se denominaron cdc, mutantes de ciclo celular. No se puede tratar de mutaciones que afecten a genes muy importantes, ya que en ese caso no serían funcionales. Han de ser mutaciones condicionales, que se manifiesten en función de las condiciones ambientales. Bajo condiciones estrictas se manifestarán, mientras que bajo condiciones permisivas no se manifestarán. Un claro ejemplo son las mutaciones sensibles a la temperatura, cdc – ts. A temperaturas de entre 35 y 37 grados, se manifestará la mutación, mientras que a temperaturas inferiores a 25 grados no se manifestará.

Se aislaron en principio 4 mutantes:

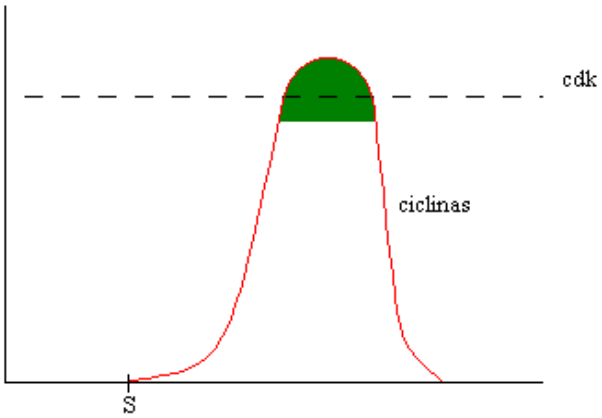
- cdc 24^{ts}: no forma yemas
- cdc 7^{ts}: no duplica el DNA
- cdc 31^{ts}: no duplica los centrómeros
- cdc 28^{ts}: no hace nada de lo anterior.

Se puede deducir, que la mutación cdc 28^{ts} será anterior en el ciclo a las otras, ya que su mutación impide que se den varios procesos.

$$\begin{pmatrix} Start \\ Inicio \end{pmatrix} \xrightarrow{cdc\ 28^{ts}} \begin{array}{l} \xrightarrow{cdc\ 24^{ts}} Budding \\ \xrightarrow{cdc\ 7^{ts}} DNA\ \text{sint.} \\ \xrightarrow{cdc\ 31^{ts}} Dup.\ \text{cent.} \end{array} \longrightarrow Mitosis$$

Se suele considerar como punto de inicio el paso de G1 a S, ya que se trata de un punto crítico, de no retorno, ya que las células que pasan de ese punto van hasta el final.

Cdc 28^{ts} en S. cerevisiae es lo mismo que cdc 2^{ts} en S. pombe, por lo que normalmente se les llama cdc $^{2}/_{28}$. Se trata de una kinasa dependiente de ciclinas. De hecho es la cdk que forma parte de MPF, que es un heterodímero entre cdc $^{2}/_{28}$ y una ciclina, la B. Cuando este heterodímero está activo, las células entran en mitosis. Los complejos cdk / ciclina indican un cambio de actividad.



Cuando se activa el complejo, se activa el reconocimiento de la caja de destrucción de las ciclinas, con lo cual éstas entrarán en el proceso de degradación. El MPF está regulado por otros genes como Wee 1 y cdc 25. Para que se pueda dar la regulación ha de poderse formar el complejo MPF, ha de haber un nivel mínimo de ciclinas. Wee 1 se aisló de las células de levaduras deficientes en ese gen, cuyo fenotipo es que sus células son más pequeñas de los normal. Wee 1 es un inhibidor de MPF, por lo que en las células deficientes, MPF no estará inhibido, por lo que las células estarán en un estado de continua división. Por otra parte, cdc 25 es lo opuesto, ya que cdc 25 es un activador de MPF, por lo que las células con deficiencia en ese gen serán muy grandes, al no entrar en división.

