

LA ASIMETRÍA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y SU RELEVANCIA PARA LA CÉLULA *

Blanca Alicia Delgado Coello

Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Ciudad de México, México. correo E: bdelgado@ifc.unam.mx

RESUMEN

La asimetría de las membranas es una característica de gran relevancia para la fisiología de la célula eucarionte, dado que la distribución diferencial de lípidos es en sí una forma de señalar eventos celulares específicos. Para conseguir la asimetría membranar, la célula cuenta con las flipasas, ATPasas especializadas que transfieren fosfolípidos específicos de la capa exoplásmica a la capa citoplásmica de la bicapa membranar y con flopasas que regulan el flujo de fosfolípidos en sentido inverso. En el presente trabajo se ilustran las funciones de algunos de estos transportadores localizados en la zona canalicular de los hepatocitos donde se realiza la síntesis y secreción de sales biliares. Algunas mutaciones del gen codificante para la flipasa ATP8B1, generan distintos tipos de colestasis que afectan no sólo las funciones del hepatocito sino a nivel extrahepático, por ejemplo en intestino delgado o en oído interno.

ABSTRACT

Membrane asymmetry represents a feature of paramount relevance in the physiology of the eukaryote cell since the differential distribution of lipids represents by itself the signaling of specific cellular processes. In order to accomplish the membrane asymmetry, the cell is provided with flippases, specialized ATPases moving specific phospholipids from the exoplasmic side to the cytoplasmic side of the membrane bilayer, and with floppases moving phospholipids in the opposite direction. In this work are shown the functions performed by several of these transporters located in the canalicular region of hepatocytes where the synthesis and secretion of bile salts occur. Several mutations in the gene encoding for the flippase ATP8B1 produce different types of cholestasis affecting not only the function of hepatocytes, but extrahepatic functions, for example in the small intestine or inner ear.

ASIMETRÍA DE MEMBRANAS

La conceptualización de las membranas de las células eucariontes ha experimentado una evolución en correlación directa con los hallazgos referentes a su estructura. Resaltan entre otros, la demostración de la existencia de una bicapa lipídica como parte de la estructura membranar por Gorter y Grendel en 1925; el carácter asimétrico de la composición de la misma descrito por Bretschner y el modelo de mosaico fluido de Singer y Nicolson en 1972 que involucra un dinamismo dado por movimientos de lípidos (flip-flop) de un lado a otro de la membrana. Recientemente, el mismo Nicolson ha actualizado el

modelo de mosaico fluido incorporando conceptos nuevos y la relevancia de los dominios tipo balsa lipídica e interacciones con el citoesqueleto.

Una característica propia de la membrana plasmática es la asimetría en su composición de fosfolípidos, lo cual implica que la capa de la membrana que se orienta hacia el exterior de la célula (cara exoplásmica o trans) tiene una composición distinta a la de su contraparte en la capa interna (cara citoplásmica o cis). En 1971, Mark Bretschner determinó mediante marcaje radioactivo con un reactivo capaz de reconocer grupos aminos primarios (formil-metionil-sulfon metil fosfato), que la fosfatidilserina (PS) y fosfatidiletanolamina (PE)

PALABRAS

CLAVE:

Asimetría de membrana, flipasas, flopasas, escramblasas, ATPasas P4, colestasis.

KEY WORDS:

Membrane asymmetry, flippases, floppases, scramblases, P4 ATPases, cholestasis.

