ACTINA: CRISTALIZACION Y ACCION INDUCTORA SOBRE LA DIVISION CELULAR

C. Oriol-Audit *

Biochimie cellulaire, College de France, París 5.

Propiedades de la actina

La actina bajo forma monomérica (G-actina) es una proteína globular de peso molecular 42 500, y diámetro de 50 Å. Tiene la propiedad de polimerizarse y dar lugar a filamentos dobles de estructura helicoidal (F-actina). Estos filamentos en el músculo contienen de 300 a 400 monómeros de actina y su polimerización se favorece por la presencia de sales y cationes divalentes como Ca^{++} y Mg^{++}. La G-actina contiene una molécula de ATP que durante la polimerización se hidroliza en ADP.

Actina muscular

Las dos proteínas contráctiles del músculo son la actina y la miosina. La actina al unirse con la tropomiosina y la troponina forma un conjunto de filamentos finos que se enlazan a la línea Z por uno de sus extremos. Estos filamentos finos al interactuar con los filamentos gruesos de miosina producen la energía necesaria para la contracción muscular.

Actina en otras células

En las células no musculares la actina es el componente proteínico principal y con frecuencia constituye del 10 al 15% de las proteínas totales, alcanza hasta el 20 y 30% en células de gran actividad motora. La miosina en cambio sólo se halla en poca cantidad. La actina participa en muchas funciones celulares tales como: motilidad, división, fagocitosis, sinéresis, variaciones morfológicas, secreción hormonal, distribución y movilidad de antígenos y anticuerpos (en la superficie de la membrana linfocitaria), actividad del cono de crecimiento axonal, pinocitosis, migración premitótica del núcleo, invaginación de la gástrula y otras.

Dos modelos estructurales

En algunos procesos celulares esta motilidad difiere del modelo muscular porque en el músculo la actina se mantiene siempre polimerizada en filamentos. Así, en el proceso acrosomal por ejemplo, la motilidad puede producirse por la polimerización rápida de la actina sin intervención de la miosina o por cambios morfológicos de la actina (1). Además, en los procesos celulares tales como la división o la fagocitosis, la polimerización de los filamentos de actina es reversible.

Dos tipos de investigación

Estas observaciones hacen suponer que para comprender el mecanismo de los movimientos celulares basados en la polimerización de la actina es indispensable por un lado comprender el mecanismo físico-químico de la polimerización proteínica, y por otro debemos encontrar los factores biológicos que inducen a esta polimerización. Es por tales razones que hemos realizado nuestros estudios sobre la actina en dos vías: la que nos condujo a la cristalización de la actina y la que nos permitió descubrir los factores inductores de la división celular.

* Doctora en Ciencias, Universidad de París.

Cristalización de la actina

El mecanismo de polimerización de la actina podrá ser totalmente comprendido hasta que se conozca la estructura tridimensional de esta proteína y esta estructura se podrá establecer totalmente a partir de la difracción de rayos X habida cuenta que la secuencia de los aminoácidos de esta proteína es conocida (2).

Hasta el presente la actina se ha descrito como una proteína incristalizable y esto se debe a su tendencia a polimerizar espontáneamente. En efecto, la actina polimerizada origina fibras o paracristales, así llamados porque no llegan a ser cristales verdaderos. Un gran número de proteínas cristalizan a partir del sulfato de amonio, pero como que la adición de esta sal aumenta la fuerza iónica del medio y transforma la actina a su forma fibrosa, hemos resuelto el problema utilizando el polietilenglicol.

Técnica de cristalización

Realizamos experiencias de cristalización sobre una actina extraída de músculo de conejo, utilizando ioduro de potasio y purificando por dos ciclos sucesivos de polimerización y despolimerización. Anteriormente habíamos encontrado que la actina obtenida por este método es más estable que la extraída por el método habitual a partir del polvo acetónico de músculo (3). Los cristales de actina se obtuvieron a partir de medios de cristalización que contenían la G-actina diluida entre 4 y 7 mg/ml en su tampón de despolimerización (2 mM Tris, 0.2 mM $CaCl_2$, 0.2 mM ATP, 3 mM NaN_3, pH 7.5) y a concentraciones de polimetilenglicol 6000 variando de 4 a 14%.

Dos tipos de cristal según la temperatura

La morfología de los cristales de actina depende de la temperatura del medio de cristalización: a 5°C los cristales son de forma octaédrica de las siguientes dimensiones promedio: 0.050 × 0.050 mm (4) (figura 1).

