

VESÍCULAS CON CUBIERTA Y SU PARTICIPACIÓN EN EL TRANSPORTE INTRACELULAR

Ana Sandra Staskevich¹

¹ Microbiología General e Inmunología Básica

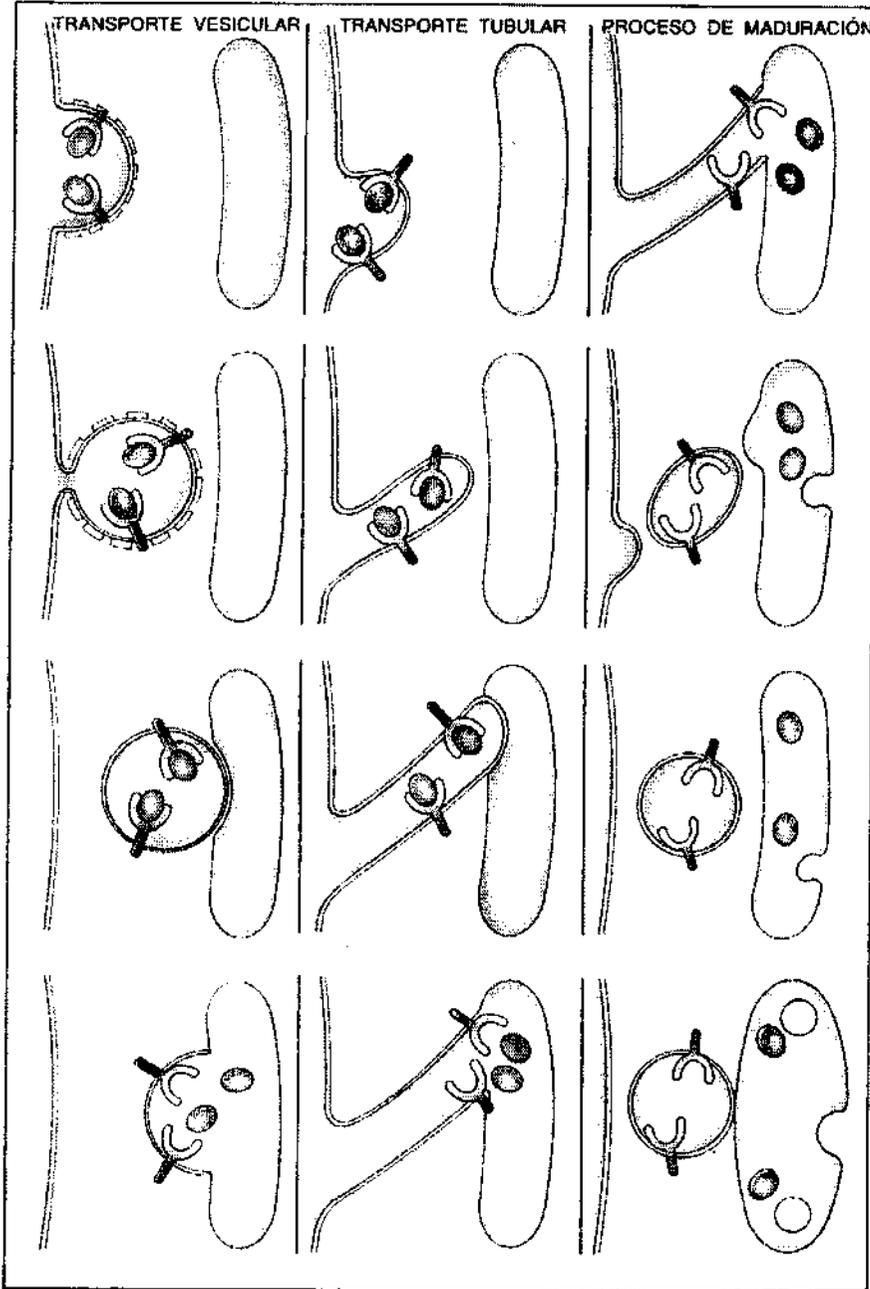
Todas las células eucarióticas poseen numerosos compartimientos que están delimitados por membranas, los cuales tienen características bioquímicas específicas que les permite realizar funciones especiales. Para cumplir con ellas, cada compartimiento tiene proteínas de membrana y solubles que le son características. El correcto funcionamiento de cada uno de ellos es importante para el metabolismo celular normal y la interacción de ella con su medio.