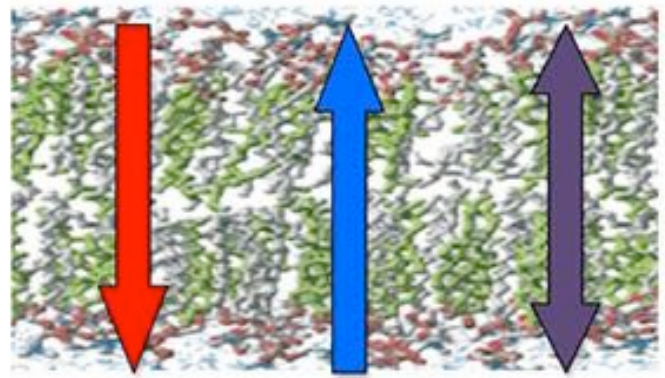
se ubican en la cara citoplásmica de la membrana del eritrocito. Posteriormente, en la propuesta del modelo del mosaico fluido se incorporó el concepto de asimetría de membrana al tiempo que se racionalizó la existencia de un movimiento tipo flip-flop que permitiría el paso de lípidos de uno a otro lado de la membrana. Actualmente es conocido que en la mayoría de las células eucariontes, la cara exoplásmica de la membrana está enriquecida en fosfatidilcolina (PC), esfingomielina (SM) y glucosfingolípidos en tanto que la cara interna tiene abundancia de PS y PE. Por ejemplo en el eritrocito en condiciones normales, del 100% de fosfolípidos de membrana, en la cara externa hay un contenido similar de PC y SM aproximadamente del 25%; 6% de PE y prácticamente no hay PS. En contraste, en la cara interna hay aproximadamente 24% de PE, 13% de PS y 6-7% de PC y SM (1).

A continuación se describen algunos de los sistemas que las células poseen para mantener la asimetría de membrana.

TRANSPORTADORES ENCARGADOS DE LA ASIMETRÍA DE MEMBRANA

Acerca del mecanismo generador de la asimetría membranar, Bretscher propuso el término flipasa para aquellos transportadores de lípidos cuya función sería equilibrar los lípidos recién sintetizados a través de las membranas biogénicas, como el retículo endoplásmico. La descripción funcional de las flipasas en eritrocitos se reportó en 1984 cuando Seigneuret y Devaux caracterizaron una aminofosfolípido-translocasa (2). Ahora se sabe que este proceso, a diferencia del flip-flop convencional, se lleva a cabo mediante proteínas integrales de membrana que contienen diez dominios transmembranales y que se denominan genéricamente, flipasas dependientes de energía o aminofosfolípido-translocasas. Al interior de la célula, las flipasas muestran una pequeña asa que contiene el sitio actuador y entre los dominios transmembranales 4 y 5, un asa de mayor tamaño donde se ubica el dominio catalítico que contiene un sitio de fosforilación y un sitio de unión a nucleótidos donde se une el ATP. Dichas flipasas pertenecen a una superfamilia de ATPasas tipo P (aquellas que para llevar a cabo su ciclo catalítico requieren de un intermediario fosforilado). La superfamilia consta de 5 subfamilias denominadas P1-P5, las flipasas pertenecen a la subfamilia más grande (P4) con 14 miembros y presente exclusivamente en eucariontes. El término flipasa aplica para el transporte básicamente de fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina de la capa externa a la interna, aunque existen reportes de que también se transportan

Extracelular



Intracelular

Figura 1. Representación de la direccionalidad de las proteínas involucradas en la translocación de lípidos en las membranas biológicas de eucariontes. Las flipasas (↕) y flopasas (↑) realizan el transporte direccionado de lípidos de manera dependiente de ATP, mientras que las escramblasas (↕) lo realizan de manera independiente de la hidrólisis de ATP.

fosfatidilcolina y lisofosfatidilcolina en algunas células de mamífero y de levadura. Las flipasas tienen una distribución amplia en eucariontes, recientemente se ha reportado que las variantes ATP11A y ATP11C se expresan ubicuamente en tejidos de humano y ratón (3), cabe destacar que la presencia de flipasas se ha descrito también en organelos como el aparato de Golgi.

El mecanismo por el cual ocurre el transporte de lípidos mediado por flipasas aún no se conoce, sin embargo, se sabe que once de las ATPasas P4 interactúan con proteínas tipo CDC50 ("cell division cycle protein 50") formando heterodímeros. Las proteínas CDC50 oscilan entre 50-60 kD y cuentan con dos dominios transmembranales (TM) y un asa extracelular, se sugiere que su función podría ser permanente cuando se forma una subunidad tipo β de la misma flipasa o bien transitoria, si actúa como chaperona (4).

