

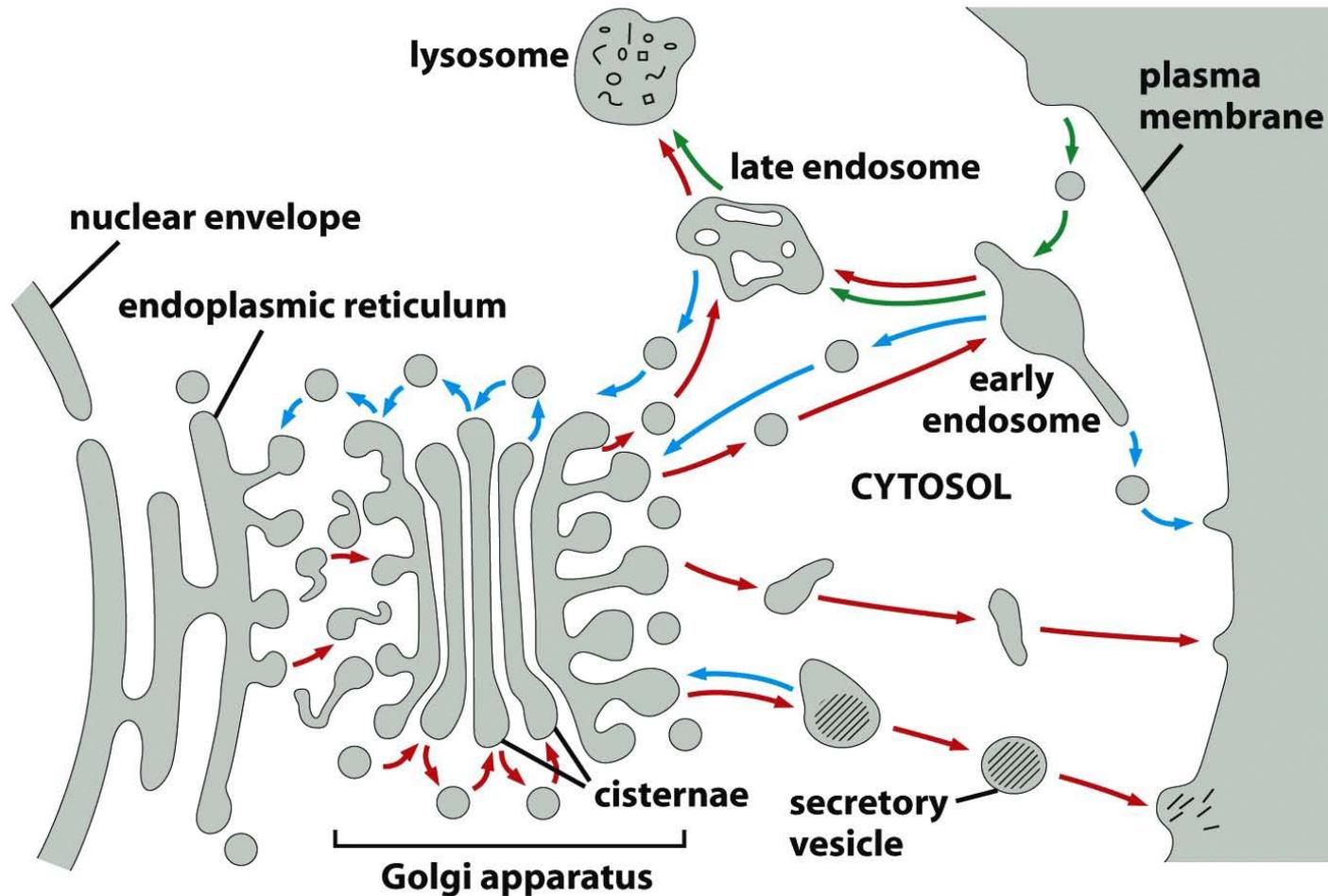
Flujo de membranas:

**SELECCIÓN DE CARGO,
MECANISMOS DE DETINACIÓN
Y ENDOCITOSIS**

M. T. Núñez

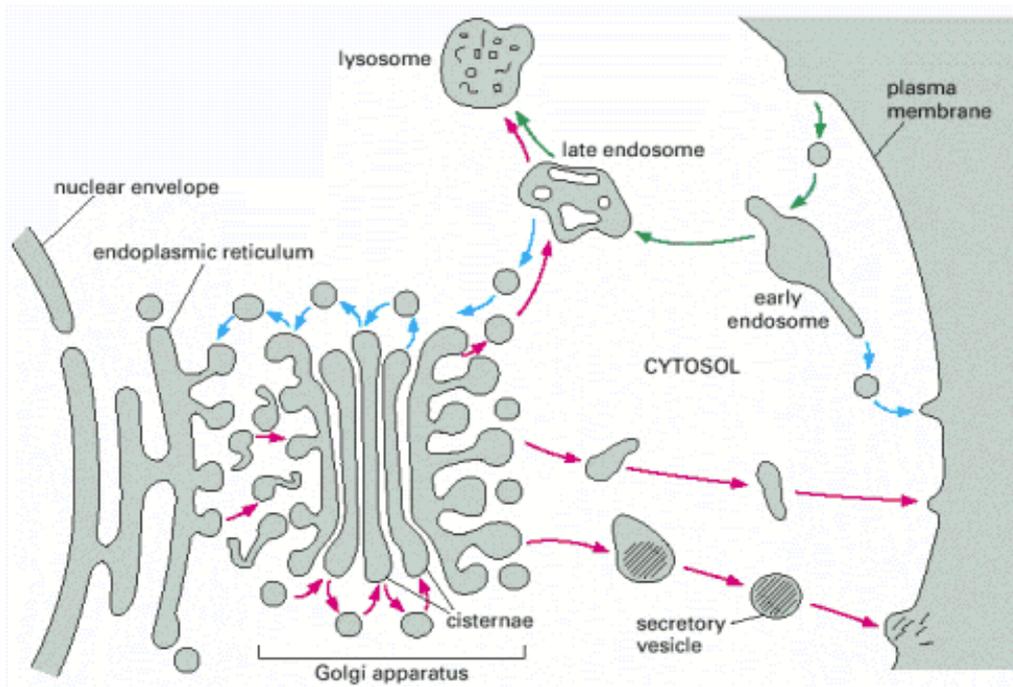
Curso de Biología Celular 2011

Las células eucariontes poseen un complejo sistema de membranas que permite el intercambio de material entre diferentes compartimentos y con el medio extracelular



Rojo: anterógrado
Azul: retrógrado
Verde: endocitosis

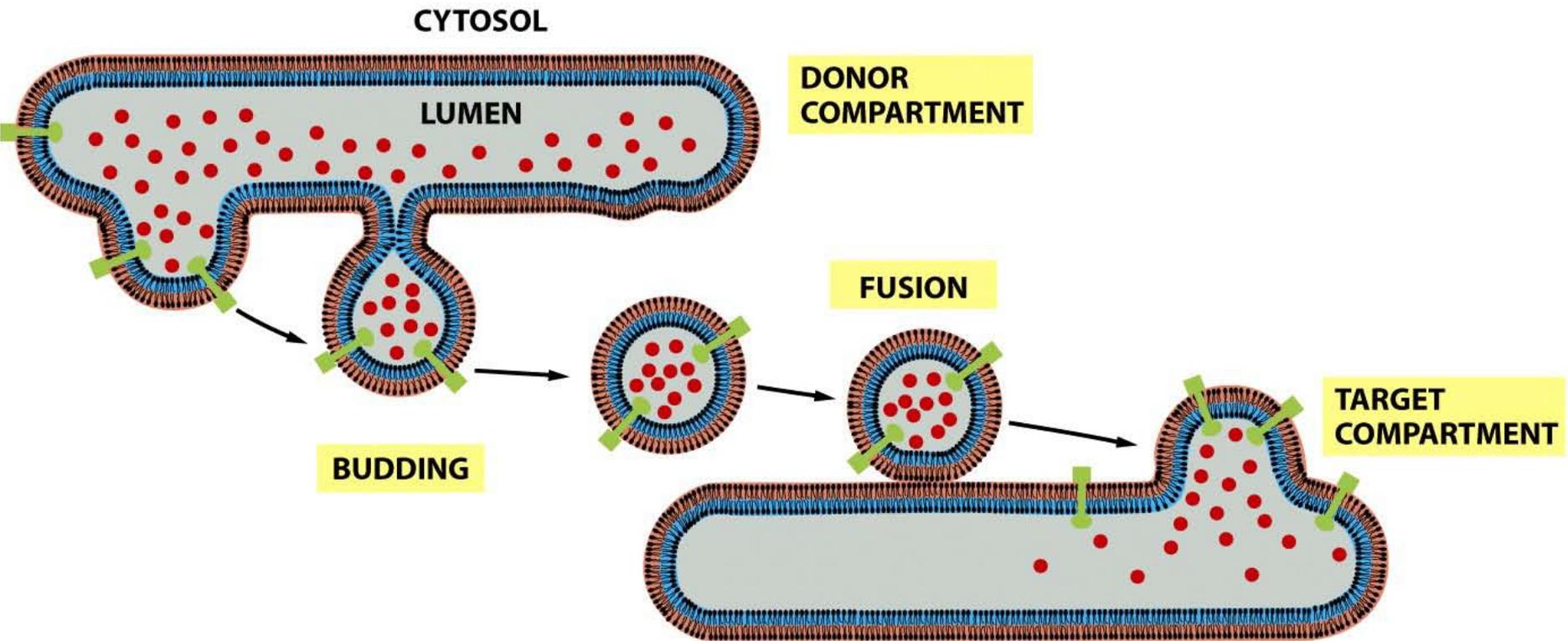
EXO Y ENDO



La ruta secretoria (EXOCITOSIS) se inicia en el **retículo endoplásmico**, pasa por el **aparato de Golgi** y termina en la **membrana celular**, con desvíos hacia **endosomas y lisosomas**

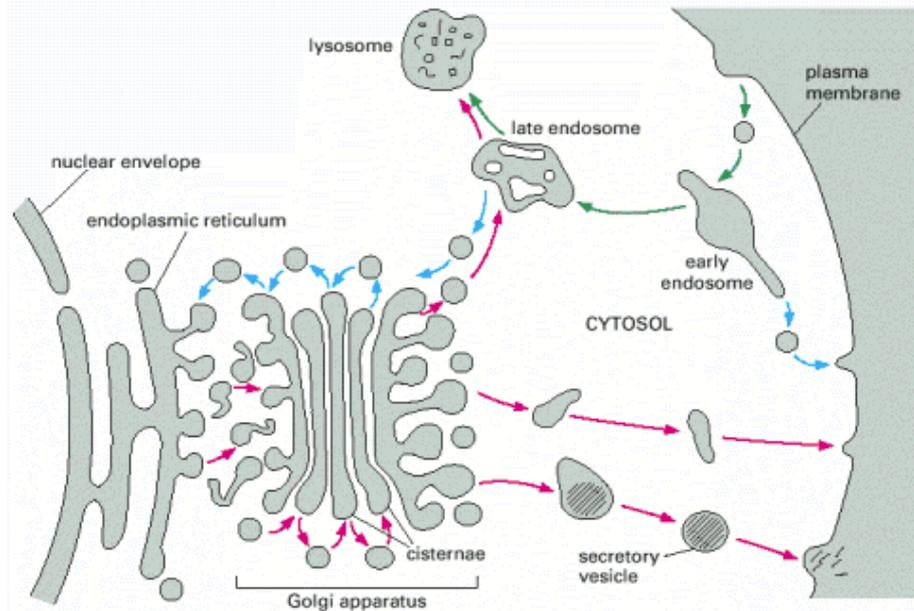
La ruta ENDOCÍTICA se inicia en la **membrana plasmática** y termina en **lisosomas**, con rutas alternativas al **aparato de Golgi** y de **reciclaje a la membrana plasmática**

El tráfico Secretorio es a través de Vesículas



Vesículas que llevan un cargo determinado geman del compartimanto dador y se fusionan con el compartimento aceptor

Selectividad, la palabra clave...



Las vesículas de transporte deben ser muy **selectivas**: deben seleccionar tanto su **cargo** como el **compartimiento blanco**.