A 20-22°C los cristales tienen forma de agujas prismáticas de 0.300 × 0.050 mm (5) (figura 2). Esta última forma cristalina casi tiene las dimensiones que se requieren para lograr un análisis por difracción de rayos X, lo que nos permite esperar con fundamento que este análisis pronto será un hecho.

Inducción de la división celular

En el músculo la actina está siempre polimerizada y asociada con la tropomiosina y la troponina formando filamentos finos. En cambio en las células no musculares la actina se encuentra bajo diferentes morfologías según sea la etapa del ciclo celular.

En una célula en reposo (interfase) la actina se halla polimerizada bajo forma de filamentos agrupados en un conjunto orgánico llamado "cable". Estos cables contienen dos proteínas que también se encuentran en el músculo; la tropomiosina y la α-actinina. Cuando la célula entra en la primera fase de la mitosis (profase) los cables desaparecen y la actina se redistribuye de forma difusa a manera de filamentos aislados (monómeros) que no contienen la tropomiosina. En la metafase los cromosomas están localizados en la región ecuatorial y la membrana nuclear desaparece. Durante la anafase los cromosomas emigran a polos opuestos de la célula y este movimiento se debe esencialmente a la polimerización-despolimerización de microtúbulos, tal vez en relación con microfilamentos de actina. Al terminar la anafase aparece un anillo contráctil compuesto por filamentos de actina distribuidos paralelamente. Este anillo contráctil, que es la organela de la división celular, produce un surco de segmentación que continúa durante la etapa siguiente o teleofase (6).

La teleofase es la última etapa de la mitosis, es decir, la verdadera división celular o citoquinesis.

Estos filamentos de actina que forman el anillo contráctil difieren de los filamentos de la actina muscular por su vida muy corta (10 min) y por su fácil destrucción por la droga citocalasina B. Hasta hoy no se habían encontrado los factores biológicos que convierten la actina difusa (de la célula en profase) a esta disposición en filamentos paralelos que forman el anillo contráctil y que induce a la división celular.

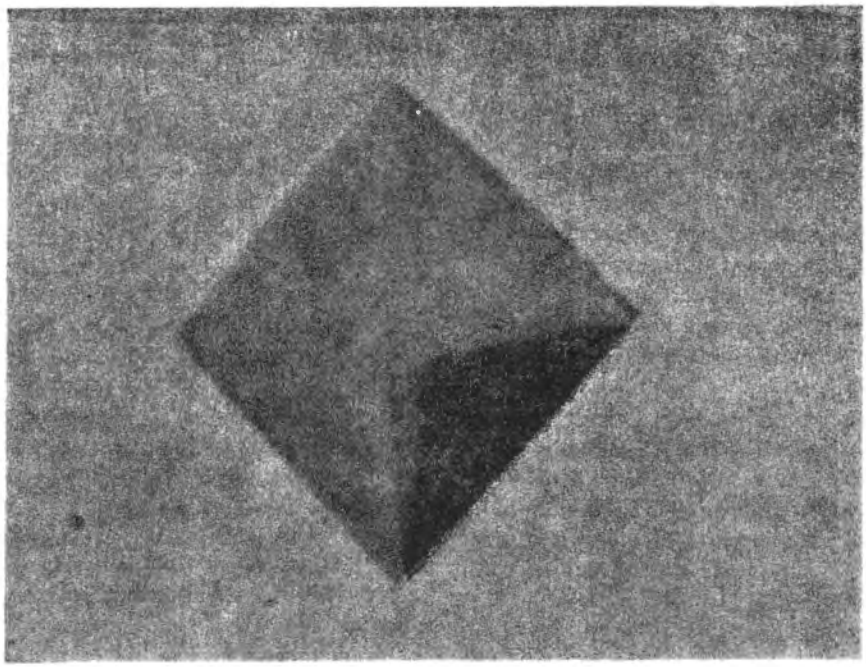


FIG. 1. Fotografía de un cristal de actina de forma octaédrica, obtenida a 5°C.

