

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Doctorado en Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina

**“SEÑALIZACION MEDIADA POR CITOESQUELETO, PAPEL
DE LA FILAMINA COMO INTEGRADOR DE MECANISMOS Y
SEÑALES CELULARES”**

T E S I S

Que para obtener el grado de:
DOCTORA EN CIENCIAS
Presenta

M. en C. MARÍA ELIZABETH GARCÍA PLASCENCIA

ASESOR: DR. DAVID JOHN JAY GÓMEZ-FARÍAS



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CREDITOS

La parte experimental del presente estudio fue realizada en el Departamento de Biomedicina Cardiovascular (antes Cultivo de Tejidos) del Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez.

Tutor: Dr. David J. Jay Gómez-Farías.
Jefe del Departamento de Biomedicina Cardiovascular
Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez.

Esta tesis fue apoyada en parte por los proyectos CONACYT:
30558-M y U40188-Q.

Agradezco, también, el apoyo académico del Dr. Miguel Ángel Vargas M.
del Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV.

AGRADECIMIENTOS

Porque lo invisible de Dios, su eterno poder y su deidad, se hace claramente visible desde la creación del mundo y se puede discernir por medio de las cosas hechas. (Romanos: 1, 20).

Agradezco a mi esposo David por su amor y apoyo durante la realización de este trabajo.

A mis padres quienes siempre me han brindado su amor y comprensión.

A mis hermanos: Rubén, Jaime, Jesús y Eduardo porque siempre cuento con ellos.

A mis compañeros de laboratorio: Hortensia, Ana y Ricardo por su ayuda, colaboración y amistad.

Este trabajo está dedicado a mis hijos: **David, Alan y Daniel** por su amor, apoyo e inspiración cuando veo en ellos una sonrisa. Esperando que algún día se sientan orgullosos de mi labor.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	4
INTRODUCCION	6
Citoesqueleto	6
Citoesqueleto de Actina.	7
Filamina.	9
JUSTIFICACIÓN	19
HIPOTESIS	20
OBJETIVOS	21
MATERIALES Y METODOS	23
Estrategia Experimental.	23
Células y Plásmidos.	24
Reacciones de PCR, mutagénesis dirigida con PCR, subclonación y expresión en <i>Escherichia coli</i> .	25
Obtención de plaquetas humanas y detección de filamina en éstas.	25
Crecimiento y transfección de células 293FT y purificación de los fragmentos de FLNa.	26
Experimentos de fosforilación <i>in vitro</i> .	27
Determinación de la actividad específica de la calcineurina, usando a la FLNa como sustrato.	27
RESULTADOS	28
Expresión y purificación de los fragmentos nativo y mutado recombinantes de la región C-terminal de la FLNa.	28
Defosforilación <i>in vitro</i> de la FLNa recombinante nativa (1671-2361) previamente fosforilada.	29
Determinación de la actividad específica de la calcineurina usando a la FLNa como sustrato.	30
La ciclosporina “A” (CsA) reduce la velocidad de defosforilación de la FLNa nativa recombinante (1671-2361), inducida por calcio y ionóforo A23187 en células 293FT.	31
Protección de la FLNa por CsA contra calpaína <i>in situ</i> (plaquetas humanas).	32
DISCUSION	35
CONCLUSIONES	42
REFERENCIAS	43
APENDICE	49

RESUMEN

La activación de receptores celulares por diversos estímulos fisiológicos o exógenos produce cambios dramáticos en la forma y función celulares. Tales cambios dependen principalmente de la reestructuración del citoesqueleto, y en especial de la malla periférica de actina. Un ejemplo notable de éste fenómeno se presenta en las plaquetas de donde se ha obtenido mucha de la información de la que disponemos actualmente sobre el citoesqueleto.

Las plaquetas humanas responden a diversos estímulos fisiológicos y exógenos resultando en cambios de forma y secreción de diversas sustancias. La respuesta también incluye la activación de diversas familias de cinasas y la fosforilación de un gran número de proteínas incluyendo a la proteína que une actina, filamina A (FLNa, proteína que une actina-280, ABP-280, o ABP, filamina no muscular). Se ha postulado que un proceso dinámico de fosforilación/defosforilación pueda estar involucrado en la organización de la arquitectura del citoesqueleto en la cual la FLNa juega un papel principal. A este respecto, la FLNa se caracteriza por ser una de las proteínas con mayor capacidad para entrecruzar filamentos de actina (actina-F), durante la formación de geles tridimensionales de actina por lo que, tiene un papel importante en mantener la forma de la plaqueta en reposo y participar, así mismo en los cambios de forma que se dan a consecuencia de la activación plaquetaria. La FLNa también es una proteína de andamiaje a la cual se pueden unir numerosos componentes macromoleculares cada una de los cuales con propiedades únicas como: señalización celular, regulación en la transcripción de genes y movilización de receptores, entre otras. Sin embargo, el papel fisiológico de la FLNa en estos procesos ha permanecido incierto. En este sentido, estudios previos, sin embargo, mostraron que la fosforilación de la región C-terminal de la FLNa por proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) reforzaba la malla

de actina al proteger a la FLNa de ser degradada proteolíticamente por calpaína. Estudios previos tanto como in situ como in vitro realizados por nuestro grupo demostraron que esta fosforilación por PKA ocurría únicamente en fragmentos recombinantes que contenían a la Serina 2152. El análisis por mutagénesis dirigida confirmó que este residuo es el único sustrato de la PKA en la región C-terminal de la FLNa cuya fosforilación brinda resistencia contra la degradación proteolítica. En aparente contradicción con estos resultados información más reciente mostró que la fosforilación de la Serina 2152 por Pak 1 y RSK era necesaria para producir cambios dinámicos de membrana tales como formación de bordes o arrugas membranales y migración de células de melanoma inducida por factor de crecimiento epidermal (FCE), respectivamente.

En este trabajo encontramos que la inhibición por ciclosporina (CsA) de la fosfatasa activada por calcio/calmodulina, calcineurina (CN) protegía a la FLNa plaquetaria de ser degradada por calpaína. Los resultados pudieron ser combinados con la información disponible hasta la fecha en un mismo modelo asumiendo, sin embargo, que algunos de los fragmentos liberados de la FLNa (y de otras moléculas potenciales diversas como la Talina, Espectrina, Tau, etc.) por la acción de la calpaína regulada por la calcineurina podían llevar a cabo acciones en rutas corriente abajo participando como “Péptidos Proteolizados Integradores de Señales” o SIPP por el acrónimo derivado del termino en Ingles “Signaling Integrator Proteolytic Peptide”. Estos elementos tendrían la facultad de movilizar distintos tipos de macromoléculas (que se encuentran unidas a la FLNa completa) hasta sus sitios de acción en el citoplasma o en el núcleo celular. Este modelo, así mismo, daría una explicación a la aparente contradicción acerca del efecto encontrado sobre la fosforilación de la FLNa en la dinámica del citoesqueleto, ya que asume, que la FLNa puede jugar dos funciones totalmente distintas en la células: a) Como molécula estructuradora, entrecruzadora de filamentos de actina y b) Como péptido señalizador activador de diversas vías

incluyendo aquellas involucradas en la reorganización misma del citoesqueleto e actina (ver manuscrito adjunto para una explicación detallada del modelo).

ABSTRACT

Activation of cellular receptors by diverse stimuli induces dramatic changes in shape and function to respond to the new circumstances of the cell. This modified behavior depends on the reorganization of the peripheral actin meshwork. An outstanding example of these processes can be found in platelets, from which, much of the information available on cytoskeletal function has been obtained.

Human platelets are responsive to various physiological and exogenous stimuli, resulting in shape change and secretion. The responses also include activation of several families of kinases and phosphorylation of a number of proteins including actin-binding protein. It has been postulated that a dynamic phosphorylation-dephosphorylation process may be involved in the organization of the cytoskeleton architecture, in which filamin A (FLNa, actin-binding protein-280, ABP-280 or ABP; nonmuscle filamin) plays a pivotal role. In this regard, FLNa emerges as one of the proteins with the highest potential in initiating the cross-linking of actin filaments (F- actin) during the formation of tridimensional actin gels and has an important role in maintaining the shape in platelets at rest. It also participates on cell shape changes and as a scaffold protein that recruits numerous macromolecular components involve in a complete different set of functions like signal transduction, gene transcription regulation, and receptor translocation. However, the physiological role of FLNa in these processes has remained elusive. In this regard, previous studies, however, showed that phosphorylation of the C-terminal region of FLNa by cAMP-dependent protein kinase (PKA) strengthen the actin cytoskeleton meshwork by protecting filamin against proteolytic cleavage by calpain. Previous in situ and in vitro studies by us demonstrated that the phosphorylation step by PKA occurred only in fragments that contained serine 2152. Site-directed mutagenesis analysis confirmed that this residue is the

unique substrate for PKA in the C-terminal region of FLNa whose phosphorylation provides resistance against proteolytic cleavage. In contrast to these results, more recent information indicated that phosphorylation of Ser 2152 by Pak I and RSK was necessary for membrane dynamic changes such as, membrane ruffle formation and EGF-induced migration of human melanoma cells, respectively. In the present study we found that the inhibition of the calcium/calmodulin-activated phosphatase calcineurin (CN) by cyclosporine (CsA) protected filamin in platelets from calpain degradation. Results could be combined with available information in a single model, assuming that some of the peptide fragments released by calcineurin-regulated calpain action could mediate actions as “Signaling Integrator Proteolytic Peptides” (SIPPs) in downstream pathways, which may help to resolve the controversies reported on the role of filamin phosphorylation in actin dynamics.

INTRODUCCION

Las plaquetas, así como otros tipos celulares, responden a una gran variedad de estímulos fisiológicos y exógenos. La respuesta incluye cambios de forma y secreción de diversas sustancias entre otros fenómenos (1). En el caso de las plaquetas, su función se define por dos estados fisiológicos. En su estado base la plaqueta presenta una forma discoide estable con la cual circula libremente en la vasculatura. En un segundo estado, en respuesta al daño vascular, las plaquetas rápidamente se convierten a su forma activa con filopodia y lamelipodia que se forman por la remodelación del citoesqueleto de actina que incluye la polimerización de actina para formar nuevos filamentos (2). De esta manera, una función del citoesqueleto es dirigir por un lado los contornos de la membrana en la plaqueta no estimulada y por otro lado los rápidos cambios de forma en la plaqueta activada. Los cambios inducidos por la activación plaquetaria resultan de procesos como la fosforilación y/o la ruptura proteolítica por calpaína de proteínas del citoesqueleto (3). La reorganización específica depende de la combinación de señales a las que la plaqueta está expuesta. A este respecto, diversos estudios han mostrado que el citoesqueleto es un blanco principal de estos procesos (1,4,5).

CITOESQUELETO.

Las actividades del citoesqueleto dependen de tres tipos de estructuras: a) Los filamentos de actina (o microfilamentos) formados por la polimerización de monómeros de actina y proteínas accesorias entrecruzadoras de los microfilamentos, b) microtúbulos formados por tubulina y proteínas asociadas a éstos (MAPs), como la proteína Tau; y c) filamentos intermedios que incluyen proteínas como la vimentina o la laminina. Cada uno de estos sistemas regula actividades fundamentales para la célula. Los filamentos intermedios brindan soporte mecánico a la célula. Los microtúbulos representan centros primarios de organización del citoesqueleto y los

microfilamentos de actina son esenciales para la manifestación de la motilidad celular especialmente para movimientos a nivel de membrana plasmática donde los filamentos se encuentran asociados de manera importante (6).

CITOESQUELETO DE ACTINA.

La actina es un componente esencial del citoesqueleto en células eucarióticas y participa en varias funciones: endocitosis, tráfico intracelular, movilidad, contractilidad, mantenimiento de la morfología y división celular. Se encuentra en dos estados físicos: en forma polimerizada como actina filamentosa (actina-F) ó bien en su forma depolimerizada denominada actina globular (actina-G), de 43 kDa. Los filamentos de actina crecen por la adición de actina G principalmente en sus extremo positivo, formando la actina filamentosa o actina F. Durante el proceso de polimerización in vitro la actina G unida a ATP polimeriza en presencia de K^+ y Mg^{2+} . La eventual hidrólisis de ATP generando ADP hace a los filamentos inestables y susceptibles de reorganización al generar de nueva cuenta los monómeros originales (7). El entrecruzamiento de actina F puede conducir a la formación de estructuras altamente organizadas como haces de fibras y, a su vez, el anclaje reversible de estas estructuras de actina a la membrana. Los microfilamentos de actina son fundamentales en diferentes procesos infecciosos por agentes tales como: *Rickettsia*, *Shigella*, etc. También se ha demostrado que alteraciones en la red de los microfilamentos de actina conllevan a alteraciones fisiológicas tales como incremento en el potencial metastático y transformación celular (8).

ACTINA EN EL NUCLEO. Además de ser un componente fundamental en la reestructuración del citoesqueleto en el citosol, la actina se ha encontrado involucrada en diversas funciones en el núcleo tales como: 1) Organización de la remodelación de la cromatina, 2) Procesamiento de RNA ó regulación de la función de la DNAasa I. De hecho, juega un papel

directo en la transcripción, en la regulación de las RNA polimerasas I, II y III (9). Sin embargo el mecanismo por el cual la actina migra al núcleo permanece incierto, posiblemente migre asociado a otras proteínas como la miosina, espectrina ó la FLNa que también se ha encontrado en el núcleo (10), Ozzane y Loy observaron que el extremo C-terminal de la FLNa unida al receptor de andrógeno podía translocar al núcleo (11).

A su vez las propiedades del citoesqueleto de actina se deben a las proteínas unidas a éste, siendo reguladores y elementos clave de procesos involucrados en la señalización celular, durante los procesos de polimerización, la formación de redes y la depolimerización. Algunos ejemplos de ellas son: profilina, timosina β 4, gelsolina, talina, espectrina y filamina entre otras (12).

Recientemente, se demostró que las funciones del citoesqueleto de actina están relacionadas con la actividad de miembros de la familia de pequeñas GTPasas como Rho y Rac (13,14). La interacción con estas proteínas asegura un control coordinado entre las funciones del citoesqueleto de actina y funciones celulares como la transcripción de genes y la manifestación de fenómenos de adhesión. El blanco primario de esta interacción se da en las proteínas entrecruzadoras de microfilamentos y está regulado por procesos finos que incluyen la modificación postraducciona por fosforilación y la degradación por proteasas específicas. Entre estas proteínas accesorias destaca la filamina.

FILAMINA.

En lo que se refiere a la filamina en plaquetas (también llamada: filamina A, filamina no muscular; ABP, actin-binding protein o ABP-280, por su peso molecular de 280 kDa), es un homodímero en donde cada subunidad está constituida por 2647 aminoácidos. Los dominios funcionales de cada subunidad incluyen una región N-terminal de unión a actina filamentosa (F-actina), una región C-terminal de autounión y al menos una región, también C-terminal, de unión a glicoproteínas de membrana (15, 16) Fig. 1.

De entre las proteínas que actualmente se conocen que entrecruzan filamentos de actina, la filamina es sin duda la más eficiente en formar geles ortogonales tridimensionales de actina. Además, es la principal proteína que une al citoesqueleto periférico de actina con la membrana celular a través de su dominio C-terminal de unión a glicoproteínas, como el receptor del factor von Willebrand GpIb-V-IX en plaquetas (16, 17).

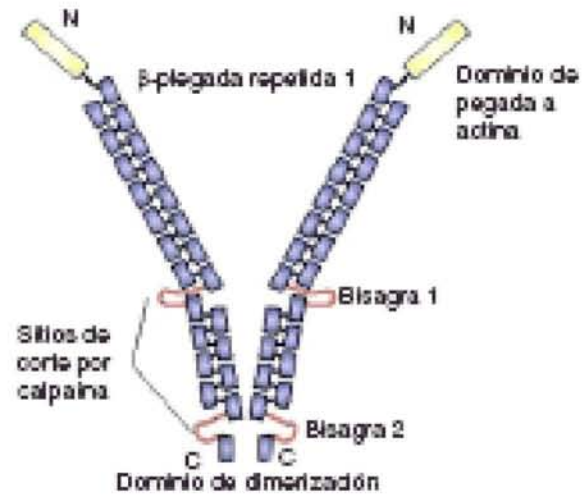


Fig.1 Representación esquemática de la estructura del dímero de la FLNa. N, Extremo amino-terminal de unión a actina y homólogo a calponina: ABD; 24 Repetidas; 2 Sitios bisagra susceptibles a corte por calpaina; Extremo C-terminal de autounión y de unión a glicoproteínas de membrana.

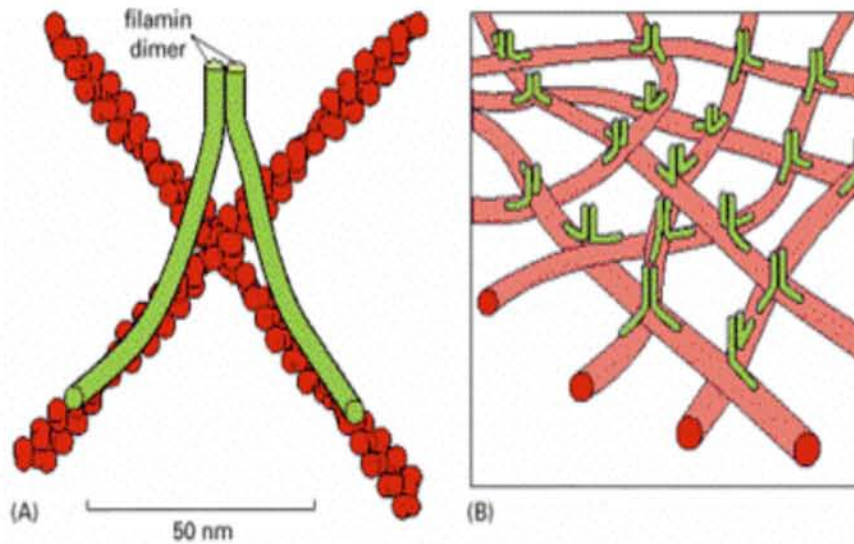


Fig. 2 Representación de la FLNa como molécula entrecruzadora de filamentos de actina.

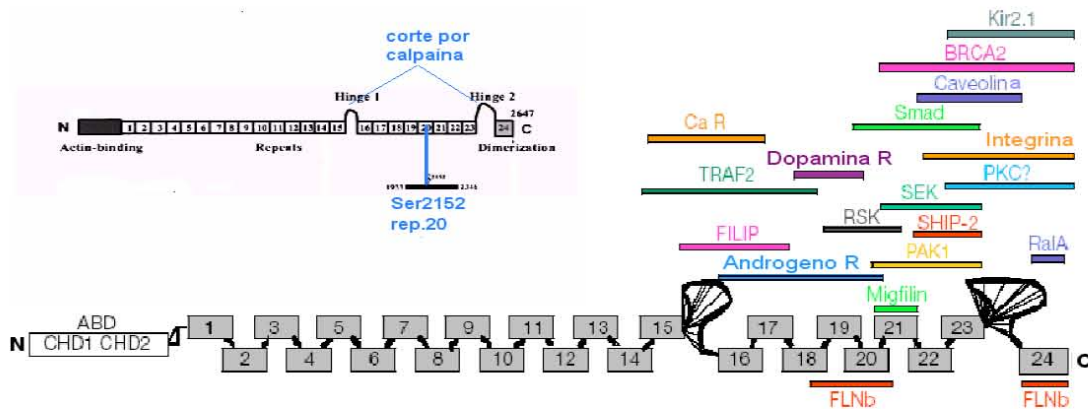
Se han descrito tres isoformas de filamina en mamíferos A, B y C. La filamina A, es codificada por un gen que se localiza en el locus Xq28 del cromosoma X humano. Se encuentra ampliamente distribuida en células no musculares, por ejemplo plaquetas y células endoteliales (7). El gen de la filamina B se encuentra en la región 3p14.3 del cromosoma 3, y se ha identificado principalmente en células musculares. Por otro lado, el gen de la filamina C se encuentra en el cromosoma 7 y se expresa en músculo estriado y cardiaco en la edad adulta (18). Los tres isotipos de filamina muestran entre sí un 60% - 80% de homología, con excepción de las dos regiones bisagra, susceptibles a corte por calpaína, las cuales muestran grandes divergencias (19,20,21). Las filaminas no solo han sido identificadas en organismos eucariotes superiores sino también en eucariontes menos complejos como el hongo *Dictyostlium discoideum*, llamada factor de gelación DdABP-120 y la Eh-120 de *Entamoeba histolytica* la cual es fundamental para el movimiento amibiano (22).

La estructura de los dímeros de filamina es similar a una inmunoglobulina, su estructura flexible puede inducir ramificaciones ortogonales de actina-F de gran ángulo. Los ángulos formados entre los monómeros de filamina son inversamente proporcionales a la concentración de filamina en plaquetas (19). La formación de ases paralelos de filamentos de actina es promovida cuando la proporción molar de filamina a actina es 1:10-50, mientras que una estequiometría de 1:150-740 lleva a la formación de redes ortogonales de actina. Existen varios tipos de entrecruzamiento de la actina causados por la filamina (tipos X, T ó Y).

FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LA FLNa HUMANA.

Mutaciones en los genes de la FLNa humana están asociadas a un amplio espectro de anomalías del desarrollo como: síndrome otopalatodigital (OPD), displasia frontometáfiseal (FMD), etc. Así como defectos de la migración neuronal: Heterotropía Periventricular (PVNH), la cual está ligada al sexo, las mujeres presentan ataques epilépticos debido a la acumulación de neuronas que no se desplazaron a los ventrículos laterales del cerebro, y también presentan problemas vasculares prematuros, mientras que los hombres son inviables.

En los últimos años, se ha encontrado que una amplia variedad de proteínas se une a la filamina (más de 40 hasta la fecha) incluyendo receptores transmembranales y moléculas de señalización (Fig. 3) y la mayoría de éstas interacciones se dan en el extremo C-terminal de la filamina (17, 23).



Figur

a 3. Esquema del monómero de FLNa mostrando las principales macromoléculas asociadas a ella.

De esta manera, la filamina, al unir una gran variedad de moléculas tendría un papel fundamental, no únicamente como estructuradora del citoesqueleto, sino también como molécula de andamiaje, organizadora del conglomerado de macromoléculas. En la tabla I se muestran algunas de las principales moléculas accesorias de la filamina y se resumen las principales características funcionales de ellas.

Tabla 1. PROTEINAS ASOCIADAS A LA FLNa.

Proteínas asociadas a la filamina	# de la repetida de la FLNa a la que se une la proteína accesoria	Significado funcional de la asociación.
Complejo GpIb/V/IX (von Willebrand receptor) (24,25)	17-19	Transmite la activación del receptor por factor vW y por trombina.
Integrinas β 1A, β 1D, β 2, β 3 y β 7(26).	Extremo C-terminal	Mecanoprotección.
Factor tisular (27)	23-24	Co-asociación in vivo.
FcR1 (CD64) (28)	No determinado	?
Furina (29)	13-14	Promueve la internalización de furina.
δ -Sarcoglicanos (30)	23-24	Posible papel en la distrofia muscular.
Miotilina (31)	19-21	Posible papel en la distrofia muscular
Caveolina-1(32)	Extremo C-terminal	Colocalización en estructuras caveolares.
Presenilinas (33, 34)	Extremo C-terminal	La sobre expresión de FLN1 inhibe la sobre expresión de presenilina en <i>Drosophila</i> .
Receptor de Dopamina D2 (35)	16-19	Participa en respuesta a dopamina.
Granzima B (36)	24	Participa con Granzima B en la apoptosis.
Toll (37)	21-24	?
TRAF 2 (38)	21-24	Involucrada en la activación de NF-kB o SAPK por TRAF2 o TNF.
SEK-1 (39)	21-24	Involucrada en la activación de SAPK mediante el ácido Lisofosfatídico y TNF.
Receptor de Andrógeno (40)	Extremo C-terminal	Involucrada en la translocación del receptor de andrógeno al núcleo.
Rho, Rac, Cdc42. (41)	21-24	Reestructuración del citoesqueleto y activación de cinasas.
RalA	24	Promueve la formación de microextensiones cascada abajo del cdc42.
Trio (42)	23-24	La FLNa se une al dominio 1 de la proteína GEF
CvHSP (43)	21-24	?
Canal de potasio Kv4.2 (axones post-sinápticos) (44)	Extremo C-terminal	Promueve la densidad de corriente mediada por este canal.

