

45  
29



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ENDOCITOSIS DE  $\beta$ -GLUCURONIDASA EN  
FIBROBLASTOS HUMANOS EN CULTIVO:  
PURIFICACION DE UN PEPTIDO QUE CONTIENE UN  
NUEVO MARCADOR DE RECONOCIMIENTO  
PARA SU ENDOCITOSIS.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O  
P R E E N T A :  
JOSE RA **MUNDO CRUZ** PEREZ



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



**FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR  
1996**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

M. en C. Virginia Abrin Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:  
Endocitosis de  $\beta$ -glucuronidasa en fibroblastos humanos en cultivo:  
Purificación de un péptido que contiene un nuevo marcador de reconocimiento  
para su endocitosis.

realizado por José Raymundo Cruz Pérez

con número de cuenta 8522221-8 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dr. Alfonso González Noriega

Propietario Dr. Ignacio Canacho Arrollo

Propietario Biol. Carlos Alberto Castillo Pompeyo

Suplente Dr. Jesús Manuel León Cázarez

Suplente Biol. Fernando Hernández Sánchez

Consejo Departamental de Biología

GOBERNADOR DEL ESTADO  
DE BIELLA

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LA UNIDAD DE GENÉTICA DE LA NUTRICIÓN DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. ALFONSO GONZÁLEZ NORIEGA.**

*A mis padres  
Sr Bulmaro Cruz y Sra Antonia Pérez.*

*A mis hermanos  
Jorge, Isabel y Francisca.*

*A mis sobrinos  
Gerardo, Marcela, Laura, Marlene y Jessica.*

*A mis Amigos.*

*A Elizabeth Estrada Muñiz*

***Agradecimientos.***

*Al Dr. Alfonso González Noriega por su apoyo para la realización de este trabajo.*

*A la QFB Patricia Ferrara, por su ayuda en la purificación de las enzimas.*

*A la Biol. Colette Michalak, por su ayuda en los cultivos celulares.*

*Al Dr. Edgar Zenteno por proporcionarme algunas de las lectinas utilizadas en este trabajo,  
así como por su ayuda en la realización del análisis de carbohidratos.*

*Si las puertas de la percepción  
quedaran depuradas,  
todo se habría de mostrar al hombre  
tal cual es: infinito.*

WILLIAM BLAKE.

## ÍNDICE

## PAGINA

RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
Antecedentes históricos	1
Hipótesis sobre el transporte de enzimas lisosomales	2
Naturaleza del marcador de reconocimiento	4
Transporte intracelular de enzimas lisosomales	5
Receptores para manosa 6-fosfato (MPR)	8
Antecedentes específicos	9
OBJETIVO	12
MATERIALES	13
I. Soluciones amortiguadoras	13
II. Medios de cultivo	13
MÉTODOS	14
I. Purificación de enzimas	14
II. Enzayos enzimáticos	15
III. Purificación del péptido que contiene el marcador de reconocimiento	15
III.1-Digestión de $\beta$ -glucuronidasa con pronasa	15
III.2-Cromatografía de exclusión molecular	16
III.3-Cromatografía de intercambio iónico	16
IV. Cromatografía de afinidad con lectinas	16
V. Acetilación de péptidos	17
VI. Cuantificación de péptidos	17
VII. Cuantificación de carbohidratos	18
VIII. Cultivos celulares	18
IX. Enzayos de internalización	19
X. Análisis de aminoácidos	19
XI. Análisis de resonancia magnética nuclear	19
RESULTADOS	20
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES	43
REFERENCIAS	44



## RESUMEN

La endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa de hígado bovino en fibroblastos humanos en cultivo es mediada por dos receptores de membrana. El primero reconoce al marcador de manosa 6-fosfato, mientras que el segundo reconoce a un "nuevo" marcador. Aunque el "nuevo" marcador ya fue purificado, su caracterización química no se pudo llevar a cabo, debido a problemas de contaminación no controlada y a que probablemente el marcador se modificó por las condiciones de purificación. En este trabajo se presenta un protocolo alternativo para la purificación de un péptido, a partir de la  $\beta$ -glucuronidasa de hígado bovino, que contenga el "nuevo" marcador de reconocimiento. Este protocolo está basado en digestión de la  $\beta$ -glucuronidasa de hígado bovino pura con pronasa, cromatografía de exclusión molecular, Sefadex G-25, Sefadex G-10 y cromatografía de intercambio catiónico en carboximetil celulosa. De esta manera, se logró purificar 1,000 veces un péptido de 300 daltones que actúa como inhibidor competitivo de la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa de hígado bovino en fibroblastos humanos en cultivo, lo que sugiere una semejanza entre el marcador de la enzima y el inhibidor presente en el péptido. Se considera que el péptido se encuentra lo suficientemente puro como para proceder por medio de espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear a la caracterización química del marcador.

## INTRODUCCIÓN

Los lisosomas son orgánulos citoplasmáticos que contienen al menos 50 hidrolasas ácidas entre las que se pueden encontrar: fosfatasa, nucleasas, glicosidasas, proteasas, peptidasas, sulfatasas y lipasas (1). Estos orgánulos están involucrados en la destrucción de agentes infecciosos que son fagocitados, así como en la degradación de macromoléculas endógenas y de aquellas que entran a la célula por endocitosis mediada por receptor. Además, los lisosomas participan en el recambio de componentes intracelulares (autofagia) y en el remodelamiento de tejidos y huesos (2).

El interés en los lisosomas y enzimas lisosomales ha sido estimulado por la existencia de cerca de 30 trastornos genéticos de humanos, en los que la deficiencia en una enzima permite que haya un acúmulo lisosomal del sustrato no degradado lo que genera una patología celular y por lo tanto una enfermedad degenerativa que es progresiva y en la mayoría de los casos produce la muerte del paciente a edades tempranas (2).

### ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Aunque el término lisosoma fue acuñado por de Duve a principio de la década de 1950, su existencia funcional se conocía gracias a los trabajos de Metchnikoff quien a finales del siglo XIX descubrió la función fagocítica de los macrófagos y estableció que esta función está íntimamente ligada a la digestión intracelular (3). Sin embargo, el concepto bioquímico de los lisosomas como vesículas cuyo pH es ácido y que contienen enzimas hidrolíticas, surge como resultado de los trabajos de Berthet y de Duve (4) en relación a la localización subcelular de la fosfatasa ácida en hígado de rata. Su existencia y propiedades fueron inferidos al observar que la fosfatasa ácida y otras hidrolasas ácidas son enzimas latentes que se encuentran dentro de vesículas celulares impermeables a sustratos añadidos exógenamente (3).

El conocimiento que hoy se tiene sobre el sistema lisosomal se debe al trabajo multidisciplinario de diversos laboratorios. Así, entre los primeros trabajos que se realizaron para caracterizar a los lisosomas, están los de microscopía electrónica realizados por Novikoff y col (5), quienes por medio de técnicas citoquímicas para la fosfatasa ácida (marcador del lisosoma) obtuvieron las primeras fotografías de los lisosomas, así como también observaron una serie de vesículas relacionadas al sistema lisosomal como son: los autolisosomas, los cuerpos multivesiculares y los cuerpos residuales. Por otra parte, Strauss (6) obtuvo las primeras evidencias directas sobre la actividad digestiva de los lisosomas en diferentes materiales endocitados por la célula. Mediante procedimientos citoquímicos y de fraccionamiento subcelular pudo seguir el destino de la peroxidasa de rábano después de su internalización a las células de hígado y riñón. De esta forma, encontró que este material exógeno primero se acumula en gránulos citoplasmáticos, a los que llamó fagosomas, en el siguiente estado, los fagosomas se unen con los lisosomas, que tiñen positivamente para la fosfatasa ácida, para formar los fagolisosomas, que tiñen positivamente para la peroxidasa y fosfatasa ácida. Estas observaciones, permitieron a de Duve y Wattiaux (7) determinar la existencia de dos tipos de lisosomas: a) lisosomas primarios, que son aquellas vesículas que contienen enzimas lisosomales sintetizadas *de novo* y que no han participado en un fenómeno digestivo y b) lisosomas secundarios, que son aquellas vesículas que no solo contienen

hidrolasas ácidas, sino también sustratos tomados del espacio extracelular por endocitosis o de la propia célula por mecanismos de autofagia.

El estudio de pacientes con trastornos en el metabolismo de macromoléculas que deben ser degradadas en los lisosomas, permitió conocer que enzimas están presentes en éstos, así como los sustratos que son degradados en este orgánulo. Así, Hers (8), en células provenientes de pacientes con glucogenosis tipo II, encontró que el glucógeno se acumula en los lisosomas debido a que estos pacientes tienen una deficiencia para la  $\alpha$ -glucosidasa, la cual interviene en el catabolismo del glucógeno. Además, los estudios de los trastornos genéticos del catabolismo de mucopolisacáridos permitieron descubrir, en fibroblastos en cultivo, un sistema de endocitosis mediada por receptor, para la captura de enzimas lisosomales (9). Neufeld y Cantz (10) mostraron que células en cultivo provenientes de pacientes con tales trastornos acumulaban un exceso de mucopolisacáridos sulfatados, pero su nivel podía reducirse al normal al incluir en el medio de cultivo concentrados de orina humana o bien secreciones de fibroblastos en cultivo obtenidos a partir de sujetos normales. Posteriormente, al purificar los principios activos de estos concentrados, o "factores correctivos" y determinar su función, se encontró que se trataba de enzimas hidrolíticas. Por ejemplo, la sustancia purificada capaz de normalizar el catabolismo de mucopolisacáridos de células obtenidas a partir de pacientes con el síndrome de Hurler (factor correctivo Hurler), mostró ser la  $\alpha$ -L-iduronidasa (11). Otra sustancia correctiva para células obtenidas de pacientes con el síndrome de Hunter mostró ser la iduronidato sulfatasa. (12). La observación de que en fibroblastos en cultivo la mayoría de estos trastornos son corregidos mediante la adición de la enzima de la cual carecen, generó un considerable interés en la posibilidad de utilizar terapias de reemplazo enzimático para este tipo de desórdenes (13).

#### **HIPÓTESIS SOBRE EL TRANSPORTE DE ENZIMAS LISOSOMALES**

A principios de la década de 1970, el grupo de Palade (14) propuso un modelo para la síntesis y transporte vectorial de proteínas secretoras en células pancreáticas exócrinas, que se puede resumir en seis pasos sucesivos: (i) síntesis de proteínas en polisomas unidos a retículo endoplásmico, (ii) descarga vectorial y segregación de los polipéptidos nacientes dentro de las cisternas del retículo endoplásmico, (iii) transporte intracelular de proteínas desde el retículo endoplásmico hasta el Aparato de Golgi por medio de vesículas transportadoras, (iv) segregación y empacado de proteínas secretoras en las vesículas del Aparato de Golgi, (v) almacenamiento temporal de proteínas secretoras y (vi) descarga por exocitosis de productos al espacio intercelular.

Aunque el modelo de transporte vectorial propuesto por Palade para proteínas secretoras se aceptó también como válido para el transporte de enzimas lisosomales y la formación de lisosomas primarios, no explicaba cómo y donde la célula segrega las proteínas que son secretadas de aquellas que forman parte del sistema lisosomal, ni cual es la ruta que siguen las hidrolasas ácidas a través del Aparato de Golgi para formar a los lisosomas primarios.

Novikoff (15) basado en estudios ultraestructurales e histoquímicos de la distribución de la fosfatasa ácida, propuso una hipótesis para el transporte y segregación de enzimas lisosomales, que sugiere la existencia de múltiples rutas de transporte, así como múltiples sitios para la segregación, que incluyen; el retículo endoplásmico, el Aparato de Golgi y los lisosomas. De

esta forma, las hidrolasas ácidas pueden atravesar el Golgi para luego terminar en vesículas consideradas como lisosomas primarios, las hidrolasas ácidas pueden ser transportadas a Golgi y permanecer como parte de él y finalmente, las hidrolasas ácidas pueden surgir del retículo endoplásmico liso para formar otros tipos de lisosomas como cuerpos densos y vacuolas autofágicas. Por otra parte, Goldstone y col (16) basados en experimentos de fraccionamiento subcelular, sugirieron que existen regiones especializadas en el retículo endoplásmico rugoso (RER) para la síntesis de enzimas lisosomales diferentes a las regiones en que se sintetizan proteínas secretorias. Sin embargo, estas hipótesis no aclararon cual es el mecanismo mediante el cual las enzimas lisosomales son segregadas en el Golgi de las proteínas secretorias.

Por su parte, Hickman y Neufeld (17) al estudiar las propiedades de captura de enzimas lisosomales en fibroblastos en cultivo, obtenidos de pacientes con mucopolidosis II, conocidos como células "I", enfermedad que se caracteriza por una severa deficiencia intracelular de múltiples enzimas lisosomales y un acúmulo en el medio extracelular de ellas, observaron que las hidrolasas ácidas secretadas no son endocitadas por fibroblastos humanos normales ni fibroblastos con la enfermedad de células "I", por el contrario los fibroblastos obtenidos de pacientes con la enfermedad de células "I", si son capaces de endocitar y retener hidrolasas ácidas secretadas por fibroblastos normales. Estas observaciones les permitió postular: a) la existencia de un marcador de reconocimiento similar o común en la mayoría de las enzimas lisosomales, así como de receptores en la membrana plasmática para el reconocimiento del marcador. Este marcador está ausente en enzimas lisosomales de fibroblastos obtenidos de pacientes con la enfermedad de células "I". b) La segregación de proteínas ocurre extracelularmente, es decir, las enzimas hidrolíticas son normalmente secretadas al medio extracelular y luego introducidas a los lisosomas de fibroblastos en cultivo por recaptura mediada por receptor. Este mecanismo para la segregación de proteínas fue conocido como hipótesis de "secreción-recaptura". Esta hipótesis tuvo una gran importancia ya que propuso, por primera vez, la existencia de un marcador común para la segregación, transporte y compartimentación de todas las enzimas lisosomales. En los siguientes años varios grupos se dieron a la tarea de comprobar este modelo así como estudiar la naturaleza química del marcador. Estos trabajos y nuevas observaciones generaron otras hipótesis, que en esencia son modificaciones de la de "secreción-recaptura". Lloyd (18) sugirió que las hidrolasas ácidas entran a los lisosomas cuando estos se forman por gemación en el Golgi y que el marcador de reconocimiento no es necesario para que las enzimas lisosomales entren a los lisosomas, sino que es necesario para que las enzimas sean retenidas una vez que llegaron ahí. Esta hipótesis está basada en el hecho de que continuamente hay un reciclamiento de vesículas de los lisosomas a la membrana plasmática y viceversa, lo que permitió razonar que el marcador de reconocimiento es importante para anclar las hidrolasas ácidas a las membranas de los lisosomas y prevenir que éstas sean perdidas en el medio extracelular cuando de los lisosomas surgen vesículas exocíticas. Esta hipótesis fue descartada con las observaciones de Glaser y col (19) ya que presentaron resultados que indicaban que el marcador de reconocimiento es removido inmediatamente después de que las enzimas llegan a los lisosomas. von Figura y Weber (20) basados en estudios inmunocitoquímicos propusieron una hipótesis alterna, la cual sugiere que una vez que las enzimas lisosomales llegan a la región del Golgi se unen a su receptor, así el complejo ligando receptor es transportado a la membrana plasmática y de ahí a

los lisosomas. En el caso de células "I", como no existe el marcador de reconocimiento, las enzimas lisosomales son transportadas a la superficie celular no unidas a la membrana por lo que son secretadas al medio externo. Esta hipótesis era apoyada por el hecho de que se detectaron hidrolasas ácidas en la membrana plasmática de fibroblastos humanos normales que podían ser liberadas con tripsinización suave.