Los compartimientos interactúan entre sí y el transporte vesicular media un intercambio continuo de membranas y contenido entre ellos. Es necesario, pues, que la célula mantenga la existencia de estructuras membranosas bastante estables sin cerrar el tráfico de macromoléculas entre las mismas. Se han propuesto tres modelos para explicar el flujo de material de unos orgánulos a otros: transporte vesicular, transporte tubular y transporte por maduración.

En el modelo del transporte vesicular las moléculas transitan de un compartimiento a otro incorporadas en vesículas que se forman en el compartimiento de origen y se fusionan con el compartimiento de destino. De acuerdo con el modelo del transporte tubular, las moléculas difunden de un compartimiento a otro a través de conexiones tubulares que se establecen al fusionarse las membranas de ambos. En el modelo de maduración, los compartimientos se van transformando con el tiempo, y así una macromolécula puede aparecer en diferentes estructuras sin tener que ser trasvasada.

Los tres modelos participan, de una forma u otra, en las dos vías principales de transporte intracelular: la exocítica o secretoria y la endocítica. La exocítica media el transporte de proteínas sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso, a través del aparato de Golgi, hasta su destino final: vertido al medio extracelular, acumulación en gránulos secretores, inserción en la membrana plasmática o transporte hasta los lisosomas. La endocítica le permite llevar macromoléculas incorporadas por invaginación de la membrana plasmática hasta su destino final: reciclado al medio extracelular o degradación en lisosomas.

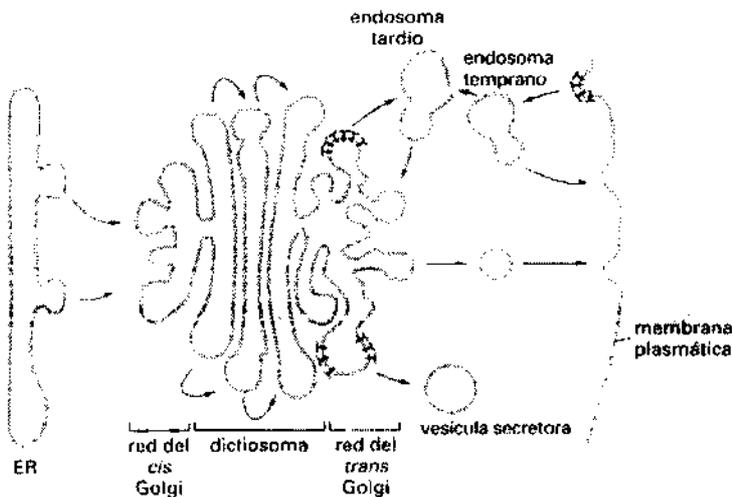
Pueden ser distinguidos dos modos de transporte vesicular, uno constitutivo (no selectivo) y otro regulado (selectivo). En el constitutivo no hay una selección de la carga incluida en las vesículas de transporte, estando en la misma concentración que en el compartimiento dador. Esta vía es también referida como "ruta por defecto o ruta de salida en masa". Por el contrario, en la ruta regulada, se apartan proteínas seleccionadas de la vía constitutiva que requieren clasificación y distribución. Así, los contenidos vesiculares están presentes en alta concentración con respecto al compartimiento de origen resultando en un transporte eficiente. Estas dos vías divergen en la red del trans Golgi (TGN: Trans Golgi Network). Un ejemplo de ruta de clasificación que ocurre en la red del trans Golgi orienta hidrolasas lisosomales sintetizadas recientemente que llevan un extremo manosa 6 fosfato (M6P). Estas hidrolasas interactúan con receptores M6P en el TGN, causando este selectivo transporte a lisosomas.



