

REGULACIÓN DE LA CALCIO ATPASA DE MEMBRANA PLASMÁTICA POR EL CITOESQUELETO DE ACTINA

Marianela G. DALGHI^{1,*,#}, Mariela FERREIRA-GOMES¹ & Juan Pablo ROSSI^{1,*}

¹IQUIFIB – Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas, Conicet/UBA, Junín 956 (1113) Buenos Aires, Argentina

*Dirigir correspondencia a Juan Pablo F.C. Rossi (vonckers@gmail.com) y Marianela G. Dalghi (mgd29@pitt.edu).

RESUMEN	3
SUMMARY.	4
EL ENTRAMADO CELULAR	4
LAS CÉLULAS SE MUEVEN	5
POLIMERIZACIÓN-DESPOLIMERIZACIÓN DE LA ACTINA	5
CÓMO SE MUEVEN LAS CÉLULAS	7
LA FUNCIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA EN LA REGULACIÓN DEL TRANSPORTE DE CALCIO A TRAVÉS DE LA MEMBRANA	8
REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PMCA POR ACTINA	9
MODELO Y CONCLUSIONES	12
GLOSARIO	13
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14

RESUMEN

Las asociaciones entre los componentes de la membrana plasmática y el citoesqueleto cortical son consideradas ya no sólo de naturaleza estructural y mecánica sino que hoy en día son reconocidas como interacciones dinámicas que modulan una plétora de respuestas celulares. Los filamentos de actina se reorganizan ante la aparición de diversos estímulos, entre los que se destaca el aumento de Ca^{2+} citosólico, que participa en la motilidad celular y la adherencia, la fagocitosis, la citoquinesis y la secreción. La dinámica de la actina participa en la regulación del transporte iónico a través de las membranas donde no sólo juega un papel clave en la entrega y la estabilización de los canales y transportadores de la membrana plasmática, sino también en la regulación de su actividad. Hemos descrito recientemente la interacción funcional entre la actina y la membrana plasmática Ca^{2+} -ATPasa (PMCA), lo que representa un nuevo mecanismo regulador de la bomba al tiempo que presenta un nuevo camino por el que participa el citoesqueleto de actina cortical en la regulación de la homeostasis del Ca^{2+} citosólico. En este trabajo de revisión, resumimos el conocimiento actual de la interacción entre el citoesqueleto cortical y la PMCA y discutimos los mecanismos posibles que explican la modulación de la bomba de calcio.

Palabrasclave: PMCA, actina, citoesqueleto, modulación, calcio.

[#]Dirección actual: Renal-Electrolyte Division, School of Medicine, University of Pittsburgh, 982 Scaife Hall, 3550 Terrace St., Pittsburgh, PA 15261. Phone: +14123838892. E-mail: mgd29@pitt.edu.

SUMMARY.**REGULATION OF THE PLASMA MEMBRANE CALCIUM ATPASES BY THE ACTIN CYTOSKELETON**

Associations between the cortical cytoskeleton and the components of the plasma membrane are no longer considered to be merely of structural and mechanical nature but are nowadays recognized as dynamic interactions that modulate a plethora of cellular responses. Reorganization of actin filaments upon diverse stimuli –among which is the rise in cytosolic Ca^{2+} – is involved in cell motility and adhesion, phagocytosis, cytokinesis, and secretion. Actin dynamics also participates in the regulation of ion transport across the membranes where it not only plays a key role in the delivery and stabilization of channels and transporters in the plasma membrane but also in the regulation of their activity. The recently described functional interaction between actin and the Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) represents a novel regulatory mechanism of the pump at the time that unveils a new pathway by which the cortical actin cytoskeleton participates in the regulation of cytosolic Ca^{2+} homeostasis. In this review, we summarize the current knowledge on the interaction between the cortical actin cytoskeleton and the PMCA and discuss the possible mechanisms that may explain the pump's modulation.

Key words: PMCA, actin, cortical cytoskeleton, modulation, calcium.

EL ENTRAMADO CELULAR

El citoesqueleto de las células eucarióticas consta principalmente de estructuras filamentosas compuestas de distintos polímeros lineales. Considerando los monómeros que componen estos polímeros y el diámetro de sus filamentos, se pueden diferenciar principalmente tres clases de estructuras. Estas son el citoesqueleto compuesto de microfilamentos de actina (6 a 10 nm de diámetro) (Korn *et al.*, 1987), el de filamentos intermedios (7 a 11 nm de diámetro) (Steinert & Liem, 1990) y el de microtúbulos (25 nm de diámetro) (Bayley, 1990). Una característica común de los filamentos del citoesqueleto es que son polímeros unidimensionales, es decir, estructuras en las que una de sus dimensiones es significativamente mayor que las otras dos. Así, el largo de los polímeros puede llegar a varios micrómetros mientras que el diámetro de los monómeros está en el orden de los nanómetros. Adquiere una relevancia especial en las células animales, que carecen de pared celular rígida, pues mantiene la estructura y la forma de la célula.



Figura 1. Entramado celular. Fibroblastos mostrando el citoesqueleto celular. Microscopía de fluorescencia de dos fibroblastos mostrando su núcleo en verde y el citoesqueleto. El citoesqueleto está constituido por los microtúbulos en amarillo y los filamentos de actina en azul-violeta. El citoesqueleto en su conjunto establece la estructura celular, le permite moverse y asiste en el movimiento de organelas y vesículas dentro de la célula. Los fibroblastos son células que forman el tejido conectivo y son responsables de la secreción de proteínas como el colágeno. Magnificación x 980 cuando se imprime en 10 cm de ancho. (Tomado de [Wittmann, 2017](#)).

LAS CÉLULAS SE MUEVEN

La polimerización controlada de actina y tubulina es responsable de la movilidad de las células eucariotas y de la forma de éstas. El movimiento celular es el resultado de la acción coordinada de formación de extensiones, adherencias y retracciones de la membrana, en donde la red de actina y las interacciones entre estas y los motores moleculares juegan un papel fundamental. Los microtúbulos controlan la distribución espacial de estas actividades, creando una polarización de la célula que determina la dirección del movimiento.