MPF se regula cdc 2. MPF tiene 4 posibles puntos de fosforilación, de manera que se activará cuando, por acción de un complejo proteico de tipo cdk, cdc 7, más ciclina H, se fosforile la Thr 161. Wee 1 fosforilará de nuevo MPF en el residuo Tyr 15, lo que lo inactivará. Cuado la célula va a entrar en mitosis, se activará la fosfatasa del residuo Tyr, cdc 25, lo que activará el complejo MPF. Alternado las concentraciones de cdc 25 y de wee 1 puede modificarse el tamaño de las células, pero teniendo en cuenta que las células más pequeñas podrían no ser viables, ya que podrían ser muy pequeñas y no tener orgánulos necesarios.

MPF está inhibido en interfase con 2 fosforilaciones Thr 161 y Tyr 15
MPF está activo en mitosis con 1 fosforilación Thr 161

Wee 1 y cdc 25 pueden ser sustratos de MPF: $Wee1 \underset{-}{\overset{-}{\rightleftarrows}} MPF \underset{+}{\overset{+}{\rightleftarrows}} cdc25$

Ha de haber un proceso que inicie la función de MPF. Existen 2 hipótesis:

- Se cree posible que en la fase S se forme un elemento que active la siguiente fase. Se considera plausible que la polokinasa fosforile cdc 25, disparando el ciclo.
- El otro modelo considerado es el modelo del equilibrio. Supongamos un nivel constante de Wee 1, por lo que MPF no se puede activar. Si en G2 la célula sintetiza cdc 25 activa, de manera que según vaya creciendo su concentración, irá desfosforilando MPF, de manera que al final se alcanzará un equilibrio entre la acción de cdc 25 y wee 1. Pero si se sobrepasa ese punto de equilibrio, la reacción se dispara.

Al activarse MPF, se activará un enzima E3 de reconocimiento de sustrato, que reconocerá la ciclina B, con lo que se acabará provocando la fosforilación de la lámina nuclear, despolimerizándola. Se provocará además la fosforilación de las histonas, con lo que se condensarán los cromosomas. Se activarán las MAPs, se provocará la polimerización de los microtúbulos, la duplicación de los centrosomas, ... Esto regula el paso de G2 a M

El paso de G1 a S está controlado por proteínas que inhiben el paso. Una de las proteínas es p53, que es un antioncogen. p53 es inhibidor de la entrada en división. Este es el punto principal de control del ciclo Está regulado por ciclinas. Entra en la fase S cuando se activan una serie de complejos, como CDK 2, CDK 4 y CDK 5, además de E más CDK 2. La proteína p53 anteriormente ejerce una función de bloqueo, de manera que con esa proteína no se podrá entrar en S. Se observó que p53 era inexistente o inactiva en la mayoría de los tumores, por lo que se supuso que es un antioncogen, ya que si existe p53 la célula es difícil que entre en división. p53 es un factor de transcripción, que tiene varios promotores diana. El gen más importante regulado por p53 es p21. p21 tiene una elevada afinidad por las ciclinas, por lo que los complejos que necesiten ciclinas no se podrán activar debido a la presencia de p21. Para que la célula entre en síntesis por lo tanto se ha de degradar p53.

Existe una proteína, MDM2, que está retenida en el nucleolo por la proteína x. Cuando la célula tiene que entrar en división, x se fosforila, con lo que MDM2 puede ir al núcleo, donde se unirá a p53, que se separará del cromosoma. El complejo MDM2 – p53 tiene señal NES de salida de núcleo, por lo que ambas proteínas son exportadas al citosol. MDM2 tiene además capacidad E3, con lo que será reconocido y se poliubicuitinizará, con o que se destruirán ambas proteínas. El nivel de p53 baja a 0 en muy poco tiempo.

Durante la fase G1, la RB o retinoblastoma está desfosforilada. Se identificó esta proteína en tumores en los que estaba constitutivamente fosforilada, por lo que no se puede producir bloqueo entre G1 y S. RB está en el núcleo, unida a E2F, lo que impide la síntesis de nuevo DNA, ya que E2F es un promotor de enzimas implicados en la síntesis de nuevo DNA. A la vez que se fosforila la proteína x, se fosforila RB, lo que provocará la liberación de E2F, con lo que se sintetizará más DNA.