F-actina (45)	Extremo N-terminal	Rearreglo de la malla intracelular de actina.
BRCA2 (46)	Extremo C-terminal.	Interacciona con BRCA2 en respuesta a daño de ADN.

Aunque no se sabe el significado funcional de todas las interacciones de la FLNa con sus proteínas, a continuación describo alguna de la información disponible que se tiene al respecto.

Recientemente se resolvió la estructura cristalina del complejo FLNa-integrinas β . (47). Se determinó que la repetida 21 de la FLNa brindaba la interfase apropiada para unir a la proteína con el dominio citoplásmico de la integrina. Como se menciona más adelante, la determinación de esta estructura brindó un marco conceptual para entender aspectos de la función de las integrinas. En este momento cabe recordar, que la habilidad de los receptores de adhesión (integrinas) de transmitir señales químicas y de fuerza mecánica a través de la membrana celular, depende, en última instancia, de su interacción con el citoesqueleto subyacente. Así, previamente, se había demostrado que el receptor GPIb-V-IX (receptor del factor vW) estaba vinculado a la malla periférica de actina a través de su unión con la FLNa (48, 49). La interacción se da con el dominio citoplásmico de la glicoproteína IB, en particular con la GP Iba. La glicoproteína IB (GP Ib) es una proteína de la membrana plaquetaria compuesta de un heterodímero, una cadena alfa y una cadena beta, unidas por puentes disulfuro. La GpIb funciona como receptor del factor von Willebrand (vWF) y es también el receptor de alta afinidad para trombina (50). El complejo de receptores incluye la asociación no covalente de las subunidades alfa y beta con las glicoproteínas IX y V en plaquetas. La pegada del complejo GP Ib-IX-V al vWF facilita la adhesión inicial plaquetaria al endotelio vascular después del daño vascular, y también inicia eventos de señalización, activación plaquetaria, trombosis y hemostasis. Varios polimorfismos y mutaciones se han descrito en el gen que codifica para la subunidad alfa de este

receptor, algunos de ellos son la causa del síndrome de Bernard-Soulier y plaquetas con el fenotipo patológico de von Willebrand (51).

Un dato fundamental que se encontró con la resolución del modelo atómico de la interacción FLNa-integrina fue que el sitio de unión de la FLNa a la integrina se traslapa con el sitio de unión de la talina (otra proteína entrecruzadora de actina) a la integrina. Es decir, la FLNa y la talina competían por su unión a la integrina. Datos previos habían demostrado que la talina era la principal proteína encargada de iniciar la activación de adentro hacia afuera (“inside-out activation”) del receptor IIb/IIIa (α IIb/ β 3) del fibrinógeno a través de su unión al dominio citoplásmico de la integrina β 3 (52). Como se recordará, en plaquetas en reposo el receptor IIb/IIIa es incapaz de unir fibrinógeno con afinidad elevada. Sin embargo, cuando las plaquetas son activadas por distintos agonistas como la trombina, el ADP, la epinefrina, el colágeno o endoperóxidos de prostaglandinas, la conformación de la GPIIb/IIIa cambia observándose una unión aumentada por el fibrinógeno (53). A este fenómeno es al que se le llama activación de adentro hacia afuera y depende de la preactivación plaquetaria. Durante la activación plaquetaria la FLNa es fragmentada por una cisteín-proteasa neutra, dependiente de calcio (calpaína) (4,54,55). Estos productos de degradación pueden participar en eventos posteriores durante la agregación plaquetaria y además liberarían a la integrina β que ahora estaría en posibilidad de ser activada (56,57).

La calpaína, es una proteína heterodimérica, que consta de dos subunidades: de 80 kDa y de 30 kDa. Hay dos tipos de calpaínas, la μ -calpaína (activada por concentraciones micro molares de calcio) y la m-calpaína (activada por concentraciones mili molares de calcio). También se han descrito otras calpaínas, según el tejido donde actúan, como la nCL2 del estómago y la p94 del músculo esquelético. Los sustratos de la calpaína pueden ser desde proteínas del citoesqueleto

como la filamina, vimentina, tubulina, espectrina, así como sustratos con secuencias PEST (regiones ricas en P prolina, E ácido glutámico, S serina, ácido aspártico y T treonina rodeada de aminoácidos básicos, condiciones que generan un microambiente que propicia la unión del calcio (58). Se ha detectado actividad de calpaína en el núcleo de algunas células donde forma un complejo con las proteínas de la matriz nuclear y el ADN. La activación de la calpaína *in vivo* se da a través de su asociación con la membrana cuando se incrementa el calcio citosólico. El balance calpaína/calpastatina es un factor importante en el control de la función de las calpaínas, ya que la calpastatina es el inhibidor natural de la calpaína. Esto puede verse alterado en condiciones patológicas como la hipertensión, en donde el nivel de la calpastatina es menor (59).

Como se mencionó, otro ejemplo en donde la FLNa puede jugar un papel principal en la vía hemostática mediada por su interacción con otras macromoléculas es durante la agregación plaquetaria, especialmente durante la formación de las protuberancias de la membrana plaquetaria (filopodia) que se dan durante la generación y posterior retracción del coágulo (3). La inhibición de la agregación plaquetaria por agentes que elevan la concentración de AMP cíclico (AMPc) como la prostaciclina protegen a la FLNa de la degradación por calpaína (4). Esto permitía mantener una red íntegra de la malla periférica de actina evitando los cambios de forma y estructura propios de la plaqueta activada. Esta reducción de la susceptibilidad de la FLNa a calpaína se daba como consecuencia de su fosforilación por Proteína Cinasa dependiente de AMPc (PKA). Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que la fosforilación se daba de manera específica en la serina 2152 localizada en el extremo C-terminal de la proteína (54,55). Contrario a estas observaciones, Vadlamudi y Cols., encontraron subsecuentemente que la fosforilación de este mismo residuo (Ser2152) por la Proteína Cinasa 1 activada por p21 (Pak 1) iniciaba la reorganización de la red de actina, generando fenómenos dinámicos en la membrana

celular y la fosforilación de la Serina 2152 por RSK era necesaria para la migración de células de melanoma inducida por factor de crecimiento epidermal (FCE) respectivamente.

Como se discutirá en este trabajo, el presente estudio muestra que la FLNa, además de jugar un papel central como estructuradora de la malla de actina plaquetaria, puede ejercer funciones fundamentales adicionales como integradora de vías de señalización. Los datos obtenidos, junto con la información disponible en la literatura, pudieron ser presentados en un esquema alternativo asumiendo que algunos de los fragmentos de degradación de la FLNa, liberados por la acción de la calpaína regulada por calcineurina, jugaban un papel en vías nucleares y citosólicas corriente abajo como “Péptidos Proteolizados Integradores de Señales” (o SIPPs, por sus siglas en Inglés, “Signaling Integrator Proteolytic Peptides”), lo cual resolvía muchas de las contradicciones encontradas en la literatura en cuanto al papel de la fosforilación en la dinámica del citoesqueleto (56).

JUSTIFICACIÓN.

La activación plaquetaria durante la hemostasia primaria o la trombosis arterial o venosa resulta en cambios de forma celular y fenómenos de secreción que conllevan, en última instancia a la formación del coágulo. Este proceso depende de la reorganización de la estructura del citoesqueleto, durante la cual se observa la activación de diversas familias de cinasas y la fosforilación de diversas proteínas del citoesqueleto entre las que destaca la FLNa por ser la principal molécula entrecruzadora de F-actina. En este sentido, estudios de nuestro grupo mostraron que la fosforilación por PKA en el extremo C-terminal de la FLNa protegía a la proteína contra la degradación por calpaína, manteniendo, de esta manera, una red inalterada de filamentos de actina cuando la función plaquetaria estaba inhibida por agentes que elevan la concentración de AMP cíclico como la Prostaciclina o la PGE₁. Después de identificar a la Ser 2152 como el único sustrato fosforilable por PKA en el extremo C-terminal de la FLNa, y al ver que el efecto de la fosforilación en este residuo por PKA es conferir resistencia a la degradación de la FLNa por calpaína, era factible asumir que la defosforilación de este blanco rindiera una proteína vulnerable a la acción de la proteasa.

Hasta la fecha, sin embargo, no se había identificado a la posible fosfatasa que pudiera brindar el elemento de control recíproco en esta vía de señalización.

La identificación de los elementos moleculares involucrados en la fosforilación/defosforilación de la FLNa podría dar evidencia del posible papel de la proteólisis de la FLNa en la fisiología plaquetaria y celular.

HIPÓTESIS

Si el estado de fosforilación/defosforilación de la filamina es un evento fundamental en la regulación de sus funciones, entonces, no únicamente participará en la estructuración del citoesqueleto, sino también, durante la señalización celular al mediar su susceptibilidad a proteólisis por calpaína.

OBJETIVOS GENERALES

- Generar sustratos de la calcineurina (CN) mediante la generación de fosfopéptidos (fosforilados con la subunidad catalítica de la PKA) nativos y/o mutados (S2152) del extremo C-terminal de la FLNa.
- Establecer si la FLNa reacciona con la calcineurina (CN) *in situ* (células 293).
- Determinar si la Ser 2152 es un buen sustrato de la CN, *in vitro*, mediante la estimación de la actividad específica de la enzima utilizando a los fosfopéptidos recombinantes como sustrato.
- Con la idea de establecer algún papel fisiológico de la defosforilación de la FLNa se estudiará la posible protección de la degradación de ésta por calpaína en plaquetas humanas usando un inhibidor específico de la CN Ciclosporina (CsA).

OBJETIVOS PARTICULARES

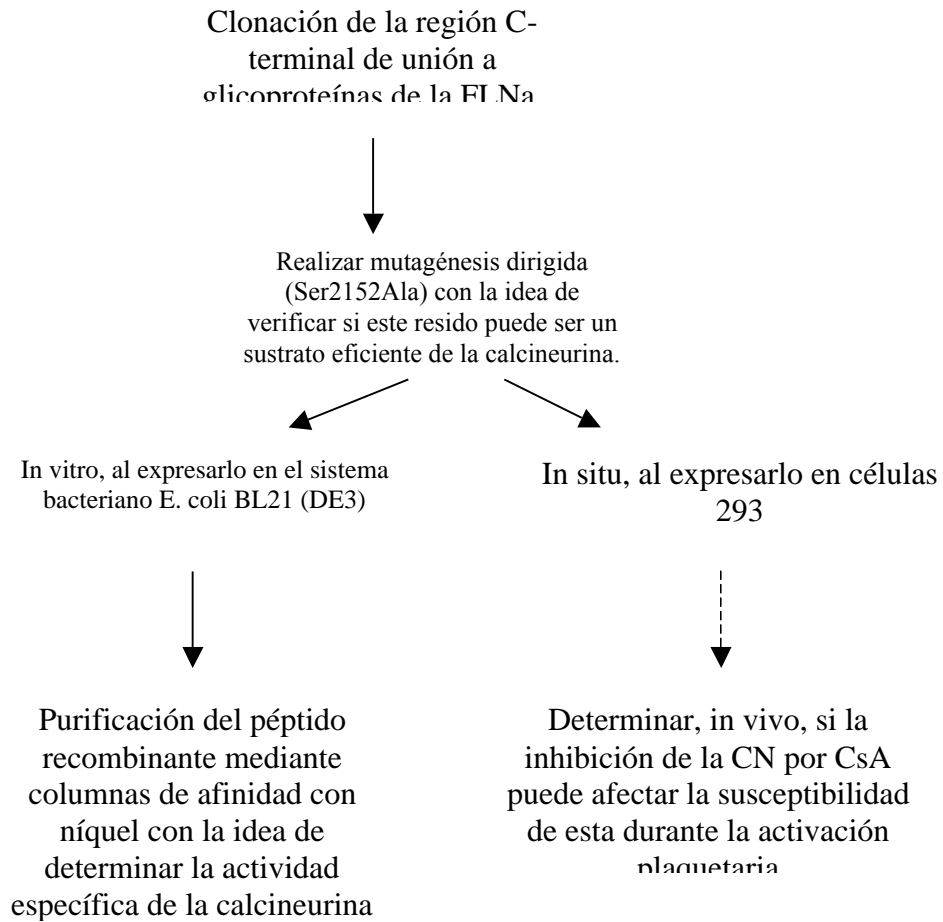
- Clonar y expresar en sistemas bacterianos, que carecen de la maquinaria de fosforilación, característica de las células eucariontes, distintas regiones del gen que pueden contener los sitios susceptibles de modificación por fosforilación/defosforilación.
- Confirmar, mediante mutagénesis dirigida, que el sitio previamente identificado en la regulación de la susceptibilidad a calpaína (Ser 2152) también es un sustrato eficiente para defosforilación por calcineurina.
- Expresar péptidos nativos y mutados recombinantes en células superiores (293FT) con la finalidad de mostrar que los sitios de fosforilación/defosforilación pueden ser

un elemento de control importante cuando el citoesqueleto de actina se reorganiza en respuesta a estímulos fisiológicos.

- Utilizar ciclosporina, la cual es un inhibidor específico de la calcineurina, para obtener información sobre los mecanismos moleculares que participan durante la remodelación del citoesqueleto por defosforilación y proteólisis.

MATERIALES Y MÉTODOS

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL:



CÉLULAS Y PLÁSMIDOS.

- 1) *E. coli* TOP10 (Invitrogen) fue usada para la propagación del plásmidos.
- 2) La cepa BL21 (DE3) fue utilizada como sistema de expresión bacterial para las proteínas recombinantes (García, *et al.*, 2006, ver apéndice de este trabajo) (56).
- 3) *E. coli* XL-Gold fue usada en los ensayos de Mutagénesis.
- 4) Para la expresión de proteínas recombinantes en células en cultivos se utilizó la línea 293 FT.
- 5) Plaquetas humanas frescas obtenidas de donadores sanos informados y siguiendo las normas del comité de ética para estos protocolos.
- 6) Los plásmidos utilizados fueron los siguientes:

pT7-7M1FLNa (que contiene la región que codifica para los residuos 1717-2360 de la FLNa) para la expresión en *E. coli* BL21 (DE3). También se ocupó una variante de este plasmado que contenía la mutación Ser2152Ala (S2152A).

pcDNA4HM-C2 (que contiene 2073 pares de bases que codifica los residuos: 1671-2361) para expresión en células 293FT. De la misma manera, se utilizó una variante conteniendo la mutación S2152A.

ANTICUERPOS UTILIZADOS:

Anticuerpo monoclonal anti-Xpress 1:1000 (Invitrogen)

Anticuerpo monoclonal anti-FLNa 1:500 (Zymed).

Anticuerpo secundario anti-ratón marcado con HRP 1:1000 (Zymed).

ENZIMAS:

La subunidad catalítica de la PKA (New England. BioLabs).

Calcineurina (CN) (Upstate).

REACCIONES DE PCR, MUTAGENESIS DIRIGIDA CON PCR, SUBCLONACIÓN Y EXPRESIÓN EN E. coli. Una región C-terminal del gen que codifica para FLNa fue subclonada y expresada en el sistema bacteriano de *E. coli* BL21 (DE3). Asimismo, la mutación de sentido equivocado Ser²¹⁵² → Ala (S2152A) fue introducida en el fragmento obtenido. La metodología para amplificar mediante PCR las distintas regiones del gen, la estrategia para subclonar y expresar en células de *E. coli* los distintos fragmentos, así como la manera para introducir la mutación S2152A se detallan en, (54,56). Las secuencias de nucleótidos en el ADN fueron verificadas con el análisis de secuenciación del ADN por fluorescencia, para esto se utilizó un secuenciador 310 Genetic Analyzer ABI PRISM.

OBTENCIÓN DE PLAQUETAS HUMANAS. Plaquetas frescas humanas fueron obtenidas de donadores sanos, informados que asisten al Instituto Nacional de Cardiología y siguiendo las normas del comité de ética para estos protocolos. Básicamente se siguió la metodología de Barber y Jamieson, 1970 para la obtención de plaquetas (61).

DETECCIÓN DE FILAMINA EN PLAQUETAS. Para la detección de la filamina, después de los experimentos, las plaquetas fueron disueltas en tampón de corrida con SDS para geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, ver más abajo). Los péptidos fueron desplegados en SDS-PAGE al 8 %, electroforéticamente transferidos a filtros de nitrocelulosa y revelados con anti-suero primario anti-filamina seguido de anti-IgG secundario conjugado

con peroxidasa. El anti-suero primario fue generado inmunizando conejos con los fragmentos de filamina recombinantes expresados en *E. coli*. Este anti-suero primario reaccionó con una proteína con peso molecular de 280 kDa que corresponde a la filamina y también con un péptido de 180 kDa que corresponde al fragmento N-terminal de ABP generado por acción de la calpaína. La SDS-PAGE se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Laemmli en 1970 (62).

CRECIMIENTO Y TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS 293FT. Se mantuvieron células 293FT en cultivo con medio Dulbecco modificado Eagles de tipo advance adicionado con 3% de suero fetal bovino, 2 mM GlutaMax, 100 U/ml penicilina/100µM/ml estreptomicina, 0.25 µg/ml anfotericina y 500µg/ml geneticina (Gibco-BRL). Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37°C, 95% de humedad relativa y 5% CO₂. A 80% de confluencia fueron tripsinizadas (Tripsina-EDTA) y transferidas a pozos de 35mm, para ser transfectadas con Lipofectamina 2000 (Invitrogen), usando 0.8 µg de ADN en 8X10⁵ células/pozo. Después de 3 días se midió la expresión de proteína.

PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE FLNA. Los fragmentos de FLNa recombinante expresados tanto en *E. coli* como en células 293 FT fueron purificados en condiciones nativas (pH 7.8) como se indica a continuación. Las células se rompieron por sonicación con un disrruptor sónico y por ciclos repetidos de congelación-descongelación. La suspensión de células se centrifugó a 6000rpm durante 20min para eliminar los restos celulares y se recuperó el sobrenadante que contenía a las proteínas.

La purificación de las proteínas llevó a cabo bajo condiciones nativas utilizando una resina ProBond de níquel (Invitrogen), mediante una columna de afinidad a polihistidinas, siguiendo las condiciones de pegado recomendadas por el fabricante (protocolo de

ProBond). La concentración de las proteínas se llevó a cabo mediante un filtro con tamiz de exclusión de 30 kDa y después se equilibraron con un buffer Tris-Cl 10mM, pH: 7.4.

EXPERIMENTOS DE FOSFORILACIÓN IN VITRO. Los ensayos de fosforilación se llevaron a cabo con 12 µg de proteína recombinante en un tampón de 50 mM de Tris-Cl, pH 8.0, que además contenía 10 mM de MgCl₂, 0.2 mM de ATP, conteniendo, o no, [γ -³²P]ATP (0.1 µCi/nmol) y 100 U de la subunidad catalítica de la PKA (New England Biolabs). El volumen final fue de 50 µl y las muestras se incubaron por 2 h a 37° C. Después de la fosforilación, las proteínas se separaron en SDS-PAGE al 8 %. Los geles se secaron y se expusieron para autoradiografía a un film Cyclone para uso en un sistema de identificación Packard Cyclone Phosphorimager.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA CALCINEURINA, USANDO A LA FLNA COMO SUSTRATO. Las proteínas recombinantes (nativa y mutada) purificadas y fosforiladas con PKA en presencia de [P^{32}]- γ ATP, según se describe arriba, fueron utilizadas como sustrato de la CN para medir la actividad específica de ésta. Las condiciones detalladas para la reacción de defosforilación fueron descritas de manera detallada por García y Cols. (56). De la misma manera, en esta publicación se detallan las condiciones para la inhibición de la CN in situ i. e., en células 293 FT y en plaquetas.

RESULTADOS

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS NATIVO Y MUTADO RECOMBINANTES DE LA REGIÓN C-TERMINAL DE LA FILAMINA. Se expresó el extremo C-terminal de la FLNa, residuos (1671-2361) correspondiente a un peso molecular de 79 kDa, tanto en forma nativa como mutada (S2152) en células 293FT. Tanto estos péptidos como la FLNa completa de 280 kDa obtenida de plaquetas reaccionaron después de la inmunotransferencia con un anticuerpo específico generado previamente por nosotros al inmunizar conejos con proteína recombinante del extremo C-terminal de la FLNa, residuos (1717-2360), generada en células E. coli BL21 (DE3), (55,63,64). Los fragmentos de 79 kDa también reaccionaron con un anticuerpo Anti-Xpress, el cual detecta al epítipo localizado en el extremo N-terminal de los péptidos de fusión.

La FLNa recombinante, que tiene seis residuos en tandem de histidina, fue purificada usando una columna de afinidad por níquel (probond invitrogen). La figura 4 muestra a los fragmentos recombinantes nativo (N) y mutado (M) de la FLNa en geles de poliacrilamida teñidos con Azul de Coomassie.

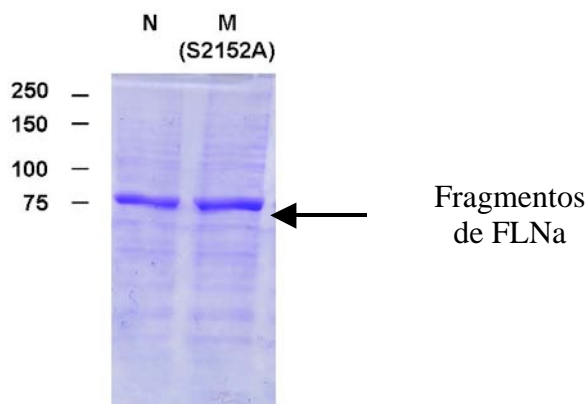


Fig. 4 Fragmentos (1671-2361) nativo (N) y mutado (M, S2152A) purificados y resueltos en gel de poliacrilamida al 10% y teñidos con Azul de Coomassie.

DEFOSFORILACIÓN IN VITRO DE LA FLNA RECOMBINANTE NATIVA (1671-2361) PREVIAMENTE FOSFORILADA. El fragmento nativo puro del extremo C-terminal de la FLNa previamente fosforilado con la subunidad catalítica de la PKA, se defosforiló con calcineurina (1-2 µg), calcio (0.5 mM) y calmodulina (4 µM).

Habiendo demostrado previamente que la Ser2152 del extremo C-terminal de la FLNa era el único residuo fosforilable por PKA, confirmamos que al sustituir a este residuo por Alanina la incorporación de fosfato marcado y por lo tanto la subsiguiente posible defosforilación de éste fueron abolidos, fig.5. (4,5,54,55).