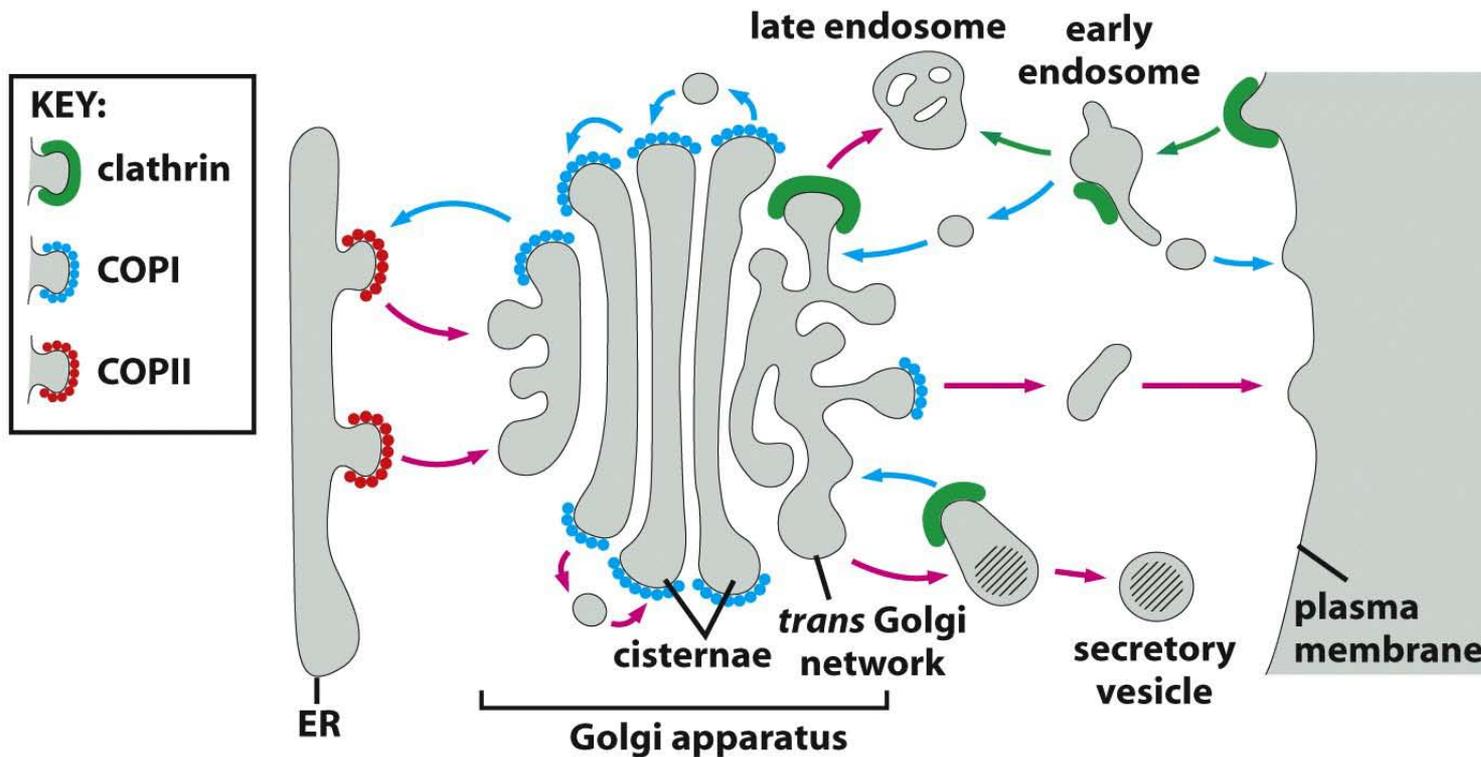
Por ejemplo, las vesículas destinadas a lisosomas deben llevar solo enzimas y proteínas lisosomales y deben fusionarse solo con lisosomas. Las enzimas lisosomales se seleccionan porque tienen la señal topogénica manosa-6P que es reconocida por el receptor de manosa 6P (M6P-R), el que tiene en su segmento citosólico señales de destinación al lisosomas.

Flujo de membranas: **SORTING Y TARGETING**

Se define el proceso de ***selección o sorting*** como el empacamiento de determinado tipo de proteínas en una vesícula con el fin de dirigirlo a un compartimiento blanco. Por ejemplo, proteínas del RE se seleccionarán para ser recuperadas desde el Golgi-cis; proteínas destinadas al Golgi se seleccionan en vesículas que irán al Golgi; proteínas lisosomales se seleccionan en vesículas que van desde la red trans-Golgi a lisosomas. **El sorting ocurre en el organelo de origen.**

La ***destinación o targeting*** se define como el proceso por el cual una vesícula con un cargo determinado reconoce su compartimiento blanco. Esto ocurre por **movimiento** de las vesículas, **generalmente a través de microtúbulos**, desde el compartimento dador al compartimento aceptor, y un mecanismo de reconocimiento del compartimento aceptor. **El targeting ocurre en el compartimento blanco.**

Proteínas de cubierta: COP I, COP II y clatrina



Las proteínas de cubierta son importantes en la selección del cargo de una vesícula:

COP I-ARF1: tráfico Golgi → RE

COP II-SAR1: tráfico RE → Golgi

Clatrina: membrana plasmática → endosomas; red transGolgi → endosomas tardíos

Señales de selección al RE

Determinadas secuencias aminoacídicas en el C-terminal son señal de retención o recuperación de proteínas del RE.

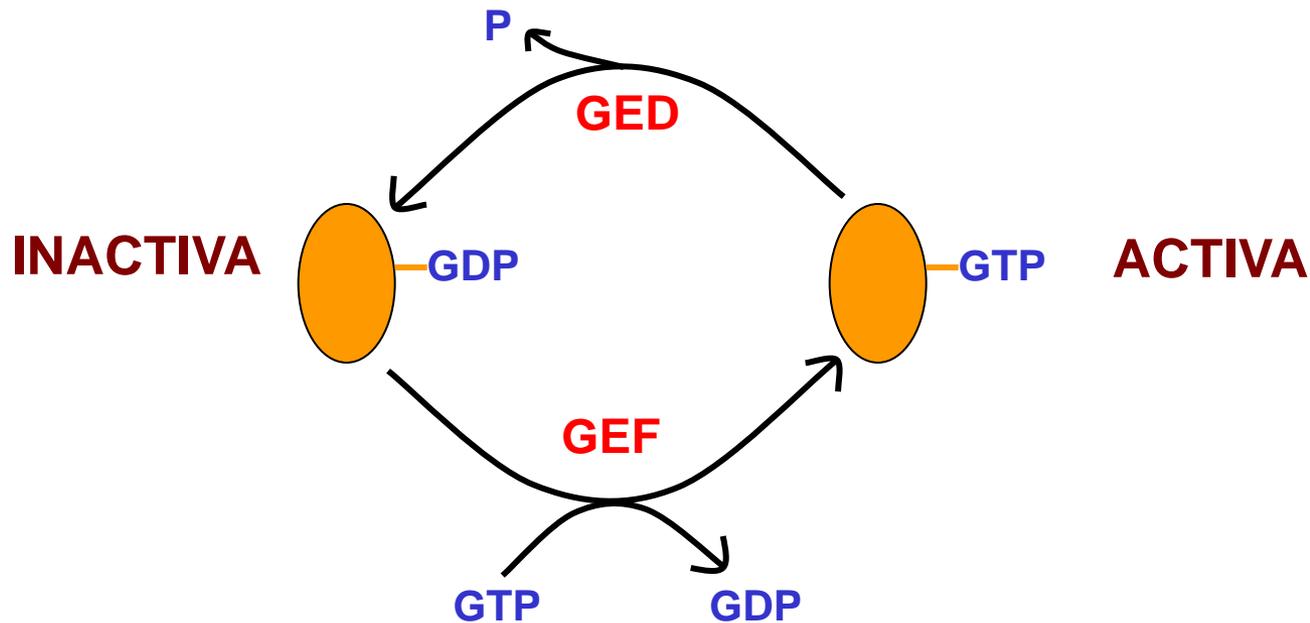
La señal de recuperación más conocida es dos lisinas seguidas por 2 aminoácidos cualquiera (**KKXX**)

Proteínas con la secuencia **KDEL** en el **carboxilo terminal** (Lis-Asp-Glu-Leu) interactúan con el receptor para KDEL (**KDEL-R**) y vuelven al RE en vesículas que contienen COP-I y ARF.

KDEL-R recicla entre RE y Golgi. El receptor, y proteínas que se unen a este, son también utilizadas para **retener proteínas en el RE** en donde KDEL-R es abundante.

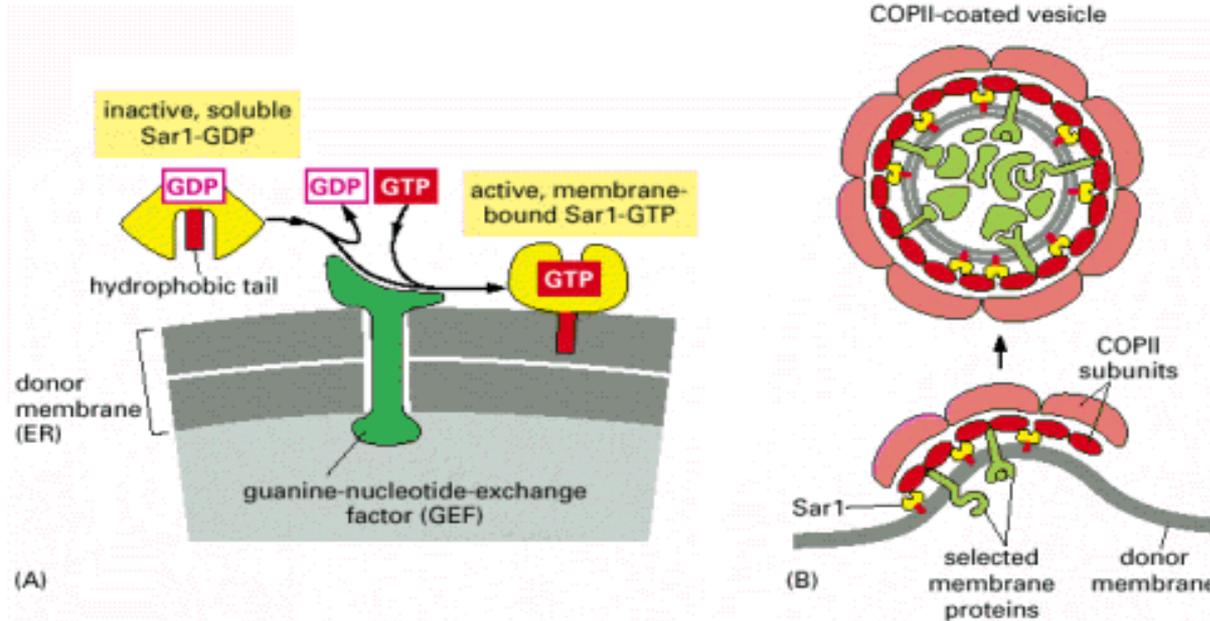
PROTEÍNAS G: proteínas que unen guanidín nucleótidos (GTP, GDP)

Las proteínas G existen en dos estados: unidas a GDP o a GTP. Las proteínas G pueden ser triméricas (Gs, Gi, Gq) o monoméricas (ras, raf, rab, gsp, arf, sar, etc)



GEF: guanine nucleotide exchange factor
GED: GTPase effector domain

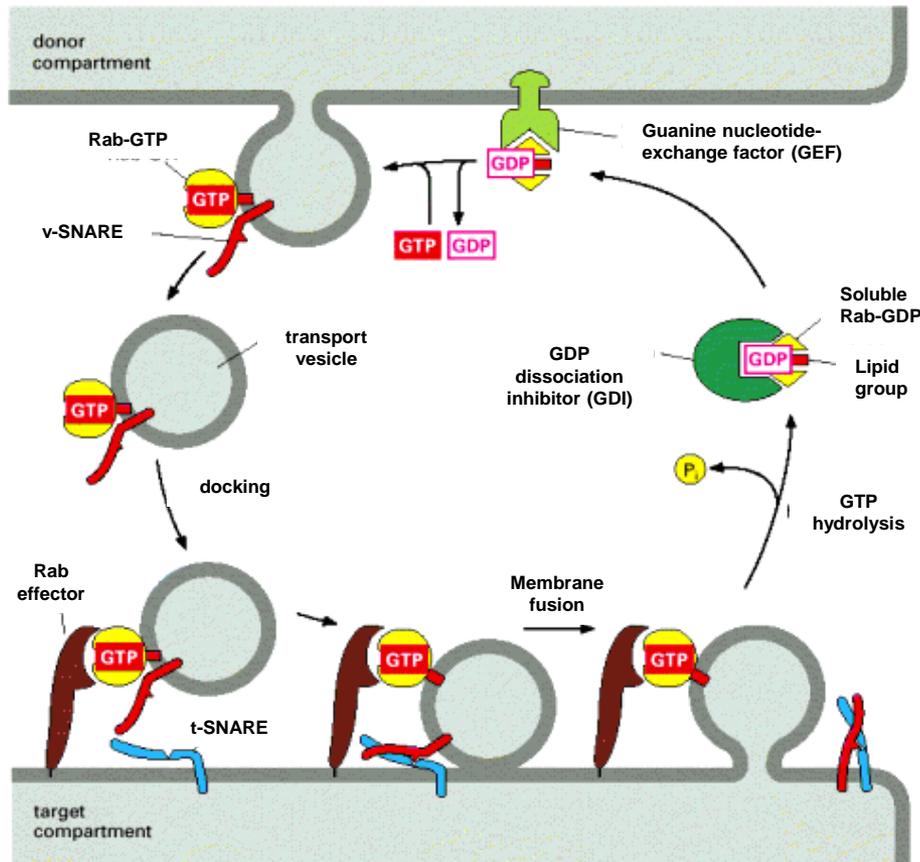
Sorting: formación de vesículas COPII



Las vesículas **COP II** contienen la proteína G **Sar1**. Cuando se va a formar una vesícula en el RE, un GEF de la membrana del RE une Sar1 inactivo (Sar1-GDP) y cataliza el intercambio por GTP lo que causa un cambio conformacional exponiendo una cola hidrofóbica. En el estado GTP, **Sar1** se une a la membrana del RE y **recluta las proteínas de la cubierta COPII**.