#### NATURALEZA DEL MARCADOR DE RECONOCIMIENTO

Las investigaciones llevadas a cabo por Morell y col (21) sobre la vida media de las proteínas séricas pusieron en relevancia el papel que juegan los carbohidratos como señales de reconocimiento en un sistema de endocitosis mediada por receptor. La ceruloplasmina en el torrente circulatorio tiene una vida media de varios días; pero cuando se remueven de la molécula los residuos de ácido siálico terminales y quedan expuestos los residuos de galactosa, su vida media es de sólo unos minutos. Subsecuentes investigaciones *in vitro* mostraron la presencia de receptores en la membrana plasmática de hepatocitos, que reconocen a las glicoproteínas séricas que contienen residuos terminales de galactosa. Estos receptores son los encargados de retirar las asialoglicoproteínas y transportarlas a los lisosomas (22). Estos resultados dieron la pauta para pensar que probablemente las enzimas lisosomales fueran reconocidas por medio de un residuo glicosídico para ser internadas en los fibroblastos. De esta manera, Hickman y col (23) debido a que encontraron que después de la oxidación con 0.01 M de periodato de sodio la  $\beta$ -hexosaminidasa secretada por fibroblastos normales perdía sus propiedades de captura, sin perder su actividad catalítica, postularon que el marcador de reconocimiento es un carbohidrato. La atención se centró en los residuos de manosa ya que la endocitosis de la  $\beta$ -galactosidasa en fibroblastos fue inhibida parcialmente por altas concentraciones de manosa pero no por N-acetilglucosamina o bien después del tratamiento de la enzima con  $\alpha$ -manosidasa parcialmente purificada (24). La especificidad de la débil inhibición causada por la manosa permitió que se examinaran oligosacáridos que contenían manosa, pensando que alguna característica estructural secundaria presente en estos, por ejemplo un enlace específico, podría ser el factor crítico para la unión de alta afinidad entre las enzimas lisosomales y sus receptores (25). Entre los componentes que se probaron están las mananas de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*, caracterizadas por Ballou (26). Se encontró que dos de estas mananas eran inhibidores muy potentes y su única característica en común fue la presencia de manosa 6-fosfato (M6P). Así mismo, Kaplan y col (27) demostraron que eran realmente los residuos de M6P los marcadores de reconocimiento responsables de la endocitosis de enzimas lisosomales en fibroblastos. Esta observación fue corroborada al mostrar que cuando la  $\beta$ -glucuronidasa es pretratada con una fosfatasa pierde su capacidad de ser endocitada. Resultados similares se obtuvieron con  $\alpha$ -L-iduronidasa (28),  $\beta$ -hexosaminidasa (29) y  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa (30). De todos los otros componentes fosforilados ensayados en diversos sistemas, solo se obtuvo una inhibición similar con fructuosa 1-fosfato, piranosa que recuerda la estructura de la M6P. No se obtuvo efecto cuando se probaron otros azúcares fosforilados, aminoácidos fosforilados o nucleótidos.

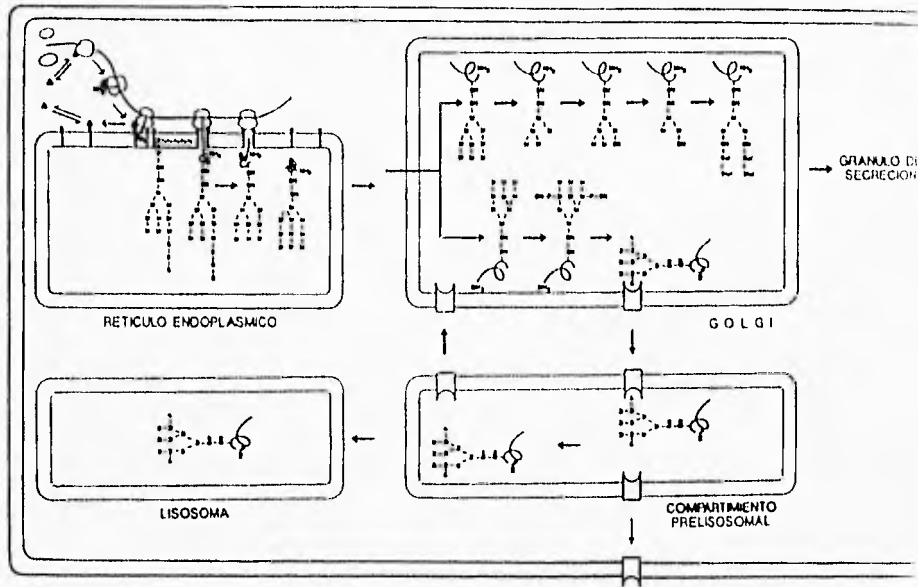
#### TRASPORTE INTRACELULAR DE ENZIMAS LISOSOMALES

Al conocerse la naturaleza química del marcador de reconocimiento, se pudo poner a prueba de forma muy sencilla la hipótesis de "secreción-recaptura". Se supuso que si los fibroblastos en cultivo se hacen crecer en presencia M6P, la cual inhibe la unión de las enzimas lisosomales a su receptor o bien facilita su disociación, se produciría un agotamiento intracelular y un acúmulo extracelular de enzimas lisosomales. Sin embargo, esto no se encontró ya que sólo se produjo poco o ningún cambio en los niveles enzimáticos intracelulares y sólo un cambio marginal en los niveles enzimáticos extracelulares (31).

Los estudios de unión de las enzimas lisosomales a su receptor muestran que ésta ocurre a pH 7.3, pH del medio de cultivo y del líquido extracelular, mientras que la disociación ocurre a pH 4.8 que corresponde a los endosomas y lisosomas (28 y 31). González-Noriega y col (31) basados en estas observaciones y por medio de aminos secundarios como cloruro de amonio y cloroquina encontraron que: a) La cloroquina inhibe la endocitosis de enzimas exógenas, ya que al incrementar el pH de las vesículas ácidas, se inhibe la disociación del complejo ligando-receptor internalizado, lo que impide que el receptor liberado regrese a la superficie y por ende su reutilización. b) Al impedirse la disociación del complejo enzima receptor se generan fenocopias de células deficientes para el receptor lo cual puede ser observado al cuantificar el número de receptores libres en la membrana. c) Al no haber receptores libres, la célula carece de un medio para transportar a las enzimas lisosomales, lo que trae como consecuencia que éstas sean secretadas y que las enzimas secretadas anormalmente contengan el marcador de reconocimiento. Estos estudios permitieron proponer un modelo alternativo para el transporte de enzimas lisosomales el cual propone que: a) Las enzimas lisosomales son transportadas a los lisosomas sin necesidad de ser secretadas. b) La presencia del marcador M6P permite a las enzimas lisosomales unirse a su receptor y de esta forma ser segregadas de otras proteínas que deben ser secretadas. c) La enzima unida a su receptor es transportada a los lisosomas en donde el complejo enzima receptor se disocia y el receptor puede ser reciclado para transportar otras enzimas lisosomales. d) Una fracción del receptor está presente en la membrana plasmática donde puede recapturar aquella fracción de enzimas lisosomales que contienen el marcador y que han sido secretadas.

Las investigaciones que se han realizado hasta la fecha confirman la existencia de un transporte vectorial [propuesto por Palade (14)] para enzimas lisosomales y la existencia de mecanismos de segregación intracelular para proteínas transportadas hasta Golgi (25).

Los conocimientos hasta ahora acumulados para el transporte de enzimas lisosomales son resumidos en la figura 1. En forma breve, todas las proteínas sintetizadas en polisomas unidos a membrana en el retículo endoplásmico rugoso, ya sean lisosomales, de secreción o de membrana, tienen en común una secuencia señal, un tramo de 15 a 30 aminoácidos principalmente hidrofóbicos localizado en el extremo amino terminal (32). Cuando sobresale del ribosoma esta secuencia señal forma un complejo con una ribonucleoproteína llamada partícula de reconocimiento de la señal, PRS (33). Posteriormente, este complejo se une a un receptor en la superficie del RER llamado receptor PRS (34 y 35), y entonces la proteína nascente es transferida al lumen del RER. Las enzimas lisosomales (al igual que muchas de las proteínas de secreción y de membrana) son glicosiladas cotraduccionalmente en residuos de asparagina en posición Asp-X-Treo/Ser. Este paso de glicosilación incluye la transferencia en bloque de un oligosacárido preformado (Cadena glicosídica unida a una cadena lipídica a través



**Figura 1. Transporte de enzimas lisosomales.** Al penetrar al lumen del retículo endoplásmico, las proteínas secretorias y enzimas lisosomales son glicosiladas mediante la transferencia de un oligosacárido preformado (dolicol-p-p-oligosacárido). Las proteínas son transportadas a Golgi donde los oligosacáridos de proteínas secretorias son procesados a cadenas complejas, y los oligosacáridos de las enzimas lisosomales son fosforilados. Una vez fosforiladas, las cadenas glicosídicas de enzimas lisosomales son reconocidas por dos tipos de receptores membranales de 45 y 215 kd, los cuales las transportan al compartimiento prelisosomal. En este compartimiento el complejo ligando-receptor se disocia, los receptores son reciclados al Aparato de Golgi y las hidrolasas ácidas son llevadas a los lisosomas. Una pequeña fracción de las enzimas lisosomales fosforiladas no se unen a sus receptores, por lo que son secretadas, pudiendo ser recapturadas por los receptores 215 kd presentes en la membrana plasmática (2).

de un enlace pirofosfato, Glc3-Man9-GlcNAc2-pp-Dolicol) al polipéptido naciente (36). En el RER, comienza el procesamiento del oligosacárido, con la excisión de tres glucosas y una manosa (37).

Las glicoproteínas son transportadas desde el retículo endoplásmico al Golgi, por medio de vesículas lisas, en donde sufren una serie de modificaciones postraduccionales y luego son conducidas a su destino final: lisosomas, gránulos secretorios y membrana plasmática (38 y 39). A través de su paso por el Golgi, los oligosacáridos de las glicoproteínas de membrana y de secreción, son procesados a unidades de tipo complejo. Aunque algunos de los oligosacáridos de las enzimas lisosomales sufren un procesamiento similar, la mayoría de ellas adquiere un residuo fosfomanosil mediante la acción de 2 enzimas: i) la UDP-N-acetil-glucosamina fosfotransferasa (fosfotransferasa) que transfiere N-acetilglucosamina 1-fosfato del azúcar nucleótido UDP-GlcNAc a el C-6 de residuos terminales de manosa, presente en cadenas de alta manosa de las enzimas lisosomales, para dar un intermediario fosfodiéster. ii) La N-acetilglucosamina 1-fosfodiéster  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa remueve el residuo de N-acetilglucosamina para dar como resultado un fosfomonoéster que funciona como componente esencial del marcador de reconocimiento (32 y 37).

La fosfotransferasa es la enzima clave para que las hidrolasas ácidas adquieran el residuo de M6P, por lo que debe ser capaz de reconocerlas específicamente, así: a) La fosfotransferasa parcialmente purificada, fosforila enzimas lisosomales 100 veces mejor que a glicoproteínas no lisosomales que contienen oligosacáridos de alta manosa (40). b) Los glicopéptidos y oligosacáridos de alta manosa son sustratos muy pobres para la fosfotransferasa. c) Las enzimas lisosomales que fueron deglicosiladas se comportan como potentes inhibidores de la fosforilación de enzimas lisosomales intactas; estos datos sugieren que la fosfotransferasa reconoce un dominio proteico que es común a todas las enzimas lisosomales pero que está ausente en glicoproteínas no lisosomales (41). En la enfermedad de células "I", existe una mutación en el gen de la fosfotransferasa por lo que las enzimas lisosomales no adquieren el marcador de M6P, y al no ser reconocidas por el receptor correspondiente son secretadas e incluso no pueden ser recapturadas (32).

Las enzimas lisosomales que han adquirido el residuo fosfomanosil pueden unirse a su receptor en la región *cis* del Golgi y atravesar el Aparato de Golgi como un complejo o bien salir del Golgi en ese punto. Varios estudios inmunocitoquímicos y de microscopía electrónica muestran que en algunas, pero no en todas las células, el receptor para M6P, está concentrado en la región *cis* del Golgi con muy bajos niveles en la región *trans* del Golgi (42). Cuando las células se incuban con tunicamicina (droga que inhibe la N-glicosilación) se observa que los receptores se acumulan solo en la región *cis* del Golgi y en vesículas cubiertas, pero no en los lisosomas y/o endosomas y si las células se incuban en presencia de cloroquina ocurre una acumulación de receptores en los lisosomas y/o endosomas. Estas observaciones sugieren que las enzimas lisosomales son reconocidas por su receptor en la región *cis* del Golgi y de ahí son transportadas vía vesículas cubiertas a los lisosomas y/o endosomas (42). Sin embargo se ha postulado que la segregación de proteínas en la mayoría de las células ocurre en la región *trans* del Golgi, aseveración que es apoyada por las siguientes observaciones: a) La mayoría de las enzimas lisosomales contienen oligosacáridos procesados hasta su región terminal (43 y 44), datos que indican que estas enzimas atraviesan por completo el Aparato de Golgi ya que las



glicosiltransferasas responsables de la glicosilación terminal residen en elementos de la región *trans* del Golgi (36). b) Algunos estudios de la cinética de tráfico de los receptores han demostrado que éstos retornan a los compartimentos tardíos del Golgi (la red *trans* del Golgi), mucho más frecuentemente que a los compartimentos tempranos del Golgi (45). c) Los receptores y las enzimas lisosomales se han localizado en vesículas cubiertas de clatrina en la región de la red *trans* del Golgi (46). Los análisis bioquímicos y los estudios de inmunolocalización revelan cantidades muy bajas o indetectables del receptor en los lisosomas, pero cantidades significantes en estructuras endosomales, con identidad propia (47), lo que permitió suponer que las vesículas provenientes del Golgi que contienen los complejos enzima-receptor son conducidos a los compartimentos ácidos prelisosomales/endosomales en vez de a los lisosomas (47). El bajo pH de los compartimentos endosomales (pH 4.8) provoca que el complejo ligando receptor se disocie y las enzimas lisosomales liberadas sean conducidas a los lisosomas; además, los receptores son reciclados al Golgi y membrana plasmática (31). La pequeña proporción de enzimas lisosomales que son secretadas por las células al medio extracelular, se unen a los receptores en la superficie celular para ser internalizadas vía el receptor para manosa 6-fosfato, el cual está localizado en la superficie celular en depresiones cubiertas de clatrina. Las enzimas lisosomales internalizadas entran a los compartimentos endosomales en donde se disocian de los receptores para luego ser liberadas en los lisosomas. (10 y 20), observación que se ve demostrada con los siguientes trabajos: i) Los factores correctivos (Enzimas lisosomales) añadidos exógenamente son capaces de degradar cantidades patológicas de mucopolisacáridos acumulados en fibroblastos provenientes de pacientes con diferentes tipos de mucopolisacáridosis (10 y 48) ii) Varios procedimientos citoquímicos demostraron que las enzimas añadidas se localizaron en vesículas perinucleares.(48). iii) Los estudios de fraccionamiento celular llevados a cabo en fibroblastos, a los que se les añadió enzimas exógenamente ( $\alpha$ -L-iduronidasa y  $\beta$ -glucuronidasa) mostraron la presencia de estas enzimas en fracciones que corresponden a lisosomas (49 y 50).

#### RECEPTORES PARA MANOSA-6-FOSFATO (MPR)

Se han aislado, caracterizado y clonado los ADNc de dos distintos MPR. Uno es una glicoproteína transmembranal con una Mr de 275,000. Este receptor une ligandos que contienen M6P en ausencia de cationes, por lo que se le ha llamado receptor para M6P independiente de cationes CI-MPR (51). El otro receptor es también una glicoproteína transmembranal con una Mr de 46,000; las formas bovina y murina de este receptor requieren cationes para una óptima unión, por lo que se le refiere como receptor para M6P dependiente de cationes CD-MPR (52). Ambos receptores muestran una especificidad similar de unión hacia oligosacáridos fosforilados, aunque prefieren oligosacáridos con dos fosfomonoesteres mas que aquellos con un fosfomonoester (53)

Los análisis de secuencia, combinados con experimentos de proteólisis indican que el precursor de CI-MPR consiste de una secuencia señal amino terminal de 44 residuos, un dominio extracitoplásmico de 2269 residuos, una región única transmembranal de 23 residuos y un dominio citoplásmico carboxilo terminal de 163 residuos. El dominio extracitoplásmico contiene 19 sitios potenciales para glicosilación de los cuales al menos 2 son utilizados, por eso, el tamaño de la glicoproteína madura es de entre 275 y 300 kDa. El dominio extracitoplásmico también tiene una estructura repetitiva de 15 segmentos de aproximadamente 147 aminoácidos

cada uno. Cada segmento comparte similitud en la secuencia en un porcentaje del 16 al 38%. La localización de los residuos de cisteína están altamente conservados entre los segmentos (54 y 55).

El CD-MPR también consiste de 4 dominios estructurales: Una secuencia señal en el amino terminal de 28 residuos, un dominio extracitoplásmico de 159 residuos, una región transmembranal única de 25 residuos y un dominio citoplásmico en el carboxilo terminal de 67 residuos. El dominio extracitoplásmico es similar a cada una de las unidades repetitivas del CI-MPR, con identidades en la secuencia del 14 al 28% lo que sugiere que ambos receptores provienen de un ancestro común y que el CI-MPR surgió por duplicación de una secuencia ancestral única. En contraste no existen similitudes significantes entre sus secuencias señal, región transmembranal y dominios citoplásmico (54 y 55).