Lo que dispara esta serie de fosforilaciones es la señal mitogénica. En los organismos unicelulares, la señal será la abundancia de nutrientes en el medio que rodea la célula. En organismos pluricelulares, ya no dependerá de los nutrientes, ya que hay mecanismos de homeostasis, sino que pasará a depender de alguna sustancia que irá por la sangre. Estas sustancias son los factores de crecimiento, GF. Son sintetizados por las células y pueden actuar tanto a nivel local como sistémico. Algunos factores de crecimiento son:

FGF: Fibroblast Growth Factor
VEGF: Crecimiento de vasos sanguíneos, estimula la angiogénesis.
PDGF

Todos estos factores actúan sobre las células mediante un receptor específico. El receptor de la PDGF necesita de la llegada de un dímeros de PDGF, lo que activará los receptores, que se fosforilarán recíprocamente, sintetizando mensajeros secundarios mediante otras proteínas. Algunos mensajeros secundarios pueden ser IP3, algunas proteínas pequeñas de tipo GTP,... Estos mensajeros secundarios podrán activar una serie de kinasas, que acabarán fosforilando los factores de transcripción.

p53 es lo que llamamos un antioncogen. En la célula también podemos encontrar protooncogenes, como ras, que si se mantiene activo de manera constitutiva provocará la aparición de tumores. Un protooncoproteína se mantiene como tal, siempre y cuando tenga la capacidad de activarse y desactivarse. Si carece de esa capacidad, pasará a ser una oncoproteína. Las kinasas involucradas en el ciclo celular pueden pasar a ser oncoproteínas, en caso de que perdiesen su capacidad de desactivarse. Este tipo de oncogen podría aparecer en caso de que se diese una mutación que cambiase la conformación del enzima. Otra posibilidad de aparición de tumores radica en el hecho de que si un oncogen se sobreexpresa, podría inducir la aparición de un tumor, ya que podría escapar de las capacidades de regulación de la célula. Si se produjese una translocación en el protooncogen, podría pasar a tener un promotor más fuerte, lo que provocaría que en la célula hubiese un mayor número de copias, lo que podría provocar la aparición del tumor.

APOPTOSIS

En el ciclo celular existen una serie de fases continuas, siempre y cuando la célula esté en proliferación. Existe la posibilidad de que después de la fase M, la célula pase a la G1, pero de allí pase a una fase G0, de diferenciación. Las células que se diferencian ya no se dividen. Pasado un cierto tiempo, y debido a ciertas señales, la célula entrará en senescencia, y morirá.

La célula, para poder morir, necesitará una serie de genes. Se requerirá la capacidad de producir proteínas para entrar en la fase de apoptosis. Es importante este proceso para eliminar células viejas, o incluso en la síntesis de tejidos.

Se ha de diferenciar entre necrosis y apoptosis, teniendo en cuenta, que la segunda es una muerte programada dela célula, provocada por el propio organismo. Dentro de este proceso se activan una serie genes en el núcleo, que activarán proteasas y DNAasas. Las proteasas suelen ser de tipo caspazas. Se puede reconocer fácilmente una célula apoptótica, gracias a una serie de señales:

- Núcleo concentrado
- Núcleo fragmentado
- Mitocondrias deshaciéndose
- Sistema endomembrana deshaciéndose
- ...

El DNA presenta una estructura claramente en forma de escalera, debido a la acción de las DNAasas.

DIRECCIONES WEB DE INTERÉS

Tema : Actina y proteínas de asociación a actina

- myosin web page : http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/myosin/myosin.html

Tema : Microtúbulos y proteínas asociadas a los microtúbulos.