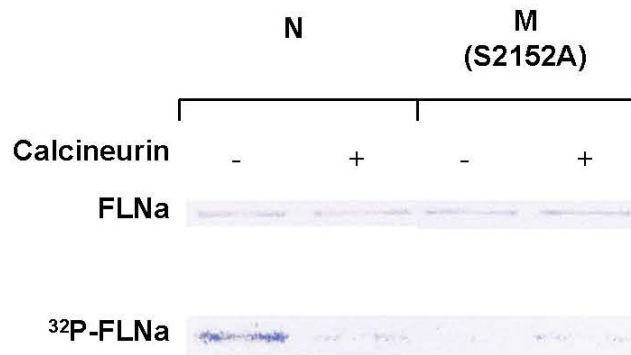


Fig. 5 Inmunotransferencia (FLNa) y autoradiograma (³²P-FLNa) de los fragmentos recombinantes (1671-2361) nativo (N) y mutado (M) purificados de la FLNa en donde se muestra que solo N(-) pudo ser fosforilada (Ser2152) por PKA y defosforilada N(+) por calcineurina (2 µg), mientras que M no fue defosforilada M(+) ya que no incorporó fosfato por PKA M(-).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA CALCINEURINA

(CN) USANDO A LA FLNa, COMO SUSTRATO. La figura 6 muestra el curso temporal de la defosforilación de la FLNa recombinante por CN (1.04 ng/ μ l), CaCl₂ (0.5mM), calmodulina (4 μ M, donada por el Dr. Jaime Mass) y NiCl₂ (1.5mM) (ver Materiales y Métodos) (56). De la porción lineal de la curva obtuvimos una actividad específica de 1.44 +/- 0.096 nmol/mg/min. Sin embargo, encontramos que la estequiometría de incorporación de fosfato radioactivo por fragmento de FLNa C-terminal era 10 veces menor a lo esperado en FLNa recombinante. Esto se interpretó (García et al), (56) como indicativo de que la Ser 2152 ya estaba previamente fosforilada (al menos 90 %) al ser sintetizada en las células 293FT. De esta manera, la velocidad medida de eliminación de marca (³²P) por defosforilación en realidad indicaba una velocidad de eliminación de fosfato 10 veces superior a la observada. Por tal motivo, asumimos que la actividad específica de la CN utilizando a la FLNa (Ser 2152) como sustrato en realidad era de 14.4 +/- 0.96 nmol/mg/min. En condiciones similares de reacción se reportó un valor comparable (6.25 nmol/mg/min.) para la actividad específica de la CN plaquetaria reportado por Tallant y cols (65,66). Estos datos indicaron que en realidad la FLNa (Ser 2152) es un buen sustrato para la CN. El inserto en la figura muestra que la estimación de la actividad específica se hizo bajo condiciones de cinética lineal, ya que la defosforilación de la FLNa nativa, recombinante y pura era proporcional a la concentración de enzima (0.52- 4.16 ng/ μ l).

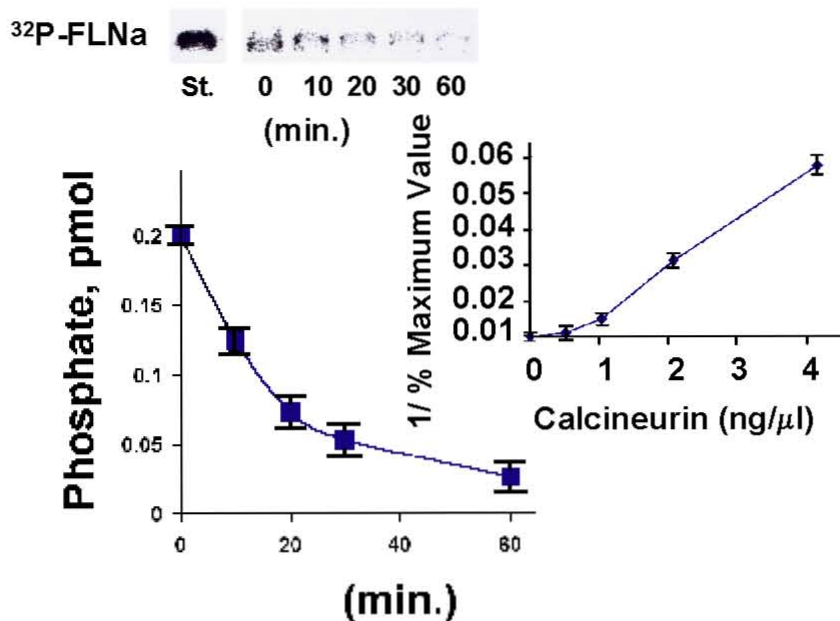


Fig. 6 Determinación de la actividad específica de la calcineurina utilizando al fragmento recombinante (1671-2361) fosforilado (Ser2152) y purificado como sustrato. Las condiciones de reacción se detallan en (56).

LA CICLOSPORINA (CSA) REDUCE LA VELOCIDAD DE DEFOSFORILACIÓN DE LA FLNa NATIVA RECOMBINANTE (1671-2361), INDUCIDA POR CALCIO Y IONÓFORO A23187 EN CÉLULAS 293FT. Ya que la FLNa (Ser2152) es fosforilada/defosforilada in vitro de manera eficiente, se pensó que un efecto similar podía ser esperado en células intactas, después de la estimulación endógena de la PKA, seguida de la activación de la CN, manteniendo niveles elevados de calcio mediante la incorporación de éste con el ionóforo A23187. En estas circunstancias, la CsA aumentó la incorporación de ^{32}P en el fragmento de FLNa inmunoprecipitado de las células 293FT y el máximo efecto se apreció en presencia de CsA, Forskolina e Isobutil Metil Xantina (IBMX, inhibidor de la fosfodiesterasa) ver Fig. 7, (67).

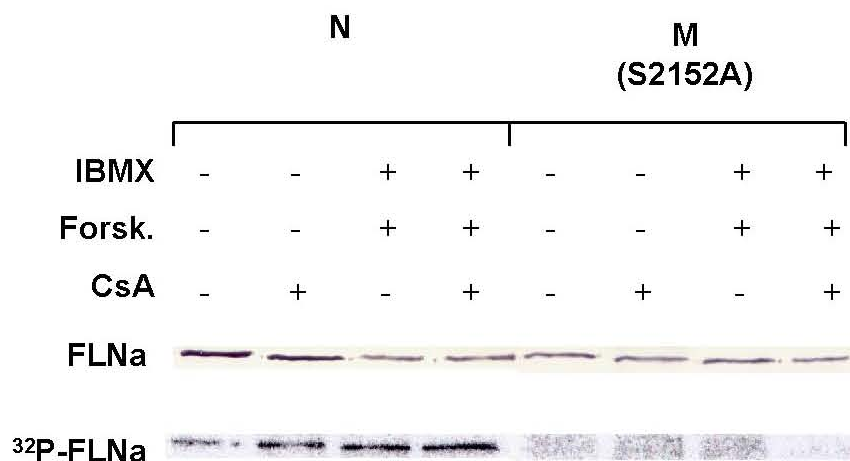


Fig. 7 Efecto de la inhibición de la calcineurina por CsA *in situ* sobre la fosforilación de los fragmentos (1671-2361) recombinantes nativo (N) y mutado (M) expresados en células 293FT. La proteína recombinante fue inmunoprecipitada a partir de células 293FT precargadas con ³²P e incubadas en presencia de los agentes indicados: 1 mM Isobutilmetilxantina (IBMX), 10 μM Forskolina (Forsk), y/o 1 μM de CsA. Después de las adiciones las muestras fueron incubadas por 20 min. Con 0.5 mM de CaCl₂ y 1 μM de ionóforo de calcio A23187, ver detalles en (56). De esta manera se aprecia que la FLNa incorporó más fosfato en las células tratadas con CsA y la mayor incorporación se dio en presencia de los tres agentes.

PROTECCIÓN DE LA FLNa POR CICLOSPORINA CONTRA CALPAÍNA IN SITU (PLAQUETAS HUMANAS). Para determinar el papel que pudiera jugar la inhibición de la defosforilación de la FLNa por CsA en la función plaquetaria, se estudió la degradación de la FLNa por calpaína *in situ*. Como se sabe la FLNa es una mezcla de formas fosforiladas en distinto grado, y al ser fosforilada por PKA se hace resistente a la degradación por calpaína. (5,45).

En este sentido, la FLNa es digerida en minutos en una forma dependiente de calcio cuando las plaquetas frescas son incubadas en presencia de calcio y un ionóforo como el A23187 (68,69,70). De acuerdo con esta información, se decidió realizar los experimentos cuyos resultados se muestran en las figuras 8 y 9. Aquí se muestra que la inhibición de la CN por concentraciones crecientes ($1\mu\text{M}$ - $20\mu\text{M}$) (Fig. 8) de CsA protege a la FLNa plaquetaria, de manera progresiva, de ser degradada por calpaína; indicando que muy probablemente la CsA permitió que la Ser2152 se haya mantenido en su estado fosforilado brindando protección contra la degradación proteolítica.

La figura 9 (A y B) muestra el curso temporal de la proteólisis de la filamina en plaquetas que fueron incubadas en presencia de A23187. En ambos casos la filamina desapareció casi completamente a los 10 min. de incubación resultando en la rápida acumulación del producto de degradación N-terminal de la proteína (Controles). Esta proteólisis pudo ser prevenida completamente por la adición de $85\mu\text{g/ml}$ del inhibidor de calpaína I (Calp. I), el cual es un inhibidor específico de calpaína permeable a la membrana celular, indicando que la proteasa responsable de la hidrólisis fue la calpaína, cuya actividad da cuenta del 95% de la actividad proteolítica total de la plaqueta. (69,70,71). También se muestra que cuando las plaquetas fueron tratadas con $20\mu\text{M}$ de CsA por 10 min. antes de la adición del A23187, la filamina permaneció sin ser degradada totalmente por casi 30 min. El tiempo requerido para una hidrólisis completa de la filamina en estos experimentos varió desde unos cuantos segundos hasta algunos minutos dependiendo de las concentraciones de A23187 y de calcio extracelular utilizadas. En los experimentos mostrados se utilizaron $1\mu\text{M}$ de A23187 y 0.5mM de CaCl_2 . Estas condiciones permitieron observar claramente un contraste en la proteólisis de la filamina entre las muestras control y las plaquetas tratadas con las concentraciones indicadas de CsA o Calp. I.

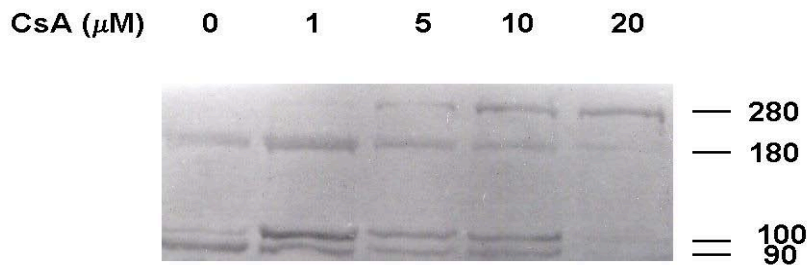


Fig. 8 La CsA protege a la FLNa in situ, de manera dosis dependiente, contra la degradación por calpaína. Plaquetas frescas fueron preincubadas por 30 min. con las concentraciones indicadas de CsA. Después, se añadió CaCl_2 (0.5 mM) y A23187 (1 μ M) y la incubación continuó por otros 30 min. La figura muestra la inmunotransferencia de la proteína plaquetaria teñida con un anticuerpo primario anti-

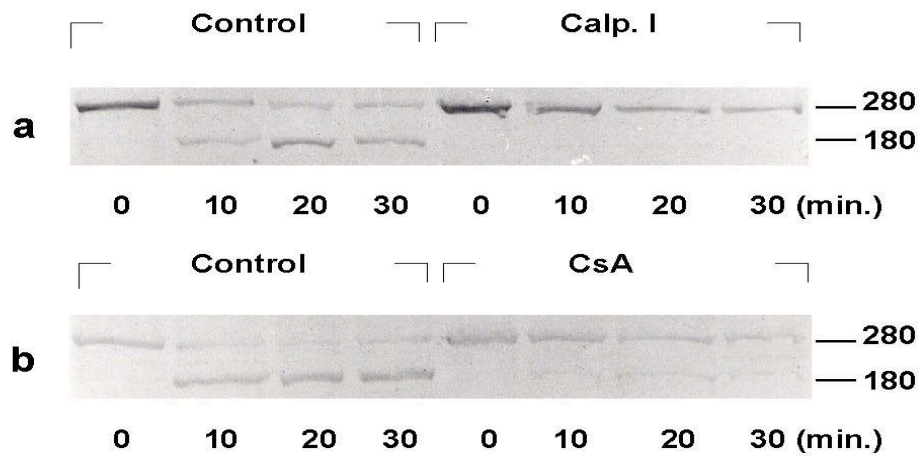


Fig.9 Inmunotransferencia de proteína plaquetaria mostrando el curso temporal de la degradación de FLNa por calpaína, y el efecto protector de: a) 85 μ g/ml de Calp. I (inhibidor específico de la calpaína) y, b) 20 μ M de CsA.

DISCUSION

Estudios previos han mostrado que la filamina es una fosfoproteína con un contenido de fosfato de 18 a 40 moles de fosfato/mol de filamina (5,72). El análisis de la secuencia de aminoácidos ha revelado múltiples sitios potenciales para fosforilación por diversas cinasas: tres sitios para PKA, treinta y tres sitios para PKC, treinta sitios para caseína cinasa II e inclusive un sitio para tirosina cinasa. En su estado fosforilado la filamina no es sustrato de la PKC pero puede aún ser fosforilada por PKA y retiene su habilidad de organizar una red altamente estructurada de actina. Además, la fosforilación por PKA brinda una molécula resistente a la degradación por calpaína. En este caso, el sitio de fosforilación fue localizado en el extremo C-terminal de la proteína que fue el único que incorporó ^{32}P después de la fosforilación (4,5,64). Estudios tanto *in vitro* como *in situ*, indicaron que la serina 2152 es el único residuo susceptible de fosforilación por PKA en esta porción de la proteína (54,55,84). Una propiedad interesante de este residuo es que se encuentra adyacente a un residuo de prolina (Pro 2151). Se ha mostrado que los residuos de prolina brindan un elemento de control en muchas cadenas polipeptídicas al sufrir isomerización cis/trans. Además, la fosforilación de motivos serina-prolina o treonina-prolina brinda un sitio de regulación a este nivel al modular la actividad de isomerización (73,74). Un ejemplo notable de este tipo de fosforilación dirigido por prolina se encuentra en la proteína Tau asociada a microtúbulos que, en pacientes con enfermedad de Alzheimer, aparece en agregados precipitables hiperfosforilados resistentes a proteólisis por calpaína (75,76,77,78). Otra característica interesante de este tipo de sitios de fosforilación es que la fosfatasa calcineurina (CN) regula su estado de fosforilación. De hecho, la reducción de la actividad de la CN en el cerebro lleva a un estado persistente de fosforilación de la proteína Tau (79,80).

Por otro lado, con respecto a la FLNa, además de tener un papel en la reestructuración del citoesqueleto y en los cambios de forma celulares inducidos por movimiento celular, agregación y respuesta a estímulos, ésta es una molécula de andamiaje que recluta más de 40 proteínas distintas, incluyendo Rho GTPasas, receptores nucleares como el receptor de andrógeno (AR), proteínas supresoras de tumores (BRCA2), receptor de insulina, proteínas de choque térmico y receptores de integrinas, además de los filamentos de actina, y la mayoría de estas interacciones ocurren a través de su extremo C-terminal. En este caso aún permanecía por definirse el posible papel que la fosforilación de la FLNa pudiera jugar en la regulación de todas las macromoléculas que se unen a ella.

Los resultados de esta tesis muestran que el extremo C-terminal de la FLNa, en particular la Ser 2152, es un buen sustrato de la CN *in vitro* e *in vivo* en donde el inhibidor específico de ésta, la CsA, permitió mantener un estado altamente fosforilado y resistente a proteólisis por calpaína.

Los resultados de este trabajo aportan elementos adicionales que permiten presentar el papel de la fosforilación/defosforilación de la FLNa en un esquema alternativo asumiendo, además, que los péptidos derivados de su proteólisis participan, como elementos señalizadores en vías corriente abajo, incluyendo rutas nucleares y de reorganización misma del citoesqueleto.

El modelo asume que la FLNa fosforilada (Ser 2152) se encuentra unida al citoesqueleto de actina en la superficie celular a través de su interacción con receptores de membrana. En particular, en las plaquetas la FLNa forma la red GP-Ib-FLNa-actina. Los filamentos de actina también pueden formar una malla tridimensional estabilizada por moléculas de FLNa (ver Fig.10, izquierda). Bajo condiciones de reposo la FLNa permanece fuertemente unida a los filamentos de actina y resistente al ataque de la calpaína permitiendo una estructura altamente

organizada alrededor de la cual las macromoléculas mencionadas anteriormente se pueden agrupar.

Posterior a la estimulación de los receptores debida a diversos estímulos fisiológicos y exógenos se da una marcada reorganización del citoesqueleto la cual se requiere para movimientos celulares, diferenciación, interacciones intracelulares y secreción, las cuales culminan en una conducta celular alterada apropiada para las nuevas circunstancias. Uno de los primeros eventos en la activación, sin embargo, es un rápido incremento en la concentración citosólica de calcio que tiene efectos profundos en la estructura del citoesqueleto. Los filamentos de actina son fragmentados por la gelsolina y la calpaína es activada resultando en la ruptura de proteínas como la filamina, talina, otras proteínas del citoesqueleto y dominios de membrana de receptores de integrina entre otros sustratos (3,81,82,83). Esto rompe la estructura del citoesqueleto, Fig. 10 centro.

Nuestro modelo asume que éste es un evento crítico en la señalización celular, ya que los fragmentos derivados juegan un papel principal en eventos corriente abajo. En este punto la CN juega un papel fundamental ya que en el caso del la FLNa al menos permite la defosforilación de ésta y su subsiguiente degradación dando lugar a la reorganización de la malla de actina. Además, la CN puede actuar simultáneamente sobre otros blancos iniciando cascadas de señalización como es el caso de la proteína Tau o el NFAT en donde motivos Ser/Thr-Pro son directamente defosforilados. En concordancia con ésta función reguladora de la CN está el hecho de que la calpaína induce una proteólisis limitada de sus sustratos, sugiriendo una acción reguladora más que de hidrólisis general. Ésta ocurre únicamente en sitios de membrana en donde la proteasa es reclutada después de la ocupación de los receptores adyacentes. Se ha brindado evidencia indicando que la calpaína asociada a la membrana se activa de manera muy

rápida actuando corriente arriba de las Rho GTPasas y efectores subsiguientes, siendo así necesaria para la acción de las GTPasas (85,86). Estos hechos en combinación con los resultados del presente estudio hacen surgir la posibilidad de que algunos de los fragmentos liberados por la acción del calpaína mediada por fosforilación/defosforilación puedan participar como “Péptidos Proteolizados Integradores de Señales” (o SIPP por sus siglas en inglés “Signaling Integrator Proteolytic Peptides”), los cuales mediarían acciones en rutas corriente abajo. Como se mencionó, evidencia reciente en la literatura puede ser reanalizada, indicando que éste modelo en verdad ocurre por lo menos en el caso de la FLNa.

Por ejemplo, aunque la FLNa completa es predominantemente citoplásmica, el fragmento C-terminal de 100 kDa de ésta ha sido encontrado en el núcleo en donde se colocaliza con el receptor de andrógeno (RA). Este fragmento inhibe la transactivación del RA e interrumpe las interacciones entre dominios de receptor de andrógeno brindando un mecanismo por el cual las mutaciones en la región del RA que une a la FLNa resultan en cáncer de próstata (87). Además, se encontró que la cinasa 6 activada por P21 y regulada por Rho (Pak 6) se unía a la misma región del receptor de andrógeno en donde se une a la FLNa en este caso la Pak 6 también inhibía la actividad del RA. Como se mencionó arriba la región C-terminal de la FLNa une diversas GTPasas incluyendo Rac, Rho y Cdc42. Estas moléculas se unen a la FLNa de una manera independiente de GTP y sus efecto sobre la FLNa son desconocidos de esta manera, el producto de degradación del la FLNa podría movilizar estos elementos hacia el receptor de andrógeno en donde su acción es requerida.

Otro ejemplo que merece mención es la habilidad de la FLNa de mediar la formación de verrugas membranales inducidas por Pak 1 (60) (Fig. 10, derecha). En contraste con el efecto estabilizador de la fosfo-FLNa sobre la estructura del citoesqueleto encontrado por nuestro grupo

(5,45). En este estudio se demostró que la fosforilación de la Ser2152 era requerida para cambios dinámicos en la membrana. Muchos de los aspectos del estudio mencionado sin embargo indican que nuestro modelo se puede aplicar mostrando que la FLNa puede asumir dos funciones totalmente distintas en este proceso lo cual resuelve la aparente contradicción. Así se encontró, que la interacción de la FLNa con Pak 1 era recíproca, esto es la FLNa era fosforilada por Pak 1 y Pak 1 era activada por la unión de la FLNa. La activación de Pak 1 por FLNa se llevaba a cabo, sin embargo, utilizando un fragmento C-terminal de 852 aminoácidos de la FLNa obtenido de la librería de expresión de cDNA utilizada. Se encontró que esta región C-terminal se unía al dominio CRIB de la Pak 1, el cual también une Cdc42 y Rac 1 cuando su actividad de cinasa es estimulada por auto-fosforilación (88). In vivo la interacción de la FLNa con la Pak1 se encontró que ocurría después de la estimulación celular por heregulina y esfingolípidos los cuales activaban a la Pak 1 al tiempo que incrementan la concentración intracelular de calcio (89). La asociación de la FLNa con la Pak 1 dependía de la integridad del citoesqueleto siendo interrumpida por citocalasina D.

La explicación dentro de nuestro modelo asume que el péptido C-terminal de la FLNa liberado por la activación de la CN y la calpaína posterior a la estimulación celular funcionaría como un SIPP activando a Pak 1. Después, en un estado posterior la Pak 1 activada por el SIPP fosforilaría a la Ser2152 en la FLNa citosólica que forma parte de la red tridimensional de actina y que no fue hidrolizada por la calpaína asociada a la membrana permitiendo, de esta manera, que la FLNa exprese nuevamente y de manera completa sus propiedades estructuradoras de filamentos de actina. Este paso ocurriría en una etapa posterior independiente del calcio en donde la actividad fragmentadora y depolimerizadora de actina de la cofilina se encuentra inhibida por la actividad de cinasa de LIM la cual fue inducida por fosforilación por Pak 1 (90).

Evidencia adicional en la literatura sugiere que nuestro modelo se puede aplicar a muchas otras vías celulares incluyendo la señalización iniciada por el receptor de insulina o vías activadas por el NFAT (91,92), como también en eucariontes menos complejos como: Entamoeba histolytica, en donde pequeños fragmentos producidos por acción proteolítica tienen mayor actividad que toda la proteína completa de ehFLNa (93). Para una descripción detallada de nuestro modelo y el papel en algunas vías celulares ver García y cols. 2006 (56).

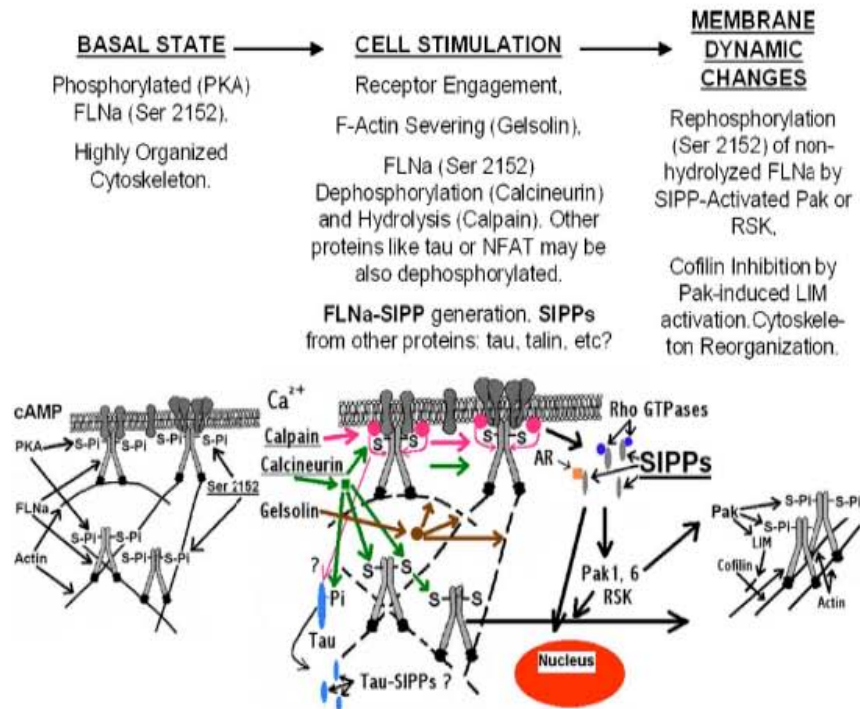


Fig.10 Representación esquemática del mecanismo propuesto para la movilización de la FLNa y la señalización celular. El modelo resuelve las controversias encontradas en la literatura en cuanto al papel de la fosforilación de la FLNa (Ser2152) en el estado basal, caracterizado por una estructura organizada en el citoesqueleto en contraste con el estado dinámico que sigue a la estimulación celular. El conflicto desaparece asumiendo que los fragmentos de la FLNa producidos por proteólisis por calpaína regulada por calcineurina tienen un papel como péptidos señalizadores en vías corriente abajo. Es factible asumir que elementos similares sean generados por muchas otras proteínas como Tau cuya proteólisis esta regulada por mecanismos similares.

CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados de este trabajo indican que la calcineurina puede regular la susceptibilidad de la FLNa a calpaína mediante la defosforilación de la FLNa en el residuo Ser2152. Definir el mecanismo por el cual la proteólisis de la FLNa por calpaína es regulada es de singular importancia por múltiples razones. Por ejemplo, se encontró que un péptido C-terminal de 100 kDa de la FLNa se encuentra de manera natural en el núcleo celular asociado al receptor de andrógeno. De la misma manera, hasta la fecha se han encontrado más de 40 macromoléculas asociadas a esta misma región de la FLNa. El hecho de que los resultados de este estudio muestren que durante la activación celular procesos de fosforilación/ defosforilación pueden regular la liberación de fragmentos proteolíticos unidos a estas moléculas accesorias, brinda un mecanismo mediante el cual la célula puede enviar señales corriente abajo a partir del citoesqueleto y otros elementos asociados a la membrana celular. Hemos denominado a estas unidades señalizadoras “Péptidos Proteolizados Integradores de Señales” (o SIPPs, por sus siglas en Inglés, “Signaling Integrator Proteolytic Peptides”). Además, la existencia de estas moléculas señalizadoras resolvería muchas de las controversias que actualmente existen en la literatura acerca del papel de la fosforilación en la dinámica del citoesqueleto.

REFERENCIAS

- 1 Huang, E.M. and Detwiler, T.C. (1986). In Biochemistry of Platelets (Phillips, D.R. and Shuman, M.A., eds.) pp.1-68, Academic Press, New York.
- 2 Hartwig JH, Barkalow K, Azim A, Italiano J.(1999) The elegant platelet: signals controlling actin assembly. *Thromb. Haemost.* Aug; **82(2)**:392-8
- 3 Fox Joan E.B. (2001). Cytoskeletal proteins and platelet signaling. *Thromb. Haemost.* **86**, 198-213.
- 4 Chen, M. and Stracher, A. (1989). In situ phosphorylation of platelet actin-binding protein by cAMP-dependent protein kinase stabilizes it against proteolysis by calpain. *J. Biol Chem.* **264**, 14282-14289
- 5 Wu, M.P., Jay, D. and Stracher, A. (1994). Existence of multiple phosphorylated forms of human platelet actin-binding protein. *Cell. and Mol. Biol. Res.* **40**, 351-357
- 6 Guidebook to the cytoskeletal and motor proteins (1993) (Kreis, T. and Vale R. eds.) Sambrook & Tooze Publication, Oxford University Press, New York
- 7 Mitchison TJ, Cramer LP (1996). Actin-Based cell motility and cell locomotion. *Cell.* **84**, 371-376.
- 8 Matsudaira P. (1994). Actin crosslinking proteins at the leading edge. *Semin Cell Biol.* **5(3)**, 165-174.
- 9 Wilma A. Hofmann¹, Ljuba Stojiljkovic, et. al (2004). Actin is part of preinitiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat. Cell Biol.* Nov; 6 (11):1094-1101.
- 10 Ricardo Uribe, David Jay. (2007). A review of actin binding proteins: New Perspectives. *Mol. Biol.* On line first.
- 11 Ozanne D, Brady M, Gaughan L, Cook S, Neal D, Robson C (2000). Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the F-actin crosslinking protein filamin. *Mol Endocrinol* 2000; **14**: 1618–1626.
- 12 Posey (2000). Failure of gelsolin overexpression to regulate lymphocyte apoptosis. *Blood.* **95**, 3482-3488.
- 13 Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-514.
- 14 Oath Y., Suzuki, N., Nakamura, S., Hartwig, J.H. and Tassel, T.P. (1999). The small GTPases Real targets filamin to induce filopodia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 2122-2128.
- 15 Gorlin, J.B., Yamin, R., Egam, S., Stewart, M., Tassel, T.P., Kwiatkowski, D.J. and Hartwig, J.H. (1990). Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin) : a molecular leaf spring. *J. Cell. Biol.* **111**, 1089-1105
- 16 Sonnenberg A. Arjan van der Flier, (2001). Structural and functional aspects of filamins. *Biochem. Et Biophysica Acta.* **1538**, 99-117.
- 17 Yuan Y, Dopheide SM, Ivanidis C, Salem HH, Jackson SP. (1997). Calpain regulation of cytoskeletal signaling complexes in von Willebrand factor-stimulated platelets. Distinct roles for glycoprotein Ib-V-IX and glycoprotein

- Iib-IIIa (integrin alphaIIb beta3) in von Willebrand factor-induced signal transduction. J. Biol. Chem. Aug 29; **272(35)**:21847-54.
- 18 Yuanyi Feng Christopher A. Walsh, (2004). The many faces of filamin: A versatile molecular scaffold for cell motility and signaling. Nature Cell Biology **6(11)**, 1034-1038.
- 19 Maestrini E, Patrosso C, Manzini M, Rivella S, Rocchi M, Repetto M, Villa A (1993). Mapping two genes encoding isoforms of the actin binding protein ABP-280, a dystrophin like protein, to Xq28 and to chromosome 7. Human Mol Genet.; **2**: 761-766.
- 20 Tassel TP, Condeelis J, Cooley L, Hartwig JH, Noegel A, Schleicher M, Shapiro SS (2001). Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. Nat Rev Mol Cell Biol; **2**: 138-45.
- 21 Hartwig J, Tassel T (1975). Isolation and properties of actin, myosin, and a new actin binding protein in rabbit alveolar macrophages. J Biol Chem; **250**: 5696-5705.
- 22 Arias Romero LE, de la Rosa CH, Almaráz Barrera Mde J., Díaz-Valencia JD., Sosa-Peinado A, Vargas M. (2007). EhGEF3, a novel Dbl family member, regulates EhRacA activation during chemotaxis and capping in Entamoeba histolytica. Cell Motil Cytoskeleton May; **64(5)**: 390-404
- 23 Tassel TP, Condeelis J, Cooley L, Hartwig JH Noegel A, Schleicher M, Shapiro S. (2001). Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 2001; **2**: 138-145.
- 24 Xu WF, Xie ZW, Chung D, Davie E. (1998). A novel human actin-binding protein homologue that binds to platelet glycoprotein Iba. B lood; **92**: 1268–1276.
- 25 Meyer SC, Zuerbiq S, Cunningham CC, Hartwig JH, Bissell T, Gardner K, Fox JE. (1997). Identification of the region in actin-binding protein that binds to the cytoplasmic domain of glycoprotein Ibalpha. J Biol Chem; **272**: 2914–2919.
- 26 Calderwood, D, Shattil S, Ginsberg M. (2000). Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. J Biol Chem; **275**: 22607–22610.
- 27 Ott I, Fischer E, Miyagi Y, Mueller B, Ruf W (1998). A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280. J Cell Biol; **140**: 1241–1253.
- 28 Oath Y, Tassel T, Hartwig J. (1991). Ligand-sensitive binding of actin-binding protein (ABP) to immunoglobulin G Fc receptor I(FcgR1, CD64). Cell **67**: 275–282.
- 29 Liu G, Thomas L, Warren RA, Enns CA, Cunningham CC, Hartwig JH, Thomas G (1997). Cytoskeletal protein ABP-280 directs the intracellular trafficking of furin and modulates protein processing in the endocytic pathway. J Cell Biol; **139**: 1719–1733.
- 30 Thompson TG, Cha TM, Hack AA, Brosius M, Rajala M, Lidov HGW, McNally ME, Watkins S, Kunkel LM (2000). Filamin 2 (FLN2): a muscle-specific sarcoglycan interacting protein. J Cell Biol; **148**: 115–126.

- 31 van der Ven PFM, Wiesner S, Salmikangas P, Auerbach D, Himmel M, Kempa S, Hayeß K, Pacholsky D, Taivainen A, Schröder R, Carpén O, Fürst DO (2000). Indications for a novel muscular dystrophy pathway: g- filamin, the muscle-specific filamin isoform, interacts with myotilin. J Cell Biol; 151: 235–247.
- 32 Stahlhut M, van Deurs B (2000). Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. Mol Biol Cell; **11**: 325–337.
- 33 Schwarzman AL, Singh N, Tsiper M, Gregori L, Dranovsky A, Vitek MP, Glabe CG, George-Hyslop PH, Goldgaber D (1999). Endogenous presenilin 1 redistributes to the surface of lamellipodia upon adhesion of Jurkat cells to a collagen matrix. Proc Natl Acad Sci; 96: 7932–7937.
- 34 Guo Y, Zhang S, Sokol N, Cooley L, Boulianne G (2000). Physical and genetic interaction of filamin with presenilin in Drosophila. J Cell Sci; 113: 3499–3508.
- 35 Li M, Bermak C, Wang Z, Zhou Q. (2000). Modulation of dopamine D2 receptor signaling by actin-binding protein (ABP-280). Mol Pharmacol; **57**: 446–452.
- 36 Browne K, Johnstone R, Jans D, Trapani J (2000). Filamin (280-kDa actin-binding protein) is a caspase substrate and is also cleaved directly by the cytotoxic T lymphocyte protease granzyme B during apoptosis. J Biol Chem; 275: 39262–39266.
- 37 Edwards D, Towb P, Wasserman S (1997). An activity-dependent network of interactions links the Rel protein Dorsal with its cytoplasmic regulators. Development; 124: 3855–3864.
- 38 Leonardi A, Ellinger-Ziegelbauer H, Franzoso G, Brown K, Siebenlist U (2000). Physical and functional interaction of filamin (actin-binding protein-280) and tumor necrosis receptor-associated factor 2. J Biol Chem 2000; 275: 271–278.
- 39 Marti A, Cunningham LC, Oath Y, Hartwig J, Tassel TP, Kyriakis JM, Avruch J (1997). ABP-280 binds the SAPK activator SEK-1 and is required for TNF α activation of SAPK in melanoma cells. J Biol Chem; 272: 2620–2628.
- 40 Ozanne D, Brady M, Gaughan L, Cook S, Neal D, Robson C (2000). Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the F-actin crosslinking protein filamin. Mol Endocrinol 2000; 14: 1618–1626.
- 41 Oath Y, Suzuki N, Nakamura S, Hartwig J, Tassel T (1999). The small GTPases Rac1 and RhoG target filamin to induce filopodia. Proc Natl Acad Sci 1999; 96: 2122–2128.
- 42 Bellanger JM, Bellanger JM, Astier C, Sardet C, Oath Y, Tassel TP, Debant A. (2000) The Rac1- and RhoG-activating domain of the bifunctional guanine nucleotide exchange factor Trio targets filamin to remodel cytoskeletal actin. Nature Cell Biol; 2: 888–892.
- 43 Krief S, Faivre JF, Robert P, Le Douarin B, Brument LM, Lefrere I, Bouzyk MM, Anderson KM, Greller LD, Tobin FL, Souchet M, Bril A. (1999) Identification and characterization of cvHsp. A novel human small stress protein selectively expressed in cardiovascular and insulin-sensitive tissues. J

- Biol Chem; 274: 36592–36600.
- 44 Petrecca K, Miller D, Shrier A. (2000). Localization and enhanced current density of the Kv4. 2 potassium channel by interaction with the actin-binding protein filamin. J Neurosci; 20: 8736–8744.
- 45 Zhuang QQ, Rosenberg S, Lawrence J, Stracher A. (1984): Role of actin binding protein phosphorylation in platelet cytoskeleton assembly. Biochem Biophys Res Commun; 118: 508-513.
- 46 Yuan Y, Shen ZJ (2001). Interaction with BRCA2 suggests a role for filamin-1 (hsFLNa) in DNA damage response. J Biol Chem; 276: 48318-48324.
- 47 Kiema T, Lad Y, Jiang P, Oxley CL, Baldassarre M, Wegener KL, Campbell ID, Ylanne J, Calderwood DA (2006). The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. Mol Cell; **21**: 337-347.
- 48 Solum NO, Olsen TM (1984). Glycoprotein Ib in the Triton-insoluble (cytoskeletal) fraction of blood platelets. Biochim Biophys Acta; **799**: 209-220.
- 49 Okita JR, Pidard D, Newman PJ, Montgomery RR, Kunicki TJ. (1985). On the association of glycoprotein Ib and actin-binding protein in human platelets. J Cell Biol; **100**: 317-21.
- 50 Jamieson GA, Tandon NN, Greco NJ. (1999). Human platelet Thrombin receptor model for platelet activation. Editor, Rao GHR. En: Handbook of platelet physiology and pharmacology. Norwell, Massachusetts. Kluwer Academic Publishers, p. 21-37.
- 51 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=omim>
- 52 Calderwood DA (2004). Talin controls integrin activation. Biochem Soc Trans **32**: 434-437.
- 53 Shattil SJ (1995). Function and regulation of the beta 3 integrins in hemostasis and vascular biology. Thromb Haemostas; 74: 149-155.
- 54 Jay D, García E, Lara JE, Medina MA, de la Luz Ibarra M (2000). Determination of a cAMP-dependent protein kinase phosphorylation site in the C-terminal region of human endothelial actin-binding protein. Arch Biochem Biophys; 377: 80-84.
- 55 Jay D, García E, de la Luz Ibarra M. (2004). In situ determination of a PKA phosphorylation site in the C-terminal region of filamin. Mol Cell Biochem; **260**: 49-53.
- 56 García E, Stracher A, Jay D. (2006). Calcineurin dephosphorylates the C-terminal region of filamin in an important regulatory site: a possible mechanism for filamin mobilization and cell signaling. Arch Biochem Biophys; **446**: 140-50.
- 57 Elizabeth García, David Jay. (2006). In cell signal integration and function. Arch Cardiol Méx; **76**: 67-75.
- 58 Dominic Cuerrier, Tudor Moldoveanu, Peter L. Davies. (2005). Determination of peptide substrate specificity for μ -Calpain by a peptide library-based approach; **280**: 40632-40641.
- 59 Wang, Q., Patton, W.F., Chiang, E.T., Hechtman, H.B., Shepro, D. (1996).

- Filamin translocation is an early endothelial cell inflammatory response to bradykinin: regulation by calcium, protein kinases and protein phosphatases. *J. Cell. Biochem.* **62**, 383-96
- 60 Vadlamudi RK, Li F, Adam L, Nguyen D, Oath Y, Tassel TP, Kumar R (2002). Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nat Cell Biol*; **4**: 681-690.
- 61 Barber, A.J. and Jamieson, G.A. (1970). Isolation and characterization of plasma membranes from human blood platelets. *J. Biol. Chem.* **245**, 6357-6365.
- 62 Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- 63 Jay, D. and Stracher, A. (1994). Expression in Escherichia coli and phosphorylation with cAMP-dependent protein kinase of the N-terminal region of human endothelial actin-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun.* **202**, 764-771.
- 64 Jay, D. and Stracher, A. (1997). Expression in Escherichia coli, phosphorylation with cAMP-dependent protein kinase and proteolysis by calpain of a 71-kDa domain of human endothelial actin-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**, 555-558
- 65 Tallant, E.A. and Wallace, R.W. (1985). Characterization of a calmodulin-dependent protein phosphatase from human platelets. *J. Biol. Chem.* **260**, 7744-7751.
- 66 Sakon, M., Kambayashi, J., Kajiwara, Y., Uemura, Y., Shiba, E., Kawasaki, T. and Mori, T. (1990). Platelet protein phosphatases and their endogenous substrates. *Biochem. Int.* **22**, 149-161.
- 67 Borel, J.F., Padova, F.D., Mason, J., Quesniaux, V., Ryffel, B. and Wenger, R. (1989). Pharmacology of cyclosporine (sandimmune). *Pharmacol. Rev.* **41**, 239-422.
- 68 Bassé, F., Gaffet, P. and Bienvenüe, A. (1994). Correlation between inhibition of cytoskeleton proteolysis and anti-vesiculation effect of calpeptin during A23187-induced activation of human platelets : are vesicles shed by filopod fragmentation ? *Biochim. Biophys. Acta* **1190**, 217-224
- 69 Fujitani, K., Kambayashi, J., Sakon, M., Ohmi, S.I., Kawashima, S., Yukawa, M., Yano, Y., Miyoshi, H., Ikeda, M., Shinoki, N. and Monden, M. (1997). Identification of mu-, m-calpains and calpastatin and capture of mu-calpain activation in endothelial cells. *J Cell Biochem.* **66**, 197-209.
- 70 Nachmias, V.T., Sullender, J.S. and Fallon, J.R. (1979). Effects of local anesthetics on human platelets: filopodial suppression and endogenous proteolysis. *Blood* **53**, 63-72
- 71 Truglia, J.A. and Stracher, A. (1981). Purification and characterization of a calcium dependent sulfhydryl protease from human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **100**, 814-822
- 72 Oath, Y. and Hartwig, J.H. (1996). Phosphorylation of actin-binding protein 280 by growth factors is mediated by p90 ribosomal protein S6 kinase. : J. Biol. Chem. **271**, 11858-11864.
- 73 Schutkowski, M., Bernhardt, A., Zhou, XZ., Shen, M., Reimer, U., Rahfeld,

- JU., Lu, KP., and Fischer, G. (1998). Role of phosphorylation in determining the backbone dynamics of the serine/threonine-proline motif and Pin1 substrate recognition. *Biochemistry* **37**, 5566-5575
- 74 Gothel, SF., and Marahiel, MA. (1999). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 423-436
- 75 Gustke, N., Steiner, B., Mandelkow, EM., Biernat, J., Meyer, HE., Goedert, M., and Mandelkow, E. (1992). The Alzheimer-like phosphorylation of Tau protein reduces microtubule binding and involves Ser-Pro and Thr-Pro motifs. *FEBS Lett.* **307**, 199-205.
- 76 Mandelkow, E.M. and Mandelkow, E. (1993). Tau as a marker for Alzheimer's disease. *Trends Biochem Sci.* **18**, 480-483
- 77 Mandelkow, E.M., Schweers, O., Drewes, G., Biernat, J., Gustke, N., Trinczek, B. (1996). Structure, microtubule interactions, and phosphorylation of Tau protein. *Ann N Y Acad Sci.* **777**, 96-106
- 78 Litersky, J.M. and Johnson, G.V. (1992). Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase inhibits the degradation of tau by calpain. *J. Biol. Chem.* **267**, 1563-1568.
- 79 Garver, T.D., Kincaid, R.L., Conn, R.A. and Billingsley, M.L. (1999). Reduction of calcineurin activity in brain by antisense oligonucleotides leads to persistent phosphorylation of tau protein at Thr181 and Thr231. *Mol. Pharmacol.* **55**, 632-641.
- 80 Lander, C.J., Czech, J., Maurice, J., Lorens, S.A. and Lee, J.M. (1996). Reduction of calcineurin enzymatic activity in Alzheimer's disease: correlation with neuropathologic changes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **55**, 924-931
- 81 Hartwig JH, Barkalow K, Azim A, Italiano J. The elegant platelet: signals controlling actin assembly.(1999). *Thromb. Haemost. Aug*; **82(2)**:392-8
- 82 Hartwig JH, Tassel T.P., Condeelis J., Cooley L., Noegel A., Schleider M., Shapiro S.S. (2001). Filamins as integrators of cell mechanics and signaling. *Nature* **2**, 138-145.
- 83 Pudas, Regina (2006). Structural and interaction on the carboxy-terminus of filamin, an actin-binding protein. Doctoral degree. Faculty of Science, Dep. Biochemistry, University of Oulu, Finland.
- 84 Elizabeth García (2005). Regulación por fosforilación de la degradación de la proteína que une actina, filamina, por calpaína en plaquetas. Tesis para obtener el grado de maestra en Ciencias Fisiológicas, Inst. Neurobiología, UACPyP del CCH.
- 85 Fox J.E. (1999) On the role of calpain and Rho proteins in regulating integrin-induced signaling *Thromb. Haemost.* **82**: 385-391
- 86 S. Kulkarni, T.C. Saido, K. Suzuki, J.E. Fox. (1999) Calpain mediates integrin-induced signaling at a point upstream of Rho family members. *J. Biol. Chem.* **274**: 21265-21275.
- 87 C.J. Loy, K.S. Sim, E.L., Yong. Filamin-A fragment localizes to the nucleus to regulate androgen receptor and coactivator functions *Proc. Natl., Acad. Sci. USA* **100**(2003): 4562-4567.
- 88 E. Manser, T. Leung, H. Salihuddin, Z.S. Zhao, L. Lim (1994). A brain

- serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1 Nature **367** 40-6.
- 89 LL. Chen, J.K. Johansson, R.R. Hodges, D. Zoukhri, E. Ghinelli, J.D. Rios, D.A. Dartt. Differential effects of the EGF family of growth factors on protein secretion, MAPK activation, and intracellular calcium concentration in rat lacrimal gland. Exp Eye Res. **80** (2005) 379-89
- 90 C. Revenu, R. Athman, S. Robine, D. Louvard, (2004) The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. **5** 635-46
- 91 Negulescu, P.A., Shastri, N. and Cahalan, M.D. (1994). Intracellular calcium dependence of gene expression in single T lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A **91**, 2873-2877
- 92 Rao, A., Luo, C. and Hogan, P.G. (1997). Transcription factors of the NFAT family : regulation and function. Annu. Rev. Immunol. **15**, 707-747
- 93 George J N, Rosa J P, George, D F Bainton, A T Nurden , J P Caen , and McEver R P.(1987). Gray platelet syndrome. Demonstration of alpha granule membranes that can fuse with the cell surface. J. Clin. Invest. October; **80(4)**: 1138–1146

APÉNDICE

Artículos publicados durante la realización de la Tesis

Calcineurin dephosphorylates the C-terminal region of filamin in an important regulatory site: A possible mechanism for filamin mobilization and cell signaling[☆]

Elizabeth Garcia^a, Alfred Stracher^b, David Jay^{a,*}

^a *Departamento de Biomedicina Molecular Cardiovascular, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México D.F. 14080, México*

^b *Department of Biochemistry, Health Science Center at Brooklyn, State University of New York 11203, USA*

Received 19 August 2005, and in revised form 7 December 2005

Available online 29 December 2005

Abstract

Filamin is a phosphoprotein that organizes actin filaments into networks. We report that a purified C-terminal recombinant region of filamin is a suitable substrate for calcineurin *in vitro*. Furthermore, 1 μ M cyclosporin A (CsA), a specific calcineurin inhibitor, reduced the dephosphorylation of the recombinant fragment in 293FT cells. Mutagenesis analysis showed that a dephosphorylation step occurred in Ser 2152, which was previously shown to provide resistance to calpain cleavage when endogenous PKA is activated. In contrast, phosphorylation of Ser 2152 was recently reported to be necessary for membrane dynamic changes. In this regard, we found that CsA protects filamin in platelets from calpain degradation. Results could be combined with available information in a single model, assuming that some of the peptide fragments released by calcineurin-regulated calpain action could mediate actions in downstream pathways, which may help to resolve the controversies reported on the role of filamin phosphorylation in actin dynamics.
© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Androgen receptor; Calpain; Calcineurin; Cyclosporin; Filamin; Insulin receptor; NFAT; Pak; RSK; Tau

Filamin A (FLNa, non-muscle filamin or actin-binding protein-280, ABP-280 or ABP)¹ are homodimers with polypeptide subunit chains of 2647 amino acids, corresponding to 280 kDa. The functional domains of each subunit include

an F-actin binding region, a self-association domain, and a membrane glycoprotein binding region [1]. In cells from different origins, including platelets, ABP is an important component of the cytoskeleton, where it promotes rearrangement of actin filaments in response to a variety of physiological and exogenous stimuli [1,2]. Previous studies indicated that a dynamic phosphorylation/dephosphorylation process may modulate the interaction of ABP with other cytoskeletal elements. Dephosphorylation of ABP by treatment with *Escherichia coli* alkaline phosphatase resulted in the loss of its ability to crosslink F-actin into a low-speed sedimentable complex (platelet cytoskeleton) [3,4], whereas phosphorylation of the native protein by cAMP-dependent protein kinase (PKA) strengthens this structural framework by protecting the molecule against proteolytic cleavage by calpain. In this case, the phosphorylation site lies in the 100 kDa carboxy-terminal fragment produced by calpain cleavage [4–7].