La evidencia muestra que el CI-MPR participa tanto en la segregación de enzimas lisosomales sintetizadas *de novo*, así como en la endocitosis de enzimas lisosomales extracelulares, mientras que el CD-MPR sólo participa en la segregación de enzimas lisosomales. Así, las células en cultivo que carecen de CI-MPR endógenos (56) o son agotadas del CI-MPR mediante tratamiento con anticuerpos específicos (57 y 58) secretan aproximadamente el 70% de las enzimas lisosomales sintetizadas *de novo* y no son capaces de endocitar enzimas lisosomales extracelulares. La segregación y endocitosis defectuosas, que se dan en células que carecen de CI-MPR, es corregida mediante transfección con el ADNc del CI-MPR (59 y 60). La segregación residual de enzimas lisosomales que se da en las células deficientes del CI-MPR al parecer es mediada por el CD-MPR, ya que después del tratamiento de las células con anticuerpos anti-CD-MPR existe un incremento en la secreción de hidrolasas ácidas (58).

Un dato interesante es que al clonarse y secuenciarse el receptor para el factor de crecimiento II semejante a insulina (IGF-II) se descubrió que su secuencia correspondía a la del CI-MPR (61). Los estudios bioquímicos muestran que ambos receptores son la misma proteína ya que pueden unir simultáneamente residuos de fosfomanosil e IGF-II, una hormona polipeptídica no glicosilada (62 y 63). En contraste el CD-MPR no es capaz de unir IGF-II (62 y 64). El significado biológico de estos descubrimientos no es muy claro. Se conoce que el CI-MPR une e internaliza en la superficie celular IGF-II y que lo conduce a los lisosomas donde es degradado (65). De esta manera el receptor serviría para retirar el IGF-II de circulación. Pero la pregunta crítica es si el IGF-II al unirse al CI-MPR da como resultado la transducción de una señal.

#### **ANTECEDENTES ESPECÍFICOS**

Aunque el sistema para el transporte y segregación de las proteínas que contienen el marcador de M6P es importante, seguramente no es el único. Existen evidencias que confirman la existencia de rutas alternativas, por ejemplo, algunos grupos celulares (células Kupffer, hepatocitos y leucocitos) provenientes de pacientes con enfermedad de Células "I" (mucopolipidosis II) y polidistrofia pseudo-Hurler (mucopolipidosis III), presentan niveles normales de enzimas lisosomales, a pesar de tener la deficiencia característica en la actividad de fosfotransferasa por lo que no pueden adquirir el marcador de reconocimiento de M6P (66 y 67). Además, aunque los fibroblastos de pacientes con mucopolipidosis II secretan la mayoría de

las enzimas lisosomales al medio, existen algunas actividades normales, tal es el caso de la fosfatasa ácida (68).

La presencia de un sistema independiente del marcador de M6P para el transporte y segregación de las enzimas lisosomales, se ve apoyada también por los trabajos de Rijnboutt y col (69) y Glickman y Kornfeld (70). El primero en sus experimentos de pulso y caza en hepatoma humano HepG2, encontró que la Catepsina D en presencia de tunicamicina (droga que inhibe la N-glicosilación y por lo tanto la formación del marcador de M6P) sólo es parcialmente secretada al medio de cultivo, encontrando también que el transporte es llevado a cabo cuando la procatepsina D se asocia de manera específica a la membrana, independientemente del marcador de M6P. Por su parte Glickman y Kornfeld (70) al trabajar con una línea celular linfoblastoide B, obtenida a partir de pacientes con enfermedad de células "I", encontraron que solo el 45% de la Catepsina D es secretada al medio de cultivo y que el transporte a lisosomas en esta línea celular es mediado de manera específica por una región en el carboxilo terminal de la procatepsina D.

Otras evidencias sobre un sistema independiente de M6P, surgen de los estudios realizados en fibroblastos provenientes de pacientes con mucopolisacáridosis VII (enfermedad que se caracteriza por una deficiencia en la enzima lisosomal  $\beta$ -glucuronidasa), así, Ullrich y col (30) encontraron que la endocitosis adsorptiva de la  $\beta$ -glucuronidasa de hígado de rata no se ve afectada por la presencia de azúcares fosforilados o por tratamiento de la enzima con fosfatasa alcalina. De igual manera, Hieber y col (71) demostraron que la endocitosis adsorptiva de la  $\beta$ -glucuronidasa de hígado bovino tampoco es afectada por la presencia de M6P o por las altas concentraciones de otras enzimas lisosomales que contienen el residuo de M6P.

En sus investigaciones, González-Noriega y col (72) han observado que: a) La endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa de bazo humano es completamente inhibida cuando se encuentra en presencia de M6P, cuando es pretratada con fosfatasa ácida y endoglicosidasas H o F, pero la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa de bazo y de hígado bovino sólo es parcialmente inhibida (23%) por los mismos tratamientos. b) Los anticuerpos anti-receptor de M6P de 215 kDa son capaces de inhibir selectivamente la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa humana, pero no de la  $\beta$ -glucuronidasa bovina. Estos estudios permitieron proponer la existencia de dos sistemas de endocitosis diferentes, e independientes, para la captura de hidrolasas ácidas por fibroblastos humanos, de los cuales el sistema de M6P es responsable de aproximadamente el 23% de la endocitosis de la enzima bovina mientras que el nuevo sistema propuesto es el responsable de aproximadamente un 80% de la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa bovina.

Estas observaciones sugieren la existencia de una vía alterna para la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa bovina y en la actualidad se está trabajando en el laboratorio para caracterizarla. El trabajo se ha dividido en dos partes: a) purificación y caracterización del receptor presente en membranas las de fibroblastos humanos, así como la obtención de anticuerpos en contra del receptor para la realización de experimentos inmunocitoquímicos, b) identificación del "nuevo" marcador, para conocer en que enzimas lisosomales se encuentra y en que lugar de la célula se adquiere.

Previamente en el laboratorio se han utilizado varios enfoques para determinar la naturaleza química del nuevo marcador de reconocimiento. De manera breve: a) Se han analizado una serie de azúcares, neutros, ácidos, básicos, fosforilados o bien sulfatados no encontrándose

ninguno que tenga la capacidad de inhibir la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa de hígado bovino. b) se ha encontrado que una mezcla de péptidos son capaces de inhibir la endocitosis de la enzima bovina; sin embargo, se ha descartado que el inhibidor sea una secuencia peptídica ya que conserva su capacidad de inhibir la endocitosis a pesar de ser digerido exhaustivamente con pronasa. c) Existe la posibilidad de que el nuevo marcador esté unido a una cadena glicosídica ya que puede ser separado de la enzima bajo las mismas condiciones en que se puede hidrolizar la unión O-ser/thr por la que ciertas cadenas glicosídicas se unen a las proteínas. d) La molécula aislada tiene un PM de 121, no se une a columnas de intercambio aniónico pero si a columnas de intercambio catiónico lo que sugiere que contiene grupos amino, pero no carboxílicos. Este tipo de resultados ha obligado a buscar estrategias alternativas a fin de proceder a la caracterización química del marcador mediante resonancia magnética nuclear (NMR) y espectrometría de masas. González-Noriega y col (73) describieron la purificación del "nuevo" marcador de reconocimiento para la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa de hígado bovino, mediante  $\beta$ -eliminación con 50 mM de NaOH y reducción con  $^3\text{H}$  borhidruro de sodio a partir de un extracto crudo de hígado bovino. Sin embargo, el método de purificación descrito es en sí muy laborioso y en los análisis de NMR y espectrometría de masas, realizados para establecer su identidad química, aparecen una gran cantidad de contaminantes producto de la degradación de la matriz de las resinas sintéticas de Dowex, P2 y Amberlita que se arrastraron durante todo el proceso de purificación y no se pudieron detectar dada la sensibilidad de las técnicas utilizadas. Por otra parte, con este método probablemente el marcador se modifica químicamente por las condiciones de liberación y reducción. En suma, los problemas encontrados con este método de purificación obligaron a establecer un protocolo alternativo para la purificación del marcador, que sea menos laborioso, evite en lo posible contaminaciones no controladas y que no modifique la estructura química del marcador.

### **OBJETIVO**

El siguiente trabajo tiene como objetivo el establecer un protocolo para la purificación de un péptido que contiene un "nuevo" marcador de reconocimiento para la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa de hígado bovino en fibroblastos humanos en cultivo.

## MATERIALES

### I. SOLUCIONES AMORTIGUADORAS

#### I.1- SOLUCION SALINA AMORTIGUADORA CON FOSFATOS (PBS)

Cloruro de sodio (J.T. Baker)	150 mM
Cloruro de potasio (J.T. Baker)	2.6 mM
Fosfato de sodio monobásico (J.T. Baker)	8.0 mM
Fosfato de potasio monobásico (J.T. Baker)	1.4 mM

#### I.2- AMORTIGUADOR DE GLICINA CARBONATO

Glicina (Sigma)	0.32 M
Carbonato de sodio (J.T. Baker)	0.20 M
Hidróxido de sodio (Merk)	0.18 M
Ajustar pH 10.5	

#### I.3- AMORTIGUADOR TRIS-FOSFATO

Cloruro de sodio (J.T. Baker)	0.15 M
Fosfato de sodio monobásico (J.T. Baker)	0.01 M
Tris-HCl (Sigma)	0.01 M
Azida de sodio (Sigma)	0.025 %

#### I.4- SOLUCIÓN AMORTIGUADORA PARA ACOPLAMIENTO

Bicarbonato de sodio (J.T. Baker)	0.1 M
Cloruro de sodio (J.T. Baker)	0.5 M
Ajustar pH 8.3	

#### I.5- LÍQUIDO DE BRAY

Naftaleno (J.T. Baker)	70 g/L
PPO (Du Pont)	4 g/L
Etilenglicol (J.T. Baker)	20 ml/L
Metanol (sigma)	100 ml/L
Dioxano (J.T. Baker)	aforar a 1 L

### II. MEDIOS DE CULTIVO

#### II.1- MEDIO ESENCIAL MINIMO (MEM)

Medio mínimo de Eagle (Gibco)	9.6 g/L
Bicarbonato de sodio (J.T. Baker)	2.2 g/L
Piruvato de sodio (Sigma)	0.1 g/L
Suero fetal bovino (Gibco)	
inactivado 30 min a 50°C	100 ml/L
Aforar a 1 L con agua tridestilada	
Filtrar en filtro Millipore de 0.22 µm	

#### II.2- MEM-BES

Medio mínimo de Eagle (Gibco)	9.6 g/L
Bes (sigma)	5.3 g/L
Piruvato de sodio (sigma)	0.1 g/L
Albúmina de suero bovino (sigma)	1.0 g/L
Ajustar pH 6.8	
Aforar con agua tridestilada	

Filtrar con filtro Millipore de 0.22 $\mu$ m	
II.3- VERSENO	
EDTA (J. T. Baker)	0.2 g/L
Cloruro de sodio (J.T. Baker)	8.2 g/L
Cloruro de potasio (J.T. Baker)	0.4 g/L
Tris-base (Sigma)	3.0 g/L
Rojo fenol (Sol. al 5%) Merk	2.0 ml
Aforar a 1 L con agua bidestilada	
Filtrar con filtro Millipore de 0.22 $\mu$ m	
II.4- SOLUCIÓN DE TRIPSINA	
Tripsina (Difco)	1.25 g
Solución de verseno	500 ml
Filtrar con filtro Millipore de 0.22 $\mu$ m	

## MÉTODOS

### I. PURIFICACIÓN DE ENZIMAS

#### I.1- $\beta$ -GLUCURONIDASA DE HÍGADO BOVINO

La purificación de la  $\beta$ -glucuronidasa de hígado bovino (E.C. 3.2.1. 31) se realizó de acuerdo con el método descrito por Himeno y col (74) y modificado en el laboratorio para eliminar el marcador de M6P (75). El hígado bovino crudo se homogenizó en solución amortiguadora de acetatos 0.07 M, pH 5.0, que contenía 1mM de EDTA (solución A) a una proporción de 3 ml por gr de tejido con un Polytron (Kinematica CH-6010). El homogenado fue centrifugado a 13,000 rpm durante 30 minutos en centrífuga Sorvall refrigerada RC-5B y rotor GSA, el sobrenadante fue llevado al 60% de saturación con sulfato de amonio y después de una noche a 4°C la solución se centrifugó a 13,000 rpm por 30 minutos, el sobrenadante fue descartado y el precipitado se resuspendió en amortiguador Tris/maleato 0.035 M, pH 6.8. El material insoluble fue removido por centrifugación a 13,000 rpm por 30 minutos, el sobrenadante fue incubado a 25°C durante 24 horas para eliminar el marcador de M6P. La suspensión se llevó a pH 5 con ácido acético 1M. A un volumen de la solución de la enzima se le añadieron 0.4 de volumen de etanol frío, para luego centrifugar a 13,000 rpm durante 30 minutos, el precipitado fue descartado. Al sobrenadante se le añadieron 0.7 volúmenes de etanol frío, la mezcla se centrifugó a 13,000 rpm durante 30 minutos, el sobrenadante fue descartado. El precipitado fue disuelto en solución A y el material insoluble se eliminó por centrifugación. A un volumen de la solución de enzima del paso anterior se le agregó 0.5 de volumen de una mezcla de solvente orgánico (etanol-acetona-eter, 15: 4: 1, por volumen) la mezcla se enfrió en hielo por 10 minutos para luego centrifugar a 13,000 rpm durante 10 minutos, el precipitado fue descartado. Al sobrenadante se le adicionó un volumen de la mezcla de solvente orgánico frío. La mezcla se incubó en hielo por 10 minutos y se centrifugó a 13,000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante fue descartado y el precipitado fue disuelto en solución A. La solución de enzima obtenida después del fraccionamiento con solvente orgánico se dializó contra solución A y fue sujeta a cromatografía en Carboximetil-Sefadex (CM-25). Los picos de actividad fueron unidos, concentrados y cromatografiados, en Sefadex G-200

equilibrada con amortiguador Tris/maleato 0.035 M, pH 6.8. La enzima se guardó en alícuotas de 1 ml a -70°C.

#### 1.2- PURIFICACIÓN DE $\beta$ -GLUCURONIDASA DE PLAQUETAS HUMANAS

La  $\beta$ -glucuronidasa de plaquetas humanas se purificó según el método descrito por Natowicz y col (76). El concentrado plaquetario almacenado a -70°C donado por el Instituto Nacional de Pediatría, se descongeló y se llevó a una concentración final de, EDTA 25 mM, tártrato de sodio 25 mM, fosfato de sodio dibásico 50 mM y 0.2% de desoxicolato (DOC). La solución se llevó a pH 7.5 con Tris 1M y se dejó 1 hora a 4°C, después de lo cual el pH se bajó a 5 para precipitar el DOC. El precipitado fue descartado al centrifugar a 13,000 rpm, durante 30 minutos, en una centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B y rotor GSA. El sobrenadante se adsorbió en una columna de anticuerpos de conejo anti- $\beta$ -glucuronidasa acoplados a Sefarosa 4B. Después de lavar la columna con amortiguador Tris-fosfato 0.1 M pH 6.8, la enzima adsorbida se eluyó con Urea 6 M, para luego concentrar en un Amicon con membrana XM50 bajo atmósfera de nitrógeno. La enzima concentrada se dializó contra amortiguador Tris-fosfato, pH 6.8, se le agregó albúmina de suero bovino (1mg/ml) y se guardó en alícuotas de 1 ml a -70°C.

## II. ENSAYOS ENZIMATICOS

La actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa se determinó fluorométricamente (77), se utilizó como sustrato 4-metil-umbeliferil- $\beta$ -D-glucuronido, a una concentración de 10 mM en amortiguador de acetato de sodio 0.1 M pH 4.5. Los ensayos se llevaron a cabo durante 30 minutos a 37°C, al adicionar 50  $\mu$ l de la enzima a 100  $\mu$ l del sustrato. La reacción se detuvo al adicionar 1.8 ml de amortiguador de glicina carbonato pH 10.5.

Una unidad de actividad es la cantidad de enzima que cataliza la liberación de una nanomola de 4-metil-umbeliferona por hora. La fluorescencia se cuantificó en espectrofluorómetro Aminco a una excitación de 360 nm y emisión de 448 nm. Como estándar se utilizó una solución de 4-metil-umbeliferona 10 nM.

La cuantificación de proteína se determinó espectrofotométricamente, de acuerdo con el método de Lowry, utilizando albúmina de suero bovino como estándar (78).

## III. PURIFICACIÓN DEL PÉPTIDO QUE CONTIENE EL MARCADOR DE RECONOCIMIENTO

### III.1- DIGESTIÓN DE $\beta$ -GLUCURONIDASA CON PRONASA

Los glicopéptidos fueron generados a partir de  $\beta$ -glucuronidasa de hígado bovino (E.C. 3.2.1.31) por tratamiento prolongado con pronasa (79). La  $\beta$ -glucuronidasa (90 mg) fue resuspendida en solución amortiguadora Tris-HCl 0.1 M, pH 8, que contenía 1 mM de  $\text{CaCl}_2$ . La digestión de la muestra se inició con la adición de 1mg de pronasa (Boehringer Mannheim) previamente preincubada a 60°C por 30 minutos, para inactivar glicosidasas, seguida de adiciones de 1mg a las 24 y 48 horas. El pH fue monitoreado y cuando fue necesario se reajustó a pH 8, antes de cada nueva adición de pronasa. La digestión se llevó a cabo a 37°C, previa agregación de tolueno para suprimir crecimiento microbiano. La digestión se detuvo a las 72 horas por calentamiento a 100°C durante 2 minutos, finalmente, la muestra fue centrifugada a 6,000 rpm durante 15 minutos para remover material insoluble.