- kinesina (- end MT motor) : http://www.blocks.fhcrc.org/~kinesin
- página del laboratorio de Hirokawa (kinesina) : http://cb.m.u-tokyo.ac.jp/
- página del laboratorio de Vale : http://motorhead.ucsf.edu/valelab

Tema : Núcleo - organización

1. Histonas y el nucleosoma
   - http://www.cstone.net/~jrb7q/hathome.html. Información acerca de como se acetila el núcleo de histonas. Alineaciones de secuencia. Enlaces con otros investigadores
   - http://genome.nhgri.nih.gov/histones/ . Base de datos de histonas en el National Human Genome Research Institute. Estructuras 3D, secuencias, alineaciones, ...
   - http://www.average.org/~pruss/nucleosome.html y http://www.average.org/~pruss/Nucleosomes/Ac/acetyl.html. The nucleosome page. Gif animado de la formación de un nucleosoma. Estructura del DNA y del nucleosoma.

2. Estructura y función de la cromatina, cromosomas
   - http://www.medcor.mcgill.ca/EXPMED/GENSTRUCTURE/. Grupo de discusión relacionado con la estructura génica, protocolos, material educacional sobre el núcleo y algunos recursos de bioinformática, así como enlaces con investigadores y grupos de investigación en el área.
   - http://www.mdanderson.org/~genedev/Bone/chrom.html. Diseñado para la diseminación de información en el campo de la estructura de la cromatina.
   - http://sgi.bls.umkc.edu/waterborg/chromat/chromatn.html. Colección de diapositivas del Dr. Jakob de los cursos sobre estructura de la cromatina.
   - http://infofarm.cc.affrec.go.jp/~shignak/chromosome.net/. Chromosome@net. Mantenido por Shigeki Nakayama (National Institute of Agrobiological Research, Japon). Enlaces a meetings, laboratorios y científicos. Foro de discusión.
   - http://www.chromatin.net/ Chromatin Network Home Page. Esta introducción básica a la cromatina contiene una bibliografía extensa.
   - http://www.euchromatin.net/links01.html. Colección de enlaces a sitios que tratan sobre cromatina.

3. Complejo de poro nuclear.
   - http://www.mih.unibas.ch/Homepages/stoffler/Slides/NPC/NPC.html. Imágenes del complejo de poro nuclear del Dr. Stoffler.
   - http://cellbio.utmb.edu/cellbio/nucleus.html. Esta es la página del programa de Biología Celular de la Universidad de Texas. Contiene textos e imágenes útiles para el neófito en el estudio del núcleo.
   - http://www.geocities.com/TheTropics/6066/. Nuclear Physiology Laboratory en Brasil. Explicación de las funciones del NPC como conductor iónico, y enlaces a los mayores laboratorios que trabajan en NPC.
   - http://www.mih.unibas.ch/Booklet/NPC.html. Del Instituto Dr. Müller de Biologia Estructural en el Biozentrum de Basilea, Suiza. Explica las bases de algunas de las técnicas de análisis de imagen y resolución de estructuras. Poca información sobre NPC.

4. Telomeros y telomerasas
   - http://petunia.colorago.edu/telomere/telomere.html. The telomere club. Este sitio contiene una colección de enlaces sobre telómeros y telomerasas. Útil para localizar información básica.
   - http://www.genlink.wustl.edu/teldb/index.html. Telomere database (TelDB), Centro de información sobre los telómeros del National Institute of Health. Base de datos de gran utilidad sobre la literatura existente acerca de telómeros, telomerasas, proteínas teloméricas, etc... Incluye numerosos enlaces a otros recursos sobre telómeros.
   - http://petunia.colorado.edu/~nakamut/ y http://resolution.colorado.edu/~nakamut/telomere/telomere.html. Toru M Nakamura's Home Page. Introducción básica a los telómeros y telomerasas. Con buenos enlaces a otros recursos sobre telómeros, aunque no muy actualizado.

