

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

**BIOSÍNTESIS, TRANSPORTE Y
COMPARTIMENTACIÓN
DEL RECEPTOR 78 kDa INVOLUCRADO EN EL
TRANSPORTE INTRACELULAR DE ENZIMAS
LISOSOMALES**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

Q.F.B. DANIEL DAGOBERTO ORTEGA CUELLAR

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALFONSO GONZÁLEZ NORIEGA

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 2004





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
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de la Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 2 de junio del 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) **Ortega Cuellar Daniel Dagoberto**, con número de cuenta 501093587, con la tesis titulada: **"Biosíntesis, transporte y compartimentación del receptor 78 kDa involucrado en el transporte intracelular de enzimas lisosomales"**, bajo la dirección del(a) **Dr. Alfonso González Noriega**.

Presidente:	Dra. María Isabel Soto Cruz
Vocal:	Dr. Raúl Barrera Rodríguez
Secretario:	Dr. Alfonso González Noriega
Suplente:	Dr. Alfonso León del Río
Suplente:	Dr. Luis Felipe Jiménez García

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 06 de agosto de 2004.


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

**Este trabajo fue realizado con el apoyo de una beca de Maestría del CONACyT.
El comité tutorial estuvo integrado por los Doctores: Alfonso González Noriega,
Raúl Barrera Rodríguez y Alfonso León del Río.**

El presente trabajo fue realizado en el departamento de Biología Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Alfonso González Noriega.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de Tesis por todos las sus enseñanzas, amistad y confianza, pero sobre todo el apoyo personal brindado durante mi estancia en su laboratorio.

A la Bióloga Collet Michalack, por su todas su amistad y sus enseñanzas, sobre todo en el manejo de los cultivos celulares.

A los revisores de tesis por participar con gran interés en la revisión.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
Transporte de hidrolasas ácidas.....	4
Incorporación del marcador de reconocimiento a las enzimas lisosomales.....	7
Especificidad de la fosfotransferasa.....	10
Receptores Man 6-P (MPRs).....	11
El CI- MPR.....	11
El MPR-46.....	12
Transporte intracelular de los MPRs.....	13
Transporte de proteínas membranales del lisosoma.....	15
Mecanismo de transporte independiente de Man 6-P.....	17
Justificación.....	20
OBJETIVO GENERAL.....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
I. Cultivos celulares.....	22
II. Obtención de anticuerpos.....	22
III. Marcaje Metabólico.....	22
IV. Fraccionamiento Subcelular.....	23
V. Ensayos enzimáticos	23
VI. Identificación de vesículas endocíticas.....	24
VII. Rompimiento selectivo de lisosomas.....	25
VIII. Efecto de drogas en cultivos celulares.....	25
IX. Inmunoprecipitación	26
X. Electrofóresis.....	26
XI. Inmunotransferencia.....	26
RESULTADOS.....	28
Identificación del receptor 78/72 kDa por inmunotransferencia.....	28

Biosíntesis del receptor 78/72 kDa.....	31
Identificación de organelos por fraccionamiento subcelular.....	34
Localización del intracelular del receptor 78 kDa.....	37
Transporte intracelular del receptor 78 kDa sintetizado de novo.....	40
Localización del receptor 78 kDa, en cultivos celulares tratados con NH ₄ Cl.....	46
DISCUSIÓN.....	47
CONCLUSIÓN.....	57
REFERENCIAS.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

- Å : Ángstrom
- BSA: Albumina Sérica Bovina
- cDNA : Ácido desoxiribonucleico complementario
- CD-MPR: Receptor para manosa 6-fosfato dependiente de cationes
- CI-MPR: Receptor para manosa 6-fosfato independiente de cationes
- DMSO: Dimeíl sulfóxido
- EDTA: Acido etilendiaminico tetracético
- Gly- Tyr: Glicina-Tirosina
- GPN: Glicil-L-fenilalanina 2-naftilamida
- HepG2: Linea celular de hematoma humano
- HRPasa: Peroxidasa de hidrogeno de rabano
- ILeu: Isoleucina
- LAMPs: Proteínas asociadas de la membrana del lisosoma
- Lamp-1: Proteína asociadas de la membrana del lisosoma 1
- Lamp-2: Proteína asociadas de la membrana del lisosoma 2
- LAP: Fosfatasa ácida lisosomal
- Leu: Leucina
- Limps: Proteínas integrales de la membrana del lisosoma.
- Limp I: Proteína integral de la membrana del lisosoma I
- Limp II: Proteína integral de la membrana del lisosoma II
- Man 6-P: Manosa 6-fosfato
- MPRs: Receptores para manosa 6-fosfato
- NH₄Cl: Cloruro de amonio
- Rb421: Anticuerpo producido en conejo 421
- RER: Retículo endoplásmico rugoso
- SDS: Duodecil sulfato de sodio
- SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida
- SPN: Sobrenasandante post-nuclear
- TGN: Red trasn del Golgi

RESUMEN

Para que una enzima lisosomal sea transportada desde su sitio de síntesis hasta lisosomas requiere de la presencia de marcadores de reconocimiento en la enzima y de receptores membranales específicos que reconocen esta señal. Uno de estos marcadores es el de manosa 6-fosfato (Man 6-P) que es reconocido por el receptor para manosa 6-fosfato independiente de cationes (CI-MPR), cuya función es la de transportar a las enzimas lisosomales solubles desde el complejo de Golgi a endosomas tardíos, o bien desde la membrana plasmática a endosomas tempranos. En ambos casos, en los endosomas se disocia el complejo ligando-receptor, las enzimas lisosomales siguen su ruta hacia los lisosomas y el receptor regresa a su compartimento subcelular de origen para iniciar otra ronda de transporte.