1. MODELOS DE TRANSPORTE de elementos entre compartimientos intracelulares.

El transporte vesicular (*izquierda*) se efectúa por medio de vesículas que se desprenden de las membranas de ciertos orgánulos, viajan por el citoplasma y se fusionan con la membrana del compartimiento destino. Ciertas vesículas portan en su superficie una proteína denominada clatrina, que liberan antes de la fusión. En el transporte mediado por túbulos (*centro*), la membrana de un compartimiento se elonga en una formación tubular que acabará por fusionarse con la membrana de destino. Por último, ciertos compartimientos, debido a múltiples etapas de transporte en las cuales pierden componentes y adquieren otros, pueden sufrir transformaciones importantes en su composición y estructura, proceso conocido como maduración (*derecha*). (Mayorga, LS y Colombo, MI, Invest. Y Ciencia, 213, págs 6-12, 1994)

Otro ejemplo de transporte selectivo y regulado es la endocitosis mediada por receptor que tiene lugar en la membrana plasmática. Proceso que por interacción específica de ligandos y receptores en la superficie celular lleva a la internalización de diversas cargas (Ej: lipoproteínas de baja densidad, hierro unido a apotrasferrina, insulina y ciertos virus). Las vesículas endocíticas internalizadas se fusionan con endosomas. Bombas de protones en la membrana endocitada lleva a la acidificación del lumen vesicular e induce cambios conformacionales en el complejo receptor-ligando llevando a la disociación del ligando. Pareciera que el endosoma es capaz de clasificar ligandos y receptores. Mientras que los receptores pueden ser transportados volviendo a la superficie celular, los ligando usualmente terminan en lisosomas donde son degradados.



2. TRANSPORTE VESICULAR SELECTIVO Y NO SELECTIVO EN CELULAS NO POLARIZADAS. Se postula que el transporte no selectivo (constitutivo) (*flechas azules*) está mediado por vesículas revestidas de coatómero, mientras que diversas formas de transporte selectivo (mediado por señal) (*flechas rojas*) se lleva a cabo mediante vesículas revestidas de clatrina. En células polarizadas se requiere una vía adicional desde la red del *trans* Golgi mediada por señal. (Alberts B. y col., *Biología molecular de la célula*, Tercera edición. Págs 678-686, 1994).

En medio de tanta actividad intracelular los compartimientos donador y receptor específicos para determinada macromolécula se reconocen entre sí, permitiendo así el transporte direccional. El carácter de un compartimiento está definido por la naturaleza de la membrana que lo delimita: los marcadores expuestos en la superficie citosólica de la membrana guían la dirección de las vesículas, asegurando que solo se fusionen con el compartimiento adecuado, dictando por lo tanto el patrón de tráfico entre un compartimiento y otro.

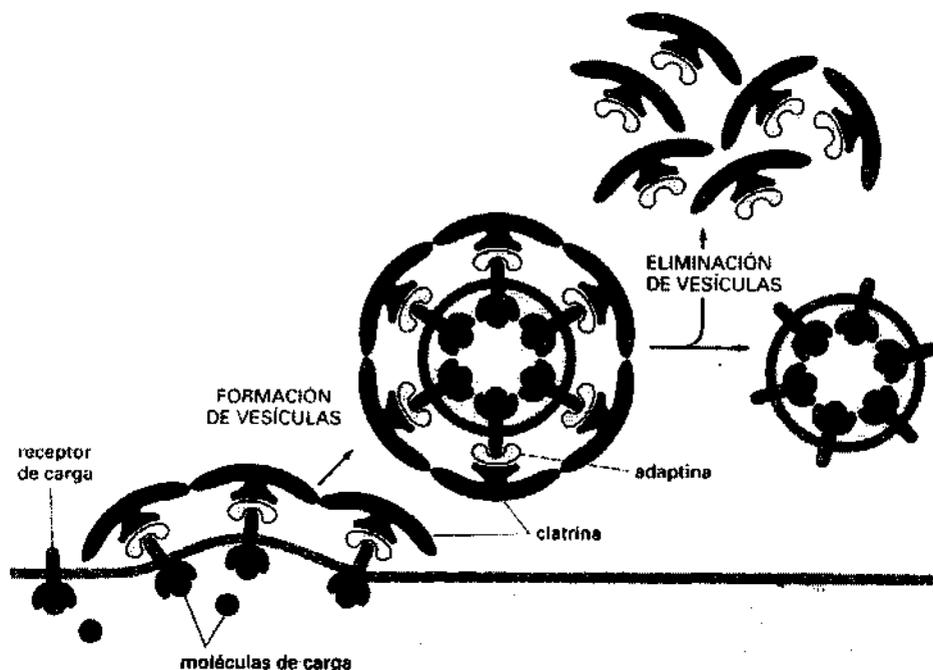
La generación de una vesícula de transporte conlleva el ensamblaje de una cubierta especial en la cara citosólica de la membrana que genera la vesícula. Estas cubiertas actúan como un dispositivo que succiona la membrana rica en ciertas proteínas y pobre en otras hacia afuera de la membrana, así las proteínas pueden ser transportadas de forma específica a otro compartimiento.