5. Centrómeros.

   - http://pingu.salk.edu/users/Karpen_web/karpen2/ The Karpen Laboratory Home Page en el Instituto Salk. Estudios sobre centrómeros en Drosophila. Contiene tablas en las que se recogen los componentes proteicos de centrómeros de diversas especies, y protocolos útiles.
   - http://www.scripps.edu/cb/sullivan/research.htm. Sullivan lab HP at Scripps. Presenta algunos videos de time-lapse de centrómeros humanos marcados con CENP-B-GFP, durante interfase y mitosis. También hay reconstrucciones tridimensionales de centrómeros a partir de microscopía confocal de cromosomas marcados con H2B-GFP.

6. RNA

   - http://www.rockefeller.edu/labheads/darst/index.html. Darst laboratory Home Page. Contiene información acerca de la estructura de RNA polimerasas y una buena colección de enlaces de microscopía electrónica, biología estructural, organizaciones, compañias, conferencias, revistas científicas, bases de datos y herramientas disponibles en la red.
   - http://www.imb-jena.de/RNA.html. RNA world. Todo lo que está relacionado con RNA : estructuras 3D, secuencias, comparaciones, predicciones de estructura, protocolos, ...

7. RNPs

   - http://biosun.biobase.dk/~pdi/2Dimmunoblot/immunoblot_java.html. Patrones de inmunoblot a partir de geles 2D de la base de datos de geles bidimensionsles (Twodimensional gels database).

8. maduración de RNA

   - http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/pathol/spliceosome.htm. Neuromuscular Disease Center (Washington University School of Medicine). Contiene información de los componentes del spliceosoma y enlaces útiles a a ExPASy y OMIM (On Line Mendelian Inheritance in Man), en los que se correlacionan defectos en splicing con patologias en el hombre.
   - http://www.cse.ucsc.edu/~kent/intronerator/index.html. Un sitio de utilidad por su colección de herramientas para explorar la biología celular y genómica de *Caenorhabditis elegans*, con especial énfasis en la maduración alternativa.
   - http://devnull.lbl.gov:8888/alt/. Alternative splicing database. Contiene información acerca de genes que presentan maduración alternativa, con buscadores que permiten encontrar todas las formas alternativas de un tránscrito, las que se han encontrado en un tejido o en un organismo, etc.... Útil.
   - http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html. Un programa de Martin Reese (Univerity of California en Berkeley) que permite predecir los sitios de splincing en humanos y *Drosophila*.
   - http://www.cshl.org/labs/spector/movies.htm. Movies from the Spector Home Page. Es la página del laboratorio del Dr. Spector, en Cold Spring Harbor. Contiene seis videos de muestras aspectos dinámicos de los factores de splicing en células BHK.

Tema : Retículo endoplasmático rugoso

- Trabajos de Günther Blobel: http://www.rockefeller.edu/pubinfo/blobel.nr.html
- Comité Nobel: http://www.nobel.se/medicine/laureates/1999/

Tema : Transporte entre RE y Golgi / Complejo de Golgi

- Videos del laboratorio de J. Lippincott-Schwartz (http://dir.nichd.nih.gov/cbmb/pb1labob.html). En esta dirección se pueden encontrar videos de GFP en vivo.
- Página de Mark Terasaki (http://terasaki.uchc.edu/). La home page de Mark Terasaki contiene una colección de videos de tráfico de membranas en embriones, células vivas en cultivo o extractos celulares *in vitro*.
- Home page de Jamie White's (http://www.embl-heidelberg.de/~jwhite/). La Home page de Jamie White en el EMBL contiene varios videos de proteínas marcadas con GFP que se desplazan a lo largo de la ruta de secreción. Cada video está acompañado de explicaciones muy detalladas.
- Videos del laboratorio del Dr. T. Kreis (http://www.unige.ch/kreis-lab/SJS/SJS_Main.html). Contiene videos relacionados con sus publicaciones más recientes sobre CLIP-170 y el tráfico entre ER y Golgi.
- Home page de David Stephens (http://www.embl-heidelberg.de/~stephens/). Contiene enlaces a algunos recursos de microscopía así como a recursos de información.
- GFP en el Golgi de plantas (http://www.brookes.ac.uk/bms/research/molcell/hawes/gfp/gfp.html). Colección de imágenes y videos en los que se ve GFP-tagged proteinas en el Golgi de plantas. Con comentarios.