Otras proteínas que transportan lípidos a través de las membranas son las flopasas y escramblasas (Fig. 1). Los transportadores que llevan lípidos, particularmente PC, en sentido inverso al de las flipasas, se denominan flopasas y también dependen de la hidrólisis de ATP. Las escramblasas presentan un flujo bidireccional principalmente de fosfatidilserina, no dependiente de ATP pero al parecer dependiente de un aumento de la concentración citosólica de calcio lo cual se ha reportado en eritrocitos y plaquetas (5).

IMPORTANCIA FISIOLÓGICA DE LAS FLIPASAS

El transporte direccionado y específico de ciertos aminofosfolípidos en las membranas biológicas mediado por flipasas y/o flopasas tiene implicaciones fisiológicas importantes. La redistribución de lípidos contribuye a la modulación de las membranas durante momentos específicos donde las flipasas pueden funcionar como verdaderos interruptores para la ejecución de funciones tales como vesiculación de membrana, apoptosis y división celular, entre otras.

Experimentalmente se ha demostrado en plaquetas y eritrocitos que la translocación de lípidos en la membrana plasmática produce cambios locales o totales en la forma de las células, lo cual involucra la participación del citoesqueleto. Por lo tanto, las flipasas no solo regulan la composición de la membrana sino su estructura, lo cual permite a su vez la modulación dentro de la misma bicapa lipídica de distintos eventos que ocurren en la célula. Sin duda, esta serie de mecanismos confieren a las células un alto grado de especialización requerido para realizar diversas funciones.

Las flipasas se han clasificado con base en homología de secuencia en seis subclases, sin embargo, esta clasificación no es del todo útil debido a que las subclases no comparten semejanzas funcionales o especificidades de los lípidos que transportan a través de las membranas. Las flipasas de las clases 1 y 2 se encuentran en todos los eucariontes, las de las clases 3 y 4 son propias de levaduras, las de la clase 5 se han descrito en el gusano *Caenorhabditis elegans* y en la planta silvestre *Arabidopsis*, en *Drosophila* y en mamíferos se encuentran también flipasas de la clase 5 y 6 (6).

Con objeto de ilustrar la relevancia fisiológica de los transportadores que mantienen la asimetría membranal, en este trabajo tomamos como ejemplo cercano a nuestra área de trabajo a las flipasas y flopasas presentes en el hepatocito. Entre las múltiples funciones del hepatocito, destaca la síntesis de las sales biliares que se secretan a través del dominio canalicular de la membrana plasmática hacia el árbol biliar y de éste a la vesícula biliar para entrar al ciclo enterohepático, esto es, a las células del intestino delgado o enterocitos y de regreso al hepatocito, mediante el cual se recuperan cerca del 95% de las sales biliares. El dominio canalicular del hepatocito tiene una composición lipídica y proteica diferenciada del resto de los dominios del hepatocito, por ejemplo, el contenido de esfingomielina y colesterol es al menos el doble respecto a los dominios sinusoidal y basolateral (7) y destaca la presencia de la flipasa ATP8B1