### III.2- CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

Los glicopéptidos generados fueron separados por cromatografía de exclusión molecular en columna Sefadex G-25 (2.5 x 150 cm) equilibrada a temperatura ambiente con 10 mM de NaCl a un flujo de 30 ml/hr. Las fracciones que contienen los péptidos se unieron por separado y se concentraron por evaporación al vacío en rotovapor Büchi RE 111. Los picos obtenidos en Sefadex G-25 fueron cromatografiados en columnas de Sefadex G-10 unidas en serie (3 columnas de 1.6 x 90 cm) equilibradas con agua mili Q a temperatura ambiente a un flujo de 30 ml/hr, el monitoreo de los péptidos se realizó por lecturas de densidad óptica a 230 nm, las fracciones que contienen los péptidos fueron unidas y liofilizadas.

### III.3- CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

Los péptidos resuspendidos en amortiguador de acetato de sodio 5 mM, pH 5, fueron aplicados a una columna (1 x 12 cm) de carboximetil celulosa (CM-52, Whatman), previamente equilibrada a temperatura ambiente con amortiguador de acetato de sodio 5 mM, pH 5, a un flujo de 9 ml/hr. Después de adsorber, la columna se lavó con amortiguador de acetatos 5 mM pH 5.0, hasta que la densidad óptica del efluente fue cero. Los péptidos adsorbidos se eluyeron de la columna con un gradiente lineal de NaCl 0-0.2 M en amortiguador de acetato de sodio 5 mM, pH 5. Los péptidos se monitorearon por densidad óptica a 230 nm en fracciones de 1 ml.

### IV. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD CON LECTINAS

Las lectinas de concanavalina A, *Ricinus communis*, Germen de trigo (*Triticum vulgare*) y *Lens culinaris*, acopladas a sefarosa, se adquirieron comercialmente de Sigma Chemical Co. Las lectinas de *Phaseolus vulgaris*, *Arachis hypogaea* y *Anaracanthus leucocarpus* fueron proporcionadas por el Dr Edgar Zenteno de la Facultad de Medicina de la UNAM y acopladas en el laboratorio a sefarosa activada con bromuro de cianógeno según el método descrito en el manual para cromatografía de afinidad de Pharmacia Fine Chemicals (80). De manera breve: la sefarosa activada con bromuro de cianógeno se hidrató con HCl 1 mM por 15 min, se pasó a un embudo Buchner, se lavó con la misma solución (200 ml/gr de resina) y enseguida con amortiguador de acoplamiento, la resina lista para usarse se transfirió a un tubo que contenía la lectina que se va a acoplar y que ha sido disuelta en el amortiguador de acoplamiento (10 mg lectina/ml de gel). La reacción se llevó a cabo a 4°C durante 24 horas con agitación. Para bloquear los grupos activos remanentes, la resina se transfirió a una solución de etanolamina 1 M, pH 8, durante 2 horas a temperatura ambiente. El exceso de lectina no acoplada se eliminó lavando la resina alternativamente 4 veces con amortiguador de pH alto y bajo (acetatos 0.1 M, pH 4, y amortiguador de acoplamiento, pH 8.3), después de lo cual la lectina acoplada está lista para utilizarse o bien se puede guardarse a 4°C en presencia de timerosal 0.01 %.

1. Cromatografía de afinidad en Concanavalina A (Con-A): la columna de Con-A sefarosa (0.7 x 15 cm), se equilibró a temperatura ambiente con amortiguador Tris-HCl 0.01 M, pH 8, que contenía 0.15 M de NaCl, 1 mM de CaCl<sub>2</sub> y 1 mM de MnCl<sub>2</sub> a un flujo de 9 ml/hr. Los glicopéptidos que contienen el marcador fueron resuspendidos en 1 ml del amortiguador de equilibrio y aplicados a la columna. La columna se lavó con amortiguador Tris-HCl de equilibrio hasta que el efluente quedó libre de péptidos, para eluir después con 3 volúmenes de Metil β-D-manopiranosido 1 M.
2. Cromatografía de afinidad en *Ricinus communis* (RCA): La columna de RCA (0.7 x 15 cm) fue equilibrada a temperatura ambiente con PBS, a un flujo de 9 ml/hr. Los glicopéptidos

previamente resuspendidos en 1 ml de PBS fueron aplicados a la columna. La columna se lavó con 5 volúmenes de PBS, seguido de 3 volúmenes de lactosa 0.1 M en PBS.

3. Cromatografía de afinidad en *Phaseolus vulgaris* (PHA): La columna de PHA (1 x 15 cm) se equilibró a temperatura ambiente con PBS a un flujo de 9 ml/hr. Los glicopéptidos que contienen el marcador previamente resuspendidos en 1 ml de PBS, fueron aplicados a la columna. La columna se lavó con 5 volúmenes de PBS, seguido de 3 volúmenes de lactosa 0.1 M en PBS.
4. Cromatografía de afinidad en *Arachis hypogaea* (PNA): la columna de PNA (0.7 x 15cm) fue equilibrada a temperatura ambiente con PBS a un flujo de 9 ml/hr. Los glicopéptidos previamente resuspendidos en 1 ml de PBS fueron aplicados a la columna. La elución de los glicopéptidos se llevó a cabo lavando con 8 volúmenes de PBS.
5. Cromatografía de afinidad en *Amaranthus leucocarpus* (AHA): los glicopéptidos que contiene el marcador resuspendidos en 1 ml de PBS fueron aplicados a la columna de AHA (0.7 x 16 cm) previamente equilibrada a temperatura ambiente con PBS a un flujo de 9 ml/hr. La elución de la muestra se llevó a cabo lavando con 8 volúmenes de PBS.
6. Cromatografía de afinidad en *Triticum vulgaris* (WGA). Los glicopéptidos que contienen el marcador resuspendidos en 1 ml de PBS fueron aplicados a la columna de WGA (0.7 x 10 cm) previamente equilibrada a temperatura ambiente con PBS a un flujo de 9 ml/hr. La elución de los glicopéptidos se llevó a cabo lavando con 5 volúmenes de PBS seguido de 3 volúmenes de N-acetilglucosamina 0.1 M.
7. Cromatografía de afinidad en *Lens culinaris*. (LCA) Los glicopéptidos que contiene el marcador resuspendidos en 1 ml de PBS fueron aplicados a la columna de LCA (1 x 8 cm) previamente equilibrada con PBS a temperatura ambiente a un flujo de 9 ml/hr. La elución de los glicopéptidos se llevó a cabo lavando la columna con 8 volúmenes de PBS.

Todas las columnas fueron regeneradas mediante lavados extensivos con la solución amortiguadora de equilibrio propia para cada lectina. Los glicopéptidos fueron monitoreados por radioactividad en contador de centelleo líquido, en fracciones de 0.56 ml.

#### V. ACETILACIÓN DE PÉPTIDOS

Los grupos amino de los péptidos se acetilaron con [<sup>14</sup>C] anhídrido acético, 30 mCi/mmol (81). De 5 a 100 nmolas del glicopéptido fueron secados en un tubo de ensaye, y enseguida se añadió 0.1 ml de [<sup>14</sup>C] anhídrido acético (3,5 mM en bicarbonato de sodio 0.08 M), después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente se agregó 1 µl de hidróxido de amonio 0.7 M para formar ácido acético con el anhídrido acético que no reaccionó. Luego de otra hora de incubación a temperatura ambiente los glicopéptidos acetilados fueron separados del exceso de anhídrido acético en una columna de Sefadex G-10 (1.50 x 130 cm). Los glicopéptidos acetilados fueron monitoreados en un contador de centelleo líquido (Minaxi β) utilizando el líquido de Bray.

#### VI. CUANTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS

Los grupos amino libres de los péptidos fueron cuantificados fluorométricamente según el método de la fluorescamina descrito por Böhlen y col (82). Se utilizó como estándar leucina 100 nmoles/ml en amortiguador de fosfatos pH 8.5. Se pipetearon alicuotas de la leucina (1 a 10 nmoles) en tubos de ensaye, y se llevaron a 1 ml con amortiguador de fosfatos 0.1 M pH

8.5. Cuando el tubo de ensayo estaba siendo vigorosamente agitado en un vortex, se agregó rápidamente a la solución, 0.5 ml de fluorescamina en dioxano (30 mg/100ml). El mezclado rápido es esencial para obtener resultados reproducibles ya que la fluorescamina es hidrolizada rápidamente. Dado que la fluorescamina reacciona con trazas de aminos presentes en los reactivos y solventes, se hizo rutinariamente un blanco de la reacción. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente. Para las muestras problema se realizó el mismo procedimiento. Todos los ensayos se llevaron a cabo por duplicado para disminuir errores resultantes de contaminaciones accidentales. La fluorescencia fue medida en un espectrofluorómetro Aminco, con una longitud de onda de excitación a 390 nm y emisión de 490 nm. bajo estas condiciones la reacción es lineal hasta 10 nmoles del aminoácido.

#### **VII. CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS**

Los carbohidratos totales de las cadenas glicosídicas se cuantificaron de acuerdo al método descrito por Dubois y col (83). Se utilizó como estándar una solución de glucosa (180µg/ml). Se pipetearon alícuotas de entre 25 a 100 µl que contenían la solución estándar, a un tubo de ensayo y se llevaron a un volumen de 200 µl con agua destilada. Enseguida se añadieron 200µl de una solución de fenol en agua al 5% (w/v), después de lo cual se añadió rápidamente 1 ml de ácido sulfúrico concentrado, el ácido sulfúrico se agregó directamente sobre la superficie de la solución para obtener una buena mezcla y no por las paredes del tubo. La solución se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, para luego agitar vigorosamente. El blanco de la reacción se preparó sustituyendo la solución de glucosa por agua destilada. Para las muestras problema se siguió el mismo procedimiento. Todas las soluciones fueron preparadas por duplicado para disminuir errores que pueden resultar de contaminaciones accidentales. La absorbencia se determinó en un espectrofotómetro Pharmacia Ultrospec III a 490 nm. Bajo estas condiciones la reacción es lineal hasta 18µg de glucosa.

#### **VIII. CULTIVOS CELULARES**

La línea celular de fibroblastos humanos S392 donada por el Dr W.S, Sly de la Universidad de Whashington, fue iniciada a partir de una biopsia de piel de un paciente con mucopolisacaridosis VII, enfermedad caracterizada por la deficiencia en la enzima lisosomal β-glucuronidasa.

Los fibroblastos fueron crecidos en frascos T75, hasta confluencia, en medio de cultivo MEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1,3 nM de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Para realizar los subcultivos, se retiró de los frascos el medio de cultivo y se enjuagaron con una solución quelante de EDTA (Verseno). Para desprender las células se adicionó tripsina al 0.25% durante tres minutos, las células se resuspendieron al adicionar medio de cultivo, para detener la acción de la tripsina. De cada frasco T75 se preparan otros 4 frascos T75.

Para realizar los ensayos de internalización a partir de un frasco T75 se prepararon placas de 24 pozos (de 20 mm cada pozo). Tanto a las placas como a los frascos de cultivo se les cambió el medio de cultivo cada tercer día y se mantuvieron en atmósfera húmeda, 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C

#### **IX.- ENSAYOS DE INTERNALIZACIÓN**

A los fibroblastos humanos de la línea S392 deficientes en  $\beta$ -glucuronidasa, crecidos en placas con 24 pozos, se les retiró el medio de cultivo, para luego adicionar la concentración adecuada de  $\beta$ -glucuronidasa e inhibidor en 200 $\mu$ l del medio de internalización MEM-Bes, pH 6.8. Después de 2 horas de incubación a 37°C la placa se puso sobre una capa de hielo y los pozos se lavaron 6 veces con PBS frío. Las células se lisaron con 300 $\mu$ l de desoxicolato de sodio al 0.02 % durante 30 minutos a 4°C. En el lisado celular se cuantificó la cantidad de  $\beta$ -glucuronidasa asociada a las células así como la proteína celular (72 y 73).

La velocidad de internalización se expresó, como la cantidad de enzima asociada a las células por unidad de tiempo (unidades de  $\beta$ -glucuronidasa/mg de proteína celular/hora de internación).

#### **X. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS**

El análisis de aminoácidos de los péptidos generados fue realizado en un autoanalizador de aminoácidos en el Instituto de Biotecnología de la U.N.A.M.

#### **XI.- ANÁLISIS DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

Los análisis de resonancia magnética nuclear fueron realizados en el Instituto de Química de la U.N.A.M y en el laboratoire de chimie biologique, Université des sciences et techniques, de Lille (Francia).

La muestra resuspendida en D<sub>2</sub>O se analizó con una frecuencia de un solo pulso empleando 512 scans, a 500 MHz.

## RESULTADOS

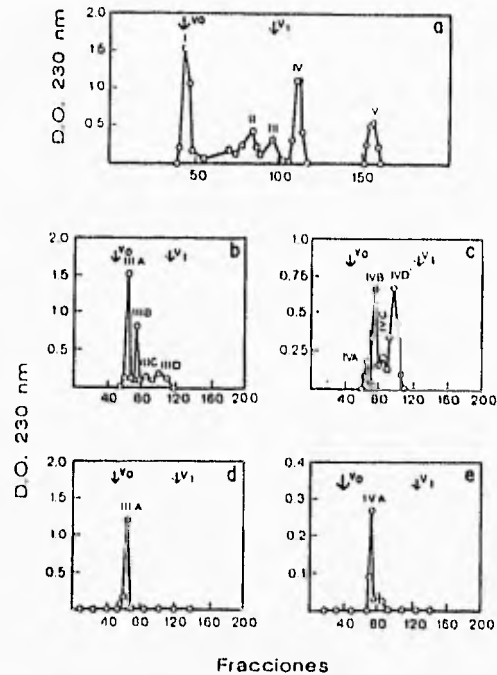
### GENERACIÓN DE PÉPTIDOS QUE CONTIENEN EL MARCADOR DE RECONOCIMIENTO

Previamente, al purificarse la  $\beta$ -glucuronidasa de hígado bovino, se encontró una fracción de proteínas capaz de inhibir competitivamente la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa de hígado bovino (enzima que contiene el "nuevo" marcador de reconocimiento) en fibroblastos humanos en cultivo; así mismo se observó que la capacidad inhibidora de esta fracción no es afectada si se trata con pronasa (73). En este trabajo se presenta un protocolo para purificar un péptido a partir de  $\beta$ -glucuronidasa de hígado bovino pura, que contenga el marcador de reconocimiento para el nuevo sistema de endocitosis encontrado en fibroblastos humanos en cultivo (72).

La Figura 2a muestra el perfil cromatográfico en Sefadex G-25 de los glicopéptidos generados al digerir exhaustivamente la  $\beta$ -glucuronidasa de hígado bovino con pronasa. La presencia de los mismos se determinó a 230 nm, longitud de onda propia de la unión peptídica. Se detectaron 5 picos (I a V), de los cuales el pico I contiene la pronasa junto con la  $\beta$ -glucuronidasa bovina no digerida y péptidos de más de 5,000 daltones de peso molecular, por lo que fue descartado. El Volumen de elución ( $V_e$ ) de los picos IV y V fue mayor que el Volumen total ( $V_t$ ) de la columna, este retraso sugiere posibles interacciones hidrófobas entre estos péptidos y la resina. Las fracciones que contienen cada uno de los picos (picos II a V) se unieron por separado y se concentraron por evaporación al vacío.

La cantidad de material en cada pico se determinó teniendo en cuenta el contenido peptídico o bien el contenido de cadenas glicosídicas. Dado que la cuantificación de los grupos amino libres son un buen reflejo del contenido de péptidos en cada pico, se utilizó un método fluorogénico en el que la fluorescamina reacciona específicamente con aminas primarias (82). De igual manera, el contenido de cadenas glicosídicas en cada pico se determinó de acuerdo al método colorimétrico del fenol-sulfúrico (83), que ha sido ampliamente utilizado para la determinación cuantitativa de carbohidratos totales libres o presentes en oligosacáridos, polisacáridos y glicoproteínas.