El monómero de actina (actina-G) es una proteína globular en forma de pera, compuesta por una sola cadena polipeptídica de 42 kDa que se mantiene como monómero en condiciones no fisiológicas de baja fuerza iónica. En presencia de Mg^{2+} o de fuerza iónica equivalente a la fisiológica, la actina se polimeriza a través de asociaciones no covalentes para formar filamentos helicoidales dobles con sentido dextrógiro (actina-F), constituidos por miles de monómeros (Korn et al., 1987).

Este proceso es favorecido por la presencia de ATP, y mientras que el nucleótido y el monómero no sean factores limitantes de la reacción de polimerización, el filamento continúa su polimerización desde ambos extremos. Ambos extremos presentan propiedades diferentes que, basados en el patrón de flecha creado cuando las cabezas de miosina se unen a actina (Pollard y Cooper, 1986), se conocen como extremos agudo y romo, siendo este último el que adiciona preferentemente monómeros durante el proceso de polimerización (Pollard y Mooseker, 1981).

Se han estudiado intensivamente las funciones biológicas de la actina polimérica. El ejemplo más investigado son los filamentos finos del músculo, que junto con los filamentos gruesos de miosina, proveen las bases mecano-químicas de la contracción muscular. No obstante, también es importante en las actividades motiles de células no musculares: locomoción celular, citocinesis, fagocitosis, retracción del coágulo en plaquetas, y agrupación de receptores de la superficie celular inducida por ligandos, son algunos ejemplos de células no musculares que se piensa que son fundamentalmente similares a la contracción muscular (Korn et al., 1987).

En células no musculares, las polimerizaciones y despolimerizaciones extensas del citoesqueleto son posiblemente procesos continuos y regulados, con filamentos de actina desapareciendo y reapareciendo en diferentes tiempos y lugares a medida que se necesitan para funciones específicas (Korn *et al.*, 1987).

POLIMERIZACIÓN-DESPOLIMERIZACIÓN DE LA ACTINA

La actina-G se une de manera no covalente a una molécula de ATP y a un ion metálico divalente, que puede ser Ca^{2+} o Mg^{2+} ; aunque se supone que en la célula el catalizador es el Mg^{2+} (Carlier, 1991). El ATP es hidrolizado a ADP unido a actina-F y fosfato inorgánico (Pi) durante la polimerización, en un proceso que involucra la formación transitoria de actina F-ADP.Pi. El ATP no se resintetiza cuando la actina-F se despolimeriza, pero el ADP unido a los monómeros de actina-G que se disocian en el extremo del filamento se intercambia por ATP en solución y se regenera la actina-G-ATP. Por lo tanto, la despolimerización no es simplemente el proceso contrario a la polimerización (Dos Remedios et al., 2003). La polimerización resulta en una continua hidrólisis de ATP, y en este sentido, la actina es una ATPasa (Korn et al., 1987).

El mecanismo de polimerización de la actina puede ser dividido convenientemente en cuatro pasos (Pollard, 1986):

1. Activación: unión de sales y cambios conformacionales en los monómeros.
2. Nucleación: la formación de oligómeros que tienen mayor probabilidad de crecer en filamentos que descomponerse a monómeros.
3. Elongación: el crecimiento bidireccional de los polímeros.
4. Unión extremo con extremo de dos filamentos.

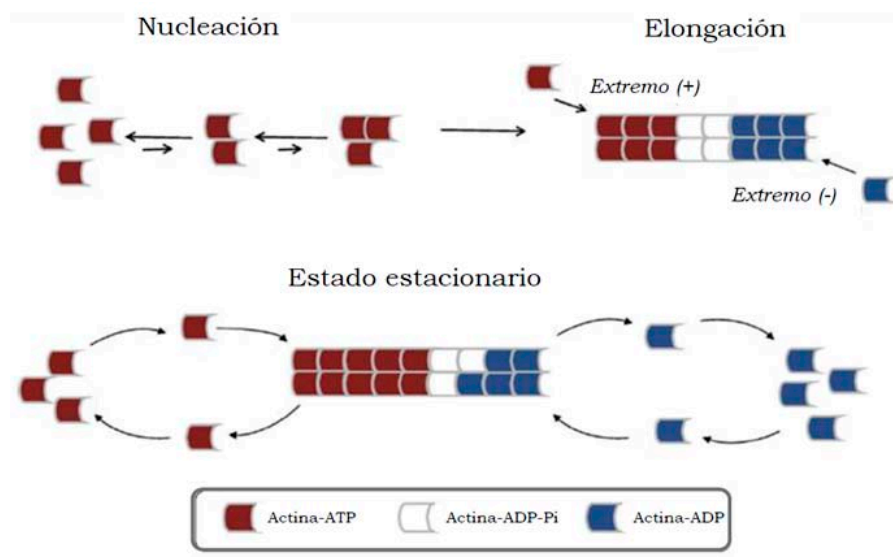


Figura 2. Esquema del proceso de polimerización de la actina. La etapa de nucleación consiste en la formación de un agregado de actina con mayor tendencia a elongar que a disociarse, en este esquema está representado como un trímero. Durante la etapa de elongación se unen rápidamente los monómeros de actina al filamento en formación. En el estado estacionario no hay crecimiento neto del filamento. Los filamentos presentan tres regiones: el extremo (+) rico en actina-ATP, el centro de actina-ADP-Pi y el extremo (-) con actina-ADP. (Imagen modificada de Kustermans *et al.*, 2008).