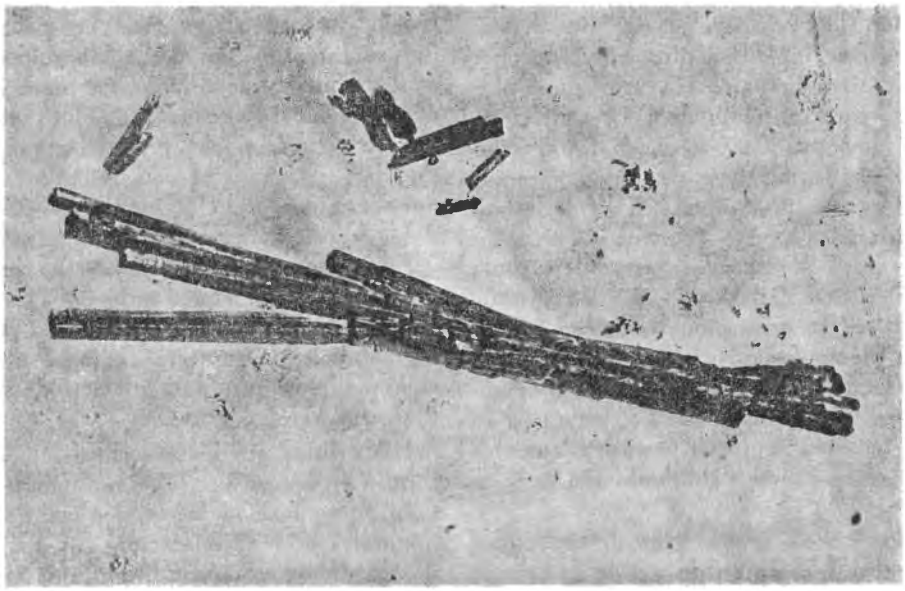


FIG. 2. Fotografía de cristales de actina en forma de agujas prismáticas, obtenidas a 20-22°C.

Creemos que el inductor de la polimerización de la actina del anillo contráctil debe ser un factor cuya concentración aumente en los tejidos en crecimiento y de una manera especial en la división celular. Las poliaminas espermidina y espermina llenan este requisito. En efecto, numerosas investigaciones han demostrado que durante el crecimiento aumenta el contenido en poliaminas del tejido y asimismo se ha demostrado la estimulación del crecimiento de las células en cultivo por la presencia de poliaminas (7).

En las células neoplásicas, también se ha demostrado una correlación positiva entre concentración de espermidina y velocidad de crecimiento (8). Durante el ciclo celular la biosíntesis de poliaminas alcanza dos máximos de actividad, uno de los cuales coincide con el inicio de la división celular (9).

Para comprobar si las poliaminas podían ser los agentes inductores de la polimerización de la actina en el anillo contráctil, estudiamos primero su acción sobre la actina *in vitro*. Hemos demostrado que concentraciones fisiológicas de diaminas y poliaminas ($\leqslant$ 0.5 mM) inducen la formación de filamentos de actina y que la espermidina y la espermina son las poliaminas biológicas más eficaces (10). Hemos demostrado igualmente que estos filamentos de actina tienen las mismas propiedades físico-químicas que los filamentos inducidos por sales o cationes divalentes. Entre estas propiedades características de la F-actina, tenemos la activación enérgica de la Mg-ATPasa de la miosina, el aumento importante de viscosidad específica y el desplazamiento del espectro proteínico en ultravioleta cercano. Estudios en microscopio electrónico han demostrado que a partir de la G-actina, la espermina induce la formación de filamentos dispuestos paralelamente mientras que la espermidina forma filamentos homogéneos aislados. La espermidina puede también agrupar estos filamentos cuando se le añade a una solución que los contiene.

Habida cuenta que la citocalasina puede destruir los filamentos de actina formando un anillo contráctil y por ello detener la división celular, hemos podido demostrar que esta droga destruye la organización de los filamentos de actina inducidos por la espermidina.

El conjunto de estos resultados sobre la inducción de los filamentos de actina por las aminas biológicas y su destrucción por la citocalasina sugiere que las poliaminas pueden ser los factores inductores del anillo contráctil.

Mecanismo de acción

Por esto hemos propuesto el mecanismo siguiente para explicar la inducción de la división celular (11). Al final de la anafase la actina celular está bajo forma de monómeros y de microfilamentos aislados. La disposición en paralelo de los filamentos del anillo contráctil sería inducida por la acción de la espermina, por la acción de la espermidina o por ambos al actuar sobre los microfilamentos. El factor inductivo de la formación de este anillo es la concentración creciente en poliaminas que proviene de la activación de la biosíntesis de estos compuestos en el preciso momento de iniciarse la división celular.

Esta teoría que hemos propuesto para la inducción de la citoquinesis ha sido recientemente apoyada por los estudios de otros investigadores. En las células de mamíferos en cultivo, se ha demostrado que la inhibición de la biosíntesis de las poliaminas induce la inhibición de la citoquinesis. El agotamento en poliaminas va junto con la desorganización de los filamentos de actina (12). En *Amoeba proteus* se puede inducir la citoquinesis con microinyecciones de espermina en el citoplasma. (W. Stocken y U. Gawlitta, comunicación personal).