Las vesículas **COP I** reclutan una proteína G llamada **ARF1** que tiene unido covalentemente miristato (ac. graso saturado de 14 carbonos) que funciona como cola hidrofóbica. **ARF1** se une a la membrana del Golgi cis y **recluta las proteínas de la cubierta COP1**.

Ciclo de las proteínas Rab

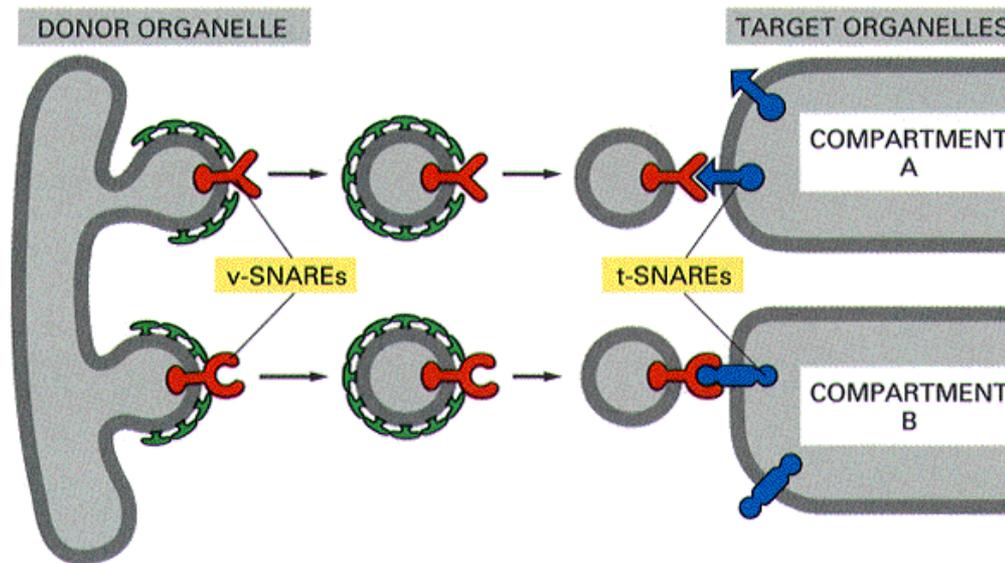


1. **Rab-GDP se une a un GEF** específico en el compartimento donador.
2. **GEF induce el intercambio de GDP por GTP** activando Rab (Rab-GTP). Al activarse, Rab evidencia un grupo lipídico que la ancla al compartimento donador.
3. **RAB en conjunto con un v-SNARE** específico se seleccionan en la **vesícula saliente**.
4. **V-SNARE reconoce** el compartimento blanco al **interactuar con un t-SNARE específico**. A su vez, Rab-GTP se une a un efector específico para este Rab.
5. La **unión de los SNARES** (en conjunto con otras proteínas) induce la **fusión de la vesícula**.
6. La fusión **desencadena la actividad GTPasa de Rab** y Rab-GDP **se disocia** del compartimento blanco.
7. La capacidad de **intercambio** de Rab-GDP es **bloqueada** por un inhibidor de la asociación hasta alcanzar el **compartimento donador con actividad GEF**

TARGETING: SNARES

Debido a la abundancia de los sistemas membranosos, una vesícula puede colisionar con varias membranas antes de encontrar la membrana blanco. Por lo tanto, las vesículas deben ser altamente selectivas.

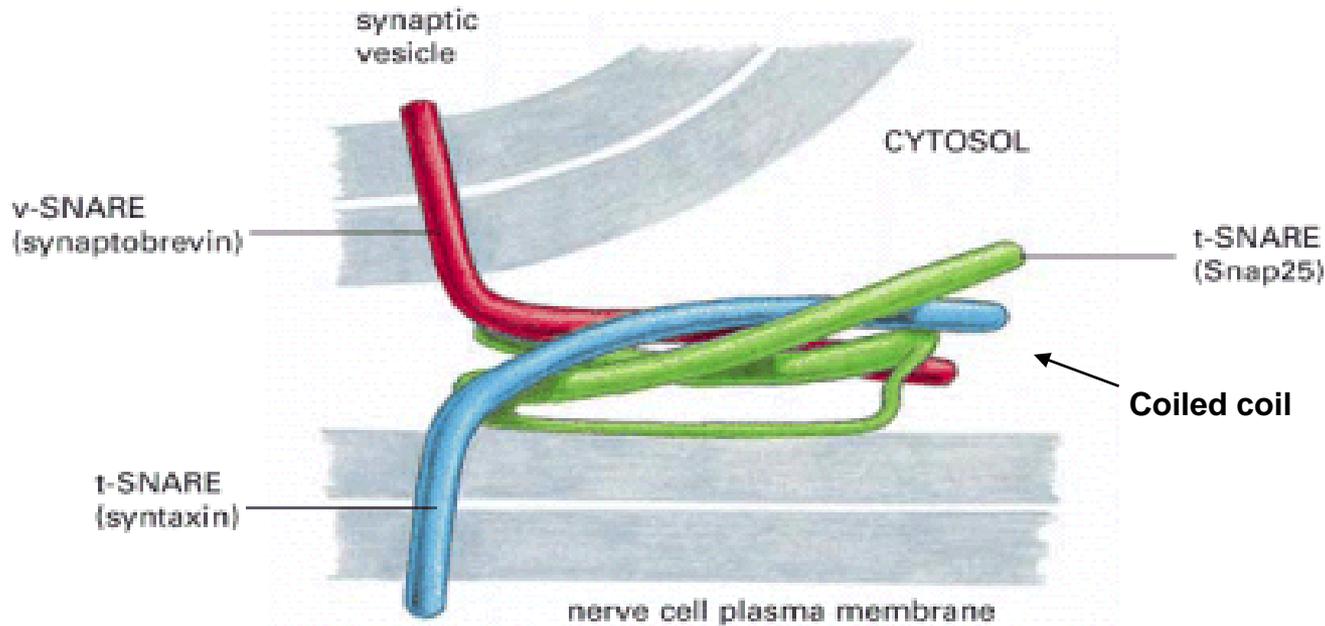
La **especificidad del targeting** se asegura por proteínas de la vesícula que son reconocidas por receptores en el compartimiento blanco: **los SNARES**



v-SNARE: en la vesícula

t-SNAREs: en el comp. blanco

Acoplamiento de SNAREs



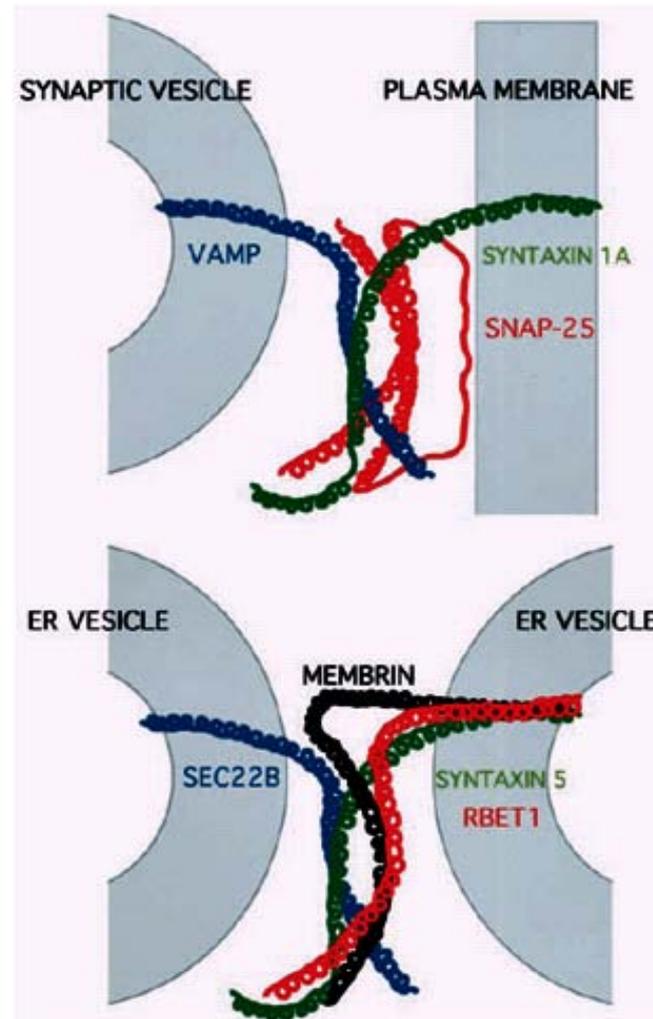
Tres SNAREs son responsables del docking de las vesículas sinápticas a la membrana plasmática. El v-SNARE *synaptobrevin*, y el t-SNARE *syntaxin* son proteínas transmembrana que contribuyen una α -hélice cada uno al complejo de SNAREs. El t-SNARE *Snap25* es una proteína periférica de membrana que contribuye dos α -hélices al complejo. Los complejos de SNARE siempre consisten de un haz de cuatro α -hélices (coiled coil), tres contribuidas por los t-SNARE y una por el v-SNARE.

Una vez establecida la unión, la vesícula se fusiona y descarga su contenido.

Similitud entre SNAREs vesícula sináptica/membrana plasmática y RE/Golgi

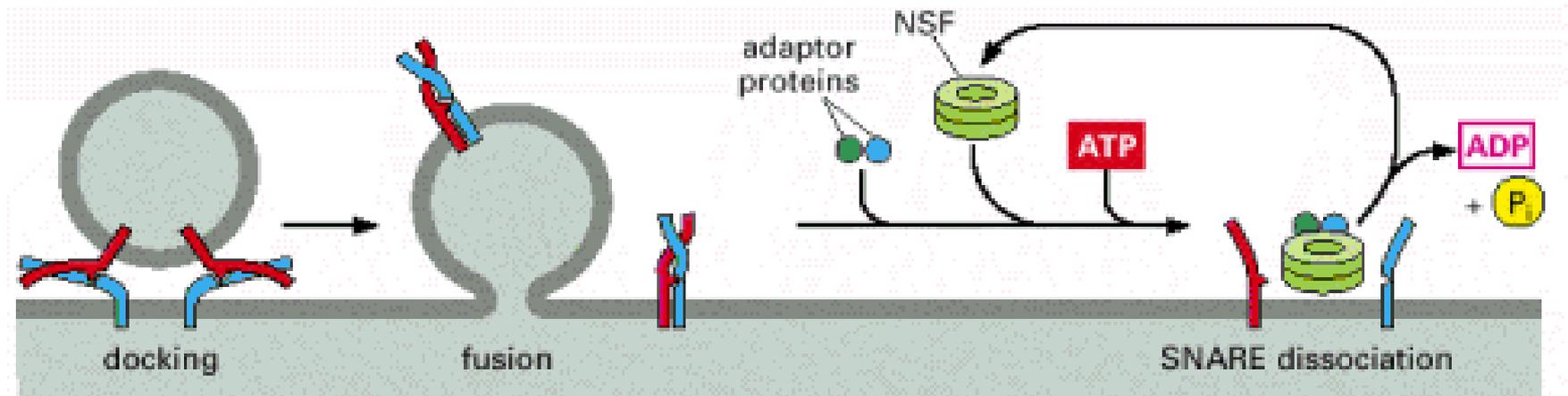
Note that both complexes potentially involve three T-SNARE helices on one membrane providing a high affinity binding site for one opposing V-SNARE helix on the other membrane.

