

Características bioquímicas y actividad funcional del compartimiento endocítico en la célula hepática

C. Enrich* y W. H. Evans**

Departamento de Biología Celular
Facultad de Medicina
Universidad de Barcelona
08028 Barcelona (España)

(Recibido el 19 de diciembre de 1989)

C. ENRICH and W. H. EVANS. *Biochemical and Functional Activities of Hepatic Endocytic Compartment*. Rev. esp. Fisiol., 46 (1), 95-102, 1990.

When many ligands, polypeptidic hormones, growth factors, metabolic carriers, plasma glycoproteins, etc., bind to cell-surface receptors, ligand-receptor complexes are internalized by a process called receptor-mediated endocytosis towards the endocytic compartment. The endocytic compartment is an extensive network of anastomosing vesiculo-rubular membranes that differs biochemically and functionally from other intracellular organelles. Endosome fractions were prepared and antibodies raised against endosome membrane proteins. In addition to a detailed biochemical study of proteins and glycoproteins the antibodies were used to immunolocalize the endocytic structures in the hepatic cell. These studies aided to demonstrate the involvement of endocytic compartment not only in the sorting of proteins to specific domains of the plasma membrane but in the identification of «resident» endosome components.

Key words: Endosomes, Hepatocyte, Receptor-mediated endocytosis, Intracellular traffic.

Los métodos de fraccionamiento celular han demostrado y resuelto diferencias entre los principales orgánulos y sistemas de membranas en las células de los mamíferos. Un nuevo sistema de membranas que está siendo caracterizado es el *compartimiento endocítico*, que comprende una serie de estructuras de membrana vesiculo-tubulares muy heterogéneas y que se extiende desde la superficie de la célula hacia la región perinuclear (3, 12). El compartimiento endocítico, *los endosomas*, tiene muchas funciones entre las que incluye ser

el centro del «sorting» de entrada; es decir, de clasificación —distribución de los materiales internalizados por la célula y que han de ser enviados a diferentes destinos intracelulares (lisosomas, aparato de Golgi o hacia otras regiones de la membrana plasmática).

El hígado es muy activo en procesos de endocitosis, tanto en lo que se refiere a la endocitosis inespecífica (de fase fluida), como la endocitosis mediada por receptores específicos. Por esta razón, se ha utilizado como material para el aislamiento y caracterización de los endosomas.

Esencialmente, los hepatocitos están implicados en la captación o endocitosis de hormonas polipeptídicas, factores de

* A quien debe ser dirigida la correspondencia.

** National Institute for Medical Research, Mill Hill, London NW7 1AA (U. K.).

crecimiento, proteínas plasmáticas modificadas y una gran diversidad de nutrientes y metabolitos. Recientemente, se ha podido demostrar que el compartimiento endocítico de los hepatocitos también está implicado en la modulación de componentes de la matriz extracelular así como de sus receptores, las «integrinas».

En este trabajo se analizan algunas de las características bioquímicas del compartimiento endocítico de la célula hepática y sus funciones más relevantes.

Material y Métodos

Animales. — Se han utilizado ratas macho Sprague-Dawley de 200-300 g, alimentadas con dieta estándar y sometidas a ritmos de luz-oscuridad de 12 horas.

Reactivos. — Todos los productos utilizados han sido de pureza analítica. Nycomed (Nyegaard Diagnostica, Oslo). Los reactivos para inmunofluorescencia son de Bio-Yeda Ltd (Rehovot/Israel), la proteína A y el Triton X-114 son de Sigma y los radioisótopos I^{125} y $Met-S^{35}$, son de Amersham.

Métodos. — Para el aislamiento de los endosomas hepáticos se ha utilizado el método descrito por EVANS (6).

La inmunocitoquímica se ha realizado tanto a nivel de microscopía óptica (peroxidasa-antiperoxidasa) como por inmunofluorescencia indirecta (3) y a nivel de microscopía electrónica con proteína A-oro coloidal (Janssen). Los anticuerpos policlonales contra proteínas integrales de la membrana de los endosomas han sido obtenidos mediante la solubilización con Triton X-114 (1).

