

Tráfico vesicular mediante las rutas secretora y endocítica

13

- Transporte desde el ER al complejo de Golgi
- Transporte desde la red del *trans* Golgi a los lisosomas
- Transporte desde la membrana plasmática vía endosomas: endocitosis
- Transporte desde la red del *trans* Golgi hasta la superficie celular: exocitosis
- Mecanismos moleculares del transporte vesicular y mantenimiento de la diversidad de compartimentos

Todas las células han de comunicarse con su entorno. En una célula procariota esta comunicación tiene lugar a través de su membrana plasmática: así, por ejemplo, las enzimas digestivas son secretadas hacia el exterior celular y los pequeños metabolitos generados por la digestión son captados por proteínas de transporte presentes en la membrana plasmática. Por el contrario, las células eucariotas han adquirido un elaborado sistema membranoso interno que les permite captar las macromoléculas por un proceso denominado *endocitosis*, y ponerlas en contacto con enzimas digestivas que se almacenan intracelularmente en los lisosomas; como consecuencia de ello, a medida que se van produciendo, los metabolitos de la digestión van saliendo de los lisosomas directamente hacia el citosol. Además de proporcionar un sistema de regulación de la digestión de las macromoléculas mediante la *vía endocítica*, el sistema membranoso interno permite que las células eucariotas puedan regular la liberación al exterior de las proteínas y glúcidos acabados de sintetizar. Todas las moléculas que viajan a lo largo de esta *vía biosintética y secretora* pasan por numerosos compartimentos, por lo que la célula puede modificar esta molécula en varios pasos controlados, almacenarla hasta que se necesite, y entonces descargarla en un dominio de la superficie celular determinado mediante un proceso llamado *exocitosis*. En la Figura 13-1 se muestran las rutas endocítica y la biosintética-secretora.

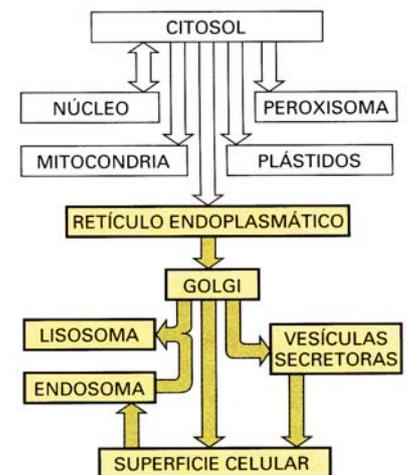


Figura 13-1 Las rutas secretora y endocítica. En este “mapa de carreteras” sobre el tráfico de las proteínas biosintetizadas, que fue introducido en el Capítulo 12, aparecen coloreadas tanto la ruta secretora como la endocítica.

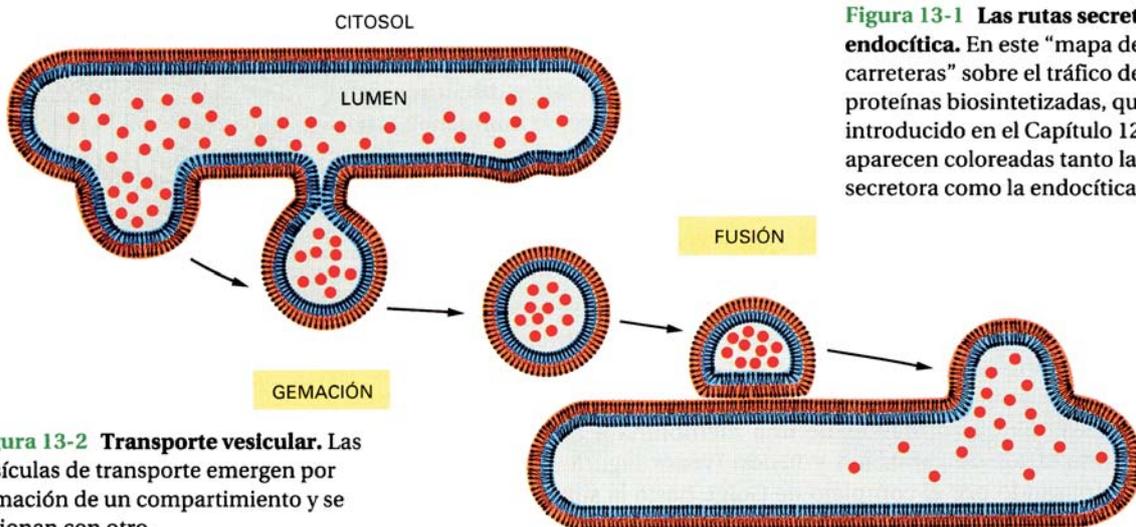


Figura 13-2 Transporte vesicular. Las vesículas de transporte emergen por gemación de un compartimento y se fusionan con otro.

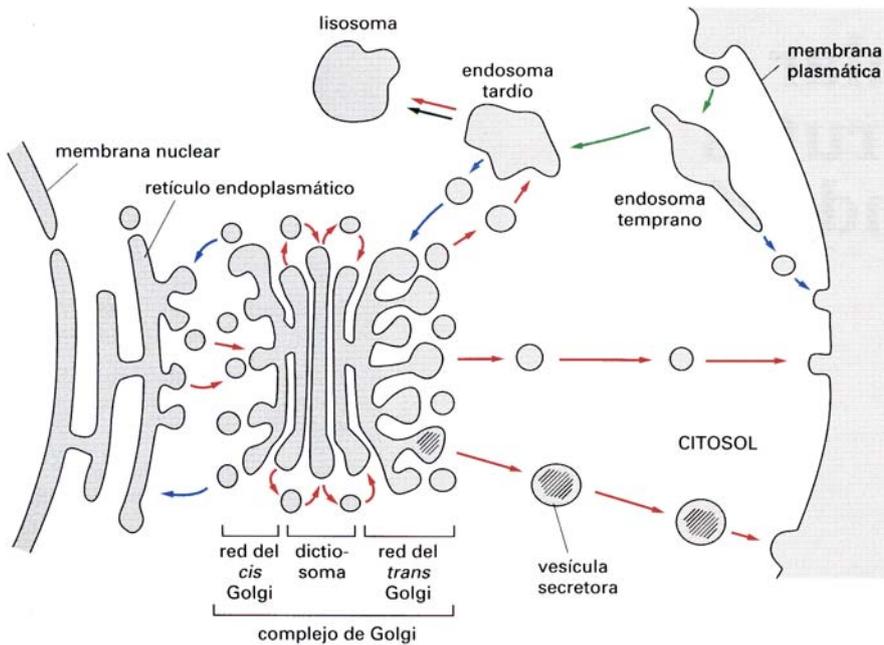


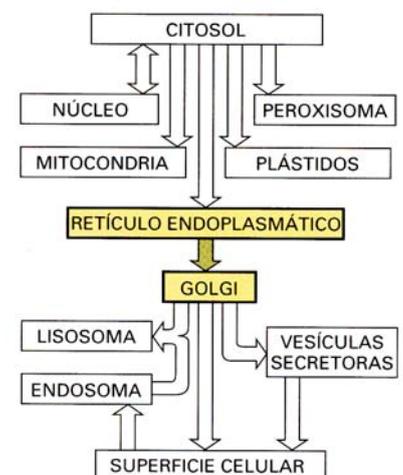
Figura 13-3 Los compartimientos intracelulares de una célula eucariota implicados en la ruta biosintética-secretora y en la vía endocítica. Cada compartimiento limita un espacio que es topológicamente equivalente al exterior de la célula. Un lumen cualquiera se comunica con otro cualquiera mediante vesículas de transporte. En la ruta biosintética-secretora (flechas rojas) las proteínas son transportadas desde el ER a la membrana plasmática o (vía endosomas tardíos) a los lisosomas. En la ruta endocítica (flechas verdes) las moléculas son ingeridas mediante vesículas formadas a partir de la membrana plasmática, conducidas a los endosomas tempranos y, vía endosomas tardíos, a los lisosomas. Muchas moléculas endocitadas son recuperadas de los endosomas tempranos y retornadas a la superficie celular para ser reutilizadas; de forma similar, algunas moléculas son recuperadas de los endosomas tardíos y devueltas al complejo de Golgi, y algunas son recuperadas del Golgi y devueltas al ER. Todas estas rutas de recuperación se muestran con las flechas azules.

El lumen de cada uno de los compartimientos que participan en la ruta biosintética-secretora y en la endocítica es topológicamente equivalente al exterior de la célula. Además, todos los compartimientos están en comunicación permanente entre sí, por lo menos mediante las numerosas vesículas de transporte que continuamente emergen por gemación de una membrana y se fusionan con otra (Figura 13-2). El tráfico está altamente organizado: la vía biosintética-secretora va hacia afuera desde el ER al complejo de Golgi y a la superficie celular, con una ruta lateral que va a los lisosomas; por otro lado, la vía endocítica va hacia adentro, desde la membrana plasmática a los endosomas y lisosomas (Figura 13-3).

Para poder realizar su función, cada vesícula de transporte que emerge de un compartimiento ha de tomar sólo las proteínas apropiadas y únicamente ha de fusionarse con la membrana diana apropiada. Así, por ejemplo, una vesícula que va del complejo de Golgi a la membrana plasmática no puede llevarse proteínas que deben residir en el complejo de Golgi, y sólo ha de fusionarse con la membrana plasmática y no con otros orgánulos. Asimismo, a pesar de participar en este flujo constante de componentes de membrana, cada orgánulo ha de mantener su propia identidad diferencial. En este capítulo consideraremos la función del complejo de Golgi, de los lisosomas, de las vesículas de secreción y de los endosomas, y veremos las vías por las cuales estos orgánulos están interconectados. En la parte final consideraremos los mecanismos moleculares de la gemación y fusión que se dan en todo transporte vesicular, y discutiremos el problema fundamental de cómo, a pesar de este transporte, se mantienen las diferencias en los compartimientos.

Transporte desde el ER al complejo de Golgi¹

Como ya hemos visto en el Capítulo 12, las proteínas sintetizadas *de novo* entran en la ruta biosintética-secretora cuando atraviesan la membrana del ER desde el citosol. El transporte posterior, desde el ER al complejo de Golgi y desde éste a la superficie celular o a cualquier otro sitio, tiene lugar a través de vesículas. Estas vesículas transfieren las proteínas de una membrana a otra o de un lumen a otro, mediante ciclos de gemación y fusión (véase Figura 12-7). La vía que va desde el ER, pasando por el complejo de Golgi, hasta la superficie celular se llama a menudo *vía por defecto* ya que parece que las proteínas no necesitan pre-



sentar determinadas señales para seguirla: cualquier proteína que entre en el ER (y se pliegue y se forme correctamente) será transportada automáticamente a través del complejo de Golgi hacia la superficie celular, a menos que contenga señales que o bien la detengan en algún compartimiento de la ruta o bien la desvíen, pasando por el complejo de Golgi, hacia los lisosomas o las vesículas de secreción.

En esta sección vamos a centrarnos en el **complejo de Golgi**, que es un importante punto de síntesis glucídica y un lugar de clasificación y distribución de los productos del ER. Muchos de los polisacáridos celulares son sintetizados en el complejo de Golgi, entre ellos la pectina y la hemicelulosa de la pared celular de las plantas y la mayoría de los glucosaminoglucanos de la matriz extracelular de las células animales (véase Capítulo 19). Pero el complejo de Golgi también constituye una zona de paso de los productos del ER, de manera que una gran parte de los glúcidos que fabrica el Golgi se unen como cadenas de oligosacáridos a las proteínas y lípidos que el ER le envía. Algunos oligosacáridos actúan como señales que dirigen determinadas proteínas hacia vesículas que las enviarán a los lisosomas; otras proteínas y lípidos, una vez adquiridos los oligosacáridos apropiados en el complejo de Golgi, son distribuidas mediante vesículas de transporte a otras partes de la célula.

El complejo de Golgi está formado por una serie de compartimientos ordenados²

El complejo de Golgi se localiza normalmente cerca del núcleo celular, y en una célula animal a menudo está cerca del *centrosoma*, o *centro celular*. Está formado por una serie de *cisternas* limitadas por una membrana y de forma aplanada que se parecen a un montón de platos. Normalmente estos **dictiosomas del Golgi** presentan entre cuatro y seis cisternas (Figura 13-4). El número de dictiosomas del Golgi por célula varía enormemente en función del tipo celular: algunas células animales tienen un gran dictiosoma, mientras que ciertas células vegetales presentan cientos de dictiosomas muy pequeños.

Multitud de pequeñas vesículas se hallan asociadas a los dictiosomas del Golgi, agrupadas en la cara contigua al ER y a lo largo de los anillos dilatados de cada cisterna (véase Figura 13-4). Se cree que estas *vesículas del Golgi* son vesículas de transporte de proteínas y de lípidos hacia y desde el Golgi y entre las cisternas del Golgi. Durante su paso a través del complejo de Golgi, las moléculas transportadas sufren una serie de modificaciones covalentes ordenadas.

Figura 13-4 El complejo de Golgi.

(A) Dibujo tridimensional del complejo de Golgi, a partir de micrografías de una célula secretora animal.

(B) Electronmicrografía de un complejo de Golgi de una célula vegetal (del alga verde *Chlamydomonas*), visto en sección transversal. Se pueden observar dos dictiosomas. Generalmente, en las células vegetales el complejo de Golgi es más diferenciado y está más claramente separado de los otros sistemas membranosos intracelulares que en las células animales. (A, a partir de A. Rambourg e Y. Clermont, *Eur. J. Cell Biol.* 51:189-200, 1990; B, por cortesía de George Palade.)

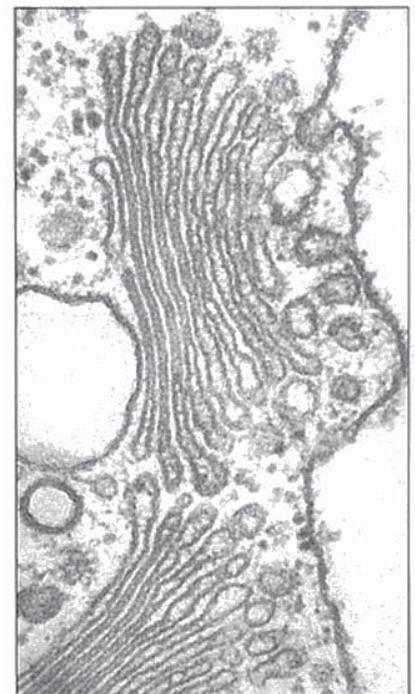
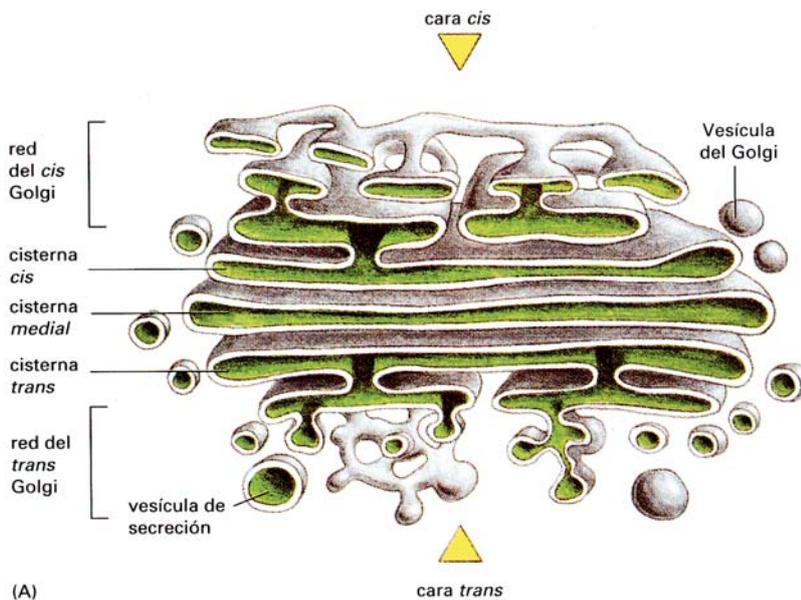


Figura 13-5 Célula caliciforme del intestino delgado. Esta célula está especializada en la secreción de mucus, una mezcla de glucoproteínas y de proteoglicanos sintetizados en el ER y en el complejo de Golgi. El complejo de Golgi está altamente polarizado, lo cual facilita la descarga del mucus mediante exocitosis en la superficie apical de la célula. (De R.V.Krstić, *Illustrated Encyclopedia of Human Histology*. New York: Springer-Verlag, 1984.)

Los dictiosomas del Golgi tienen dos caras distintas: una **cara cis** (o cara de entrada) y una **cara trans** (o cara de salida). Ambas caras están conectadas a unos compartimientos especiales, formados por una red de estructuras tubulares y cisternas, que son, respectivamente, la **red del cis Golgi** (también llamada compartimiento intermedio o de salvamento) y la **red del trans Golgi**. Las proteínas y lípidos entran por la red del *cis* Golgi en vesículas de transporte que provienen del ER y salen por la red del *trans* Golgi en vesículas de transporte con destino a la superficie celular o a otro compartimiento. Se cree que ambas redes son importantes en la clasificación de las proteínas: las proteínas que entran en la red *cis* pueden seguir a través del Golgi o bien volver al ER; las proteínas que salen de la red *trans* están clasificadas según su destino sea los lisosomas, las vesículas de secreción o la superficie celular.

El complejo de Golgi es prominente en las células que están especializadas en la secreción, tales como las células caliciformes del epitelio intestinal, las cuales secretan al intestino grandes cantidades de moco rico en polisacáridos. En células de este tipo, se forman grandes vesículas a partir de la cara *trans* del complejo de Golgi, el cual se encara hacia el dominio de la membrana plasmática por el que tiene lugar la secreción (Figura 13-5).

Las proteínas residentes en el ER son selectivamente recuperadas de la red del *cis* Golgi³

Las vesículas destinadas al complejo de Golgi emergen desde regiones especializadas del ER llamadas **elementos transicionales**, cuya membrana no tiene ribosomas adheridos y se encuentra a menudo entre el ER rugoso y el complejo de Golgi (Figura 13-6). Se cree que estas vesículas no son selectivas. Transportan cualquier proteína desde el ER al complejo de Golgi, aunque puede haber señales que favorezcan este proceso. No obstante, existe un requerimiento esencial para que una proteína salga del ER: ha de estar correctamente plegada y formada. Las proteínas que no tienen la conformación correcta o que están incompletas son retenidas, o bien unidas a la proteína de unión especial BiP (discutido en el Capítulo 12) o bien formando agregados que no pueden ser empaquetados, y final-

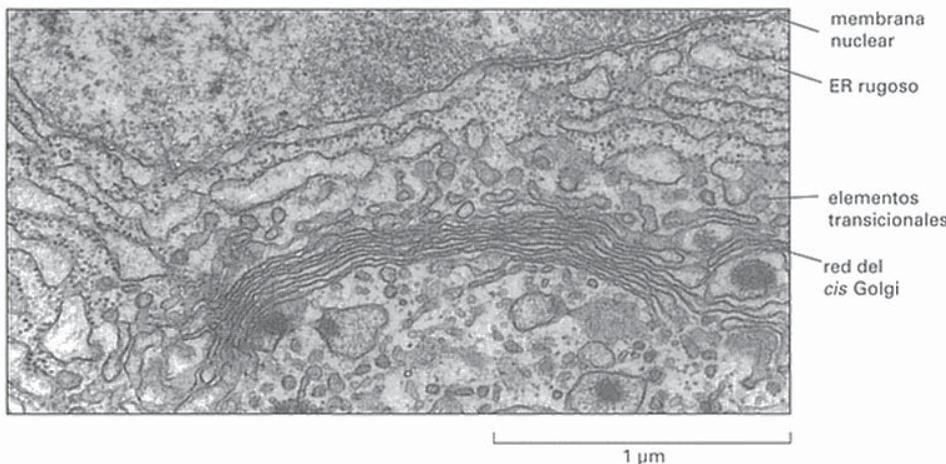
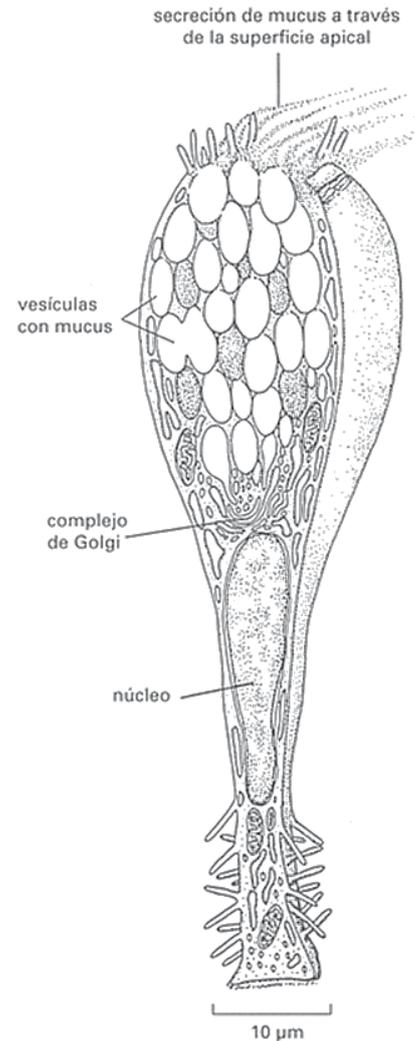


Figura 13-6 Electronmicrografía de los elementos transicionales y de la red del *cis* Golgi. De los elementos transicionales del ER emergen vesículas de transporte por gemación; estos elementos transicionales están casi completamente libres de ribosomas y se fusionan con la red del *cis* Golgi, transfiriendo así proteínas y lípidos acabados de sintetizar desde el ER hasta el complejo de Golgi. (Por cortesía de Brij J. Gupta.)

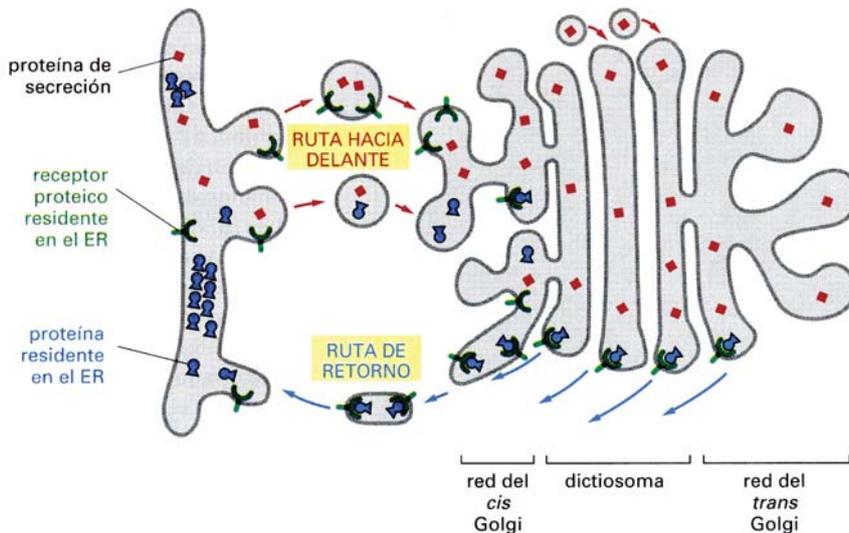


Figura 13-7 Mecanismo utilizado para retener las proteínas residentes en el ER. Las proteínas residentes en el ER que se escapan hacia la red del *cis* Golgi son devueltas al ER mediante transporte vesicular. Un receptor de membrana en la red *cis* Golgi captura las proteínas y las conduce, en vesículas de transporte, hacia el ER. Las condiciones iónicas presentes en el ER separan las proteínas de su receptor, de forma que el receptor regresa a la red del *cis* Golgi para ser reutilizado. Se han encontrado también receptores que reconocen la señal de retención en ER en las cisternas *cis*, *medial* y *trans* del Golgi. De esta manera, la recuperación de proteínas del ER empieza en la red del *cis* Golgi, pero la ruta de retorno también funciona en las cisternas más *trans* del Golgi. En el lumen del ER se producen interacciones entre las proteínas residentes en el ER, que ayudan a su retención. Estas interacciones retardan la salida de las proteínas del ER en relación con las proteínas que han de ser secretadas (proteínas de secreción). En experimentos en los que se ha eliminado la señal de retención de ER de la proteína BiP, se observa cómo la BiP abandona el ER y es secretada por las células; ahora bien, su salida del ER tiene lugar más lentamente que las proteínas de secreción *bona fide*, lo cual indica que BiP es parcialmente retenida en el ER mediante interacciones débiles con otras proteínas.

mente son degradadas en el propio ER. Así pues, la salida desde el ER puede ser considerada como un control de calidad: si la proteína no se pliega o no se forma correctamente, es descartada. De hecho, el ER parece que es uno de los principales lugares de la célula donde se degradan proteínas (los otros son los lisosomas, como veremos más adelante, y el citosol, como vimos en el Capítulo 5).

Las proteínas que están bien plegadas no necesitan ninguna señal específica para que sean transportadas fuera del ER, pero aquellas que, como la proteína BiP, se encuentran en el lumen del ER necesitan una señal para quedarse en él. Esta retención de las proteínas solubles residentes en el ER está mediada por una señal de clasificación constituida por una corta secuencia, de cuatro aminoácidos: KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) u otra similar (véase Tabla 12-3). Si, por ejemplo, mediante ingeniería genética se elimina esta *señal de retención en ER* de la proteína BiP, se observa cómo esta proteína es secretada al exterior de la célula; y si la señal se transfiere a una proteína que normalmente es secretada, ahora queda retenida en el ER. Esta señal de retención no consiste en un anclaje de las proteínas residentes en el lumen del ER sino en una recuperación selectiva después de que hayan sido transportadas en vesículas y descargadas en la red del *cis* Golgi. En la red del *cis* Golgi, un receptor de membrana específico une a todas las proteínas que presentan la señal de retención en ER y las empaqueta en vesículas de transporte especiales que las devuelve al ER. Así pues, para estas proteínas residentes el ER es como una prisión abierta: no hay nada que impida que salgan, pero si lo hacen, son transportadas de nuevo al interior del ER (Figura 13-7).

Las proteínas del Golgi vuelven al ER cuando las células se tratan con la droga brefeldina A⁴

El continuo retorno de las proteínas residentes en el ER desde la red del *cis* Golgi implica que el transporte entre estos dos orgánulos tiene lugar en ambas direcciones. Como ya se menciona en el pie de la Figura 13-7, los receptores que reconocen la señal de retención en ER se encuentran también en los compartimientos más *trans* del Golgi, de manera que quizá existe una ruta de retorno desde ellos al ER. La importancia de esta ruta de retorno se ilustra muy bien usando la droga **brefeldina A**, la cual bloquea la secreción de proteínas ya que desorganiza el complejo de Golgi. En células tratadas con brefeldina A, el complejo de Golgi desaparece y sus proteínas se acaban encontrando en el ER, donde se mezclan con las propias del ER. Cuando se elimina la droga, el complejo de Golgi se vuelve a organizar y sus proteínas retornan a sus compartimientos (Figura 13-8).

Para explicar estas observaciones, se ha propuesto que la brefeldina A bloquea el transporte hacia delante –desde el ER al complejo de Golgi– sin afectar

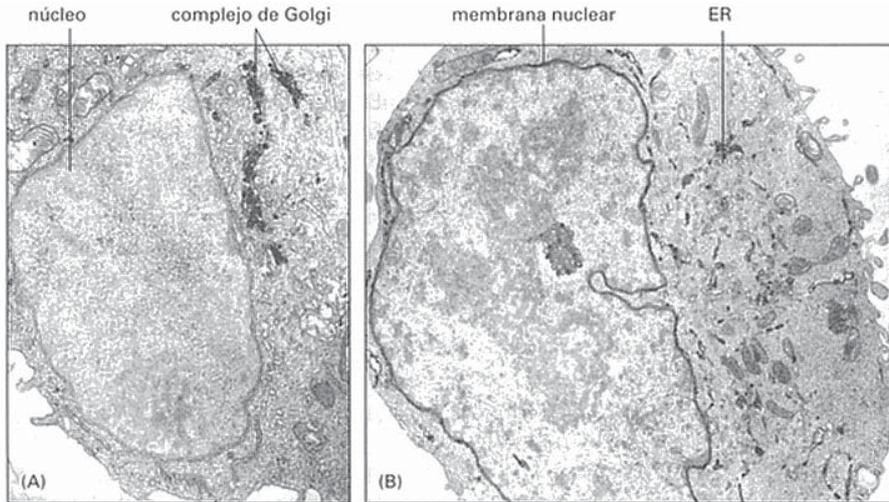


Figura 13-8 Electronmicrografías que muestran el efecto del tratamiento con brefeldina A sobre el complejo de Golgi. Una tinción histoquímica permite ver la localización de una enzima del Golgi (una manosidasa) antes (A) y dos horas después (B) del tratamiento con brefeldina A sobre fibroblastos en cultivo. Nótese que después del tratamiento, la enzima pasa de las cisternas *cis* y *medial* del Golgi al ER y a la membrana nuclear, que es continua con el ER. (Por cortesía de Jennifer Lippincott-Schwartz y Lydia Yuan.)

al transporte de retorno –desde el Golgi al ER (Figura 13-9). En este sentido, la droga provocaría que las proteínas del complejo de Golgi se vaciasen al ER mediante la ruta de retorno y, cuando la droga desapareciese, la vía hacia delante se encargaría de devolver las proteínas del Golgi a sus compartimientos.

En el complejo de Golgi se procesan las cadenas de oligosacárido⁵

Como se ha descrito en el Capítulo 12, en el ER se añade un mismo tipo de *N*-oligosacárido a muchas proteínas diferentes, y este oligosacárido se modifica profundamente mientras las proteínas todavía están en el ER. En el complejo de Golgi se producen modificaciones posteriores, dependiendo de la proteína. El resultado es que en las glucoproteínas de mamífero se encuentran dos grandes tipos de *N*-oligosacáridos, los *oligosacáridos complejos* y los *oligosacáridos ricos en manosa*. Algunas veces ambos tipos de oligosacáridos están unidos (en lugares diferentes) a la misma cadena polipeptídica. Los **oligosacáridos ricos en manosa** no presentan azúcares que hayan sido añadidos en el complejo de Golgi. Sólo contienen dos *N*-acetilglucosaminas y muchos residuos de manosa, cuyo número a menudo se acerca al número de residuos que se hallan presentes en el precursor del oligosacárido original unido a lípido, del ER. Por el contrario, los **oligosacáridos complejos** pueden tener más de las dos moléculas de *N*-acetilglucosamina originales y también pueden presentar un número variable de ga-

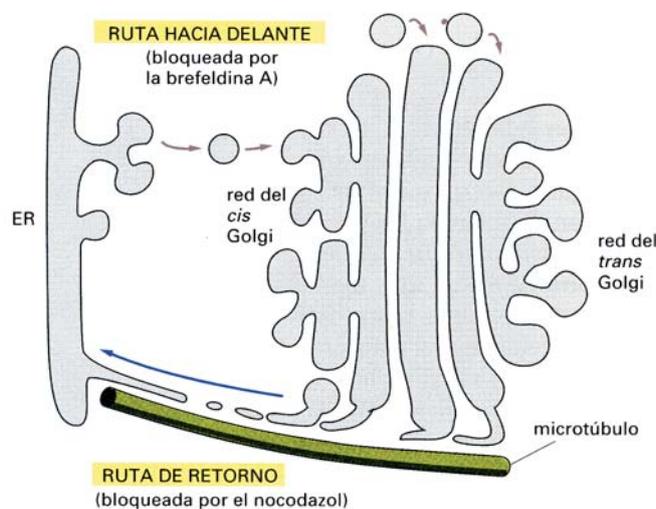


Figura 13-9 Ruta de retorno propuesta que va desde el complejo de Golgi al ER. Mientras que la ruta hacia delante precisa de vesículas de transporte y tiene lugar independientemente de los microtúbulos, se cree que la ruta de retorno precisa de unos túbulos membranosos que emergen del complejo de Golgi hacia el ER siguiendo los microtúbulos (los cuales son fragmentados por drogas como el nocodazol). Como ya hemos dicho anteriormente, la brefeldina A evita la unión de las cubiertas que son necesarias para la gemación de las vesículas de transporte, de manera que bloquea los pasos del transporte vesicular hacia delante y mantiene intacto el proceso de transporte hacia atrás, dependiente de túbulos de membrana.