La mayoría de las vesículas de transporte se forman a partir de regiones revestidas especializadas de la membrana, por lo que generan vesículas revestidas de una red de proteínas distintas de las que recubren la superficie citosólica. Antes de que la vesícula se

fusione con la membrana receptora, este recubrimiento debe eliminarse para permitir que las dos membranas interactúen directamente.

Se han identificado dos tipos de vesículas de transporte, que se caracterizan por el complejo proteico que las recubre. Las revestidas de clatrina (proteína mayoritaria del recubrimiento) y un complejo adaptador, se generan en la membrana plasmática y en el último repliegue del aparato de Golgi. Las vesículas carentes de clatrina en su cubierta (revestidas de coatómero –de coat, cubierta) intervienen en el acarreo de proteínas desde el retículo endoplasmático hacia el aparato de Golgi y entre las distintas cisternas de este último. Las vesículas revestidas de clatrina median el transporte selectivo de receptores transmembrana, como el receptor M6P (manosa 6 fosfato) desde la red del trans Golgi, o el receptor de LDL (lipoproteínas de baja densidad o Low Density Lipoproteins) desde la membrana plasmática, ambos con cualquier molécula soluble que se haya unido a ellos, quedando atrapada en el lumen de la vesícula. Las vesículas revestidas de coatómero, por el contrario, median el transporte vesicular no selectivo desde el ER (Reticulo Endoplasmático) y las cisternas del Golgi.

Puede haber un tercer tipo de vesícula revestida. La membrana plasmática de las mayoría de las células presenta invaginaciones morfológica y bioquímicamente diferenciadas, denominadas caveolas; aunque su función es incierta, una posibilidad sería que estas caveolas generaran vesículas revestidas de caveolina.

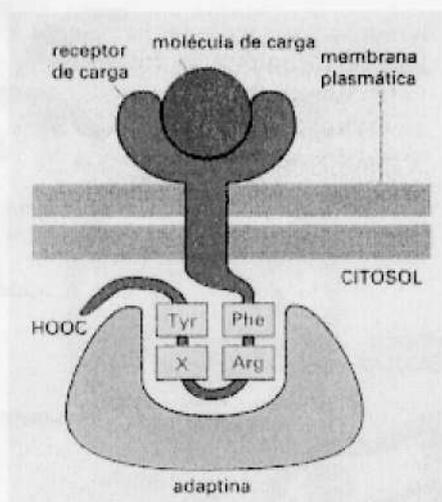


3. TRANSPORTE SELECTIVO MEDIADO POR VESÍCULAS REVESTIDAS DE CLATRINA.
 Las adaptinas se unen tanto a los trisquelions de clatrina como a los receptores de carga. (Alberts B. y col., *Biología molecular de la célula*, Tercera edición. Págs 678-686,1994).