Todos estos pasos son reversibles. Debido a que la nucleación, o sea la asociación de monómeros - probablemente trímeros (Cooper *et al.*, 1983) o tetrámeros (Tobacman & Korn, 1983)- en un núcleo pequeño y termodinámicamente inestable es lenta y limitante, la polimerización espontánea de los monómeros se caracteriza por una fase de latencia al principio seguida por una fase rápida, en la que el núcleo crece hasta convertirse en largos filamentos, con poca acumulación de oligómeros de tamaños intermedios (Korn *et al.*, 1987). La elongación ocurre en ambos extremos del filamento, pero más rápidamente en los extremos romos, que en los agudos. (Pollard & Mooseker, 1981). La elongación termina cuando la concentración de monómeros decrece hasta la concentración crítica, que es la concentración de monómeros a la que la velocidad de disociación de monómeros de los extremos del filamento iguala a la tasa de adición de monómeros (Korn *et al.*, 1987). En condiciones fisiológicas la concentración crítica para el extremo agudo es 12 a 15 veces mayor que para el extremo romo (Wegner & Isenberg, 1983). Esta diferencia puede resultar

en el crecimiento unidireccional del filamento de actina debido al continuo flujo de subunidades de actina desde el extremo agudo hacia el romo, lo cual se llama “*treadmilling*”, que describe el proceso de sacar unidades en un extremo y agregarlas en el otro (Dos Remedios *et al.*, 2003).

CÓMO SE MUEVEN LAS CÉLULAS

Para que una célula polarizada pueda moverse eficientemente, su frente tiene que coordinar las actividades de extensión, retracción y adhesencia. El movimiento delantero comienza con la formación de una saliente, que requiere la polimerización de la actina en lamellipodia y filopodios, la estructura principal de una migración de la célula. Al final de la saliente, el frente de la célula se retrae un poco y luego se adhiere a la matriz extracelular. Esas acciones ocurren en la laminilla, la estructura que se encuentra detrás es la lamellipodia. La laminilla recluta a la proteína contráctil miosina y desarma la F-actina o actina polimérica -en forma de cinta de correr- para formar complejos de adhesión focal nacientes de una manera dinámica. Después de una adhesión exitosa, otro ciclo de saliente comienza con la polimerización de la actina de los complejos de adhesión célula-matriz recién creada. Tales ciclos de saliente - leve retracción y adhesencia - se repiten para que la porción delantera de la célula se adelante, de manera que se movería como una oruga. (Tsai *et al.*, 2015).

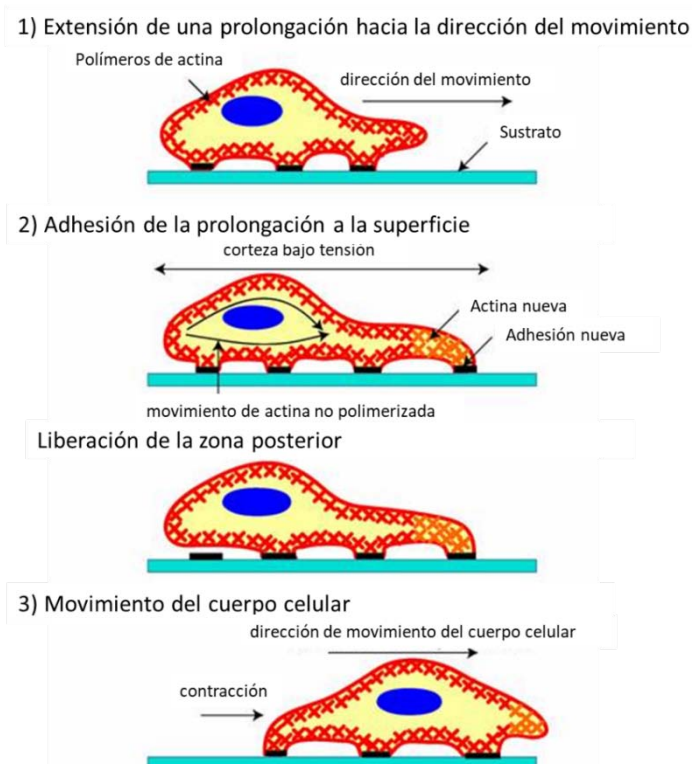


Figura 3. Esquema del movimiento celular. Se muestran las tres etapas del movimiento celular: luego de recibir el estímulo que determina la dirección del movimiento, la célula extiende una protuberancia en la dirección del movimiento por la polimerización de actina hacia el frente. Luego, adhiere esta prolongación a la superficie y luego adhiere la parte posterior del cuerpo celular. Finalmente, desplaza todo el cuerpo celular hacia adelante mediante las fuerzas contráctiles generadas por el cuerpo celular. Adaptado de Ananthakrishnan & Ehrlicher, 2007.

LA FUNCIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA EN LA REGULACIÓN DEL TRANSPORTE DE CALCIO A TRAVÉS DE LA MEMBRANA

La regulación del citoesqueleto cortical de actina sobre el transporte a través de la membrana plasmática involucra por lo menos a dos mecanismos diferentes, que son: (i) la regulación sobre los parámetros cinéticos del transportador y (ii) la modificación en el número de moléculas del transportador por unidad de área de membrana (Khurana, 2000). Nos referiremos sólo a las bases moleculares que modifican al transportador.

Los cambios en la dinámica del citoesqueleto de actina modifican la fluidez de la membrana plasmática y el movimiento lateral de los lípidos lo que altera la organización estructural de los componentes presentes en ella. Estos cambios pueden regular la función de las proteínas de membrana por cambios en las asociaciones entre ellas y con los lípidos que las circundan (Kusumiet *al.*, 2005). Se ha observado que la alteración en la fluidez de la membrana asociada a la modificación en el citoesqueleto cortical de actina aumenta la actividad de la Na^+, K^+ -ATPasa en la membrana basolateral en los túbulos proximales del riñón (Molitoris *et al.*, 1992).

A su vez, la dinámica del citoesqueleto de actina puede modificarse por los lípidos de la membrana, ya sea por interacción directa con estos (Gicquaud, 1993) o a través de la regulación de la interacción con ABPs por medio de mensajeros lipídicos (Janmey&Stossel, 1987). Experimentos realizados *in vitro* mostraron que la actina se une directamente a lípidos con carga neta a través de interacciones electrostáticas, dicha unión induce cambios conformacionales en la molécula de actina-G lo que resulta en cambios en su capacidad de polimerizar (Bouchard *et al.*, 1998). Por otro lado, en un contexto celular se observó que el PIP2 provoca la disociación del complejo actina-profilina, lo que promueve la polimerización. La generación de IP3 por la ruptura de PIP2, genera la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, por estimulación de los receptores (IP3R) del retículo endoplásmico. El aumento de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático activa a las proteínas que cortan a los largos filamentos de actina y a las que nucleon monómeros, llevando de esta manera a la formación de oligómeros de actina. En conjunto todos estos factores demuestran la compleja interrelación que existe entre la membrana y el citoesqueleto cortical.