In the case of the ER/Golgi complex, one helix would be contributed by each of the four proteins, whereas in the synapse, SNAP-25 contributes two helices. (Xu et al., J. Biol. Chem. 275: 39631–39639, 2000).



Xu et al., J. Biol. Chem. 275: 39631–39639, 2000

Disociación de los acoplamientos de SNAREs por NSF después de completar la fusión



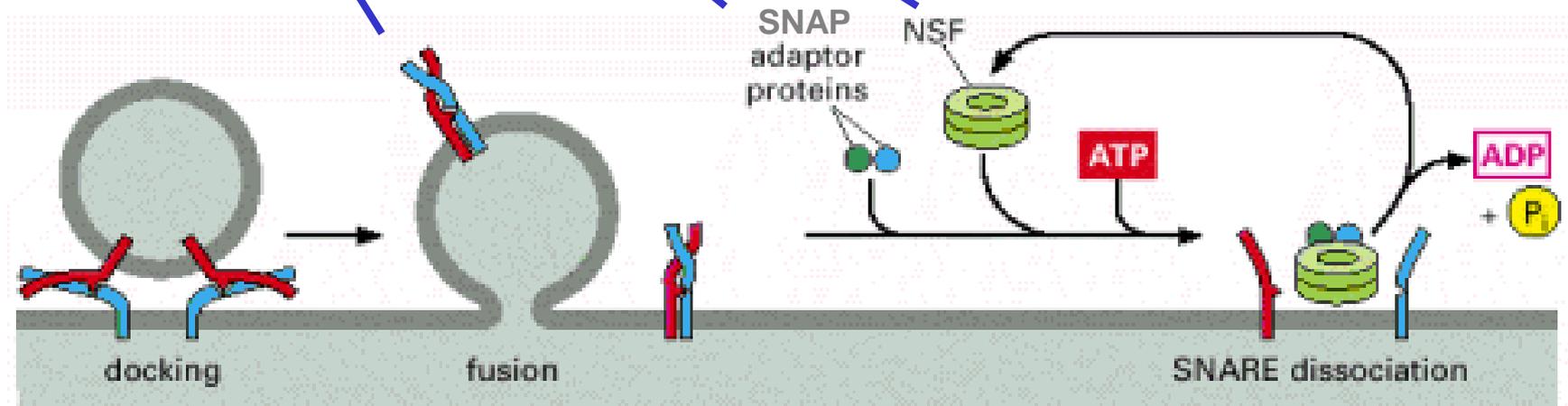
Después de que los SNAREs han mediado la fusión de la vesícula en la membrana blanco, una proteína llamada NSF cataliza el desensamblaje de los SNAREs. NSF es una chaperona citosólica con actividad ATPasa. La energía de la hidrólisis del ATP se usa para separar la interacción coiled-coil entre los SNAREs.

Nomezclatura:

SNARE: SNAP receptor

SNAP: soluble NSF Attachment Protein

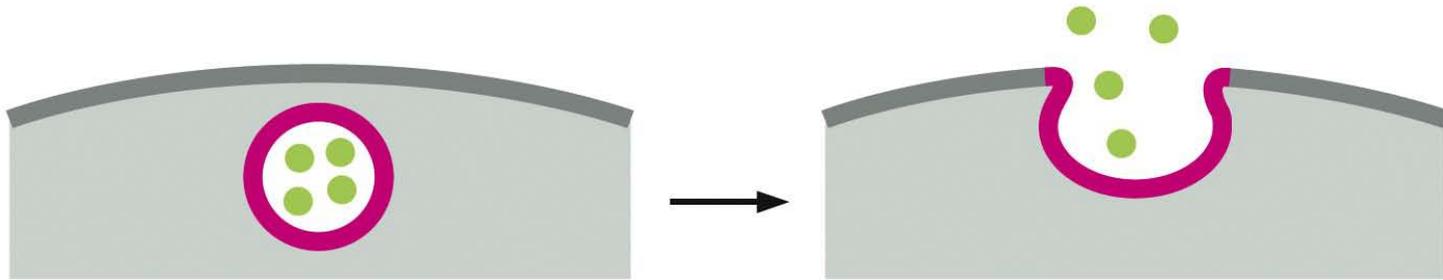
NSF: N-ethylmaleimide Sensitive Factor



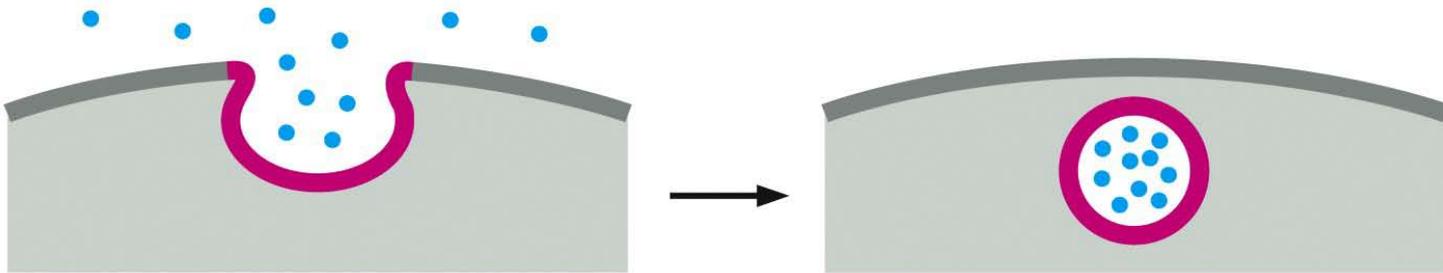
Flujo de Membranas

Exocitosis: un mecanismo sintético-secretor que permite que macromoléculas sintetizadas por la célula sean *destinadas* al medio extracelular.

Endocitosis: proceso celular de incorporación de macromoléculas desde el medio extracelular

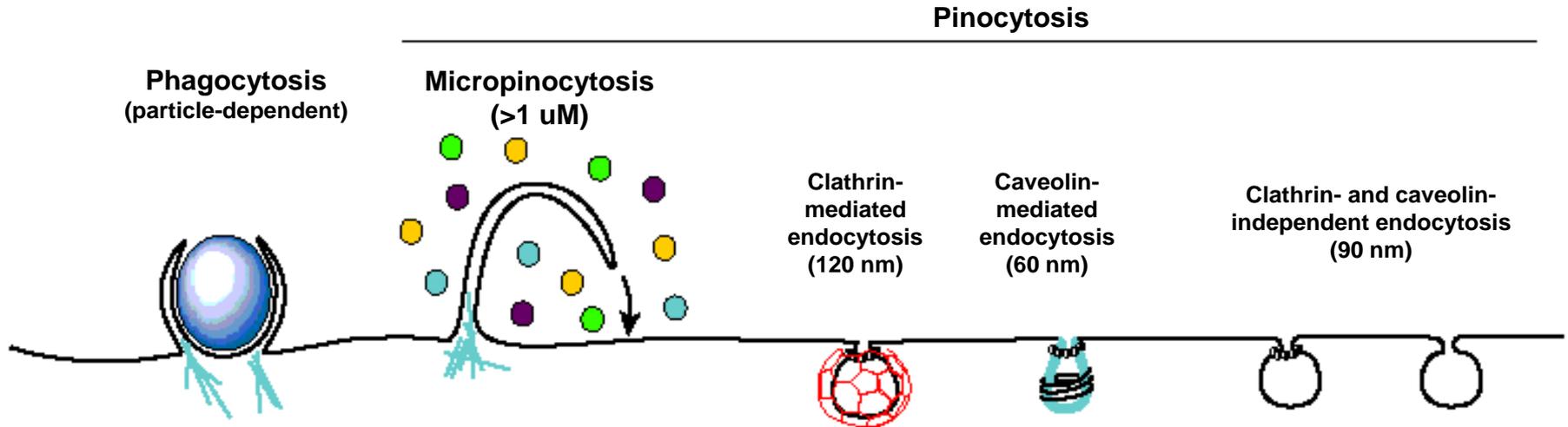


(A) **exocytosis**



(B) **endocytosis**

RUTAS ENDOCÍTIICAS

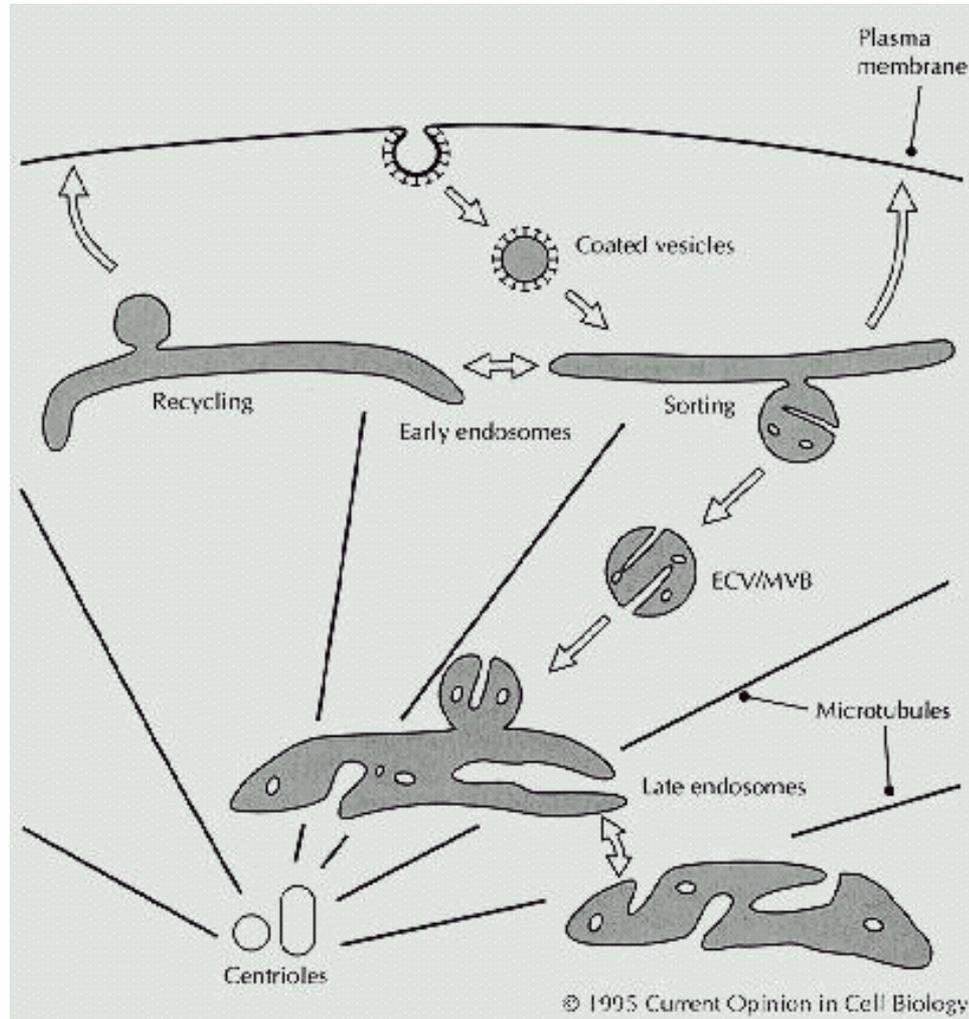


Multiples rutas de entrada a la célula

Las rutas endocíticas difieren con respecto a:

- ❖ cargo (ligandos, receptores, lípidos)
- ❖ Tamaño de las vesículas
- ❖ Mecanismo de formación de vesículas

ENDOCITOSIS MEDIADA POR CLATRINA



SISTEMA ENDOSOMAL

	Endosoma de sorting	Endosoma de reciclaje	MVBs	Endosomas tardíos
Topología	Citopl. periférico	Perinuclear	A través del citoplasma	Perinuclear
Morfología	Túbulo-vesicular	Vesicular	Esférica con memb.internas	Compleja, con membranas internas
pH luminal	6.2	6.5	5.5	5.5
Marcadores	TfR (y receptores que reciclan)	TfR (y receptores que reciclan)	---	M6PR; proteínas lisosomales
Proteínas G, anexinas	Rab4; Rab5; ARF6; EEA1; anexina II	Rab4; Rab11; anexina VII	Anexina I;	Rab7; Rab9; anexina I;
v-SNARES	Celubrevin	Celuvrevin		