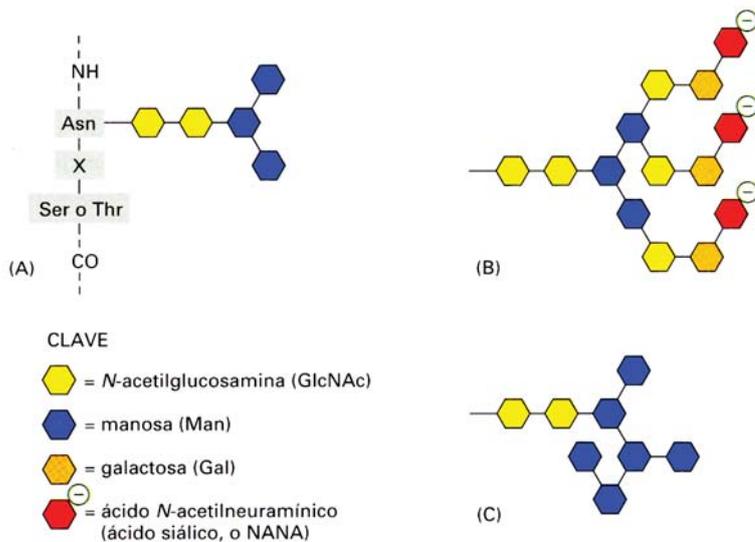


Figura 13-10 Ejemplos de las dos clases principales de oligosacáridos unidos a asparagina

(*N*-oligosacáridos) encontrados en glucoproteínas maduras. En (B) se muestra un oligosacárido complejo y en (C) un oligosacárido rico en manosa. Todo oligosacárido complejo consta de una *región central* (en color en A) que deriva del *N*-oligosacárido original añadido en el ER y que consta de forma característica de dos *N*-acetilglucosaminas (GlcNAc) y tres manosas (Man). Además, existe una *región terminal* que contiene un número variable de unidades de trisacáridos (*N*-acetilglucosamina-galactosa-ácido siálico) unidas al núcleo de manosas. Frecuentemente la *región terminal* está truncada y contiene sólo GlcNAc y galactosa (Gal) o sólo GlcNAc. Normalmente se puede añadir un residuo de fucosa al núcleo de GlcNAc unido a la asparagina (Asn). Así pues, aunque las etapas de procesamiento y posterior adición de azúcares están ordenadas estrictamente, los oligosacáridos complejos pueden ser heterogéneos: por ejemplo, mientras que el oligosacárido complejo que se muestra en la figura tiene tres ramas terminales, también es habitual encontrar oligosacáridos con dos o con cuatro ramas, en función de la glucoproteína de que se trate y de la célula en la que se fabrique. También se encuentran oligosacáridos "híbridos" con una rama de Man y otra de GlcNAc-Gal. Los tres aminoácidos que en esta figura se presentan en color constituyen la secuencia reconocida por la enzima oligosacaril transferasa que añade el oligosacárido inicial a la proteína. Abreviaturas: Ser = serina; Thr = treonina; X = cualquier aminoácido.

lactosas y de residuos de ácido siálico, y en algunos casos, de fucosa. El ácido siálico tiene una importancia especial porque es el único residuo de azúcar de las glucoproteínas con una carga negativa neta (Figura 13-10).

Los oligosacáridos complejos se generan mediante una combinación de modificaciones posteriores del oligosacárido original, añadido en el ER, y por la adición de nuevos azúcares. El hecho de que un determinado oligosacárido se mantenga rico en manosa o sea procesado viene determinado fundamentalmente por su configuración sobre la proteína a la cual se halla unido: si el oligosacárido es estéricamente accesible a las enzimas procesadoras del Golgi, es probable que se convierta en una forma compleja; si es inaccesible a ellas, es probable que se mantenga como una forma rica en manosa. El proceso que genera cadenas de oligosacáridos complejos sigue la vía altamente ordenada que se muestra en las Figuras 13-11 y 13-12.

Las cisternas del Golgi están organizadas en forma de series secuenciales de compartimientos de procesamiento⁶

Las proteínas exportadas desde el ER entran al primero de los compartimientos del Golgi (el **compartimiento *cis***), que se cree que es continuo con la red del *cis* Golgi; luego se desplazan al siguiente compartimiento (el **compartimiento *medial***, formado por la cisterna central del dictiosoma), y finalmente se desplazan al **compartimiento *trans***, donde se completa la glucosilación. Se cree que el lumen del compartimiento *trans* continúa con la red del *trans* Golgi, donde las proteínas se segregan en diferentes vesículas de transporte y se liberan a sus destinos finales –la membrana plasmática, los lisosomas, o las vesículas de secreción.

Estas rutas de procesamiento de oligosacáridos tienen lugar según una secuencia ordenada en el dictiosoma, en el que cada cisterna contiene sus propias enzimas. Las proteínas se modifican a través de sucesivas etapas a medida que van de cisterna en cisterna a través del dictiosoma, de forma que las cisternas constituyen una unidad de procesamiento múltiple. Esta compartimentación podría parecer innecesaria, ya que cada enzima sólo actúa sobre su glucoproteína después de que haya sido convenientemente procesada por la enzima anterior. Sin embargo, parece claro que el procesamiento tiene lugar tanto en una secuencia espacial como en una secuencia bioquímica: así, las enzimas que catalizan las primeras etapas se localizan en las cisternas más *cis* del dictiosoma, mientras que las que catalizan las últimas etapas se encuentran en las cisternas más *trans*.

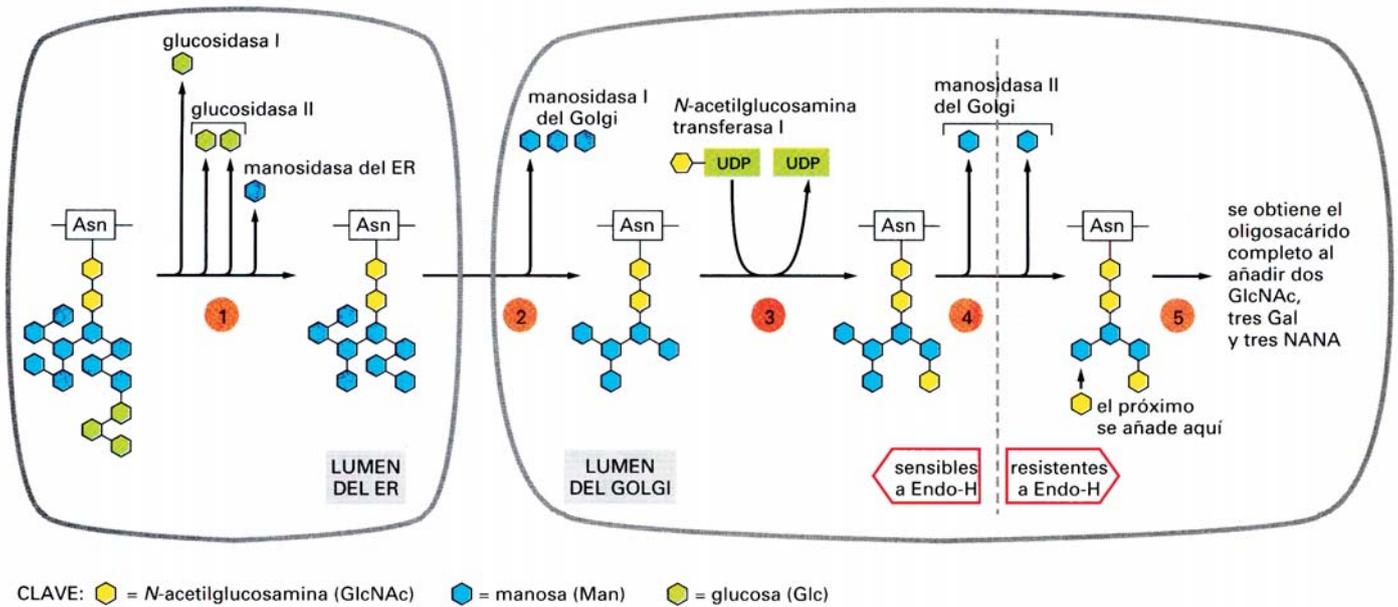


Figura 13-11 Procesamiento de los oligosacáridos en el ER y en el complejo de Golgi. El proceso es altamente ordenado, de forma que cada uno de los pasos depende de las reacciones anteriores de cada serie. El procesamiento comienza en el ER con la eliminación de los residuos de glucosa del oligosacárido inicialmente transferido a la proteína. A continuación, una manosidasa de la membrana del ER elimina un determinado residuo de manosa. En los dictiosomas del Golgi, la manosidasa I elimina tres residuos más de manosa y la N-acetilglucosamina transferasa I añade un residuo de GlcNAc, lo cual permite que la manosidasa II elimine dos residuos más de manosa. Así, se obtiene el núcleo final de tres residuos de manosa que se presenta en un oligosacárido complejo. En este estadio, el enlace que existe entre los dos residuos de GlcNAc del núcleo del oligosacárido se vuelve resistente al ataque de una endoglucosidasa altamente específica (*Endo-H*). Todas las estructuras posteriores son resistentes a *Endo-H*, por lo que se utiliza el tratamiento con esta enzima para distinguir los complejos de oligosacáridos ricos en manosa. Por último, como se muestra en la Figura 13-10, se añaden residuos de GlcNAc, de galactosa y de ácido siálico. Algunos oligosacáridos pueden escaparse del procesamiento del complejo de Golgi, mientras que otros seguirán el proceso que se muestra, con algunas variantes. La complejidad del proceso depende del tipo de proteína y de la localización en la proteína del residuo de asparagina al que se halla unido el oligosacárido.

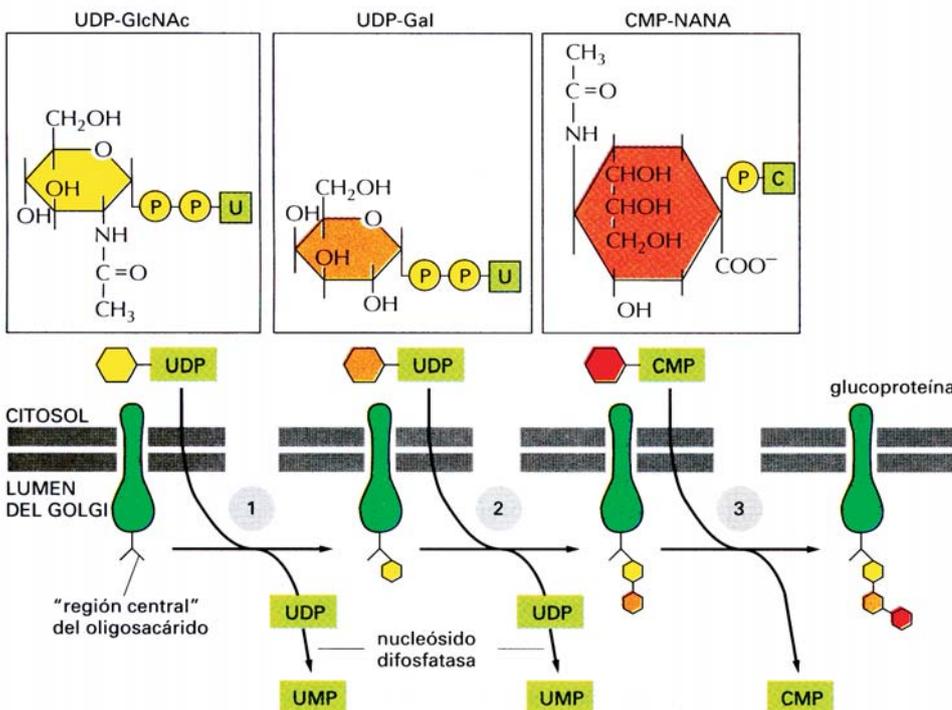


Figura 13-12 Etapas finales en la síntesis de un oligosacárido complejo. La adición progresiva de residuos de azúcar se produce en los compartimientos de las cisternas del complejo de Golgi. Tres tipos de enzimas glucosil transferasa actúan de forma secuencial, utilizando como sustrato azúcares que han sido activados mediante su unión a determinados nucleótidos (los que se indican en la figura). Las membranas de las cisternas del Golgi contienen proteínas transportadoras transmembrana específicas que permiten a cada azúcar-nucleótido entrar por intercambio con su producto nucleótido monofosfato, que es liberado después de que el azúcar se una a la proteína en la cara luminal (no se muestra). En la parte superior de la figura se muestra la estructura de los compuestos azúcar-nucleótido UDP-N-acetilglucosamina, UDP-galactosa y CMP-N-ácido acetilneuramínico.

Figura 13-13 Contrastado histoquímico que demuestra que el complejo de Golgi está bioquímicamente polarizado. La serie de electronmicrografías muestra el complejo de Golgi sin contrastar (A), contrastado con osmio (B), el cual es reducido preferentemente por las cisternas del compartimiento *cis*, y contrastado revelando la localización de una enzima específica (C y D). La enzima nucleósido difosfatasa (véase Figura 13-12) se halla en las cisternas del *trans* Golgi (C), mientras que la enzima fosfatasa ácida marca la red del *trans* Golgi (D). (Por cortesía de Daniel S. Friend.)

Se cree que el transporte de proteínas entre las diferentes cisternas del Golgi tiene lugar mediante vesículas de transporte, las cuales surgen por gemación de una cisterna y se fusionan con la siguiente. Se supone que las vesículas que se desplazan entre las cisternas del Golgi no seleccionan la carga, como ya sucedía con las que viajan desde el ER al complejo de Golgi. Así, cualquier proteína soluble o de membrana que no sea considerada residente puede entrar en las vesículas de transporte y desplazarse a través de la ruta biosintética-secretora desde la cisterna *cis* a la *trans* pasando por la *medial*. Casi todo lo que sabemos sobre el mecanismo molecular del transporte vesicular fue descrito originalmente utilizando sistemas *in vitro* para medir el transporte proteico entre las cisternas del Golgi (véase Panel 13-1, págs. 682-683). Los electronmicroscopistas han visto pequeños túbulos membranosos que parecen interconectar algunos dictiosomas, y es posible que a través de estas estructuras tenga lugar algún tipo de transferencia de material desde una cisterna a la siguiente.

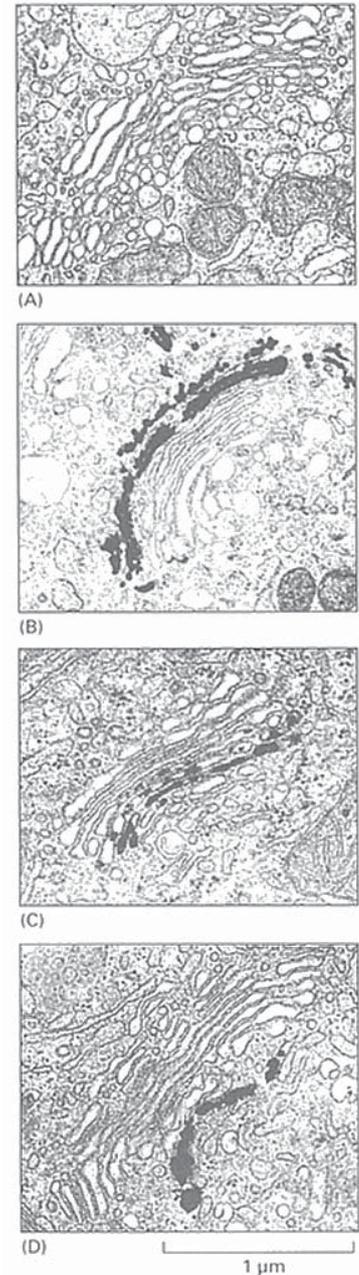
Las diferencias funcionales entre las subdivisiones *cis*, *medial* y *trans* del complejo de Golgi fueron descubiertas mediante la localización, tanto por fraccionamiento físico del orgánulo como por electronmicroscopia marcando con anticuerpos las enzimas implicadas en el procesamiento de los *N*-oligosacáridos en distintas regiones del orgánulo. Por ejemplo, se encontró que la separación de los residuos de manosa y la adición de *N*-acetilglucosamina tenía lugar en el compartimiento *medial*, mientras que la adición de galactosa y de ácido siálico ocurría en el compartimiento *trans* y en la red del *trans* Golgi (Figura 13-13). La compartimentación funcional del complejo de Golgi está resumida en la Figura 13-14.

Los proteoglicanos son ensamblados en el complejo de Golgi⁷

No sólo son las cadenas de *N*-oligosacárido de las proteínas las que son alteradas a medida que las proteínas pasan a través de las cisternas del Golgi, en su camino desde el ER a sus destinos finales; muchas proteínas también son modificadas de otras formas. Por ejemplo, algunas proteínas tienen azúcares añadidos a los grupos OH de las cadenas laterales de determinadas serinas o treoninas. Como el crecimiento de las cadenas de *N*-oligosacáridos, esta **O-glucosilación** está catalizada por series de enzimas glucosiltransferasas que utilizan compuestos azúcar-nucleótido en el lumen del Golgi para añadir residuos de azúcar, uno a uno, a una proteína. Habitualmente primero se añade la *N*-acetilgalactosamina, y a continuación un número variable (desde unos pocos a 10 o más) de residuos de azúcar.

De todas las proteínas glucosiladas, las que lo están más son algunas *proteínas nucleares de proteoglicanos*, las cuales son modificadas en el complejo de Golgi produciendo **proteoglicanos**. Tal como se explica en el Capítulo 19, esto implica la polimerización de una o más *cadena de glucosaminoglucano* (largos polímeros no ramificados compuestos por unidades repetidas de disacáridos) vía una unión a xilosa en las serinas de las proteínas nucleares. Muchos proteoglicanos son secretados y pasan a ser componentes de la matriz extracelular, mientras que otros permanecen anclados a la membrana plasmática. Otros constituyen el componente principal de sustancias como el moco que es secretado formando una cubierta protectora sobre muchos epitelios.

Los azúcares incorporados a los glucosaminoglucanos son altamente sulfatados inmediatamente después de que los polímeros se hayan formado en el complejo de Golgi, lo cual ayuda a dar la elevada carga negativa que presentan los pro-



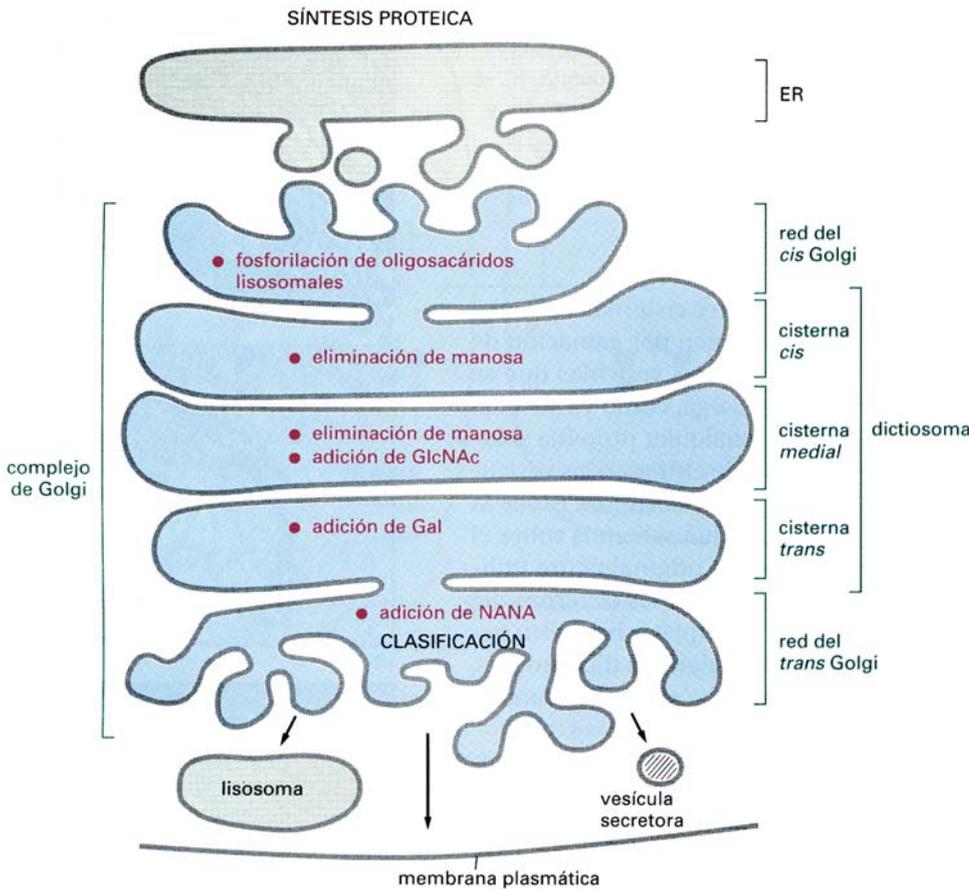


Figura 13-14 **Compartimentación funcional del complejo de Golgi.** La localización de cada una de las etapas de procesamiento que se muestran en la figura ha sido determinada por medio de la combinación de técnicas, entre las que se encuentran el subfraccionamiento de las membranas del complejo de Golgi y la electronmicroscopia tras la tinción con anticuerpos específicos contra algunas de las enzimas específicas de procesamiento. La localización de muchas otras reacciones de procesamiento todavía no ha sido determinada. A pesar de que sólo se ha podido demostrar la existencia de tres compartimientos de cisternas, a veces cada uno de ellos está formado por un grupo de dos o más cisternas secuenciales, y es posible que haya subdivisiones aún por descubrir. También podría ser que hubiese sólo tres compartimientos funcionalmente distintos y que las cisternas extra representasen múltiples copias de uno de las tres unidades funcionales. No obstante, no está claro si cada enzima está restringida a una cisterna concreta o si su distribución varía a lo largo del dictiosoma –de manera que las enzimas que actúan primero están presentes mayoritariamente en las cisternas *cis* del Golgi, mientras que las que actúan más tarde están sobretodo en las cisternas *trans* del Golgi.

teoglucanos. Algunos residuos de tirosina también son sulfatados en este estadio. En ambos casos la sulfatación depende de un dador de sulfato (3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato, o PAPS, de 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate), que es transportado desde el citosol al lumen del compartimento *trans* del Golgi.

Los carbohidratos de las membranas celulares se encuentran en la cara de la membrana que es topológicamente equivalente al exterior de la célula⁸

Dado que todos los oligosacáridos son incorporados en el lado luminal del ER y del complejo de Golgi, la distribución de carbohidratos en las proteínas de membrana y en los lípidos es asimétrica. Tal como ocurre con la asimetría de la bicapa lipídica, la orientación asimétrica de estas moléculas glucosiladas se mantiene durante su transporte a la membrana plasmática, a las vesículas de secreción, o a los lisosomas. Por lo tanto, los oligosacáridos de todas las glicoproteínas y glicolípidos de las membranas intracelulares correspondientes se encuentran encarados hacia el lado luminal, mientras que en la membrana plasmática se encuentran encarados hacia el exterior de la célula (Figura 13-15).

¿Cuál es el propósito de la glucosilación?⁹

Existe una diferencia importante entre la construcción de un oligosacárido y la síntesis de otras macromoléculas como el DNA, el RNA o las proteínas. Mientras que los ácidos nucleicos y las proteínas son copiados de un molde a través de una serie repetida de pasos idénticos y utilizando la(s) misma(s) enzima(s), los carbohidratos complejos requieren una enzima diferente en cada paso, de forma que cada producto de una reacción es reconocido como el sustrato exclusivo por la siguiente enzima de la serie. Dado lo complicadas que son las vías que han tenido que evolucionar para sintetizar estos oligosacáridos, parece probable que

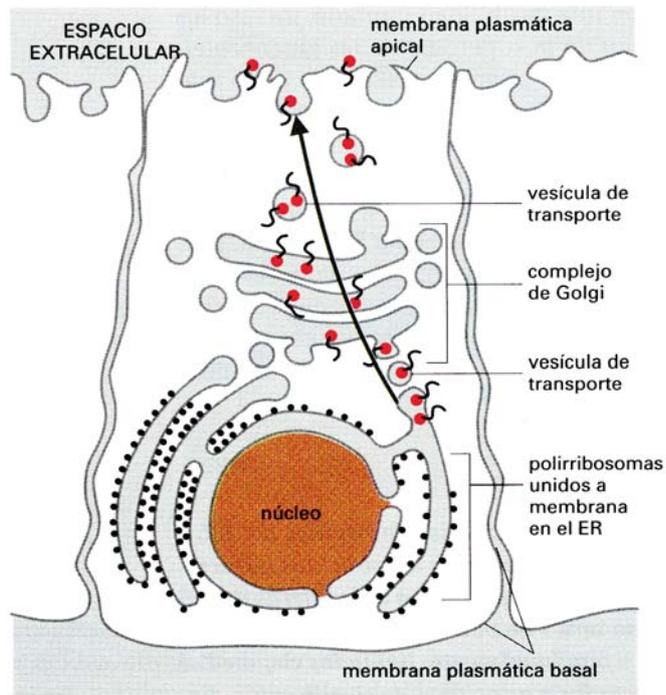


Figura 13-15 Los azúcares de las glucoproteínas de membrana y de los glucolípidos están orientados hacia afuera del citosol. La orientación que tiene una proteína transmembrana en la membrana del ER se mantiene cuando esta proteína es transportada a otras membranas. Los puntos coloreados del final de cada molécula de glucoproteína representan el *N*-oligosacárido añadido a las proteínas en el lumen del ER. Nótese que estos residuos de azúcar están confinados en el lumen de cada uno de los orgánulos internos de la célula, y que después de que la vesícula de transporte se haya fusionado con la membrana plasmática aparecen expuestos hacia el espacio extracelular. Lo mismo sirve para los residuos de azúcar de los glucolípidos y los *O*-oligosacáridos producidos en el complejo de Golgi.

formando parte de los glucolípidos y de las glucoproteínas desempeñen funciones importantes, aunque todavía se desconocen la mayoría de estas funciones.

La *N*-glucosilación, por ejemplo, es predominante en todos los eucariotas, incluyendo las levaduras, pero no se presenta en procariotas. En la mayoría de las proteínas transportadas a través del ER y del complejo de Golgi –un proceso que es exclusivo de las células eucariotas– se hallan presentes uno o más *N*-oligosacáridos, por lo que se creyó que su función era la de colaborar en los procesos de transporte. No obstante, por regla general las drogas que bloquean determinados pasos de la glucosilación no interfieren con el transporte (con la importante excepción del transporte a los lisosomas, que se explicará más adelante). Además, las células mutantes que tienen bloqueados varios pasos de glucosilación del Golgi son viables en cultivo y transportan proteínas normalmente. En ausencia de glucosilación la mayoría de las proteínas retienen sus actividades normales, aunque algunas no se pliegan correctamente sin sus oligosacáridos normales, y por lo tanto precipitan en el ER y no son transportadas.

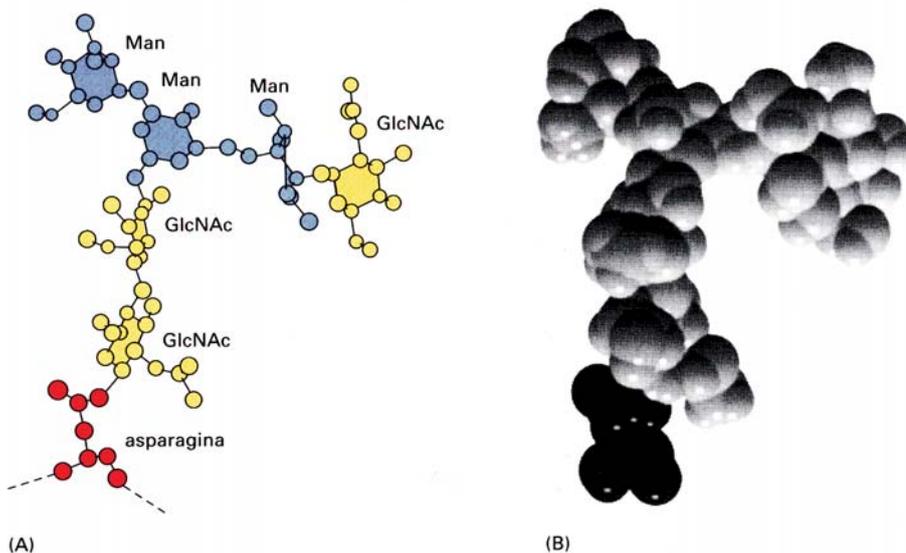


Figura 13-16 Estructura tridimensional de un pequeño *N*-oligosacárido. La estructura fue determinada por análisis cristalográfico de rayos X de una glucoproteína. Este oligosacárido tan sólo contiene 6 residuos de azúcar, mientras que el *N*-oligosacárido transferido inicialmente a las proteínas en el ER tiene 14 residuos de azúcar (véase Figura 12-48). (A) Modelo del esqueleto del compuesto, en el que se muestran todos los átomos excepto los de hidrógeno; (B) modelo espacial en el que la asparagina se presenta en negro. (Por cortesía de Richard Feldmann.)

Dado que las cadenas de azúcar tienen una flexibilidad limitada, incluso los N-oligosacáridos más pequeños sobresalen de la superficie de las glucoproteínas (Figura 13-16), de forma que pueden limitar la aproximación de otras macromoléculas a la superficie de la glucoproteína. De esta manera, por ejemplo, la presencia de oligosacáridos tiende a hacer que una glucoproteína sea relativamente resistente a la digestión por proteasas. Podría ser que los oligosacáridos provinieran originalmente de una célula eucariota ancestral que tuviera una cubierta protectora, la cual, a diferencia de la rígida pared celular bacteriana, permitiera a la célula una cierta libertad para cambiar de forma y para moverse. Desde entonces los oligosacáridos pueden haber sido modificados en el sentido de que también sean útiles para otros fines: por ejemplo, las selectinas –polisacáridos unidos a las proteínas de la superficie celular– intervienen en la adhesión entre dos células, como ya se vio en el Capítulo 10.

Resumen

El complejo de Golgi recibe las proteínas recién sintetizadas y los lípidos del ER, y los distribuye a la membrana plasmática, a los lisosomas y a las vesículas de secreción. Se trata de una estructura polarizada, formada por una o más hileras de cisternas en forma de disco, organizadas como series de por lo menos tres compartimientos secuenciales distintos bioquímica y funcionalmente, llamados cis, medial y trans. Las cisternas cis y trans están conectadas a estaciones de clasificación, llamadas la red del cis y trans Golgi, respectivamente. Las proteínas bien plegadas son transportadas indiscriminadamente desde el lumen y la membrana del ER a la red del cis Golgi, pero las residentes del ER son devueltas. Las proteínas destinadas a las vesículas secretoras, a la membrana plasmática y a los lisosomas se desplazan a través del dictiosoma en la dirección cis a trans, pasando desde una cisterna a la siguiente, en serie. Finalmente, las proteínas alcanzan la red del trans Golgi, desde donde cada tipo de proteína parte a su destino final. Todas estas etapas de transporte tienen lugar mediante vesículas, las cuales surgen por gemación de una membrana y se fusionan con otra.

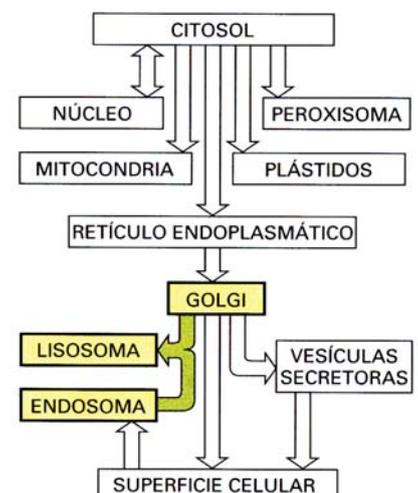
El complejo de Golgi, a diferencia del ER, contiene muchos compuestos azúcar-nucleótido; una diversidad de enzimas glucosil transferasas utilizan estos substratos para realizar reacciones de glucosilación, tanto en moléculas de lípido como de proteína, a medida que éstas van pasando a través del complejo de Golgi. Los N-oligosacáridos, por ejemplo, que se añaden a las proteínas en el ER, son a menudo modificados por eliminación de residuos de manosa y por adición de azúcares adicionales –como la N-acetilglucosamina, la galactosa y el ácido siálico. Además, el Golgi es el lugar donde se produce la O-glucosilación y donde las cadenas de glucosaminoglucanos se añaden a las proteínas centrales de proteoglicano formando proteoglicanos. En el último compartimiento del Golgi también tiene lugar la sulfatación de azúcares de proteoglicanos y de determinadas tirosinas de las proteínas.

Transporte desde la red del *trans* Golgi a los lisosomas

Al parecer, todas las proteínas que pasan a través del complejo de Golgi, excepto las que son retenidas en él como residentes permanentes, son clasificadas en la red del *trans* Golgi de acuerdo con su destino final. El mecanismo de clasificación está especialmente bien estudiado para el caso de las proteínas destinadas al lumen de los lisosomas. En esta sección vamos a considerar este proceso de transporte selectivo. Empezaremos con una breve descripción de la estructura y de la función de los lisosomas.