(conocida también como F1C1) que transporta PS y otras proteínas relevantes. Dentro del canalículo de los hepatocitos coexisten con la flipasa ATP8B1 otros transportadores indispensables para el flujo biliar: la bomba exportadora de bilis (BSEP o ABCB11) y la flopasa ABCB4 ("ATP-binding cassette, sub-family B, member 4") o MDR3 "multidrug resistance protein 3" que transporta PC hacia la cara extracelular del hepatocito (Fig. 2). ABCB4 está formada por dos módulos similares, cada uno con seis dominios transmembranales aparentemente relacionados con la especificidad y secreción de sustrato, y un dominio de unión a nucleótidos (NBD1 y NBD2) que unen ATP. El amino terminal contiene sitios de fosforilación responsables de la regulación de la secreción de PC (8). Experimentalmente se ha demostrado que la coexistencia de ATP8B1 y ABCB4 es esencial para mantener la integridad de la membrana del canalículo en los hepatocitos (9). Por una parte, se logró una expresión baja de ABCB4 compatible con la vida en células embrionarias de riñón (línea celular HEK293T), pues a mayores niveles de expresión se observó un efecto citotóxico que podía revertirse si se coexpresaban ATP8B1/CDC50 dando lugar al transporte de fosfatidilcolina como lo haría ABCB4 en el hepatocito. Cuando se sobreexpresa solo ATP8B1, gran parte de la proteína permanece en el retículo sarcoplásmico; si se expresa junto con CDC50, aumenta la expresión total de ATP8B1 y se localiza también en membrana plasmática. Por otro lado, en ratones manipulados genéticamente para cancelar la expresión de ATP8B1 o ABCB4 (*knockout*) o de ambos (doble *knockout*), se determinó que la extracción de PC depende solo de ABCB4. Además, se encontró que la membrana del canalículo de los ratones deficientes en ATP8B1 muestra mayor sensibilidad a los detergentes biliares que los dobles *knockout*, debido posiblemente al estado líquido desordenado que prevalece en los *knockouts* de ATP8B1 al mantener alta la concentración de PS en la capa externa de la membrana al tiempo que ABCB4 mueve PC hacia la misma capa externa (9).

Otra flipasa que se expresa en hepatocitos y células endoteliales del sinusoides (que también transporta PS) es ATP11C. El mRNA de esta flipasa muestra una expresión alta en el hígado de humano y de ratones C57BL/6 (3), la proteína se localiza en la membrana basolateral de hepatocitos ubicados en la zona central del lobulillo hepático donde desempeña un papel protector de las células hepáticas expuestas a un exceso de sales biliares (10).

Desde el punto de vista clínico, destacan algunas mutaciones en el gen que codifica para ATP8B1 y