CLASES DE EMR

Clase I

LDL²

α_2 -macroglobulina

Cobalamina

Insulina

Manosa-6-fosfato

Asialoglicoproteína

Fibronectina

Interferón

Provee a la célula de colesterol

Remueve agentes nocivos

Proporciona vitamina B12

Internaliza insulina

Remueve enzimas lisosomales

Remueve glicoproteínas

Provee fibronectina

Actividad antiviral

Clase II

Transferrina

MHC clase I en linfocitos T

MHC clase II en macrófagos

Provee a la célula de hierro

Reacción inmune

Reacción inmune

Clase III

EGF²

NGF²

Glucagón

Insulina

Hormona del Crecimiento

TSH

CG

Interleucinas

Transducción de señales, mitosis

Transducción de señales, mitosis

Cambios en la actividad metabólica

Cambios en la actividad metabólica

Transducción de señales, mitosis

Síntesis y secreción de proteínas

Producción hormonal

Comunicación intercelular

Clase IV

IgA

IgG

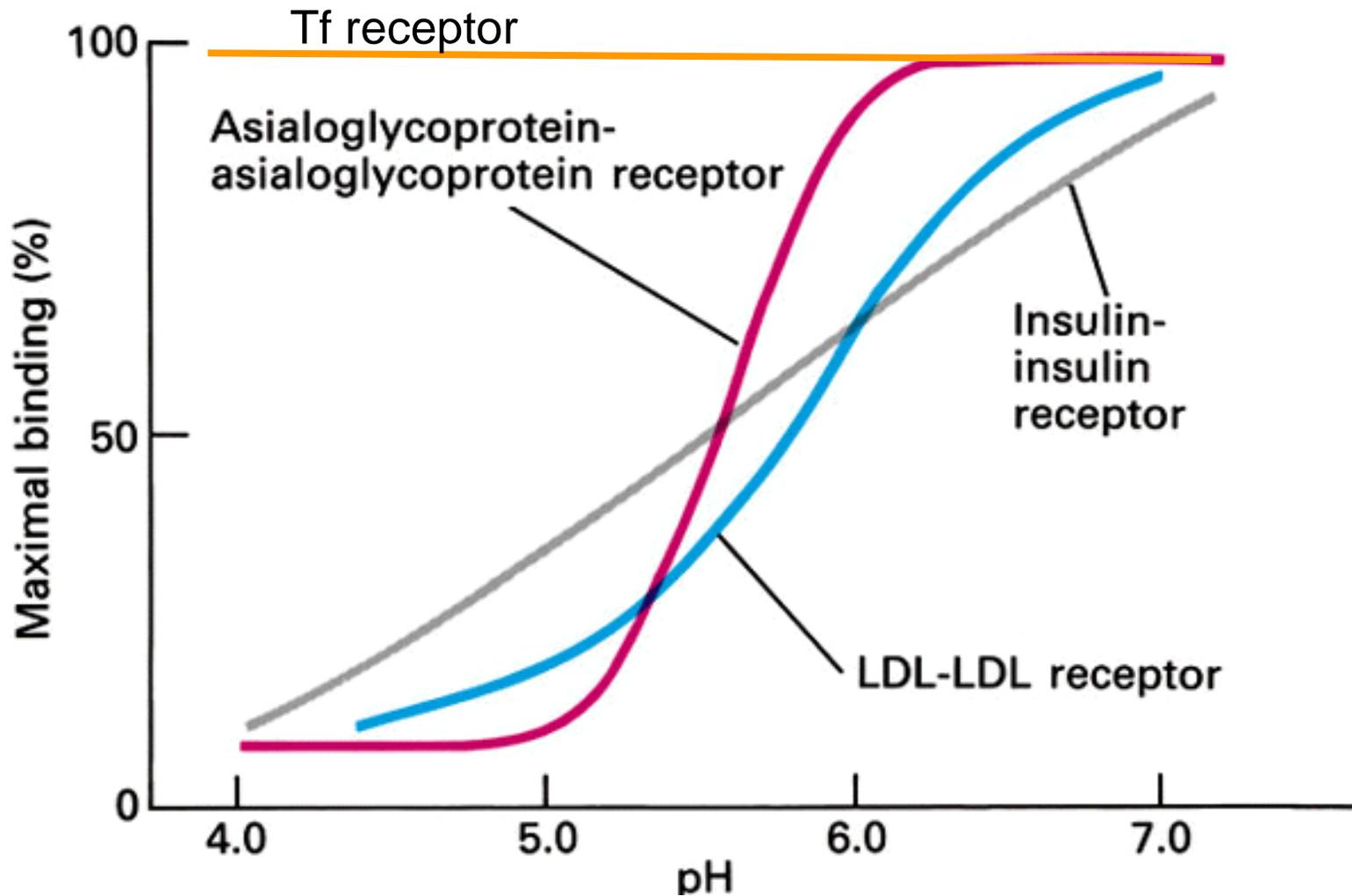
Fibronectina

Transcitosis de IgA en intestino

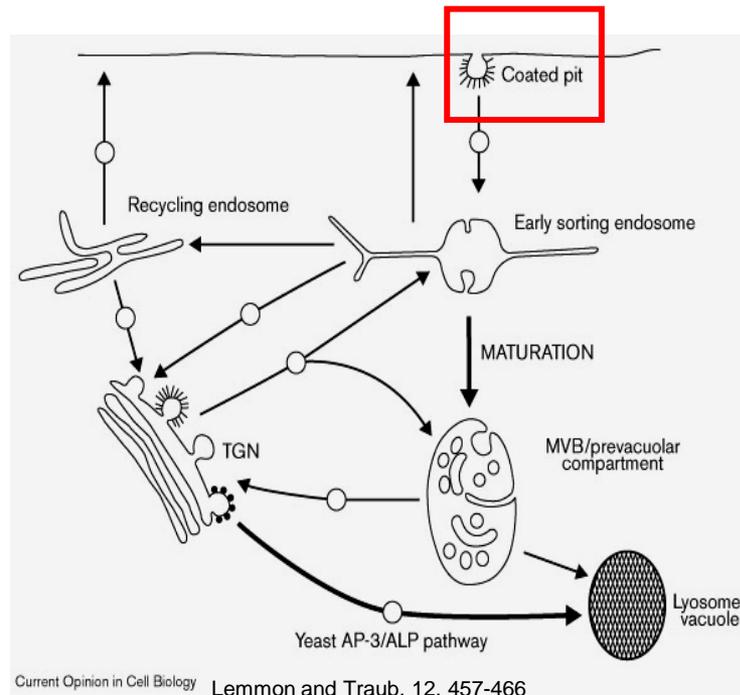
Transcitosis de IgG en hígado, placenta

Transcitosis de fibronectina

Estabilidad al pH de complejos ligando-receptor



Endocitosis mediada por clatrina



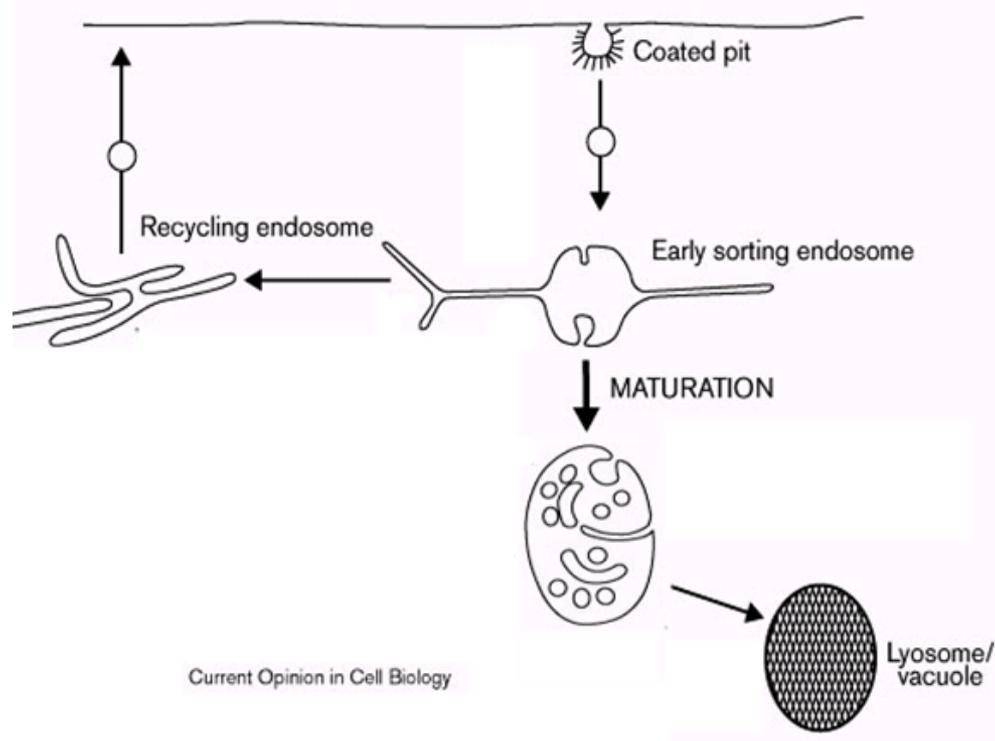
Ruta degradativa:

1. Membrana plasmática
2. Endosoma temprano (sorting)
3. Endosoma tardío
4. Lisosoma

Ruta de reciclaje:

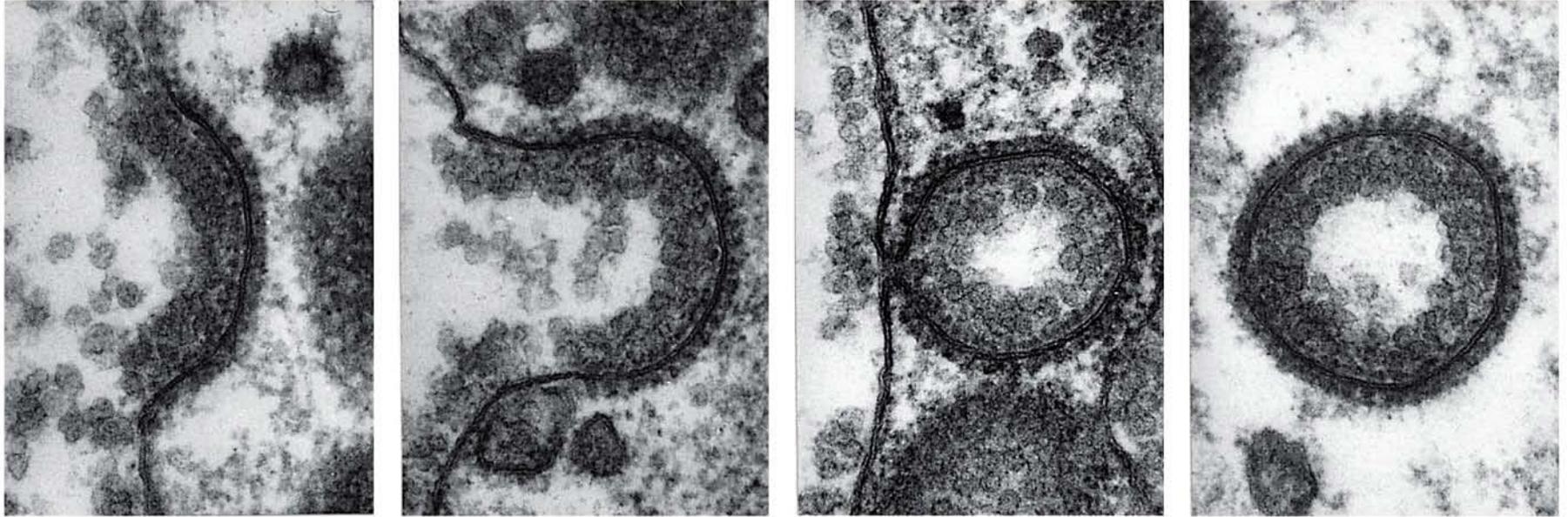
1. Membrana plasmática
2. Endosoma temprano (sorting)
3. Endosoma de reciclaje
4. Membrana plasmática

El endosoma temprano



El destino de ligandos y receptores hacia la **ruta degradativa** o la **ruta de reciclaje** se decide en el **endosoma temprano o de sorting**. Receptores que **no tienen señales específicas** en sus segmentos citosólicos siguen la **ruta de reciclaje**. La presencia de **señales específicas**, como **fosforilación o ubiquitinación**, inducen la selección de estas proteínas hacia la **ruta degradativa**.