Los lisosomas son el lugar principal de digestión intracelular¹⁰

Los **lisosomas** son vesículas membranosas que contienen enzimas hidrolíticas utilizadas para la digestión intracelular controlada de macromoléculas. Contie-



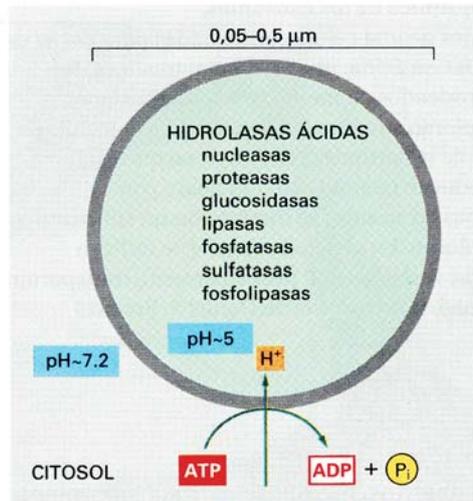


Figura 13-17 Lisosomas. Las hidrolasas ácidas son enzimas hidrolíticas que están activas en condiciones ácidas. El lumen se mantiene a un pH ácido mediante la acción de una bomba de H⁺ situada en la membrana, la cual utiliza la energía de hidrólisis del ATP para bombear H⁺ al interior del lisosoma.

nen alrededor de 40 tipos de enzimas hidrolíticas, entre las que se encuentran proteasas, nucleasas, glucosidasas, lipasas, fosfolipasas, fosfatasa, y sulfatasas. Todas ellas son **hidrolasas ácidas**, cuya actividad óptima se expresa a un pH cercano a 5, que es el pH que se mantiene en el interior de los lisosomas. En este sentido el citosol está doblemente protegido contra el ataque de su propio sistema digestivo. Normalmente, la membrana del lisosoma mantiene las enzimas alejadas del citosol, pero en el caso incluso de que se produzca alguna fuga, la dependencia ácida de la actividad de estas enzimas protege el contenido del citosol (cuyo pH es de aproximadamente 7,2).

Como en el caso de otros orgánulos intracelulares, el lisosoma no sólo contiene una dotación característica de enzimas sino una membrana envolvente también característica. La membrana lisosomal contiene, por ejemplo, proteínas de transporte que permiten que se escapen los productos finales de la digestión de macromoléculas, como los aminoácidos, azúcares y nucleótidos, de tal manera que estos productos puedan ser excretados o reutilizados por la célula. También contiene una bomba de protones que utiliza la energía de hidrólisis del ATP para bombear H⁺ al interior del lisosoma, manteniendo así el lumen a un pH ácido (Figura 13-17). La mayoría de las proteínas de la membrana lisosomal están altamente glucosiladas, lo cual puede ayudar a protegerlas de las proteasas lisosomales del lumen.

Como veremos más adelante, los materiales endocitados son inicialmente descargados a unos orgánulos llamados *endosomas* antes de ser liberados a los lisosomas. Los endosomas también tienen bombas de H⁺ que mantienen su lumen a un pH bajo, aunque no tan bajo como el de los lisosomas (Figura 13-18). Veremos cómo estas diferencias de pH son a menudo usadas para unir o separar las moléculas de sus receptores durante el transporte vesicular a lo largo de la ruta endocítica.

Figura 13-18 El bajo pH de los lisosomas y endosomas. Las proteínas marcadas con una sonda fluorescente sensible al pH (fluoresceína) y que son endocitadas por las células, pueden ser utilizadas para medir el pH en endosomas y lisosomas. Los diferentes colores son una muestra del pH que la sonda fluorescente encuentra en estos orgánulos. El pH en los lisosomas (*rojo*) es alrededor de 5, mientras que el pH en los diversos tipos de endosomas (*azul y verde*) va de 5,5 a 6,5. Este método fue usado originalmente en la década de 1890 por Metchnikoff, quien alimentaba células fagocíticas mediante partículas de tornasol y observaba cómo variaba su color del azul al rojo después de la ingestión. (Por cortesía de Fred Maxfield y Kenneth Dunn.)

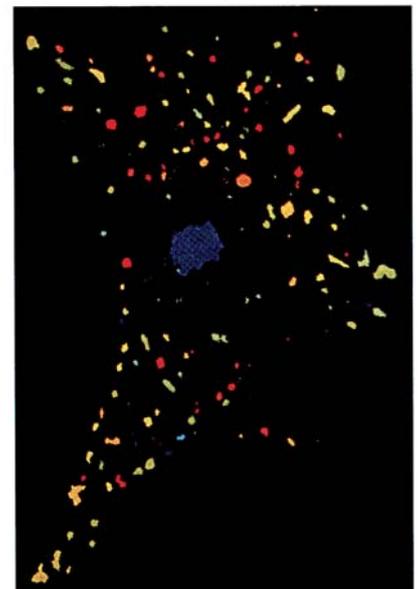
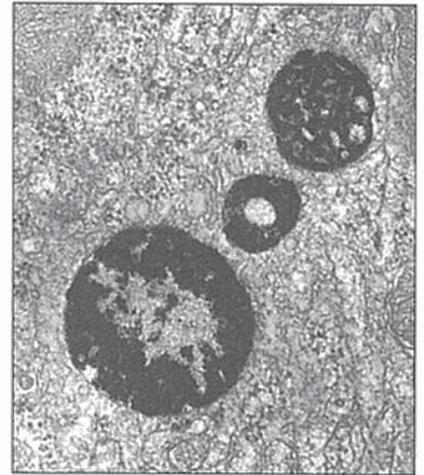
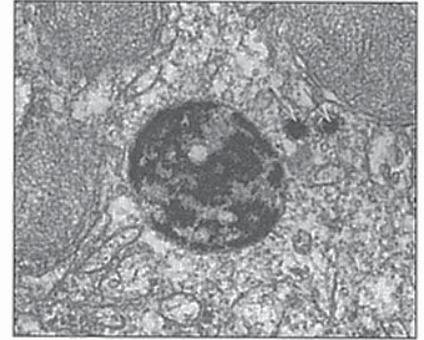


Figura 13-19 Visualización histoquímica de los lisosomas.

Electronmicrografía de dos secciones de una célula contrastadas para poner de manifiesto la localización de la fosfatasa ácida, una enzima marcadora de lisosomas. Los grandes orgánulos rodeados de membrana, que contienen precipitados densos de fosfato de plomo son lisosomas. Su diversa morfología refleja variaciones de la cantidad y de la naturaleza del material que están digiriendo. Los precipitados se producen cuando el tejido fijado con glutaraldehído (para fijar las enzimas en su sitio) se incubó con un sustrato de la fosfatasa en presencia de iones plomo. En el panel superior se indican mediante flechas rojas dos pequeñas vesículas que probablemente transportan hidrolasas desde el complejo de Golgi. (Por cortesía de Daniel S. Friend.)



Los lisosomas son heterogéneos¹¹

Los lisosomas fueron inicialmente descubiertos mediante el fraccionamiento bioquímico de extractos celulares, y más tarde fueron observados al microscopio electrónico. Son extraordinariamente diversos en cuanto a forma y tamaño, pero por procesos histoquímicos pueden ser identificados como miembros de una familia única de orgánulos, utilizando el precipitado producido por la acción de una hidrolasa ácida sobre su sustrato, para mostrar qué orgánulos contienen la enzima (Figura 13-19). Utilizando este criterio, los lisosomas se hallan en todas las células eucariotas.

La heterogeneidad de la morfología lisosomal contrasta con la uniformidad relativa de la mayoría de los demás orgánulos celulares. La diversidad refleja la amplia variedad de funciones digestivas mediadas por las hidrolasas ácidas, como la digestión de desechos intra y extracelulares, la digestión de microorganismos fagocitados, e incluso la nutrición celular. Por esta razón, a veces se considera a los lisosomas como una colección heterogénea de orgánulos distintos cuya característica común es un elevado contenido de enzimas hidrolíticas. Como veremos a continuación, es especialmente difícil aplicar una definición más ajustada que ésta en las células vegetales.

Las vacuolas de las plantas y de los hongos son lisosomas muy versátiles¹²

La mayoría de células vegetales y hongos (incluyendo las levaduras) tienen una o varias vesículas muy grandes y llenas de fluido, llamadas **vacuolas**, que ocupan más del 30% del volumen celular –cerca del 90% en algunos tipos celulares (Figura 13-20). Las vacuolas se parecen a los lisosomas de las células animales porque tienen numerosas enzimas hidrolíticas, pero sus funciones son muy diversas. Las vacuolas vegetales pueden actuar como almacén de nutrientes y de productos de desecho, como compartimento de degradación, incrementando el volumen celular de una forma económica (Figura 13-21), y controlando la presión de turgencia (la presión osmótica que empuja hacia afuera la pared celular y que impide que la planta se marchite). En una misma célula se encuentran a menudo diferentes vacuolas con diferentes funciones (por ejemplo, digestión y almacenamiento).

La vacuola es importante como aparato homeostático, permitiendo a las células vegetales resistir grandes variaciones de su entorno. Por ejemplo, cuando el pH del medio disminuye, el flujo de H^+ hacia el citosol es controlado, al menos en parte, aumentando el transporte de H^+ a la vacuola, de manera que el pH del citosol se mantiene constante. De forma parecida, muchas células vegetales mantienen una presión de turgencia casi constante a pesar de grandes cambios en la osmolaridad del fluido que les rodea. Esto lo consiguen cambiando la presión osmótica del citosol y de la vacuola –en parte por la hidrólisis y resíntesis controlada en la vacuola de algunos polímeros como el polifosfato, y en parte por la alteración del transporte de azúcares, aminoácidos y otros metabolitos a

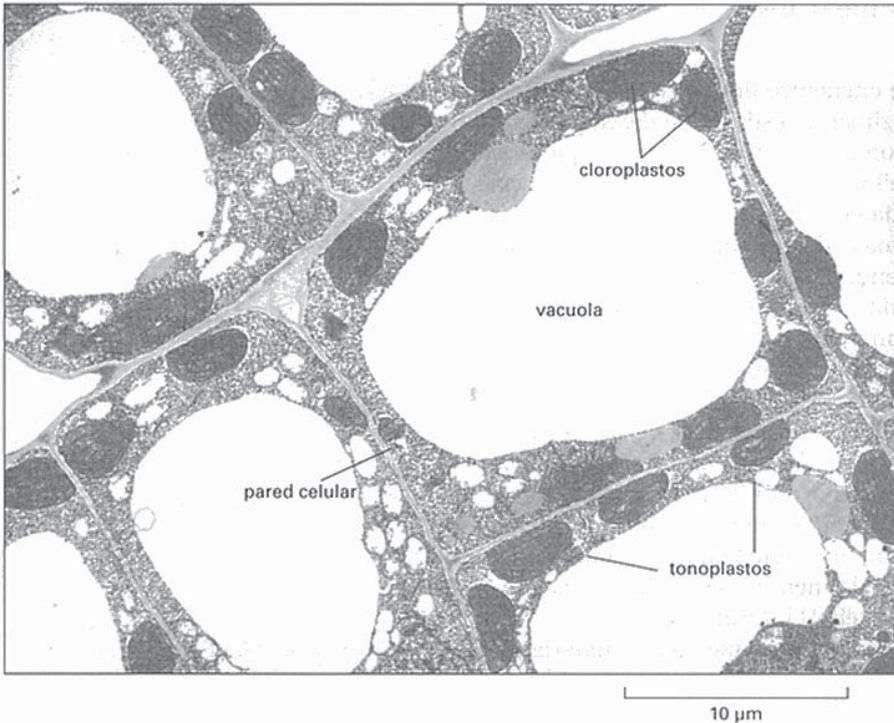


Figura 13-20 Las vacuolas de una célula vegetal. Esta electronmicrografía de células de una hoja joven de tabaco muestra cómo el citoplasma está reducido, debido a la enorme vacuola, a una delgada capa que contiene numerosos cloroplastos dispuestos contra la pared celular. La membrana de la vacuola recibe el nombre de tonoplasto. (Por cortesía de J. Burgess.)

través de las membranas plasmática y vacuolar. La presión de turgencia controla estos flujos regulando las actividades de los diferentes transportadores de cada bicapa lipídica.

Las sustancias almacenadas en las vacuolas vegetales varían entre las diferentes especies, desde la goma al opio y al aromatizante del ajo. A menudo, los productos almacenados tienen una función metabólica. Por ejemplo, las proteínas pueden ser guardadas durante años en las vacuolas de algunas células de muchas semillas, como los guisantes y las judías. Cuando estas semillas germinan, las proteínas son hidrolizadas y los aminoácidos que se movilizan proporcionan alimento al embrión. Los antocianos, pigmentos que se encuentran en las vacuolas, dan color a los pétalos de muchas flores atrayendo los insectos polinizadores, mientras que las moléculas nocivas que se liberan de las vacuolas cuando una planta es comida o dañada, proporcionan un sistema de defensa contra los depredadores.

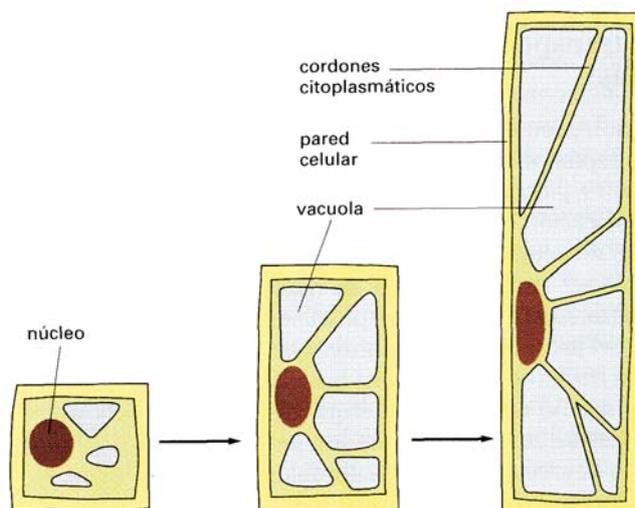


Figura 13-21 El papel de la vacuola en el control del tamaño de las células vegetales. Es posible conseguir un aumento del volumen celular sin que se produzca un aumento del volumen del citosol. La relajación local de la pared permite una expansión celular impulsada por la turgencia que conlleva la captación de agua en el interior de una vacuola en expansión (véase Figura 19-67). Finalmente el citoplasma queda confinado a un delgado estrato periférico, comunicado con la región perinuclear mediante cordones citoplasmáticos transvacuolares que contienen haces de filamentos de actina (no se muestran).

Los materiales son transportados hasta los lisosomas a través de varias rutas¹³

En general, los lisosomas son puntos de encuentro donde convergen diferentes corrientes del tráfico intracelular. Las enzimas digestivas son descargadas a ellos mediante una ruta que va por el ER y el complejo de Golgi, mientras que las sustancias que deben ser digeridas llegan a ellos a través de por lo menos tres vías.

De estas tres vías, la mejor estudiada es la que siguen las macromoléculas que son endocitadas. De forma breve (más adelante discutiremos los detalles), las moléculas endocitadas son inicialmente transferidas a unas vesículas intracelulares pequeñas e irregulares, llamadas *endosomas tempranos*. Desde ellos, algunas de las moléculas endocitadas son seleccionadas y recicladas a la membrana plasmática, mientras que otras se dirigen a los *endosomas tardíos*. Allí, los materiales que van a ser digeridos se encuentran con las hidrolasas lisosomales que provienen del complejo de Golgi, debido a la fusión de las vesículas de transporte de ambas rutas. El interior de los endosomas tardíos es medianamente ácido (pH ~6), y se cree que es el lugar donde empieza la digestión hidrolítica de las moléculas endocitadas. A partir de los endosomas tardíos se forman los lisosomas, a pesar de que no se sabe exactamente cómo ocurre. Durante este proceso de conversión, algunas moléculas de la membrana de los endosomas son eliminadas y se produce una disminución del pH interno.

Todas las células disponen de una segunda ruta que aporta materiales a los lisosomas para su degradación, mediante la cual pueden ser destruidas partes obsoletas de la propia célula –un proceso denominado **autofagia**. En una célula hepática, por ejemplo, una mitocondria tiene una vida media de 10 días. En las imágenes de microscopía electrónica de células normales se pueden observar lisosomas conteniendo (y probablemente digiriendo) mitocondrias así como otros orgánulos. Al parecer, el proceso de digestión supone que el orgánulo sea envuelto por membranas derivadas del ER, generándose un *autofagosoma*. Se cree que el autofagosoma se fusiona con un lisosoma (o un endosoma tardío). El proceso está altamente regulado, de forma que durante la remodelación celular se pueden seleccionar diferentes componentes celulares y ser destinados a su destrucción: por ejemplo, el ER liso que prolifera en una célula hepática en respuesta a la droga pentobarbital (discutido en el Capítulo 12) es eliminado selectivamente por medio de la autofagia cuando esta droga es retirada.

Como veremos más adelante, la tercera ruta que proporciona materiales a los lisosomas sólo tiene lugar en células que están especializadas en la *fagocitosis* de grandes partículas y de microorganismos. Estas células (macrófagos y neutrófilos en vertebrados) pueden ingerir grandes objetos y formar un *fagosoma*. Se cree que el fagosoma se transforma en lisosoma de la misma forma que hemos explicado para el caso del autofagosoma. Estas tres rutas se resumen en la Figura 13-22.

Algunas proteínas citosólicas son transportadas directamente a los lisosomas para ser degradadas¹⁴

Podría existir una cuarta ruta de degradación proteica que condujese hasta los lisosomas: algunas proteínas poseen ciertas señales en su superficie [llamadas secuencias KFERQ, de lisina (K), fenilalanina (F), glutamato (E), arginina (R) y glutamina (Q)] que son responsables de su selección para ser descargadas en los lisosomas y degradadas. Es posible que las secuencias KFERQ unan estas proteínas a determinados orgánulos que vayan a ser autofagocitados, de manera que de forma indirecta también serían destruidas. Alternativamente, puede existir un transportador específico en la membrana del lisosoma que reconozca estas señales y transfiera directamente las proteínas a través de la membrana lisosomal.

Se conocen antecedentes de mecanismos no convencionales que desplazan proteínas a través de las membranas. Algunas de las proteínas que son secretadas al exterior de la célula, como el factor básico de crecimiento de los fibroblastos o la interleuquina-1, llegan a la superficie celular sin haber pasado nunca por la ruta

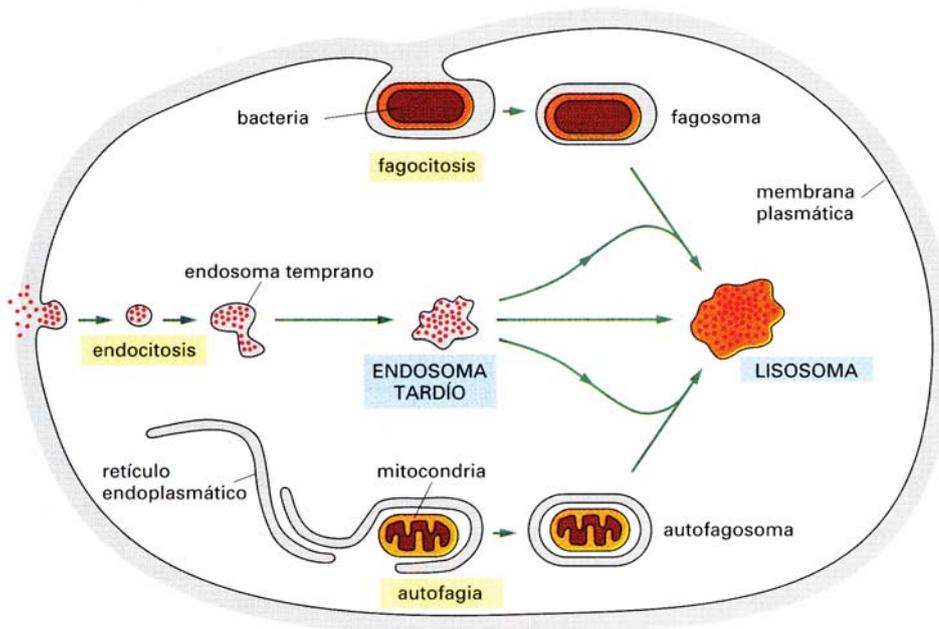


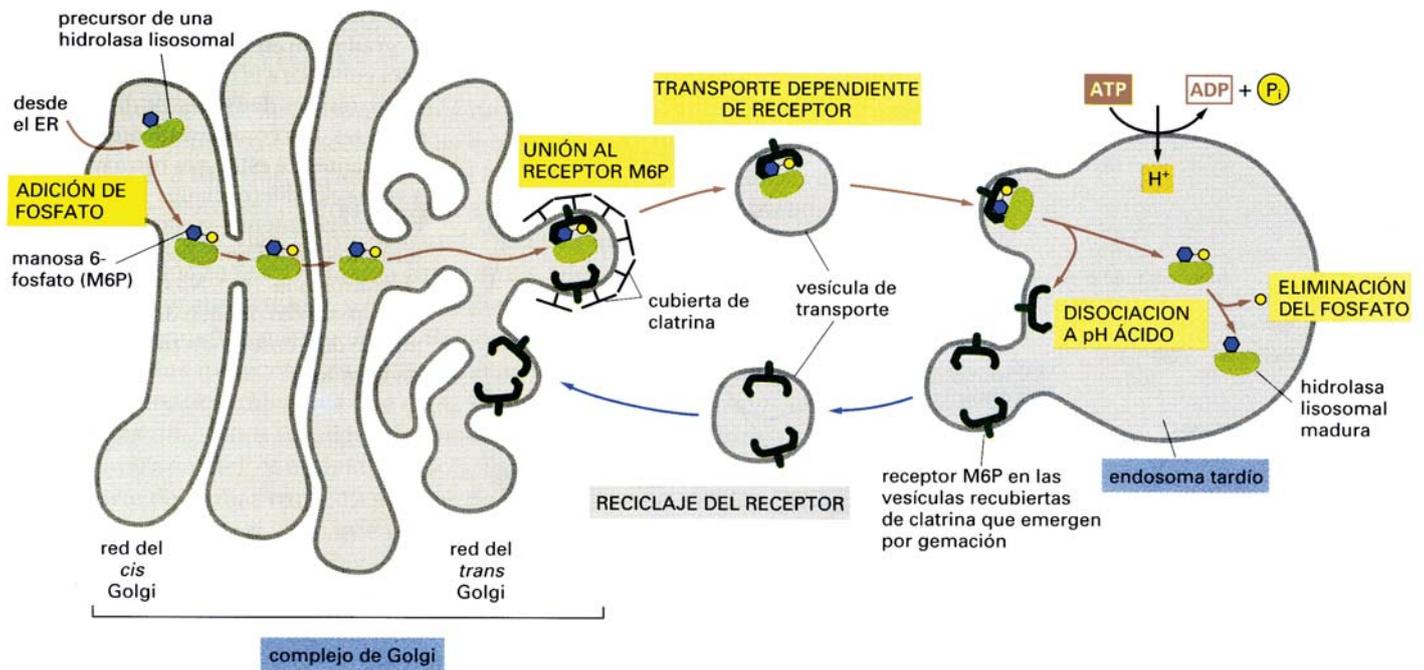
Figura 13-22 Tres rutas de degradación en los lisosomas. Cada ruta conduce a la digestión intracelular de materiales derivados de diferentes orígenes. Los compartimientos resultantes de estas tres rutas pueden, a veces, ser diferenciados morfológicamente –a ello se deben los términos “autofagolisosoma”, “fagolisosoma”, etc. No obstante, estos lisosomas sólo pueden diferenciarse por los diferentes materiales que están digiriendo.

clásica a través del ER y del complejo de Golgi. En la mayoría de los casos no se conoce qué membrana es atravesada por la proteína o cómo se cataliza su transporte transmembrana. En el caso de un pequeño péptido de levaduras, el factor feromona α , se sabe que el transporte tiene lugar directamente a través de la membrana plasmática mediante una bomba proteica impulsada por ATP que pertenece a la familia proteica de los transportadores ABC (discutido en el Capítulo 11). Así, es posible que bombas parecidas a ésta proporcionen sistemas de transporte “privados”, cada uno de ellos especializado en la transferencia de un pequeño y específico grupo de proteínas a través de una membrana en particular.

Las enzimas lisosomales son clasificadas en la red del *trans* Golgi por un receptor proteico unido a membrana que reconoce la manosa 6-fosfato¹⁵

Ahora consideraremos con más detalle el sistema que conduce la otra mitad del tráfico hasta los lisosomas –las hidrolasas lisosomales especializadas y las proteínas de membrana. Ambos tipos de proteínas se sintetizan en el ER rugoso y son transportadas a través del complejo de Golgi. Las vesículas de transporte que conducen estas proteínas hasta los endosomas tardíos –los cuales forman más tarde los lisosomas– parten de la red del *trans* Golgi, incorporando las proteínas lisosomales y excluyendo todas las demás proteínas, que serán empaquetadas en otras vesículas de transporte y serán descargadas en otros lugares.

¿Cómo son reconocidas y seleccionadas las proteínas lisosomales con la precisión necesaria? Para las hidrolasas lisosomales la respuesta es conocida. Estas hidrolasas presentan un solo marcador en forma de grupos de **manosa 6-fosfato (M6P)**, los cuales son añadidos exclusivamente a los *N*-oligosacáridos de estas enzimas lisosomales solubles, probablemente mientras están en el lumen de la red del *cis* Golgi. Los grupos M6P son reconocidos por los **receptores M6P**, que son proteínas transmembrana presentes en la red del *trans* Golgi. Estos receptores unen a las hidrolasas lisosomales y ayudan a concentrarlas en vesículas de transporte específicas que surgen por gemación de la red del *trans* Golgi y acaban fusionándose con los endosomas tardíos, descargando su contenido en el lumen de estos orgánulos. Como veremos más adelante, los receptores M6P son empaquetados en vesículas de transporte específicas en la red del *trans* Golgi mediante unas proteínas de recubrimiento especiales que se ensamblan en la superficie citosólica de la membrana y permiten la gemación de las vesículas desde la red del *trans* Golgi.



El receptor de manosa 6-fosfato viaja como una lanzadera, adelante y atrás, entre determinadas membranas¹⁶

El receptor de la manosa 6-fosfato une su oligosacárido específico a pH 7 en la red del *trans* Golgi y lo libera a pH 6, que es el pH del interior de los endosomas tardíos. Así en cuanto llegan al interior de estos endosomas tardíos, las enzimas lisosomales se disocian de los receptores M6P y empiezan a digerir el material endocitado transferido desde los endosomas tempranos. Una vez han liberado las enzimas, los receptores son recuperados y devueltos a la membrana de la red del *trans* Golgi, mediante vesículas de transporte que surgen por gemación de los endosomas tardíos (Figura 13-23). No se sabe si el transporte de vuelta al complejo de Golgi requiere un péptido señal específico en la cola citoplasmática del receptor M6P o si tiene lugar por defecto. Este proceso de *reciclaje de membrana* desde el endosoma tardío hacia el complejo de Golgi es similar al reciclaje que ocurre entre otros subcompartimientos de las rutas secretora y endocítica que veremos más adelante.

El proceso de clasificación de las hidrolasas lisosomales es el modelo mejor conocido de los diversos fenómenos de clasificación mediados por vesículas de transporte que tienen lugar en las células eucariotas. Aunque no es probable que en todos los casos se utilice un marcador oligosacárido, la estrategia general es seguramente típica de otros procesos de clasificación mediados por vesículas. La carga es reconocida y recogida por los receptores de carga unidos a la membrana, durante el proceso de gemación de vesículas específicas recubiertas de clatrina. Estas *vesículas cargadas* se fusionan con una membrana diana específica, la carga es liberada en el compartimiento diana y los receptores vacíos vuelven a su compartimiento original.

No toda la carga que está destinada a acabar en los lisosomas llega a su destino. Parece que algunas de las hidrolasas lisosomales consiguen escapar del proceso de empaquetamiento en la red del *trans* Golgi y son transportadas, vía la ruta por defecto, a la superficie celular, desde donde son secretadas al fluido extracelular. No obstante, algunos receptores M6P también van a la membrana plasmática para recapturar a las hidrolasas lisosomales escapadas y devolverlas mediante *endocitosis mediada por receptor* a los lisosomas vía endosomas tempranos y tardíos.

Esta *ruta basurero* fue originalmente descubierta en células humanas que eran genéticamente defectuosas en una hidrolasa lisosomal específica. Un ejem-

Figura 13-23 Transporte de las hidrolasas lisosomales recién sintetizadas a los lisosomas. Los precursores de las hidrolasas son etiquetados con grupos manosa 6-fosfato (M6P) en la red del *cis* Golgi, y separados de todas las demás proteínas en la red del *trans* Golgi. Esta separación ocurre porque las vesículas recubiertas con clatrina que emergen por gemación de la red del *trans* Golgi presentan elevadas concentraciones de receptores específicos de manosa 6-fosfato, los cuales unen las hidrolasas lisosomales. Estas vesículas se fusionan con los endosomas tardíos. Al bajo pH de los endosomas tardíos, las hidrolasas se disocian de sus receptores, los cuales se reciclan hacia el complejo de Golgi para ser reutilizados en siguientes rondas de transporte. La posterior eliminación del fosfato de la manosa de las hidrolasas disminuye la probabilidad de que las hidrolasas vuelvan de nuevo al complejo de Golgi, unidas al receptor.

plo de ello es la *enfermedad de Hurler*, en la cual la enzima necesaria para la rotura de los glucosaminoglucanos no es funcional. En estos individuos mutantes se acumulan en los lisosomas grandes cantidades de compuestos no digeridos. Por esta razón estas enfermedades se conocen con el nombre de *enfermedades de acúmulo lisosomal*. Cuando se cultivan las células de individuos mutantes, se observan los mismos defectos intracelulares. No obstante, si se hace un cocultivo entre las células mutantes y células de un individuo normal, dejan de observarse los defectos. Las células mutantes son rescatadas porque pueden captar del medio de cultivo la hidrolasa lisosomal que no tienen. Más adelante veremos cómo el estudio de estas enfermedades han permitido conocer una parte importante del mecanismo de clasificación de las hidrolasas lisosomales.

Una región señal en la cadena polipeptídica proporciona la clave para marcar una enzima lisosomal con la manosa 6-fosfato¹⁷

El sistema de clasificación que segrega las hidrolasas lisosomales y las dirige hacia los endosomas tardíos funciona porque en el complejo de Golgi se añaden grupos de manosa 6-fosfato tan sólo a las glucoproteínas adecuadas. Este marcaje específico requiere un reconocimiento también específico de las hidrolasas por la enzima del Golgi responsable de añadir los grupos M6P. Dado que todas las glucoproteínas abandonan el ER con las cadenas de *N*-oligosacáridos idénticas, la señal para añadir las unidades M6P a los oligosacáridos ha de residir en alguna parte de la cadena polipeptídica de cada hidrolasa.

La adición de grupos M6P a las hidrolasas lisosomales está catalizada por dos enzimas que actúan de manera secuencial (Figura 13-24). La primera es una fosfotransferasa con un *lugar de reconocimiento* que une específicamente la hidrolasa, y un *lugar catalítico*; la señal reconocida por el lugar de reconocimiento no es un péptido señal sino una *región señal* dependiente de conformación (véase Figura 12-8). Cuando la hidrolasa está unida, la fosfotransferasa añade grupos GlcNAc-P a una o dos de las manosas de cada cadena de oligosacárido (Figura 13-25). Entonces una segunda enzima elimina el residuo GlcNAc, creando el marcador de la manosa 6-fosfato (véase Figura 13-24).

La mayoría de las hidrolasas lisosomales tienen varios oligosacáridos, por lo que adquieren muchos residuos de M6P, lo cual amplifica enormemente la señal. Así, mientras que una hidrolasa lisosomal se une al sitio de reconocimiento de la fosfotransferasa con una constante de afinidad (K_d) de aproximadamente 10^5 litros/mol, la hidrolasa multifosforilada se une al receptor M6P con una K_d de aproximadamente 10^9 litros/mol, lo cual supone un incremento en la afinidad de 10 000 veces.