Por otro lado, los cambios en la dinámica del citoesqueleto de actina ante estímulos mecánicos u osmóticos le permiten a la célula deformarse y cambiar su morfología y volumen celular. Se ha observado que el citoesqueleto está involucrado en la regulación de la actividad de ciertos transportadores de membrana que son afectados por dichos estímulos. Como ejemplo, nos referiremos al cotransportador de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ presente en el epitelio intestinal. Este se activa cuando las células se ponen en contacto tanto con un medio hiper como hipoosmolar. Matthews *et al.* (1998) demostraron el papel del citoesqueleto utilizando drogas que alteran la polimerización de la actina. Cuando las células se incubaron en un medio hipertónico, la activación del transportador se inhibió por el agregado de citocalasina-D (agente despolimerizante), mientras que la adición de faloidina (agente polimerizante y estabilizante de filamentos) no mostró efecto sobre la activación. De manera inversa, la activación del transportador inducida por un medio hipotónico fue revertida por el agregado de faloidina mientras que la citocalasina-D no mostró efecto. Estos resultados muestran que la regulación de la actividad del transportador en los procesos de cambio de volumen celular estaría estrechamente relacionada con el grado de polimerización de los filamentos de actina.

Finalmente, se le atribuye al citoesqueleto de actina un papel directo sobre la regulación de ciertos transportadores. Se ha observado que la actividad del canal epitelial de Na^+ , ENaC, está regulada por interacción directa con la actina como pudo observarse a través de experimentos *in vitro* donde el agregado de actina polimerizada del lado citoplasmático del canal aumentó el número de canales abiertos (Cantiello *et al.*, 1991), mientras que el agregado de actina-G disminuyó la conductancia del canal (Berdiev *et al.*, 2001). También se demostró que la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa está regulada por la unión directa a actina (Cantiello, 1995), en este caso la actividad de la bomba aumenta por la presencia de cortos oligómeros. Kurashima *et al.*, (1999) mostraron que el estado de polimerización de la actina afecta la actividad del intercambiador Na^+/H^+ (NHE3), observando que su actividad disminuye tanto cuando se induce la polimerización como cuando se promueve la disociación de los filamentos, y sugirieron que dicha regulación podría estar dada por la asociación directa con proteínas del citoesqueleto de actina. Se observó que la H^+ -ATPasa se une directamente a los microfilamentos, como mostraron Chen *et al.*, (2004) a través de experimentos de co-inmunoprecipitación e inmunocitoquímica en osteoclastos. La función fisiológica de dicha interacción se relacionaría con la regulación de pH, pero el papel concreto de esta unión aún no se ha establecido.

Hay evidencias que demuestran que la PMCA está asociada al citoesqueleto de actina y que esta interacción está involucrada en su localización y distribución dentro de la membrana plasmática (Zabe & Dean, 2001; Kip *et al.*, 2006). Dean & Whiteheart (2004) demostraron a través de experimentos de microscopía de inmunofluorescencia que el citoesqueleto de actina participa en la translocación de la PMCA a los filopodios de las plaquetas, que ocurre cuando estas se activan.

También se ha visto que la PMCA forma parte de un complejo con proteínas del citoesqueleto en el que están presentes la CLP36, la α -actinina y la actina (Bozulic *et al.*, 2007). Estos estudios, llevados a cabo en plaquetas, muestran que cuando las células se encuentran en reposo, la PMCA se localiza en regiones asociadas a porciones del citoesqueleto donde la actina se encuentra bajo la forma no-filamentosa.

Por otro lado, Kip *et al.* (2006) mostraron que, durante la maduración de las neuronas del hipocampo, la PMCA se concentra en las dendritas y co-localiza con las regiones ricas de actina de las espinas dendríticas.

Nuestro grupo de trabajo es el primero en mostrar evidencias del papel funcional de la interacción entre el citoesqueleto de actina y la PMCA y en demostrar la unión directa entre ambas proteínas (Vanagas *et al.*, 2007, 2013; Dalghiet *et al.*, 2013, 2017a, 2017b).

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PMCA POR ACTINA

Vanagas *et al.*, (2007) observaron que al disminuir la concentración de proteína total de membrana - obtenidas a partir de eritrocitos humanos - la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA presente en estas muestras aumentaba. Este fue un resultado inesperado ya que la actividad de una enzima no cambia en función de la concentración de proteína. Este hallazgo nos llevó a pensar que habría algún componente en la membrana que al diluir podía activar o interrumpir la inhibición de la bomba. Dicho componente podía tratarse del citoesqueleto de actina cortical el cual permanece asociado a la membrana plasmática durante la preparación de la muestra (Purich & Southwick, 1999; Karr *et al.*, 1980). Diferentes estrategias experimentales permitieron validar esta hipótesis (Vanagas *et al.*, 2013). Se descartaron experimentalmente diferentes explicaciones plausibles tales como la accesibilidad diferencial a los sustratos a la bomba o una activación diferencial de la bomba por CaM a diferentes concentraciones de proteína de membrana.

Estas observaciones nos motivaron a explorar más a fondo la aparente regulación diferencial que la actina podría ejercer sobre la actividad de la PMCA en función de su estado de polimerización (Dalghi et al., 2013; Vanagas et al., 2013). Para probar que la actina tenía un comportamiento dual, se estudió el efecto de añadir G-actina a PMCA4b purificada a partir de glóbulos rojos humanos y se monitorizó en tiempo real la actividad de PMCA y la polimerización de actina (Figura 4). Este fue un experimento clave que nos permitió determinar que la activación máxima de la bomba ocurría durante los primeros minutos después de iniciada la reacción (~ 7 veces el valor de control), que correspondía a los pasos iniciales en la polimerización de actina (es decir, G-actina y oligómeros cortos). A medida que progresó la polimerización de actina, la magnitud de la activación de la PMCA disminuyó. En etapas posteriores, la actividad de la PMCA se inhibió, alcanzando ~ 50% del valor de control. Así es como atribuimos el efecto inhibitorio a la F-actina y para probar esto incubamos PMCA4b con actina prepolimerizada obteniendo el mismo grado de inhibición.