Formación de una vesícula endocítica cubierta por clatrina



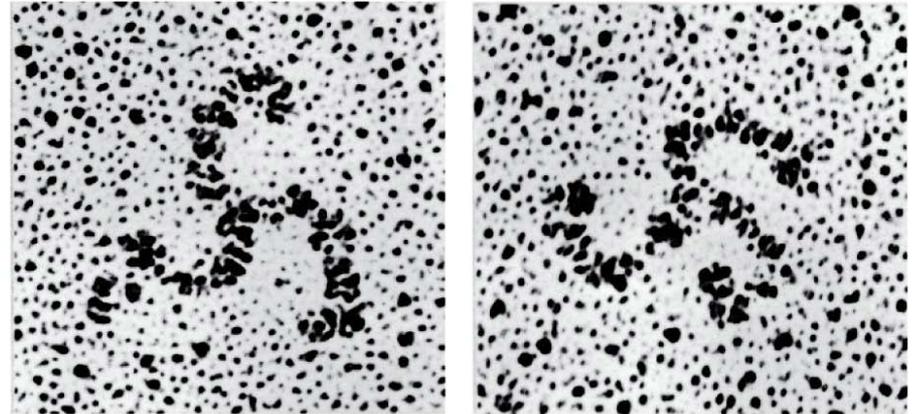
0.1 μm

Los pozos cubiertos por clatrina atrapan proteínas de la membrana plasmática que tienen en su segmento citosólico **señales topogénicas** de endocitosis.

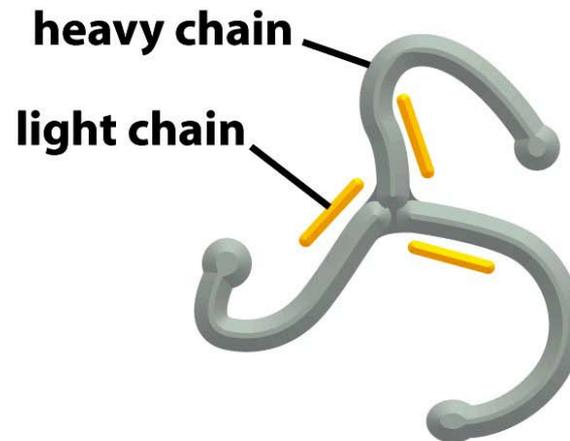
Trisquelions: unidad estructural de la cubierta de clatrina

Los trisquelions son la unidad estructural de la capa de clatrina. Están formados por tres sub-unidades pesadas y por 3 sub-unidades livianas de clatrina.

Los trisquelions se auto-ensamblan generando una vesícula endocítica cubierta por clatrina



(A)

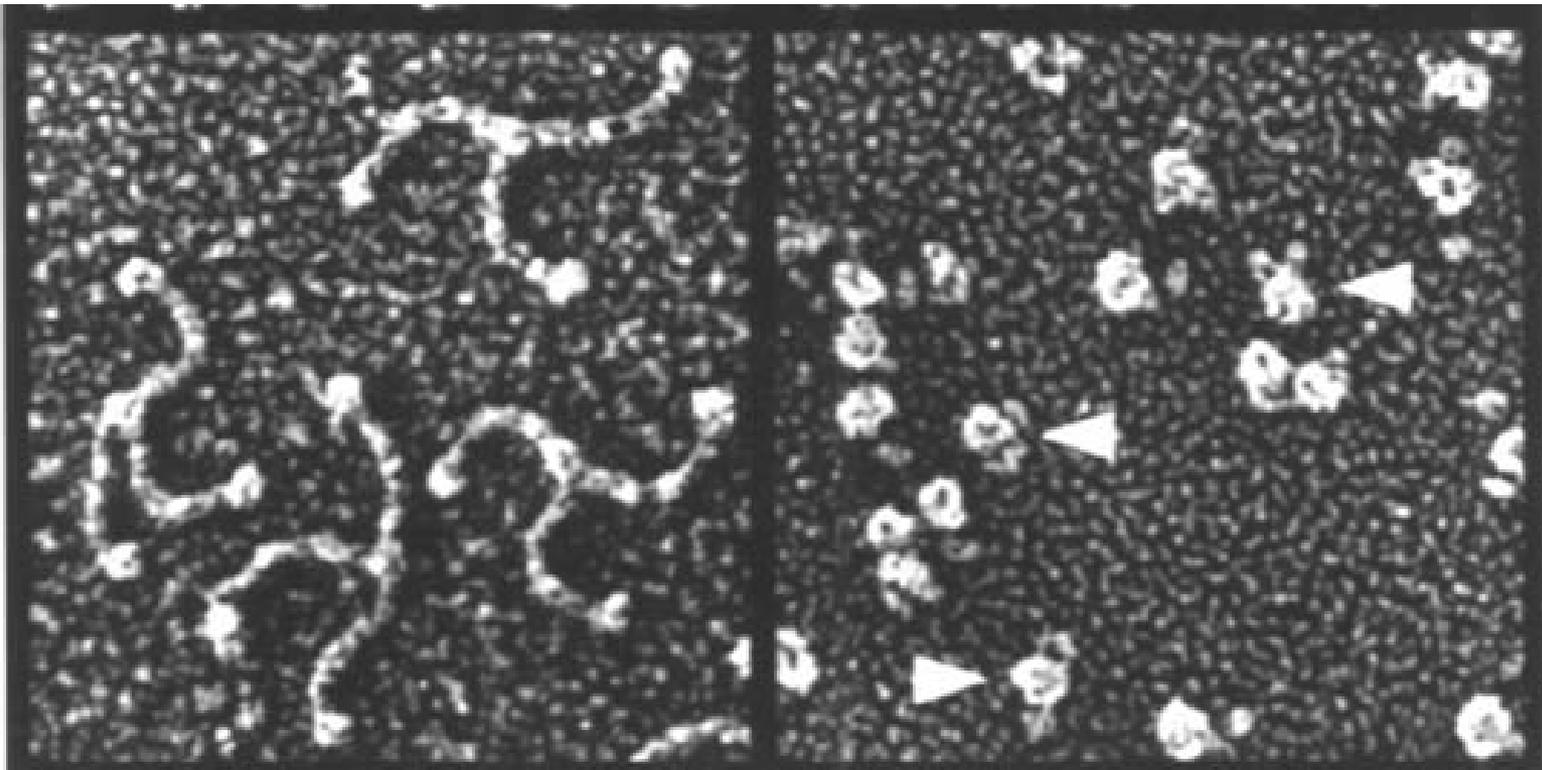


(B)

Las Adaptinas (péptidos de ensamblaje) son tenaces acompañantes de los trisquelions

Clatrina

Adaptinas

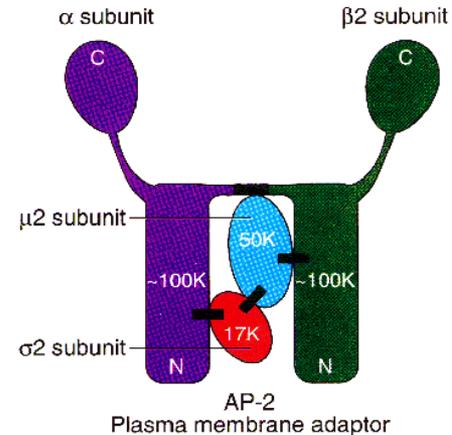


Péptidos de ensamblaje

Las adaptinas o péptido de ensamblaje son oligómeros formados por 2 cadenas pesadas (α , β , γ) que interactúan con lípidos de la membrana (PIP2) e inducen la formación de la cubierta de clatrina

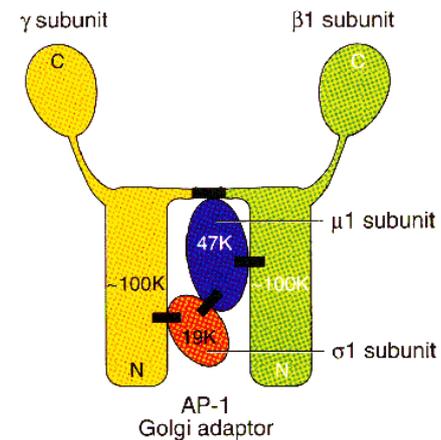
AP-2

Péptido que forma parte de las vesículas cubiertas por clatrina que se originan en la membrana plasmática que tienen como destino el endosoma temprano

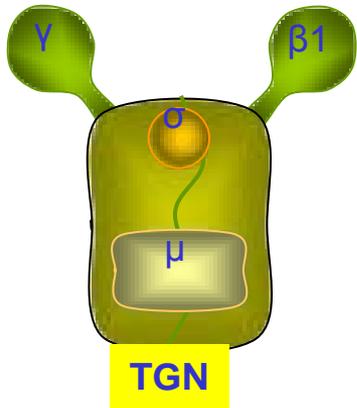


AP-1

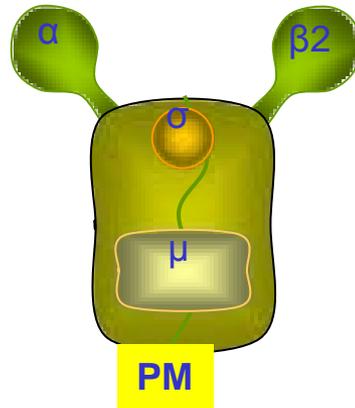
Péptido que forma parte de las vesículas cubiertas por clatrina que se originan en la red trans Golgi y que tienen como destino el endosoma tardío y los lisosomas