En la tabla I se muestra el contenido de grupos amino así como el de carbohidratos de cada una de los picos obtenidos en la columna de Sefadex G-25. Como se puede observar la relación carbohidratos/péptido es muy variable de un pico a otro. Esta variabilidad sugiere que no necesariamente todas las cadenas peptídicas contienen una cadena glicosídica, por lo cual no se puede utilizar indistintamente uno u otro parámetro. Dado que las evidencias obtenidas anteriormente en el laboratorio sugirieron que el marcador se encuentra asociado a una cadena glicosídica, se optó por utilizar el contenido de carbohidratos, presentes en cada fracción, para valorar su capacidad inhibidora. Sin embargo, debido a la dificultad para obtener grandes cantidades de la muestra, no fue posible generar curvas de dosis-respuesta para cuantificar la capacidad inhibidora de cada glicopéptido generado en cada paso de purificación. Por esta razón, se trató de utilizar una concentración de muestra que inhiba aproximadamente en un 50% la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa bovina en fibroblastos humanos. En la figura 3, se presenta una curva de dosis-respuesta en la que se observa la capacidad de la  $\beta$ -glucuronidasa bovina desnaturalizada por calor, para inhibir la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa bovina activa en fibroblastos humanos. Como se puede observar, existe una dependencia entre la cantidad de enzima desnaturalizada (cuantificada en términos de sus contenido de carbohidratos) y el

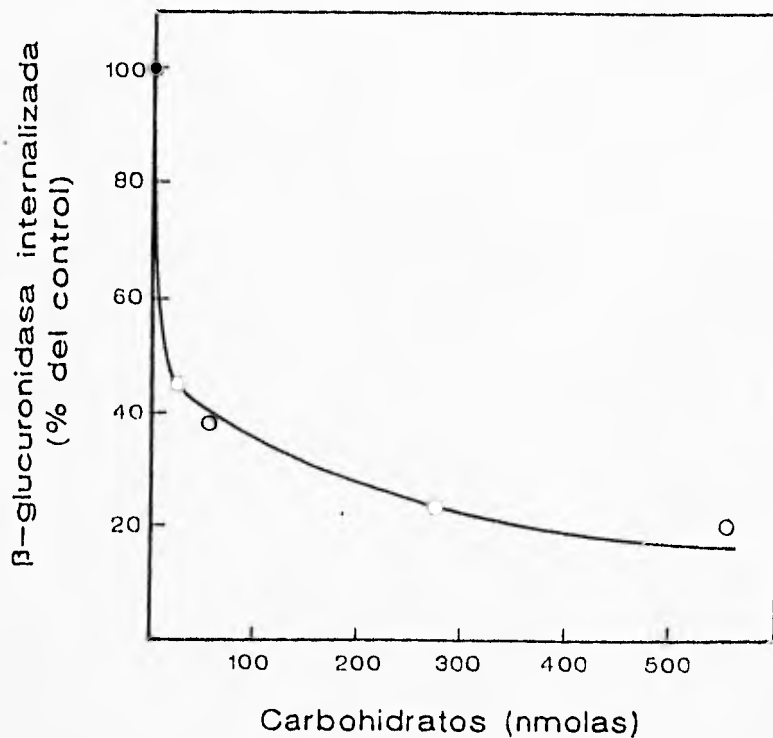


**Figura 2. Cromatografía de exclusión molecular de los glicopéptidos obtenidos por digestión de la  $\beta$ -glucuronidasa bovina con pronasa.** a) Los glicopéptidos generados por digestión de  $\beta$ -glucuronidasa bovina con pronasa fueron cromatografiados en columna de Sefadex G-25 (2.5 x 150 cms) equilibrada a temperatura ambiente con 10 mM de NaCl, a un flujo de 30 ml/hr y monitoreados por D.O. a 230 nm en fracciones de 7 ml. b y c) Los picos III y IV obtenidos en sefadex G-25 fueron cromatografiados en columna de Sefadex G-10 (3 columnas de 1.6 x 90 cms unidas en serie) equilibradas a temperatura ambiente con agua milli Q, a un flujo de 30 ml/hr y monitoreados a 230 nm en fracciones de 5 ml. d y e) Los picos IIIA Y IVA obtenidos en Sefadex G-10 fueron recromatografiados en Columna de Sefadex G-10 (3 columnas de 1.6 x 90 cms unidas en serie), equilibradas a temperatura ambiente con agua milli Q, a un flujo de 30 ml/hr y monitorados a 230 nm en fracciones de 5ml. Para Sefadex G-25 y G-10, el Volumen de elución ( $V_0$ ) se determinó con albumina de suero bovino (BSA).

**TABLA I**  
**Capacidad inhibidora de los glicopéptidos obtenidos por digestión de  $\beta$ -glucuronidasa bovina con pronasa sobre la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa en fibroblastos humanos.**

Picos	Concentración total (nmoles)		A/B	Concentración inhibidor (nmoles)		Endocitosis % del control $\beta$ -glucuronidasa	
	azúcares A	péptidos B		azúcares	péptidos	bovina	humana
II	4100	81333	0.050	13	130	100	124
III	560	125400	0.004	13	1840	20	175
IV	490	21780	0.022	13	300	68	152
V	133	613	0.016	13	100	100	135

Se incubaron fibroblastos deficientes de  $\beta$ -glucuronidasa con 2,000 U de  $\beta$ -glucuronidasa bovina o humana en presencia de 13 nmolas de carbohidratos de los glicopéptidos obtenidos por digestión de  $\beta$ -glucuronidasa bovina y cromatografía en Sefadex G-25 (fig. 2a). Después de 2 horas de incubación a 37°C las células fueron lisadas y enzayadas para la enzima asociada a la célula, como se describe en Materiales y Métodos.



**Figura 3. Inhibición de la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa bovina en fibroblastos humanos por  $\beta$ -glucuronidasa bovina desnaturalizada.** Se incubaron fibroblastos humanos, deficientes para  $\beta$ -glucuronidasa, en presencia de 2,000 U de  $\beta$ -glucuronidasa de hígado bovino y cantidades crecientes de  $\beta$ -glucuronidasa bovina desnaturalizada a 75°C durante 30 minutos. Después de 2 horas de incubación a 37°C las células fueron lisadas y ensayadas para enzima asociada a la célula, como se describe en Materiales y Métodos. La cantidad de  $\beta$ -glucuronidasa fue determinada en base a su contenido de carbohidratos.



porcentaje de inhibición de la  $\beta$ -glucuronidasa activa. En presencia de 550 nmolas de carbohidratos, la endocitosis de la enzima se redujo en un 80%, es decir fue necesario agregar aproximadamente 6,000 veces de enzima desnaturalizada para inhibir a la enzima nativa. Como punto de partida se utilizaron 13 nmolas de carbohidratos/caja, la concentración de carbohidratos necesaria para obtener una inhibición de la endocitosis de 50%. En los siguientes pasos de la purificación, la cantidad de muestra utilizada de cada fracción para estudiar su capacidad inhibitoria se disminuyó en el mismo porcentaje que la masa de cada pico generado representa en relación a la fracción de la cual se partió.

Se probó la capacidad de cada uno de los glicopéptidos (picos II a V) obtenidos en la columna de Sefadex G-25 (Fig 2a) para inhibir la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa de hígado bovino en fibroblastos humanos. Se utilizó como control de la especificidad de la inhibición,  $\beta$ -glucuronidasa humana, la cual solamente es internalizada por el sistema de M6P. La tabla I muestra los resultados del ensayo de internalización, los picos III y IV inhibieron la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa de hígado bovino en un 80 y 32% respectivamente. Sin embargo, la presencia de estas dos fracciones produjo un incremento en la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa humana, utilizada como control de inhibición por toxicidad. Este efecto pone en duda que la especificidad de la inhibición obtenida sea debida a la presencia del marcador, y más bien sea resultado de una toxicidad debida probablemente a que la concentración de NaCl presente en las muestras produce condiciones de hipertonicidad. Para evitar la probable inhibición por toxicidad, los glicopéptidos fueron desalados después de cada paso de purificación, en Columna de Sefadex G-10 (1 x 100 cm) equilibrada con agua mili Q.

En la tabla II se muestra la capacidad inhibitoria de las fracciones una vez desaladas. Como se puede observar ahora, ninguna de las fracciones es capaz de incrementar la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa humana en fibroblastos humanos. Las fracciones correspondientes a los picos III y IV fueron las únicas con capacidad para inhibir la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa de hígado bovino. Al desalarse se puede observar también que disminuyó la capacidad inhibitoria del pico III de 80 a 54%. Los picos II y V no inhibieron la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa bovina (0 y 8%) por lo que fueron descartados. En seguida los picos III y IV fueron cromatografiados por separado en columna de Sefadex G-10 (3 columnas de 1.6 x 90 cm unidas en serie) equilibradas con agua mili Q. Las figuras 2b y 2c muestran el perfil cromatográfico en Sefadex G-10 de los picos III y IV respectivamente. Se obtuvieron 4 picos a partir del pico III (IIIA a IIID) y 4 picos a partir del pico IV (IVA a IVD). Se probó la capacidad inhibitoria de cada uno de los picos obtenidos. Los picos IIIA y IVA inhibieron la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa bovina en un 54 y 35% respectivamente, el resto de los picos no fueron capaces de inhibir la endocitosis por lo que se descartaron (tabla III). Los picos IIIA y IVA fueron recromatografiados en Sefadex G-10 (Fig 2d y 2e) y nuevamente a ambos picos se les probó su capacidad para inhibir la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa bovina en fibroblastos humanos en cultivo. Los resultados muestran 54% de inhibición para el pico IIIA y 35% de inhibición para el pico IVA. Como se esperaba no se obtuvo inhibición de la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa humana (tabla IV).

El Volumen de elución de los picos IIIA y IVA es diferente (Figs. 2d y 2e). El peso molecular de ambos péptidos fue estimado con base en intervalo de separación de Sefadex G-10, que va de 0 a 700 daltones (84). De esta manera, si no existe ningún tipo de interacción

**TABLA II**  
**Capacidad inhibidora de los glicopéptidos obtenidos por digestión de  $\beta$ -glucuronidasa y desalados en Sefadex G-10 sobre la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa en fibroblastos humanos.**

Picos	Concentración total (nmoles)		Concentración inhibidor (nmoles)		Endocitosis % del control $\beta$ -glucuronidasa	
	azuáres	péptidos	azúcares	péptidos	bovina	humana
II	2811	65000	13	154	96	99
III	378	84399	13	1489	46	100
IV	356	14725	13	367	67	92
V	105	471	13	30	100	100

Se incubaron fibroblastos deficientes de  $\beta$ -glucuronidasa con 2,000 U de  $\beta$ -glucuronidasa bovina o humana en presencia de 13 nmoles de carbohidratos de los glicopéptidos desalados en Sefadex G-10. Después de 2 horas de incubación a 37°C las células fueron lisadas y enzayadas para la enzima asociada a la célula, como se describe en Materiales y Métodos.

**TABLA III**  
**Capacidad inhibidora de los glicopéptidos de  $\beta$ -glucuronidasa obtenidos por cromatografía en Sefadex G-10 sobre la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa en fibroblastos humanos**

Picos	Concentración total (nmoles)		Concentración inhibidor (nmoles)		Endocitosis % del control $\beta$ -glucuronidasa	
	azúcares	péptidos	azúcares	péptidos	bovina	humana
IIIA	327	72855	11.6	1600	46	100
IIIB	5	1164	0.16	24	100	100
IIIC	36	800	1.3	170	100	100
IIID	10	2320	0.3	50	100	100
IVA	25	1414	1.0	65	65	100
IVB	138	6170	5.4	200	100	100
IVC	83	3714	3.2	100	100	100
IVD	78	3427	3.0	182	100	100

Se incubaron fibroblastos deficientes de  $\beta$ -glucuronidasa con 2,000 U de  $\beta$ -glucuronidasa bovina o humana en presencia de las cantidades señaladas de los glicopéptidos obtenidos en cromatografía Sefadex G-10 (figs. 2b y 2c). Después de 2 horas de incubación a 37°C las células fueron lisadas y enzayadas para la enzima asociada a la célula, como se describe en Materiales y Métodos.

**TABLA IV**  
**Capacidad inhibidora de los glicopéptidos obtenidos por recromatografía en Sefadex G-10 sobre la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa en fibroblastos humanos**

Picos	Concentración total (nmoles)		Concentración inhibidor (nmoles)		Endocitosis % del control $\beta$ -glucuronidasa	
	azúcares	péptidos	azúcares	péptidos	bovina	humana
III A	293	52872	8.5	1476	46	100
IV A	25	1400	1.0	65	65	100

Se incubaron fibroblastos deficientes de  $\beta$ -glucuronidasa con 2,000 U de  $\beta$ -glucuronidasa bovina o humana en presencia de las cantidades señaladas de los glicopéptidos obtenidos por recromatografía en Sefadex G-10 (figs. 2d y 2e). Después de 2 horas de incubación a 37°C las células fueron lisadas y ensayadas para la enzima asociada a la célula, como se describe en Materiales y Métodos.

de los péptidos con la columna que altere su peso molecular relativo, se puede considerar que el péptido IVA tiene un PM de aproximadamente 300 daltones y el péptido IIIA de 400 daltones.

#### CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD EN LECTINAS

Las lectinas son proteínas que tienen la capacidad de unir específica y reversiblemente carbohidratos, por lo que han sido utilizadas en una amplia variedad de técnicas, para estudiar glicoproteínas, glicopéptidos y oligosacáridos. Además, las lectinas acopladas a soportes inertes han sido utilizadas para aislar y fraccionar glicopéptidos específicos (79 y 85). Como se mencionó anteriormente, había evidencias en el sentido que el "nuevo" marcador se encuentra asociado a una cadena glicosídica, por lo que se investigó si el péptido que contiene el marcador es adsorbido o retardado en alguna de las columnas que incluyen las lectinas más comúnmente utilizadas y que cubren el espectro de cadenas glicosídicas presentes en una glicoproteína. De esta forma, el péptido IIIA fue acetilado con [<sup>14</sup>C] anhídrido acético y cromatografiado en columnas de Sefarosa a la cual está acoplada algunas de las siguientes lectinas: a) Concanavalina A (Con A), que interactúa con alta afinidad con oligosacáridos de alta manosa; b) *Ricinus communis* (RCA) que interactúa con oligosacáridos complejos, bi y triantenarios que contienen residuos terminales de galactosa, c) *Phaseolus vulgaris* (PHA), retarda oligosacáridos complejos, tri y tetraantenarios que contienen un residuo de manosa sustituido en posición C-2 y C-6 por Gal $\beta$ (1,4)GlcNAc, d) *Triticum vulgaris* (WGA), une fuertemente oligosacáridos híbridos; e) *Arachis hypogaea* (PNA), reconoce oligosacáridos que contienen D-Gal- $\beta$ (1,3)-D-GalNAc, f) *Amaranthus leucocarpus* (AHA), interactúa con oligosacáridos GalNAc( $\alpha$  1,3) ser/thr, g) *Lens culinaris* (LCA), interactúa con oligosacáridos complejos que contienen fucosa y GluNAc terminal (79 y 85).

El péptido acetilado se resuspendió en la solución amortiguadora de equilibrio de las lectinas y se cromatografió en cada una de ellas como se describe en materiales y métodos. En la figura 4 se observa el perfil cromatográfico del péptido acetilado monitoreado por radioactividad en contador de centelleo líquido. Si bien la literatura reporta que los glicopéptidos que interactúan específicamente con la lectina son retrasados hasta 3 volúmenes de la columna o bien hasta que son eluidos específicamente con el hapteno adecuado (79 y 85), nuestros resultados muestran que en todos los casos el volumen de elución del péptido IIIA corresponde al volumen total de las columnas. Además, al cuantificar la fracción que sale en el volumen total de la columna se comprobó que se recuperó todo el péptido, lo que sugiere que no fue reconocido específicamente por ninguna de las lectinas ensayadas.

Debido a que no se encontró ninguna interacción del péptido con las lectinas se decidió realizar un análisis de resonancia magnética nuclear para conocer su contenido de carbohidratos. La figura 5 muestra el espectro de resonancia magnética nuclear realizado en Lille Francia para el pico IIIA. El espectro muestra a la glucosa y mesoinositol como únicos carbohidratos presentes en la muestra, contaminantes comunes, producto de degradación de la matriz de las columnas de Sefadex utilizadas. No se detectaron ninguno de los carbohidratos que por lo general se encuentran formando parte de las cadenas glicosídicas como N-acetilglucosamina N-acetilgalactosamina, manosa, galactosa o ácido siálico. Estos resultados cuestionan la supuesta presencia del marcador en una cadena glicosídica.