La estimulación de la PMCA es una característica clave porque esta enzima generalmente muestra una baja actividad basal. Luego, estuvimos especialmente interesados en caracterizar lo que ocurre en las primeras etapas de polimerización (es decir, el efecto de G-actina y oligómeros cortos). El medio requerido para la medición de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la PMCA promueve la polimerización de la actina, por lo tanto, fue necesario emplear métodos sensibles y cortos períodos de tiempo. Cuando la PMCA4b purificada se incubó con concentraciones crecientes de G-actina (hasta 5 μM) durante un corto período de tiempo, es decir, 1 minuto, y su actividad se midió por la liberación de ^{32}P Pi desde ^{32}P ATP (Dalghi y col., 2013), encontramos que la activación de la PMCA mostró una dependencia sigmoidea con la concentración de G-actina (coeficiente de Hill ~ 3-4), esto significa que fue necesario más de una molécula de actina para activar a la PMCA. La polimerización de actina se evaluó en condiciones experimentales idénticas y se observó que la actina estaba en las etapas iniciales de la polimerización (Dalghi et al., 2013). También observamos que la activación de la bomba se correspondía con las concentraciones de actina donde se detectó la polimerización. Todas estas observaciones, junto con el hecho de que el PMCA mostró solo un sitio de unión para G-actina (Dalghiet al., 2013), nos llevó a proponer que los oligómeros de actina, y no la actina G, son responsables del efecto de activación en la bomba.

En estudios posteriores, buscamos determinar si el estado de polimerización del citoesqueleto cortical podría influir en la actividad de la PMCA en una célula intacta de acuerdo a lo que predicen nuestras observaciones in vitro (Dalghiet al., 2017a). Para ello, se sobreexpresó en forma transitoria a la PMCA2 en células HEK293, lo que contribuyó significativamente a atenuar el aumento de Ca^{2+} citosólico derivado de la depleción de ER y del medio extracelular (Pásztyet al., 2015; Dalghiet al., 2017a). Encontramos que la despolimerización de actina, dada por tratamiento con citocalasina D, aumentó significativamente la extrusión de Ca^{2+} mediada por PMCA2 y fue independiente de la fuente de Ca^{2+} que dio origen al transitorio de Ca^{2+} . Por el contrario, cuando la F-actina se estabilizó utilizando jasplakinolida, la actividad de la PMCA fue completamente abolida (Dalghiet al., 2017a).

En ambos casos, descartamos un posible efecto directo de los fármacos sobre la actividad de la PMCA, así como un impacto de la expresión de la PMCA en la membrana plasmática. El hecho de que en una célula viva la polimerización/despolimerización de la actina cortical regule la actividad de PMCA es interesante por numerosas razones. Una de ellas es que los niveles de Ca^{2+} intracelular regulan la polimerización de la actina (Janmey, 1994), y su aumento conduce a la despolimerización de la F-actina en la corteza celular (Waleset al., 2016; Takeshitaet al., 2017).

Similar a lo que ocurre con la activación de la PMCA por el sistema calcio-calmodulina, la actina podría actuar como un sensor de la concentración de calcio citosólico que da como resultado la formación de especies de actina, es decir, oligómeros cortos, que conducen a la activación de PMCA que a su vez da como resultado la restauración de las concentraciones bajas normales de Ca^{2+} . Otra característica interesante de la interacción PMCA-actina, es que la actividad de la PMCA podría alterar potencialmente el estado de polimerización del citoesqueleto cortical mediante la regulación de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular. Esta interacción recíproca no es completamente nueva ya que se ha observado entre el citoesqueleto y canales, receptores y transportadores de membrana (Smaniet *et al.*, 2014; Joseph *et al.*, 2014). En el caso de la PMCA, la hipótesis de una interdependencia recíproca requiere estudios adicionales y es, ciertamente, un tema apasionante de futuras investigaciones en el campo.

