

NUEVOS PAPELES DE LAS CORONINAS EN LA ORGANIZACIÓN DEL CITOESQUELETO Y LA SEÑALIZACIÓN CELULAR

La familia de GTPasas Rho/Rac constituye un subgrupo de la superfamilia de proteínas Ras que participa en la regulación de funciones celulares muy diversas, siendo una de las mejor caracterizadas la regulación que ejercen sobre el citoesqueleto de actina (Jaffe and Hall 2005). Por otro lado, las coroninas constituyen una familia conservada en todo el reino eucariota, también con un papel clave en el mantenimiento del citoesqueleto de actina (Utrecht and Bear 2006). Distintos estudios sobre la Coronina1A han puesto de manifiesto la importancia de esta proteína en el sistema inmune para regular distintos procesos relacionados con el citoesqueleto. Por tanto, no es de extrañar que mutaciones en esta proteína se asocien con enfermedades del sistema inmune (Pieters, Muller et al. 2013).

Para ahondar en el conocimiento de las funciones que las coroninas desempeñan, hemos generado líneas celulares estables deplecionadas de Coronina1A o Coronina1B mediante transducción de shRNA específicos para cada isoforma. Ambas líneas se caracterizan por la presencia de grandes fibras de estrés en comparación con las células silvestres, reflejo de un defecto citoesquelético subyacente. Previamente habíamos descrito la participación necesaria de Coronina1A para una correcta activación y translocación a la membrana plasmática de la GTPasa Rac1 (Castro-Castro, Ojeda et al. 2011). Esto, junto con el papel fundamental que desempeña Rac1 en la regulación del citoesqueleto, nos hizo plantearnos la hipótesis de que introduciendo un mutante constitutivamente activo de Rac1 (Rac1^{Q61L}) en las células deficientes en Coronina1A/1B podríamos rescatar sus defectos citoesqueléticos basales. Sin embargo, la sobreexpresión de un mutante activo de Rac1 en células deplecionadas de Coronina1A o Coronina1B provoca la formación de estructuras aberrante de F-actina morfológicamente diferentes de las ondas de membrana o ruffles que forma en las células WT.

La formación de este fenotipo se debe a una hiperactivación de la ruta de la miosina, ya que el tratamiento de las células deficientes en coronina transfectadas con Rac1^{Q61L} con blebbistatina (inhibidor de la miosina) revierte a

la formación de ruffles. Adicionalmente, células WT cotransfectadas con un mutante constitutivamente activo de la miosina junto con Rac1 activo, forman las mismas estructuras aberrantes que las células deplecionadas de coronina confirmando la implicación de una miosina hiperactiva en el fenotipo.

También hemos conseguido demostrar la participación necesaria en este proceso de Pak2 y ArhGEF7, dos efectores de Rac1, utilizando distintas aproximaciones (mutantes de Rac1 incapaces de unirse a ellos y depleción de los mismos por expresión de siRNA).

Por último, mediante técnicas de inmunoprecipitación hemos conseguido demostrar la existencia de la formación de un complejo entre Rac1-GTP/ArhGEF7/Pak2 y miosina que es más estable en ausencia de coronina. La formación de este complejo requiere de la presencia de Pak2, ya que en su ausencia la interacción entre Rac y la miosina no tiene lugar.

Como segundo objetivo de nuestro estudio nos planteamos estudiar los mutantes de Coronina1A asociados con enfermedades del sistema inmune en un contexto citoesquelético. Uno de estos mutantes, Coronina1A^{E26K}, se une a la F-actina con mucha mayor afinidad que la versión silvestre provocando la asociación de filamentos en estructuras de alto orden molecular. Esta reorganización de los filamentos de actina se produce de tal manera que se altera su estructura, de modo que ya no pueden ser reconocidos por marcadores de actina (faloidina, lifeact, anticuerpos anti-actina). Además, la unión de la F-actina a este mutante la hace más resistente a la despolimerización por distintos agentes (Latrunculina, citocalasina) o proteínas despolimerizadores de actina (gelsolina). Experimentos de FRAP indican que este mutante es mucho menos móvil que la proteína silvestre.

Ensayos funcionales ponen de manifiesto que este mutante es activo en función del contexto, ya que sí que es capaz de desencadenar respuestas equivalentes a las de la proteína silvestre en el caso de activación de NF-AT pero la respuesta de activación de JNK es deficiente.

Estos dos trabajos sirven para entender en mayor profundidad los mecanismos por los cuales las coroninas regulan el mantenimiento de las estructuras

citoesqueléticas. En el primero de ellos, hemos descrito un mecanismo desconocido por el cual Rac1 interacciona y regula el estado de la miosina de manera dependiente de coronina. En el segundo hemos descrito un mutante de coronina que, a pesar de presentar ganancia de función, no es capaz de desempeñar todas las funciones que realiza la versión silvestre.

Castro-Castro, A., V. Ojeda, et al. (2011). "Coronin 1A promotes a cytoskeletal-based feedback loop that facilitates Rac1 translocation and activation." EMBO J **30**(19): 3913-27.

Jaffe, A. B. and A. Hall (2005). "Rho GTPases: biochemistry and biology." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 247-69.

Pieters, J., P. Muller, et al. (2013). "On guard: coronin proteins in innate and adaptive immunity." Nat Rev Immunol **13**(7): 510-8.

Utrecht, A. C. and J. E. Bear (2006). "Coronins: the return of the crown." Trends Cell Biol **16**(8): 421-6.