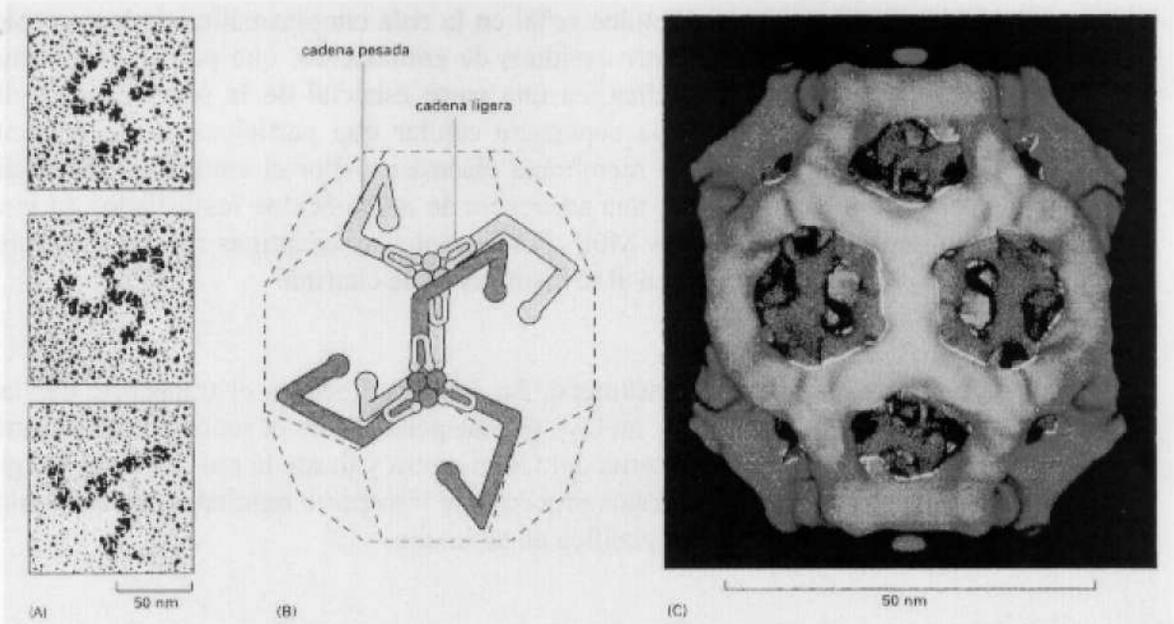
Vesícula con clatrina. El principal componente proteico de estas vesículas es la propia clatrina. Un complejo proteico altamente conservado. Consiste en tres cadenas polipeptídicas grandes y tres pequeñas que juntas forman una estructura de tres patas denominada trisquelion. Los trisquelions de clatrina se unen dando lugar a un esqueleto en forma de cesto convexo formado por hexágonos y pentágonos, generando depresiones revestidas en la cara citoplasmática de las membranas.

Se cree que la formación de un brote revestido de clatrina se produce por fuerzas generadas por el ensamblaje de las proteínas de la cubierta sobre la superficie citosólica de la membrana. No se conoce qué inicia el proceso de unión a una región particular de la membrana ni cómo se libera el brote formando la vesícula revestida. Una vez la vesícula se desprende, la cubierta se pierde rápidamente. Se cree que participa una proteína que une GTP denominada ARF (ADP ribosylation factor). El mecanismo por el cual se desprende tampoco se conoce, pero se ha demostrado que in vitro una proteína chaperona de la familia hsp70 actúa como una ATPasa de eliminación de la cubierta que utiliza la energía de la hidrólisis de ATP para eliminar la cubierta de las vesículas revestidas de clatrina.

Normalmente las vesículas pinocíticas revestidas de clatrina son de tamaño pequeño y uniforme, pero la clatrina también está implicada en la formación de vesículas mayores, por ejemplo en vesículas de secreción que contienen grandes agregados de proteínas. Parece que en estos casos se forman parches de clatrina que ayudan a que la membrana se doble, pero el gran tamaño de la carga unida a los receptores evita que la membrana se pliegue lo suficiente como para permitir que se forme un revestimiento completo.