Resultados

Características bioquímicas de los endosomas hepáticos. — A partir de estudios

cinéticos con hormonas marcadas radioactivamente (7) se pudo diseñar la estrategia de aislamiento y fraccionamiento celular de las vesículas endocíticas. Se han aislado tres fracciones de endosomas: los endosomas periféricos, que corresponde a una fracción de vesículas que contienen complejos ligando-receptor; la fracción endosomas perinucleares, que corresponde a una fracción de vesículas que esencialmente contienen ligandos, y una tercera fracción «enriquecida en receptores» que son vesículas que contienen esencialmente receptores y que muy probablemente se trate de vesículas de reciclaje.

Estas fracciones de endosomas han sido analizadas bioquímicamente y se ha determinado las actividades enzimáticas de enzimas marcadores de diferentes compartimientos intracelulares (4, 8).

Cuando se estudia el contenido polipeptídico de las fracciones de endosomas se puede observar, en primer lugar, una considerable complejidad en cuanto a la cantidad de proteínas en este compartimiento y, en segundo lugar, una gran similitud con el patrón polipeptídico correspondiente a la membrana plasmática especialmente de la región sinusoidal del hepatocito —lo que confirma que el compartimiento endocítico deriva o es la continuación de regiones de la membrana plasmática. La figura 1(a) ilustra la complejidad de la población polipeptídica de los endosomas.

Localización del compartimiento endocítico en los hepatocitos. — Los endosomas aislados se solubilizaron en Triton X-114 y la fracción rica en detergente, que contiene las proteínas integrales, se utilizó para la producción de anticuerpos policlonales. La figura 1(b) muestra el análisis mediante Western-blot del antisuero en las fracciones de endosomas hepáticos. El antígeno reconocido mayoritariamente por dicho antisuero es el receptor de las asialoglucoproteínas (3). De hecho, otros autores (18, 20, 21) ya habían demostrado

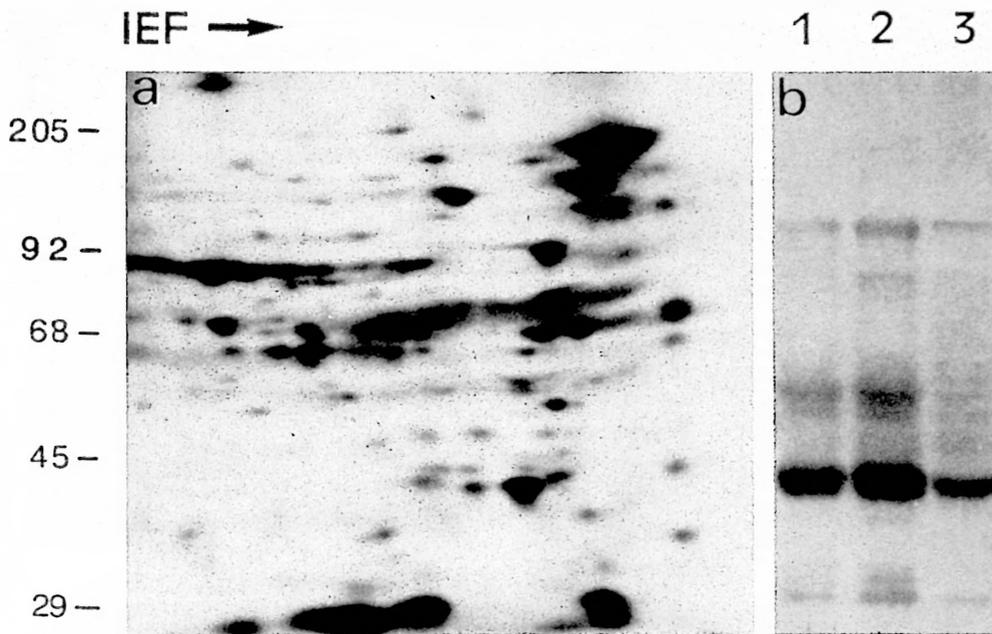


Fig. 1. Análisis electroforético bidimensional de las proteínas (a) y Western-blot del anticuerpo (b) de los endosomas hepáticos.