Tema : Regulación del ciclo celular

- Direcciones web recogidas en Pines, J., Toldo, L. y Lafont, F. (1999) COCB 11: 651-652
- Direcciones web recogidas en Futcher, B., Pines, J. y Lafont, F. (2000) COCB 12 : 653-654

Prácticas de Biología celular: www.ub.es/biocel/practica.htm
Página Web de la asignatura: www.bio.ub.es/~mreina/deocencia/curso0001.htm

ARTÍCULOS CITADOS EN CLASE

Microtúbulos y proteínas asociadas a los microtúbulos.

- A. Desai y Th. J. Mitchinson (1997). "Microtubule polymerization dynamics" Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 13 : 83-117.
- Eva Nogales (2000) "Structural insights into microtubule function". Annu. Rev. Biochem. 69 : 277-302.
- Kenneth H. Downing and Eva Nogales (1998). "Tubulin and microtubule structure". Curr. Op. Cell Biol. 10 : 16-22.
- M.A. Jordan y L. Wilson (1998). "Microtubules and actin filaments : dynamic targets for cancer chemotherapy". Curr. Op. Cell Biol. 10 : 123-130.
- Cassimeris, L. (1999). "Accessory protein regulation of microtubule dynamics throught the cell cycle" COCC 11 : 134-141.
- Joshi, H.C. (1998). "Microtubule dynamics in living cells" COCB 10 : 35-44
- Goldstein, L.S.B. y Yang, Z (2000). "Microtubule based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins" Annu. Rev. Neurosci. 23 : 39-71
- Manning, B.D. y Snyder, M. (2000) "Drivers and passenger wanted!. The role of kinesin-associated proteins". TCB 10 : 281-289
- Woehlke, G. y Schliwa, M. (2000). "Directional motility of kinesin motor proteins". Biochimic. Biophys Acta 1496: 117-127

Núcleo - organización

- Marshal, I.B.C. y Wilson, K.L. (1997). "Nuclear envelope assembly after mitosis". TCB 7 : 69-74
- Collas, Ph.C. y Courvalin, J.C. (2000) "Sorting nuclear membrane proteins at mitosis". TCB 10 : 5-8
- Belmont, A.S., Dietzel, S., Nye, A.C., Strukov, Y.G. y Tumbar, T. (1999). "Large scale chromatin and function" COCB 11 : 307-311
- Collins, K (1996). "Structure and function of telomerase" COCB 8 : 374-380
- Newport, J., y Yang, H. (1996). "Organization of DNA into foci during replication". COCB 8 : 365-368
- Grunstein, M. (1997). "Molecular model for telomeric heterochromatin in yeast". COCB 9 : 383-387
- Collins, K. (2000). "Mammalian telomeres and telomerase" COCB 12 : 378-383
- Kaufman, P.D. (1996). "Nucleosome assembly : the CAF and the HAT". COCB 8 : 369 - 373.
- Cheung, W.L., Briggs, S.D. y Allis, C.D. (2000). "Acetylation and chromosomal functions" COCB 12 : 326 - 333
- Choo, K.H.A. (2000). "Centromerization" TCB 10 : 182 - 188
- Pidoux, A.L. y Allshire, R.C. (2000) "Centromeres : getting a grip of chromosomes" COCB 12 : 308 - 319
- Shaw, P.J. y Jordan, E.G. (1995). "The nucleolus". Annu. Rev. Cell and Dev. Biol. 11 : 93 - 121
- Scheer, U. y Hock, R. (1999) "Structure and function of the nucleolus" COCB 11 : 385 - 390.
- Olson, M.O.J., Dundr, M., Szebeni, A. (2000) "The nucleolus : an old factory with unexpected capabilities". TCB 10 : 189 - 196
- Stoffler, D., Fahrenkrog, B. y Aebi, U. (1999). "The nuclear pore complex : from molecular architecture to functional dynamics" COCB 11 : 391-401 (filename : cocb11-3-19.pdf, Kb)
- Ryan, K.J., Wente, S.R. (2000). "The nuclear pore complex : a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm" COCB 12 : 361-371
- Fischer, U., Michael, W.M., Lührmann, R. y Dreyfuss, G. (1996). "Signal-mediated nuclear export pathways of proteins and RNAs" TCB 6 : 290-293
- Adam, S.A. (1999). "Transport pathways of macromolecules between the nucleus ans the cytoplasm". COCB 11 : 402-406
- Michael, W.M. (2000). "Nucleocytoplasmic shuttling signals : two for thew price of one" TCB 10 : 46-50
- Azuma, Y. y Dasso, M. (2000). "The role of RAN in nuclear function". COCB 12 : 302-307
- Wilson, K.L. (2000). "The nuclear envelope, muscular distrophy and gene expression" TCB 10 : 125-129