4. **PEPTIDO SEÑAL PARA LA ENDOCITOSIS.** Se cree que los diversos receptores proteicos de superficie celular que son endocitados en las vesículas de clatrina comparten esta señal, la cual es reconocida por las adaptinas que actúan en la endocitosis mediada por receptor desde la membrana plasmática. Los aminoácidos mostrados aquí son una parte esencial de la señal. (Alberts B. y col., *Biología molecular de la célula*, Tercera edición, Págs 678-686, 1994).



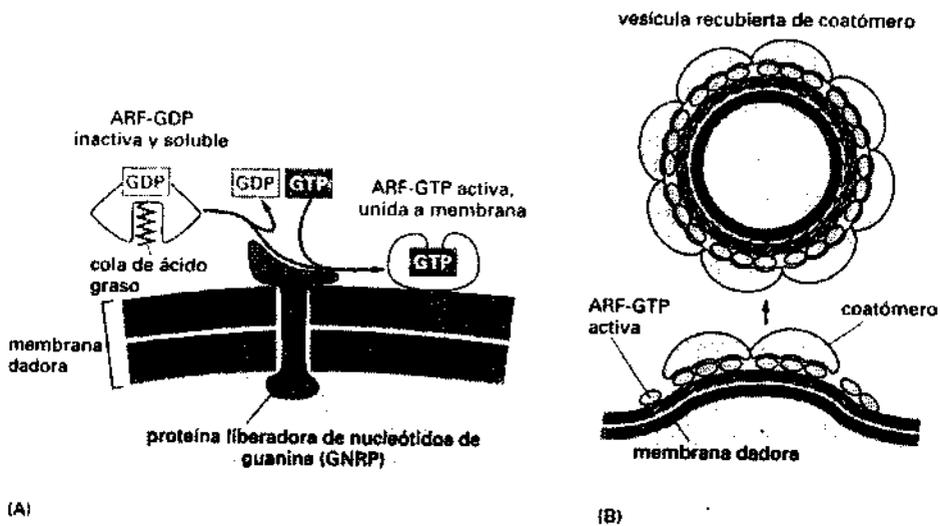
5. ESTRUCTURA DE LA CUBIERTA DE CLATRINA. (A) Electromicrografía de trisquelions de clatrina sombreados con platino. Aunque no puede observarse en las micrografías, cada trisquelion está compuesto por tres cadenas pesadas y tres cadenas ligeras de clatrina. (B) Dibujo esquemático de la distribución probable de los trisquelions en la superficie de las vesículas revestidas de clatrina. Se muestran dos trisquelions, las cadenas pesadas de uno se han dibujado en rojo y las del otro en gris; las cadenas ligeras de ambos se presentan en amarillo. La distribución superpuesta de los brazos flexibles del trisquelion proporciona una fuerza mecánica y flexibilidad. Obsérvese que el final de cada brazo del trisquelion se dobla hacia dentro, por lo que su dominio amino terminal forma una cubierta intermedia. (C) Reconstrucción tridimensional de la cubierta de clatrina compuesta por 36 trisquelions organizados en una red de 12 pentágonos y 6 hexágonos. La cubierta poligonal exterior, en rojo, representa las patas superpuestas de los trisquelions de clatrina; la cubierta intermedia, en verde, está formada por los dominios amino terminales de los trisquelions; y la cubierta interior, en azul, representa las proteínas adaptadoras. Aunque la cubierta mostrada es demasiado pequeña para incluir una vesícula de membrana, los revestimientos de clatrina de las vesículas están contruidos de forma similar a ésta, a partir de 12 pentágonos y un número superior de hexágonos. (Alberts B. y col., *Biología molecular de la célula*, Tercera edición. Págs 678-686, 1994).