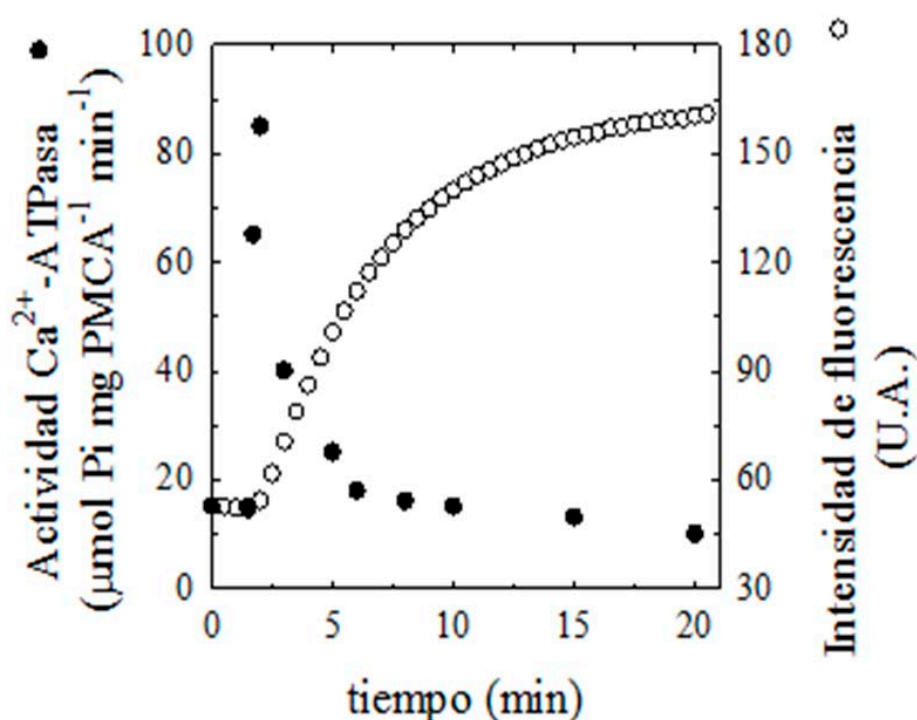


Figura 4. Actividad de la Ca^{2+} -ATPasa (círculos llenos) y polimerización de actina (círculos vacíos) en función del tiempo. La reacción se inició con el agregado de 2 mM de ATP. La reacción de polimerización de actina fue determinada monitoreando la fluorescencia de la actina-pireno, un derivado fluorescente que incrementa su rendimiento cuántico en función del grado de polimerización de la actina. El agregado de ATP promueve simultáneamente la polimerización de actina y la actividad de ATPasa de la PMCA. Esto muestra la correlación entre ambos fenómenos con un efecto activador de la PMCA a tiempos cortos, seguido de una inhibición a tiempos más largos. Extraído de Dalghi *et al.*, 2017b.

MODELO Y CONCLUSIONES

Nuestro grupo de trabajo ha descubierto un nuevo mecanismo regulador de la actividad de la PMCA que involucra al citoesqueleto de actina. Hemos observado que que la actina ejerce una doble regulación de la bomba: los oligómeros cortos de actina aumentan la actividad de la PMCA mientras que la F-actina la inhibe. La interacción directa entre la PMCA y actina promueve un cambio conformacional en la bomba que da como resultado la modulación de su actividad específica que es, al menos en parte, debido a cambios en su afinidad por Ca^{2+} y en los niveles de los intermedios fosforilados en estado estacionario. En células vivas, la extrusión de Ca^{2+} mediada por la actividad de PMCA se ve profundamente afectada por el estado de polimerización del citoesqueleto cortical, lo que confirma aún más el papel relevante de este mecanismo regulador en la biología celular.

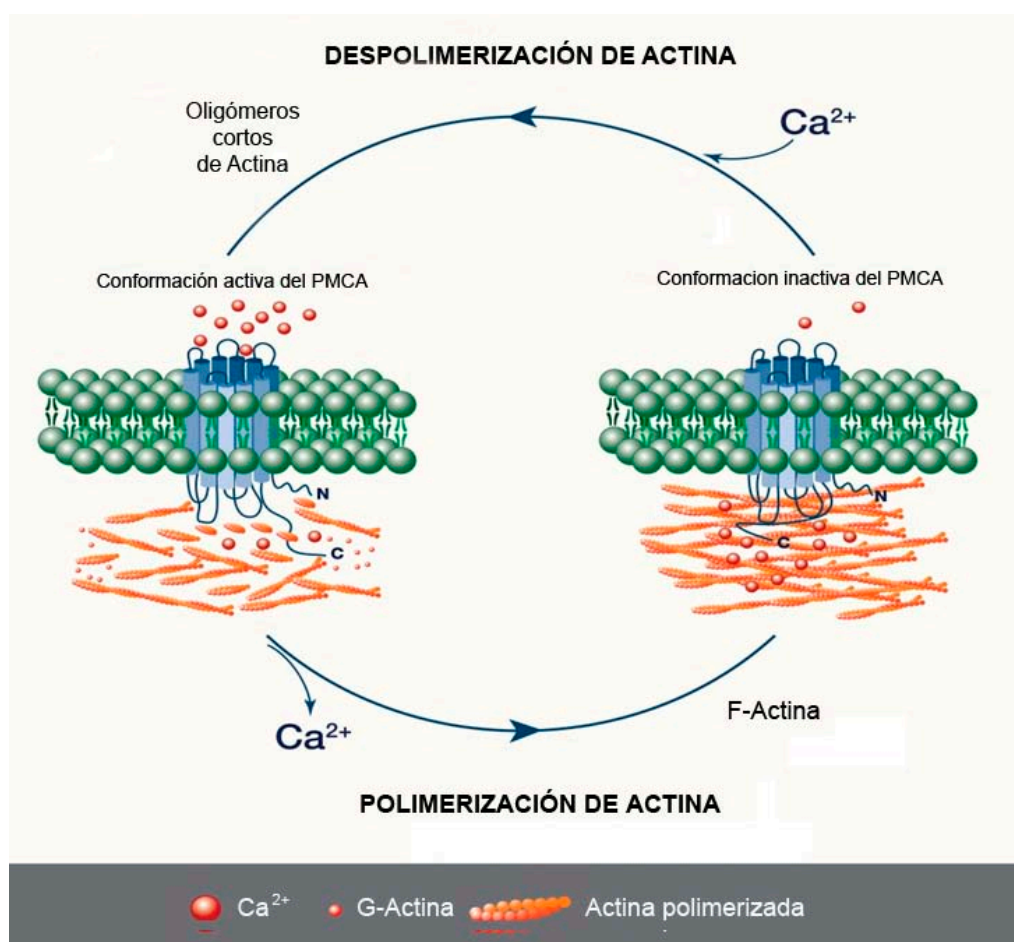


Figure 5. Regulación de la actividad de la PMCA por la actina del citoesqueleto. La actividad de PMCA se incrementa a medida que la actina se despolimeriza (se forma actina G) mientras que el efecto inverso se obtiene cuando la actina se polimeriza (se forma actina F). En este modelo proponemos que un incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico, que induce la despolimerización de actina, resulta en la activación de PMCA la cual a su vez permite restaurar la baja concentración de Ca^{2+} del estado estacionario. Esto a su vez induce la re-polimerización de actina hacia la formación de largos filamentos que previenen la expulsión adicional de Ca^{2+} mediada por las distintas isoformas de PMCAs presentes en las células. Extraído de Dalghiet *al.*, 2017b.