Proteínas citosólicas

- Kirschner, M (1999) "Intracellular proteolysis" TCB 9 : M42-M45

- Hee Lee, D., Goldberg, A.L. (1998). "Proteasome inhibitors : valuable tools for cell biologists" TCB 8 : 397-403

- Jackson, P.K., Eldridge, A.G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J.Y., Kaiser, B. K. y Reimann, J.D.R. (2000). "The lore of RINGs : substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases" TCB 10 : 429 - 439

Retículo endoplasmático rugoso

- Zheng, N., y Gierasch, L.M. (1996). "Signal sequences : the same yet different" Cell 86 : 849-852

- Martoglio, B. y Dobberstein, B. (1998). "Signal sequences : more than just greasy peptides" TCB 8 : 410 - 415

- Johnson, A.E. (1997). "Protein translocation at the ER membrane : a complex process becomes more so" TCB 7 : 90 - 95

- Hedge, R.S. y Lingappa, V.R. (1999). "Regulation of protein biogenesis at the endoplasmic reticulum membrane" TCB 9 : 132 - 137

- Teter, S.A. y Klionsky, D.J. (1999). " How to get a folded protein across a membrane" TCB 9 : 428 - 431

Transporte entre RE y Golgi / Complejo de Golgi

- Klumperman, J. (2000). "Transport between ER and Golgi" COCB 12 : 445-449

- Glick, B.S. (2000)."Organization at the Golgi apparatus" COCB 12 : 450-456

Tráfico vesicular

- Barinaga, M. (1993). "Secrets of secretion revealed" Science, 260 : 487 - 489

- Kirchausen, T., Bonifacino, J.S., Riezman, H. (1997). "Linking cargo to vesicle formation : receptor tail interactions with coat proteins" COCB 9 : 488 - 495.

- Chavrier, Ph y Goud, B. (1999). "The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport". COCB 11 : 466-475

- Mayer, A, (1999). "Intracellular membrane fusion : SNAREs only?"COCB 11 : 447 - 452

- Wieland, F., Harter, C. (1999). "Mechanism of vesicle formation : insights from the COP system". COCB 11 : 440 - 446

- Niemann, H., Blasi, J., Jahn, R. (1994). "Clostridial neurotoxins : new tools for dissecting exocytosis". TCB 4 : 179 - 185.

- Hay, J.C., y Scheller, R.H. (1997). "SNAREs and NSF in targeted membrane fusion". COCB 9 : 505-512

Secreción constitutiva / regulada

- Martin, Th. J. (1997). "Stages of regulated exocytosis". TCB 7 : 271 - 276

- Arvan, P. y Castle, D. (1992). "Protein sorting and secretion granule formation in regulated secretory cells". TCB 2 : 327-331

- Bauerfeind, R., Huttner, W.B. (1993). "Biogenesis of secretory vesicles, secretory granules and synaptic vesicles". COCB 5 : 628-635

- Monck, J.R. y Fernandez, J.M. (1996). "The fusion pore and mechanism of biological membrane fusion". COCB 8 : 524-533

- Weimbs, Th., Hui Low, S., Chapin, S.J. y Mostov, K.E. (1997). "Apical targetting in polarized epithelial cells : there's more afloat than rafts". TCB 7 : 393-399.