Complejo adaptador o Adaptina Una segunda molécula principal de recubrimiento presente en vesículas con clatrina, es un complejo formado por muchas subunidades llamado adaptina. Las adaptinas son necesarias tanto para unir el revestimiento de clatrina a la membrana como para atrapar diversos receptores proteicos transmembrana, los cuales capturan moléculas específicas en el interior de la vesícula. De este modo un grupo seleccionado de moléculas a transportar, unidas a sus receptores de carga específicos, se incorporan al lumen de cada una de las vesículas de transporte revestidas de clatrina acabadas de formar.

Las vesículas revestidas de clatrina no son todas iguales. Hemos visto, por ejemplo, que algunas de ellas, las que participan en el tránsito desde el complejo de Golgi hasta los endosomas tardíos, son ricas en receptores M6P; otras, que participan en la ruta desde la membrana plasmática a los endosomas tempranos, son ricas en receptores de compuestos extracelulares como las LDL. Aunque parece que el revestimiento de clatrina en sí mismo es el mismo en cada caso, las adaptinas son diferentes y median la captura de diferentes receptores.

Las adaptinas reconocen peptidos señal en la cola citoplasmática de los receptores. Una secuencia característica de cuatro residuos de aminoácido, que parece que forma un giro brusco en la cadena polipeptídica, es una parte esencial de la señal de endocitosis compartida por los receptores de la superficie celular que participan en la endocitosis mediada por receptor a partir de la membrana plasmática. Por el contrario, en la red del trans Golgi las adaptinas reconocen una secuencia de aminoácidos fosforilados en la zona carboxilo terminal de los receptores M6P. Por lo tanto las adaptinas reconocen proteínas transmembrana específicas y las unen al revestimiento de clatrina.

Vesículas revestidas de coatómero. Se cree que median el transporte celular no selectivo de la ruta por defecto, que incluye el transporte desde el retículo endoplasmático al complejo de Golgi, desde una cisterna del Golgi a otra y desde la red del trans Golgi a la membrana plasmática. Ninguno de estos procesos de transporte requieren que las vesículas que se forman capturen una carga específica en su lumen.



6. **MODELO ACTUAL SOBRE LA FORMACIÓN DE LAS VESÍCULAS REVESTIDAS DE COATÓMERO.** Algunos autores postulan un modelo similar para clatrina. (A) La proteína ARF-GDP, soluble e inactiva, se une a una proteína liberadora de nucleótidos de guanina (GNRP) en la membrana dadora, lo cual provoca que ARF libere su GDP y se una a GTP. El GTP desencadena un cambio conformacional en ARF dejando expuesta su cadena de ácido graso, que se inserta en la membrana dadora. (B) La proteína ARF-GTP activa unida a la membrana recluta subunidades de coatómero del citoplasma. Esto hace que la membrana forme un brote o yema. El posterior acontecimiento de fusión de membrana separa y libera la vesícula revestida. (Alberts B. y col., *Biología molecular de la célula*, Tercera edición. Págs 678-686,1994).

El revestimiento de estas vesículas consiste en parte en un gran complejo proteico llamado coatómero, formado por siete subunidades proteicas de revestimiento (llamadas COP, de coat protein). Por lo menos una de ellas presenta homología de secuencia con las adaptinas de las vesículas revestidas de clatrina, pero difieren estructuralmente de esta última..

Parece que tanto el ensamblaje como el desensamblaje del revestimiento de coatómero depende de una proteína denominada ARF, que también podría participar en el ensamblaje de las cubiertas de clatrina. Es una de las muchas proteínas de unión a GTP que son componentes clave en el control del transporte vesicular.