Puesto que parece establecido que las poliaminas son factores inductivos de la división celular, podría ser fructuoso estudiar el metabolismo de estos compuestos para comprender mejor la regulación de la proliferación celular (13).

Las células pueden ser clasificadas como células en reposo y células proliferantes. Estas últimas forman los tejidos embrionarios, tumorales o en regeneración. En las células de mamíferos en reposo la arginina se transforma en ornitina la cual se utiliza en tres vías metabólicas.

1) Biosíntesis de poliaminas.

2) Formación de citrulina.
3) Producción de glutamato (cuadro 1).

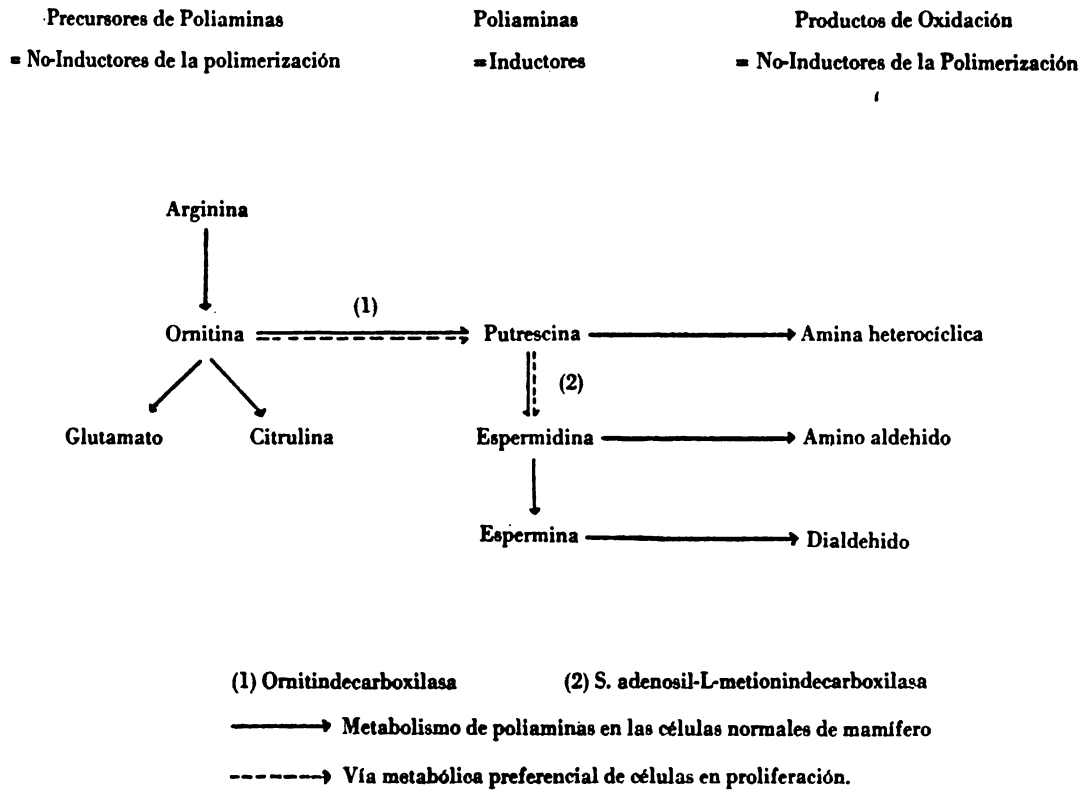
En la biosíntesis de las poliaminas la ornitina se descarboxila y transforma en putrescina, que es la diamina precursora de otras dos poliaminas: la espermidina y la espermina. Las poliaminas se eliminan rápidamente formando aldehidos por oxidación (7).

Entre los compuestos que integran la vía metabólica de las poliaminas hemos demostrado que únicamente éstas pueden inducir la polimerización de la actina y por lo tanto la división celular. Los precursores de estos compuestos (arginina y ornitina) y los productos de eliminación no son inductores de la polimerización de la actina. Por lo tanto, la división de las células normales estaría regulada por la concentración de poliaminas.

Contrariamente, en las células en proliferación, la ornitina se utiliza preferencialmente para la biosíntesis de las poliaminas puesto que la actividad de la ornitin-descarboxilasa (descarboxilasa que descarboxila la ornitina en putrescina), está muy aumentada. Es así que las células en proliferación contienen mayor cantidad de poliaminas que las células normales (7).