Los defectos en la GlcNAc-fosfotransferasa causan una enfermedad de acúmulo lisosomal en humanos¹⁸

Las *enfermedades de acúmulo lisosomal* están causadas por defectos genéticos que afectan a una o más de las hidrolasas lisosomales, lo cual provoca una acumulación en los lisosomas de sus substratos no digeridos. Este acúmulo tiene

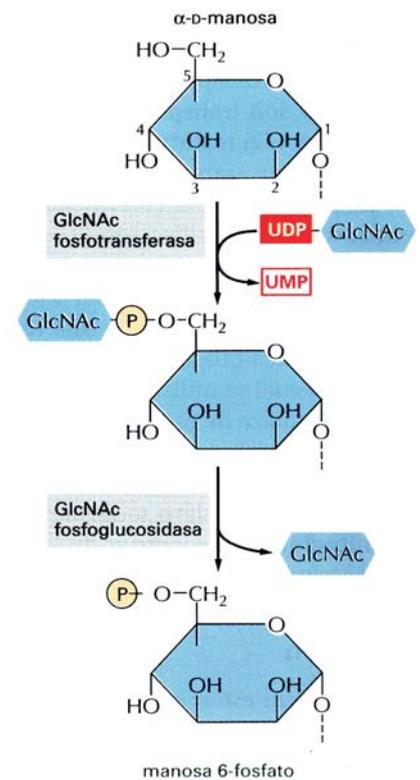


Figura 13-24 Síntesis del marcador manosa 6-fosfato sobre una hidrolasa lisosomal. La síntesis ocurre en dos pasos. En primer lugar, la GlcNAc fosfotransferasa transfiere residuos de GlcNAc-P a la posición 6 de diversos residuos de manosa de los *N*-oligosacáridos de la hidrolasa lisosomal. En segundo lugar, una fosfoglicosidasa elimina el residuo GlcNAc, generando el marcador manosa 6-fosfato. La primera enzima está activada específicamente por una zona señal presente en las hidrolasas lisosomales (véase Figura 13-25), mientras que la fosfoglicosidasa es una enzima no específica. Esta modificación de determinados residuos de manosa en la red del *cis* Golgi protege las manosas de ser eliminadas por las manosidasas que más tarde encontrarán en el compartimiento *medial* del Golgi.

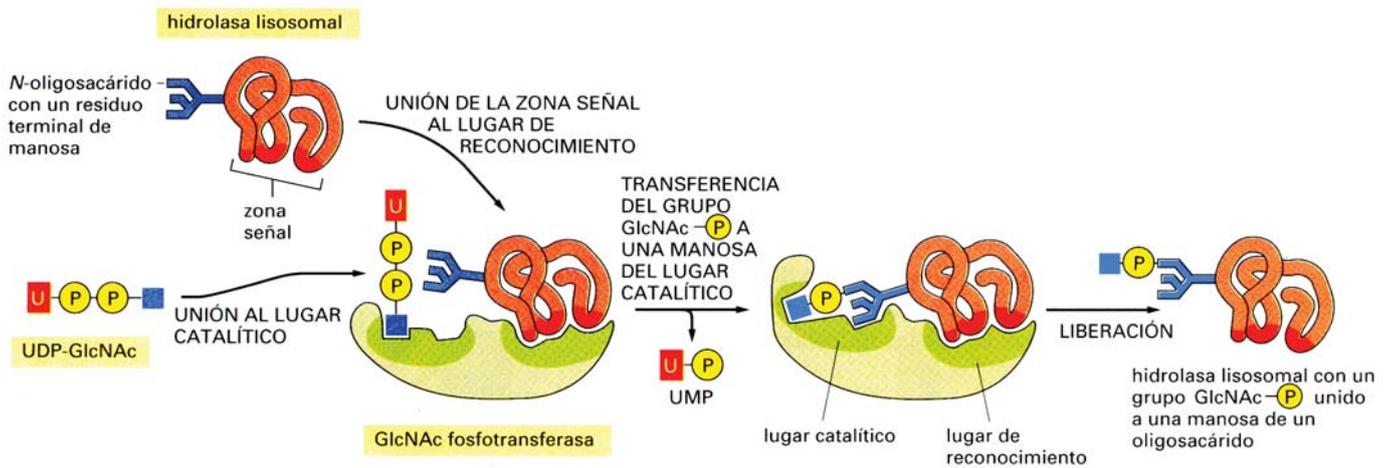


Figura 13-25 Reconocimiento de una hidrolasa lisosomal. La enzima GlcNAc fosfotransferasa, que reconoce las hidrolasas lisosomales en el complejo de Golgi, tiene un lugar catalítico y un lugar de reconocimiento separados. El lugar catalítico une *N*-oligosacáridos ricos en manosa y UDP-GlcNAc. El lugar de reconocimiento se une a una zona señal que únicamente se encuentra sobre la superficie de las hidrolasas lisosomales.

consecuencias patológicas profundas. Habitualmente, se producen como consecuencia de una mutación en un gen estructural que codifica una hidrolasa lisosomal; éste es el caso de la enfermedad de Hurler, mencionada anteriormente. No obstante, la forma más dramática de una enfermedad de acúmulo lisosomal es una alteración muy poco frecuente denominada enfermedad de inclusión celular (*enfermedad celular-I*). En esta enfermedad la mayoría de las enzimas hidrolíticas han desaparecido de los lisosomas de los fibroblastos y sus substratos no digeridos se acumulan formando grandes “inclusiones” en las células de los pacientes. La enfermedad celular-I es debida a un solo defecto génico que, como en el caso de la mayoría de las deficiencias genéticas, es recesivo –es decir, sólo presentan la enfermedad los individuos que tienen defectuosas las dos copias del gen.

En la enfermedad celular-I todas las hidrolasas que han desaparecido de los lisosomas se hallan en la sangre; la anomalía se produce por un error en el proceso de clasificación de estas hidrolasas en el complejo de Golgi, error que provoca que las hidrolasas sean secretadas en lugar de ser transportadas a los lisosomas. Este error de clasificación es debido a una GlcNAc-fosfotransferasa defectuosa o ausente. En este caso, las enzimas lisosomales no son fosforiladas en la red del *cis* Golgi, por lo que no son captadas por los receptores M6P ni empaquetadas en las vesículas de transporte apropiadas en la red del *trans* Golgi. Por el contrario, las hidrolasas son transportadas a la superficie celular y son secretadas por la ruta por defecto. En realidad ésta fue la primera evidencia de la existencia de una ruta por defecto; y comparando bioquímicamente las hidrolasas lisosomales con las de los pacientes de la enfermedad celular-I se descubrió que la manosa 6-fosfato era la señal de clasificación lisosomal y se comprendió toda la ruta de clasificación de las hidrolasas lisosomales.

En la enfermedad celular-I los lisosomas de algunos tipos celulares, como los hepatocitos, contienen una dotación normal de enzimas lisosomales. Este hecho implica que tiene que existir otra vía para dirigir las hidrolasas a los lisosomas, la cual se utiliza en algunos tipos celulares pero no en otros. Se desconoce la naturaleza de esta vía independiente de M6P. De manera similar, las proteínas de la membrana lisosomal son clasificadas en todas las células desde la red del *trans* Golgi hasta los endosomas tardíos, a través de una vía independiente de M6P. No está claro todavía por qué las células necesitan más de una vía de clasificación para construir un lisosoma, aunque quizá no sea sorprendente que en proteínas solubles y unidas a membrana actúen mecanismos diferentes.

Resumen

Los lisosomas están especializados en la digestión intracelular. Contienen proteínas de membrana características y una amplia variedad de enzimas hidrolíticas que trabajan mejor a pH 5, que es el pH interno de los lisosomas. El pH ácido de los

lisosomas se mantiene por una bomba de ATP de su membrana, que impulsa protones. Las proteínas lisosomales recién sintetizadas son transferidas al lumen del ER, son transportadas a través del complejo de Golgi, y luego conducidas por medio de vesículas de transporte desde la red del trans Golgi a los endosomas tardíos.

Las hidrolasas lisosomales contienen N-oligosacáridos que son modificados covalentemente de una forma característica en la red del cis Golgi, de manera que sus residuos de manosa son fosforilados. Estos grupos de manosa 6-fosfato (M6P) son reconocidos por un receptor de la red del trans Golgi, el cual separa las hidrolasas del resto de las moléculas y ayuda a empaquetarlas en el interior de vesículas de transporte, las cuales descargan su contenido en los endosomas tardíos y después en los lisosomas. Estas vesículas de transporte actúan como un servicio de transporte que desplaza el receptor M6P de un lugar a otro, entre la red del trans Golgi y los endosomas tardíos. El bajo pH de los endosomas tardíos disocia las hidrolasas lisosomales de su receptor, haciendo que el transporte de las hidrolasas sea unidireccional.

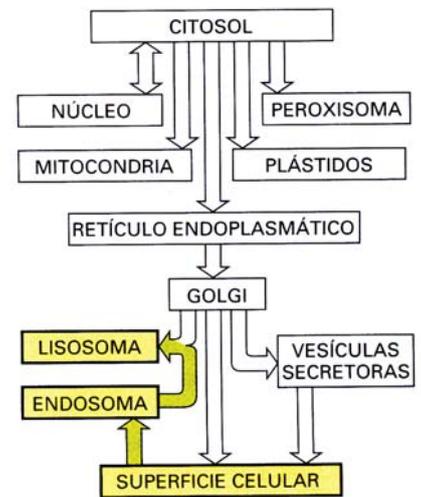
Transporte desde la membrana plasmática vía endosomas: endocitosis¹⁹

Las rutas que llevan hacia los lisosomas desde la superficie celular empiezan con la **endocitosis**, mediante la cual las células captan macromoléculas, sustancias particuladas y, en casos especiales, otras células.

La sustancia que va a ser ingerida es rodeada progresivamente por una pequeña porción de la membrana plasmática, que primero se invagina y luego se estrangula formando una vesícula intracelular que contiene el material ingerido. En función del tipo de vesículas que se forman, se pueden distinguir dos tipos de endocitosis: la *pinocitosis* (“bebida de la célula”), que implica la ingestión de fluidos y de solutos vía pequeñas vesículas (≤ 150 nm de diámetro); y la *fagocitosis* (“comida de la célula”) que comporta la ingestión de grandes partículas tales como microorganismos o restos celulares, mediante grandes vesículas llamadas *fagosomas*, generalmente de diámetro superior a 250 nm. Aunque la mayoría de las células eucariotas ingieren continuamente fluidos y solutos por pinocitosis, las grandes partículas son ingeridas principalmente por células fagocíticas especializadas.

Células fagocíticas especializadas pueden ingerir grandes partículas²⁰

La **fagocitosis** es una forma especial de endocitosis en la que se ingieren grandes partículas, tales como microorganismos y restos de células, vía grandes vesículas de endocitosis llamadas *fagosomas*. En los protozoos, la fagocitosis constituye un sistema de alimentación: las grandes partículas atrapadas en los fagosomas acaban en los lisosomas, y los productos de los procesos digestivos posteriores pasan al citoplasma donde son utilizados como alimento. La mayoría de las células de los organismos pluricelulares son incapaces de ingerir grandes partículas de forma eficaz. En el intestino, las grandes partículas de alimento son fraccionadas fuera de las células antes de ser captadas por ellas. En la mayoría de los animales la fagocitosis es importante en otros procesos diferentes al de la nutrición, y la llevan a cabo células especializadas que son fagocitos “profesionales”. En los mamíferos existen dos tipos de glóbulos blancos que actúan como fagocitos: los **macrófagos** (que además de encontrarse en la sangre, se hallan ampliamente distribuidos en los tejidos) y los **neutrófilos**. Estos dos tipos de células proceden de un precursor común (discutido en Capítulo 22), y nos defienden contra las infecciones mediante la ingestión de los microorganismos invasores. Los macrófagos también desempeñan un importante papel en la eliminación tanto de células viejas y lesionadas como de restos celulares. En términos cuantitativos, esta última función es la más importante: en cada uno de nosotros los macrófagos fagocitan más de 10^{11} eritrocitos viejos cada día.



Mientras que las vesículas endocíticas implicadas en la pinocitosis son pequeñas y uniformes, el diámetro de los **fagosomas** está determinado por el tipo de partículas que ingieren, y pueden llegar a ser tan grandes como la propia célula fagocítica (Figura 13-26). Los fagosomas se fusionan con los lisosomas, y el material ingerido es degradado; en los lisosomas permanecen sustancias no digeribles, formando *corpos residuales*. Algunos de los componentes de la membrana plasmática internalizada son recuperados del fagosoma mediante vesículas de transporte y devueltos a la membrana plasmática.

Para que una partícula sea fagocitada, primero ha de unirse a la superficie del fagocito. No obstante, no se ingieren todas las partículas que pueden unirse. Los fagocitos tienen toda una gama de receptores de superficie especializados que se encuentran unidos funcionalmente a la maquinaria fagocítica de la célula. A diferencia de la pinocitosis, que es un proceso constitutivo que ocurre continuamente, la fagocitosis es un proceso regulado en el que los receptores activados transmiten la señal al interior de la célula, iniciándose la respuesta. Los reguladores mejor caracterizados de este proceso son los anticuerpos, que nos protegen contra los microorganismos infecciosos uniéndose a su superficie formando una cubierta en la que las colas de los anticuerpos (llamadas regiones Fc) se hallan expuestas al exterior. Esta cubierta de anticuerpos es reconocida entonces por los *receptores Fc* de la superficie de los macrófagos y de los neutrófilos (véase Figura 23-20). La unión de partículas recubiertas por anticuerpos a estos receptores induce a la célula fagocítica a extender pseudópodos que engullen a la partícula, formando un fagosoma (Figura 13-27).

Se han caracterizado algunas otras clases de receptores que provocan fagocitosis: por ejemplo, los que reconocen el *complemento* (una clase de moléculas que circulan por la sangre y que colaboran con los anticuerpos marcando las células indeseables para ser destruidas, discutido en Capítulo 23), y los que reconocen directamente oligosacáridos de la superficie de ciertos microorganismos. No se sabe qué receptores de los macrófagos reconocen las células viejas o dañadas, aunque se sospecha que en algunos casos están implicadas las proteínas de adhesión celular de la familia de las integrinas (discutido en Capítulo 22).

Las vesículas de pinocitosis se forman en la membrana plasmática a partir de depresiones revestidas²¹

Prácticamente todas las células eucariotas ingieren continuamente zonas de su membrana plasmática en forma de pequeñas vesículas pinocíticas (endocíticas)

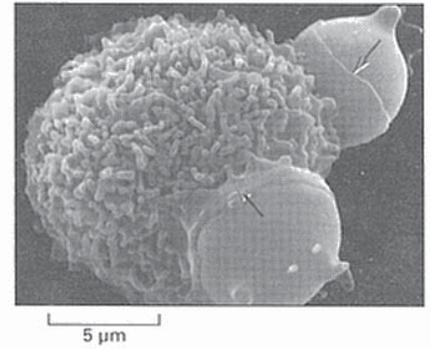
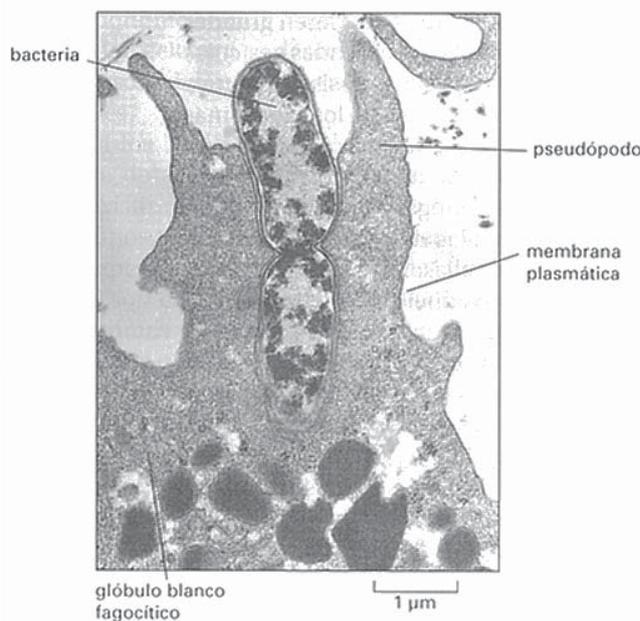
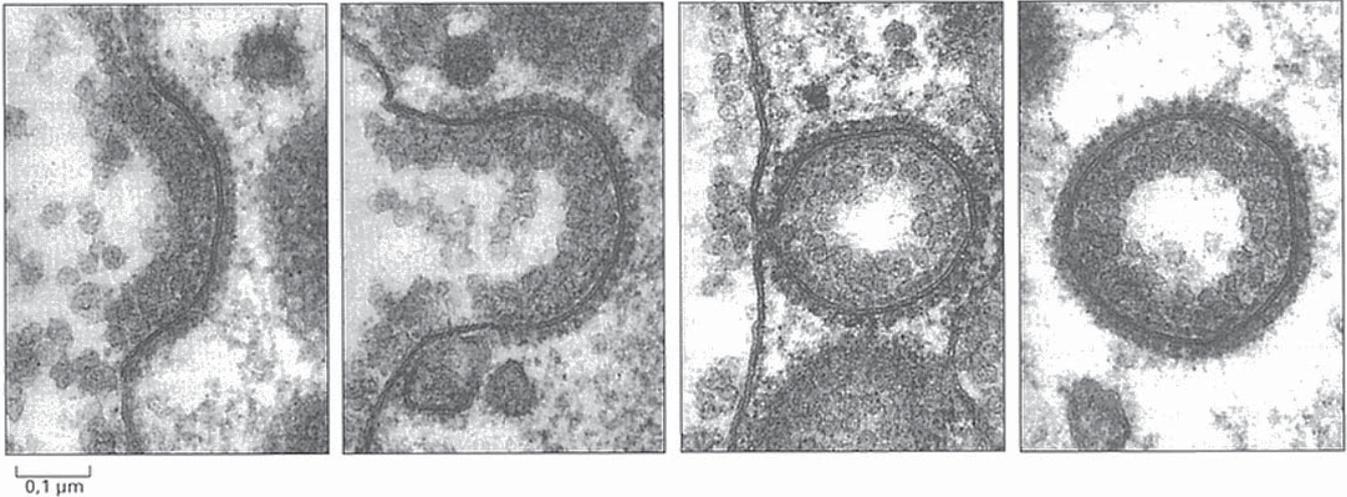


Figura 13-26 Fagocitosis por un macrófago. Electronmicrografía de barrido de un macrófago de ratón fagocitando dos eritrocitos modificados químicamente. Las flechas rojas indican los bordes de las finas extensiones (pseudópodos) del macrófago que se proyectan como collares engullendo los eritrocitos. (Por cortesía de Jean Paul Revel.)

Figura 13-27 Fagocitosis por un neutrófilo. Electronmicrografía de un neutrófilo fagocitando una bacteria que se hallaba en proceso de división. (Por cortesía de Dorothy F. Bainton.)



que posteriormente retornan a la superficie de la célula. La velocidad a la que se internaliza la membrana plasmática en este proceso de **pinocitosis** varía de un tipo celular a otro, pero normalmente es bastante elevada. Por ejemplo, un macrófago ingiere cada hora una cantidad de fluido igual al 25% de su propio volumen. Esto significa que cada minuto ha de ingerir un 3% de su membrana plasmática, o un 100% en media hora. Los fibroblastos presentan una velocidad menor, mientras que algunas amebas ingieren la membrana plasmática todavía más rápidamente. Dado que el área de la superficie y el volumen celular no varían durante este proceso, está claro que toda la membrana que desaparece por endocitosis se ha de ir añadiendo por *exocitosis* (el proceso contrario, discutido más adelante). En este sentido, endocitosis y exocitosis son procesos ligados que se puede considerar que constituyen un **ciclo endocítico-exocítico**.

Normalmente, la parte endocítica de este ciclo empieza en regiones especializadas de la membrana plasmática llamadas **depresiones revestidas de clatrina** (clathrin-coated pits), que ocupan aproximadamente un 2% del área total de la membrana plasmática. En electronmicrografías de las membranas plasmáticas estudiadas mediante las técnicas de congelación rápida por sublimación (rapid freeze, deep-etch) estas depresiones aparecen como invaginaciones de la membrana plasmática revestidas en su superficie interna (citoplasmática) con estructuras densas. Estos revestimientos están formados por *clatrina*, la cual, junto con otras proteínas, forma una estructura característica que discutiremos más adelante. La vida media de las depresiones revestidas de clatrina es corta: un minuto después de haber sido formadas, se invaginan hacia el interior de la célula y se separan de la membrana formando las **vesículas revestidas de clatrina** (Figura 13-28). En fibroblastos aislados se ha estimado que aproximadamente cada minuto, 2500 vesículas revestidas de clatrina abandonan la membrana plasmática. Estas vesículas revestidas son más transitorias incluso que las depresiones revestidas: segundos más tarde de ser formadas, se despojan de su revestimiento siendo así capaces de fusionarse con los endosomas tempranos. Dado que las depresiones revestidas de clatrina están llenas de fluido extracelular, cuando se invaginan formando vesículas revestidas también se internalizan las sustancias disueltas en el fluido extracelular –un proceso denominado **endocitosis de la fase fluida**.

Las depresiones revestidas de clatrina pueden actuar como un mecanismo concentrador internalizando macromoléculas extracelulares específicas²²

En la mayoría de células animales, las depresiones y las vesículas revestidas de clatrina proporcionan una ruta eficiente para captar macromoléculas específi-

Figura 13-28 Formación de vesículas revestidas de clatrina a partir de la membrana plasmática.

Electronmicrografías que ilustran la probable secuencia de acontecimientos durante la formación de una vesícula revestida de clatrina a partir de una depresión revestida de clatrina. Las depresiones y las vesículas revestidas que aparecen en las fotografías son mucho mayores que las que se presentan en las células de tamaño normal. Intervienen en la captación de lipoproteínas en un gran oocito de gallina, formando la yema del huevo. En la superficie extracelular de la membrana plasmática puede verse una capa electrodensa que corresponde a las lipoproteínas asociadas a sus receptores. (Por cortesía de M.M. Perry y A.B. Gilbert, de *J. Cell Sci.* 39:257-272, 1979, con permiso de The Company of Biologists.)

cas del fluido extracelular, un proceso llamado **endocitosis mediada por receptor**. Las macromoléculas se unen a receptores complementarios de la superficie celular (proteínas transmembrana), se acumulan en depresiones revestidas, y entran en la célula en forma de complejos receptor-macromolécula en vesículas recubiertas de clatrina. El proceso es muy similar al empaquetamiento de las hidrolasas lisosomales en el complejo de Golgi. Allí, como hemos visto, las moléculas que han de ser transportadas también se unen a receptores específicos de la membrana (receptores M6P) y son capturadas en vesículas de membrana que abandonan el compartimento y se desplazan por el citosol. Además, la gemación desde el complejo de Golgi de vesículas cargadas con las enzimas lisosomales también tienen lugar mediante un revestimiento de clatrina (véase Figura 13-23). Como discutiremos más adelante, se supone que, tanto para la membrana plasmática como para la del Golgi, la formación del recubrimiento en la cara citosólica es la responsable de la invaginación.

La endocitosis mediada por receptores proporciona un mecanismo de concentración selectivo que incrementa la eficiencia de la internalización de determinados ligandos más de 1000 veces. De esta manera se pueden captar específicamente y en grandes cantidades componentes incluso minoritarios del fluido extracelular, sin internalizar el gran volumen correspondiente de fluido extracelular. Un ejemplo bien conocido y fisiológicamente importante es el proceso mediante el cual las células de los mamíferos captan el colesterol.

Las células importan colesterol por endocitosis mediada por receptor²³

Muchas células animales captan colesterol por endocitosis mediada por receptor y así adquieren la mayor parte del colesterol que necesitan para la síntesis de las membranas. Si esta ingestión se bloquea, el colesterol se acumula en la sangre y puede contribuir a la formación en las paredes de los vasos sanguíneos de placas ateroscleróticas (depósitos de lípidos y de tejido fibroso que causan apoplejías e infartos de miocardio al impedir la circulación sanguínea). De hecho, fue a través del estudio de humanos con una alta predisposición genética por la aterosclerosis que se conoció por primera vez el mecanismo de endocitosis mediada por receptor.

La mayor parte del colesterol se transporta en la sangre unido a proteínas, formando unas partículas conocidas como **lipoproteínas de baja densidad**, o **LDL** (de Low Density Lipoproteins; Figura 13-29). Cuando la célula necesita colesterol para la síntesis de membranas, produce proteínas receptoras de LDL y las inserta en su membrana plasmática. Una vez en la membrana, los receptores de LDL difunden hasta asociarse con depresiones revestidas de clatrina que se hallan en proceso de formación (Figura 13-30A). Dado que las depresiones re-

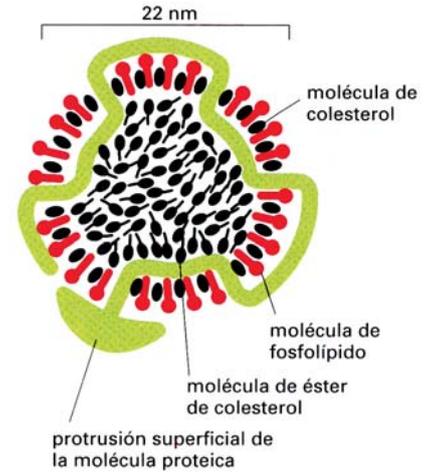


Figura 13-29 Lipoproteína de baja densidad (LDL). Cada partícula esférica tiene una masa de 3×10^6 daltons. En la región central contiene alrededor de 1500 moléculas de ésteres de colesterol esterificado con ácidos grasos de cadena larga. Esta región central está rodeada de una monocapa lipídica de unas 800 moléculas de fosfolípido y unas 500 de colesterol no esterificado. Además presenta una única molécula de proteína, de unos 500 000 daltons, que organiza la partícula y que es la responsable de la unión específica de las LDL a las proteínas receptoras de la superficie de las células.

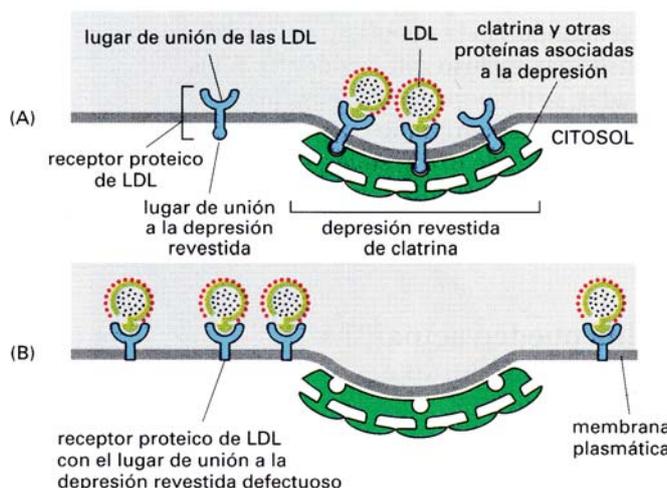


Figura 13-30 Receptores normales y mutantes de LDL. (A) Proteínas receptoras de LDL unidas a una depresión revestida de la membrana plasmática de una célula normal. El receptor humano de LDL es una glucoproteína transmembrana de paso único compuesta de unos 840 residuos de aminoácido, de los cuales únicamente 50 se hallan en el lado citoplasmático de la membrana. (B) Célula mutante en la que las proteínas receptoras de LDL son anormales porque carecen del dominio citoplasmático que les permite unirse a las vesículas revestidas. Estas células unen LDL pero no pueden captarlas. En la mayoría de poblaciones humanas, uno de cada 500 individuos tiene un gen que codifica un receptor de LDL alterado, y como consecuencia de ello, tiene una elevada probabilidad de morir prematuramente de un infarto de miocardio debido a la aterosclerosis.

vestidas se separan constantemente de la membrana formando vesículas revestidas, cualquier partícula de LDL que se halle unida a los receptores en las depresiones revestidas es rápidamente internalizada. Después de desprenderse de su cubierta de clatrina, las vesículas de endocitosis liberan su contenido en los endosomas tempranos, que se encuentran cerca de la periferia celular. Una vez en el compartimiento endosomal, las LDL pasan a los endosomas tardíos y de ellos a los lisosomas, donde se hidrolizan los ésteres de colesterol dando lugar a colesterol libre, que de esta forma queda a disposición de la célula para la biosíntesis de membrana. Si se acumula demasiado colesterol libre en la célula, ésta detiene tanto la síntesis de colesterol como la síntesis de proteínas receptoras de LDL, con lo que la célula produce y absorbe menos colesterol.

Esta vía regulada para la absorción del colesterol está perturbada en algunos individuos que heredan unos genes defectuosos para la producción de proteínas receptoras de LDL y, por consiguiente, sus células no pueden captar LDL de la sangre. Los niveles elevados de colesterol en sangre resultantes predisponen a estos individuos a una aterosclerosis prematura, y la mayoría de ellos mueren a una edad temprana de un infarto de miocardio como consecuencia de alteraciones de las arterias coronarias. La anomalía se puede atribuir al receptor de LDL, el cual puede estar ausente o ser defectuoso –bien en su lugar de unión extracelular para las LDL o bien en el lugar de unión intracelular que fija el receptor al revestimiento de las depresiones revestidas de clatrina (véase Figura 13-30B). En este último caso, el número de proteínas receptoras que unen las LDL es normal, pero no pueden localizarse en las regiones revestidas con clatrina de la membrana plasmática. Aunque las LDL se unen a la superficie de estas células mutantes, no se incorporan a la célula. Este hecho demuestra directamente la importancia que tienen las depresiones revestidas de clatrina respecto a la endocitosis mediada por receptor del colesterol.

Se han descrito más de 25 receptores diferentes que participan en la endocitosis mediada por receptor de diferentes tipos de moléculas, y todos ellos aparentemente utilizan la misma ruta de las depresiones revestidas de clatrina. Muchos de estos receptores, como el receptor de las LDL, entran en las depresiones revestidas independientemente de si se han unido o no a sus ligandos específicos; otros entran sólo si se han unido a su ligando específico, lo cual sugiere que es necesario un cambio conformacional inducido por el ligando para llegar a las depresiones. No obstante, no todas las proteínas de la membrana plasmática se acumulan en depresiones revestidas de clatrina, lo cual indica que estas depresiones actúan como filtros moleculares recogiendo ciertas proteínas de la membrana plasmática (receptores) y excluyendo a otras. Estudios de electronmicroscopía de células cultivadas expuestas a diferentes ligandos (que se han marcado para hacerlos más visibles al microscopio electrónico) han demostrado que en una misma depresión revestida se agrupan muchas clases de receptores. La membrana plasmática de una depresión revestida de clatrina puede acumular probablemente unos 1000 receptores de varias clases. Aunque todos los complejos receptor-ligando que utilizan esta ruta endocítica terminan aparentemente en el mismo compartimiento endosomal, el destino posterior de las moléculas endocitadas varía, como veremos ahora.

El material endocitado termina frecuentemente en los lisosomas²⁴

El **compartimiento endosomal** puede ser reconocido al microscopio electrónico añadiendo al medio extracelular una molécula fácilmente detectable, como la enzima peroxidasa, y permitiendo que las células la capten por endocitosis a diferentes tiempos. La distribución de la molécula después de ser captada revela que el compartimiento endosomal es como una serie de túbulos heterogéneos rodeados de membrana y vesículas que se distribuyen desde la periferia de la célula hasta la región perinuclear, donde a menudo se observan cerca, aunque físicamente separados, del complejo de Golgi. Mediante estos experimentos de marcaje pueden distinguirse rápidamente dos series de endosomas: al cabo de un mi-

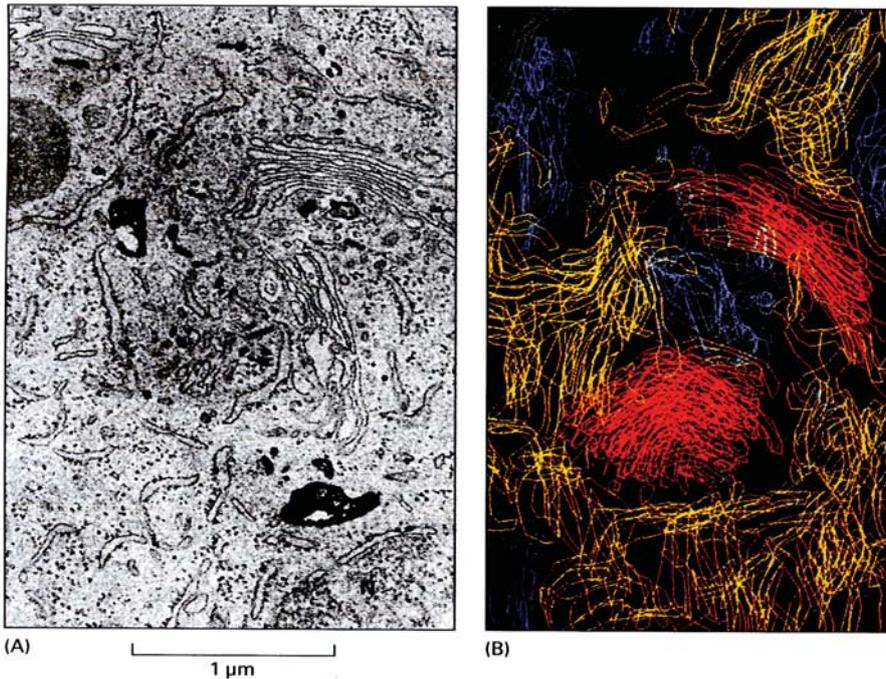


Figura 13-31 Relación entre los endosomas tardíos y otros compartimientos membranosos. (A) Células cultivadas de riñón de hámster joven (BHK, de Baby Hamster Kidney) fueron incubadas en una solución conteniendo la enzima peroxidasa, durante 15 minutos, lo cual es suficiente para que la peroxidasa sea captada por endocitosis de fase fluida y transportada hasta los endosomas tardíos, pero no suficiente para que haya llegado a los lisosomas. Después de que las células fuesen fijadas y expuestas a un sustrato de la peroxidasa, el producto de la reacción se hizo denso a los electrones mediante la fijación con tetróxido de osmio. (B) Reconstrucciones seriadas de endosomas tardíos (azul), ER (amarillo), y complejo de Golgi (rojo) a partir de electronmicrografías, una de las cuales se muestra en (A). La reconstrucción fue dibujada a partir de 18 secciones ultrafinas seriadas. En (A) el núcleo se indica con una N y en (B) se muestra en verde. (A, de M. Marsh, G. Griffiths, G. Dean, I. Mellman y A. Helenius, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2899-2903, 1986; B, por cortesía de Mark Marsh.)

nuto, las moléculas endocitadas aparecen en los **endosomas tempranos**, justo por debajo de la membrana plasmática, y al cabo de 5-15 minutos en los **endosomas tardíos**, al lado del complejo de Golgi y cerca del núcleo (Figura 13-31).