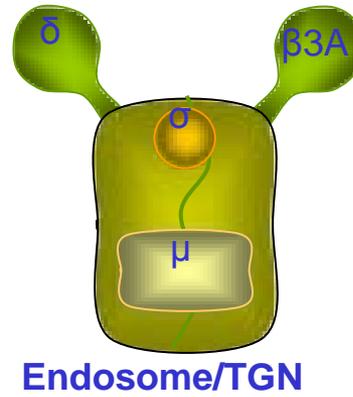
AP-1A



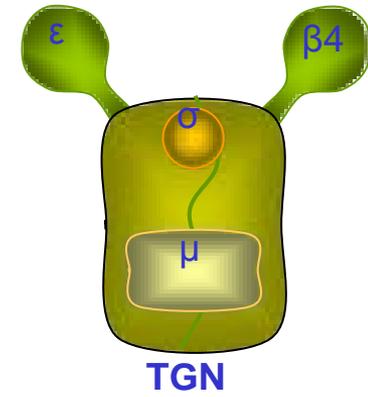
AP-2



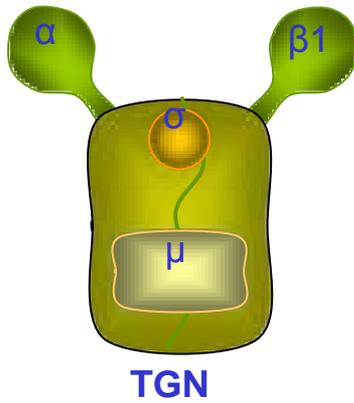
AP-3A



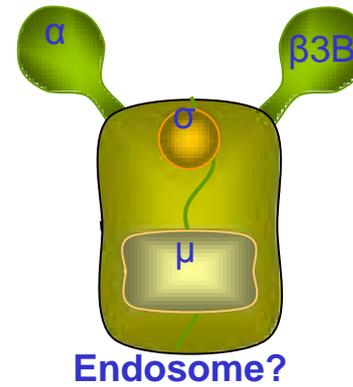
AP-4



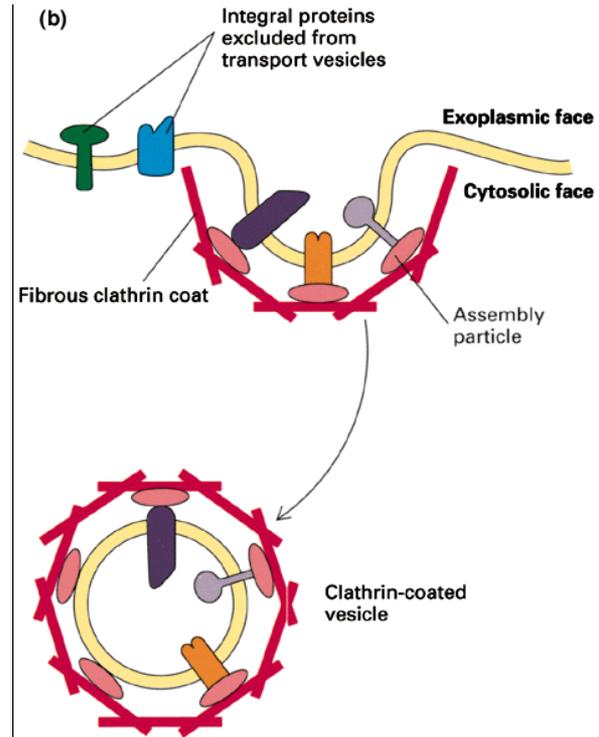
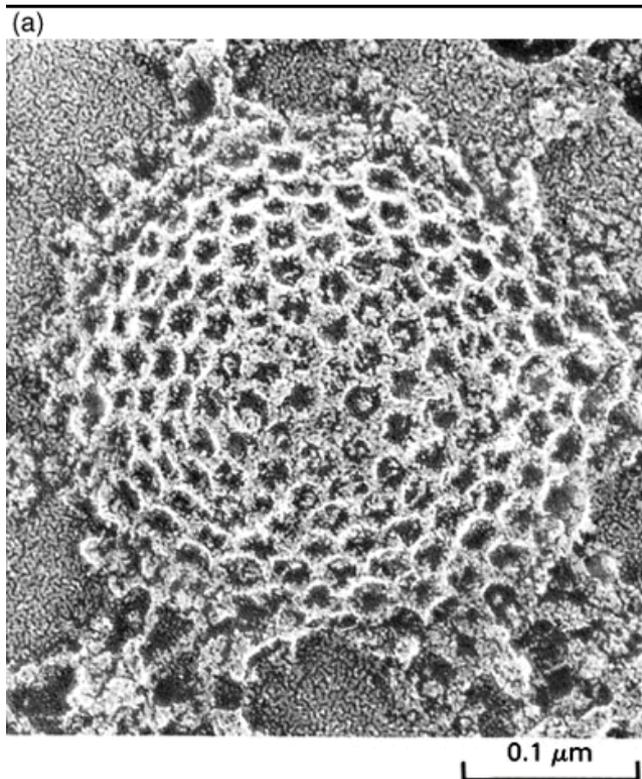
AP-1B
solo epitelios

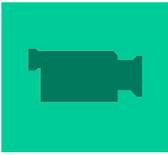


AP-3B

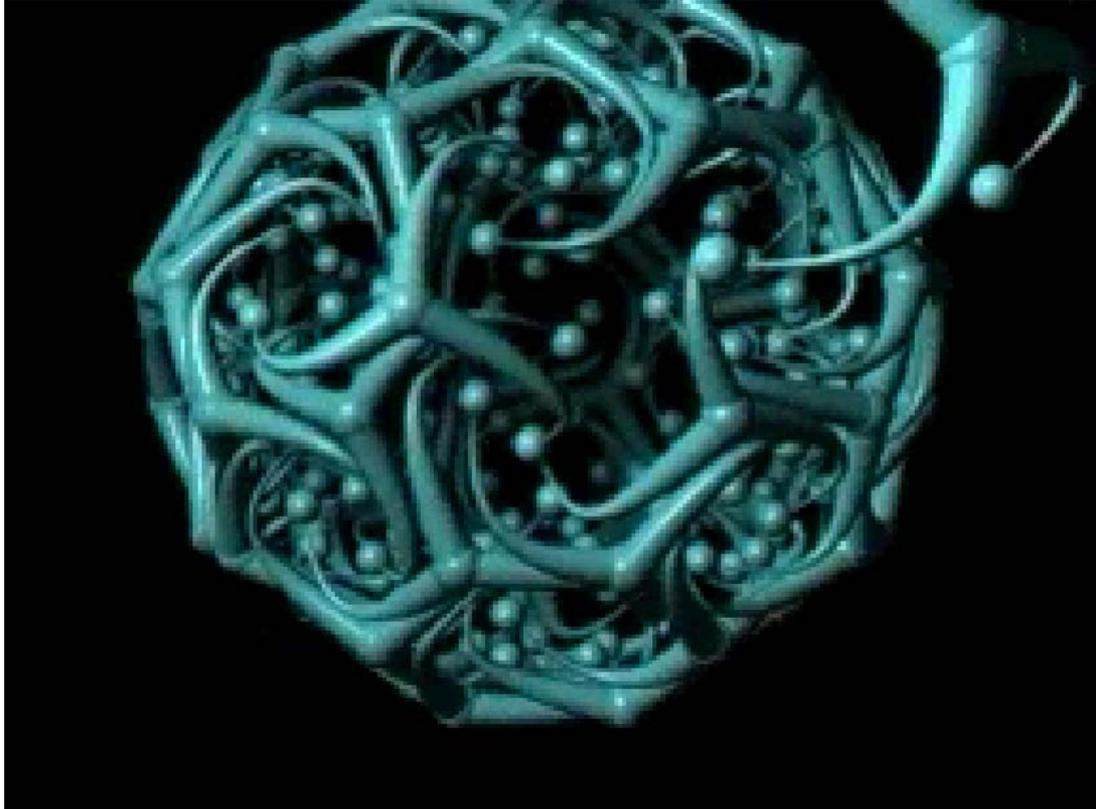


FORMACION DE VESICULAS CON CLATRINA





Ensamblaje de clatrina



SEÑALES DE INTERNALIZACION BASADAS EN TIROSINA:

Las proteínas internalizadas por endocitosis tienen en su segmento citosólico secuencias de internalización que es reconocidas por los péptidos de ensamblaje, anclando a estos receptores en los pozos cubiertos por clatrina

RECEPTOR

SECUENCIA

LDL

NPVY (NPXY)

Manosa

NTLY (NXLY)

Transferrina

YTRF (YXRF)

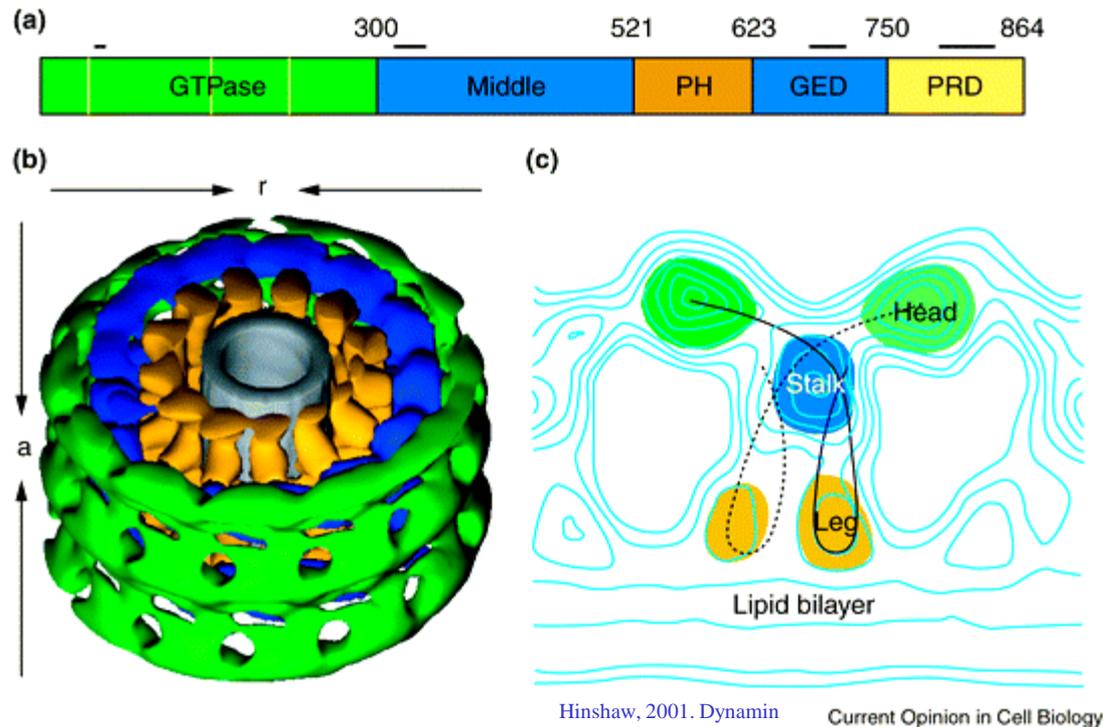
Poli IgG

YSAF (YSXF)

Manosa-6-P

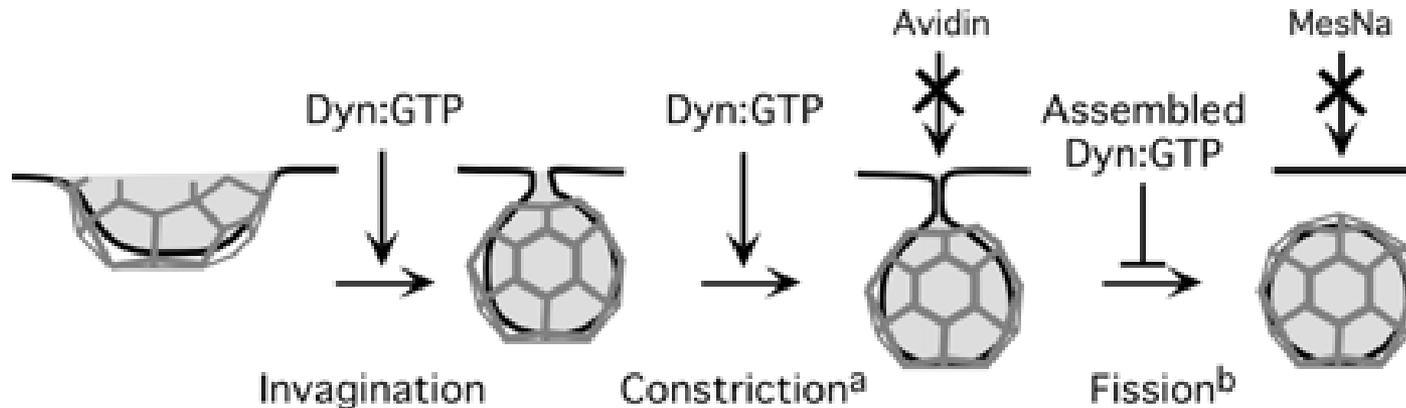
YRGV (YRGX)

Dinamina



Estructura de la dinamina. (a) Diagrama de sus cinco dominios: GTPasa, del medio, homología a plekstrina (PH), el dominio efector GTPasa (GED) y el dominio rico en prolina (PRD). Las líneas negras indican las regiones involucradas en el auto-ensamblaje. (b) y (c) reconstrucción 3D de PRD-dinamina en el estado contraído. (B) mapa en 3D de PRD-dinamina, que muestra tres picos prominentes densidad de color verde (la cabeza), azul (tallo) y oro (pierna). En presencia de GMP-PCP, PRD-dinamina constriñe en la dirección radial (r) y axial (flechas). La constricción del tubo es de 40 nm de diámetro en comparación con 50 nm para el tubo no contraído. En la dirección axial, el tubo se contrae ~ 4 nm. (c) sección a través del mapa en tres dimensiones, la que ilustra las posibles interacciones entre las moléculas de dinamina en el dímero. Se ha propuesto que el dominio GTPasa de dinamina reside en la región de la cabeza, el centro y GED residen en el tallo y el dominio PH reside en la pierna. La región de la pierna inserta en la monocapa exterior de la bicapa lipídica.