Endocitosis

- Battey, N.H., James, N.C., Greenland, A.J., Brownlee, C. (1999). "Exocytosis and endocytosis". The Plant Cell 11 : 643-659.

- Marks, M.S., Ohno, H., Kirchhausen, T., Bonifacino, J.S. (1997). "Protein sorting by tyrosine based signals : adapting to the Ys and wherefores". TCB 7 : 124-128

- Gruenberg, J. and Maxfield, F.R. (1995). "Membrane transport in the endocytic pathway". COCB 7 : 552-563

- Seaman, M.N.J., Burd, Ch. G., Emr, S.D. (1996). "Receptor signalling and the regulation of endocytic membrane". COCB 8 : 549-556.

- Overath, P., Stierhof, Y.D., Wiese, M. (1997). "Endocytosis and secretion in trypanosomatid parasites - tumultuous traffic in a pocket". TCB 7 : 27 - 33.

- Marsh, M., Pelchen-Matthews, A., Hoxie, J.A. (1997). "Roles for endocytosis in lentiviral replication". TCB 7 : 1 - 4.

Mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas

- Glover, L.A. y Lindsay, G. (1992). "Targeting proteins to mitochondris : a current overview". Biochem. J. 284 : 609 - 620.
- Theg, S.M. y Scott, S.V. (1993). "Protein import into chloroplasts". TCB 3 : 186 - 190.
- Haucke, V. y Schatz, G. (1997). "Import of proteins into mitochondria and chloroplasts". TCB 7 : 103-106
- Schneider, A. y Marechal.Drouard, L. (2000). "Mitochondrial tRNA import : are there distinct mechanisms?". TCB 10 : 509-513
- Schneider, A. (1994). "Import of RNA into mitochondria". TCB 4 : 282 - 286.
- Subramani, S. (1996). "Convergence of model systems for peroxisome biogenesis". COCB 8 : 513-518.
- ERdman,,, R., Veenhuis, M., Kunau, W.H. (1997). "Peroxisomes : organelles at the crossroads". TCB 7 : 400-407

Regulación del ciclo celular

- Murray, A., y Hunt, T. (1993)- "The cell cycle : an introduction". Oxford Univ. Press
- Lew, D.L. y Kornbluth, S. (1996) "Regulatory reoles of cyclin dependent kinase phosphorilation in cell cycle control·". COCB 8 : 795-804 (filename : jcel_cb8614
- Osmani, S.A. y Ye, X.S. (1997) "Targets of checkpoints controlling mitosis : lessons from lower eukaryotes". TCB 7 : 283 - 288.
- Walworth, N.C. (2000). "Cell-cycle checkpoint kinases : checking in on the cell cell cycle" COCB 12 : 697-704
- Takizawa, Ca.G., y Morgan, D.O. (2000). "Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C" COCB 12 : 658-665
- Harbour, J.W. y Dean, D.C. (2000). "Chromatin remodelling and Rb activity" COCB 12 : 685-689
- Lundberg, A.S., Hahn, W.C., Gupta, P., Weinberg, R.A. (2000). "Genes involved in senescence and inmortalization" COCB 12 : 705-709
- Ekholm, S.V. y Reed, S.I. (2000). "Regulation of G1 cyclin-dependent kinases in the mamalian cell cycle". COCB 2000 : 676-684
- Nebreda, A.R. y Ferby, I. (2000). "Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes" COCB 12 : 666-675
- Lohrum, M.A., Vousden, K.H. (2000). "Regulation and function of the p53-related proteins : same family, different rules" TCB 10 : 197-202