Como ya mencionamos, el interior del compartimiento endosomal es ácido (pH ~6) debido a la presencia en la membrana del endosoma de bombas dirigidas por ATP que bombean H^+ desde el citosol hacia el lumen. En general, los endosomas tardíos son más ácidos que los tempranos. Este ambiente ácido juega un papel crucial en la función de estos orgánulos. Se cree que una *ATPasa de H^+ vacuolar* similar o idéntica a ésta es la responsable de la acidificación de todos los orgánulos endocíticos y exocíticos, incluyendo fagosomas, lisosomas, determinados compartimientos del complejo de Golgi y muchas vesículas secretoras y de transporte.

Ya hemos visto cómo los materiales endocitados que llegan a los endosomas tardíos se mezclan con hidrolasas lisosomales recién sintetizadas y acaban en los lisosomas. No obstante, muchas moléculas se salvan específicamente de su destrucción y son recicladas desde los endosomas tempranos hacia la membrana plasmática, mediante vesículas de transporte. Como resultado de ello, sólo se degradan las moléculas endocitadas que no son recuperadas de los endosomas.

Determinadas proteínas son recuperadas de los endosomas tempranos y devueltas a la membrana plasmática²⁵

El compartimiento endosomal primario actúa como la principal estación de clasificación en la ruta endocítica, tal como lo hace la red del *trans* Golgi en la vía biosintética-secretora. En el ambiente ácido del endosoma temprano, muchos receptores internalizados cambian su conformación y liberan su ligando, como también ocurre en los receptores M6P con sus hidrolasas lisosomales en los aún más ácidos endosomas tardíos. Normalmente, los ligandos endocitados que se disocian de sus receptores en el endosoma temprano están predestinados a ser destruidos en los lisosomas, conjuntamente con los otros contenidos del endosoma no unidos a membrana. No obstante, algunos otros ligandos endocitados permanecen unidos a sus receptores y comparten su destino.

El destino de los receptores –y de algunos ligandos unidos a ellos– varía según el tipo de receptor de que se trate: (1) la mayoría de ellos retornan al mismo dominio de la membrana plasmática de donde proceden; (2) algunos viajan has-

Figura 13-32 Posibles destinos de los receptores transmembrana que han sido endocitados. Se muestran tres rutas que parten del compartimiento endosomal en una célula epitelial. Los receptores que no son recuperados específicamente de los endosomas siguen la ruta desde el compartimiento endosomal hasta los lisosomas, donde son degradados. Los receptores recuperados pueden retornar tanto al mismo dominio de la membrana plasmática del que partieron (*reciclaje*) como a un dominio diferente de la membrana plasmática (*transcitosis*). Si el ligando que es endocitado con su receptor sigue unido a él en el entorno ácido del endosoma, seguirá la misma ruta que el receptor; en caso contrario, será descargado en los lisosomas.

ta los lisosomas, donde son degradados; y (3) otros retornan a un dominio diferente de la membrana plasmática, mediando así un proceso llamado *transcitosis* (Figura 13-32).

El receptor de LDL sigue la primera de estas rutas. Se disocia de su ligando LDL en el endosoma y es reciclado hacia la membrana plasmática para su reutilización, mientras que la LDL descargada es transportada a los lisosomas (Figura 13-33). Un reciclaje similar a éste, aunque más complejo, tiene lugar después de la endocitosis de la **transferrina**, una proteína que transporta hierro por la sangre. El receptor de la transferrina de la superficie celular descarga la transferrina, con el hierro unido, en los endosomas tempranos mediante un proceso de endocitosis mediada por receptor. El bajo pH del endosoma hace que la transferrina libere el hierro que transporta. La transferrina libre de hierro (llamada apotransferrina) permanece unida a su receptor y es reciclada a la membrana plasmática como un complejo receptor-apotransferrina. Cuando retorna al pH neutro del fluido extracelular, la apotransferrina se disocia del receptor, por lo que puede volver a unir hierro y empezar de nuevo el ciclo. De esta forma, la transferrina actúa como una lanzadera entre el fluido extracelular y el compartimiento endosomal, evitando entrar en contacto con los lisosomas y repartiendo el hierro que las células necesitan para crecer.

La segunda ruta que pueden seguir a partir de los endosomas los receptores endocitados es la que sigue el receptor que une al *factor de crecimiento epidérmico* (EGF, de Epidermal Growth Factor), una pequeña proteína que estimula la división de las células de la epidermis y de otros tipos celulares. A diferencia de los receptores de LDL, estos receptores únicamente se acumulan en depresiones revestidas después de haber unido EGF. Además, muchos de ellos no se reciclan

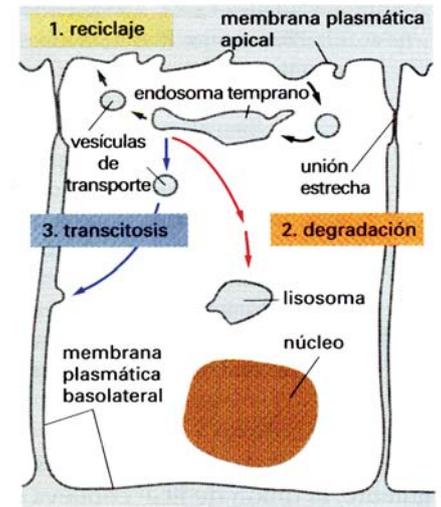


Figura 13-33 Endocitosis de LDL mediada por receptor. Nótese que en el ambiente ácido del endosoma, la LDL se disocia de su receptor. Después de una serie de pasos (véase Figura 13-34), la LDL acaba en los lisosomas, donde se degrada y se libera en forma libre el colesterol que contenía. El receptor proteico de LDL vuelve a la membrana plasmática vía transporte de vesículas que, tal como se muestra en la figura, brotan de la región tubular del endosoma. Para simplificar el dibujo, se muestra un solo receptor de LDL que entra en la célula y que retorna a la membrana plasmática. Está ocupado o no, típicamente cada receptor de LDL realiza un ciclo completo, hacia adentro y de nuevo hacia la membrana de la célula, cada 10 minutos, dando un total de varios cientos de vueltas en su vida media de 20 horas.

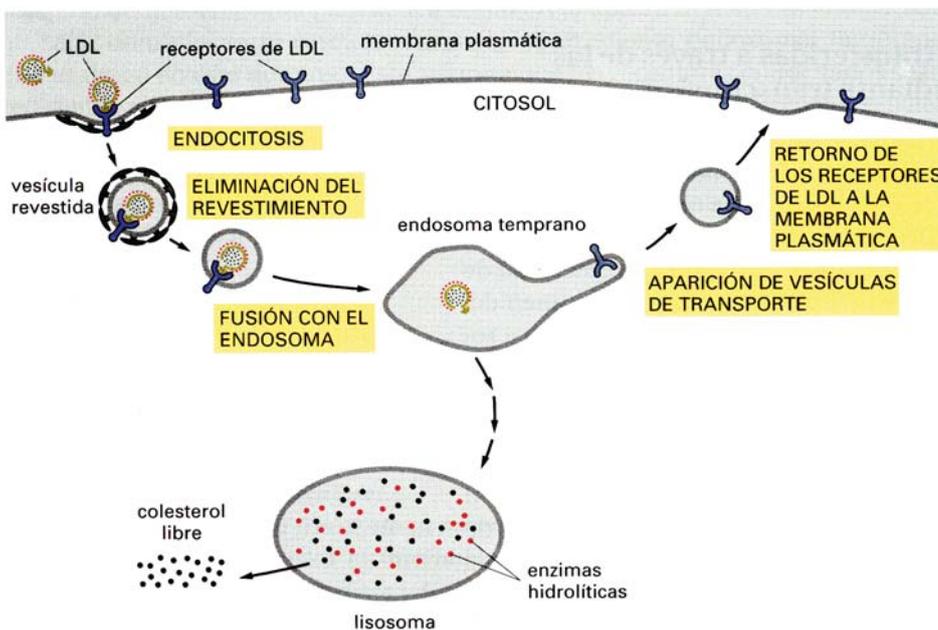
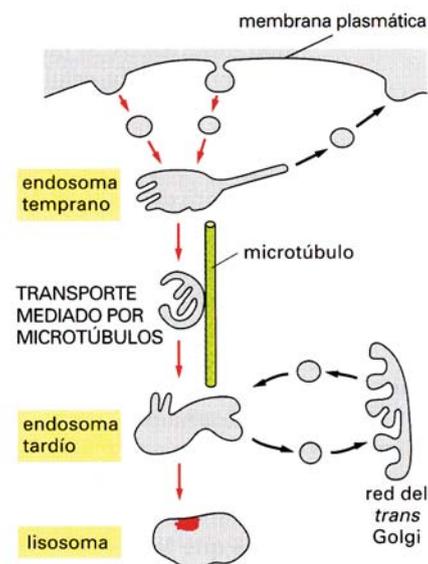


Figura 13-34 La vía endocítica desde la membrana plasmática a los lisosomas. El transporte desde los endosomas tempranos a los endosomas tardíos tiene lugar mediante grandes *vesículas de transporte endosomal*, las cuales contienen una gran cantidad de membrana invaginada y por ello reciben el nombre de *cuerpos multivesiculares*. No está claro si deben ser considerados como endosomas de mediana edad que se desplazan hacia el interior celular a medida que maduran, o bien como unos compartimientos de transporte distintos. Su movimiento tiene lugar mediante microtúbulos y puede ser experimentalmente bloqueado con drogas que los despolimericen. Finalmente, puede que los endosomas tardíos se conviertan en lisosomas. Entre los endosomas tempranos y la superficie celular existen unas vesículas de transporte que reciclan material, mientras que otro tipo de vesículas hacen lo mismo entre los endosomas tardíos y la red del *trans* Golgi.



sino que acaban en los lisosomas, donde son degradados con el EGF. Por consiguiente, la unión de EGF conlleva un descenso en la concentración de los receptores de EGF en la superficie celular –un proceso llamado *regulación por disminución* (down regulation). Como resultado de ello, la concentración del ligando señal en el medio extracelular regula el número de moléculas de receptor complementario de la superficie de la célula diana (discutido en Capítulo 15).

La relación entre endosomas tempranos y tardíos es incierta²⁶

No está claro cómo se desplazan las moléculas endocitadas de un compartimiento endosomal a otro y acaban en los lisosomas. Una hipótesis sería que los endosomas tempranos van desplazándose lentamente hacia el interior de la célula y pasan a ser endosomas tardíos; éstos se convierten en lisosomas como resultado de su fusión con las vesículas que transportan hidrolasas desde la red del *trans* Golgi, de su continuo reciclaje de la membrana y de su incremento de la acidificación. Otra hipótesis sería que los endosomas tempranos y tardíos son dos compartimientos separados y que el transporte entre ellos tiene lugar a través de un compartimiento intermedio de transporte –mediante una red dinámica de túbulos o mediante el desprendimiento de trozos del endosoma temprano que son transportados al interior celular, donde se fusionan con los endosomas tardíos (Figura 13-34). Los endosomas tempranos y tardíos se diferencian, en realidad, en su composición proteica: concretamente, están asociados con diferentes proteínas rab, las cuales son importantes para dirigir el transporte vesicular, como veremos más adelante (véase Tabla 13-1, pág. 689).

Las macromoléculas pueden ser transferidas a través de las láminas de células epiteliales mediante transcitosis²⁷

Algunos receptores de la superficie de las células epiteliales polarizadas transfieren macromoléculas específicas desde un espacio extracelular a otro, mediante un proceso llamado **transcitosis**. Estos receptores siguen la tercera vía descrita a partir de los endosomas (véase Figura 13-32). Las ratas recién nacidas, por ejemplo, obtienen anticuerpos de la leche materna (que les ayudan a protegerse de las infecciones) transportándolos a través de su epitelio intestinal. El lumen del intestino es algo ácido, y a este bajo pH los anticuerpos de la leche se unen a receptores específicos de la superficie apical (absortiva) de la células epiteliales del intestino y son internalizados vía depresiones y vesículas revestidas de clatrina, y transferidos a los endosomas tempranos. Los complejos receptor-anticuerpo permanecen intactos en los endosomas y son recuperados en vesículas de transporte que se fusionan con el dominio basolateral de la membrana plasmática. Al ser expuestos al pH neutro del fluido extracelular, los anticuerpos se disocian de sus receptores y entran en el torrente circulatorio de los recién nacidos. En la madre, la secreción de estos anticuerpos a la leche también tiene lugar por transcitosis, pero en dirección opuesta, desde la sangre hasta la leche. Otros ma-

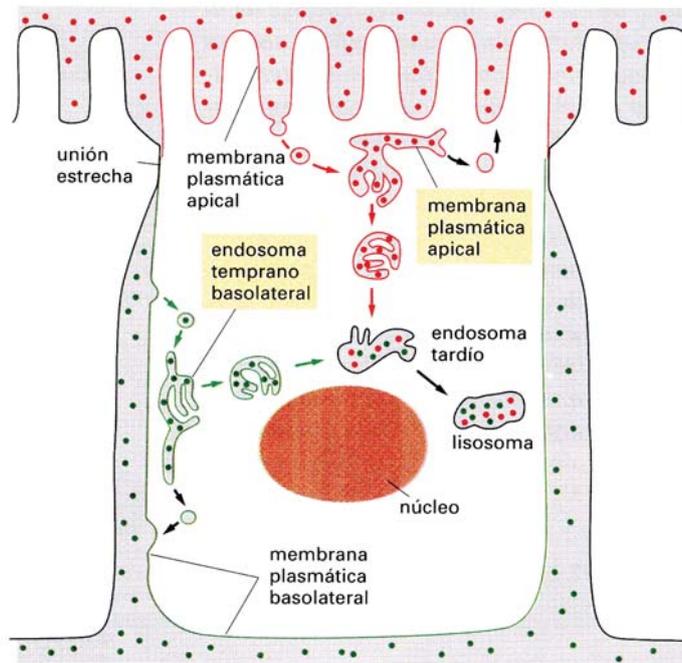


Figura 13-35 Dos compartimientos endosomales tempranos distintos en una célula epitelial. Los dominios basolateral y apical de la membrana plasmática comunican con distintos compartimientos endosomales tempranos, a pesar de que las moléculas endocitadas en ambos dominios que no tienen señales para su reciclaje o transcitosis se encuentran en un compartimiento endosomal tardío común antes de ser digeridas en los lisosomas.

míferos, incluidos los humanos, también transportan anticuerpos a la leche de esta manera, pero los anticuerpos permanecen en el intestino del recién nacido y no entran, como pasa en las ratas, en el torrente circulatorio.

El hecho de que los diferentes receptores puedan seguir diferentes caminos a partir de los endosomas implica que, además de un lugar de unión para el ligando y otro para la depresión revestida, muchos receptores también han de presentar señales de clasificación que los guíen desde el endosoma hasta la vesícula de transporte apropiada, y por lo tanto a la membrana adecuada de la célula. Se desconoce todavía la naturaleza de estas señales.

Las células epiteliales tienen dos compartimientos endosomales tempranos distintos pero un solo compartimiento endosomal tardío común²⁸

En células epiteliales polarizadas, la endocitosis ocurre tanto en el dominio basolateral de la membrana plasmática como en el apical. El material endocitado en cada dominio entra primero en un compartimiento endosomal temprano que es único en este dominio. Esto permite que los receptores endocitados sean reciclados a su dominio original de membrana, a menos que contengan señales que les obliguen a transitar al otro dominio. Las moléculas endocitadas desde cada dominio que no son recuperadas en los endosomas tempranos son transportadas a un compartimiento endosomal tardío común, situado cerca del centro de la célula, y acaban siendo degradadas en los lisosomas (Figura 13-35).

Resumen

Las células ingieren macromoléculas por endocitosis: determinadas regiones de la membrana plasmática se invaginan y se desprenden formando vesículas endocíticas; muchas de las partículas y moléculas endocitadas acaban en los lisosomas, donde son degradadas. La endocitosis tiene lugar tanto constitutivamente como en respuesta a señales extracelulares.

La endocitosis es tan frecuente en muchas células que una importante fracción de la membrana plasmática es internalizada cada hora. Los componentes de la membrana plasmática (proteínas y lípidos) son continuamente devueltos a la superficie celular mediante un gran ciclo endocítico-exocítico mediado principal-

mente por depresiones y vesículas revestidas de clatrina. Muchos receptores de la superficie celular que se unen a macromoléculas extracelulares específicas acaban localizándose en las depresiones revestidas de clatrina y, por lo tanto, son internalizados en vesículas recubiertas de clatrina –un proceso denominado endocitosis mediada por receptor. Las vesículas endocíticas revestidas pierden rápidamente su cubierta de clatrina y se fusionan con los endosomas tempranos. La mayoría de ligandos se separan de sus receptores en el ambiente ácido de los endosomas y acaban en los lisosomas, mientras que la mayoría de receptores son reciclados a la superficie celular mediante vesículas de transporte, y son reutilizados. Pero los complejos receptor-ligando pueden seguir otras rutas desde el compartimiento endosomal. En algunos casos tanto el receptor como el ligando acaban degradándose en los lisosomas, dando lugar a la “regulación por disminución” del receptor. En otros casos, ambos son transferidos a un dominio de la membrana plasmática diferente y, por lo tanto, el ligando es liberado por exocitosis en una superficie de la célula diferente de la de origen –un proceso llamado transcitosis.

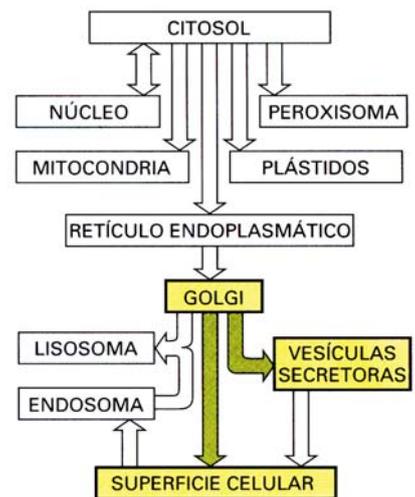
Transporte desde la red del *trans* Golgi hasta la superficie celular: exocitosis²⁹

Habiendo considerado el sistema digestivo interno de la célula y los diversos tipos de tráfico de membranas que convergen en los lisosomas, ahora volveremos al complejo de Golgi y examinaremos las rutas secretoras que conducen al exterior celular. Normalmente, las vesículas de transporte destinadas a la membrana plasmática abandonan el *trans* Golgi siguiendo un flujo constante. Las proteínas de membrana y los lípidos de estas vesículas aportan nuevos componente a la membrana plasmática celular, mientras que las proteínas solubles de estas vesículas son secretadas al espacio extracelular. La fusión de las vesículas con la membrana plasmática se llama **exocitosis**. De esta forma, por ejemplo, las células producen y secretan la mayoría de los proteoglicanos y glucoproteínas de la *matriz extracelular*, como se discute en el Capítulo 19.

Todas las células necesitan esta **ruta de secreción constitutiva**. No obstante, las células especializadas en la secreción disponen de una segunda ruta secretora en la que las proteínas solubles y otras sustancias se almacenan primero en *vesículas de secreción* y son segregadas más tarde. Ésta es la **ruta de secreción regulada**, que se encuentra principalmente en células especializadas en secretar rápidamente productos como las hormonas, neurotransmisores o enzimas digestivas, cuando es necesario (Figura 13-36). En esta sección consideraremos el papel del complejo de Golgi en estas dos rutas de secreción y compararemos los mecanismos que intervienen en ambas.

Parece que muchas proteínas y lípidos son transportados automáticamente desde el ER y el complejo de Golgi a la superficie celular³⁰

En una célula capaz de realizar secreción regulada, antes de abandonar la red del *trans* Golgi se han de separar por lo menos tres tipos de proteínas: las destinadas a los lisosomas (vía endosomas tardíos), las destinadas a las vesículas de secreción y las destinadas a ser descargadas inmediatamente en la superficie celular. Ya hemos visto que las proteínas destinadas a los lisosomas son seleccionadas para su empaquetamiento en vesículas de transporte específicas (mediante la M6P en el caso de las hidrolasas lisosomales), y se cree que señales análogas a éstas dirigen las proteínas empaquetadas al interior de las vesículas de secreción. La mayoría de las otras proteínas son transportadas directamente a la superficie celular mediante una **ruta por defecto** no selectiva (las proteínas que deben ser selectivamente dirigidas a un dominio de la superficie celular o a otro son excepciones) (Figura 13-37). Así, se ha propuesto que en una célula no



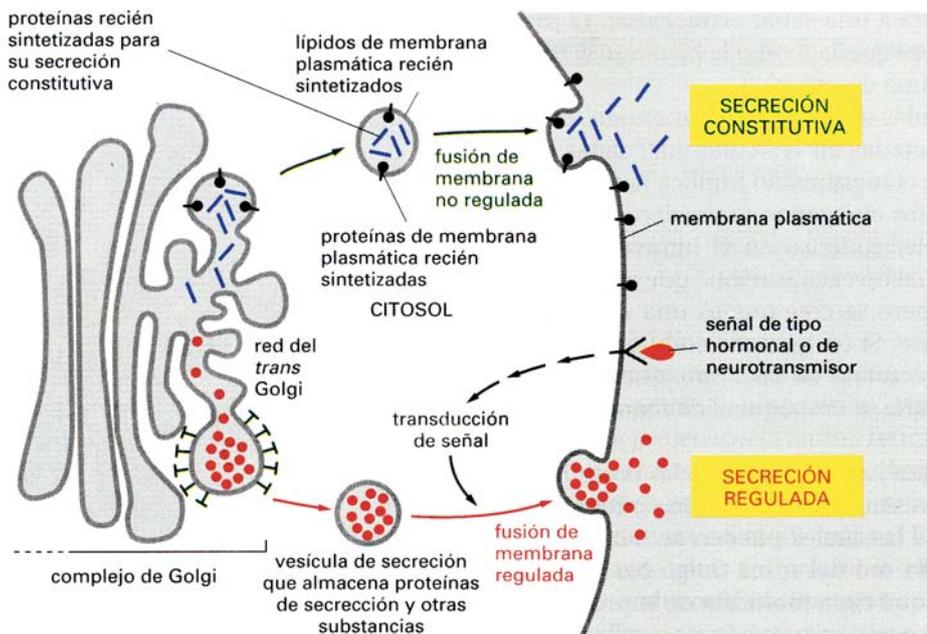


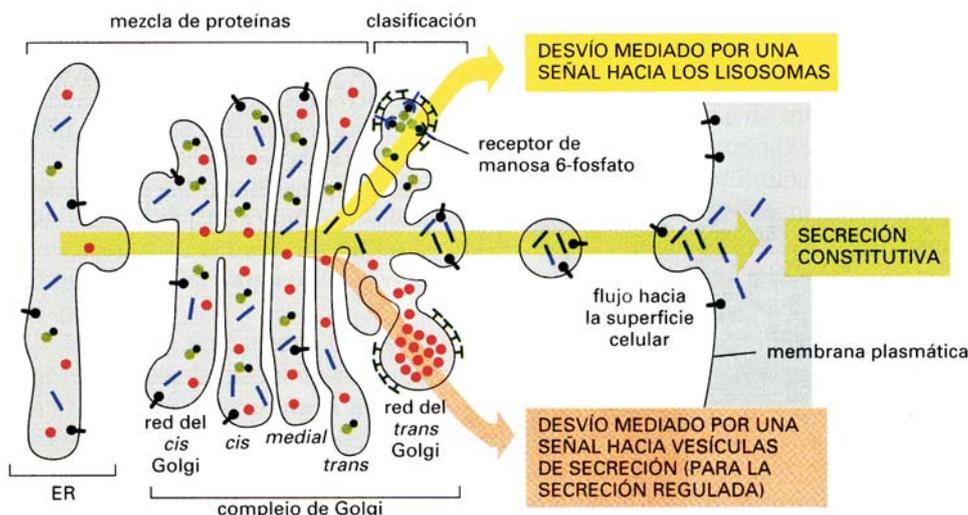
Figura 13-36 La ruta de secreción regulada y constitutiva. Las dos rutas divergen en la red del *trans* Golgi. Muchas proteínas solubles son segregadas continuamente de la célula a través de la *ruta de secreción constitutiva* (también llamada *ruta por defecto*), que actúa en todas las células. Esta vía también nutre a la membrana plasmática con proteínas y lípidos acabados de sintetizar. Las células especializadas en la secreción también disponen de una *ruta de secreción regulada*, mediante la cual determinadas proteínas de la red del *trans* Golgi son conducidas en vesículas de secreción, donde las proteínas son empaquetadas y concentradas hasta que una señal extracelular estimula su secreción. La secreción regulada de pequeñas moléculas, como la histamina, tiene lugar de forma similar: estas moléculas son activamente transportadas desde el citosol a vesículas de secreción ya formadas. Allí, a menudo, se complejan con determinadas macromoléculas (proteoglicanos en el caso de la histamina), de manera que pueden ser almacenadas en grandes cantidades sin producir una presión osmótica excesivamente elevada.

polarizada, tal como las células de la serie blanca de la sangre o los fibroblastos, si las proteínas del lumen del ER no son específicamente retenidas como residentes del ER o del complejo de Golgi o no son seleccionadas para las rutas que llevan a la secreción regulada o a los lisosomas, serán automáticamente transportadas a través del complejo de Golgi hasta la superficie celular mediante la vía secretora constitutiva. Veremos que en células polarizadas, en las que se han de transferir diferentes productos a diferentes dominios de la superficie celular, las opciones son un poco más complejas.

Las vesículas de secreción emergen por gemación desde la red del *trans* Golgi³¹

Las células que están especializadas en secretar rápidamente algunos de sus productos en respuesta a una señal concentran y almacenan estos productos en **vesículas de secreción** (frecuentemente denominadas *gránulos de secreción* o *vesículas de núcleo denso* porque se observan núcleos densos cuando se miran al microscopio electrónico). Las vesículas de secreción se forman por gemación de vesículas recubiertas de clatrina, a partir de la red del *trans* Golgi, y liberan su

Figura 13-37 Los procesos de clasificación de proteínas en la red del *trans* Golgi mejor conocidos. Las proteínas marcadas con manosa 6-fosfato son dirigidas hacia los lisosomas (vía endosomas tardíos) mediante vesículas de transporte recubiertas de clatrina (véase Figura 13-23). Las proteínas cuyas señales les dirigen hacia vesículas de secreción son concentradas en grandes vesículas recubiertas de clatrina, que rápidamente pierden su recubrimiento transformándose en vesículas de secreción –un proceso que únicamente tiene lugar en células secretoras especializadas. Al parecer, en células no polarizadas, las proteínas que no presentan características especiales son transportadas hacia la superficie celular por defecto a través de la ruta de secreción constitutiva. En células polarizadas, sin embargo, las proteínas de secreción y las de membrana plasmática son dirigidas selectivamente hacia el dominio apical o hacia el dominio basolateral de la membrana plasmática, de forma que al menos una de estas dos rutas ha de estar mediada por una señal, como veremos más adelante.



contenido al exterior celular en respuesta a una señal extracelular. El producto secretado puede ser tanto una molécula pequeña (como la histamina) como una proteína (como una hormona o una enzima digestiva).

Las proteínas destinadas a las vesículas de secreción (a menudo denominadas *proteínas de secreción*) son empaquetadas en vesículas adecuadas en la red del *trans* Golgi. En este caso, parece que el mecanismo implica la agregación selectiva de las proteínas de secreción. Estos agregados se pueden detectar al microscopio electrónico como material electrodens en el lumen de la red del *trans* Golgi. Se desconoce cuál es la "señal de clasificación" que dirige a las proteínas de secreción a estos agregados, pero se cree que es una zona señal que presentan muchas proteínas de esta clase. Si un gen que codifica una proteína de secreción se transfiere a una célula secretora de otro tipo, que normalmente no fabrica esta proteína, la proteína extraña se empaqueta de manera apropiada en vesículas de secreción.

Tampoco se conoce cómo se segregan los agregados de las proteínas de secreción en las vesículas secretoras. Las vesículas de secreción contienen proteínas de membrana especiales, algunas de las cuales pueden actuar como receptores uniendo el material agregado en la red del *trans* Golgi. No obstante, los agregados son demasiado grandes para que cada molécula de la proteína secretada pueda unirse a su propio receptor, como se propone para el transporte de enzimas lisosomales. La captura de los agregados en las vesículas de secreción puede parecerse más a la captación de partículas por fagocitosis en la superficie celular, la cual también puede estar mediada por membranas revestidas de clatrina.

Después de que las vesículas de secreción inmaduras emerjan de la red del *trans* Golgi, su cubierta de clatrina es eliminada y su contenido se condensa aún más –hasta unas 200 veces respecto a su concentración en el lumen del Golgi (Figura 13-38). La condensación tiene lugar de repente y parece que es debida a la acidificación del lumen de la vesícula, inducida por una bomba de H^+ impulsada por ATP de la membrana de la vesícula. Debido a que las vesículas maduras son tan densas, la célula secretora libera grandes cantidades de material por exocitosis en cuanto es necesario (Figura 13-39).

A menudo las proteínas son procesadas proteolíticamente durante la formación de las vesículas de secreción³²

La condensación no es el único proceso por el que se ven afectadas las proteínas de secreción a medida que las vesículas de secreción maduran. Muchas hormonas polipeptídicas y neuropéptidos, así como muchas enzimas hidrolíticas secretadas, se sintetizan como proteínas precursoras inactivas, a partir de las cuales tienen que ser liberadas las moléculas activas por proteólisis. Se cree que esta hi-



Figura 13-38 Formación de vesículas de secreción. Esta electronmicrografía muestra algunas vesículas de secreción formándose a partir de la red del *trans* Golgi en una célula β del páncreas secretora de insulina. Para localizar las moléculas de clatrina se ha utilizado un anticuerpo conjugado con esferas de oro coloidal (*puntos negros*). Las vesículas de secreción inmaduras (*cabezas de flecha negras*), que contienen la proteína precursora de la insulina (proinsulina), se hallan revestidas de clatrina. En cuanto la vesícula se ha formado, este recubrimiento de clatrina es rápidamente eliminado, ya que no se encuentra en las vesículas de secreción maduras, las cuales tienen un núcleo muy denso (*cabezas de flecha vacías*). (Por cortesía de Lelio Orci.)

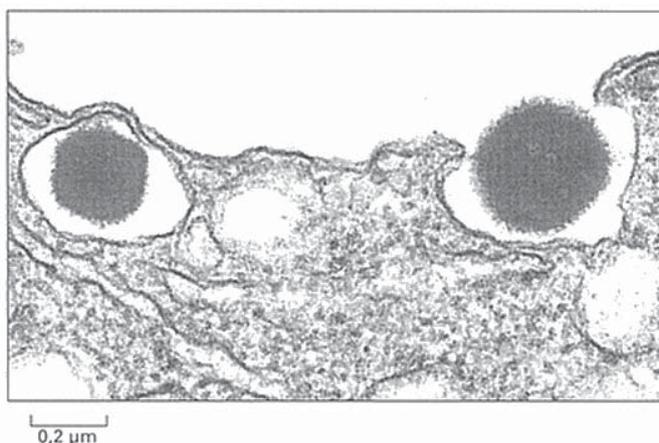


Figura 13-39 Exocitosis de vesículas de secreción. La electronmicrografía muestra la liberación de insulina desde una vesícula de secreción de una célula β pancreática. (Por cortesía de Lelio Orci, de L. Orci, J-D. Vassali, y A. Perrelet, *Sci. Am.* 256: 85-94, 1988.)