a) Las proteínas se marcaron con Metionina- S^{35} y la fotografía corresponde a la fluorografía del gel bidimensional. IEF, dirección de la primera dimensión, isoelectroenfoque. Pesos moleculares en kilodaltons. b) Western-blot: el anticuerpo utilizado fue el generado a partir de la solubilización de los endosomas con Triton X-114. La autoradiografía corresponde a los gels marcados con proteína A - I^{125} , 1, periféricos; 2, endosomas perinucleares; 3, fracción enriquecida en receptores. El antígeno inmunodominante reconocido por el antisuero (aprox. 43 kD) se identificó como el receptor de las asialoglucoproteínas.

la existencia de dos *pools* del receptor: uno en la superficie celular y otro intracelular, siendo este último más importante cuantitativamente. Estos anticuerpos se han utilizado para la inmunolocalización de las estructuras endocíticas en el hígado de rata mediante técnicas inmunocitoquímicas. En la figura 2 se muestra, a diferentes niveles, la localización de las estructuras endocíticas.

Discusión

Mecanismos moleculares de «sorting» en los endosomas. — El mecanismo de «sor-

ting» mejor conocido es la disociación de los complejos ligando-receptor mediante la disminución de pH en el interior del endosoma (10, 16, 19). Se conoce una serie de receptores que son sensibles a los cambios de pH producidos por la actividad de la bomba de protones de las vesículas endocíticas: ejemplos de este tipo son el receptor de la transferrina, el de las asialoglucoproteínas, de las fosfomanosil-glicoproteínas (enzimas lisosómicos), la toxina de la difteria y de los virus capsulados (*Semliki Forest virus*). El pH a que se produce la disociación es entre 5 y 6. Por el contrario, existe una serie de receptores con poca capacidad de reciclaje que la di-