[☆] This work was in part supported by a grant from the Mexican National Council for Science and Technology (CONACYT, Grant U40188-Q) to D. Jay.

* Corresponding author. Fax: +52 55 5573 0926.
E-mail addresses: david.jay@cardiologia.org.mx, djay@msc@yahoo.com (D. Jay).

¹ Abbreviations used: ABP, actin-binding protein or filamin A; AR, androgen receptor; Calp, calpain; CN, calcineurin; CsA, cyclosporin A; EGF, epidermal growth factor; FLNa, filamin A or actin-binding protein; Forsk, forskolin; hsp90, heat-shock proteins of average weight 90 kDa; IBMX, isobutylmethylxanthine; IR, insulin receptor; LIM, for LIM1, LIM1 and MEC3 kinases; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NFAT, nuclear factor of activated T cells; Pak1 and 6, p21-activated kinase 1 and 6; PKA, cAMP-dependent protein kinase; RSK, ribosomal S6 kinase; SIPP, signaling integrator proteolytic peptide.

In this regard, FLNa was described as a phosphoprotein whose phosphate content ranges from 18 to 40 mol of Pi/mol FLNa [4]. Indeed, the analysis of the amino acid sequence of FLNa [1] revealed multiple consensus sequences specific for diverse kinases, including three sites for PKA at residues 167, 2152, and 2336, whereas the calpain cleavage site has been localized to residues 1761–1762, 100 kDa away from the C-terminal end. There is an additional calpain site at 10 kDa from the C-terminal region but its cleavage is ineffective. Thus, calpain digestion results in polypeptides of 180, 100, 90, and 10 kDa. From previous studies [8], the threonine at position 167 appears to already be phosphorylated in native ABP, whereas the remaining potential PKA sites appeared to be free in the molecule and confer proteolytic stability upon becoming phosphorylated [4–7].

More recently, in an effort to identify the functionally significant phosphorylation sites in ABP we generated *in vitro* different C-terminal fragments, which, in combination with site-directed mutagenesis analysis, confirmed Ser 2152 as the only PKA phosphorylation site in the C-terminal region of ABP [9]. Subsequent studies have shown that Ser 2152 phosphorylation is stimulated *in vivo* after PKA activation [10,11]. The effect and full consequences of phosphorylation of FLNa, however, have remained unclear and to a certain extent controversial. In contrast to the stabilizing effect of phosphofilamin on cytoskeletal structure reported by us [3–6], phosphorylation of FLNa was reported to be necessary for membrane dynamic changes. In fact, Pak1 and RSK were recently found to phosphorylate FLNa in Ser 2152 in processes which involved membrane ruffle formation and EGF-induced migration of human melanoma cells, respectively [12,11]. In addition, we lack conclusive evidence regarding the role of dephosphorylation and how this step can be coordinated with the opposite phosphorylation reaction to regulate FLNa function.

In a previous study, calcineurin was found to be the only calcium and calmodulin-dependent protein phosphatase present in human platelets that, in addition, was able to reduce ³²P label on many cytoskeletal proteins, including ABP, from a Triton X-100 lysate of thrombin stimulated platelets [13]. At that time, however, the physiological role of this dephosphorylation reaction remained unclear. Platelet calcineurin was first purified from human platelets by Tallant and Wallace [14].

Calcineurin has been described as a calcium/calmodulin-dependent threonine/serine protein phosphatase required for the dephosphorylation and subsequent translocation of the nuclear factor of activated T cells (NFAT) proteins from the cytoplasm to the nucleus in most immune system cells [15]. As substrates for calcineurin, NFAT proteins are major targets for the immunosuppressive drug cyclosporin A (CsA). Inactivation of calcineurin by CsA, however, can also alter a spectrum of other cellular functions in cells outside the immune system; a process which may underlie, at least in part, the

toxic effects of the drug [16,17]. In this report, we provide clear evidence that Ser 2152 in the C-terminal region of FLNa is a suitable substrate for calcineurin *in vitro* and *in vivo* and that the calcineurin-specific inhibitor CsA protects in a dose-dependent manner native filamin in platelets from calpain degradation. We propose a mechanism by which FLNa becomes susceptible to calpain degradation after activated calcineurin promotes its dephosphorylation. After degradation, filamin would allow actin cytoskeleton reorganization. In addition, we also propose a model in which the present results, together with available information, may be combined in a single scheme, assuming that some of the peptide fragments released by calcineurin-regulated calpain action could mediate actions in downstream pathways, which would resolve some of the controversies reported on the role of FLNa phosphorylation during actin dynamics with implications to other cellular routes. The possibility that other cytoskeleton-associated proteins, like tau, could function in a similar fashion is discussed.

Materials and methods

Cells and plasmids

Escherichia coli TOP10 (Invitrogen) was used for plasmid propagation and BL21 (DE3) strain was used for bacterial protein expression. 293FT cells were utilized for experiments involving eukaryotic protein expression. Fresh human platelets, obtained from healthy informed volunteers, were prepared following the procedures described before [18]. Plasmids used were pT7-7M1ABP (containing a 1930 nucleotide sequence section of human endothelial cell FLNa corresponding to the coding region for residues 1717–2360) [7] for bacterial protein expression, and the mammalian expression vectors pcDNA4HM-C2 (containing a 2073-bp section of FLNa corresponding to the coding region for residues 1671–2361) and pcDNA4HM-C2^{*} (carrying a missense mutation, Ser²¹⁵² → Ala (S2152A) in the 1671–2361 fragment) [10]. PCR and site-directed mutagenesis protocols for the elaboration of these plasmids have been previously described [9,10]. Restriction enzyme digestions, agarose gel electrophoresis, and plasmid extractions were performed as described by Sambrook et al. [19]. The missense mutation and part of the DNA sequence of the fragments were verified by fluorescent DNA sequencing utilizing a Perkin-Elmer Genetic Analyzer 310 DNA Sequencer.

Growth, maintenance conditions, and transfection of the 293FT cell line

293FT cells were maintained in 75 cm² flasks containing 15 ml of advanced Dulbecco's modified Eagles medium (advanced DMEM) (high glucose) supplemented with 3% fetal bovine serum (FBS), 2 mM GlutaMax, 100 U/ml

penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.25 µg/ml amphotericin, and 500 µg/ml geneticin (Gibco-BRL). The flasks were incubated in a humidified (95% relative humidity), 37 °C, 5% CO₂ incubator. One day before transfection, when cells were ≈80–90% confluent, the monolayer was detached from the flask surface with trypsin-EDTA (0.05% trypsin, 0.53 mM EDTA-4Na, Gibco BRL) solution and cells were transferred to 35-mm plates. Lipofectamine 2000 (Invitrogen) was used to transfect plasmids into 293FT cells. Experiments were conducted in the 35-mm plates utilizing 0.8 µg DNA per sample (8 × 10⁷ cells). Protein expression was measured three days after transfection.

Purification of proteins

Purification of the recombinant proteins was carried out under native conditions utilizing a nickel-chelating ProBond resin (Invitrogen) following the binding conditions recommended by the manufacturer. Samples were desalted and concentrated by the use of a centrifugal filter device (10 kDa nominal molecular weight limit, Millipore). Purification of bovine-brain calmodulin by phenyl-Sepharose affinity chromatography was conducted as previously reported [20].

Qualitative *in vitro* phosphorylation/dephosphorylation reactions

In vitro phosphorylation assays were carried out in a buffer containing 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 200 µM [γ-³²P]ATP (0.1 µCi/nmol), 100 U of the catalytic subunit of PKA (New England Biolabs), and equal amounts (as visualized by examining the band intensity on Coomassie blue-stained gels) of purified recombinant native (11.6 µg) or mutant (S2152A) (12.4 µg) proteins in a final volume of 50 µl (protein was determined according to the method of Lowry et al. [21] and differences in the degree of purification between native and mutant samples were compensated by visual inspection of the Coomassie blue-stained gels). The phosphorylation reactions were allowed to proceed for 1 h at 30 °C and then stopped by the inclusion of PKA inhibitor peptide (1000 IU) (Sigma). Phosphorylated recombinant peptides were then used in a calcineurin assay by the addition of 0.5 mM CaCl₂, 4 µM calmodulin, and 1–2 µg calcineurin (Sigma formulation: 2500–5000 IU of phosphodiesterase activity/mg protein) in a final volume of 60 µl. Reactions were allowed to proceed for 1 h at 37 °C and then stopped by the addition of SDS-gel sample buffer containing 10 mM EDTA. Analogous experiments were also carried out with a different preparation (Upstate) of CN (see below).

Determination of calcineurin specific activity utilizing phosphofilamin as a substrate

Forty-five micrograms of purified recombinant native protein were incubated in a buffer containing 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM (to ensure saturating con-

ditions) [γ-³²P]ATP (0.5 µCi/nmol), and 100 U of the catalytic subunit of PKA (New England Biolabs) in a final volume of 300 µl. The phosphorylation reaction was allowed to proceed for 3 h at 30 °C and then was stopped by the inclusion of PKA inhibitor peptide (1000 IU) (Sigma). Five-microliters of the reaction were taken at this time and diluted in water (1/100) and 10 µl aliquots of this dilution were counted in a scintillation counter (Packard CA 2200) to determine the specific activity of ATP (651 cpm/pmol). Excess of label was reduced by repeated buffer exchange (Tris-Cl, pH 7.5) in a centrifugal filter device (Millipore). This preparation of phosphofilamin [³²P]FLNa, however, could not be directly used as a standard to estimate CN specific activity since it showed a slight contamination of two additional phosphoproteins of approximately 27 and 48 kDa. With the idea of preparing such a standard we proceeded as follows: half volume of the phosphorylation reaction was precipitated with an equal volume of 40% ice-cold trichloroacetic acid (TCA) and the pellet was washed three additional times with 0.5 ml of 20% TCA. Then, the pellet was dissolved with SDS-gel sample buffer and protein was displayed by SDS-10% PAGE. [³²P]FLNa band was cut out from the gel and electro-eluted with a Bio-Rad 422 Electro-Eluter. After concentrating the eluted protein by the use of a centrifugal filter device (Millipore) an aliquot was taken to count the total radioactivity and nanomoles of incorporated phosphate (as compared to the ATP specific activity) in the sample. Measurement of protein concentration in the eluted protein revealed that the specific activity of the labeled FLNa corresponded to only 0.10 mol of phosphate per mole of FLNa (79 kDa). Since a great excess of ATP over FLNa was utilized in the phosphorylation reaction, we assumed that most of the protein (90%) was already phosphorylated when it was purified from 293FT cells. These data are in agreement with previous information (see Discussion below and scheme in Fig. 7) indicating that in resting cells FLNa (Ser 2152) is highly phosphorylated. We also confirmed that more than 98% of the counts were bound to electro-eluted [³²P]FLNa since they could be precipitated by TCA using bovine serum albumin (BSA) as a carrier. [³²P]FLNa prepared by these means could not be reacted with CN due to the presence of residual SDS; however, it could be compared, as a standard resolved by SDS-10% PAGE, with purified recombinant native [³²P]FLNa which reacted with CN allowing the determination of the phosphatase specific activity.

Assays for phosphatase activity were carried out by adding 26 ng (1.04 ng/µl) of CN (Upstate) to 25 µl (final volume) of medium containing 50 mM Tris-Cl, pH 7.4, 0.5 mM CaCl₂, 4 µM calmodulin, 1.5 mM NiCl₂, and 100 µg/ml BSA. Reaction was started by the addition of 0.9 µg of purified recombinant native [³²P]FLNa prepared as described above. Five-microliter aliquots were withdrawn at the times indicated in Results and the reaction was stopped by the addition of SDS-gel sample buffer containing 10 mM EDTA. A parallel control reaction was carried out in which CN was replaced by reaction medium. The



reaction proceeded at a linear rate for at least 10 min, usually dephosphorylating $\approx 30\%$ of [^{32}P]FLNa. After the addition of SDS-gel sample buffer, polypeptides were resolved by SDS-10% PAGE and electrophoretically transferred to nitrocellulose paper. The amount of radioactivity was quantified using a Packard Cyclone Storage Phosphor System by comparing each [^{32}P]FLNa band with the electroeluted [^{32}P]FLNa standard. The amount of phosphate removed from [^{32}P]FLNa by CN in the 25 μl reaction medium was determined from the amount removed in the 5 μl aliquot. Since, we knew the protein concentration of CN (Upstate formulation: 25 $\mu\text{g}/38 \mu\text{l}$) the linear interval of the curve was utilized to determine the specific activity of the phosphatase which was expressed as nmol/mg/min \pm standard deviation from regression ($n=4$). With the idea of determining the linearity of dephosphorylation of [^{32}P]FLNa, an alternative set of experiments, utilizing different concentrations of CN (0.52–4.16 ng/ μl), was conducted. Conditions of dephosphorylation were similar to those described above but reactions were stopped, by the addition of SDS-gel sample buffer plus 10 mM EDTA, 10 min after starting each reaction by the addition of purified recombinant native [^{32}P]FLNa. Data were plotted as 1/ % maximum value vs. CN concentration (ng/ μl).

In vivo phosphorylation/dephosphorylation assays

Three days after transfection with pcDNA4HM-C2 or pcDNA4HM-C2' plasmids 293FT cells were incubated in buffer (140 mM NaCl, 5 mM glucose, 50 mM Tris-Cl, pH 7.4, 0.35% bovine serum albumin, and 1 mM EDTA). [^{32}P]PO₄ was added in a ratio of 1 mCi/ml and cells were prelabeled for 2 h at 25 °C. Then, cells were washed twice in buffer [140 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM Tris-Cl, pH 7.4, 0.3 mM EDTA, and 85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of calpain inhibitor I (Roche)] and resuspended in the same buffer plus the following additions as indicated in Results: 1 mM isobutylmethylxanthine (IBMX), 10 μM forskolin, and 1 μM CsA. In experiments including CsA, 1 μM of this reagent was included in the cell incubation medium 24 h before the experiment was conducted. We confirmed that CsA did not change the level of expression of the recombinant peptides. After the additions, samples were incubated for 20 min and then 0.5 mM CaCl₂ and 1 μM of the calcium ionophore A23187 were added to allow Ca²⁺ to equilibrate [15,22]. Samples were incubated for an additional 10 min period and reactions were stopped by the addition of 10 mM EDTA. After the assays, samples were placed on ice and the recombinant peptides were immunoprecipitated as follows: monolayers were washed once with buffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM Tris-Cl, pH 7.4, 0.3 mM EDTA, and 85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ calpain inhibitor I) and the dishes were placed on ice. 0.25 ml/35-mm plates of prechilled lysis buffer (150 mM NaCl, 1.0% NP-40, 50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 1.0 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ calpain inhibitor I, and 2 mM EDTA) were added and samples were incubated for 30 min at 4 °C. Cells were scraped from plates and homogenized with a sonic dismem-

brator (Fisher Scientific). The lysate was clarified (spin for 10 min at 10,000g at 4 °C) and incubated with primary anti-Xpress antibody for 1 h. The immune complex was collected with protein A-Agarose (Bio-Rad) and resuspended in SDS-gel sample buffer.

After samples from the *in vitro* and *in vivo* phosphorylation/dephosphorylation experiments were dissolved with SDS-gel sample buffer, polypeptides were displayed by SDS-10% PAGE, electrophoretically transferred to nitrocellulose paper and immunoblotted against primary anti-Xpress antibody followed by peroxidase-conjugated secondary IgG. ³²P incorporation was visualized and quantified using a Packard Cyclone Storage Phosphor System.

Protection of platelet filamin against calpain proteolysis

Fresh human platelets (3×10^7 platelets/sample) were incubated in a buffer containing 140 mM NaCl, 5 mM KCl, and 10 mM NaPO₄, pH 7.4. Where indicated, increasing concentrations (1 through 20 μM) of CsA were added and the samples were incubated for 30 min. Then, 0.5 mM CaCl₂ and 1 μM A23187 were added and after 30 min the reaction was stopped by the addition of 10 mM EDTA plus and SDS-gel buffer. Alternatively, platelets (3×10^8 platelets/ml) were incubated in the same buffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, and 10 mM NaPO₄, pH 7.4) and 85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ calpain inhibitor I or 20 μM CsA were added and incubated for 30 min. Then, 0.5 mM CaCl₂ and 1 μM A23187 were added and aliquots (3.0×10^7 platelets/sample) were removed at the time intervals indicated in Results and were immediately mixed with 10 mM EDTA and SDS-gel buffer. The samples were then immunoblotted against a primary anti-filamin anti-sera followed by peroxidase-conjugated secondary IgG. Primary anti-serum was generated, as previously described, by immunizing rabbits with a recombinant (1717–2360) filamin peptide fragment [7,9].

In vitro and *in vivo* phosphorylation/dephosphorylation results as well as protection analysis against calpain proteolysis presented in this work represent data from typical experiments, which were highly reproducible as confirmed by multiple repetition ($n \geq 4$).

SDS-PAGE was conducted as described by Laemmli [23].

Results

Expression and purification of the C-terminal FLNa fragment

The mammalian expression vectors used in this study were designed to express a FLNa coding region for residues 1671–2361 [10]. Previously, we had verified the expression of the FLNa fragments by immuno-blotting protein from transfected 293FT cells against an anti-sera generated by immunizing rabbits with a recombinant C-terminal (residues 1717–2360) FLNa peptide expressed in *E. coli* BL21 (DE3) [7]. Western blot assay showed that the anti-sera recognized

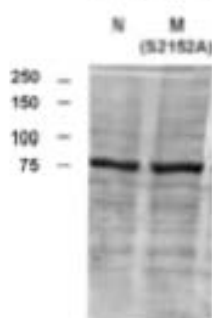


Fig. 1. Purified native and mutant (S2152A) recombinant 1671–2361 fragments. Native (N) and mutant (M) peptides were purified by nickel-chelating affinity chromatography as described in Materials and methods, and samples were analyzed by SDS-10% PAGE. Positions of the molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left. Proteins were visualized by staining the gel with Coomassie blue.

both the native and mutant (S2152A) 79 kDa protein fragments (residues 1671–2361, plus 39 kDa from the N-terminal fusion peptide included in the expression plasmid) as well as native ABP-280 from fresh human platelets [10]. As shown across this study, the 79 kDa fragments also react with anti-Xpress antibody, which detects the eight amino acid Xpress epitope located in the N-terminal fusion peptides.

Since six tandem histidine residues were also present in the N-terminal region of the recombinant proteins, high affinity nickel-chelating resin was used to purify the peptides. Fig. 1 shows a Coomassie blue-stained gel, indicating to what extent both native (N) and mutant (M) FLNa recombinant fragments could be purified following this methodology.

Qualitative *in vitro* dephosphorylation of the pre-labeled native FLNa recombinant 1671–2361 fragment

To ascertain whether calcineurin was able to react with the C-terminal region of filamin, we developed an assay for calcineurin phosphatase activity in which the purified native FLNa fragment was first phosphorylated with the catalytic subunit of PKA (Fig. 2N). Addition of calcineurin, together with Ca^{2+} and calmodulin, markedly reduces the phosphorylation level of the peptide (Fig. 2N+). Since we had previously demonstrated that Ser 2152 is the PKA site in the C-terminal region of FLNa [9,10], we confirmed that substitution of alanine for Ser 2152 in this fragment totally abolished the incorporation of ^{32}P label (Fig. 2M) and consequently the subsequent dephosphorylation step (Fig. 2M+).

Determination of calcineurin specific activity utilizing phosphofilamin as a substrate

Fig. 3 shows the time course of purified recombinant native ^{32}P -FLNa (0.9 μg) dephosphorylation as induced by

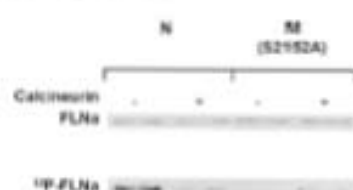


Fig. 2. Purified native recombinant 1671–2361 fragment is a substrate of calcineurin. Native (N) or mutant (S2152A) (M) purified FLNa recombinant fragments were phosphorylated by the catalytic subunit of PKA using radiolabeled ATP as described in Materials and methods, and the reactions were stopped by the addition of 1000 IU of PKA inhibitor peptide. Phosphorylated peptides were then incubated with calcineurin (1–2 μg) in the presence of CaCl_2 (0.5 mM) and calmodulin (4 μM) as indicated (+). Samples were immunoblotted against primary anti-Xpress antibody followed by peroxidase-conjugated secondary IgG (FLNa lanes). ^{32}P -FLNa lanes show ^{32}P incorporation in the Western blot above as visualized with a Packard Cyclone Storage Phosphor System.

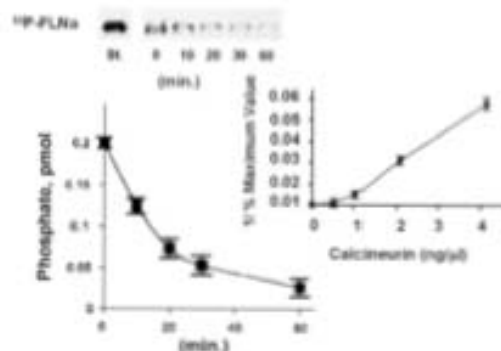


Fig. 3. Determination of calcineurin specific activity utilizing phosphofilamin as a substrate. Assay for phosphatase activity was carried out as indicated in Materials and methods in a final volume of 25 μl in the presence of 1.04 ng/ μl CN and 0.9 μg of purified recombinant native ^{32}P -FLNa substrate. A parallel control reaction was carried out in which CN was replaced by reaction medium. Five-microliter aliquots were withdrawn at the indicated times (time = 0 indicates no CN added) and the reaction was stopped by the addition of SDS-gel sample buffer plus 10 mM EDTA. Polypeptides were resolved by SDS-10% PAGE and electrophoretically transferred to nitrocellulose paper. ^{32}P -FLNa lanes show remaining ^{32}P in each ^{32}P -FLNa band transferred to the nitrocellulose filter. The amount of radioactivity was quantified using a Packard Cyclone Storage Phosphor System by comparing each ^{32}P -FLNa band with 0.48 μg of an homogeneous electro-eluted ^{32}P -FLNa standard (50, 1 μg protein/1.24 pmoles of incorporated phosphate) prepared as indicated in Materials and methods. *Inset*: Increasing concentrations of CN (0.32–4.16 ng/ μl) were reacted with purified recombinant native ^{32}P -FLNa substrate, under the standard conditions just described. After 10 min incubation time reactions were stopped and processed for analysis as described above. Data are presented as 1% maximum value vs. CN concentration (ng/ μl) ($n = 4$).

CN (1.04 ng/ μl) in the presence of CaCl_2 (0.5 mM), calmodulin (4 μM), and NiCl_2 (1.5 mM). From the linear portion of the curve (10 min) a specific activity of $1.44 \pm 0.096 \text{ nmol/}$

mg/min was estimated for the phosphatase. However, since we found that the specific activity (incorporated phosphate) of the labeled FLNa corresponded to only 0.10 mol of phosphate per mole of FLNa (see Materials and methods) and previous data demonstrated that the only PKA substrate in the C-terminal region of FLNa is Ser 2152 [9–11], we could assume that 10 times higher amount of phosphate was removed per minute from this residue during the dephosphorylation reaction, which would render a specific activity of 14.4 ± 0.96 nmol/mg/min. This value may be compared with the reported specific activity of platelet CN (6.25 nmol/mg/min) reported by Tallant and Wallace [14] which was obtained under similar conditions but in the absence of Ni^{2+} as activator. The inset in Fig. 3 shows that the estimation of CN specific activity was carried out under conditions of linear kinetics as far as dephosphorylation of purified recombinant native [^{32}P]FLNa was linear with enzyme concentration (0.52 – 4.16 ng/ μl).