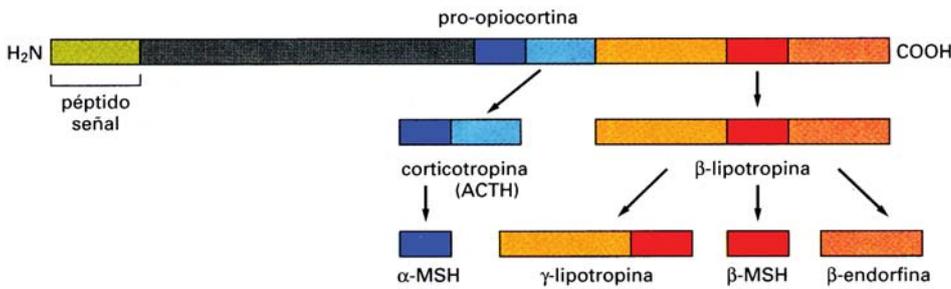


Figura 13-40 Rutas alternativas de procesamiento de la prohormona pro-opiocortina. Los cortes iniciales son realizados por proteasas unidas a la membrana que cortan cerca de pares de residuos aminoácidos cargados positivamente (Lys-Arg, Lys-Lys, Arg-Lys, o Arg-Arg). Mediante reacciones accesorias se obtienen los productos de secreción finales. Diferentes tipos celulares tienen diferentes tipos de enzimas, de manera que el mismo precursor prohormonal puede ser usado para producir diferentes hormonas peptídicas. Por ejemplo, en el lóbulo anterior de la hipófisis a partir de la pro-opiocortina sólo se producen la corticotropina (ACTH) y la β-lipotropina, mientras que en el lóbulo intermedio se producen principalmente α-MSH, γ-lipotropina, β-MSH y β-endorfina.

drólisis empieza en la red del *trans* Golgi, y continúa en las vesículas de secreción y a veces en el fluido extracelular después de que haya ocurrido la secreción. Muchos polipéptidos secretados tienen, por ejemplo, una *prosecuencia* amino terminal que es eliminada justo antes de la secreción, formándose la proteína madura. Estas proteínas se sintetizan, pues, como *preproproteínas*, en las que la *prosecuencia* consiste en el péptido señal del ER que se elimina en el ER rugoso. En otros casos las moléculas peptídicas señal se sintetizan como *poliproteínas* que contienen múltiples copias de una misma secuencia aminoacídica. En casos aún más complejos una variedad de moléculas peptídicas señal son sintetizadas como partes de una única poliproteína que es la precursora de los múltiples productos finales, los cuales son cortados individualmente a partir de la cadena polipeptídica inicial; la misma poliproteína puede ser procesada de formas diferentes produciendo diferentes péptidos en diferentes tipos celulares (Figura 13-40).

¿Por qué es tan común el procesamiento proteolítico en la ruta de secreción? Algunos de los péptidos producidos así, como las *encefalinas* (neuropéptidos de cinco aminoácidos con una actividad parecida a la morfina), son demasiado cortos en sus formas maduras para ser cotransportados hacia el lumen del ER o para poder tener las señales necesarias para empaquetarse en las vesículas secretoras. En el caso de las enzimas hidrolíticas secretadas, o de cualquier proteína cuya actividad pueda ser peligrosa en el interior de la célula, el retraso en la activación por rotura hasta que la proteína llega a una vesícula de secreción o hasta que ha sido secretada, proporciona una clara ventaja en la prevención de que actúe prematuramente dentro de la célula en la que ha sido sintetizada.

Las vesículas de secreción permanecen cerca de la membrana plasmática hasta que una señal les hace liberar su contenido³³

Una vez cargada, una vesícula secretora tiene que ir al lugar de secreción, donde debe esperar hasta que la célula reciba la señal de secreción. En algunas células el lugar de secreción está lejos del complejo de Golgi. Las células nerviosas proporcionan el ejemplo más extremo. Las proteínas de secreción, como los neurotransmisores peptídicos que deben ser liberados al final del axón, son sintetizadas y empaquetadas en vesículas del cuerpo celular, donde se sitúan los ribosomas, el ER y el complejo de Golgi. Entonces deben viajar a lo largo del axón hasta alcanzar el terminal axónico —una distancia muy corta o de más de un metro. Como se vio en el Capítulo 16, las vesículas utilizan proteínas motoras unidas a su superficie para propulsarse a lo largo de los microtúbulos axonales, la orientación de los cuales guía este tráfico a lo largo del axón en la dirección apropiada. En las células epiteliales polarizadas los microtúbulos pueden tener un papel similar dirigiendo las vesículas de secreción hacia la superficie que corresponda.

La última etapa de la ruta secretora regulada es la liberación del producto por exocitosis. La señal de secreción es a menudo un mensajero químico, como una hormona, que se une a los receptores de la superficie celular. La activación de estos receptores genera señales intracelulares, que incluyen a menudo un incremento transitorio de la concentración de Ca²⁺ libre en el citosol. En el caso de un axón nervioso, la señal de exocitosis normalmente es una excitación eléctrica

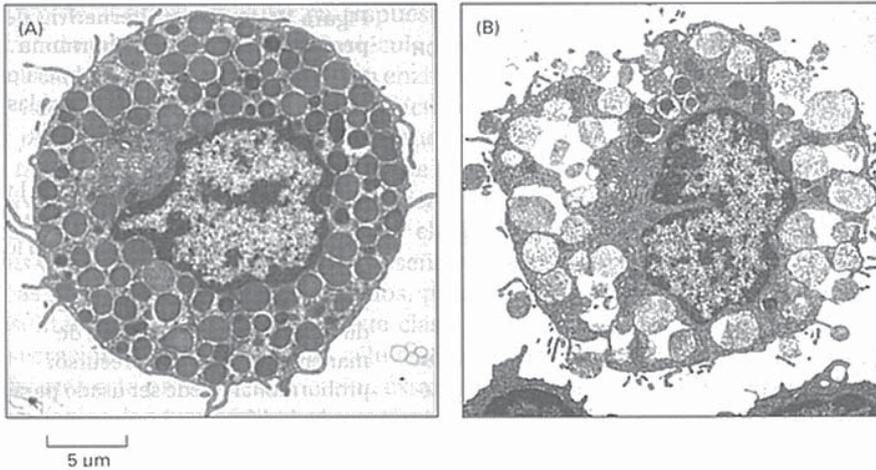


Figura 13-41 Electronmicrografías que muestran el proceso de exocitosis en células cebadas de rata. La célula de (A) no ha sido estimulada. La célula de (B) ha sido activada, por un ligando extracelular soluble, para segregar la histamina que tenía almacenada. Las vesículas que contienen histamina aparecen oscuras, mientras que las que la han liberado son claras. El material que queda en las vesículas vacías consiste en una red de proteoglicanos a la que normalmente se halla unida la histamina almacenada. Cuando la vesícula secretora se ha fusionado con la membrana plasmática, la membrana de la vesícula secretora actúa normalmente como diana a la cual se unen otras vesículas de secreción. Así, la célula de (B) presenta grandes cavidades delimitadas por las membranas fusionadas de muchas vesículas secretoras vacías, que ahora se hallan en continuidad con la membrana plasmática. Esta continuidad no siempre es patente en el plano del corte realizado a través de la célula. (De D. Lawson, C. Fewtrell, B. Gomperts y M. Raff. *J. Exp. Med.* 142:391-402, 1975, con permiso de copyright de The Rockefeller University Press.)

–un potencial de acción– que se ha producido por la unión de un transmisor químico a los receptores de la superficie celular. El potencial de acción provoca una entrada de Ca^{2+} en el terminal axónico a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Mediante un mecanismo desconocido, la repentina entrada de Ca^{2+} , o algún otro tipo de señal intracelular en la célula secretora, dispara la exocitosis, provocando que las vesículas de secreción se fusionen con la membrana plasmática y liberen su contenido al espacio extracelular.

La exocitosis regulada es una respuesta localizada de la membrana plasmática y del citoplasma subyacente³⁴

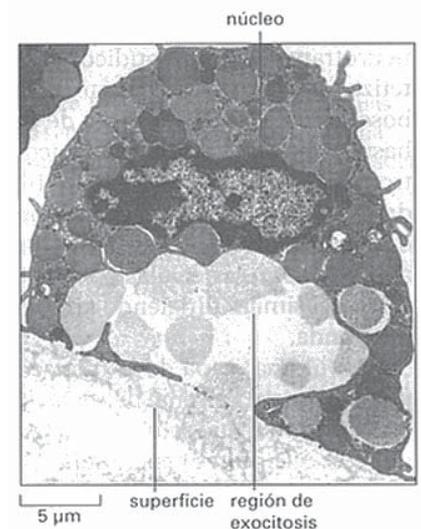
La histamina es una pequeña molécula segregada por las **células cebadas**, mediante la ruta regulada, como respuesta a ligandos específicos que se unen a los receptores de su superficie. La histamina es la responsable de muchos síntomas desagradables, tales como el prurito o los estornudos, que acompañan a las reacciones alérgicas. Si se incuban células cebadas en un medio que contenga un estimulante soluble, se observa que la exocitosis se produce por toda la superficie celular (Figura 13-41). Sin embargo, ésta no es una respuesta generalizada de toda la célula, ya que si el ligando estimulador está artificialmente fijado a una superficie sólida de modo que sólo puede interactuar con una región localizada de la superficie de la célula cebada, la exocitosis queda restringida a la región en la que la célula entra en contacto con el ligando (Figura 13-42). Claramente, distintos segmentos de la membrana plasmática pueden actuar con independencia del resto de la membrana. Como resultado de ello, la célula cebada, a diferencia de una célula nerviosa, no responde como un todo cuando está estimulada; la activación de los receptores, las señales intracelulares resultantes y la exocitosis posterior están localizadas en la región particular de la célula que ha sido excitada.

Los componentes de la membrana de las vesículas de secreción se reciclan³⁵

Cuando una vesícula secretora se fusiona con la membrana plasmática, su contenido se descarga desde la célula por exocitosis y su membrana pasa a formar

Figura 13-42 La exocitosis como una respuesta localizada.

Electronmicrografía de una célula cebada que ha sido estimulada para segregar histamina por un estimulante acoplado a una amplia esfera sólida. La exocitosis se ha producido únicamente en la región de la célula que se halla en contacto con esta superficie. (De D. Lawson, C. Fewtrell y M. Raff. *J. Cell. Biol.* 79:394-400, 1978, con permiso de copyright de The Rockefeller University Press.)



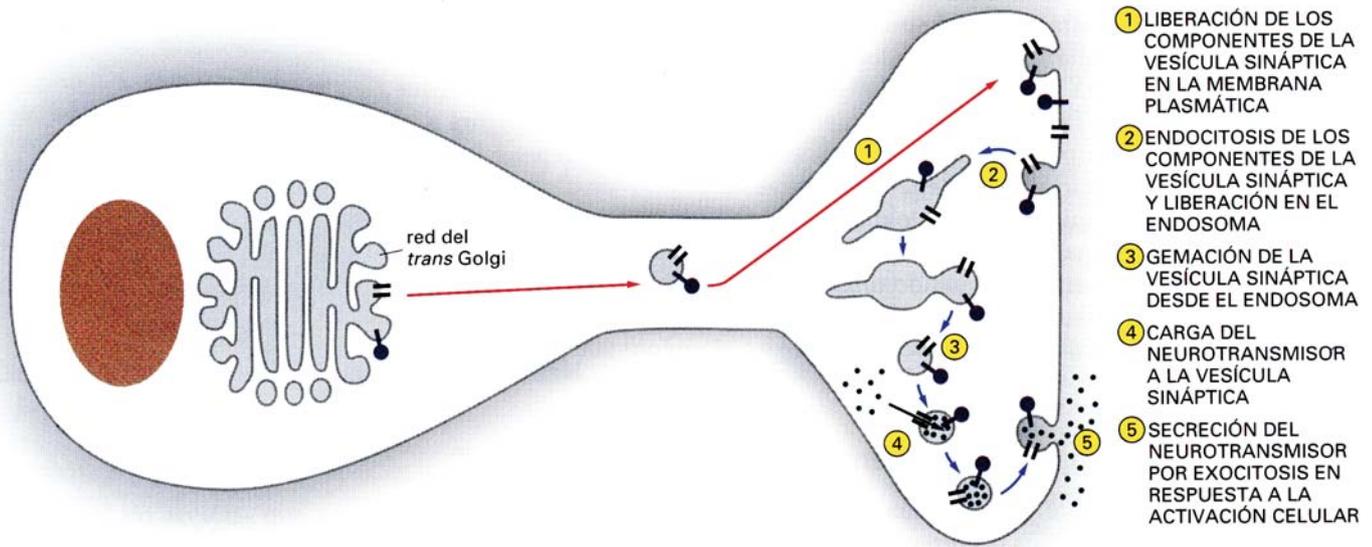
parte de la membrana plasmática. Este hecho podría incrementar notablemente el área de la superficie de la membrana plasmática, pero sólo ocurre de forma transitoria ya que constantemente son eliminados de la superficie celular componentes de membrana mediante endocitosis, y este proceso es por lo menos tan rápido como lo ha sido el de adición de componentes por exocitosis. Esta eliminación devuelve las proteínas de la membrana de la vesícula secretora a la red del *trans* Golgi (probablemente vía endosomas), donde pueden ser utilizadas de nuevo. Este reciclaje mantiene un estado estacionario de distribución de componentes de membrana entre los diversos compartimientos celulares. La cantidad de membrana vesicular que se añade temporalmente a la membrana plasmática puede ser enorme: cuando una célula acinar del páncreas es estimulada para secretar sus enzimas digestivas, en la membrana plasmática apical (cuya área es de sólo 30 μm^2) se insertan aproximadamente 900 μm^2 de membrana vesicular.

Las vesículas sinápticas se forman a partir de los endosomas³⁶

Las células nerviosas (y algunas células endocrinas) tienen dos tipos de vesículas secretoras. Como acabamos de ver, estas células empaquetan proteínas y péptidos en vesículas de secreción de contenido denso por la ruta típica, y son liberadas mediante la ruta de secreción regulada. No obstante, estas células utilizan además otra clase especializada de pequeñas vesículas de secreción (~50 nm de diámetro) que se forman de manera diferente. Estas **vesículas sinápticas** almacenan neurotransmisores pequeños, como la acetilcolina, el glutamato y el ácido γ -aminobutírico (GABA), que se usan en las sinapsis químicas para que dos células se comuniquen rápidamente (y, en algunos tejidos endocrinos, en comunicaciones locales). Cuando un potencial de acción llega al terminal nervioso, las vesículas liberan su contenido en una fracción de un milisegundo –algunas neuronas disparan más de 1000 veces por segundo– liberando vesículas sinápticas cada vez. Esto precisa un rápido relleno de las vesículas, que al parecer no se generan a partir de la membrana del Golgi, sino mediante reciclaje local de la membrana plasmática, como se indica a continuación. Se supone que los componentes de la membrana de las vesículas sinápticas son descargados inicialmente a la membrana plasmática mediante la ruta de secreción constitutiva y entonces son recuperados por endocitosis y transferidos a los endosomas, desde los cuales se agrupan y surgen por gemación para formar las vesículas sinápticas. Los componentes de la membrana de las vesículas incluyen transportadores especializados en la captación de neurotransmisores del citosol, donde son sintetizados. Una vez llenas con el neurotransmisor, las vesículas vuelven a la membrana plasmática, donde esperan hasta que la célula es estimulada. Después de que liberen su contenido, los componentes de su membrana son recuperados de la misma manera y reutilizados otra vez (Figura 13-43). Se puede observar el ciclo completo, desde la endocitosis hasta la exocitosis, añadiendo un marcador, como la peroxidasa, al medio externo y siguiendo su paso a los endosomas y su vuelta a la superficie celular en vesículas sinápticas.

Las células polarizadas dirigen las proteínas desde la red del *trans* Golgi hasta el dominio apropiado de la membrana plasmática³⁷

La mayoría de las células de los tejidos están *polarizadas* y tienen dos (y a veces más) dominios de membrana diferentes hacia los cuales van dirigidos diferentes tipos de vesículas secretoras. Aparece, pues, el problema general de cómo se organiza la salida del complejo de Golgi para que se mantengan las diferencias entre un dominio membranoso y otro. Una célula epitelial típica, por ejemplo, tiene un *dominio apical*, que da al lumen y que a menudo tiene estructuras especializadas como los cilios o los microvilli, y un *dominio basolateral*, que comprende el resto de la célula. Los dos dominios están separados por un anillo de *uniones estrechas* o *estancas* (véase Figura 23-35). Estas uniones especializadas



entre células (discutidas en el Capítulo 19) impiden que las proteínas, y los lípidos en la hemimembrana exterior, se desplacen entre las regiones apical y basolateral, de manera que no sólo la composición proteica sino también la lipídica de los dos dominios de membrana son diferentes. Concretamente, la región de la membrana apical está muy enriquecida en glucolípidos, los cuales se piensa que protegen a esta superficie del daño que puedan producir, por ejemplo, las enzimas digestivas y el bajo pH que se encuentra en lugares como el lumen del intestino. Las proteínas de la membrana plasmática que están unidas a la bicapa lipídica mediante un glucosilfosfatidilinositol (GPI) también se encuentran exclusivamente en la membrana plasmática apical. Si a una proteína que normalmente es transferida a la superficie basolateral se le añade, mediante manipulación genética, una secuencia de unión a un GPI, se observa que la proteína es descargada en la superficie apical. Las proteínas unidas a GPI parecen asociarse con glucolípidos y pueden ser transportadas a la misma región de la superficie celular como resultado de esta asociación. Sin embargo, se desconoce cómo tiene lugar esta selección.

En principio, las diferencias entre los dominios de la membrana plasmática no son las que determinan la descarga de los componentes de la membrana apropiados. Lo que ocurriría sería que los componentes de la membrana podrían ser descargados en cualquier punto de la superficie celular y entonces ser estabilizados selectivamente en algunas posiciones y eliminados selectivamente en otras. Esta estrategia de descarga al azar y retención o eliminación selectiva parece que funciona en determinados casos; no obstante, hay ejemplos muy claros donde la transferencia está dirigida específicamente. Así, a menudo, las células epiteliales secretan una serie de productos en su superficie apical –como las enzimas digestivas o el moco, en el caso de las células que se encuentran en el intestino– y otra serie de productos en la superficie basolateral –como la laminina y otros componentes de la lámina basal. Este tipo de células deben tener mecanismos para dirigir las vesículas que llevan cargas distintas, rodeadas de distintos tipos de membranas, a diferentes dominios de la membrana plasmática. Examinando células polarizadas en cultivo, se ha visto cómo las proteínas que salen del ER destinadas a los diferentes dominios viajan juntas hasta que llegan a la red del trans Golgi. Allí son separadas y enviadas mediante vesículas de secreción o de transporte al dominio de la membrana plasmática apropiado. En algunos casos las proteínas basolaterales y las apicales tienen distintas señales de clasificación que las dirigen al dominio correspondiente –o directamente o

Figura 13-43 La formación de vesículas sinápticas. Estas vesículas diminutas y uniformes se encuentran sólo en células nerviosas y en algunas células endocrinas, donde almacenan y secretan pequeños neurotransmisores.

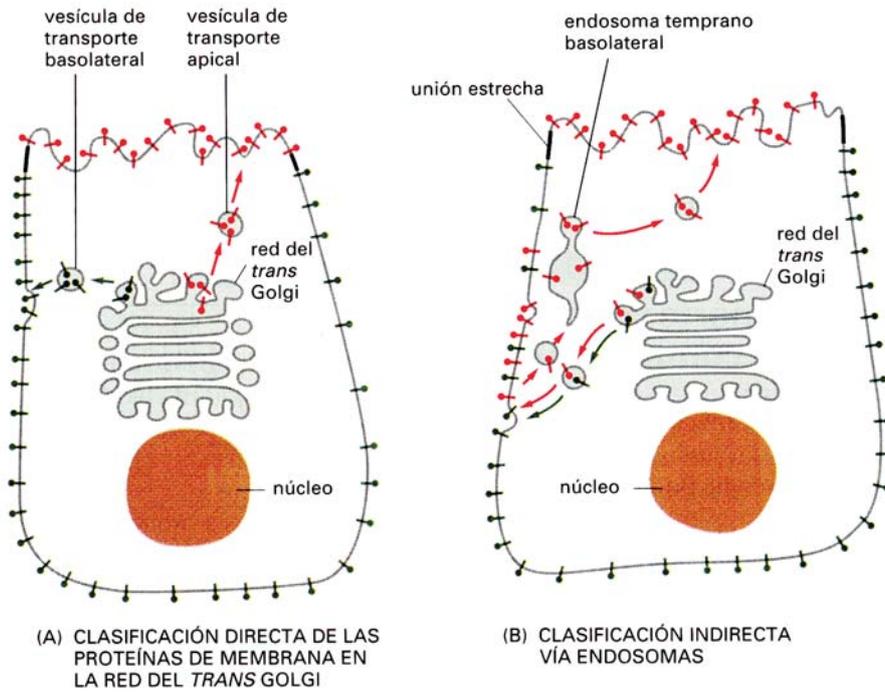


Figura 13-44 Clasificación de las proteínas de la membrana plasmática en una célula epitelial polarizada. Las proteínas recién sintetizadas pueden alcanzar su dominio de la membrana plasmática apropiado mediante una vía directa (A) o indirecta (B). En la vía indirecta una proteína es recuperada del dominio de la membrana plasmática inapropiado por endocitosis y luego transportada al dominio correcto vía endosomas tempranos –es decir, por transcitosis.

indirectamente vía endosomas (Figura 13-44); en otros casos sólo las proteínas destinadas a uno de los dos dominios membranosos tienen una señal de clasificación, mientras que el otro dominio no requiere de ninguna señal (y es alcanzado por una ruta por defecto).

Una célula nerviosa es un ejemplo límite de célula polarizada: la membrana plasmática de su terminal axónico está especializada en enviar señales a otras células, y la membrana plasmática de su soma celular y dendritas está especializada en recibir señales de otras células nerviosas. Estos dos tipos de dominios de la membrana plasmática no son sólo funcionalmente distintos sino que también tienen una composición proteica distinta. Estudios del tráfico de proteínas en células nerviosas en cultivo indican que, en lo que respecta a transporte vesicular desde la red del *trans* Golgi a la superficie celular, la membrana plasmática del soma celular nervioso y de las dendritas es equivalente a la membrana basolateral de una célula epitelial polarizada, mientras que la membrana plasmática del axón y de los terminales nerviosos es equivalente a la membrana apical de la misma célula (Figura 13-45). Así, una proteína que esté destinada a un dominio específico en una célula epitelial, también lo está, y en el dominio equivalente, en una célula nerviosa.

Resumen

Las proteínas pueden ser secretadas de una célula por exocitosis a través de una ruta regulada o constitutiva. En las rutas reguladas las moléculas son almacenadas en vesículas de secreción o en vesículas sinápticas, las cuales no se fusionan con la membrana plasmática liberando su contenido, hasta que se recibe una señal extracelular. Este empaquetamiento dentro de estas vesículas, que tiene lugar en la red del trans Golgi, es precedido por una condensación selectiva de las proteínas. Las vesículas sinápticas son propias de las células nerviosas y de algunas células endocrinas; se forman a partir de los endosomas y son responsables de la secreción regulada de pequeños neurotransmisores. Mientras que las rutas reguladas sólo actúan en células secretoras especializadas, en todas las células existe una ruta de secreción constitutiva: hay un transporte vesicular continuo desde la red del trans Golgi a la membrana plasmática.

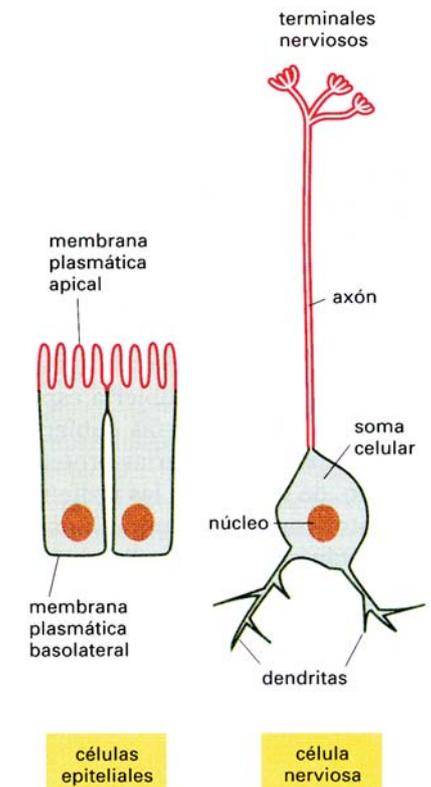


Figura 13-45 Comparación entre dos tipos de células polarizadas. Teniendo sólo en cuenta los mecanismos utilizados para dirigir las proteínas hacia los diferentes dominios de una célula, la membrana plasmática del soma celular nervioso y las dendritas parecen ser equivalentes al dominio basolateral de una célula epitelial polarizada, mientras que la membrana plasmática de un axón y los terminales nerviosos actuarían como el dominio apical de una célula epitelial.

Las proteínas fabricadas en el ER son automáticamente transferidas a la red del trans Golgi y después a la membrana plasmática a través de la ruta constitutiva, por defecto, a menos que sean captadas en otras rutas o retenidas por señales de clasificación específicas. No obstante, en las células polarizadas las rutas de transporte desde la red del trans Golgi a la membrana plasmática presentan un control selectivo asegurando que diferentes tipos de proteínas de membrana y lípidos sean transferidos a los dominios de la membrana plasmática apropiados.

Mecanismos moleculares del transporte vesicular y mantenimiento de la diversidad de compartimientos³⁸

Ahora vamos a tratar la cuestión más importante del tráfico vesicular. Hemos visto que la célula contiene 10 o más compartimientos, limitados por membrana, químicamente distintos y que el transporte vesicular media un intercambio continuo de componentes entre ellos (véase Figura 13-3). En presencia de este intercambio masivo, ¿cómo mantiene su carácter especializado cada compartimiento?

Para contestar a esta pregunta primero hay que considerar qué es lo que define el carácter de un compartimiento. Por encima de todo, parece que es 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 sólo se fusionen con el compartimiento adecuado, dictando por lo tanto el patrón del tráfico entre un compartimiento y otro.

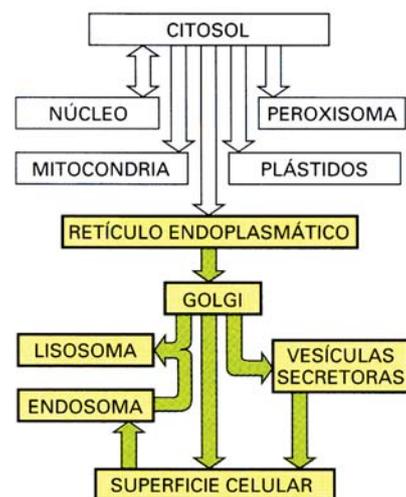
Una vez determinada la presencia de distintos marcadores para cada compartimiento, el problema radica en explicar cómo se mantienen componentes específicos de membrana a una concentración elevada en un compartimiento y baja en otro. La respuesta depende, fundamentalmente, del mecanismo de formación de las vesículas de transporte y de fusión, por el cual zonas de la membrana, enriquecidas o no de componentes específicos, son transferidas de un compartimiento a otro.

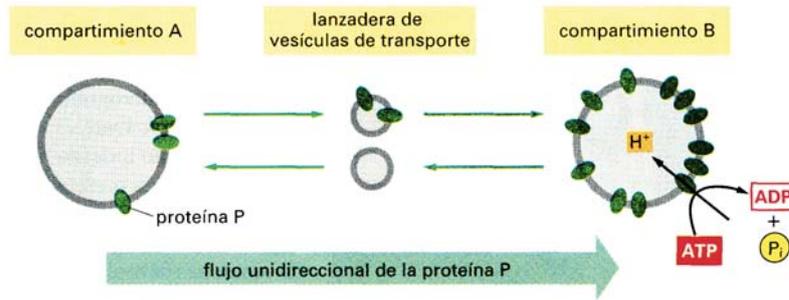
Ya hemos visto cómo la generación de una vesícula de transporte conlleva el ensamblaje de una cubierta especial en la cara citosólica de la membrana que genera la vesícula. Estas cubiertas actúan como un dispositivo que “chupa” la membrana rica en ciertas proteínas y pobre en otras hacia afuera del compartimiento, de forma que las proteínas pueden ser transportadas de forma específica a otro compartimiento. Consideraremos cómo se forman estas cubiertas y de qué están compuestas. También comentaremos cómo llegan las proteínas a la membrana diana correcta y cómo se fusionan entonces descargando su contenido en el órgano correspondiente. Veremos cómo una combinación de genética y bioquímica ha descubierto una variedad de proteínas de unión a GTP que ayudan a controlar el transporte vesicular. Acoplado la hidrólisis de GTP a otros procesos catalíticos, ayudan a controlar la dirección del transporte vesicular uniendo la liberación y la fusión de vesículas al gasto de energía libre, y garantizan su fidelidad velando por la precisión con la que la vesícula de transporte reconoce su membrana diana específica. Las estrategias genéticas y bioquímicas básicas que se han utilizado para estudiar la maquinaria molecular implicada en el transporte vesicular están perfiladas en el Panel 13-1, páginas 682-683.

De todos modos, antes de comentar los detalles de la maquinaria, es útil tratar el problema desde su base, estudiando los principios básicos generales que se deben aplicar a cualquier proceso de transporte vesicular unidireccional.

El mantenimiento de las diferencias entre compartimientos requiere un aporte de energía libre³⁸

Supongamos que tenemos dos compartimientos, delimitados por membrana, conectados por vesículas de transporte que circulan de uno a otro, y que la diferencia entre ambos compartimientos radica sólo en la concentración de un úni-





co tipo P de proteína unida a membrana. Si el sistema se deja que tienda al equilibrio, a través del tráfico de vesículas de transporte entre los compartimientos las concentraciones de P se equilibrarían y la diferencia entre compartimientos desaparecería. La diferencia puede ser mantenida utilizando energía libre para transferir activamente moléculas de P en una dirección, en contra de su gradiente de concentración. La proteína P podría ser secuestrada en la membrana formadora de vesículas de transporte del compartimiento en el cual está a baja concentración, por ejemplo, y mantenerse fuera de las vesículas en formación de los compartimientos en los que está en concentración elevada. Esto sería posible gracias a un cambio de conformación de la proteína conducido directa o indirectamente por la hidrólisis de ATP o GTP en la membrana generadora de vesículas por gemación (Figura 13-46). Aunque este ejemplo es mucho más simple que cualquier sistema conocido usado por las células, ilustrar por qué tiene que haber un aporte de energía libre que medie el transporte direccional selectivo de vesículas de transporte, entre compartimientos rodeados de membrana.

El transporte direccional selectivo es de una importancia central en la organización de la célula eucariota. Empezaremos nuestra discusión de los mecanismos moleculares que le sirven de base considerando cómo se forman las vesículas de transporte.

Existe más de un tipo de vesículas revestidas³⁹

La mayoría de 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 ha de eliminarse para permitir que las dos membranas interactúen directamente.

Existen dos tipos de vesículas revestidas bien caracterizadas –las revestidas de clatrina y las revestidas de coatómero (de *coat*, cubierta) (Figura 13-47). Las

Figura 13-46 La energía química es utilizada para conseguir que en el transporte vesicular sea unidireccional. En este ejemplo hipotético, la proteína P es una bomba de H⁺ dependiente de ATP. La concentración de protones en el compartimiento A es baja y alta en el compartimiento B. Debido a la alta concentración de P en el compartimiento B, el lumen de este orgánulo poseerá un pH mucho menor que el compartimiento A. Si P sufre un cambio de conformación dependiente de pH que le permita entrar en las vesículas que se forman a partir del compartimiento A (pH elevado) pero que a su vez le impide entrar en las vesículas que se producen a partir del compartimiento B (pH bajo), el flujo de P es unidireccional. Mientras se mantenga la diferencia de pH entre ambos compartimientos debido a la utilización continua de energía libre en forma de hidrólisis de ATP para mantener la bomba de H⁺, se conservará el gradiente de concentración de P entre los dos compartimientos. Como comentamos en el Capítulo 12, la mayoría de las membranas nunca se crean *de novo* sino que crecen por expansión de membrana ya existente. Por lo tanto, aunque este modelo simple no explica cómo se formó inicialmente el gradiente de P entre los compartimientos, proporciona un ejemplo de cómo la célula puede utilizar energía para mantener el carácter de sus compartimientos.