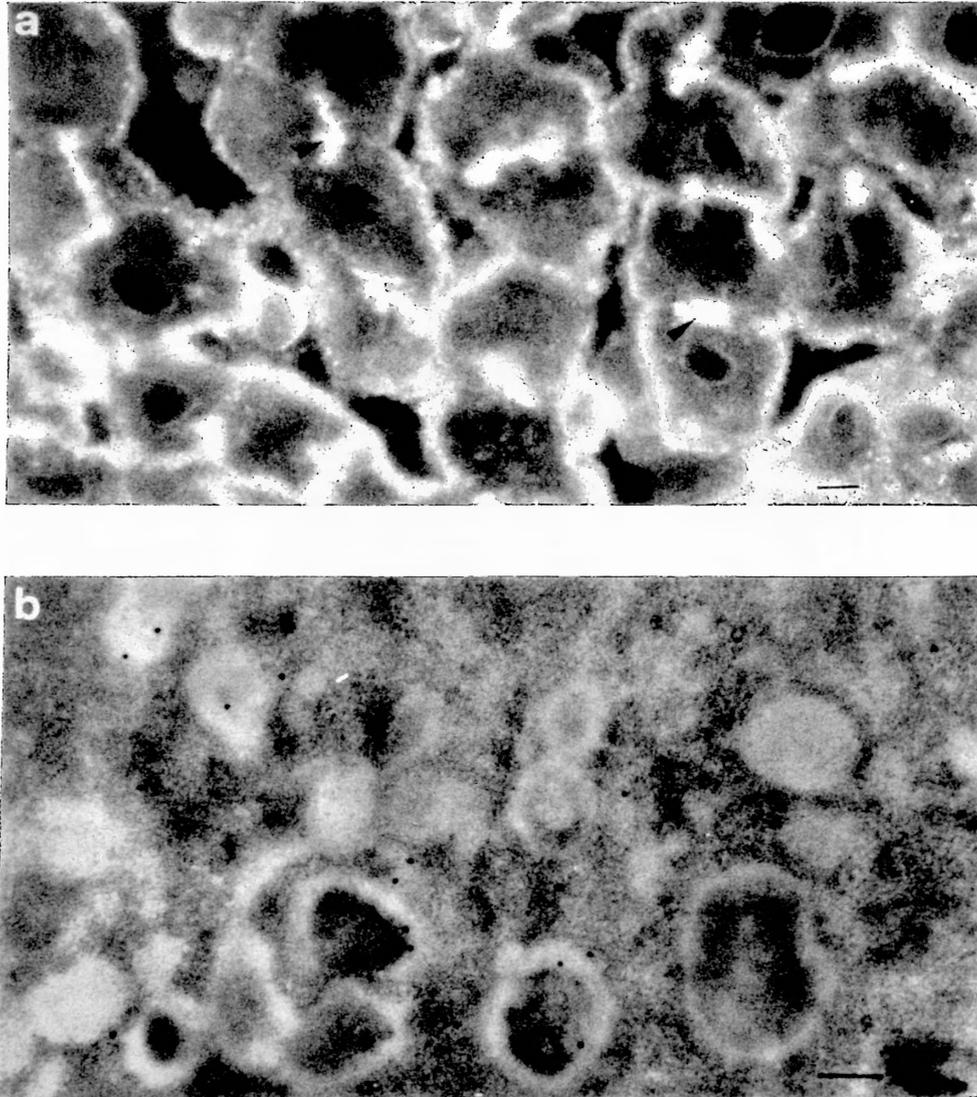


Fig. 2. *Inmunolocalización de los endosomas hepáticos.*

a) Inmunofluorescencia indirecta en secciones congeladas de hígado de 6 μm aproximadamente y fijadas en acetona. Las flechas indican la región del canaliculo biliar. Barra: 5 μm . b) Microscopia electrónica, inclusión en Lowicryl K4M. Cortes finos incubados con el antisuero anti-endosoma y a continuación con proteína A - oro coloidal de 14 nm. Se pueden observar las partículas de oro en vesículas endocíticas de los endosomas perinucleares. Barra: 0,2 μm .

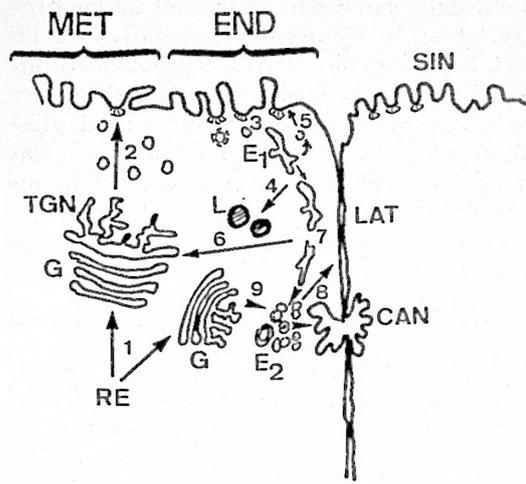


Fig. 3. Tráfico de vesículas y compartimientos endocíticos en la célula hepática.

Las proteínas sintetizadas en el retículo endoplasmático (RE) son transferidas a los diferentes complejos de Golgi (G) (via 1); procesadas y modificadas salen por el trans-Golgi network (TGN) hacia diversos destinos celulares (2) la membrana plasmática, secreción exocítica y/o (9) hacia estructuras endocíticas. E1 representa los endosomas periféricos donde van a parar los materiales captados en la endocitosis a partir de las regiones recubiertas o no de clatrina en la membrana plasmática. A partir de E1, los complejos ligando-receptor pueden seguir diferentes vías: (5) de reciclaje directo hacia la membrana plasmática, (7) internalización hacia los E2 endosomas perinucleares o (4), una de las vías más importantes, dirigirse hacia los lisosomas (L) para la degradación. Alternativamente, determinados receptores pueden seguir la vía (6) hacia el aparato de Golgi para la «reparación» y volver a la membrana plasmática. Finalmente, a partir de los endosomas perinucleares hay evidencias que indican una posible vía directa de inserción a determinados dominios de la membrana plasmática (8): membrana plasmática de la región canalicular (CAN) o de la membrana lateral (LAT). De esta forma, la región de la membrana plasmática sinusoidal del hepatocito (SIN) podría estar constituida por 2 subdominios funcionales: un dominio metabólico (MET) implicado esencialmente en la secreción y uno endocítico (END) implicado en procesos de endocitosis.

sociación de sus ligandos respectivos no se ve afectada por la disminución del pH; entre ellos, el receptor de la insulina y el del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (17).