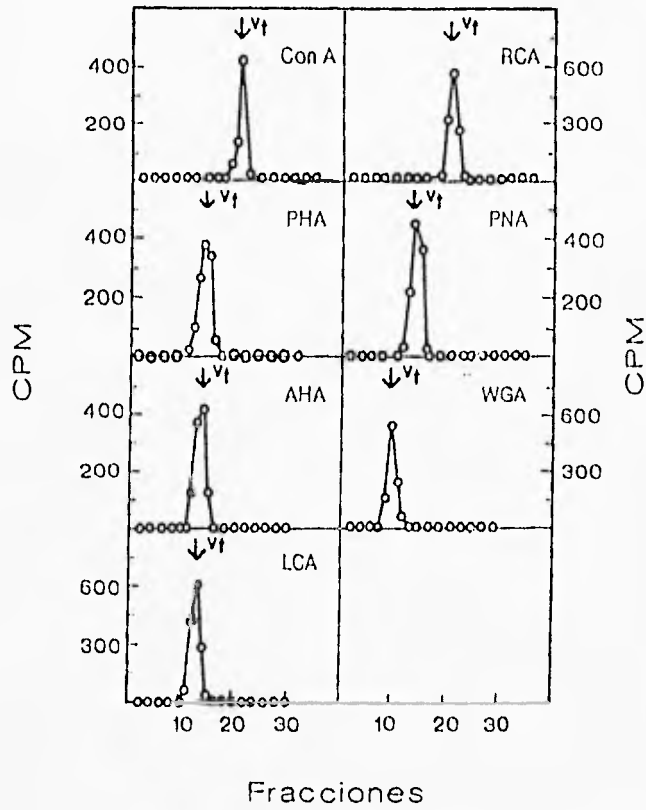


Figura 4. Cromatografía de afinidad con lectinas para el péptido obtenido por digestión de  $\beta$ -glucuronidasa y que contiene el marcador de reconocimiento. La fracción IIIA acetilada con [ $^{14}$ C] anhídrido acético, se cromatografió en cada una de las lectinas indicadas como se describe en Materiales y Métodos.

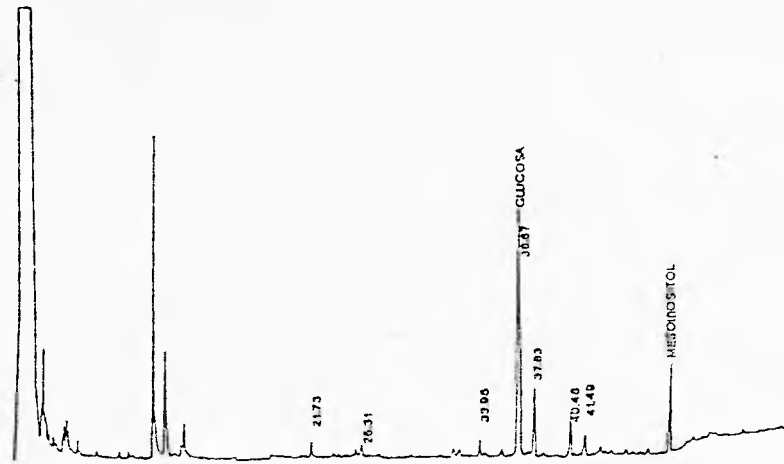


Figura 5. Espectro de resonancia magnética nuclear para carbohidratos. La fracción IIIA no adsorbida en las lectinas, fue analizada para su contenido de carbohidratos mediante resonancia magnética nuclear.

Al no encontrarse residuos glicosídicos en los péptidos purificados parcialmente, se analizó su composición de aminoácidos (péptidos IIIA y IVA). En ambos péptidos se detectó la presencia de 5 aminoácidos mayoritarios: ácido aspártico o asparagina, serina, glicina, ácido glutámico o glutamina y valina, así como trazas de otros aminoácidos (tabla V). Al comparar la cantidad relativa de los aminoácidos mayoritarios se observa que es similar para ambas fracciones, lo que sugiere que las diferencias son debidas a su peso molecular. Debemos recordar que la proteasa utilizada para hidrolizar la  $\beta$ -glucuronidasa bovina es altamente inespecífica por lo cual es de esperarse una heterogeneidad en el tamaño de los péptidos obtenidos. Por otra parte, con base en el tamaño de cada uno de los péptidos se puede suponer que el péptido IVA debe estar compuesto por dos o tres aminoácidos más el marcador que esta asociado con alguno de ellos y el péptido IIIA por tres o cuatro aminoácidos más el marcador, considerando que el marcador tiene un PM de 121 daltones (73). Sin embargo, en el análisis de aminoácidos se obtienen al menos 5 residuos mayoritarios diferentes, además de trazas de otros aminoácidos, lo que cuestiona la homogeneidad del péptido obtenido en cromatografía de exclusión molecular. La heterogeneidad de la fracciones fue confirmada al obtenerse un espectro de su resonancia magnética nuclear para protones. Así, como se observa en el espectro obtenido para el péptido IVA (Figura 6): a) hay una serie de contaminantes que no corresponden con aminoácidos, b) la heterogeneidad en la intensidad de las señales descarta que la muestra sea pura y c) se aprecian las señales de resonancia correspondientes a los grupos aminados propios de la glutamina y asparagina.

#### **ADSORCIÓN DEL PÉPTIDO QUE CONTIENE EL MARCADOR A UNA COLUMNA DE INTERCAMBIO IÓNICO**

Al no tener acceso a equipo de cromatografía líquida de alta resolución para poder purificar los péptidos que contienen el marcador de reconocimiento, se decidió utilizar resinas de intercambio iónico. Con el fin de encontrar el intercambiador iónico adecuado para adsorber de manera específica el péptido que contenga el marcador, el pico IIIA se ensayó en las siguientes resinas: Q-sefárosa (intercambiador aniónico fuerte), DEAE-Sefadex (intercambiador aniónico débil) y CM-celulosa (intercambiador catiónico débil), de las cuales solo la CM-celulosa es capaz de adsorber específicamente al péptido que contiene el marcador.

Al no tener suficiente muestra de esta fracción (péptido IIIA), ya no se pudo utilizar para subsiguientes análisis. El péptido IVA obtenido en columna de Sefadex G-10 se cromatografió en una columna de CM-Celulosa (1 x 15 cm) previamente equilibrada con amortiguador de acetato de sodio 5 mM, pH 5. Los péptidos adsorbidos fueron eluidos con 40 ml de un gradiente lineal de NaCl 0-0.2 M en amortiguador de acetato de sodio 5 mM, pH 5. La figura 7a muestra el perfil cromatográfico de el pico IVA en CM-celulosa monitoreado por densidad óptica a 230 nm. Las fracciones que corresponden al pico IVA1 y IVA2 se juntaron por separado, se liofilizaron y se desalaron. Dado que los resultados anteriores nos indicaron que el marcador no se encuentra en una cadena glicosídica, en los subsiguientes experimentos de inhibición únicamente se cuantificó la muestra por el método de fluorescamina. El ensayo de internalización para los picos IVA1 y IVA2 muestra que sólo el pico adsorbido IVA2 inhibe la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa bovina en un 79%, pero sólo inhibe la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa humana solamente un 7% (tabla VI). El pico IVA2 fue recromatografiado en columna de Sefadex G-10 (Fig 7b) y nuevamente se probó su capacidad para inhibir la

**TABLA V**  
**Contenido de aminoácidos para péptidos IIIA y IVA.**

Aminoácidos	Péptido IIIA		Péptido IVA	
	concentración (nmoles/ $\mu$ l)	cantidad relativa	concentración (nmoles/ $\mu$ l)	cantidad relativa
Aspartico y/o asparagina	0.161	1	0.079	1
Serina	0.276	2	0.143	2
Glutamico y/o glutamina	0.266	2	0.127	2
Glicina	0.477	3	0.244	3
Valina	0.772	5	0.060	<1
Leucina	0.025	<1	0.047	<1
Alanina	0.038	<1	0.062	<1
Lisina	0.059	<1	0.024	<1
Isoleucina	0.048	<1	0.019	<1
Histidina	0.033	<1	0.015	<1
Treonina	0.058	<1	0.044	<1

El análisis para conocer el contenido de aminoácidos de los péptidos IIIA y IVA fue realizado en el autoanalizador de aminoácidos del Instituto de Biotecnología de la UNAM.



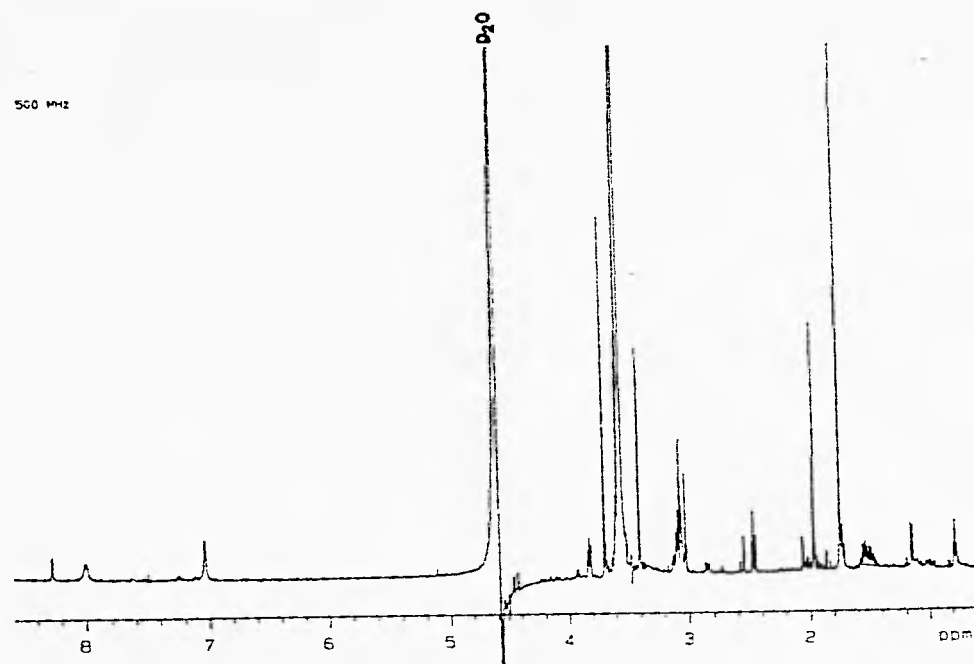


Figura 6. Espectro de resonancia magnética nuclear para protones del Péptido IVA. El péptido IVA resuspendido en agua deuterada fue analizado mediante H-NMR a 500 MHz, como se describe en Materiales y Métodos.

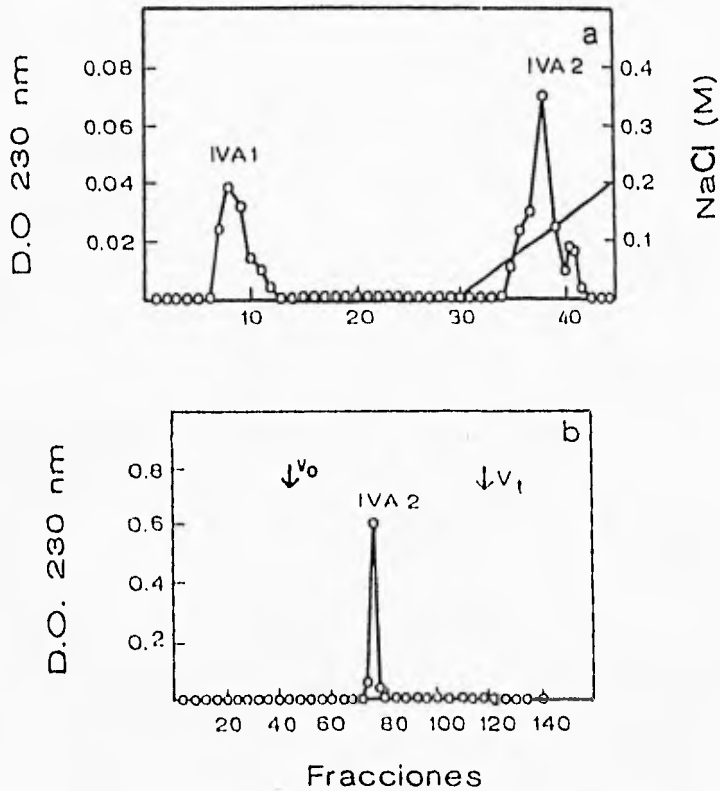


Figura 7. Purificación del péptido, que contiene el "nuevo" marcador de reconocimiento, obtenido por digestión de  $\beta$ -glucuronidasa bovina. a) Cromatografía de intercambio catiónico en CM-celulosa. El péptido IVA fue cromatografiado en una columna de CM-celulosa (1 x 14 cms) previamente equilibrada a temperatura ambiente con amortiguador de acetatos 5 mM, pH 5, a un flujo de 9 ml/hr y monitoreado por D.O. a 230 nm en fracciones de 1 ml. El péptido IVA2 adsorbido fue eluido con un gradiente lineal 0-0.2 M de NaCl en amortiguador de acetatos 5 mM, pH 5. b) Cromatografía de exclusión molecular. El péptido IVA2 fue cromatografiado en una columna de Sefadex G-10 (3 columnas de 1.6 x 90 cms unidas en serie) equilibradas a temperatura ambiente con agua milli Q a un flujo de 30 ml/hr y monitorado a 230 nm en fracciones de 5 ml.

**TABLA VI**  
**Capacidad inhibidora de los péptidos obtenidos por cromatografía de intercambio catiónico sobre la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa en fibroblastos humanos.**

Picos	Concentración total (nmoles) péptidos	Concentración inhibidor (nmoles) péptidos	Endocitosis % del control $\beta$ -glucuronidasa	
			bovina	humana
IVA1	800	35	100	100
IVA2	529	20	21	93

Se incubaron fibroblastos deficientes de  $\beta$ -glucuronidasa con 2,000 U de  $\beta$ -glucuronidasa bovina o humana en presencia de las cantidades indicadas de los péptidos obtenidos por cromatografía de intercambio catiónico (fig 7a). Después de 2 horas de incubación a 37°C las células fueron lisadas y ensayadas para la enzima asociada a la célula, como se describe en Materiales y Métodos.

endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa bovina. La tabla VII muestra un 92% de inhibición de la  $\beta$ -glucuronidasa bovina.

Se procedió a obtener el espectro de la resonancia magnética nuclear para protones del péptido IVA2 (Fig 8). Como se observa en el espectro ya no aparecen las señales correspondientes a glutamina, asparagina, con lo cual el número de aminoácidos presentes en esta fracción se reduce a serina y glicina. Además, hay un abatimiento considerable de contaminantes, y aunque aún se puede detectar, a una molécula contaminante semejante a Tris, se considera que el método de purificación aquí descrito permite obtener un péptido lo suficientemente puro como para proceder por medio de espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear a la caracterización del marcador.

Por último se estudió el efecto del péptido purificado en la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa bovina en fibroblastos humanos. Como se puede observar en la figura 9 el péptido actúa como un inhibidor competitivo de la endocitosis de la enzima, lo que sugiere una semejanza entre el marcador de reconocimiento presente en la  $\beta$ -glucuronidasa y el "inhibidor" presente en el péptido. Los valores obtenidos para la  $K_m$  de internación ( $2 \times 10^{-9}$  M) y para la  $V_{max}$  de endocitosis ( $1.1 \times 10^{-13}$  moles/mg/hr) son semejantes a reportados previamente para la endocitosis de esta enzima (72).

**TABLA VII**  
**Capacidad inhibidora de los péptidos IVA2 obtenidos por Cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía Sefadex G-10 sobre la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa en fibroblastos humanos.**

Pico	Concentración total (nmoles) péptidos	concentración inhibidor (nmoles) péptidos	Endocitosis % del control $\beta$ -glucuronidasa	
			bovina	humana
IVA2	200	10	8	94

Se incubaron fibroblastos deficientes de  $\beta$ -glucuronidasa con 2,000 U de  $\beta$ -glucuronidasa bovina o humana en presencia de 10 nmolas del péptido IVA2 obtenido en Sefadex G-10 (fig 7b). Después de 2 horas de incubación a 37°C las células fueron lisadas y ensayadas para la enzima asociada a la célula, como se describe en Materiales y Métodos.