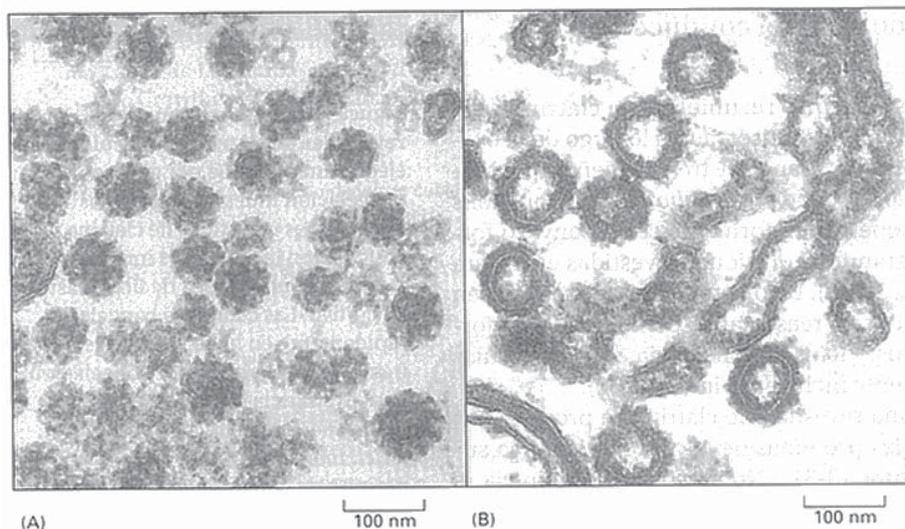


Figura 13-47 Comparación entre las vesículas revestidas de clatrina y las revestidas de coatómero. (A) Electronmicrografía de vesículas revestidas de clatrina. (B) Electronmicrografía de cisternas del Golgi de un sistema libre de células en el cual aparecen por gemación vesículas revestidas de coatómero en el tubo de ensayo. Obsérvese cómo las vesículas revestidas de clatrina tienen una estructura regular más obvia. (Cortesía de Lelio Orci, de L. Orci, B. Glick y J. Rothman, *Cell* 46:171-184, 1986 © Cell Press.)

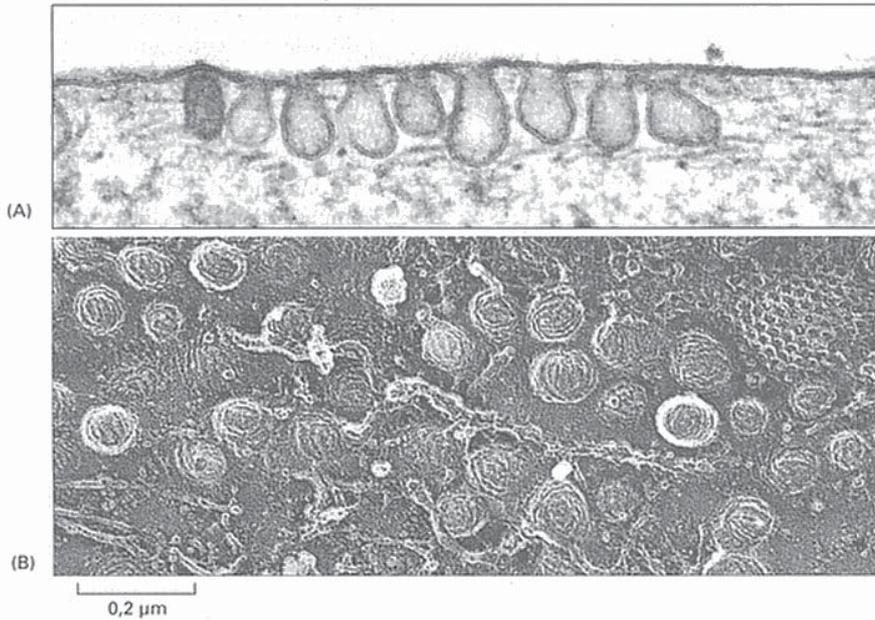


Figura 13-48 Caveolas en la membrana plasmática de un fibroblasto humano.

(A) Electronmicrografía de fibroblastos en sección transversal mostrando las caveolas como indentaciones profundas de la membrana plasmática. (B) Electronmicrografía de grabado por congelación que muestra numerosas caveolas en la cara citoplasmática de la membrana plasmática. Su cubierta parece que está constituida por hebras distribuidas concéntricamente, que contienen la proteína *caveolina*. Obsérvese que las caveolas difieren en tamaño y estructura de las depresiones revestidas de clatrina, una de las cuales se observa en la parte superior derecha de (B). (Cortesía de R.G.W. Anderson, de K.G. Rothberg et al., *Cell* 68:673-682, 1992. © Cell Press.)

vesículas revestidas de clatrina, como hemos visto anteriormente, median el transporte selectivo de los receptores transmembrana, como el receptor M6P desde la red del *trans* Golgi, o el receptor de LDL 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 y las cisternas del Golgi.

Puede haber un tercer tipo de vesícula revestida. La membrana plasmática de la mayoría de células presenta invaginaciones morfológica y bioquímicamente diferenciadas, denominadas *caveolas* (Figura 13-48); aunque su función es incierta, una posibilidad sería que estas caveolas generaran vesículas revestidas de caveolina. Si esto es así, no está claro qué transportarían estas vesículas ni cuál sería su destino, y por ahora no se puede decir nada más de ellas.

Parece que las vesículas revestidas median la transferencia direccional de tipos específicos de membrana. Normalmente esta transferencia está equilibrada por un flujo de membrana en dirección opuesta, tanto en forma de vesículas de tipos no tan caracterizados, como por medio de sacos alargados o túbulos de membrana que avanzan a lo largo de los microtúbulos (véase Figura 13-9).

El ensamblaje del revestimiento de clatrina conduce a la formación de la vesícula⁴⁰

El principal componente proteico de las **vesículas recubiertas de clatrina** es la propia **clatrina**, un complejo proteico altamente conservado a lo largo de la evolución. 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 (Figura 13-49). Bajo condiciones adecuadas en el tubo de ensayo, los trisquelions aislados se reasocian espontáneamente formando agregados típicamente poliédricos, incluso en ausencia de las vesículas de membrana que estos cestos normalmente incluyen (Figura 13-50).

Se cree que la formación de una yema revestida de clatrina se produce por fuerzas generadas por el ensamblaje de las proteínas de la cubierta sobre la superficie citosólica de la membrana (Figura 13-51). No se conoce qué inicia el proceso de unión a una región particular de la membrana ni cómo se libera la

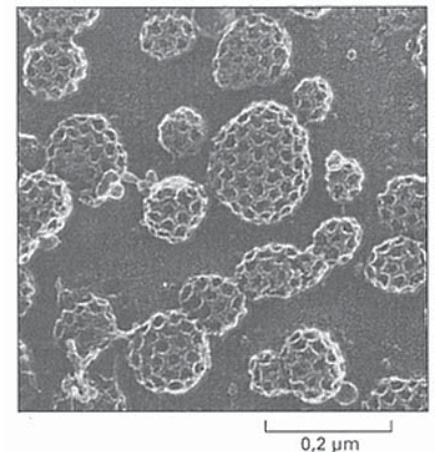


Figura 13-49 Depresiones revestidas de clatrina y vesículas. Esta electronmicrografía por grabado por congelación muestra numerosas depresiones revestidas de clatrina y vesículas en la superficie interior de la membrana plasmática de fibroblastos en cultivo. Las células se congelan rápidamente en helio líquido, se fracturan y se graban por congelación para exponer la superficie de la membrana plasmática. (De J.Heuser, *J. Cell Biol.* 84:560-683, 1980, con permiso de copyright de The Rockefeller University Press.)

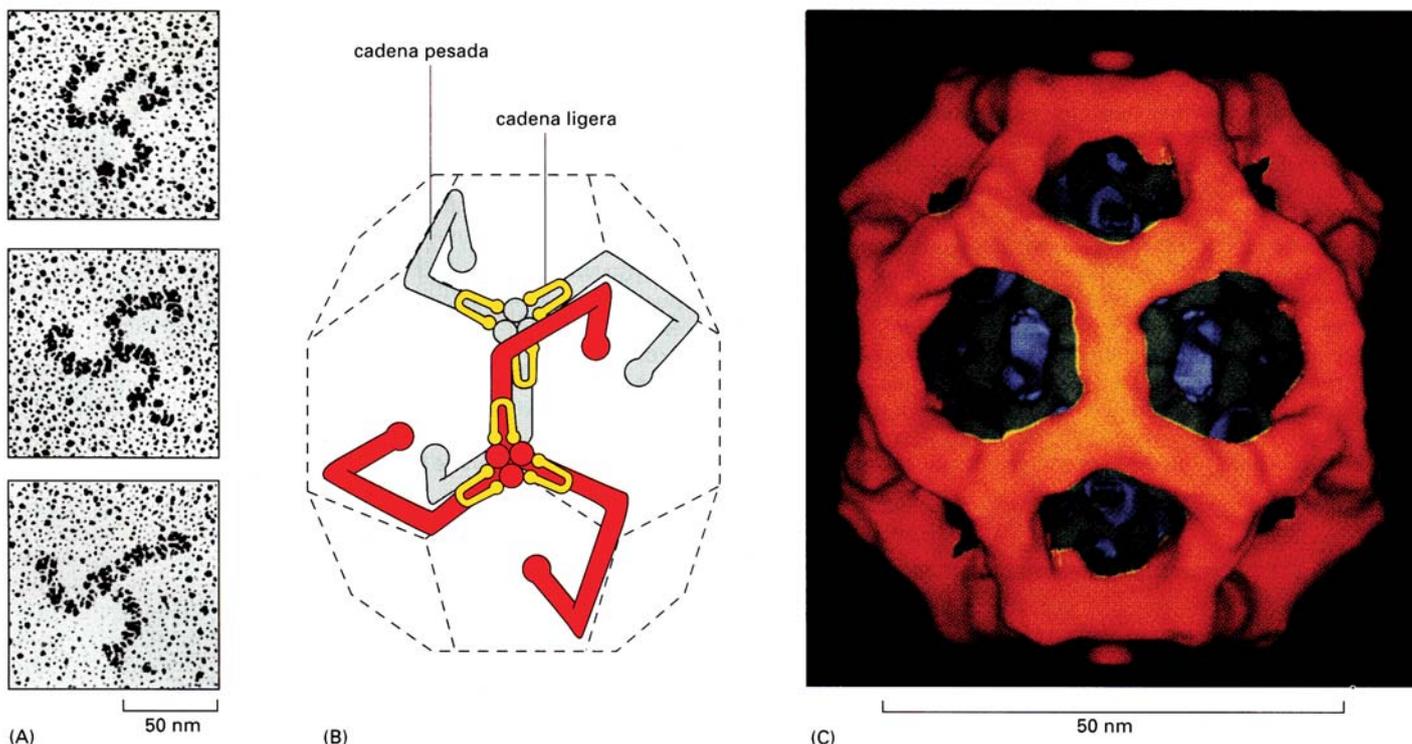
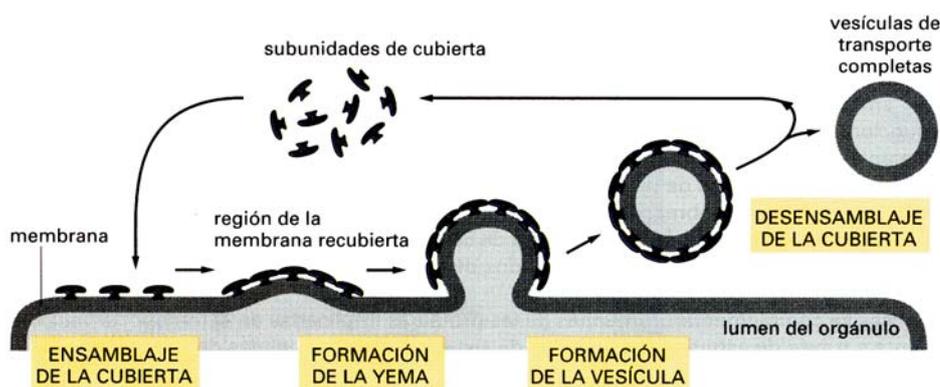


Figura 13-50 Estructura de la cubierta de clatrina. (A) Electronmicrografía de trisquelions de clatrina sombreados con platino. Aunque no puede observarse en las micrografías, cada trisquelion está compuesto por 3 cadenas pesadas y 3 cadenas ligeras de clatrina. (B) Dibujo esquemático de la distribución 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 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 que comentaremos más adelante. 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. (A, de E. Ungewickell y D. Branton, *Nature* 289:420-422, 1981, © 1981 Macmillan Journals Ltd.; B, de I.S.Nathke et al., *Cell* 68:899-910, 1992. © Cell Press; C, de G.P.A. Vigers, R.A. Crowther y B.M.F. Pearse, *EMBO J.* 5:2079-2085, 1986.)

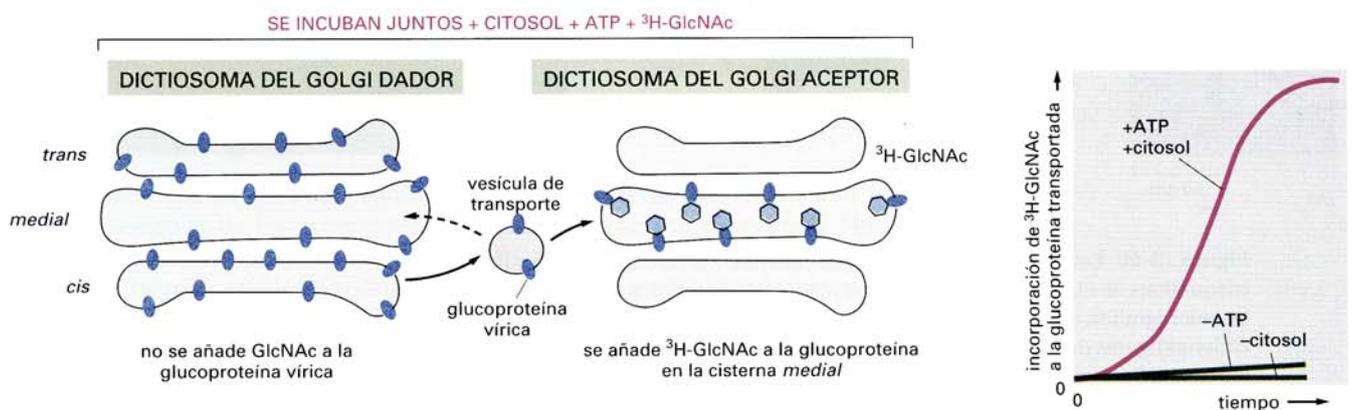
Figura 13-51 Ensamblaje y desensamblaje de la cubierta de clatrina. Parece que el ensamblaje de la cubierta de clatrina induce una curvatura en la membrana que conduce a la formación de yemas revestidas de tamaño uniforme. El desprendimiento de la yema formando una vesícula supone el proceso más complejo de fusión de membrana, que comentaremos más adelante. Aunque las cubiertas están constituidas por muchos componentes proteicos, en este esquema simplificado sólo se muestra la clatrina. El revestimiento de las vesículas recubiertas de clatrina se elimina inmediatamente después de la formación de la vesícula, mientras que, como veremos más adelante, la cubierta de coatómero se elimina después de que las vesículas entren en contacto con su membrana diana.



SISTEMAS LIBRES DE CÉLULAS PARA EL ESTUDIO DE LOS COMPONENTES Y DEL MECANISMO DEL TRANSPORTE VESICULAR

El transporte vesicular puede ser reconstituido en sistemas libres de células. La primera vez que se consiguió fue para el caso de los dictiosomas del complejo de Golgi. Cuando se aíslan los dictiosomas y se incuban en presencia de citosol y de ATP como fuente de energía, las vesículas emergen por gemación desde los bordes de los dictiosomas y parece que transporten proteínas entre las cisternas. Siguiendo el procesamiento progresivo de los oligosacáridos de una glucoproteína y su desplazamiento entre un compartimiento del Golgi y el siguiente, es posible seguir el proceso del transporte vesicular.

Para seguir el transporte, se incuban juntas dos poblaciones de dictiosomas de Golgi. La población "dadora" se aísla a partir de células mutantes que carecen de la enzima *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) transferasa I y que han sido infectadas con un virus; debido a la mutación, la principal glucoproteína vírica no puede ser modificada con GlcNAc en el complejo de Golgi de la célula. El dictiosoma del Golgi "aceptor" está aislado de las células salvajes no infectadas y que por lo tanto contienen una copia correcta de GlcNAc transferasa I, pero carecen de la glucoproteína vírica. En la mezcla de dictiosomas del Golgi la proteína vírica adquiere GlcNAc, lo cual indica que el Golgi dador se fusiona con el compartimiento *medial* del Golgi aceptor. Este transporte dependiente de glucosilación puede seguirse midiendo la transferencia de ^3H -GlcNAc desde UDP- ^3H -GlcNAc a la glucoproteína vírica. El transporte sólo se produce en presencia de ATP y de citosol. Fraccionando el citosol, se han identificado proteínas específicas citosólicas necesarias para la formación y la fusión de las vesículas de transporte.



Sistemas libres de células similares a éste se han utilizado para estudiar el transporte desde la red *medial* hasta la red del *trans* Golgi, desde la red del *trans* Golgi hasta la membrana plasmática, desde los endosomas hasta los lisosomas y desde la red del *trans* Golgi hasta los endosomas tardíos.

APROXIMACIONES GENÉTICAS AL ESTUDIO DEL TRANSPORTE VESICULAR

Los estudios genéticos de células de levadura mutantes deficientes en la secreción a temperatura elevada han permitido identificar más de 25 genes que participan en la vía de secreción. Muchos de estos genes mutantes codifican proteínas *sensibles a temperatura*, las cuales a 25°C actúan normalmente, pero cuando se eleva la temperatura a 35°C, algunas de ellas fracasan en el transporte de proteínas desde el ER hasta el complejo de Golgi, otras desde una cisterna a otra del Golgi, y otras desde el complejo de Golgi hasta la vacuola (el lisosoma de las levaduras) o hasta la membrana plasmática.

Una vez se identifican, por este sistema, algunas proteínas necesarias para que se produzca la secreción, se pueden identificar genes que codifican proteínas que interaccionan con ellas mediante un fenómeno llamado *supresión multicopia*. Una proteína mutante sensible a la temperatura elevada a menudo tiene una afinidad demasiado baja por las proteínas con las que habitualmente interacciona y se une. Sin embargo, si las proteínas de interacción se producen a una concentración muy superior a la normal, se da una unión suficiente para paliar el defecto. Para ello, células de levadura con una mutación sensible a la temperatura en un gen que participa en el transporte de vesículas, se transfectan con un vector plasmídico de levadura en la cual se han clonado fragmentos al azar de DNA genómico de levadura. Como el plásmido se mantiene en las células en un número de copias elevado, los que porten genes intactos sobreproducirán el producto normal del gen y permitirán a un reducido número de células sobrevivir a temperatura elevada. Los fragmentos de DNA relevantes, que probablemente codifican proteínas que interaccionan con la proteína mutada original, pueden ser aislados de las células supervivientes.

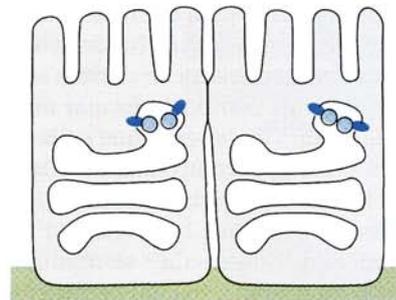
Las aproximaciones genéticas y bioquímicas se complementan, y muchas de las proteínas implicadas en el transporte vesicular han sido identificadas independientemente a través de estudios bioquímicos de sistemas libres de células de mamíferos y a través de estudios genéticos en levaduras.

SISTEMAS DE CÉLULAS SEMI-INTACTAS PARA EL ESTUDIO DEL TRANSPORTE VESICULAR

El transporte de vesículas también puede estudiarse en células cuya membrana plasmática haya sido previamente permeabilizada para permitir libremente el paso, hacia dentro o hacia fuera, de moléculas pequeñas y de macromoléculas. La permeabilización se consigue mediante rotura física o mediante el tratamiento con toxinas bacterianas que abren grandes orificios en la membrana plasmática. Estas células semi-intactas son particularmente útiles para estudiar el transporte desde sistemas de membrana extendida que se fragmentan durante los procedimientos de homogeneización convencionales, como es el caso del ER y de la red del *trans* Golgi.

Las células semi-intactas se han utilizado para aislar vesículas de transporte que median el transporte desde la red del *trans* Golgi hasta la membrana plasmática apical. Las células se cultivan a una temperatura baja (20°C) de manera que el tráfico de membrana desde la red del *trans* Golgi hasta la superficie de la célula está bloqueado, y por lo tanto la proteína vírica principal se halla atrapada en el *trans* Golgi (A). Cuando las células se permeabilizan (depositando un trozo de papel de nitrocelulosa sobre ellas y posteriormente retirándolo para romper la membrana), el citosol sale de las células dejando los sistemas de membrana (B). Entonces se levanta el bloqueo por temperatura y se añade citosol fresco y ATP, lo cual hace que las vesículas que contienen la glucoproteína vírica se desprendan de la red del *trans* Golgi por gemación y salgan de las células semi-intactas a través de los orificios de la membrana plasmática (C). Las vesículas se recogen y se purifican usando un anticuerpo que reconozca la cola citoplasmática de la glucoproteína transmembrana del virus, lo cual permite identificar las proteínas que configuran las vesículas de transporte.

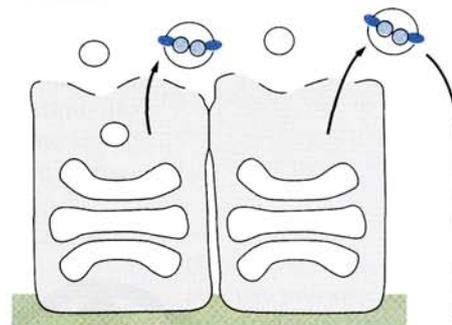
(A) 20°C glucoproteína VSV bloqueada en la red del *trans* Golgi



(B) 20°C membrana plasmática apical agujereada mediante papel de nitrocelulosa

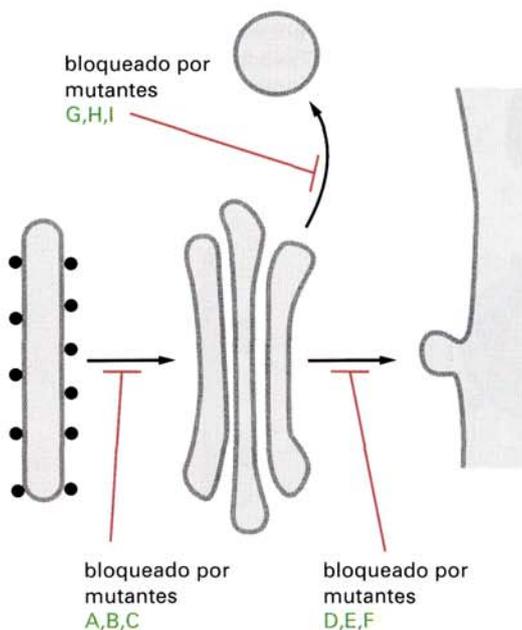


(C) 37°C +citosol +ATP



(D) anticuerpo contra la cola citosólica de la glucoproteína vírica soporte sólido

las proteínas de transporte apical se purifican mediante su unión a una columna con un anticuerpo específico



yema formando la vesícula revestida. Una vez la vesícula se desprende, la cubierta se pierde rápidamente. 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. Sin embargo, en la célula ha de actuar algún mecanismo de control adicional para evitar que la cubierta de clatrina se elimine de la yema revestida de clatrina antes de que tenga tiempo de formar una vesícula, a pesar de que la cubierta persiste más tiempo en la yema que en la vesícula. Una posibilidad es que la pérdida de la cubierta esté controlada por Ca^{2+} , el cual puede unirse a las cadenas ligeras de clatrina y desestabilizar la cubierta de clatrina. Las bombas de Ca^{2+} de la membrana plasmática bombean Ca^{2+} hacia el exterior de la célula y por lo tanto la concentración de Ca^{2+} se mantiene extremadamente baja en la cara citosólica de la membrana, lo cual permite que las depresiones se mantengan revestidas; pero una vez las vesículas revestidas se forman y migran alejándose de la membrana, se encuentran con concentraciones de Ca^{2+} mayores, que podrían desencadenar la pérdida del revestimiento.

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, tanto de vesículas de secreción que contienen grandes agregados de proteína como de fagosomas que contienen grandes partículas. En estos casos la clatrina no forma revestimientos completos sino que se concentra en determinadas zonas de las vesículas que se forman. Parece que la formación de los parches de clatrina 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.

Las adaptinas reconocen proteínas transmembrana específicas y las unen al revestimiento de clatrina⁴¹

Se cree que el ensamblaje de la cubierta de las vesículas revestidas tiene dos funciones como mínimo: proporciona la fuerza mecánica para “estirar” hacia el exterior la membrana, formando una yema, y ayuda a capturar receptores de membrana específicos junto con las moléculas a las que están unidos. Una se-

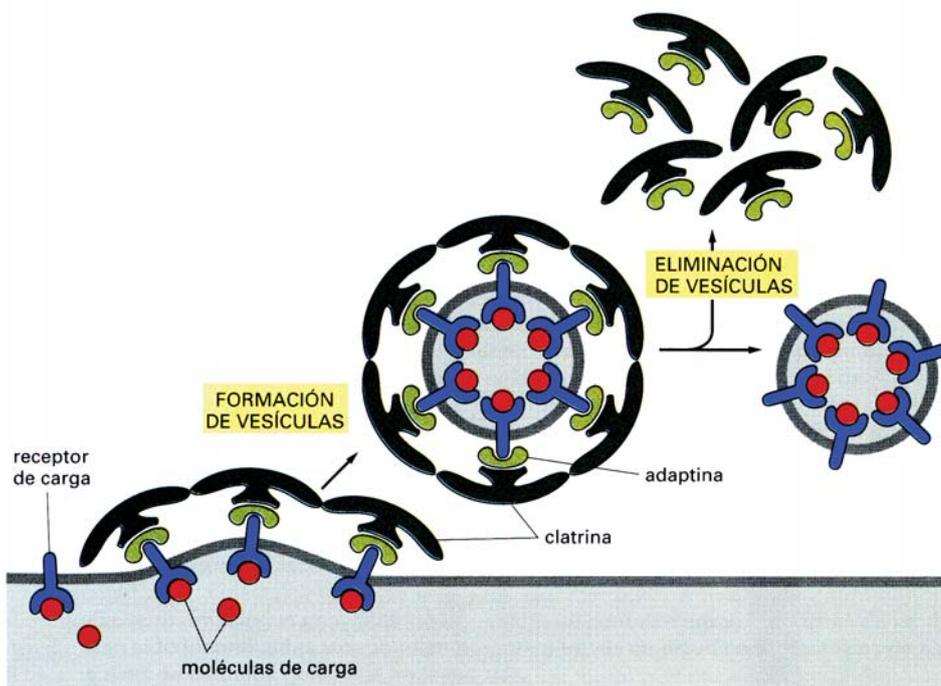


Figura 13-52 Transporte selectivo mediado por vesículas revestidas de clatrina. Las adaptinas se unen tanto a los trisquelions de clatrina como a los receptores de carga.

gunda molécula principal de recubrimiento presente en estas vesículas, un complejo formado por muchas subunidades llamado **adaptina**, participa en ambas funciones. 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 (Figura 13-52).

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 péptidos 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 (Figura 13-53). 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.

Las vesículas revestidas de coatómero median el transporte vesicular no selectivo⁴²

Se cree que las **vesículas revestidas de coatómero** median el transporte vesicular no selectivo de la ruta por defecto, que incluye el transporte desde el retículo endoplasmático al complejo de Golgi, de una cisterna del Golgi a otra y desde la red del *trans* Golgi a la membrana plasmática (Figura 13-54). Ninguno de estos procesos de transporte requieren que las vesículas que se forman capturen una carga específica en su lumen.

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 existen importantes diferencias de comportamiento entre el revestimiento de coatómero y el de clatrina. Al contrario que las cubiertas de clatrina, las de coatómeros no se autoensamblan sino que necesitan ATP que dirija su forma-

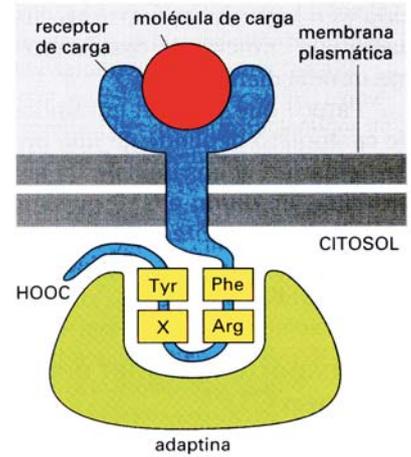


Figura 13-53 Péptido señal para la endocitosis. Se cree que los diversos receptores proteicos de superficie celular que son endocitados en las vesículas de clatrina comparten esta señal, la cual es reconocida por las adaptinas que actúan en la endocitosis mediada por receptor desde la membrana plasmática. Los aminoácidos mostrados aquí son una parte esencial de la señal.

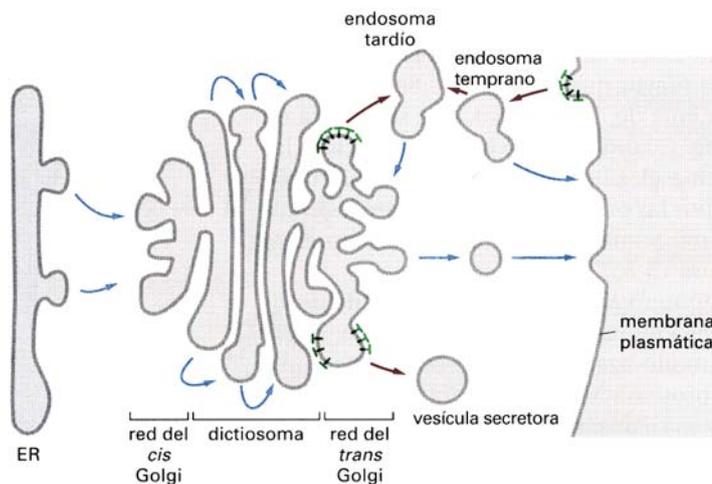


Figura 13-54 Transporte vesicular selectivo y no selectivo en células no polarizadas. Se postula que el transporte no selectivo (constitutivo) (flechas azules) está mediado por vesículas revestidas de coatómero, mientras que diversas formas de transporte selectivo (mediado por señal) (flechas rojas) 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.

ción y en lugar de separarse en cuanto la vesícula se desprende de la membrana dadora, la cubierta de coatómero se mantiene hasta que la vesícula alcanza su membrana diana.

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. Antes de comentar las particularidades de ARF, nos detendremos a revisar algunas propiedades de regulación generales de las proteínas de unión a GTP.

El transporte vesicular depende de proteínas reguladoras que unen GTP⁴³

Como se comenta en el Capítulo 5, las células contienen extensas familias de proteínas reguladoras que unen GTP. Estas proteínas actúan como interruptores moleculares que pueden alternar entre dos estados conformacionales –uno activo, unido a GTP y otro inactivo, unido a GDP– y actúan como reguladores de muchos procesos celulares complejos. Las proteínas de unión a GTP actúan en un ciclo que depende típicamente de dos componentes auxiliares: una *proteína liberadora de nucleótidos de guanina* (GNRP, de Guanine Nucleotide Releasing Protein) que cataliza el intercambio de GDP por GTP y una *proteína activadora de GTPasa* (GAP, de GTPase Activating Protein) que desencadena la hidrólisis del GTP unido.

Muchas proteínas reguladoras que unen GTP tienen un grupo lipídico unido covalentemente que les permite unirse a la membrana, y participan en una gran variedad de procesos dependientes de membrana en la célula. Se han descrito dos clases estructuralmente distintas: las *proteínas de unión a GTP monoméricas* (también llamadas *GTPasa monoméricas*), constituidas por una sola cadena polipeptídica, y las *proteínas de unión a GTP triméricas* (también llamadas *proteínas G*), constituidas por tres subunidades distintas. Aunque estudios con inhibidores muestran que ambas clases de proteínas juegan un papel esencial en el transporte vesicular, las funciones de las GTPasas monoméricas están más claras, por lo que trataremos de ellas aquí.