CsA reduces the dephosphorylation of the native FLNa recombinant 1671–2361 fragment in vivo as induced by calcium and A23187

The finding that the FLNa fragment containing Ser 2152 could be phosphorylated/dephosphorylated in vitro suggested that a similar effect might be expected in intact cells as far as conditions that allow endogenous stimulation of PKA followed by calcineurin activation are provided. In this instance, a prolonged elevation of calcium levels is required to maintain calcineurin in an active state. Under these circumstances, if FLNa dephosphorylation accompanies calcium elevation, then CsA might be expected to reduce this effect.

In addition to stimulation of immunoreceptors or G protein-coupled receptors a sustained increase in calcium concentration and subsequent activation of calcineurin can

be elicited pharmacologically by treating cells of diverse origins with calcium ionophores such as ionomycin or A23187 in the presence of calcium [15,22,24]. Fig. 4 shows the effect of calcium equilibration on ^{32}P uptake into FLNa recombinant 1671–2361 fragments expressed in 293FT cells, which were previously exposed to various compounds. Thus, when the native 1671–2361 FLNa fragment was immunoprecipitated from 293FT cells prelabeled with [^{32}P]PO $_4$ for 2 h and treated with $1 \mu\text{M}$ CsA followed by A23187 ($1 \mu\text{M}$) and calcium (0.5 mM) an increase on ^{32}P label could be seen over that of the control (Fig. 4AN, lanes 2+ vs. 1, respectively). Although, the protein kinase involved in the phosphorylation reaction in this case is not known, the data is consistent with the notion of slowdown in dephosphorylation brought about by CsA rather than increased incorporation of phosphate. To determine the effect of cAMP-elevating agents, cells were treated with isobutylmethylxanthine (1 mM) plus forskolin ($10 \mu\text{M}$) in the presence or absence of CsA ($1 \mu\text{M}$) (Fig. 4AN, lanes 4+++ and 3++, respectively). It can be seen that, after the addition of A23187 ($1 \mu\text{M}$) and calcium (0.5 mM), all these agents allowed for an increased ^{32}P incorporation into the recombinant 1671–2361 FLNa fragment. The maximum effect was appreciated in the presence of the three reagents together (Fig. 4AN, lane 4+++). See also the histogram in Fig. 4B).

Once again, when the same experiments were conducted with the mutant (S2152A) fragment, none of the phosphorylation and putative inhibition of dephosphorylation reactions just described could be observed (Fig. 4AM).

CsA protects filamin against calpain degradation in platelets

To determine whether the inhibition of FLNa dephosphorylation by CsA influences a biological process, we utilize human fresh platelets to study the degradation of

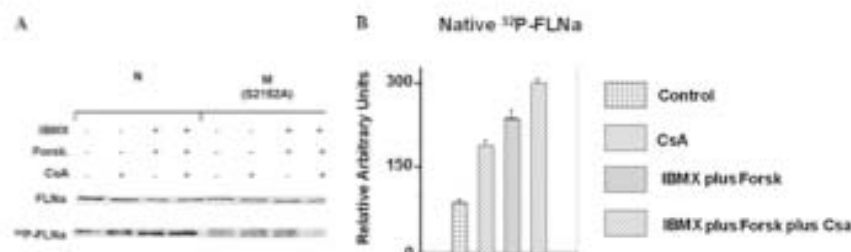


Fig. 4. Effect of calcineurin inhibition on enhancement of native recombinant 1671–2361 fragment phosphorylation in vivo. (A) 293FT cells were transfected with pcDNA410M-C2 (N) or pcDNA410M-C2' (M) plasmids and labeled with ^{32}P . Samples were treated with 1 mM isobutylmethylxanthine (IBMX) and $10 \mu\text{M}$ forskolin and/or $1 \mu\text{M}$ CsA as indicated (+). In experiments including CsA, $1 \mu\text{M}$ of this reagent was included in the cell incubation medium 24 h before the experiment was conducted. After the additions, samples were incubated for 20 min and then 0.5 mM CaCl_2 and $1 \mu\text{M}$ of the calcium ionophore A23187 were added. Samples were incubated for an additional 10 min. Overexpressed FLNa was immunoprecipitated and immunoblotted against primary anti-Xpress antibody followed by secondary peroxidase-conjugated IgG (FLNa lane). [^{32}P]FLNa lane shows ^{32}P incorporation in the Western blot above as visualized with a Packard Cyclone Storage Phosphor System. (B) The dot densities of ^{32}P incorporation in the [^{32}P]FLNa lane for native samples ($n = 4$) were determined by using the Packard Cyclone Storage Phosphor System and plotted as relative intensities in arbitrary units as function of the specific conditions as indicated on the right side.

filamin by calpain *in situ*. As already mentioned FLNa, isolated from human platelets, is a mixture of several phosphorylated forms [4]. These forms differ in their resistance to calpain cleavage and their ability to be phosphorylated by PKA. The ratio highly phosphorylated forms/less phosphorylated forms decreases with the age of the platelets, with the most highly phosphorylated form found only in the freshest platelets. In this highly phosphorylated state FLNa is unable to introduce more phosphate from PKA, indicating that the essential sites are already occupied, and is resistant to cleavage by the calcium dependent sulfhydryl protease calpain. This protection against proteolytic cleavage is specific for calpain since phosphorylation of FLNa does not protect against proteolysis by trypsin, papain and thermolysin [5]. As mentioned above, Ser 2152 is the only PKA phosphorylation site located in the carboxy-terminal region of the molecule whose phosphorylation provides protection against calpain cleavage *in situ* [9,10].

Since, the results of the present study indicate that CsA is able to maintain Ser 2152 in a phosphorylated state, it was important therefore to see if this agent could protect filamin in fresh platelets against calpain action. It is known that FLNa and talin are proteolyzed within minutes in a Ca^{2+} -dependent fashion if platelets are lysed by Triton containing buffer or in the presence of calcium and a calcium ionophore under conditions similar to those required for the activation of calcineurin (see above) [25–28]. The protease responsible for this hydrolysis is calpain, whose activity accounts for 95% of total platelet proteolytic activity [25,27]. For the experiments shown in Figs. 5 and 6, platelets were exposed to the different agents for only 30 min after extraction to maintain fresh preparations, followed by the addition of calcium and ionophore. Fig. 5 shows the protective effect of increasing concentrations of CsA, (1 through 20 μM , which compare to therapeutic “maintenance” and “attack” doses) on FLNa degradation, as induced by incubating platelets with calcium (0.5 mM) and A23187 (1 μM) for 30 min. CsA progressively diminishes the accumulation of the N-terminal 180 kDa and C-terminal 100 and 90 kDa degradation products generated by the action of calpain on its FLNa cleavage sites. In this kind of

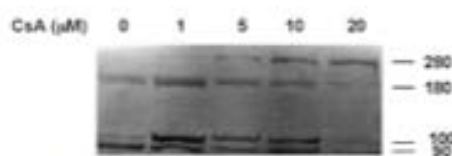


Fig. 5. CsA protects filamin against calpain degradation in platelets. Fresh human platelets were incubated in the presence of increasing concentrations (1–20 μM) of CsA and samples were incubated for 30 min. Then, 0.5 mM CaCl_2 and 1 μM A23187 were added and the preparations were incubated for an additional 30 min. Samples were immunoblotted against a primary anti-Filamin anti- α -sera followed by peroxidase-conjugated secondary IgG. Positions of full-length ABP-280 and its 180, 100, and 90 kDa calpain degradation products are indicated on the right.

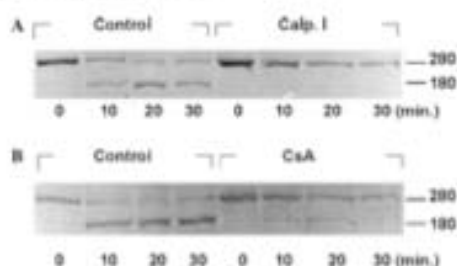


Fig. 6. Time course of FLNa degradation by calpain: effect of CsA and calpain inhibitor I. Fresh platelets were incubated for 30 min in the presence or absence of (A) 85 $\mu\text{g/ml}$ calpain inhibitor I (Calp. I) or (B) 20 μM CsA (CsA). Then, 0.5 mM CaCl_2 and 1 μM A23187 were added and aliquots were removed at the time intervals indicated below each lane and were immediately mixed with 10 mM EDTA and SDS-gel buffer and boiled. Time = 0 indicates no addition of calcium and A23187. The samples were then immunoblotted and analyzed as indicated in Fig. 4. Positions of full-length ABP-280 and its 180 kDa N-terminal fragment produced by calpain cleavage are indicated on the right.

protocols, the time required for complete hydrolysis of FLNa varies from less than 1 min to several minutes depending on the lysate dilution factor or concentration of ionophore and calcium utilized. We previously determined that, under the present conditions, 0.5 mM calcium plus 1 μM A23187 showed a clear contrast between control and treated platelets (data not shown). Fig. 6B shows the time course of FLNa proteolysis (accumulation of the 180 kDa peptide is also presented) in platelets that were incubated with CsA (20 μM) for 30 min prior to being treated with A23187 and calcium. FLNa was degraded before 10 min in control platelets (Control), whereas in CsA-treated platelets (CsA) it remained for up to 30 min. This proteolysis could be completely arrested by calpain inhibitor I (Fig. 6A, Calp. I) or, under similar conditions [6], by the inclusion of leupeptin, both inhibitors of calpain.

Discussion

The results presented in this study confirm our previous description of FLNa as a phosphoprotein whose degree of phosphorylation regulates its susceptibility to calpain action [4,5]. FLNa may be phosphorylated *in situ* by PKA and this phosphorylation accompanies protection against calpain cleavage [6]. *In vitro* studies [9] demonstrated that Ser 2152 was the unique substrate for PKA in the 100 kDa C-terminal region of the molecule, which is the only fragment that incorporates ^{32}P label when filamin is protected against proteolysis after phosphorylation [5–7]. Jay et al. [10] and Woo et al. [11] then demonstrated that Ser 2152 phosphorylation is also stimulated *in vivo* after PKA activation.

The effect and full consequences of phosphorylation of FLNa, however, have remained unclear and to a certain extent controversial. FLNa protein can be the target of other kinases, and Pak1 and RSK were recently found to

phosphorylate FLNa in Ser 2152 in processes which involved membrane ruffle formation and EGF-induced migration of human melanoma cells, respectively [12,11], suggesting that phosphorylation of Ser 2152 in filamin is required for cell shape changes. In contrast, as mention above [6], when platelet function was inhibited by prostacyclin or prostaglandin E₁, FLNa was phosphorylated by the increased level of cAMP brought about by these agents, and remained more tightly associated with actin filaments and resistant to calpain attack, preventing, by these means, subsequent shape changes and filopodia formation involved in clot retraction.

In addition to cell shape changes and migration, FLNa is a scaffold that recruits numerous proteins involved in a completely different set of functions including signal transduction, gene transcription regulation and nuclear receptor translocation (for a review see [2]) and the physiological role of FLNa phosphorylation in these processes has also remained elusive. In this regard, however, it is worthwhile mentioning that filamin binds around 20 different macromolecules, including Rho GTPases, nuclear receptors like the androgen receptor (AR), tumor suppressor nuclear protein BRCA2, insulin receptor, heat shock proteins, and integrin membrane receptors, in addition to filamentous actin, and most of the interactions occur through the carboxy-terminal end.

The results of the present study indicate that the C-terminal region of filamin A is a suitable substrate for calcineurin *in vitro* and *in vivo* where the calcineurin specific inhibitor cyclosporin A allowed for a sustained phosphorylated state of FLNa C-terminal recombinant fragment. As indicated, a dephosphorylation step occurs in Ser 2152 and inclusion of CsA protects native filamin in fresh human platelets against calpain action. At present, the nature of the regulatory process and structural changes that follow Ser 2152 phosphorylation/dephosphorylation, which leads to altered stability against calpain, remain to be established. A simple competitive effect between Pi-Ser and calpain cannot be assumed since Ser 2152 is located 390 amino acids away from the cleavage site in what is a filamentous protein. One interesting property of Ser 2152, however, is that it is adjacent to a proline residue (proline 2151).

Recent evidence has indicated that proline residues provide a backbone control element in a polypeptide chain, which is guided by *cis/trans* isomerization. In addition, phosphorylation of serine- and threonine-proline motifs has been shown to be a critical regulatory event for many proteins. Protein phosphorylation at this level can specifically regulate the backbone dynamics of the Ser/Thr-Pro motifs about the peptidyl-prolyl bond [28–31]. A notable example of this type of proline-directed phosphorylation can be found in tau protein which, in patients with Alzheimer's disease, is aggregated in a hyperphosphorylated state resistant to calpain proteolysis [32–34]. Interestingly in this regard, reduction of CN activity in the brain leads to persistent phosphorylation of tau protein [35–37] and inhibition of calcineurin phosphatase prevents calpain-mediated proteolysis of tau in differentiated PC12 cells [38].

Targeting of CN to NFAT in T cells is also directed to specific SP motifs of this kind located in the regulatory domain of the nuclear factors [15].

The results presented here suggest that a similar phosphorylation/dephosphorylation molecular mechanism may regulate the susceptibility of FLNa to calpain.

On the other hand, we believe that the finding that calcineurin inhibition prevents filamin fragmentation by calpain provides a missing link which, combined with the available information, may be presented in an alternative scheme (Fig. 7) to explain the role of FLNa phosphorylation (dephosphorylation) in actin dynamics, with additional implications to other cellular routes, insofar as some of the peptide fragments released by calcineurin-regulated calpain action are assumed to mediate actions in downstream pathways. As explained below, direct evidence for this proposal could be identified in data from previously reported results.

A plausible model envisages PKA-phosphorylated (Pi-Ser 2152) FLNa as bound to the actin cytoskeleton on the cell surface. Actin filaments also form a three-dimensional actin filament core stabilized by FLNa molecules (see Fig. 7, left). This model could apply to platelets and other cells, which in this regard, share similar regulatory mechanisms [39]. Under resting conditions FLNa remains tightly associated with actin filaments and resistant to calpain attack, allowing, by these means, a highly organized structure which provides an intact actin network around which integrin receptors, steroid receptors (like AR via AR-Hsp90 complex, [40–42]), small GTPases, GDP/GTP exchange factors and other macromolecules can organize [2,39,43].

Receptor engagement following stimulation by various physiological and exogenous stimuli leads to marked actin-dependent changes in shape that are required for productive cellular interactions, movement, differentiation, and secretion, which culminate in a modified behavior of the cell appropriate for the new circumstances. One of the early events in activation, however, is a rapid increase in calcium concentration (which has even been characterized as a pregenomic phase of steroid hormone stimulation [44]) with profound effects on cytoskeletal structure. Actin filaments are severed by gelsolin and calpain is activated resulting in the cleavage of FLNa, talin, other cytoskeletal proteins and membrane domains of integrin receptors among other substrates [43,45,46]. This unlocks the actin cytoskeleton (Fig. 7, center).

Our model assumes that calcineurin plays a key regulatory role during this phase, which may help to resolve some of the controversies reported. Not only does it contribute to cytoskeleton disassembly by permitting dephosphorylation and degradation of FLNa, but it may also allow the generation by calpain of peptide degradation products that may have a functional role in downstream events (see examples below). In addition, dephosphorylation by calcineurin may also initiate signaling cascades by directly targeting similar Ser/Thr-Pro regulatory motifs in substrates like tau or NFAT, among various possible proteins. The

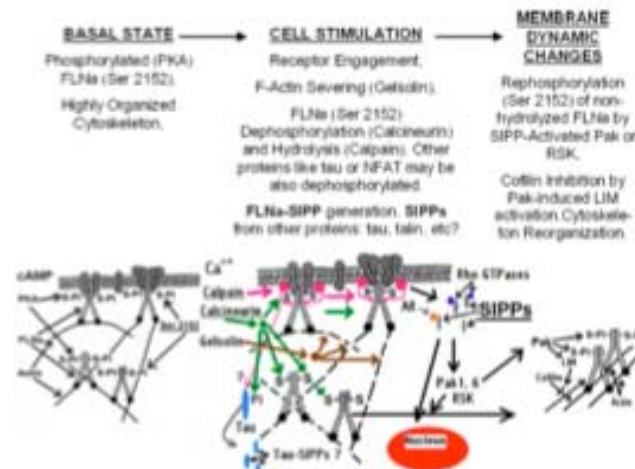


Fig. 7. Schematic representation of the mechanism proposed for filamin mobilization and cell signaling. The controversies regarding the role of FLNa (Ser 2152) phosphorylation between basal state, characterized by a highly organized cytoskeleton structure vs. membrane dynamic changes, accompanied with cytoskeleton reorganization, may be resolved by assuming that during cell stimulation, calcineurin-regulated calpain action releases peptide fragments (C-terminal) from FLNa which could participate as SIPPs mediating actions in downstream pathways. A similar mechanism of action could be envisaged for other proteins like tau whose vulnerability to calpain is regulated by a similar phosphorylation/dephosphorylation mechanism.

possibility may also be considered that other phosphoproteins could be dephosphorylated after the activation of a phosphatase cascade initiated by calcineurin, such as that previously described in hippocampus [47]. Consistent with this regulatory function of calcineurin is the fact that at this point calpain induces limited proteolysis of substrates, suggesting a regulatory action rather than general hydrolysis, which occurs only at membrane sites where the protease is recruited during receptor occupation [46]. Evidence was provided indicating that membrane-associated calpain is activated very fast, acting upstream of Rho GTPases and subsequent effectors, and being necessary for GTPase action [46,48]. These findings in combination with the results of the present study, raised the possibility that some of the peptide fragments released by calcineurin-regulated calpain action following cell stimulation could participate as "signaling integrator proteolytic peptides" (SIPPs) mediating actions in downstream pathways. As mentioned, recent evidence has indicated that this may well occur, at least in the case of filamin.

Although full-length FLNa is predominantly cytoplasmic, a naturally occurring C-terminal 100kDa fragment has been found in the nucleus where it colocalizes with AR. This fragment represses AR transactivation and disrupts AR interdomain interactions and transcriptional intermediary factor 2-activated AR function providing a possible mechanism whereby mutations of the AR in the FLNa binding domain result in prostate cancer [49]. In addition, Rho-regulated p21-activated kinase 6 (PAK6) was found to bind the same hinge region in AR to which the C-terminal

fragment of FLNa associates. In this case PAK6 also inhibited the transcriptional activity of AR. As mentioned above, the C-terminal region of FLNa binds several GTPases including Rac, Rho, and Cdc42. These molecules bind filamin in a GTP-independent manner and its effect on ABP is unknown. RalA also binds filamin and GTP-RalA elicits actin-rich filopods on surfaces of Swiss 3T3 cells [50]. Thus, a C-terminal degradation product of FLNa could mobilize these elements to the AR where their action is required [49]. The cellular site where these interactions may take place, however, is unknown since PAK6 was recently found to inhibit nuclear translocation of the stimulated AR [51]. The fact that the C-terminal region of FLNa also interacts with the nuclear tumor suppressor protein, BRCA2 [52] also merits mention.

Another example that deserves attention is the reported ability of FLNa to mediate Pak1-induced ruffle formation [12] (see Fig. 7, right). In contrast to the stabilizing effect of phosphofilamin on cytoskeletal structure found by us [3–6], in this study phosphorylation of Ser 2152 was demonstrated to be required for membrane dynamic changes. Some aspects of the mentioned study, however, may indicate that our model can apply, showing that filamin may assume two totally different functions in this process, which may resolve the apparent contradiction. Thus, the interaction of FLNa and Pak1 was found to be reciprocal, with filamin being phosphorylated by Pak1, and Pak1 being activated by filamin binding. Activation of Pak1 by filamin was performed, however, utilizing a 852 amino acid (residues 1795–2647) C-terminal region of FLNa obtained from the

mammary gland cDNA expression library used. The 852 amino acid C-terminal region of filamin was found to bind to the CRIB domain of Pak1, which also binds Cdc42 and Rac1 when its kinase activity is stimulated by autophosphorylation [53]. In vivo, the interaction of filamin and Pak1 was reported to occur after cellular stimulation by heregulin and sphingolipids that activate Pak1 and increase the intracellular concentration of calcium [54,55]. Association of FLNa with Pak1 was dependent on the integrity of the cytoskeleton being disrupted by cytochalasin D.

An explanation would be that the C-terminal product of filamin released after calcineurin and calpain activation following cellular stimulation would function as a SIPP activating Pak1. Then, in a subsequent stage SIPP-activated Pak1 would phosphorylate back Ser 2152 on calcineurin-dephosphorylated filamin which was not hydrolyzed in a site-specific manner by membrane-associated calpain, allowing, once again, for the full expression of the actin structuring properties of FLNa during ruffle formation. This step would occur later, in a calcium-independent phase, when the actin-depolymerizing/severing activities of cofilin are inhibited by phosphorylation by Pak1-induced LIM kinase activity [39].

Additional evidence in the literature suggests that our model may apply to other cellular systems, although full details of the interactions remain to be established. For example, as mentioned above, ribosomal S6 kinase (RSK), a key player in the Ras-mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, was found to phosphorylate FLNa on Ser 2152 inducing migration of human melanoma cells [11]. In addition, FLNa was also found to interact with the insulin receptor (IR) resulting in the inhibition of the MAPK pathway [56]. Interestingly, ectopic expression of a recombinant C-terminal fragment of FLNa prevented the IR-FLNa interaction and potentiated insulin-stimulated MAPK phosphorylation and ruffle formation in HepG2 cells [56]. According to our model, the generation of the C-terminal fragment of FLNa with subsequent unlocking of the IR-FLNa interaction and activation of MAPK pathway could occur under physiological conditions by the control of calcineurin and calpain action. Then Ser 2152 on intact FLNa could be phosphorylated again by activated RSK during cytoskeleton reorganization. In support of this notion, trifluoperazine, a calcium-calmodulin blocker, was found in a previous study to completely inhibit the insulin-mediated glucose transport in rat hindlimb muscle [57]. More recently, specific inhibition of calpain 10, a putative-diabetes susceptibility isoform that may be involved in the development of type 2 diabetes, by antisense expression in 3T3-L1 adipocytes, was found to prevent the translocation of insulin-responsive glucose transporter 4 (GLUT4) vesicles to the plasma membrane and actin reorganization [58]. Thus, a possible action of the calcium-calmodulin system, including calcineurin, and calpain over FLNa during insulin signaling deserves closer attention.

In conclusion, the results of the present study indicate that calcineurin may regulate the susceptibility of FLNa to

calpain by dephosphorylating Ser 2152. Defining the mechanism which controls proteolysis of filamin is of singular importance for multiple reasons. For example, a naturally occurring 100kDa C-terminal fragment of FLNa was previously found to interact with other macromolecules resulting in altered function as in the case of AR. In addition, many of the controversial findings reported on the role of FLNa phosphorylation during cell shape changes and migration may be clarified by assuming that the C-terminal degradation peptide of FLNa released by this mechanism following cellular stimulation could participate as a SIPP mediating actions in downstream pathways, including Pak1 and RSK routes, with additional implications to insulin signaling. We may just add that analogous SIPP elements could be released from other proteins like tau whose vulnerability to calpain, as mentioned, is regulated by a similar phosphorylation/dephosphorylation mechanism. Prevention of SIPP release from hyperphosphorylated tau could contribute to the development of Alzheimer's disease.

Acknowledgments

We thank Mr. John A. Jay for the assistance in the preparation of the manuscript. This work is dedicated to the memory of Mrs. Judith Gómez-Farías Leal.