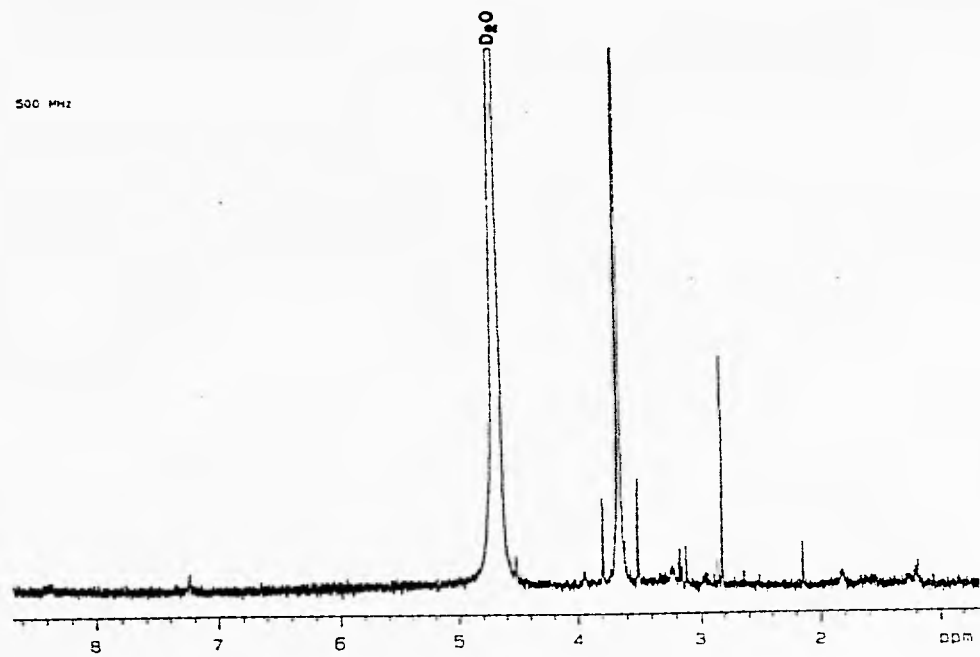


Figura 8. Espectro de resonancia magnética nuclear para protones del péptido IVA2. El péptido IVA2 resuspendido en agua deuterada fue analizado mediante H-NMR a 500 MHz, como se describe en Materiales y Métodos

1/ $\beta$ -glucuronidasa internalizada  
(mg/h/U X 10<sup>-2</sup>)

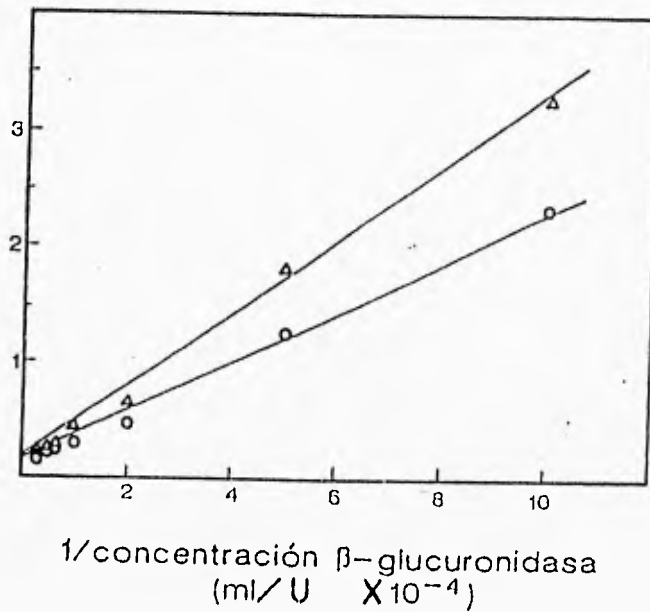


Figura 9. Efecto del péptido que contiene el "nuevo" marcador de reconocimiento en la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa bovina en fibroblastos humanos. Se incubaron Fibroblastos deficientes de  $\beta$ -glucuronidasa con las unidades indicadas de  $\beta$ -glucuronidasa de hígado bovino, en presencia ( $\Delta$ ) o ausencia (O) de 10 nmolas del péptido IVA2.

## DISCUSIÓN

González Noriega y col (72) demostraron la existencia de dos sistemas para la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa de hígado bovino en fibroblastos humanos en cultivo, uno reconoce a la señal de M6P mientras que el otro reconoce a un "nuevo" marcador de reconocimiento, el cual a pesar de los esfuerzos que se han hecho no ha podido ser caracterizado químicamente. Se han empleado enfoques previamente reportados en la literatura para poder conocer la composición química del "nuevo" marcador. Uno ha sido utilizar agentes que puedan alterar grupos funcionales específicos y el otro utilizar compuestos que actúen como inhibidores competitivos específicos del nuevo sistema de endocitosis. En este caso se parte de la base de que un inhibidor competitivo debe tener una estructura igual o muy similar al de la molécula que se investigue (28). Debido a que tanto en un caso como en el otro se obtuvieron resultados negativos, se optó por purificar el marcador y proceder a su identificación directa. Al asumir que el marcador pudiese estar presente en una cadena glicosídica, inicialmente se optó por liberar el marcador de reconocimiento de la cadena polipeptídica que lo contiene, para ello se partió de un extracto crudo de hígado bovino que se trató en condiciones alcalinas suaves con el fin de hidrolizar la unión O-ser/thr, enlace por el cual están unidas ciertas cadenas glicosídicas a las proteínas. Bajo estas condiciones se obtuvo una fracción soluble en etanol que contenía el marcador de reconocimiento. Con el fin de seguir al marcador durante su purificación se redujo con  $[^3\text{H}]$  borhidruro de sodio. Para la purificación del marcador se utilizaron una serie de columnas de matriz sintética como son las resinas de intercambio iónico Dowex y Amberlita o columnas de exclusión molecular P2. La presencia del marcador se detectó por su capacidad para inhibir la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa bovina en fibroblastos humanos (73). Aunque la muestra se purificó alrededor de 1,000 veces a partir del momento de su reducción con  $[^3\text{H}]$  borhidruro, el análisis por resonancia magnética nuclear para protones (H-NMR) no fue factible debido al alto contenido de contaminantes producto de la degradación natural de las columnas utilizadas. Sin embargo, se pudo concluir que la molécula purificada tiene un PM de 121 daltones y contiene grupos amino.

En este trabajo se describe un protocolo para la purificación de un péptido que contiene el "nuevo" marcador de reconocimiento. La estrategia seguida consistió en realizar modificaciones al método descrito por González-Noriega y col (73), para hacerlo menos laborioso y evitar en lo posible contaminaciones no controladas, así: a) Se cambió la fuente del marcador; en lugar de iniciar la purificación a partir de un extracto crudo de hígado bovino, se utilizó  $\beta$ -glucuronidasa bovina pura. b) Se eliminaron probables fuentes de contaminación, como las resinas sintéticas de Dowex, Amberlita y P2, ya que al hidrolizarse su matriz de manera azarosa se generan moléculas no predecibles con grupos amino, y diversos grupos aromáticos (86 a 88), por lo que estas resinas se cambiaron por resinas cuya matriz está formada por polímeros de glucosa, Sefadex y Celulosa (84), lo que nos permitió controlar el contaminante. c) Además, se utilizaron sales simples como cloruro de sodio y acetato de sodio en los amortiguadores, así, como agua con alto grado de pureza. d) Se evitaron compuestos que pudieran modificar la estructura química del marcador tales como, borhidruro de sodio, ácido clorhídrico e hidróxido de sodio. Para mantener la integridad química del marcador, este no se liberó de la cadena peptídica, para ello se utilizó una proteasa capaz de digerir la cadena peptídica sin liberar al



marcador. Se eligió la pronasa ya que aunque no corta específicamente y da péptidos heterogéneos, se sabe que donde existen grupos asociados a un aminoácido (por ejemplo, cadenas glicosídicas) la pronasa digiere hasta dejar alrededor de 3 o 4 aminoácidos, que en nuestro caso, son suficientes para mantener la integridad química del marcador (79). Otra ventaja de mantener el marcador en la cadena peptídica es que ésta se puede acoplar a Sefarosa para la purificación del receptor presente en las membranas de fibroblastos humanos, de igual manera se puede acoplar a una proteína acarreadora para obtener anticuerpos en contra del marcador y utilizarlos en columnas de afinidad para purificar, de manera más directa, al marcador. El uso de proteasas específicas como tripsina o quimiotripsina no se ha descartado ya que por ser la cadena peptídica más larga y homogénea se puede obtener su secuencia de aminoácidos, lo que permitiría la comparación con secuencias conocidas de otras enzimas lisosomales y poder determinar si estas presentan el "nuevo" marcador de reconocimiento que, hasta ahora sólo se conoce en la  $\beta$ -glucuronidasa bovina.

Como consecuencia de las modificaciones realizadas se tuvo que cambiar de igual manera el método para cuantificación y monitoreo del marcador. Se descartó el uso de métodos radioactivos para marcar los péptidos ya que en la técnica más utilizada, que es la de acetilación con [ $^{14}$ C] anhídrido acético, la reacción de acetilación puede ser altamente reversible debido a factores estéricos de los aminoácidos topológicamente adyacentes; además, los aminoácidos serina y treonina no son fácilmente acetilados debido a la presencia de grupos hidróxilo que son nucleófilos muy débiles (89). Entonces, se utilizó un método no invasivo para detectar los péptidos eluidos de las columnas al leer la adsorción a 230 nm que es la longitud de onda a la que adsorbe el enlace peptídico (90). Para los experimentos de competencia, inicialmente se cuantificó el contenido de carbohidratos en la muestra, pero al comprobar que la presencia de estos compuestos se debió a la glucosa que se desprendió de las columnas de Sefadex y agarosa, se tuvo que cuantificar la muestra con base en su contenido de aminos libres.

El protocolo que se estableció nos permitió la purificación de un péptido, obtenido por digestión de la  $\beta$ -glucuronidasa con pronasa y que contiene el marcador de reconocimiento para la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa de hígado bovino en fibroblastos humanos en cultivo. Básicamente se han utilizado dos métodos de cromatografía uno de filtración en gel y el otro de intercambio iónico. La capacidad de separación de Sefadex G-10 se trató de explotar al máximo alargando el tamaño de la columna, para ello se acoplaron en serie tres columnas. Gracias a este recurso se pudieron separar dos péptidos de aproximadamente 300 y 400 daltones (figs. 2d y 2e), cuya diferencia corresponde a un aminoácido. La comparación de la composición de aminoácidos de cada uno de ellos, con respecto al peso de cada péptido, nos indica que ninguno de los dos es puro. Sin embargo, cabe resaltar que en ambos péptidos hay un enriquecimiento para 5 aminoácidos mayoritarios: aspártico, serina, glicina, glutámico y valina, y que la cantidad relativa de estos aminoácidos mayoritarios es similar para ambos péptidos. La presencia de señales correspondientes a nitrógeno a la izquierda de la señal del agua deuterada en el análisis de H-NMR (fig. 6), sugiere que los grupos de aspártico y glutámico realmente corresponden a asparagina y glutamina ya que estos dos residuos en el autoanálisis de aminoácidos no se distinguen de los residuos de aspártico y glutámico. La señal correspondiente a estos dos aminoácidos no se observa en el espectro de H-NMR después

de que la muestra es adsorbida en la columna de intercambio catiónico (fig. 8), lo que sugiere que los péptidos que contienen estos grupos no son adsorbidos a la columna.

Si suponemos que la  $\beta$ -glucuronidasa bovina tiene un peso molecular de 300 kDa y el tamaño del péptido obtenido al final de la purificación es de 300 daltones, se puede pensar que el péptido obtenido se purificó aproximadamente 1000 veces. Por lo que, si comparamos el contenido de grupos amino de las fracciones II a V (Tabla I) con la cantidad obtenida para la fracción IVA2 (Tabla VII) se calcula que ésta representa un milésimo de la cantidad inicial, lo que sugiere que el péptido que contiene el "nuevo" marcador de reconocimiento fue prácticamente purificado, lo cual es apoyado con el espectro obtenido en el análisis de H-NMR (fig 8). Por otra parte, si comparamos la cantidad que se necesita de la fracción IV (tabla I) para obtener un 40% de inhibición con la cantidad utilizada después de la columna de CM-celulosa, se obtiene un valor de aproximadamente 30 veces. Este valor no coincide con el valor obtenido al calcular el número de veces que se purificó el péptido. Esta es una incongruencia aparente, ya que se debe tener en cuenta que no todas las moléculas de  $\beta$ -glucuronidasa bovina contienen el marcador de reconocimiento. Consistente con esta idea es el hecho de que para inhibir la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa bovina activa en fibroblastos humanos, se necesitaron añadir alrededor 6,000 veces la enzima desnaturalizada. En experimentos similares, se necesita añadir solo 200 veces un ligando para inhibir la endocitosis de otro ligando marcado con algún radioisótopo (28).

El péptido purificado realmente contiene el "nuevo" marcador de reconocimiento ya que: a) Inhibe competitivamente la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa de hígado bovino a fibroblastos humanos en cultivo (fig 9). b) Además, se ha acoplado este péptido a ovoalbúmina con el fin de obtener anticuerpos de conejo en su contra. Resultados preliminares, muestran que los anticuerpos obtenidos son específicos, ya que son capaces de reconocer y bloquear la endocitosis en fibroblastos humanos de  $\beta$ -glucuronidasa bovina, que es endocitada por el receptor que reconoce al "nuevo" marcador, pero no afectan la endocitosis de  $\beta$ -glucuronidasa humana que es endocitada por el receptor de 215 kDa que reconoce el marcador de M6P presente en esta enzima.

En base a evidencias indirectas como es el hecho de que el marcador puede ser liberado de la proteína por medio de una  $\beta$ -eliminación, la cadena liberada puede ser reducida con [ $^3$ H] borhidruro, da reacción positiva con fenol sulfúrico y por último, el marcador es parcialmente sensible a periodato, previamente se supuso que el "nuevo" marcador de reconocimiento estaba asociado a una cadena glicosídica (72). Sin embargo y contrariamente a lo esperado, en este trabajo se ha encontrado que el péptido obtenido no contiene ningún residuo de carbohidratos, como lo indica el análisis de resonancia magnética o su comportamiento en columnas de afinidad con lectinas que identifican cadenas glicosídicas. Estos resultados obligan a reinterpretar las observaciones previamente hechas. El marcador de reconocimiento puede ser liberado de la  $\beta$ -glucuronidasa bovina por  $\beta$ -eliminación en una molécula de aproximadamente 300 daltones, a este respecto desconocemos si la  $\beta$ -eliminación tiene algún efecto sobre la unión peptídica. En cuanto al borhidruro de sodio se sabe que además de reducir grupos cetoaminas, aldehidos y cetonas reduce también aminas secundarias presentes en aminoácidos como: asparagina, serina, treonina y cisteina (90). Por otra parte, en la reacción de Smith, que incluye oxidación con periodato y reducción con borhidruro no solamente son susceptibles aquellas moléculas como

carbohidratos que poseen dos alditoles contiguos, sino también moléculas en el que el alditol está contiguo a un aldehído una cetona un grupo amino o carboxílico (91). En forma alterna podemos sugerir que probablemente: a) El marcador en presencia de NaOH fue liberado contenido en un péptido y el borhidruro redujo algún residuo de aminoácido o bien al marcador. b) La presencia de el borhidruro como agente reductor permitió la reacción positiva al fenol-sulfúrico. c) La endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa bovina es parcialmente susceptible al tratamiento del marcador con la reacción de Smith, porque posiblemente el periodato hidrolizó la molécula en una región cercana a donde se encuentra el marcador o bien el propio marcador es parcialmente oxidado por la acción del periodato.

La purificación del péptido que contiene el nuevo marcador de reconocimiento para la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa bovina en fibroblastos humanos en cultivo permitirá conocer la naturaleza del marcador, a que grupo está asociado y la secuencia del péptido en que se encuentra. Estos resultados a su vez nos permitirán conocer si otras enzimas lisosomales tienen este marcador, su distribución organotrópica y en diferentes especies animales. Salvo los reportes hechos por los grupos de Hieber, von Figura y nuestro laboratorio en los que se ha descrito que la  $\beta$ -glucuronidasa bovina y de rata puede ser endocitada por sistemas alternos al de M6P (30, 71 y 72), la presencia del "nuevo" marcador de reconocimiento hasta ahora no ha sido reportado para otras enzimas lisosomales. Previamente se ha reportado que durante la purificación de la  $\beta$ -glucuronidasa de hígado bovino el marcador para M6P es hidrolizado en los primeros pasos de la purificación si la enzima se autodigiere a pH 6.8 y el nuevo marcador puede ser hidrolizado si la enzima se incuba a pH 5.5 (72), esto nos indica que las condiciones en que se purifican las enzimas lisosomales son determinantes para preservar uno u otro marcador, entonces, si consideramos que la mayoría de las enzimas lisosomales se purifican a pH 5.5, podríamos explicar porque el nuevo marcador no se ha detectado en estas.

Algunos, resultados previos del laboratorio muestran que: a) El "nuevo" marcador de reconocimiento presente en la  $\beta$ -glucuronidasa de hígado bovino, también se encuentra presente en la  $\beta$ -glucuronidasa de bazo bovino (72), lo que apunta a que no hay una distribución organotrópica del marcador. b) La  $\beta$ -glucuronidasa bovina es reconocida y endocitada por fibroblastos humanos (72), este sistema heterólogo sugiere que el receptor que reconoce al marcador de una enzima bovina también se encuentra en humanos. c) En una misma enzima coexiste tanto el marcador de M6P como el "nuevo" marcador (72). La existencia de dos señales diferentes, cuya función al parecer es la misma, hace pensar que en la célula existen sistemas redundantes pero independientes con el fin de asegurar que la función se lleve a cabo. Sin embargo, es probable que no haya duplicidad de funciones sino que cada señal puede actuar secuencialmente para transportar de un compartimiento a otro a las enzimas lisosomales. Si consideramos que el receptor para M6P se encuentra en Aparato de Golgi, membrana plasmática, prelisosomas pero no en lisosomas, y que no se conoce como son conducidas las enzimas de los prelisosomas a lisosomas, surge la siguiente interrogante, ¿existen otras señales como nuestro marcador para que las hidrolasas ácidas sean conducidas del compartimiento prelisosomal a el lisosoma?