Otro tipo de mecanismo, menos conocido, es la segregación de los receptores endocitados a las vesículas de reciclaje. El hecho de que se detecte la concentración de receptores en las regiones tubulares de los endosomas hace pensar que la «geometría» de estas estructuras pueda ser responsable en la especificidad del «sorting».

Un tercer mecanismo, que también modula la clasificación de ligandos y receptores, es la estructura oligomérica de los ligandos. El receptor para la Fc de las IgG's es una glucoproteína transmembrana de 55 kD de peso molecular, que ha sido aislada y purificada, y su gen, clonado (15). Este receptor es de la familia de los no sensibles a la disminución del pH; cuando el receptor se une a un ligando monovalente (p. e. el fragmento de un Fab de un anticuerpo monoclonal) se observa que el receptor endocitado, va al compartimiento endocítico y rápidamente es reciclado hacia la membrana plasmática. Cuando el receptor se une a un ligando polivalente, después de pasar por el compartimiento endocítico, va directamente hacia los lisosomas. Es decir, después de la endocitosis, tanto el ligando como posiblemente el estado oligomérico del receptor pueden influir decisivamente en el destino.

¿Cómo puede el endosoma seleccionar receptores específicos para transportarlos a los lisosomas? El pH, por sí solo, no parece estar implicado ya que agentes que elevan el pH intravesicular (monensina, cloruro amónico, cloroquina) no bloquean el transporte (tráfico) intracelular normal de los receptores de las Fc unidos a sus ligandos (11). Resultados parecidos se han observado para la gonadotropina coriónica, otro ejemplo de ligando que no se disocia de su receptor a pH ácido. Una posibilidad interesante, que quizá podría

considerarse como cuarto mecanismo, ha surgido a partir de estudios de microscopía electrónica; dos ligandos diferentes unidos a sus receptores específicos, el EGF y el Fc, se han encontrado fuertemente asociados con pequeñas vesículas de membrana dentro del endosoma. Presumiblemente, estas vesículas se forman a partir de invaginación de la membrana del endosoma. La segregación de los complejos ligando-receptor a estas estructuras (cuerpos multivesiculares) podría evitar el reciclaje y, de esta forma, se transportarían a los lisosomas, junto con otros materiales del endosoma.

Por último, se tiene muy poca información respecto de los mecanismos que modulan el tráfico de receptores de moléculas de la matriz extracelular (fibronectina, laminina, heparan sulfato). El hecho de que existan receptores específicos, las integrinas (13) para estas moléculas y que ha sido demostrada su presencia en el compartimiento endocítico (2, 5), indica que algunos de sus componentes pueden acceder a los mecanismos de degradación y/o reparación de la célula donde están asociados.

Funciones del compartimiento endocítico en la célula hepática. — Las funciones más importantes de los endosomas hepáticos son (fig. 3): 1. Los endosomas constituyen el mayor puerto de entrada de los ligandos circulantes; 2) El «locus» de desacoplamiento de ligandos sensibles al pH; 3) El centro de «sorting» y del tráfico de proteínas de membrana hacia lisosomas, dominios específicos de la membrana plasmática y otros destinos intracelulares, p.e. el núcleo; 4) Transducción y amplificación de señales extracelulares, p.e. receptor de la insulina; 5) Reparación de receptores durante el reciclaje, p.e. resialización; 6) Control del tráfico de canales iónicos; 7) Turnover de componentes de la matriz extracelular (5). 8) Procesamiento de receptores, p.e. sialidasas, manosidasas; 9) Implicación en el mantenimiento y genera-

ción de la polaridad funcional de las proteínas de la membrana plasmática en las células epiteliales (14); 10) Posible implicación en la inserción vectorial de determinadas proteínas en la membrana plasmática de la región canalicular, p.e. las unidas a la membrana por medio de un anclaje sensible a la fosfolipasa (9).