References

- [1] J.B. Gorán, R. Yamin, S. Egan, M. Stewart, T.P. Stossel, D.J. Kwiatkowski, J.H. Hartwig, *J. Cell Biol.* 111 (1990) 1089–1105.
- [2] T.P. Stossel, J. Condeelis, L. Cooley, J.H. Hartwig, A. Noegel, M. Schleicher, S.S. Shapiro, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (2001) 138–145.
- [3] Q.Q. Zhang, S. Rosenberg, J. Lawrence, A. Stracher, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118 (1984) 508–513.
- [4] M.P. Wu, D. Jay, A. Stracher, *Cell. Mol. Biol. Res.* 40 (1994) 351–357.
- [5] Z. Zhang, J. Lawrence, A. Stracher, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151 (1988) 355–360.
- [6] M. Chen, A. Stracher, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 14282–14289.
- [7] D. Jay, A. Stracher, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232 (1997) 555–558.
- [8] D. Jay, A. Stracher, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202 (1994) 764–771.
- [9] D. Jay, E.J. García, J.E. Lara, M.A. Medina, M. de la Luz Ibarra, *Arch. Biochem. Biophys.* 377 (2000) 80–84.
- [10] D. Jay, E.J. García, M. de la Luz Ibarra, *Mol. Cell. Biochem.* 260 (2004) 49–55.
- [11] M.S. Woo, Y. Ohta, I. Rabinovitch, T.P. Stossel, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 3025–3035.
- [12] R.K. Vadlamudi, F. Li, L. Adam, D. Nguyen, Y. Ohta, T.P. Stossel, R. Kumar, *Nat. Cell Biol.* 4 (2002) 681–690.
- [13] M. Sakon, J. Kamayashi, Y. Kajiwara, Y. Uemura, E. Shiba, T. Kawasaki, T. Mori, *Biochem. Int.* 22 (1990) 149–161.
- [14] E.A. Tallant, R.W. Wallace, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 7744–7751.
- [15] A. Rao, C. Luo, P.G. Hogan, *Annu. Rev. Immunol.* 15 (1997) 703–747.
- [16] J.F. Boré, F. Di Padova, J. Mason, V. Quattrocchi, B. Ryffel, R. Wenger, *Pharmacol. Rev.* 41 (1990) 239–434.
- [17] J. Aramburo, M.B. Yaffe, C. Lopez-Rodriguez, L.C. Cantley, P.G. Hogan, *Science* 285 (1999) 2129–2133.
- [18] A.J. Barber, G.A. Jamieson, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 6357.
- [19] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

- [20] R. Gopalakrishna, W.B. Anderson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104 (1982) 830–836.
- [21] O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R. Randall, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [22] N. Arai, Y. Naito, M. Watanabe, E.S. Masuda, Y. Yamaguchi-Iwai, A. Tsuboi, T. Heike, I. Matsuda, K. Yokota, N. Koyano-Nakagawa, *Pharmacol. Ther.* 55 (1992) 303–318.
- [23] U.K. Laemmli, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [24] K.T. Staw, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 11205–11209.
- [25] J.A. Truglia, A. Stracher, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100 (1981) 814–822.
- [26] S. Rosenberg, A. Stracher, R.C. Lucas, *J. Cell Biol.* 91 (1981) 201–211.
- [27] D.R. Phillips, M. Jakubova, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 5602–5605.
- [28] T. O'Halloran, M.C. Beckerle, K. Barridge, *Nature* 317 (1985) 449–451.
- [29] M. Schatzkowsky, *Biochemistry* 37 (1998) 5566–5575.
- [30] S.F. Goebel, M.A. Marahiel, *Cell. Mol. Life Sci.* 55 (1999) 423–436.
- [31] G. Wolf, G. Fien, F. Soizu, K.P. Lu, *Nat. Cell Biol.* 7 (2005) 435–441.
- [32] N. Gaske, B. Steiner, E.M. Mandelkow, J. Biernat, H.E. Meyer, M. Goedert, E. Mandelkow, *FEBS Lett.* 307 (1992) 199–205.
- [33] E.M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Trends Biochem. Sci.* 18 (1993) 480–483.
- [34] E.M. Mandelkow, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 777 (1996) 96–106.
- [35] C.X. Gong, S. Shaikh, I. Grandke-Iqbal, K. Iqbal, *Brain Res.* 741 (1996) 95–102.
- [36] L.M. Fleming, G.V. Johnson, *Biochem. J.* 309 (1995) 41–47.
- [37] A. Ferreira, R. Kinsaid, K.S. Kosik, *Mol. Biol. Cell* 4 (1993) 1225–1238.
- [38] H.Q. Xie, G.V. Johnson, *J. Neurosci. Res.* 52 (1998) 153–168.
- [39] C. Revemu, R. Ataman, S. Robins, D. Louvard, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (2004) 635–646.
- [40] D.M. Ozanne, M.E. Brady, S. Cook, L. Gaughan, D.E. Neal, C.N. Robson, *Mol. Endocrinol.* 14 (2000) 1618–1626.
- [41] Y. Miyata, I. Yahara, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 8779–8783.
- [42] S. Kriol, J.F. Favre, P. Robert, B. Le Douarin, N. Brument-Larignon, I. Lefret, M.M. Boszyk, K.M. Anderson, L.D. Grifker, F.L. Tobin, M. Souchet, A. Bril, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 36592–36600.
- [43] J.E. Fox, *Thromb. Haemost.* 86 (2001) 198–213.
- [44] H.Y. Kang, *J. Bone Miner. Res.* 19 (2004) 1181–1190.
- [45] J.H. Hartwig, *J. Cell Biol.* 118 (1992) 1421–1442.
- [46] J.E. Fox, *Thromb. Haemost.* 82 (1999) 385–391.
- [47] R.M. Mukoy, S. Endo, S. Shenukar, R.C. Malenka, *Nature* 369 (1994) 485–488.
- [48] S. Kulkarni, T.C. Saito, K. Suzuki, J.E. Fox, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 21265–21275.
- [49] C.J. Loy, K.S. Sim, E.L. Yong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 4562–4567.
- [50] Y. Ohta, N. Suzuki, S. Nakamura, J.H. Hartwig, T.P. Stossel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 2122–2128.
- [51] N. Schranz, J. daSilva Correia, B. Fowler, Q. Ge, Z. Sun, G.M. Bokoch, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 1922–1931.
- [52] Y. Yuan, Z.J. Shen, *Biol. Chem.* 276 (2001) 48318–48324.
- [53] E. Manser, T. Leung, H. Salihuddin, Z.S. Zhao, L. Lim, *Nature* 367 (1994) 40–46.
- [54] L.L. Chen, J.K. Johanson, R.R. Hodges, D. Zoukhr, E. Ghinelli, J.D. Rios, D.A. Dartt, *Exp. Eye Res.* 80 (2005) 370–380.
- [55] S. Spiegel, A.H. Merrill Jr., *FASEB J.* 10 (1996) 1388–1397.
- [56] H.J. He, S. Kolo, Y.K. Kwon, M.T. Crow, M. Bernier, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 27096–27104.
- [57] V. Guatier, E.H. Hernandez, R. Huerto, P. Gorostiza, F. Valenzuela, *Eur. J. Pharmacol.* 237 (1993) 139–141.
- [58] D.S. Paul, A.W. Harmon, C.P. Winston, Y.M. Patel, *Biochem. J.* 370 (2003) 625–632.

Filamina plaquetaria: Una proteína del citoesqueleto integradora de la función celular*

Elizabeth García,* David Jay*

Resumen

La activación de receptores celulares por estímulos fisiológicos o exógenos produce cambios dramáticos en la forma y función celulares; tales cambios dependen principalmente de la reestructuración de la red de actina. En plaquetas se ha obtenido mucha de la información sobre el citoesqueleto. Dentro de las proteínas entrecruzadoras de actina filamentosa (Actina-F) como la espectrina, la fimbrina o la alfa actinina, la Filamina A (FLNa) es la más eficiente en formar geles ortogonales tridimensionales de actina. Además, une al citoesqueleto periférico de actina con la membrana celular a través de su dominio C-terminal de unión a glicoproteínas de membrana. La filamina mantiene la citoarquitectura plaquetaria y es esencial para el movimiento y cambio de formas celulares que suceden durante la activación plaquetaria. Estudios previos han mostrado que una gran variedad de proteínas con distintas funciones tales como traducción de señales, regulación de la transcripción de genes y movilización de receptores se asocian a la filamina, sugiriendo que ésta puede actuar como andamiaje u organizador de proteínas. El propósito de esta comunicación es el de describir brevemente las características de las macromoléculas asociadas a la FLNa plaquetaria y discutir un posible papel de la asociación de éstas a la filamina.

Summary

PLATELET FILAMIN: A CYTOSKELETAL PROTEIN INVOLVED IN CELL SIGNAL INTEGRATION AND FUNCTION

Activation of cellular receptors by diverse stimuli induces dramatic changes in shape and function to respond to the new circumstances of the cell. This modified behavior depends on the reorganization of the peripheral actin meshwork. An outstanding example of these processes can be found in platelets, from which much of the information available on cytoskeletal function has been obtained. Among the many actin-crosslinking proteins like spectrin, fibrin or alpha actinin, filamin A (FLNa) emerges as the one with the highest potential in initiating the polymerization of actin filaments (F-actin) during the formation of tridimensional actin gels. FLNa also links actin filaments to the cytosolic domain of many membrane glycoproteins in platelets through its C-terminal region. In addition to participating in cell shape changes, FLNa is a scaffolding protein that recruits numerous proteins involved in a completely different set of functions, including signal transduction, gene transcription regulation, and receptor translocation; however, the physiological role of FLNa in these processes has remained elusive. The purpose of the present communication is to briefly describe the characteristics of the macromolecules able to interact with FLNa and to discuss a possible role of FLNa during the transduction of signals from those molecular elements in platelets. (Arch Cardiol Mex 2006; 76: S4, 67-75)

Palabras clave: Activación plaquetaria. Citoesqueleto. Filamina A. Plaquetas. Receptor de von Willebrand. Integrina Ib/IIIa .

Key words: Ib/IIIa Integrin. Cytoskeleton. Filamin A. Platelets. Platelet activation. von Willebrand receptor.

* Departamento de Biomedicina Cardiovascular, Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez.

Correspondencia: Ma. Elizabeth García, Departamento de Biomedicina Cardiovascular, Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez. (INCICH Juan Badiano Núm. 1 Col. Sección XVI, Tlalpan 14080, México, D.F.). Tel. 5573-2911 Ext. 1237 Fax 5573-0926. Correo electrónico: gape3y1@yahoo.com

*Este trabajo fue apoyado en parte por el donativo U40188-Q del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) otorgado a David Jay.

Las actividades del citoesqueleto dependen de tres tipos de filamentos, a saber: a) filamentos de actina (microfilamentos), formados por monómeros de actina y proteínas accesorias entrecruzadoras de actina, entre las que destaca la filamina, b) microtúbulos formados por tubulina y proteínas accesorias a ésta, como la proteína tau y c) filamentos intermedios que incluyen proteínas como la vimentina o la laminina. Cada uno de estos sistemas regula actividades fundamentales para la célula.

La reorganización tridimensional del citoesqueleto de actina permite varias funciones celulares tales como: cambios de forma, movimiento celular, división celular, fagocitosis y otros procesos que involucran un cambio celular en respuesta a estímulos externos. Los microfilamentos son polímeros del monómero de actina, subunidad proteica de 43 KDa denominada actina globular o actina G. Los filamentos de actina crecen por la adición de actina G en sus extremos, formando la actina filamentososa o actina F. *In vitro*, la actina G unida a ATP polimeriza en presencia de K^+ y Mg^{2+} . La eventual hidrólisis de ATP para generar ADP hace a los filamentos inestables y susceptibles de reorganización al generar de nueva cuenta los monómeros originales.¹ La importancia de la funcionalidad de los microfilamentos reside en la variabilidad de proteínas asociadas a ellos, (Tabla I).^{1,2} Dentro de las pro-

teínas asociadas a actina está la filamina, filamina no muscular o FLNa (ABP, ABP-280 KDa o "Actin-Binding Protein") que es una fosfoproteína homodimérica, que entrecruza los filamentos de actina en una malla tridimensional citosólica. La filamina es la proteína más eficiente en iniciar la gelación de la F-actina, además de que une al citoesqueleto periférico de actina con la membrana celular a través de su dominio C-terminal de unión a glicoproteínas (GP), como el receptor del factor von Willebrand GpIb-V-IX o el receptor de fibrinógeno, GP IIb/IIIa.^{1,3} En esta comunicación se describe la función de cada una de las proteínas asociadas a los filamentos de actina a través de la filamina. Así mismo, discutimos el posible papel de la filamina durante la señalización iniciada por las moléculas accesorias a ésta.

La filamina tiene una amplia distribución filogenética. La secuencia completa de nucleótidos de filamina obtenida de una genoteca derivada de células endoteliales (cADN de ABP) predice que cada subunidad de 280 KDa está constituida por 2,647 aminoácidos. Los dominios funcionales de cada subunidad incluyen una región N-terminal (estructura alfa hélice), de unión a actina F, también conocida como ABD ("Actin-Binding-Domain") de homología con calponinas y con proteínas presentes en vías de transducción de señales como Vav y IQGAP. Estudios

Tabla I.^{1,2}

Proteínas asociadas a actina	Funciones
Cap 32/34	Controla la longitud de actina F, por su unión al extremo de crecimiento rápido ("barbed"), previene la adición o pérdida de actina G.
Profilina	Secuestro de monómeros de actina, interacción a PIP y PIP ₂ (fosfatidilinositol monofosfato y difosfato, esta interacción disocia al complejo profilactina.
Timosina β_{42}	Secuestro de monómeros de actina, unión a PIP ₂ y su disociación de actina G.
Vilina	Corte de filamentos de actina a concentraciones elevadas de Ca^{2+} , entrecruzamiento y formación de haces a concentraciones bajas de Ca^{2+} .
Adseverina, fragmina, seiderina	Corte de actina F por Ca^{2+} , "capping" de actina F, disociación de actina F por unión a PIP ₂ .
Cofilina	Desensamble de actina F inhibida por fosforilación de serinas. Secuestro de monómeros de actina, disociación de actina G por su unión a PIP ₂ .
Ezrina, radixina, moesina.	Entrecruzamiento de actina F con la membrana plasmática. Activada por PIP ₂ y fosforilación de tirosinas y serinas. Nucleación de actina F en la membrana plasmática.
Espectrina, fimbrina.	Entrecruzamiento y formación de haces ("bundling") con actina F.
Talina	Nucleación de actina F en la membrana plasmática.
Filaminas	Entrecruzamiento ("cross-linking") y formación de haces (bundling) de actina F. La unión a PIP ₂ inhibe su actividad.
Complejo Arp 2/3	Nucleación de actina F, elongación en el extremo de crecimiento (barbed). Activada por la proteína Wasp.

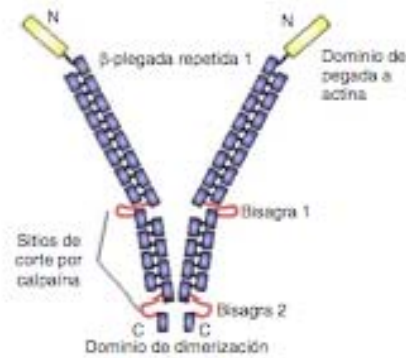


Figura 1. Estructura de la filamina humana FLNa.

recientes sugieren que la unión de ABD a actina es regulada por Calcio/Calmodulina. También tiene un dominio C-terminal de autounión y de unión a glicoproteínas de membrana.⁶ El resto de la proteína está constituida por 24 repetidas de 96 aminoácidos cada una en estructura beta plegada antiparalela. La filamina tiene dos sitios susceptibles a proteólisis por calpaína entre las repetidas 23 y 24 y un fragmento adicional entre las repetidas 15 y 16, generando un fragmento N-terminal de 180 KDa, y un fragmento C-terminal de 100 KDa que por acción prolongada de la calpaína puede originar un fragmento de 90 KDa y un péptido C-terminal de 10 KDa¹⁶ (Fig. 1).

Cuando la secuencia completa de nucleótidos de la filamina fue deducida, el análisis de la secuencia deducida de aminoácidos permitió predecir la existencia de múltiples sitios potenciales de fosforilación para diversas cinasas: tres sitios para proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA), treinta y tres sitios para proteína cinasa C (PKC), treinta sitios para caseína cinasa II (CCII), e inclusive unos sitios para tirosina cinasa (YC). De hecho existen más de 380 residuos de serina/treonina en la filamina.

Hay tres isoformas de filamina en mamíferos A, B y C. La filamina A se encuentra ampliamente distribuida en células no musculares, por ejemplo plaquetas y células endoteliales.⁷ La filamina B se encuentra principalmente en células musculares y la filamina C, se encuentra en músculo esquelético y cardíaco en la edad adulta.⁸ La localización en el genoma de los tres genes de filamina es altamente conservada. Los tres isoti-

pos de filamina muestran entre sí 60% - 80% de homología en las secuencias completas, con excepción de las dos regiones bisagra, susceptibles a corte por calpaína, las cuales muestran grandes divergencias.^{16,17}

La estructura de los dímeros de filamina es similar a una inmunoglobulina, su estructura flexible puede inducir ramificaciones ortogonales de actina-F de gran ángulo. Los ángulos formados entre los monómeros de filamina son inversamente proporcionales a la concentración de filamina en plaquetas.⁹ La formación de ases paralelos de filamentos de actina es promovida cuando la proporción molar de filamina a actina es 1:10-50, mientras que una estequiometría de 1:150-740 lleva a la formación de redes ortogonales de actina. Existen varios tipos de entrecruzamiento de la actina causados por la filamina (tipos X, T o Y).

Papel del citoesqueleto de actina y de la filamina en la plaqueta

Las plaquetas son estructuras celulares anucleadas que se forman en la megacariocitopoyesis a nivel de la médula ósea, por fragmentación de la membrana plasmática de los megacariocitos, para posteriormente distribuirse por el torrente sanguíneo. El citoesqueleto de la plaqueta consiste en una red de estructuras filamentosas que mantienen la forma discoide de la plaqueta en reposo.^{11,12} Incluyen filamentos de actina,^{11,12} el anillo marginal de microtúbulos,¹³ moléculas de miosina¹⁴ así como moléculas de unión a actina como filamina, espectrina, vinculina, talina, tropomiosina entre otras, todos ellos formando el esqueleto membranal y citoplásmico plaquetario (Fig. 2). Por otro lado, el citoesqueleto tiene el papel de dirigir y promover los rápidos cambios de forma inducidos por la activación plaquetaria.¹⁵

Los procesos de adhesión y activación plaquetaria cumplen un papel fisiológico esencial en la formación del coágulo ante un daño tisular. También constituyen un elemento central durante eventos patológicos tromboembólicos y todo esto se inicia después de la unión de receptores de superficie específicos hacia componentes tales como la colágena, trombina, vWF y ADP.¹⁶ Cuando las plaquetas se activan ocurre una rápida polimerización de filamentos de actina que determina el cambio de forma discoide a la forma extendida que involucra la formación de estructuras denominadas filopodia y lameli-

podía. La secreción del contenido granular, así como la expresión de sustancias procoagulantes en la superficie plaquetaria que conducen a la agregación para la formación de un coágulo son eventos paralelos y sinérgicos.^{16,20} Los cambios inducidos por la activación plaquetaria resultan de procesos como la fosforilación/defosforilación y ruptura proteolítica por calpaína de proteínas del citoesqueleto. La reorganización específica depende de la combinación de señales a las que la plaqueta está expuesta. De esta manera los cambios antes mencionados van acompañados de la activación de diversas familias de proteínas cinasas y la subsecuente fosforilación de un gran número de proteínas. A este respecto estudios han mostrado que el citoesqueleto es un blanco principal de estas enzimas.²¹

Regulación de la filamina por fosforilación

Como ya se mencionó, la FLNa es una fosfoproteína. A este respecto, estudios previos mostraron que la FLNa, aislada de plaquetas humanas,



Figura 2. Citoesqueleto en plaquetas.

es una mezcla de formas fosforiladas en distinto grado desde 18 hasta 40 moles de fosfato/mol de monómero de ABP.^{21,22} De hecho, se ha demostrado que la fosforilación/defosforilación de la filamina es un evento importante, involucrado en la reorganización del citoesqueleto de actina durante la activación plaquetaria.²³ Este proceso no sólo modula la habilidad de la filamina de entrecruzar filamentos de actina sino que también, al ser fosforilada por la cinasa dependiente de AMPc (PKA) disminuye la susceptibilidad de ésta a la degradación por calpaína,²² una proteína proteasa dependiente de calcio cuya actividad da cuenta de más del 95% de la actividad total proteolítica de la plaqueta y cuya presencia también ha sido demostrada en una gran diversidad de tejidos, incluyendo el endotelio.^{23,28}

Interacción de la filamina con otras proteínas

En los últimos años, se ha encontrado que una amplia variedad de proteínas se une a la filamina (más de 20 hasta la fecha), incluyendo receptores transmembranales y moléculas de señalización (Fig. 3) y la mayoría de éstas interactúan con el extremo C-terminal de la filamina.²⁷

De esta manera, la filamina, al unir una gran variedad de moléculas tendrá un papel fundamental, no únicamente como estructuradora del citoesqueleto, sino también como molécula mediadora de señales a partir de los cambios o rearrreglos generados en la red de actina en respuesta a diversos estímulos. En la Tabla II se muestran algunas de las principales moléculas

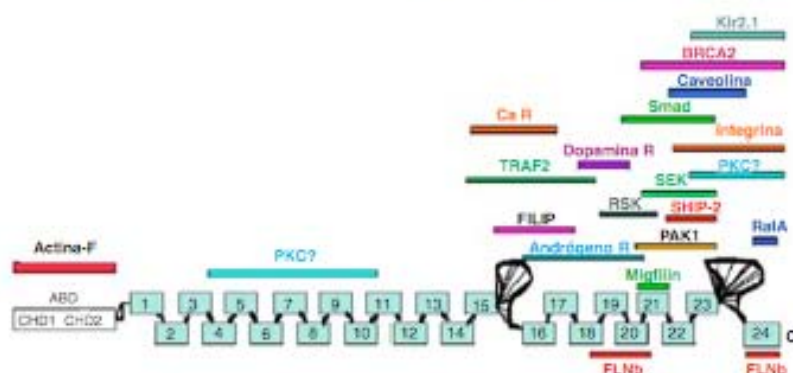


Figura 3. Esquema del monómero de FLNa mostrando las principales macromoléculas asociadas a ella.

Tabla II. Proteínas asociadas a la filamina.