Este aumento puede ser de 50 a 100 veces en caso de neoplasia. Además, en las células tumorales el nivel de oxidación de las poliaminas es inferior al de las células normales. Estas variaciones del metabolismo de las poliaminas que influyen sobre la síntesis creciente y eliminación decreciente, mantienen una concentración elevada de estos compuestos en las células en proliferación. Ahora bien, estos compuestos, las poliaminas, son precisamente los inductores de la división celular.

CUADRO 1. RELACION ENTRE METABOLISMO DE LAS POLIAMINAS Y POLIMERIZACION DE LA ACTINA



Conclusiones

La actina es conocida desde hace muchos años como componente normal del músculo. En la actualidad muchos investigadores han centrado su interés sobre esta proteína demostrando su participación en gran número de funciones celulares aunque no se tiene la explicación del mecanismo en cada proceso. Hasta el presente se había supuesto que los acontecimientos eran consecuencia de una interacción actina-proteína tal cual se había demostrado para el músculo. Esta interacción existe en las células no musculares y allí cumple tal vez un papel morfológico; pero, para acontecimientos funcionales de corta duración como la división celular (durante la cual hay desorganización de los filamentos de actina) hemos supuesto otro tipo de interacción más dinámica cuya ruptura exige menos energía a la célula.

Nuestro criterio es que la interacción actina-poliamina induce la división celular y esta es la primera vez que se ha demostrado este tipo de interacción para un mecanismo celular. Creemos que las investigaciones sobre esta interacción actina-poliamina no están cerradas y que dicha interacción podría ser un inductor polivalente para la mayor parte de procesos celulares relacionados con la motilidad.

En efecto, un estudio reciente demuestra que las inyecciones de poliaminas en el citoplasma de *Amoeba proteus* inducen tres fenómenos, a saber:

a) inversión de flujo citoplásmico.
b) retracción de hialoplasma.
c) pinocitosis (W. Stocken y U. Gawlitta, comunicación personal).

Se ha demostrado que estos tres fenómenos dependen de la polimerización de la actina. El orden de eficacia de las poliaminas para inducir estos tres fenómenos es idéntico al que hemos demostrado para la polimerización de la actina inducida por las poliaminas.

Además del interés biológico que representa esta interacción actina-poliamina hay otro interés de orden químico-físico. Con estas poliaminas hemos inducido la formación de paracristales de actina. (C. Oriol-Audit, trabajos no publicados).

El estudio de estos paracristales podría darnos información útil sobre el mecanismo de polimerización de la actina y sobre las interacciones de los filamentos.

Resumen

La autora logró obtener la actina cristalizada. A su vez estudió la actina polimerizada por poliaminas y propone un nuevo mecanismo para la inducción de la división celular.

Summary

The author has succeded to crystalize the actine. She has also studied the induction of actine polymerization by poliamines and propose a new mechanism for the induction of cell division.

Resumé

L'auteur a reussi a cristallizer l'actine. Elle a etudie l'induction de la polymerization de l'actine des polyamines et propone un mouveaux mechanisme pour l'induction de la division celulaire.

BIBLIOGRAFIA

1. Tilney, L. G. (1975): J. Cell Biol. *64*, 289-340.
2. Elzinga, M., Collins, J. H., Kuehl, W. M., and Aldestein, R. S. (1973): Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *70*, 2687-2691.
3. Oriol, C., Landon, M. F., and Hildebrand, H. F. (1977): Cytobiologie, *14*, 350-364.
4. Oriol, C., Dubord, C., and Landon, F. (1977): Febs Lett. *73*, 89-91.
5. Oriol, C., and Dubord, C. (1977): Biol. Cell. *30*, 15a.
6. Schroeder, T. E. (1972): J. Cell Biol. *53*, 419-434.
7. Bachrach, U. (1973): Functions of Naturally occurring polyamines (Academic Press, New York).
8. Heby, O., Marton, L. J., Wilson, C. B., and Martínez, H. M. (1975): Febs Lett. *50*, 1-4.
9. Heby, O., Sarna, G. P., Marton, L. J., Omine, M., Perry, S. and Russell, D. H. (1973): Cancer Res. *33*, 2959-2964.
10. Oriol-Audit, C. (1978): Eur. J. Biochem. *87*, 371-376.
11. —— (1978): Int. Symp. on cell motility, Varsovie.
12. Sunkara, P. S., Rao, P. N., Nishioka, K., and Brinkley, B. R. (1979): Exp. Cell. Res. *119*, 63-68.
13. Oriol-Audit, C. (1979): 8th. European Meeting on Muscle and Motility, Heidelberg.