Nuestra hipótesis es que ante un aumento de Ca²⁺ citosólico, que se sabe que induce la despolimerización de actina, las bombas de PMCA se activarán por los oligómeros de actina corta que se forman en la corteza celular, como se muestra en la Figura 5. Esto puede llevar al PMCA a expulsar activamente Ca²⁺ fuera de la célula, que ayuda a restaurar los niveles bajos de Ca²⁺ citosólico. Al disminuir los niveles de Ca²⁺, la actina puede volver a polimerizarse en filamentos largos y la PMCA puede regresar a su estado original. La interacción entre el Ca²⁺, la PMCA y la actina puede ser un mecanismo de retroalimentación versátil que la naturaleza desarrolló para atenuar la toxicidad de la acumulación excesiva de Ca²⁺ en la célula. Las perspectivas de nuestro trabajo están dirigidas a abordar esta hipótesis y estudiar el posible efecto que la actividad de PMCA pueda tener en el estado de polimerización de la actina mediante la regulación de los niveles locales de Ca²⁺. Un modelo interesante para estos estudios puede ser la migración celular, que es un proceso celular esencial involucrado en una variedad de eventos biológicos tales como desarrollo embrionario, curación de heridas, angiogénesis, inflamación y, en condiciones patológicas tales como la metástasis en cáncer (Bernstein, 2015). Durante la motilidad celular, el Ca²⁺ está involucrado en una serie de rearrreglos citoesqueléticos que permiten a la célula generar fuerza y producir movimiento y donde se sabe que la PMCA desempeña un papel clave.

GLOSARIO

Actina-F: actina polimerizada o filamentosa.

Actina-G: Monómero de actina.

Calmodulina: proteína ácida intracelular ubicua que regula la transducción de la señal de calcio.

Citocalasina-D: metabolito de origen fúngico capaz de unirse a filamentos de actina por lo que impide su polimerización y elongación.

Faloidina: micotoxina del grupo de las falotoxinas producida por el hongo *Amanitaphalloides* que impide la despolimerización de filamentos de actina.

Filopodios: proyecciones citoplasmáticas delgadas similares a los lamelipodios que se extienden desde el extremo directriz de células en migración.

HEK293: línea celular proveniente de células de riñón de embrión humano.

IP3: Inositol trifosfato, un segundo mensajero de la transducción de señal celular.

Jasplakinolida: agente estabilizante de la actina filamentosa.

Lamellipodia o lamelipodios: proyección de actina del citoesqueleto en el borde móvil de la célula.

Laminilla: Es la primera capa que se deposita luego de la citocinesis.

PIP2: fosfatidilinositol bifosfato producto obtenido por la escisión del IP3.

Treadmilling: banda sin fin, que ilustra la polimerización de la actina en un extremo a expensas de la despolimerización en el extremo opuesto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ananthakrishnan, R., A. Ehrlicher (2007) The forces behind cell movement. *Int. J. Biol. Sci.* **3**:303-17.
- Bayley, P.M. (1990) What makes microtubules dynamic? *J. Cell Sci.* **95**: 329-34.
- Berdiev, B.K., T.B. Mapstone, J.M. Markert, G.Y. Gillespie, J. Lockhart, C.M. Fuller, et al. (2001) pH alterations 'reset' Ca²⁺ sensitivity of brain Na⁺ channel 2, a degenerin/epithelial Na⁺ ion channel, in planar lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* **276**: 38755-61.
- Bernstein H. (2015) Role of calcium, the actin skeleton, and lipid structures in signaling and cell motility. *Arch. Med.* **51**: 1–10.
- Bouchard M., C. Pare, J.P. Dutasta, J.P. Chauvet, C. Gicquaud, M. Auger (1998) Interaction between G-actin and various types of liposomes: A 19F, 31P, and 2H nuclear magnetic resonance study. *Biochemistry.* **37**: 3149-55.
- Bozulic, L.D., M.T. Malik, D.W. Powell, A. Nanez, A.J. Link, K.S. Ramos, et al. (2007) Plasma membrane Ca(2+)-ATPase associates with CLP36, alpha-actinin and actin in human platelets. *Thromb. Haemost.* **97**: 587-97.
- Cantiello, H.F., J.L. Stow, A.G. Prat, D.A. Ausiello (1911) Actin filaments regulate epithelial Na⁺ channel activity. *Am. J. Physiol.* **261**: C882-8.
- Cantiello, H.F. (1995) Actin filaments stimulate the Na(+)-K(+)-ATPase. *Am. J. Physiol.* **269**: F637-43.
- Carlier, M.F. (1991) Nucleotide hydrolysis in cytoskeletal assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**: 12-17.
- Chen, S.H., M.R. Bubb, E.G. Yarmola, J. Zuo, J. Jiang, B.S. Lee, et al. (2004) Vacuolar H⁺-ATPase binding to microfilaments. *J. Biol. Chem.* **279**: 7988-98.
- Cooper, J.A., S.B. Walker y T.D. Pollard (1983) Pyrene actin: documentation of the validity of a sensitive assay for actin polymerization. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **4**: 253-62.
- Dalghi, M.M., M. Fernández, M. Ferreira-Gomes, I. Mangialavori, E. Malchiodi, E. Strehler, et al. (2013) Plasma membrane calcium ATPase activity is regulated by actin oligomers through direct interaction. *J. Biol. Chem.* **288**: 23380-93.
- Dalghi, M.G., M. Ferreira-Gomes, N. Montalbetti, A. Simonin, E.E. Strehler, M.A. Hediger, et al. (2017a) Cortical cytoskeleton dynamics regulates plasma membrane calcium ATPase isoform-2 (PMCA2) activity. *Biochim. Biophys. Acta.* **1864**: 1413-24.
- Dalghi, M.G., M.S. Ferreira-Gomes y J.P. Rossi (2017b) Regulation of the Plasma Membrane Calcium ATPases by the actin cytoskeleton. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* En prensa. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.151>
- Dean W.L. y S.W. Whiteheart (2004) Plasma membrane Ca(2+)-ATPase (PMCA) translocates to filopodia during platelet activation. *ThrombHaemost.* **91**: 325-33.
- Dos Remedios, C.G., D. Chhabra, M. Kekic, I.V. Dedova, M. Tsubakihara, D.A. Berry, et al. (2003) Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* **83**: 433-73.
- Gicquaud, C. (1993) Actin conformation is drastically altered by direct interaction with membrane lipids: a differential scanning calorimetry study. *Biochemistry.* **32**: 11873-77.
- Janmey, P.A. (1994) Phosphoinositides and Calcium as Regulators of Cellular Actin Assembly and Disassembly. *Annu. Rev. Physiol.* **56**: 169–91.
- Janmey, P.A., T.P. Stossel (1987) Modulation of gelsolin function by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Nature.* **325**: 362-4.
- Joseph, N., B. Reicher, M. Barda-Saad (2014) The calcium feedback loop and T cell activation: how cytoskeleton networks control intracellular calcium flux. *Biochim. Biophys. Acta.* **1838**: 557–68.
- Karr, T.L., D. Kristofferson, D.L. Purich (1980) Mechanism of microtubule depolymerization. Correlation of rapid induced disassembly experiments with a kinetic model for endwise depolymerization. *J. Biol. Chem.* **255**: 8560-6.
- Khurana, S. (2000) Role of actin cytoskeleton in regulation of ion transport: examples from epithelial cells. *J. Membrane Biol.* **178**: 73-87.
- Kip, S.N., N.W. Gray, A. Burette, A. Canbay, R.J. Weinberg y E.E. Strehler (2006) Changes in the expression of plasma membrane calcium extrusion systems during the maturation of hippocampal neurons. *Hippocampus.* **16**: 20-34.
- Korn, E.D., M.F. Carlier y D. Pantaloni (1987) Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science.* **238**: 638-44.