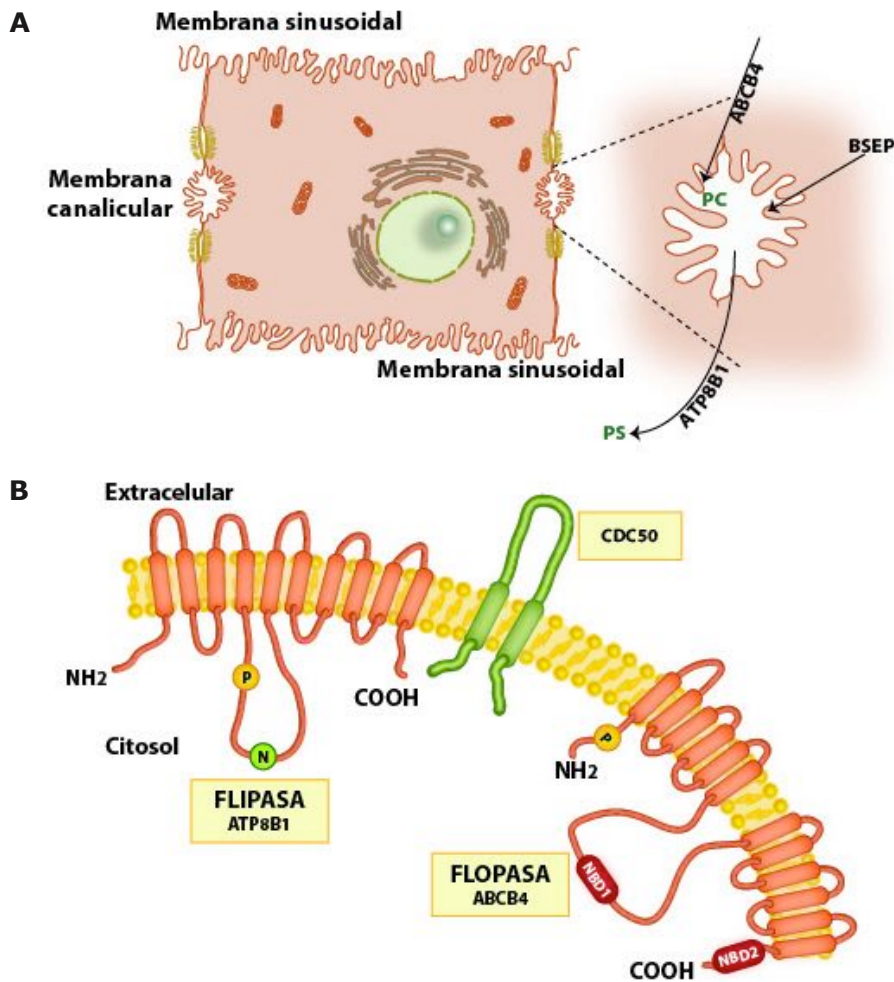


Figura 2. Localización de la flipasa ATP8B1 y la flopasa ABCB4 en la membrana plasmática del hepatocito. **A)** En detalle se muestra la región canalicular donde la flipasa ATP8B1 en condiciones normales transporta fosfatidilserina (PS) hacia el interior de la célula. En la misma región, se encuentran la flopasa ABCB4 que transporta fosfatidilcolina (PC) en sentido inverso y la bomba exportadora de bilis o BSEP. **B)** Esquema de la topología de la flipasa ATP8B1 y la flopasa ABCB4, se indican los sitios de fosforilación (P) y de unión a nucleótidos (N o NBD1 y NBD2) de ambos transportadores. Adyacente a ATP8B1 se muestra la proteína CDC50 con la que interactúa formando heterodímeros.

que producen dos enfermedades hepáticas importantes que implican un flujo inadecuado de la bilis o colestasis (11), por un lado, un padecimiento severo llamado colestasis intrahepática familiar progresiva tipo I (PFIC1, por sus siglas en inglés o enfermedad de Byler) que provoca la muerte a edades tempranas y otra mutación produce un padecimiento menos grave llamado colestasis intrahepática recurrente benigna (BRIC1, siglas en inglés) que aparentemente se resuelve de manera espontánea. Dada la localización de la flipasa ATP8B1 en la región canalicular del hepatocito, en los padecimientos mencionados se detecta un deterioro del flujo biliar, así como una tendencia del canalículo a sufrir daño por la presencia de las sales biliares citotóxicas en el lumen. La presencia de fosfatidilserina en la bilis (normalmente contiene un 25% en peso seco de fosfatidilcolina) de los pacientes demuestra la presencia anómala del lípido en la capa extracelular de la membrana canalicular. Asimismo, muestra la relevancia de la ATPasa 8B1 en el propio transporte direccional de fosfatidilserina la cual coadyuva en el manteni-

miento de una membrana líquida-ordenada dada por la presencia de colesterol y esfingolípidos en el canalículo.

Estudios realizados en modelos de ratón, muestran que las deficiencias en las ATPasas de la familia P4 originan fenotipos que afectan además de la función hepática, funciones neurológicas, inmunológicas y se relacionan con la diabetes tipo 2. La función anómala de estos transportadores también deriva en fenotipos de distintas colestasis y de carcinoma hepatocelular para el caso de ABCB11 (12). En relación a la flipasa ATP11C también presente en hepatocitos, recientemente se ha descrito su presencia en eritrocitos humanos y una mutación que se manifiesta con anemia hemolítica congénita que se hereda de manera recesiva ligada al cromosoma X (13).