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por la «Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (PM88-0044)». La colaboración London-Barcelona es gracias a una *Travel Grant* concedida por el British Council y Acciones Integradas.

Resumen

La consecuencia inmediata de la endocitosis de hormonas polipeptídicas, factores de crecimiento, metabolitos, proteínas plasmáticas, etc., es la transferencia de los materiales captados y de sus receptores al compartimiento endocítico. Los endosomas hepáticos constituyen una población heterogénea de morfología vesículo-tubular que se diferencia bioquímica y funcionalmente de otros orgánulos celulares. El aislamiento de fracciones purificadas de endosomas y la producción de anticuerpos contra proteínas de la membrana de los endosomas ha permitido realizar un detallado estudio bioquímico de su composición proteica y glicoproteica y conocer la localización del compartimiento endocítico en el hepatocito. Además, se demuestra que el compartimiento endocítico está implicado activamente en el «sorting», no sólo de entrada, sino de salida de determinadas proteínas de la membrana plasmática. Por último, se inicia el estudio de proteínas específicas del compartimiento endocítico que han de ser, muy probablemente, las responsables de las funciones de clasificación-distribución de ligandos y receptores a los diferentes destinos celulares.

Palabras clave: Endosomas, Tráfico intracelular, Hepatocito, Endocitosis mediado por receptores.

Bibliografía

1. Bordier, C.: *J. Biol. Chem.*, 256, 1.604-1.607, 1981.

2. Bretscher, M. S.: *EMBO J.*, 8, 1.341-1.348, 1989.
3. Enrich, C. y Evans, H. W.: *Europ. J. Cell Biol.*, 48, 344-352, 1989.
4. Enrich, C. y Evans, W. H.: In «Modulation of Liver Cell Expression» (Reutter, W. *et al.*, eds.), Falk Symp. 43, MTP Press. Lancaster, 1987, pp. 437-442.
5. Enrich, C. y Evans, W. H.: *Exp. Cell Res.*, 173, 99-108, 1987.
6. Evans, W. H.: *Methods Enzymol.*, 109, 246-257, 1985.
7. Evans, W. H. y Flint, N.: *Biochem. J.*, 232, 25-32, 1985.
8. Evans, W. H. y Enrich, C.: *Biochem. Soc. Trans.*, 17, 619-622, 1989.
9. Evans, W. H., Ali, N. y Enrich, C.: *Biochem. Soc. Trans.*, 18, 137-139, 1990.
10. Geisow, M. J. y Evans, W. H.: *Exp. Cell Res.*, 150, 36-46, 1984.
11. Haigler, H. T., McKanna, J. A. y Cohen, S.: *J. Cell Biol.*, 81, 382-395, 1979.
12. Hopkins, C. R.: *TIBS* 11, 472-477, 1986.
13. Hynes, R. O.: *Cell*, 48, 549-554, 1987.
14. Klausner, R. D.: *Cell*, 57, 703-706, 1989.
15. Lewis, V., Koch, T., Plutner, H. y Mellman, I.: *Nature* (London), 324, 372-375, 1986.
16. Mellman, I., Fuchs, R. y Helenius, A.: *Ann. Rev. Biochem.*, 55, 663-700, 1986.
17. Mellman, I., Howe, Ch. y Helenius, A.: *Current Top. Memb. Transp.*, 29, 255-288, 1987.
18. Pricer, W. E. y Ashwell, G.: *J. Biol. Chem.*, 251, 7.539-7.544, 1976.
19. Saermark, T., Flint, N. y Evans, W. H.: *Biochem. J.*, 255, 51-58, 1985.
20. Tanabe, T., Pricer, W. E. y Ashwell, G.: *J. Biol. Chem.*, 254, 1.038-1.043, 1979.
21. Wall, D. A. y Hubbard, A. L.: *J. Cell Biol.*, 101, 2.104-2.112, 1985.