DINAMINA



^a Rate limiting step in dyn(wt) and dyn(K694A) cells

^b Rate limiting step in dyn(R725A) cells

Observaciones de apoyo:

- Ubicación de dinamina-1 (neuronal) y dinamina-2 (ubícuota) en pozos cubiertos por clatrina de la membrana plasmática.
- La capacidad de dinamina para autoensamblarse en anillo helicoidal localizado en invaginaciones de pozos cubiertos por clatrina.
- Interacciones in vitro entre dinamina y AP2.
- La capacidad GTPásica de dinamina.
- La necesidad de GTP y el efecto de análogos en la endocitosis mediada por receptor en células perforadas. *Schmid et al. 1998. Current Opinion in Cell Biology 10:504-512.*

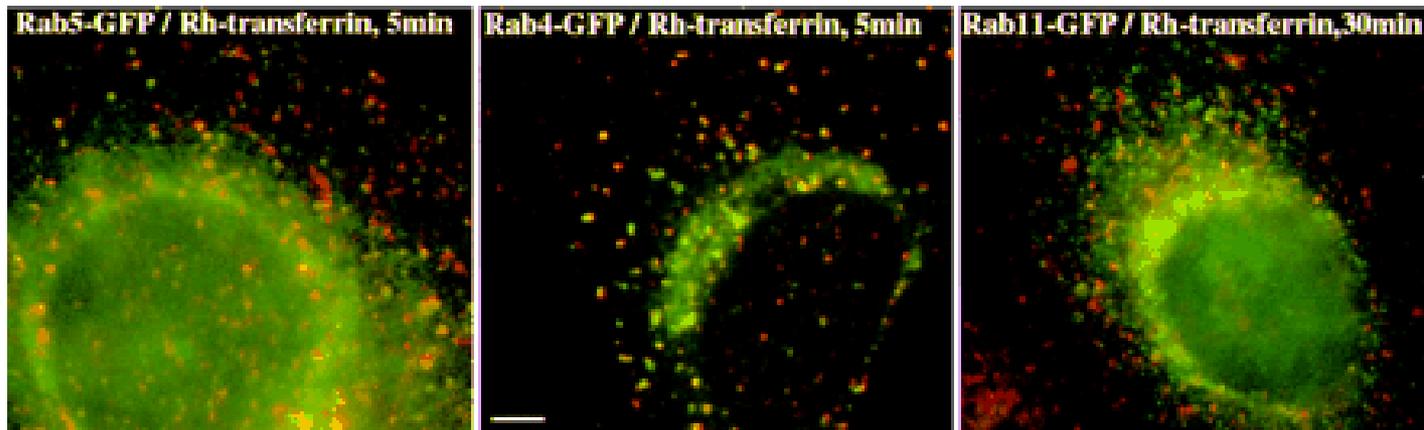
Las proteínas Rab contribuyen a la especificidad del transporte vesicular (targeting). Son GTPasas monoméricas con más de 30 miembros en la familia.

PROTEÍNA	ORGANELO
Rab1	ER and Golgi complex
Rab2	<i>cis</i> Golgi network
Rab3A	synaptic vesicles, secretory granules
Rab4	early endosomes
Rab5A	plasma membrane, clathrin-coated vesicles
Rab5C	early endosomes
Rab6	<i>medial</i> and <i>trans</i> Golgi cisternae
Rab7	late endosomes
Rab8	secretory vesicles (basolateral)
Rab9	late endosomes, <i>trans</i> Golgi network
Rab10	
Rab11	recycling endosome, plasma membrane

Targeting: Rabs en el sistema endosomal

(Sonnichsen et al, JCB 149:901-913, 2000)

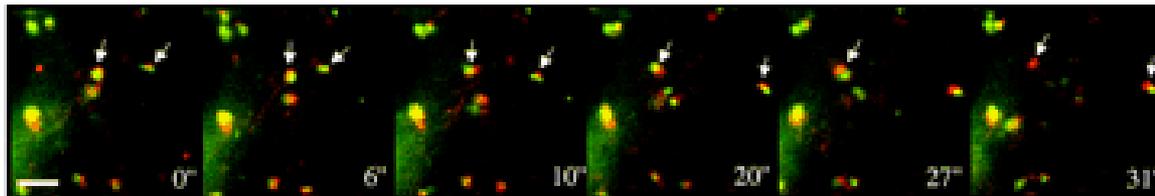
B



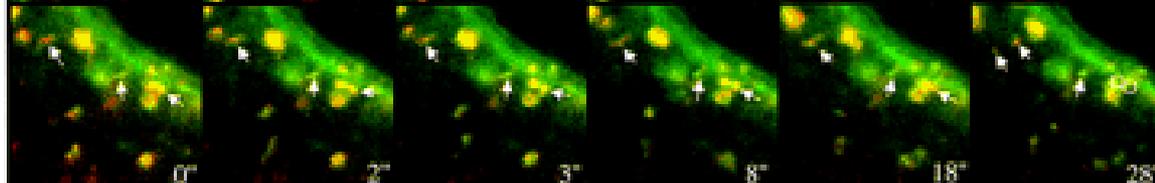
Imágenes representativas de colocalización de GFP-Rabs con Tf a distintos tiempos. Tf (rojo) colocaliza con Rab 5 y Rab 4 a tiempos tempranos y con Rab 11 a tiempos tardíos. Los compartimentos de Rab 4, Rab 5 y Rab 11 son distintos.

C

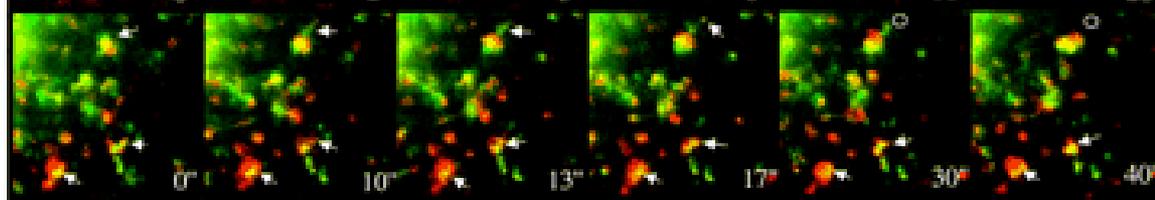
Rab5-GFP
Rh-transferrin
10min uptake



Rab4-GFP
Rh-transferrin
10min uptake
5min chase

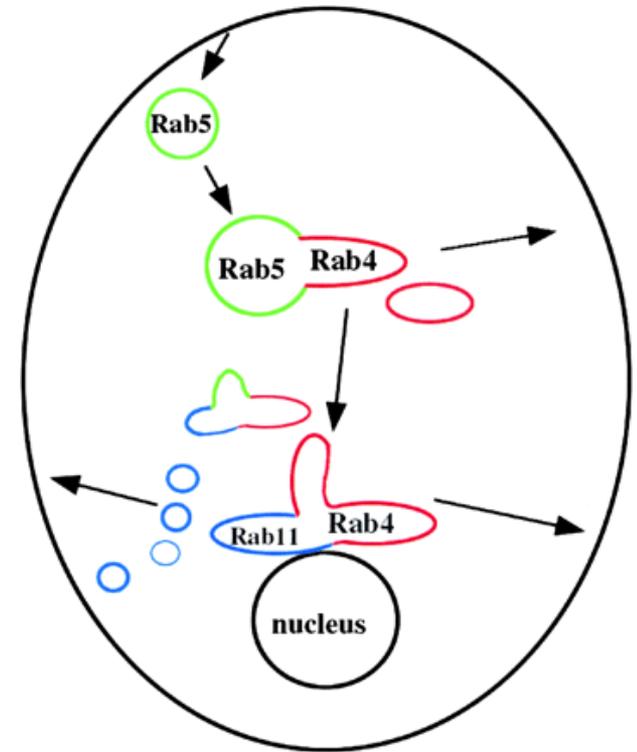
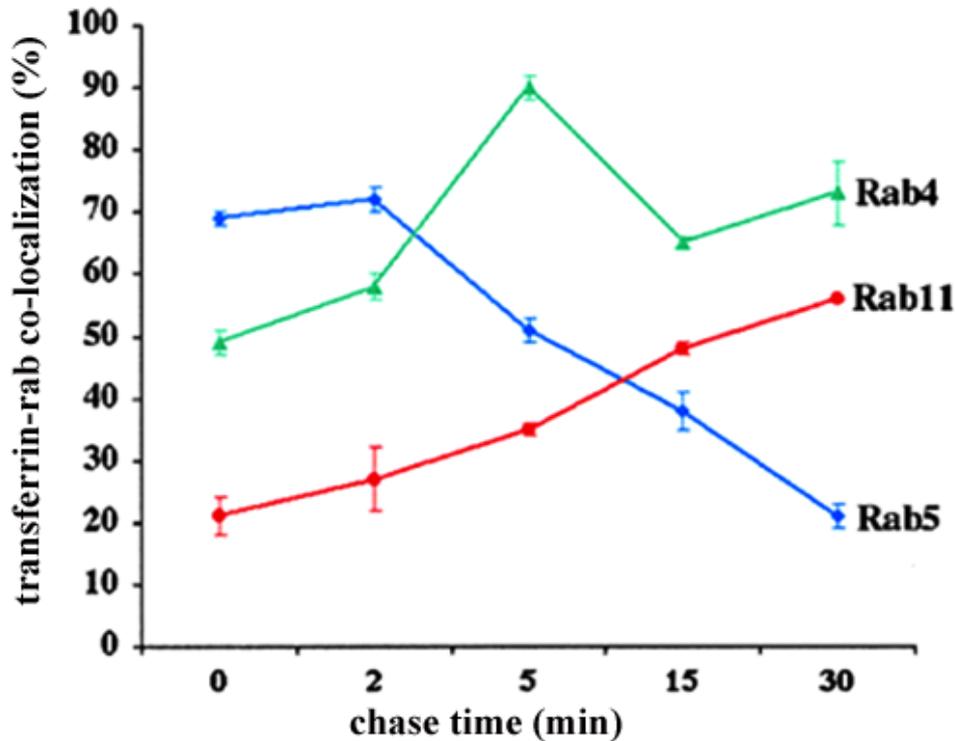


Rab11-GFP
Rh-transferrin
10min uptake
30min chase



Vídeo frames consecutivos de células A431 expresando GFP-Rab 5, Rab 4 o Rab 11 después de la internalización de transferrina marcada con rodamina. Tf colocaliza secuencialmente con Rab 5, Rab 4 y Rab 11.

Rabs de la ruta de reciclaje



Cuantificación de las colocalizaciones. Cinéticas de iniciador (Rab 5), intermediario (Rab 4) y producto final (Rab 11). ((Sonnichsen et al, JCB 149:901.913, 2000)

Los organelos endocíticos son un mosaico de dominios de membrana. La compartimentalización se logra por arreglos funcionales dinámicos entre los dominios. Las combinaciones más abundantes son entre Rab 4 y Rab 5 y entre Rab 4 y Rab 11.

FIN

3. During glycoprotein maturation in most cells, proteins move through organelles in the following order:

A. endoplasmic reticulum (ER) → Golgi vesicles → *trans* Golgi reticulum.

B. *trans* Golgi reticulum → ER → Golgi vesicles.

C. endocytic vesicle → sorting compartment → secretory vesicle.

D. transport vesicle → late endosome → lysosome.

Proteins typically included in coated vesicles include

- a. cargo proteins.
- b. cargo protein receptors.
- c. small GTPase of the Sar1 or Arf families.
- d. v-SNARE molecules.
- e. la proteína NSF

9. Transport vesicles can have all of the following properties EXCEPT

- A. a clathrin coat.
- B. a COP coat.
- C. protein shuttling from mitochondria to the endoplasmic reticulum.
- D. fusion with target organelles with the participation of SNAP.

10. The sequence Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) is an example of
- a. a sequence signal for selective inclusion of membrane proteins in COPII vesicles.
 - b. a sequence signal for interaction with AP2 and inclusion in clathrin/AP2 coated vesicles formed at the cell surface.
 - c. a sequence signal for interaction with AP1 and inclusion in clathrin/AP1 vesicles formed at the *trans*-Golgi network.
 - d. a sequence signal for inclusion via interaction with the KDEL receptor in COPI vesicles.
 - e. a sequence signal for protein aggregation at the *trans*-Golgi network resulting in inclusion in regulated secretory granules

8. N-linked oligosaccharides in glycoproteins

- A. are characterized by the presence of xylose.
- B. are generally shorter than O-linked oligosaccharides.
- C. are produced by the sequential addition of sugar residues.
- D. are produced from a common precursor.

12. Targeting of enzymes to lysosomes involves all of the following steps EXCEPT

- A. dissociation of ligand from receptor
- B. binding to a mannose-6-phosphate receptor
- C. decrease in pH
- D. direct addition of phosphate to mannose

De la pag web de Randy Sheckman

- What is a coat protein complex and what is its role in vesicle transport?
- What is meant by “anterograde” and “retrograde” transport with respect to vesicle transport between the ER and Golgi? Which coat protein complex is involved in each of these two types of transport?
- From what compartment do vesicle membranes originate?
- What role do SNARE proteins play in vesicle trafficking?
- What would happen if transport from the ER to Golgi were disrupted? What if transport from the Golgi to the ER were disrupted?
- How was it experimentally shown that the proteins involved in clathrin vesicle formation actually form a coat complex?
- What triggers COPII coat assembly, and how is this event specific to the ER?