CONCLUSIONES

En el curso de la evolución, algunos de los grandes eventos sucedidos para dar lugar a las células eucariontes como hoy las conocemos son:

el establecimiento de una membrana capaz de delimitar a la célula misma, el surgimiento del colesterol asociado a la síntesis de su precursor -el lanosterol-, que solo pudo tener lugar en presencia de una atmósfera rica en oxígeno y sin duda, la adquisición de mecanismos para mantener la asimetría de lípidos en la membrana plasmática que confiere una sofisticada especialización de las células y sus funciones tanto en salud como en estados patológicos. Esta breve revisión muestra que la asimetría de membranas es esencial para la fisiología de las células eucariontes, aún cuando no se ha determinado el mecanismo por el cual

los distintos lípidos son transferidos de una a otra capa de la membrana. Por su relevancia no solo biológica sino desde el punto de vista clínico, la caracterización de las distintas proteínas transportadoras de lípidos en la membrana celular de diversos tipos celulares y las mutaciones presentes en éstas así como los fenotipos generados, son objeto de investigación por muchos grupos en la actualidad. 

Agradecimientos

Se agradece a Jorge Bravo Martínez su colaboración para el diseño de las figuras de esta revisión.

REFERENCIAS

1. Daleke DL (2008) Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. *Curr Opin Hematol* 15:191-195.
2. Seigneuret M, Devaux PF (1984) ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:3751-3755.
3. Segawa K, Kurata S, Angaataha S (2016) Human type IV-P-type ATPases that work as plasma membrane phospholipid flippases and their regulation by caspase and calcium. *J Biol Chem* 291:762-772.
4. Paulusma CC, Elferink RPJ (2010) P4-ATPases - The physiological relevance of lipid flipping transporters. *FEBS Lett* 584:2708-2716.
5. Devaux PF, Herrmann A, Ohlwein N, Kozlov MM (2008) How flippases can modulate membrane structure. *Biochim Biophys Acta* 1778:1591-1600.
6. Lopez-Marques RL, Theorin L, Palmgren MG, Pomorski TG (2013) P4-ATPases: lipid flippases in cell membranes. *Pflugers Arch* 466:1227-1240.
7. Delgado-Coello B, Trejo R, Mas-Oliva J (2006) Is there a specific role for the plasma membrane Ca²⁺-ATPase in the hepatocyte? *Mol Cell Biochem* 285:1-15.
8. Gautherot J, Delautier D, Maubert MA, Aït-Slimane T, Bolbach G, Delaunay JL, Durand-Schneider AM, Firrincieli D, Barbu V, Chignard N, Housset C, Maurice M, Falguieres T (2014) Phosphorylation of ABCB4 impacts its function: insights from disease-causing mutations. *Hepatology* 60:610-621.
9. Groen AM, Rodríguez-Romero M, Kunne C, Hoosdally SJ, Dixon PH, Wooding C, Williamson C, Seppen J, van den Oever K, Mok KS, Coen, Paulusma CC, Linton KJ, Oude Elferink RPJ (2011) Complementary functions of the flippase ATP8B1 and the floppase ABCB4 in maintaining canalicular membrane integrity. *Gastroenterology* 141:1927-1937.
10. de Waart DR, Naik J, Utsonomiya KS, Duijst S, Ho-Mok K, Bolier AR, Hiralall J, Bull LN, Bosma PJ, Oude Elferink RPJ, Paulusma CC (2016) ATP11C targets basolateral bile salt transporter proteins in mouse central hepatocytes. *Hepatology* 64:161-174.
11. Bull LN, van Eijk MJ, Pawlikowska L, DeYoung JA, Juijn JA, Liao M, Klomp LW, Lomri N, Berger R, Scharschmidt BF, Knisely AS, Houwen RH, Freimer NB (1998) A gene encoding a P-type ATPase mutated in two forms of hereditary cholestasis. *Nat Genet* 18:219-224.
12. Nicolaou M, Andress EJ, Zolnercijs JK, Dixon PH, Williamson C, Linton KJ (2012) Canalicular ABC transporters and liver disease. *J Pathol* 226:300-315.
13. Arashiki N, Takakuwa Y, Mohandas N, Hale J, Yoshida K, Ogura H, Utsugisawa T, Ohga S, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Kanno H (2016) ATP11C is a major flippase in human erythrocytes and its defect causes congenital hemolytic anemia. *Haematologica* 101:559-565.