Parece que ARF señala el ensamblaje y el desensamblaje del revestimiento de coatómero⁴⁴

ARF es una GTPasa monomérica con una cola de ácido graso, y se cree que juega un papel crucial en el ensamblaje y desensamblaje del revestimiento de coatómero. En el citosol se encuentra altamente concentrada en la forma descargada, unida a GDP. Parece que la membrana dadora desde donde va a generarse una vesícula revestida de coatómero contiene una proteína específica liberadora de nucleótidos de guanina que hace que ARF libere su GDP y una GTP en su lugar (la concentración de GTP en el citosol es mayor que la de GDP). Se cree que la unión de GTP hace que ARF exponga la cola de ácido graso, que se inserta en la bicapa lipídica de la membrana dadora. Cuando ARF se ha unido, recluta las subunidades del coatómero, que se unen a él. El ensamblaje de la cubierta de coatómero, formado por ARF con GTP y por las proteínas de coatómero, estira la membrana induciéndola a que forme una yema, que entonces se desprende como lo hace una vesícula revestida (Figura 13-55).

Cuando la vesícula revestida de coatómero alcanza su membrana de destino, una proteína específica de la membrana diana, activadora de GTPasa, activa ARF para que hidrolice el GTP que lleva unido hasta GDP. Se cree que esto provoca un cambio de conformación en la proteína ARF de manera que la cadena de ácido graso se desprende de la membrana, causando el desensamblaje del revestimiento y permitiendo que se produzca la fusión de la membrana, como veremos. Por lo tanto ARF puede considerarse como una proteína que detecta las

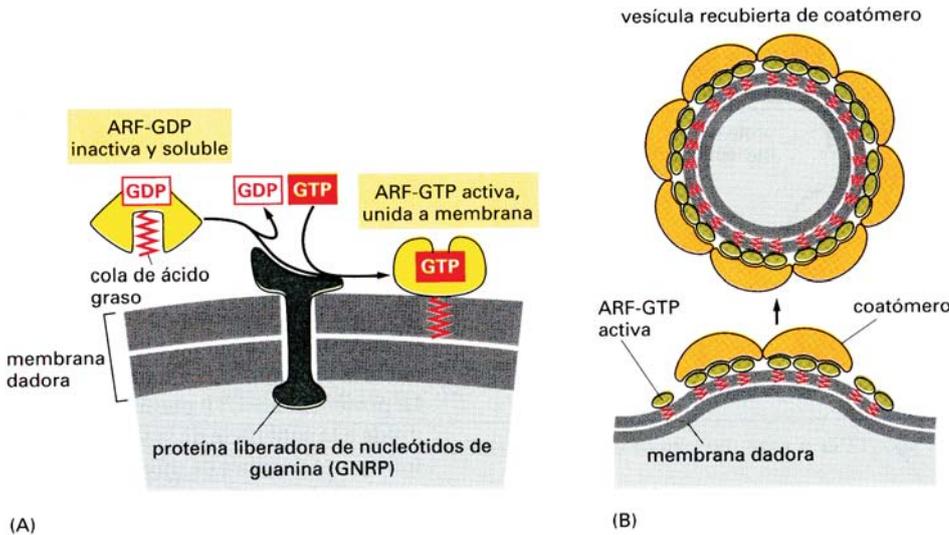


Figura 13-55 Modelo actual sobre la formación de las vesículas revestidas de coatómero. (A) La proteína ARF-GDP, soluble e inactiva, se une a una proteína liberadora de nucleótidos de guanina (GNRP) en la membrana dadora, lo cual provoca que ARF libere su GDP y se una a GTP. El GTP desencadena un cambio conformacional en ARF dejando expuesta su cadena de ácido graso, que se inserta en la membrana dadora. (B) Ahora, la proteína ARF-GTP activa unida a la membrana recluta subunidades de coatómero de la membrana. Esto hace que la membrana forme una yema. El posterior acontecimiento de fusión de membrana separa y libera la vesícula revestida. La droga brefeldina A bloquea la formación de la cubierta de coatómero inhibiendo la reacción de intercambio de GDP por GTP. Ello bloquea el tráfico de las vesículas revestidas de clatrina desde el ER a través del complejo de Golgi, haciendo que el complejo de Golgi vacíe su contenido en el ER, como se explica en la página 646.

circunstancias y genera la señal apropiada, tanto para el ensamblaje de la cubierta y la gemación de la vesícula como para el desprendimiento de la cubierta y su fusión a la membrana, como será el caso. Aún más importante, si existe una proteína liberadora de nucleótidos de guanina en la membrana dadora y una proteína activadora de GTPasa en la membrana receptora, la dirección de transporte está definida: mediante el ciclo de hidrólisis de GTP y el intercambio GDP/GTP, ARF facilita la transferencia en una única dirección.

Marcadores proteicos de orgánulo, llamados SNARE, colaboran en la dirección del transporte de vesículas⁴⁵

Las vesículas de transporte, sean o no selectivas al tomar la carga del compartimiento dador, han de ser altamente selectivas en cuanto a la membrana diana a la que se fusionan. Esto sugiere que todos los tipos de vesículas de transporte de la célula han de expresar marcadores de superficie que las identifiquen según su origen y su carga, y que sean reconocidos por receptores de las membranas diana. Aunque el mecanismo de este reconocimiento no se conoce, existe una hipótesis atractiva que supone la participación de unas proteínas denominadas **SNARE** (por razones que se comentan más adelante), de las cuales existen grupos complementarios v-SNARE en la membrana de la vesícula y t-SNARE en la membrana diana (*t* de *target*: diana) (Figura 13-56). Las proteínas SNARE están bien caracterizadas en las células nerviosas, en las cuales se cree que median la unión de las vesículas sinápticas a la membrana plasmática del terminal nervio-

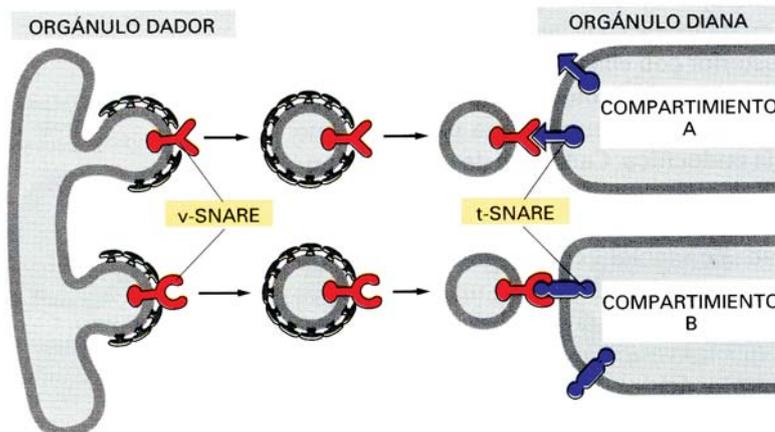


Figura 13-56 Papel propuesto para las proteínas SNARE en la dirección del transporte vesicular. Grupos complementarios de SNARE en las vesículas (v-SNARE) y de SNARE en las membranas diana (t-SNARE) determinan la selectividad del contacto de las vesículas de transporte con su membrana diana. Las proteínas v-SNARE, que están coempaquetadas con las proteínas de la cubierta durante la formación por gemación de las vesículas de transporte desde la membrana dadora, se unen a las t-SNARE complementarias de la membrana diana.

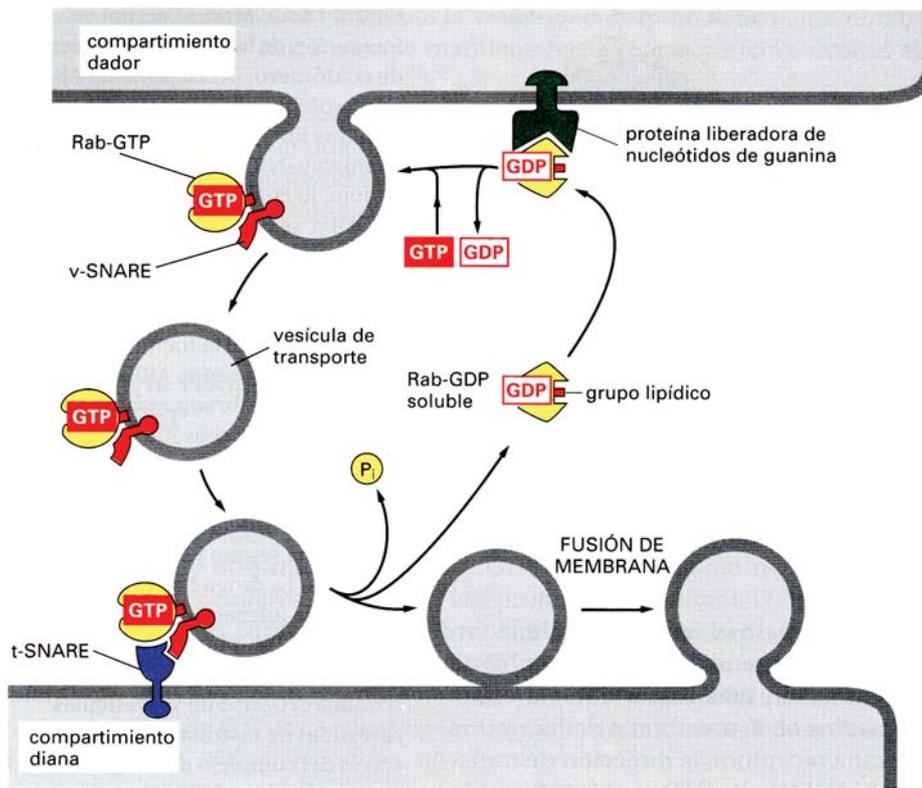


Figura 13-57 Papel propuesto para las proteínas Rab garantizando la especificidad de la unión entre las vesículas de transporte y la membrana diana. La proteína liberadora de nucleótidos de guanina en la membrana dadora reconoce una proteína Rab específica y la induce a intercambiar su GDP por GTP. Este cambio altera la conformación de la proteína Rab, exponiendo su grupo lipídico unido covalentemente, el cual ancla la proteína Rab a la membrana. La proteína Rab-GTP permanece unida a la superficie de la vesícula de transporte después de que ésta se separe de la membrana dadora. Una proteína v-SNARE de la superficie de la vesícula se une a una t-SNARE de la membrana diana, inmovilizando parcialmente la vesícula. Entonces, la proteína Rab hidroliza su GTP anclando la vesícula a la membrana diana y liberándose al citosol como Rab-GDP, desde donde puede ser reutilizada en una nueva ronda de transporte. La vesícula se fusiona entonces con la membrana diana. Nótese que los revestimientos de la vesícula han sido omitidos del esquema para mayor claridad.

so en preparación para la exocitosis: en la vesícula sináptica existe una v-SNARE y en la cara citoplasmática de la membrana plasmática existe una t-SNARE complementaria.

Se cree que las proteínas Rab aseguran la especificidad de la unión de las vesículas⁴⁶

En la célula existen muchos sistemas de membrana por lo que el proceso de unión de las distintas vesículas ha de ser altamente selectivo. Una vesícula puede inspeccionar muchas membranas potencialmente diana antes de que su v-SNARE encuentre una t-SNARE complementaria. Según un punto de vista, este proceso crucial de reconocimiento está controlado por miembros de una familia de proteínas GTPasas monoméricas llamadas **proteínas Rab**, que controlan que la interacción entre v-SNARE y t-SNARE sea correcta. Según este enfoque, las proteínas Rab están unidas a la superficie de las vesículas revestidas que se están formando en la membrana dadora. Cuando una vesícula encuentra la membrana diana adecuada, la unión de v-SNARE a t-SNARE permite que la vesícula permanezca unida durante el tiempo necesario para que la proteína Rab hidrolice el GTP que lleva unido, lo cual bloquea a la vesícula en la membrana diana, preparándola para la fusión posterior con ella (Figura 13-57).

Las células eucariotas tienen muchos tipos de proteínas Rab, cada una de las cuales está asociada con un orgánulo rodeado de membrana particular que participa en la vía de secreción o en la vía endocítica. Cada uno de estos orgánulos presenta por lo menos una proteína Rab en la superficie citosólica (Tabla 13-1). La primera proteína Rab (llamada Sec4) fue descubierta en levaduras mediante la selección de mutaciones (llamadas mutaciones *SEC*) que interfieren en el proceso de secreción. Posteriormente se vio que se trataba de un componente de las vesículas de secreción necesario para su unión a la membrana plasmática; las mutaciones que los modifican evitan que las vesículas de secreción viertan su contenido al exterior. Las secuencias de aminoácidos de estas proteínas Rab son más diferentes entre sí en su zona carboxilo terminal; experimentos de inter-

Tabla 13-1 Localizaciones subcelulares de algunas proteínas Rab

Proteína*	Orgánulo
Rab1 (YPT1)	ER y complejo de Golgi
Rab2	ER transicional, red del <i>cis</i> Golgi
Rab3A	vesículas de secreción
Rab4	endosomas tempranos
Rab5	membrana plasmática
Rab6	cisternas del <i>trans</i> y del <i>medial</i> Golgi
Rab7	endosomas tardíos
Rab9	endosomas tardíos, red del <i>trans</i> Golgi
Sec4	vesículas de secreción

* Todas estas proteínas se han hallado en células de mamífero excepto Sec4 e YPT1, que son proteínas de levadura.

cambio de extremos usando técnicas de ingeniería genética indican que es precisamente este extremo el que determina la localización intracelular de cada miembro de la familia, probablemente permitiéndole que se una a un factor dador de nucleótidos de guanina complementario, situado en la superficie del orgánulo particular (véase Figura 13-57). Antes de que las SNARE fueran las candidatas como las proteínas marcadoras de orgánulos que guían el transporte de vesículas, se creía que las proteínas Rab ejercían esta función por su notable distribución específica entre los orgánulos. Sin embargo, actualmente se sabe que algunas proteínas Rab son funcionalmente intercambiables, ya que mediante experimentos de ingeniería se ha podido localizarlas en otros orgánulos. Por lo tanto no pueden constituir la única explicación de la selectividad del transporte vesicular.

La fusión de vesículas está catalizada por una “maquinaria de fusión de membrana”⁴⁷

Cuando la vesícula de transporte ha reconocido su membrana diana y se ha unido a ella, la vesícula ha de liberar su carga mediante la fusión de membrana. Sin embargo, la fusión de la membrana no se produce siempre inmediatamente. Como hemos visto, en la exocitosis regulada la fusión no ocurre hasta que es desencadenada por una señal extracelular.

La unión y la fusión son dos procesos distintos y separables. Es posible, por ejemplo, evitar la fusión pero no la unión, manteniendo los niveles de Ca^{2+} citosólico muy bajos. Ello provoca la acumulación de vesículas unidas, pero no fusionadas, con su membrana diana. La unión sólo requiere que las dos mem-

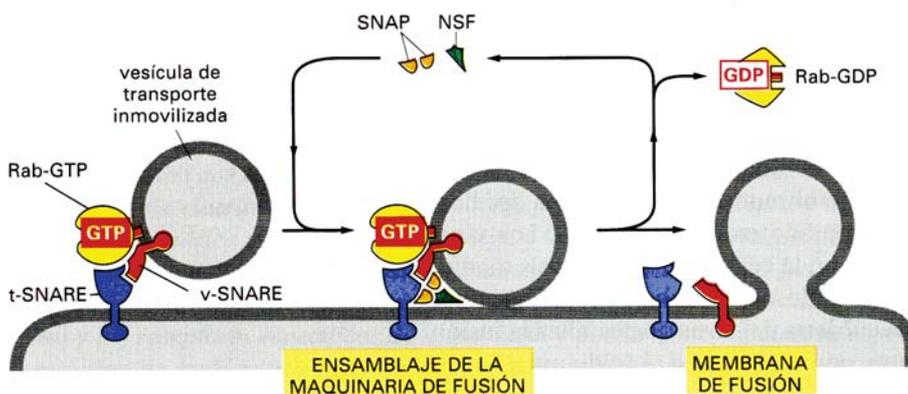


Figura 13-58 Modelo actual sobre la fusión de vesículas mediada por proteína. Una compleja maquinaria de fusión cataliza la fusión de una vesícula de transporte con su membrana diana. Sólo han sido caracterizados dos de los componentes proteicos del complejo de fusión: NSF (proteína de fusión sensible a *N*-etilmaleimida, de *N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) y SNAP (proteínas solubles de acoplamiento a NSF, de soluble NSF attachment proteins). (NEM es un compuesto químico que modifica los grupos libres SH expuestos en las superficies proteicas y por lo tanto inactiva proteínas cuyos grupos SH expuestos sean necesarios para su actividad.) Las proteínas SNARE fueron identificadas por primera vez como receptores de SNAP (de aquí su nombre): unen tanto v-SNARE como t-SNARE. La unión de SNAP permite que NSF se una. Este complejo, con la ayuda de acil Coa y proteínas aún no identificadas, cataliza la fusión de las dos bicapas lipídicas. NSF es una ATPasa que hidroliza ATP liberando el complejo una vez ha realizado su trabajo (no se muestra).

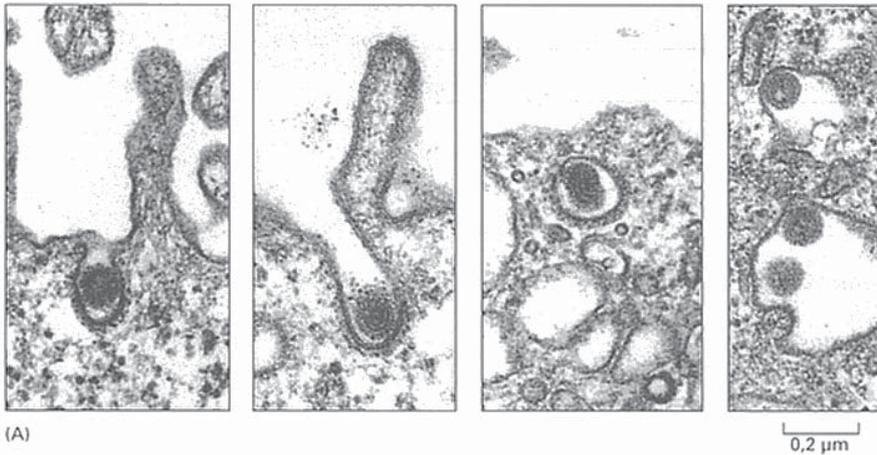
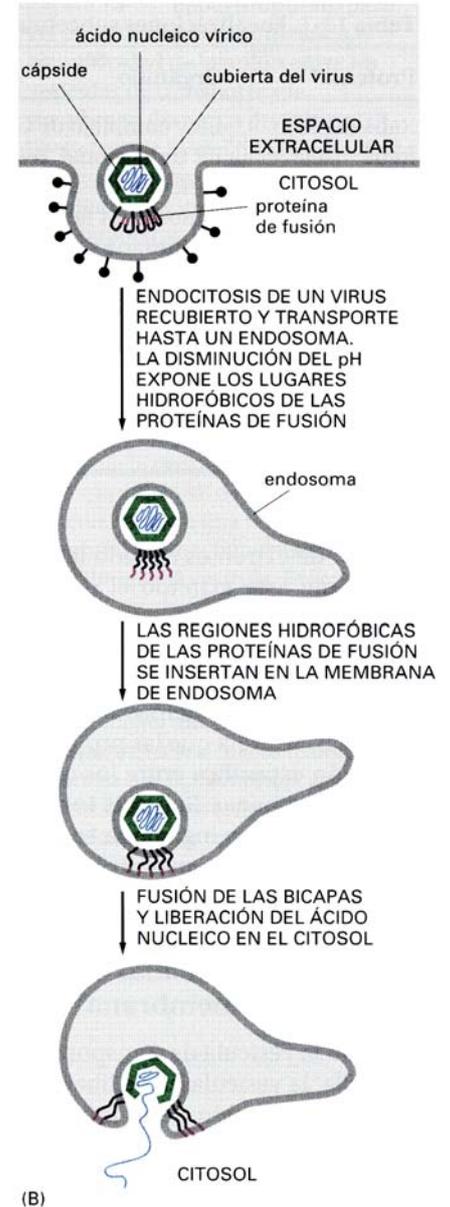


Figura 13-59 Entrada en las células de una plaga de virus de ave.

(A) Electronmicrografías que muestran cómo es endocitado un virus en una vesícula revestida de clatrina, cómo es conducido a un endosoma, y cómo se escapa de él fusionándose con la membrana del endosoma. (B) Dibujo esquemático de la forma en que unas proteínas de fusión de la superficie del virus median su salida del endosoma. (A, cortesía de Karl Matlin y Hubert Reggio, de K.S. Matlin et al., *J. Cell Biol.* 91:601-613, 1981, con permiso de copyright de The Rockefeller University Press.)



branas se acerquen lo suficiente como para permitir que las proteínas que sobresalen de la bicapa lipídica interactúen entre sí y se adhieran. La fusión requiere una aproximación mayor, quedando las membranas a 1,5 nm una de otra de manera que puedan juntarse. Para que se produzca esta aproximación, se ha de desplazar el agua de la superficie hidrofílica de la membrana –proceso que es altamente desfavorable desde el punto de vista energético. Parece probable que todas las fusiones de membrana en las células sean catalizadas por proteínas de fusión especializadas que proporcionen un camino para atravesar esta barrera energética. El mecanismo todavía se conoce muy mal. En el caso de las vesículas de transporte revestidas de coatómoro, por lo menos, la fusión con la membrana diana requiere ATP, GTP, acil CoA, y diversos componentes proteicos. Se conocen dos componentes proteicos, denominadas NSF y SNAP (por razones que se explican en el pie de la Figura 13-58), que reaccionan de forma cíclica con las membranas que se van a fusionar y el citosol. Las SNAP se unen tanto a v-SNARE de la membrana de la vesícula como a t-SNARE de la membrana diana, iniciando el ensamblaje del aparato de fusión, el cual cataliza la fusión de las dos bicapas lipídicas en la interfase membranosa de la vesícula diana (Figura 13-58).

La proteína de fusión de membrana mejor caracterizada está sintetizada por un virus⁴⁸

La fusión de membranas es importante en otros procesos además de serlo en el transporte de vesículas; se conocen con detalle las fusiones de membrana más simples, que son las catalizadas por proteínas víricas de fusión víricas. Las proteínas víricas de fusión juegan un papel crucial permitiendo la entrada de los virus recubiertos (los cuales tienen una cubierta membranosa de tipo bicapa lipídica) al interior de las células que infectan (comentado en el Capítulo 6). Los virus como el virus de la gripe, por ejemplo, entran en la célula por endocitosis mediada por receptor y son transportados hasta los endosomas. El bajo pH de los endosomas activa una proteínas de fusión de la cubierta del virus que cataliza la fusión del virus con las membranas del endosoma, permitiendo así al ácido nucleico vírico escapar al citosol, donde se puede replicar (Figura 13-59).

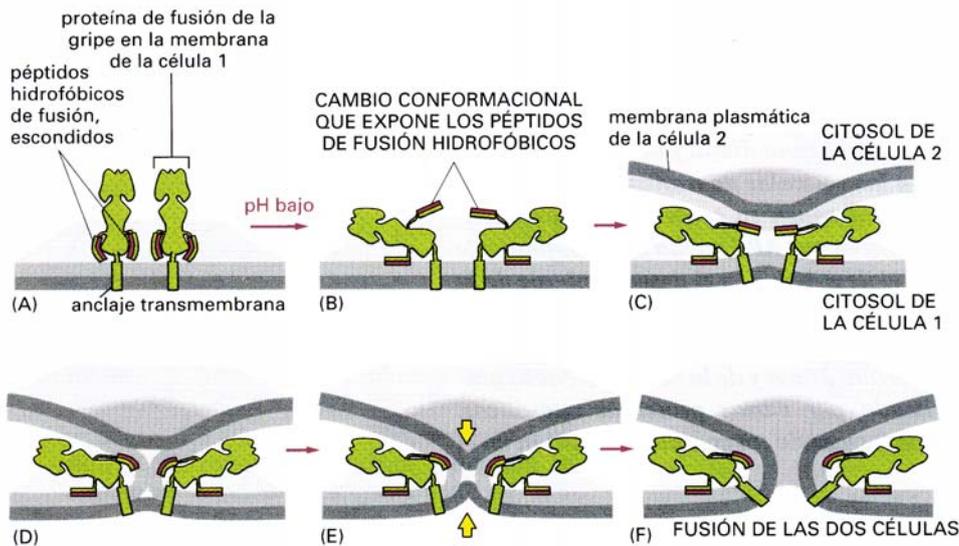


Figura 13-60 Modelo para explicar cómo una proteína de fusión de membrana cataliza la fusión de la bicapa lipídica. Una célula que expresa en su superficie la proteína de fusión de la gripe se fusiona rápidamente con sus células vecinas una vez se ha expuesto a pH bajo. Los procesos de fusión se producen a través de un paso intermedio (D y E) en el que sólo se fusionan las capas lipídicas exteriores de la membrana, mientras que las dos capas internas se mantienen separadas. Incluso se han obtenido formas mutantes de la proteína de fusión que permiten que la reacción se desarrolle sólo hasta este estado intermedio.

Se han clonado los genes que codifican varias proteínas de fusión y se han utilizado para transfectar células eucariotas en cultivo. Estas células transfectadas expresan las proteínas víricas en su superficie, y bajo condiciones adecuadas se fusionan entre sí formando células gigantes multinucleadas. En el caso mejor estudiado, el del virus de la gripe, la estructura tridimensional de la proteína de fusión ha sido determinada por cristalografía de rayos X. Se ha demostrado que el pH bajo induce un cambio de conformación importante en la proteína de fusión, que expone una región hidrofóbica, antes escondida, en la superficie de la proteína, que ahora puede interactuar con la bicapa lipídica de la membrana diana. Parece que una agrupación de regiones hidrofóbicas de este tipo en proteínas de fusión muy cercanas une las dos bicapas lipídicas manteniéndolas muy cerca una de la otra, de forma que se desestabilizan y se fusionan (Figura 13-60).

Recientemente, en mamífero se ha identificado una proteína semejante a las víricas, y se cree que media la fusión de las membranas plasmáticas del espermatozoide y del huevo que se produce en la fecundación (se comenta en el Capítulo 20). Como resaltan todos estos ejemplos, bajo circunstancias normales las membranas no se fusionan fácilmente. La fusión de membranas requiere la participación de proteínas especiales y está sometida a controles selectivos —una restricción que es crucial tanto para mantener la identidad de la célula en sí misma como para mantener la individualidad de cada uno de los compartimientos intracelulares.

Resumen

Las diferencias entre los compartimientos membranosos de una célula se mantienen gracias a un aporte de energía libre, que impulsa el transporte selectivo y dirigido de componentes particulares de membrana desde un compartimiento a otro. Las vesículas de transporte se generan a partir de regiones revestidas especializadas de la membrana dadora. El ensamblaje de la cubierta colabora en la formación de la vesícula. Existen dos tipos bien caracterizados de vesículas revestidas: las vesículas revestidas de clatrina, que median el transporte vesicular selectivo desde la membrana plasmática y la red del trans Golgi, y las vesículas revestidas de coatómero, que permiten el transporte vesicular no selectivo desde el ER a las cisternas del Golgi. Las adaptinas proporcionan una unión molecular entre las cubiertas de clatrina y los receptores específicos de membrana y por lo tanto median la captación selectiva de moléculas a transportar por las vesículas revestidas de clatrina. Las vesículas revestidas han de perder su cubierta para fusionarse con la membra-

na diana apropiada: en cuanto las vesículas entran en contacto con su membrana diana, los revestimientos de clatrina se pierden.

Diversos tipos de GTPasas monoméricas, incluyendo ARF y las proteínas Rab, participan en la regulación de varias etapas del transporte vesicular, incluyendo la gemación de las vesículas, el contacto con la membrana diana y la fusión. Las proteínas ARF, Rab, y v-SNARE se incorporan a las vesículas de transporte durante la gemación y aseguran que las vesículas sólo entreguen su contenido al compartimiento rodeado de membrana apropiado: se cree que ARF media el ensamblaje de la cubierta de coatómero (y probablemente el de clatrina) y el desensamblaje de la cubierta de coatómero, mientras que las proteínas Rab parece que aseguran la especificidad de unión anclando la vesícula a la membrana diana cuando interactúan SNARE complementarias de la membrana diana y de la vesícula. Por lo tanto, la fusión de membranas está catalizada por varias proteínas citosólicas, incluyendo SNAP y NSF, que se unen entre sí formando un complejo de fusión en el lugar de anclaje.

Bibliografía

General

- Gal, S. Raikhel, N.V. Protein sorting in the endomembrane system of plant cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:636-640, 1993.
- Gruenberg, J.; Clague, M.J. Regulation of intracellular membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:593-599, 1992.
- Pryer, N.K.; Wuesthube, L.J.; Schekman, R. Vesicle-mediated protein sorting. *Annu. Rev. Biochem.* 61:471-516, 1992.
- Rothman, J.E. The reconstitution of intracellular protein transport in cell-free systems. *Harvey Lect.* 86:65-85, 1992.

Citas

- Balch, W.E. Molecular dissection of early stages of the eukaryotic secretory pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2:634-641, 1990.
- Hauri, H.-P.; Schweizer, A. The endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:600-608, 1992.
- Saraste, J.; Kuismanen, E. Pathways of protein sorting and membrane traffic between the rough endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *Semin. Cell Biol.* 3:343-355, 1992.
- Schwaniger, R.; Plutner, H.; Bokoch, G.M.; Balch, W.E. Multiple GTP-binding proteins regulate vesicular transport from the ER to Golgi membranes. *J. Cell Biol.* 119:1077-1096, 1992.
- Driouich, A.; Faye, L.; Staehelin, L.A. The plant Golgi apparatus: a factory for complex polysaccharides and glycoproteins. *Trends Biochem. Sci.* 18:210-214, 1993.
- Griffing, L.R. Comparisons of Golgi structure and dynamics in plant and animal cells. *J. Electron Microsc. Tech.* 17:179-199, 1991.
- Mollenhauer, H.H.; Morre, D.J. Perspectives on Golgi apparatus form and function. *J. Electron Microsc. Tech.* 17:2-14, 1991.
- Rambourg, A.; Clermont, Y. Three-dimensional electron microscopy: structure of the Golgi apparatus. *Eur. J. Cell Biol.* 51:189-200, 1990.

- Hauri, H.-P.; Schweizer, A. The endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:600-608, 1992.
- Lippincott-Schwartz, J. Bidirectional membrane traffic between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Trends. Cell Biol.* 3:81-88, 1993.
- Pelham, H.R. Recycling of proteins between the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3:585-591, 1991.
- Doms, R.W.; Russ, G.; Yewdell, J.W. Brefeldin A redistributes resident and itinerant Golgi proteins to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 109:61-72, 1989.
- Graham, T.R.; Scott, P.A.; Emr, S.D. Brefeldin A reversibly blocks early but not late protein transport steps in the yeast secretory pathway. *EMBO J.* 12:869-877, 1993.
- Lippincott-Schwartz, J.; Yuan, L.; Tipper, C.; et al. Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell* 67:601-616, 1991.
- Pelham, H.R. Multiple targets for Brefeldin A. *Cell* 67:449-451, 1991.
- Takizawa, P.A.; Yucel, J.K.; Veit, B.; et al. Complete vesiculation of Golgi membranes and inhibition of protein transport by a novel sea sponge metabolite, illimaquinone. *Cell* 73:1079-1090, 1993.
- Balch, W.E.; Dunphy, W.G.; Braell, W.A.; Rothman, J.E. Reconstitution of the transport of proteins between successive compartments of the Golgi measured by the coupled in incorporation of N-acetylglucosamine. *Cell* 39:405-416, 1984.
- Kornfeld, R.; Kornfeld, S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 54:631-634, 1985.
- Schachter, H.; Roseman, S. Mammalian glycosyltransferases: their role in the synthesis and function of complex carbohydrates and glycolipids. In *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans* (W.J. Lennarz, ed.), Chap. 3. New York: Plenum Press, 1980.
- Armstrong, J. Latest episodes in the Golgi serial. *Curr. Biol.* 2:335-337, 1992.
- Graham, T.R.; Emr, S.D. Compartmental organization of Golgi-specific protein modification and vacuolar protein sorting events defined in a yeast *sec18* (NSF) mutant. *J. Cell Biol.* 114:207-218, 1991.