Proteínas asociadas a la filamina	# de la repetida de la FLNa a la que se une la proteína accesoria	Significado funcional de la asociación.
Complejo GpIb/IX (von Willebrand receptor) ^{23,24}	17-19	Promueve el despliegue celular.
Integrinas β 1A, β 1D, β 2, β 3 y β 7. ²⁵	Extremo C-terminal	Mecanoprotección.
Factor tisular ²¹	23-24	Co-asociación <i>in vivo</i> .
FcR1 (CD64) ²¹	No determinado	?
Furina ²⁶	13-14	Promueve la internalización de furina.
α -Sarcoglicanos ²⁶	23-24	Posible papel en la distrofia muscular.
Motilina ²⁶	19-21	Posible papel en la distrofia muscular.
Caveolina-1 ²⁶	Extremo C-terminal	Co-localización en estructuras caveolares.
Presenilinas ^{27,28}	Extremo C-terminal	La sobreexpresión de FLN1 inhibe la sobreexpresión de presenilina en <i>Drosophila</i> .
Receptor de Dopamina D2 ²⁹	16-19	Participa en respuesta a dopamina.
Granzima B ³⁰	24	Participa en Granzima B en la apoptosis.
Tol ³¹	21-24	
TRAF 2 ³²	21-24	Involucrada en la activación de NF- κ B o SAPK por TRAF2 o TNF.
SEK-1 ³³	21-24	Involucrada en la activación de SAPK mediante el ácido lisofosfatídico y TNF.
Receptor de andrógeno ³⁴	Extremo C-terminal	Involucrada en la translocación del receptor de andrógeno al núcleo.
Rho, Rac, Cdc42. ³⁵	21-24	
RaiA ³⁶	24	Promueve la formación de microextensiones cascada abajo del Cdc42.
Trio ³⁷	23-24	La FLNa se une al dominio 1 de la proteína GEF.
CvHSP ³⁷	21-24	
Canal de potasio Kv4.2 ³⁸ (axones post-sinápticos)	Extremo C-terminal	Promueve la densidad de corriente mediada por este canal.
F-actina ³⁹	Extremo N-terminal	Rearreglo de la malla intracelular de actina.
BRCA2 ⁴⁰	Extremo C-terminal.	Interacciona con BRCA2 en respuesta a daño de DNA.

acesorias de la filamina y se resumen las principales características funcionales de ellas. En este punto, cabe mencionar que no se sabe hasta la fecha si los procesos de fosforilación/defosforilación recién mencionados de la FLNa y la subsecuente reorganización del citoesqueleto juegan algún papel en la señalización derivada a partir de estas moléculas accesorias. A continuación describiremos brevemente algunas de las interacciones más importantes, que pueden jugar un papel principal en la función plaquetaria, asimismo, expondremos un posible papel para la fosforilación de la FLNa en este proceso.

Recientemente se resolvió la estructura cristalina del complejo FLNa-integrinas β .³¹ Se determinó que la repetida 21 de la FLNa brindaba la interfase apropiada para unir a la proteína con el dominio citoplásmico de la integrina.

Como se menciona más adelante, la determinación de esta estructura brindó un marco conceptual para entender aspectos de la función de las integrinas. En este momento cabe recordar, que la habilidad de los receptores de adhesión (integrinas) de transmitir señales químicas y de fuerza mecánica a través de la membrana celular, depende, en última instancia, de su interacción con el citoesqueleto subyacente. Así, previamente, se había demostrado que el receptor GPIb-V-IX (receptor del factor vW) estaba vinculado a la malla periférica de actina a través de su unión con la FLNa.^{32,33} La interacción se da con el dominio citoplásmico de la glicoproteína IB, en particular con la GP Iba. La glicoproteína IB (GP Ib) es una glicoproteína de la membrana plaquetaria compuesta de un heterodímero, una cadena α y una cadena beta,

unidas por puentes disulfuro. La GpIb funciona como receptor del factor von Willebrand (vWF) y es también el receptor de alta afinidad para trombina²⁴ (Fig. 4). El complejo de receptores incluye la asociación no covalente de las subunidades alfa y beta con las glicoproteínas IX y V en plaquetas. La unión del complejo GP Ib-IX-V al vWF facilita la adhesión inicial plaquetaria al endotelio vascular después del daño vascular, y también inicia eventos de señalización, activación plaquetaria, trombosis y hemostasis. Varios polimorfismos y mutaciones se han descrito en el gen que codifica para la subunidad alfa de este receptor, algunos de ellos son la causa del síndrome de Bernard-Soulier y plaquetas con el fenotipo patológico de von Willebrand.²⁵

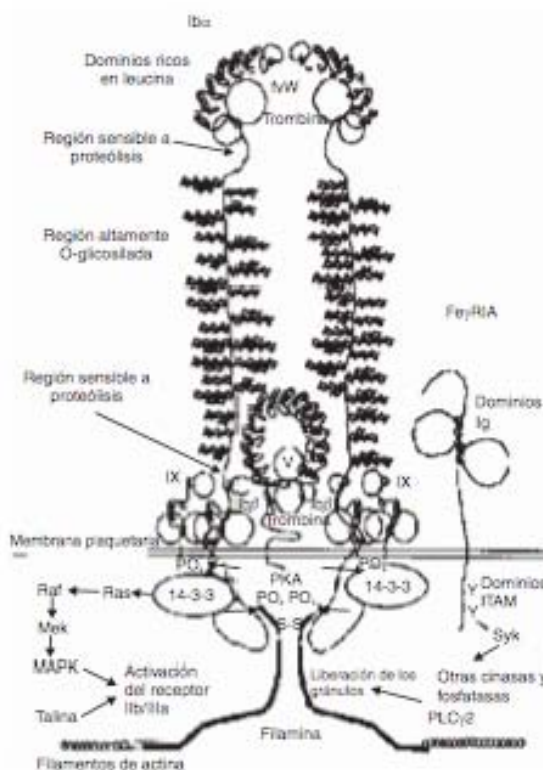


Figura 4. Estructura del receptor (GP Ib-VIX) del factor von Willebrand y su asociación a la filamina A. Este receptor también representa el sitio de unión de alta afinidad para la trombina.

Un dato fundamental que se encontró con la resolución del modelo atómico de la interacción FLNa-integrina fue que el sitio de unión de la FLNa a la integrina se traslapaba con el sitio de unión de la talina (otra proteína entrecruzadora de actina) a la integrina. Es decir, la FLNa y la talina competían por su unión a la integrina. Datos previos habían demostrado que la talina era la principal proteína encargada de iniciar la activación de adentro hacia afuera ("inside-out activation") del receptor IIb/IIIa (α IIb/ β 3) del fibrinógeno a través de su unión al dominio citoplásmico de la integrina β 3.²⁶ Como se recordará, en plaquetas en reposo el receptor IIb/IIIa es incapaz de unir fibrinógeno con afinidad elevada. Sin embargo, cuando las plaquetas son activadas por distintos agonistas como la trombina, el ADP, la epinefrina, el colágeno o endoperóxidos de prostaglandinas, la conformación de la GPIIb/IIIa cambia observándose una unión aumentada por el fibrinógeno.²⁷ A este fenómeno es al que se le llama activación de adentro hacia afuera y depende de la preactivación plaquetaria. Datos previos han mostrado que durante la activación plaquetaria la FLNa es fragmentada por proteasa neutra dependiente de calcio (calpaína)^{22,28,29} y que los fragmentos producto de esta hidrólisis pueden ser liberados de la membrana para participar en vías de señalización corriente abajo.³⁰ Como se menciona enseguida, estos productos de degradación pueden participar en eventos posteriores durante la agregación plaquetaria y además liberarían a la integrina β que ahora estaría en posibilidad de ser activada por la talina; brindando una explicación para el mecanismo molecular de activación de adentro hacia fuera del receptor de fibrinógeno.

Como se mencionó, otro ejemplo en donde la FLNa puede jugar un papel principal en la vía hemostática, mediada por su interacción con otras macromoléculas, es durante la agregación plaquetaria, especialmente en la formación de las protuberancias de la membrana plaquetaria (filopodia) que se observan durante la generación y posterior retracción del coágulo.¹³ Estudios previos habían mostrado que la inhibición plaquetaria por agentes que elevan la concentración de AMP cíclico (AMPc) tales como la prostaciclina protegían a la FLNa de la degradación por calpaína.²² Esto permitía mantener una red íntegra de la malla periférica de actina evitando los cambios de forma y estructura propios de la activación plaquetaria. Esta reducción de

la susceptibilidad de la FLNa a calpaína se daba como consecuencia de su fosforilación por la Proteína Cinasa dependiente de AMPc (PKA). Estudios posteriores mostraron que la fosforilación se efectuaba de manera específica en la serina 2152 localizada en el extremo C-terminal de la proteína.¹⁹ Contrario a estas observaciones, Vadlamudi et al encontraron subsecuentemente que la fosforilación de este mismo residuo (Ser2152) por la Proteína Cinasa 1 activada por p21 (Pak 1) iniciaba la reorganización de la red de actina, generando fenómenos dinámicos en la membrana celular.²¹ Ellos también encontraron una acción recíproca entre Pak 1 y FLNa es decir, Pak 1 fosforilaba a la FLNa y la FLNa activaba a Pak 1. Más recientemente, nosotros propusimos un modelo que podía resolver esta contradicción y que además sugería una función nueva para la FLNa.²² Como ya se ha mencionado, la activación inicial de las plaquetas es capaz de inducir la hidrólisis de la FLNa por calpaína. La proteólisis de la proteína, a su vez, libera fragmentos de la FLNa desde sus sitios de anclaje en la membrana. Como se muestra en la *Tabla II*, la región C-terminal de la FLNa es capaz de unir proteínas del grupo de las pequeñas GTPasas; en particular destaca la Cdc42.²³ En este caso la unión de la GTPasa con la FLNa es independiente de GTP y hasta la fecha no se ha encontrado ningún efecto de Cdc42 sobre la FLNa. El modelo propuesto²² asume que el frag-

mento de FLNa liberado de la membrana es capaz de transportar a la GTPasa hasta el dominio CRIB de Pak1, que es el sitio en donde Cdc42 se une a la cinasa cuando su actividad es estimulada por autofosforilación.²² Posteriormente, Pak 1 activado por el complejo FLNa fragmentada-Cdc42 sería capaz de refofosforilar a la FLNa que no fue digerida por la calpaína durante la posterior formación de filopodia durante la activación plaquetaria.

En conclusión, podemos decir que a partir de su papel central como estructuradora de la malla de actina plaquetaria, la FLNa puede ejercer funciones fundamentales adicionales como integradora de vías de señalización. Es capaz, de esta manera, de integrar señales mecánicas desde receptores de adhesión hacia el citoesqueleto como en el caso de la GP Ib-IX-V. Además, posterior a la estimulación por agonistas específicos, genera productos de degradación que por un lado permitirían la activación interna del receptor IIb/IIIa de fibrinógeno y además mediarían eventos en rutas corriente abajo importantes para la generación de fenómenos dinámicos de la membrana fundamentales para la formación y retracción del coágulo. Queda como importante campo de investigación resolver el papel que la FLNa pueda jugar en la señalización derivada de muchas de las otras macromoléculas accesorias a ella. Así como su participación en otros sistemas celulares.²²

Referencias

1. YANG F, CINDRELLS J: *Actin and associated proteins. Guidebook to the cytoskeletal and motor proteins*. Kreis T, Vale R, Ed. A Smbrook and toone publication at Oxford University Press, 1993, p. 3-20.
2. AVSCOUGH KR: *In vivo functions of actin-binding proteins*. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 102-111.
3. GEBLIN JB, YAMIN R, EGAN S, STEWART M, STOSSEL TP, KWATKOWSKI DJ, HARTWIG JH: *Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, non-muscle filamin): a molecular leaf spring*. *J Cell Biol* 1990; 111: 1089-1105.
4. STOSSEL TP, CINDRELLS J, COOLEY L, HARTWIG JH, NIEGEL A, SCHLEICHER M, SHAPIRO SS: *Filamins as integrators of cell mechanics and signalling*. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 138-45.
5. TAKAPUTA T, WU G, MURPHY GF, SHAPIRO SS: *Human β filamin is a new protein that interacts with the cytoplasmic tail of glycoprotein Iba*. *J Biol Chem* 1998; 273: 17531-17538.
6. ARIAN VAN DER FLIEP, SCHEERBERG A: *Structural and functional aspects of filamins*. *Biochem Biophys Acta* 2001; 1538: 99-117.
7. HARTWIG J, STOSSEL T: *Isolation and properties of actin, myosin, and a new actin binding protein in rabbit alveolar macrophages*. *J Biol Chem* 1975; 250: 5696-5705.
8. MAESTRINI E, PATRIBONDI C, MANZINI M, RIVELLA S, ROCCHI M, REPETTO M, VILLA A: *Mapping two genes encoding isoforms of the actin binding protein ABP-280, a dystrophin like protein, to Xq28 and to chromosome 7*. *Human Mol Genet* 1993; 2: 761-766.
9. BENNBERG WM, BAINTON DP: *Megakaryocyte and platelet structure*. Hoffmann R, Benz EJ, Shattil S J, Furie B, Cohen H J, Silberstein Hematology basic principles and practice. 2^a Ed. New York Churchill Livingstone, 1995, p. 1516-1524.
10. PATEL SR, HARTWIG JH, ITALIANO JE: *The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets*. *J Clin Invest* 2005; 115: 3348-3354.

11. DEHLIS E, WEIHER K, OGDEN M: *The cytoskeleton of blood platelets viewed by immunofluorescence microscopy*. Eur J Cell Biol 1981; 24: 45-52.
12. ZOHIL, MANUEL: *The platelet reticular network*. J Ultrastruct Res 1984; 89: 89-97.
13. WHITE JG, KRUMWEID M, BURRIS SM, HEAGAN B: *Isolation of microtubule coils from platelets after exposure to aggregating agents*. Am J Pathol 1986; 125: 319-326.
14. TANAKA K, ITOH K: *Reorganization of stress like structures in spreading platelets during surface activation*. J Struct Biol 1998; 124: 13-41.
15. FOX JE: *Cytoskeletal proteins and platelet signaling*. Thromb Haemost 2001; 86: 198-213.
16. HOLMES H: *Prostaglandin endoperoxide-thromboxane synthase and granule secretion as positive feedback loops in the propagation of platelet responses during "the basic platelet reaction"*. Thromb Haemost 1977; 38: 1030-41.
17. ROSENBERG S, STRACHER A, LUCAS RC: *Isolation and characterization of actin and actin-binding protein from human platelets*. J Cell Biol 1981; 91: 201-211.
18. ROSENBERG S, LAWRENCE J, STRACHER A: *Effect of various extraction solutions and thrombin activation on the composition of the platelet cytoskeleton*. Cell Motil 1982; 2: 317-332.
19. HARTWIG JH, BARKALOW K, AZIMI A, ITALIANO J: *The elegant platelet: signals controlling actin assembly*. Thromb Haemost 1999; 82: 392-8.
20. HARTWIG JH: *The platelet: form and function*. Semin Hematol 2006; 43: 94-100.
21. WU MP, JAY D, STRACHER A: *Existence of multiple phosphorylated forms of human platelet actin-binding protein*. Cell Mol Biol Res 1994; 40: 351-357.
22. CHEN M, STRACHER A: *In situ phosphorylation of platelet actin-binding protein by cAMP-dependent protein kinase stabilizes it against proteolysis by calpain*. J Biol Chem 1989; 264: 14282-14289.
23. PHILLIPS DR, JAKABOVA M: *Ca²⁺ dependent proteases in human platelets specific cleavage of platelet polypeptides in the presence of added Ca²⁺*. J Biol Chem 1977; 252: 5602-5605.
24. ZHANG Z, LAWRENCE J, STRACHER A: *Phosphorylation of platelet actin binding protein protects against proteolysis by calpain dependent sulfhydryl protease*. Biochem Biophys Res Commun 1988; 151: 355-360.
25. JAY D, STRACHER A: *Expression in Escherichia coli and phosphorylation with cAMP-dependent protein kinase of the N-terminal region of human endothelial actin-binding protein*. Biochem Biophys Res Commun 1994; 202: 764-771.
26. JAY D, STRACHER A: *Expression in Escherichia coli, phosphorylation with cAMP dependent protein kinase and proteolysis by calpain of a 71-kDa domain of human endothelial actin binding protein*. Biochem Biophys Res Commun 1997; 232: 555-558.
27. STOSSEL TP, CONDEelis J, COOLEY L, HARTWIG JH, NOGELI A, SCHLEICHER M, SIROGRO S: *Filamins as integrators of cell mechanics and signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol 2001; 2: 138-145.
28. XU WF, XU ZW, CHUNG D, DAVIS E: *A novel human actin-binding protein homologue that binds to platelet glycoprotein Iba*. Blood 1998; 92: 1268-1276.
29. MEYER SC, ZUBERBU S, CUNNINGHAM CC, HARTWIG JH, BISSSEL T, GARDNER K, FOX JE: *Identification of the region in actin-binding protein that binds to the cytoplasmic domain of glycoprotein Iba β* . J Biol Chem 1997; 272: 2914-2919.
30. CALDERWOOD D, SHATTE S, GINSBERG M: *Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling*. J Biol Chem 2000; 275: 22607-22610.
31. OTT I, FISCHER E, MIYAGI Y, MULLER B, RUF W: *A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280*. J Cell Biol 1998; 140: 1241-1253.
32. OHTA Y, STOSSEL T, HARTWIG J: *Ligand-sensitive binding of actin-binding protein (ABP) to immunoglobulin G Fc receptor II (Fc γ RII, CD64)*. Cell 1991; 67: 275-282.
33. LIU G, THOMAS L, WARREN RA, ENNS CA, CUNNINGHAM CC, HARTWIG JH, THOMAS G: *Cytoskeletal protein ABP-280 directs the intracellular trafficking of furin and modulates protein processing in the endocytic pathway*. J Cell Biol 1997; 139: 1719-1733.
34. THOMPSON TG, CHIA TM, HACK AA, BRIGGS M, RAJALA M, LIDOV HGW, McNALLY ME, WATKINS S, KUNDEL LM: *Filamin 2 (FLN2): a muscle-specific sarcolemma interacting protein*. J Cell Biol 2000; 148: 115-126.
35. VAN DER VEN PFM, WEINER S, SALMBANDAS P, AUERBACH D, HIMMEL M, KEMPA S, HAYES K, PACHOLSKY D, TAIWAINEN A, SCHROEDER R, CARPÉN O, FURST DO: *Indications for a novel muscular dystrophy pathway: g-filamin, the muscle-specific filamin isoform, interacts with myotilin*. J Cell Biol 2000; 151: 235-247.
36. STAHLHUT M, VAN DEURS B: *Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton*. Mol Biol Cell 2000; 11: 325-337.
37. SCHWARZMAN AL, SINGH N, TRIFER M, GREGORI L, DRANOVSKY A, VITEK MP, GLASE CG, GEORGE-HYLOF PFL, GOLDBERGER D: *Endogenous presenilin 1 redistributes to the surface of lamellipodia upon adhesion of Jurkat cells to a collagen matrix*. Proc Natl Acad Sci 1999; 96: 7932-7937.
38. GUO Y, ZHANG S, SINGH N, COOLEY L, BULLIANCE G: *Physical and genetic interaction of filamin with presenilin in Drosophila*. J Cell Sci 2000; 113: 3499-3508.
39. LI M, BERMAN C, WANG Z, ZHOU Q: *Modulation of dopamine D2 receptor signaling by actin-binding*

- protein (ABP-280). *Mol Pharmacol* 2000; 57: 446-452.
40. BROWN K, JOHNSON R, JAIN D, THOMPSON J. Filamin (280-kDa actin-binding protein) is a cytosolic substrate and is also cleaved directly by the cytosolic *T* lymphocyte proteinase granzyme B during apoptosis. *J Biol Chem* 2000; 275: 39262-39266.
 41. EDWARDS D, TOWN P, WASSERMAN S. An activity-dependent network of interactions links the *Raf* protein domain with its cytoplasmic regulator. *Development* 1997; 124: 3855-3864.
 42. LEONARDI A, ELLINGER-ZIEGLERBAUER H, FRANZOSO G, BROWN K, SIEBENLIST U. Physical and functional interaction of filamin (actin-binding protein-280) and tumor necrosis receptor-associated factor-2. *J Biol Chem* 2000; 275: 271-278.
 43. MARTI A, CUNNINGHAM LC, OHTA Y, HARTWIG J, STROBEL TP, KREIBER JM, AVRECH J. ABP-280 binds the SAPK activator *MEK-1* and is required for *TMF α* activation of SAPK in melanoma cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 2620-2628.
 44. OZANSKI D, BRADY M, GAUBMAN L, COOK S, NEAL D, ROSSON C. *Androgen* receptor nuclear translocation is facilitated by the *F-actin* crosslinking protein filamin. *Mol Endocrinol* 2000; 14: 1618-1626.
 45. OHTA Y, SUGIICHI N, NAKAMURA S, HARTWIG J, STROBEL TP. The small GTPase *Rac1A* targets filamin to induce filopodia. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 2122-2128.
 46. BELLANGER JM, BELLANGER JM, AVIERE C, SARRIEU C, OHTA Y, STROBEL TP, DEBAST A. The *Rac1*- and *RhoG*-activating domain of the *beta*-functional guanine nucleotide exchange factor *Trio* targets filamin to remodel cytoskeletal actin. *Nature Cell Biol* 2000; 2: 888-892.
 47. KIM S, FARVE JF, ROBERT P, LE DUCQUAN B, BENVENISTE LM, LEVRIER J, BOUYX MM, ANDRÉASSIS KM, GUILLET LD, THIES FL, SOECHET M, BUI A. Identification and characterization of *cofilin*, a novel human small stress protein selectively expressed in cardiovascular and insulin-sensitive tissues. *J Biol Chem* 1999; 274: 36592-36600.
 48. PERRICCI K, MILLER D, SIEGEL A. Localization and enhanced current density of the *Kv4.2* potassium channel by interaction with the actin-binding protein filamin. *J Neurosci* 2000; 20: 8736-8744.
 49. ZHANG QQ, ROSENBERG S, LAWRENCE J, STROBEL A. Role of actin binding protein phosphorylation in platelet cytoskeleton assembly. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 118: 508-513.
 50. YOUNG Y, SOON ZJ. Interaction with *BRCA2* suggests a role for filamin-1 (*hFLN1*) in DNA damage response. *J Biol Chem* 2001; 276: 48318-48324.
 51. KIMURA T, LAD Y, JUNGO P, OBLEY CL, BALLESSARIE M, WEITZER KL, CAMPBELL JD, YLAWSE J, CALDERWOOD DA. The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with *tinin*. *Mol Cell* 2006; 21: 337-347.
 52. SULLIVAN NO, OLSEN TM. Glycoprotein *IIb* in the *Triton-insoluble* (cytoskeletal) fraction of blood platelets. *Biochim Biophys Acta* 1984; 799: 209-220.
 53. OHTA YR, PIRARD D, NEWMAN PJ, MONTGOMERY RR, KUNICKI TJ. On the association of glycoprotein *IIb* and actin-binding proteins in human platelets. *J Cell Biol* 1985; 100: 317-21.
 54. JASTHUIS GA, TARDON NS, GREGO NJ. Human platelet *Thrombin* receptor model for platelet activation. Editor, Rao GHR. Ed: Handbook of platelet physiology and pharmacology. Norwell, Massachusetts. Kluwer Academic Publishers, 1999, p. 21-37.
 55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=protein>
 56. CALDERWOOD DA. *Talin* controls integrin activation. *Biochem Soc Trans* 2004; 32: 434-437.
 57. SHATTU SJ. Function and regulation of the beta 3 integrins in hemostasis and vascular biology. *Thromb Haemostas* 1995; 74: 149-155.
 58. JAY D, GARCIA E, LARA JE, MURPHY MA, DE LA LIZ IBAARRA M. Determination of a cAMP-dependent protein kinase phosphorylation site in the C-terminal region of human endothelial actin-binding protein. *Arch Biochem Biophys* 2000; 377: 80-84.
 59. JAY D, GARCIA E, DE LA LIZ IBAARRA M. *In situ* determination of a PKA phosphorylation site in the C-terminal region of filamin. *Mol Cell Biochem* 2004; 260: 49-53.
 60. GARCIA E, STROBEL A, JAY D. Calcineurin dephosphorylates the C-terminal region of filamin in an important regulatory site: a possible mechanism for filamin mobilization and cell signaling. *Arch Biochem Biophys* 2006; 446: 140-50.
 61. VAILLANCOURT RK, LI F, ADAM L, NORTON D, OHTA Y, STROBEL TP, KUMAR R. Filamin is essential in arctic cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nat Cell Biol* 2002; 4: 681-690.
 62. MANESS E, LEUNG T, SAKLITZIOS H, ZHANG ZS, LAM L. A *Drosophila* serine/threonine protein kinase activated by *Calc-42* and *Rac1*. *Nature* 1994; 367: 40-46.
 63. DELOVALDES SD, ALMAGAR B, MOO J, ARIAS RLE, HERNANDEZ RR, RUIZ DA, GUILLEN N, VARGAS M. The ABP-120 C- end region from Entamoeba histolytica interacts with raftinide, a new lipid target. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 1527-1536.