- Kurashima, K., S. D'Souza, K. Szaszi, R. Ramjeesingh, J. Orłowski, S. Grinstein (1999) The apical Na^+/H^+ exchanger isoform NHE3 is regulated by the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.***274**: 29843-9.
- Kustermans, G., N. El Mjiyad, J. Horion, N. Jacobs, J. Piette, S. Legrand-Poels (2008) Actin cytoskeleton differentially modulates NF-kappaB-mediated IL-8 expression in myelomonocytic cells. *Biochem Pharmacol.***76**: 1214-28.
- Kusumi, A., C. Nakada, K. Ritchie, K. Murase, K. Suzuki, H. Murakoshi, et al. (2005) Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.***34**: 351-78.
- Matthews, J.B., J.A. Smith, E.C. Mun y J.K. Sicklick (1998) Osmotic regulation of intestinal epithelial $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport: role of Cl^- and F-actin. *Am. J. Physiol.***274**: 697-76.
- Molitoris, B.A., R. Dahl y A. Geerdes (1992) Cytoskeleton disruption and apical redistribution of proximal tubule Na^+/K^+ -ATPase during ischemia. *Am. J. Physiol.***263**: 488-95.
- Pászty, K., A.J. Caride, Ž. Bajzer, C.P. Offord, R. Padányi, L. Hegedűs, et al. (2015) Plasma membrane Ca^{2+} -ATPases can shape the pattern of Ca^{2+} transients induced by store-operated Ca^{2+} entry. *Sci. Signal.* **8**: ra19.
- Pollard, T.D., J.A. Cooper (1986) Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu. Rev. Biochem.***55**: 987-1035.
- Pollard, T.D., M.S. Mooseker (1981) Direct measurement of actin polymerization rate constants by electron microscopy of actin filaments nucleated by isolated microvillus cores. *J. Cell Biol.* **88**: 654-9.
- Pollard, T.D. (1986) Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J. Cell Biol.***103**: 2747-54.
- Purich, D.L., F.S. Southwick (1999) Energetics of nucleotide hydrolysis in polymer assembly/disassembly: the cases of actin and tubulin. *Methods Enzymol.***308**: 93–111.
- Smani, T., N. Dionisio, J.J. López, A. Berna-erro, J.A. Rosado (2014) Cytoskeletal and scaffolding proteins as structural and functional determinants of TRP channels. *BBA - Biomembr.***1838**: 658–64.
- Steinert, P.M., R.K. Liem (1990) Intermediate filament dynamics. *Cell.***60**: 521-3.
- Takeshita, N., M. Evangelinos, L. Zhou, T. Serizawa, R. Somera-Fajardo, L. Lu, et al. (2017) Pulses of Ca^{2+} coordinate actin assembly and exocytosis for stepwise cell extension. *Proc. Natl. Acad. Sci.***114**: 5701–6.
- Tobacman, L.S., E.D. Korn (1983) The kinetics of actin nucleation and polymerization. *J. Biol. Chem.***258**: 3207-14.
- Tsai, F.C., G.H. Kuo, S.W. Chang, P.J. Tsai (2015) Ca^{2+} Signaling in Cytoskeletal Reorganization, Cell Migration, and Cancer Metastasis. *BioMed. Research International*. vol. 2015, Article ID 409245, doi.org/10.1155/2015/409245.
- Vanagas, L., R.C. Rossi, A.J. Caride, A.G. Filoteo, E.E. Strehler y J.P. Rossi (2007) Plasma membrane calcium pump activity is affected by the membrane protein concentration: evidence for the involvement of the actin cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta.***1768**: 1641-9.
- Vanagas L., M.C. de La Fuente, M. Dalghi, M. Ferreira-Gomes, R.C. Rossi, E.E. Strehler, I.C. Mangialavori y J.P. Rossi (2013) Differential effects of G- and F-actin on the plasma membrane calcium pump activity. *Cell Biochem. Biophys.* **66**: 187-98.
- Wales, P., C.E. Schuberth, R. Aufschneider, J. Fels, I. Garcia-Aguilar, A. Janning, et al. (2016) Calcium-mediated actin reset (CaAR) mediates acute cell adaptations. *Elife.***5**: e19850.
- Wegner, A., G. Isenberg (1983) 12-fold difference between the critical monomer concentrations of the two ends of actin filaments in physiological salt conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.***80**: 4922-5.
- Wittmann, T. Science Photo Library. Disponible en <http://www.gettyimages.com/detail/photo/fibroblast-cells-showing-cytoskeleton-high-res-stock-photography/680801891>. Consultada el 13 de diciembre de 2017.
- Zabe, M. & W.L. Dean (2001) Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase associates with the cytoskeleton in activated platelets through a PDZ-binding domain. *J. Biol. Chem.***18**: 14704-9.