Modelo: pasos y sus componentes en la formación de una vesícula enlace: A partir del progresivo ensamblaje de subunidades citosólicas de una proteína de cubierta a una porción de la membrana donadora, se conduce a la formación de una vesícula cubierta fuera de la membrana. **Paso1:** El ensamblaje es disparado cuando una proteína que une GTP, una GTPasa monomérica (GTP binding protein) denominada ARF (ADP ribosylation factor) u otra relacionada que posee una cola de ácido graso (Ac. mirístico), es activada por unión a GTP. La ARF citosólica está unida a GDP y el intercambio por GTP es un proceso catalizado por una proteína denominada GNEF o GNRF(guanine nucleotide exchange/releasing factor) localizada en la membrana. Las concentraciones de GTP en la célula son mayores que de GDP, por lo tanto cuando se desprende GDP por medio de GNEF, el GTP tiende a reemplazar al GDP. La unión de GTP a ARF le provoca un cambio conformacional que permite que la proteína exponga la cola lipídica. Esta se inserta en la bicapa lipídica de la membrana dadora. Una vez unida a la membrana, ARF recluta proteínas para el ensamble de la cubierta resultando en la formación de un brote. En el caso de las cubiertas de clatrina, en este paso, se produce la interacción específica del grupo adaptador con receptores agrupados en determinados lugares de la membrana, formando la capa íntima de la cubierta, sobre la cual se ensamblan las subunidades de clatrina. **Paso2:** El brote se desarrolla y se cierra por la adición de Acyl CoA (palmitoyl coenzima A) en las proteínas COP y por la acción de la GTPasa dinamina (se cree que actúa como un anillo que estrangula la zona de unión del brote a la membrana dejando la vesícula libre) en las cubiertas de clatrina. **Paso3:** ARF es inactivada al hidrolizarse el GTP unido, por acción de una GAP (GTPasa activating protein) que libera Pi a partir del nucleótido, produciendo GDP-ARF. **Paso4:** La ARF inactivada se disocia de la membrana dejando una vesícula cubierta. En el caso de las cubiertas por coatómero (COP), estas proteínas se disocian inmediatamente después de ARF, ya que las vesículas cubiertas libres de la GTPasa monomérica no son observadas ordinariamente. Por el contrario, las cubiertas por clatrina libres de ARF, son más estables y llegan a ser las especies más abundantes. Los trisquelions de clatrina son subsecuentemente liberados de las vesículas. Se piensa que esta reacción es catalizada por una proteína chaperona citosólica de la familia Hsp 70 (heat shock protein) y ATP dependiente. **Paso5:** Así, las cubiertas proteicas son rápidamente disociadas, dejando la vesícula preparada para la fusión con la membrana receptora específica. Las proteínas COP persisten en el citoplasma como el ensamble soluble llamado coatómero (combinación estequiométrica de proteínas COP) hasta un próximo reclutamiento de cubierta. Pasa algo similar con los trisquelions de clatrina.

En los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de los mecanismos moleculares que median la formación de proteínas de cubierta pero todavía no nos permite dilucidar el complejo sistema que utiliza una célula eucariótica para tomar la decisión correcta en cuanto al destino de la carga que transporta una vesícula. Todo esto hace pensar que necesitaremos mucho tiempo más para comprender a cabalidad el transporte intracelular y el papel que ocupan en él las proteínas de cubiertas.

BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

1. VESÍCULA-MEDIATED PROTEIN SORTING. Nancy K. Pryer, Linda J. Wuestehube y Randy Schekman en *Annual Review of Biochemistry*, vol. 61, págs. 471-516, 1992.
2. TRANSPORTE ENTRE COMPARTIMIENTOS INTRACELULARES. Luis S. Mayorga y María I. Colombo en *Investigación y Ciencia*, 213, págs. 6-12, 1994.
3. BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA CELULA. Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martín Raff, Keith Roberts y James D. Watson. Tercera Edición. Págs. 678-686, 1994
4. COP I DOMAINS REQUIRED FOR COATOMER INTEGRITY, AND NOVEL INTERACTIONS WITH ARF AND ARF-GAP. A. Eugster, G. Frigerio, M. Dale y R. Duden en *EMBO J*, Aug 1;19(15), págs.3905-17, 2000.
5. THE ENDOCYTOSIS MACHINERY. A. Sorkin en *J Cell Sci*, 113(Pt 24), págs. 4375-4376, 2000.
6. PARTICIPATION OF DINAMIN IN THE BIOGENESIS OF CYTOPLASMIC VESICLES. JH Henley, H. Cao y MA McNiven en *FASEB J*, Dec;13 Suppl 2,págs.S243-7,1999.