### CONCLUSIONES

1. Se estableció un protocolo alterno para la purificación de un péptido que contiene un "nuevo" marcador de reconocimiento para la endocitosis de la  $\beta$ -glucuronidasa de hígado bovino en fibroblastos humanos, basado en digestión de la  $\beta$ -glucuronidasa de hígado bovino con pronasa, cromatografía de exclusión molecular en Sefadex G-25 y G-10 y cromatografía de intercambio catiónico en CM-celulosa.
2. Mediante el protocolo de purificación se logró purificar 1,000 veces un péptido de 300 daltones que contiene el "nuevo" marcador.
3. El "nuevo" marcador de reconocimiento no se encuentra en una cadena glicosídica.

## REFERENCIAS

1. Baiton DF. The discovery of lysosomes. *J cell Biol* 1981; 91:665-765
2. Kornfeld S. Trafficking of lysosomal enzymes. *FASEB J* 1987; 1:462-468
3. de Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R y Appelmans F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochem J* 1955; 60:604-617
4. Berthet J y de Duve C. Tissue fractionation studies. 1. The existence of a mitochondria-linked, enzymically inactive form of acid phosphatase in rat liver. *Biochem J* 1951; 50:174-181
5. Navikoff AB, Beaufay H y de Duve C. Electron microscopy of lysosomes-Rich fractions from rat liver. *J Biophys Biochem Cytol* 1956; 2:179-184
6. Strauss, W. Concentration of acid phosphatase, ribonuclease, deoxyribonuclease,  $\beta$ -glucuronidase, and cathepsin in "droplets" isolated from the kidney cells of normal rats. *J Biophys Biochem Cytol* 1956; 2:513-521
7. de Duve C y Wattiaux R. Functions of lysosomes. *Ann Rev Physiol* 1966; 28:435-492
8. Hers HG.  $\alpha$ -glucosidase deficiency in generalized glycogen-storage disease (Pompe's disease). *Biochem J* 1963; 86:11-16
9. Neufeld E F, Lim T W y Shapiro L J. Inherited disorders of lysosomal metabolism. *annu Rev Biochem* 1975; 44:357.
10. Neufeld EF y Cantz MJ. Corrective factors for inborn errors of mucopolysaccharide metabolism. *ann NY Acad Sci* 1971; 179:580.
11. Bach G, Friedman R, Weissmann B y Neufeld EF. The defect in the Hurler and Scheie syndromes-Deficiency of  $\alpha$ -L-iduronidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; 69:2048-2051
12. Bach G, Einsenberg F Jr, Cantz M y Neufeld EF. The defect in the Hunter syndrome: Deficiency of sulfoidurinate sulfatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70:2134-2138
13. Desnick RJ, Thorpe SR y Fiddler MB. Toward enzyme therapy for lysosomal storage diseases. *Physiol rev* 1976; 56:57
14. Palade GE. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 1975; 189:347-358
15. Navikoff AB, Essner E y Quintana N. Golgi Apparatus and lysosomes. *Fed Proc* 1964; 23:1010-1022
16. Goldstone A, Koenig H, Nayyar R, Hughes C y Lu CY. Isolation and characterization of a rough microsomal fraction from rat kidney that is enriched in lysosomal enzymes. *Biochem J* 1973; 132:259-266
17. Hickman S y Neufeld EF. A hypothesis for I-cell disease: Defective hydrolases that do not enter lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 1972; 49:992
18. Lloyd JB. Cellular transport of lysosomal enzymes: An alternate hypothesis. *Biochem J* 1977; 164:281-282
19. Glaser JH, Roozen KJ, Brot FE y Sly WS. Multiple isoelectric and recognition forms of human  $\beta$ -glucuronidase activity. *Arch Biochem Biophys* 1975; 166:536-542
20. von Figura K y Weber I. An alternative hypothesis of cellular transport of lysosomal enzymes in fibroblasts. *Biochem J* 1978; 176:943-950

21. Morell AG, Gregoriadis G, Scheinberg IM, Hickman J y Ashwell G. The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. *J Biol Chem* 1971; 246:1461-1467
22. Ashwell G y Morell HG. The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. *Adv Enzymol* 1974; 41:99
23. Hickman S, Shapiro LJ y Neufeld EF. 1974. A recognition marker required for uptake of a lysosomal enzyme by cultured fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1974; 57:55-61
24. Hieber V, Distler J, Myerowitz R, Schmickel RD y Jourdan GW. 1976. The role of glycosidically bound mannose in the assimilation of  $\beta$ -galactosidase by generalized gangliosidosis fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 73:710
25. Sly WS, Fischer D, González-Noriega A, Grubb JH y Natowicz M. Role de 6-phosphomannosyl-enzyme receptor in intracellular transport and adsorptive pinocytosis of lysosomal enzymes. *Meth Cell Biol* 1981; 23:191-213
26. Ballou CE. Some aspects of the structure, immunochemistry and genetic control of yeast mannan. *Adv Enzymol* 1974; 40:239-265
27. Kaplan A, Achord DT y Sly WS. Phosphohexosyl components of a lysosomal enzyme are recognized by pinocytosis receptors on human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74:2026-2030
28. Sando GN y Neufeld EF. Recognition and receptor-mediated uptake of a lysosomal enzyme  $\alpha$ -L-iduronidase by cultured human fibroblasts. *Cell* 1977; 12:619-627
29. Kaplan A, Fischer D, Achord DT y Sly WS. Phosphohexosyl recognition: A general characteristic of pinocytosis of lysosomal glycosidases by human fibroblasts. *J Clin Invest* 1977; 60:1088
30. Ullrich K, Mersmann G, Weber E. y von Figura K. Evidence for lysosomal enzyme recognition by human fibroblasts via phosphorylated carbohydrate moiety. *Biochem J* 1978; 170:643-650
31. González-Noriega A, Grubb JH, Talkad V y Sly WS. Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling. *J Cell Biol* 1980; 85:839-852
32. Kornfeld S. Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states. *J Clin Invest* 1986; 77:1-6
33. Walter P, Gilmore R y Blobel G. Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Cell* 1984; 38:5-8
34. Gilmore R, Walter P y Blobel G. Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal particle receptor. *J Cell Biol* 1982; 96:470
35. Meyer DI, Krause E y Dobberstein B. Secretory protein translocation across membranes: the role the "docking protein". *Nature* 1982; 297:647-650
36. Kornfeld R y Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann Rev Biochem* 1985; 54: 631-664
37. von Figura K y Hasilik A. Lysosomal enzymes and their receptors. *Ann Rev Biochem* 1986; 55:167-193
38. Jamieson JD y Palade GH. Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. IV. Metabolic requirements. *J Cell Biol* 1968; 39:589-603

39. Farquhar MG y Palade GH. The Golgi Apparatus (complex)-(1954-1981)-from artefact to center stage. *J Cell Biol* 1981; 91:775-1035
40. Reitman ML y Kornfeld S. Lysosomal enzyme targeting: N-acetylglucosaminylphosphotransferase selectively phosphorylates native lysosomal enzymes. *J Biol Chem* 1981; 256:11977-11980
41. Lang L, Reitman ML, Tang J, Roberts RM y Kornfeld S. Lysosomal enzyme phosphorylation. Recognition of a protein-dependent determinant allows specific phosphorylation of oligosaccharides present on lysosomal enzymes. *J Biol Chem* 1984; 259:14663-14671
42. Brown WJ, Constantinescu E y Farquhar MG. Redistribution of mannose-6-phosphate receptors induced by tunicamycin and chloroquine. *J Cell Biol* 1984; 99:320-326
43. Vladutiu GD. Effect of the co-existence of galactosyl and Phosphotannosyl residues on  $\beta$ -hexosaminidase on the processing and transport of the enzyme in mucopolipidosis I fibroblasts. *Biochem Biophys Acta* 1983; 760:363-370
44. Fedde KN y Sly WS. Ricin binding properties of acid hydrolases from isolated lysosomes implies prior processing by terminal transferases of the *trans* Golgi Apparatus. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 133:614-620
45. Duncan J y Kornfeld S. Intracellular movement of two mannose 6-phosphate receptors: return to the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 1988; 106:617-628
46. Geuze HJ, Slot JW, Strous GJAM, Hasilik A y von Figura K. Possible pathways for lysosomal enzyme delivery. *J Cell Biol* 1985; 101:2253-2269
47. Brown WJ, Goodhouse J y Farquhar MG. Mannose-6-phosphate receptors for lysosomal enzymes cycle between the Golgi complex and endosomes. *J Cell Biol* 1986; 103:1235-1247
48. Lagunoff D, Nicol DN y Pritze P. Uptake of  $\beta$ -glucuronidase by deficient human fibroblasts. *Lab Invest* 1973; 29:449-453
49. Sly WS y Sthial P. Receptor-mediated uptake of lysosomal enzymes, en: transport of molecules in cellular systems. Silverstein, S. ed. Dahlem conferenzen, Berlin 1979; 229-244.
50. Rome LH, Weissmann B y Neufeld EF. Directe demonstration of binding of a lysosomal enzyme  $\alpha$ -L-iduronidase to receptors on cultured fibroblasts. *Proc Natl Aca Sci USA* 1979; 76:2331-2334
51. Lobel P, Dahms NM, Breitmeyer J, Chirgwin JM y Kornfeld S. Cloning of the bovine 215-kDa cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *Proc Natl Aca Sci USA* 1987; 84:2233-2237
52. Dahms NM, Lobel P, Breitmeyer J, Chirgwin JM y Kornfeld S. 46 kD mannose 6-phosphate receptor: cloning, expression and homology to the 215 kD mannose 6-phosphate receptor. *Cell* 1987; 50:181-192
53. Hoflack B, Fujimoto K y Kornfeld K. The interaction of phosphorylated oligosaccharides and lysosomal enzymes with bovine liver cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 1987; 262:123-129
54. Dahms NM, Lobel P y Kornfeld S. Mannose 6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting. *J Biol Chem* 1989; 264:12115-12118

55. Kornfeld S. Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu Rev Biochem* 1992; 61:307-330
56. Gabel CA, Goldberg DE y Kornfeld S. Identification and characterization of cells deficient in the mannose 6-phosphate receptor: evidence for an alternate pathway for lysosomal enzyme targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 775-779
57. Nolan CM, Creek KE, Grubb JH, y Sly WS. Antibody to the phosphomannosyl receptor inhibits recycling of receptor in fibroblasts. *J Cell Biochem* 1987; 35:137-151
58. Stein M, Zijderhand-Bleekemolen JE, Geuze H, Hasilik A y von Figura K. Mr 46,000 mannose 6-phosphate specific receptor: Its role in targeting of lysosomal enzymes. *EMBO J* 1987; 6:2677-2681
59. Kyle JW, Nolan CM, Oshima A y Sly WS. Expression of human cation-independent mannose 6-phosphate receptor cDNA in receptor-negative mouse P388D1 cells following gene transfer. *J Biol Chem* 1988; 263:16230-16235
60. Lobel P, Fujimoto K, Ye RD, Griffiths G y Kornfeld S. Mutations in the cytoplasmic domain of the lysosomal enzyme sorting and endocytosis. *Cell* 1989; 57:787-796
61. Morgan DO, Edman JC, Standing DN, Fried VA, Smith MC, Noth RA y Rutter J. Insuline-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature* 1987; 329:301-307
62. Tong PY, Tollefsen SE y Kornfeld S. The cation-independent mannose 6-phosphate receptor binds insulin-like growth factor II. *J Biol Chem* 1988; 263:2585-2588
63. Waheed A, Braulke T, Junghans U y von Figura K. Mannose 6 Phosphate/insulin like growth factor receptor: the two types of ligands binds simultaneously to one receptor a diferent sites. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 152:1248-1254
64. Kiess W, Blickenstaff GD, Sklar MM, Thomas CL, Nissley SP y Sahagian GG. Biochemical evidence that the type II insulin-like growth factor receptor is identical to the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 1988; 263:9339-9344
65. Oka Y, Rozek LM y Czech MP. Direct demonstration of rapid insulin-like growth factor II receptor internalization and recycling in rat adipocytes. *J Biol Chem* 1985; 260:9435
66. Owada M y Neufeld EF. Is there a mechanism for introducing acid hydrolases into liver lysosomes that is independent of mannose 6-phosphate recognition? Evidence from I cell disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 105: 814-820
67. Waheed A, Pohlman R, Hasilik A, von Figura K, Van Elsen A, Leroy JG. Deficiency of UDP-N-acetylglucosamine: Lysosomal enzyme N-acetylglucosamine I phosphotransferase in organs of I-cell patients. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 105:1052-1058.
68. Lemansky P, Gieselmann V, Hasilik A, y von Figura K. Synthesis and transport of lysosomal acid phosphatase in normal and I cell fibroblasts. *J Biol Chem* 1985; 260:9023-9030
69. Rijnbout S, Kal AJ, Geuze HJ, Aerts H y Strous GJ. Mannose 6-phosphate-independent targeting of cathepsin D to lysosomes in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1991; 266: 23586-23592
70. Glickman JN y Kornfeld S. Mannose 6-phosphate-independent targeting of lysosomal enzymes in I-cell disease B lymphoblasts. *J cell Biol* 1993; 123:99-108



71. Hieber V, Distler J, Myerowitz R, Schmickel R D y Jourdian GW. Selective, noncompetitive assimilation of bovine testicular  $\beta$ -galactosidase and bovine liver  $\beta$ -glucuronidase by generalized gangliosidosis fibroblasts. *J Clin Invest* 1980; 65:879-884.
72. González-Noriega A, Coutiño R, Saavedra VM, y Barrera R. Adsorptive endocytosis of lysosomal enzymes by human fibroblasts: presence of two different functional systems that deliver an acid hydrolase to lysosomes. *Arch Biochem Biophys* 1989; 268: 649-658.
73. González-Noriega A, Ferrara P, Coutiño R y Michalak C. Isolation of an inhibitor for the independent mannose 6-phosphate receptor endocytosis of bovine  $\beta$ -glucuronidase by human fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 1993; 306: 331-336
74. Himeno M, Hashiguchi Y y Kato K.  $\beta$ -glucuronidase of bovine liver: Purification, properties, carbohydrate composition. *J Biochem* 1974; 76:1243-1252
75. González-Noriega A y Michalak C. Comunicación personal.
76. Natowicz MR, Chi MM, Lowry OH y Sly WS. Enzymatic identification of mannose 6-phosphate on the recognition marker for receptor-mediated pinocytosis of  $\beta$ -glucuronidase by human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:4322-4326
77. Glaser JH y Sly WS.  $\beta$ -glucuronidase deficiency mucopolysaccharidosis, methods for enzymatic diagnosis. *J Lab Clin Med* 1973; 82: 969-977
78. Lowry OH, Roselrough NJ, Farr AL y Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275
79. Beeley JG. Glycoprotein and proteoglycan techniques. Amsterdam: Elsevier, 1985: 462 pp
80. Pharmacia Fine Chemicals. Affinity chromatography: principles&methods. 112pp
81. Narasimhan S, Harpaz, N, Longmore G, Carver JC, Grey AA y Schachter. Control of Glycoprotein synthesis: The purification by preparative high voltage paper electrophoresis in borate of glycopeptides containing high mannose and complex oligosaccharide chains to asparagine. *J Biol Chem* 1980; 225:4876-4884
82. Böhlen P, Stein S, Dairman W y Udenfriend S. Fluorometric Assay of proteins in the nanogram range. *Arch Biochem Biophys* 1973; 155:213-220
83. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA y Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 1956; 28:350-356
84. Pharmacia fine chemicals. Gel filtration chromatography: principles&methods.
85. Merkle RK y Cummings RD. Lectin affinity chromatography of glycopeptides. *Meth Enzy* 1987; 138:232-259
86. Bio Rad laboratories. A laboratory manual on ion exchange. USA. 1971: 39 pp
87. Rohm and Haas Co. Ion exchange and polymeric adsorption technology in medicine, nutrition, and the pharmaceutical industry. USA. 1975: 27pp
88. Bio Rad Laboratories. A laboratory manual on gel chromatography. USA. 1975: 90 pp
89. Means G E y Feeny R E. Chemical modification of proteins. San Francisco California:Holden-Day, 1971: 254 pp
90. Barker R. Organic chemistry of biological compounds. New Jersey: Prentice Hall, 1971: 374 pp.
91. Flückiger R y Gallop PM. Measurement of nonenzymatic protein glycosylation. *Meth Enzy* 1984. 106:77-87.