En los últimos 20 años se han reportado evidencias que indican que las células poseen mecanismos alternos para el transporte de hidrolasas al lisosoma, en el que estarían involucrados otros receptores que reconocerían marcadores diferentes al de Man 6-P. Recientemente se ha encontrado una nueva señal de reconocimiento que reside en la cadena peptídica de la enzima que se tomó como modelo. La señal es un tripéptido Ser-TrpX-Ser (donde X puede ser un metilo o un amino), que es reconocido por un receptor membranal de 78 kDa, del que hasta ahora se sabe que su función es endocitar enzimas lisosomales. Al parecer este receptor 78 kDa no sufre modificaciones postraduccionales, como cortes proteolíticos en su cadena peptídica o adición de oligosacáridos. Por otra parte se sabe que su unión al ligando es dependiente de cationes divalentes, de pH y temperatura.

Es un principio aceptado que el enriquecimiento de un determinado receptor transportador en ciertos organelos específicos, indica la posible ruta que sigue la proteína transportadora. De esta forma, por medio de fraccionamiento subcelular en gradientes de Percoll así como por métodos de pulso y caza, se determinó su localización intracelular y ruta de transporte; encontrándose que alrededor de 40-50% de receptor se localiza en una fracción que es un poco más densa que la fracción donde se localizan los lisosomas.

Al estudiar la ruta de transporte que sigue el receptor 78 kDa, encontramos que después de que es sintetizado en retículo endoplásmico, se transporta al Golgi. El tiempo de vida media de transporte del retículo endoplásmico fue de 5 minutos y sugiere que llega rápidamente a Golgi. Desafortunadamente no se pudo establecer

con exactitud su tiempo de llegada y de salida en Golgi, en primer lugar porque con la metodología utilizada no se puede separar Golgi de endosomas tempranos, además de que no sufre modificaciones postraduccionales (glicosilación y cortes aparentes en cadena polipeptídica). Sin embargo no obstante, a lo anterior se puede intuir que después de que el receptor 78 kDa deja al Golgi, este es distribuido en tres compartimentos endocíticos: membrana plasmática, endosoma temprano y endosoma tardío. Como se observó, la máxima cantidad del receptor detectada en la membrana plasmática fue de aproximadamente 28% en un tiempo de 120 minutos después de la biosíntesis, con una vida media de 40 minutos. Tomando en cuenta que la cantidad del receptor en la membrana plasmática en estado de equilibrio es de aproximadamente 5%, sugiere que es primero transportado a los endosomas tempranos y tardíos antes de alcanzar a la membrana plasmática, y una vez que llega al equilibrio recicla con los compartimentos internos.

Por último, se sabe que aminas tal como el cloruro de amonio, afectan el transporte anterogrado o retrógrado de proteínas entre dos compartimentos. En el caso del receptor 78 kDa se encontró que en presencia de aminas deja a las vesículas de alta densidad para concentrarse en Golgi y/o endosomas tempranos (estas dos fracciones no se han podido separar), en endosomas tardíos y en la membrana plasmática. Es decir las aminas tienden a bloquear el flujo intravesicular anterogrado para el receptor 78 kDa. En su conjunto todos estos resultados permiten concluir que el nuevo receptor podría estar transportando a las enzimas lisosomales desde Golgi a endosomas o desde la membrana plasmática a endosomas.

No obstante a todas estas evidencias de un nuevo sistema para el transporte de enzimas lisosomales, aún falta por demostrar en que compartimento el ligando se une al receptor, entre que compartimentos ocurre el transporte y la descarga de los ligandos. Además de demostrar la naturaleza y función que tienen las vesículas de alta densidad.

INTRODUCCIÓN

En los años 50's De Duve *et al.*, [1] describieron a los lisosomas como vesículas que contienen enzimas hidrolíticas cuyo pH óptimo es ácido (4.8-5.2). Estas vesículas contienen alrededor de 50 hidrolasas ácidas entre las que se encuentran: fosfatasas, nucleasas glicosidasas, proteasas, sulfatasas y lipasas; que están separadas de otros componentes citoplasmáticos por medio de una membrana lisosomal. Esta membrana: evita el paso de las hidrolasas ácidas al citoplasma, contiene una bomba para transportar protones, (manteniendo su concentración en estas vesículas tres órdenes de magnitud mayor que en el citoplasma) y es selectiva a los compuestos primarios provenientes de las macromoléculas que son degradadas dentro de la vesícula [2].

Los lisosomas tienen la capacidad de hidrolizar casi cualquier tipo de partícula (macromolécula) biológica extracelular, capturada por la célula por endocitosis, o bien intracelular por autofagia (el proceso autofágico se incrementa cuando la célula es sometida a ayuno prolongado). Las macromoléculas que son degradadas pueden ser desde cadenas lipídicas, glicosídicas, de ácidos nucleicos o proteicas y le permite a la célula obtener un aporte adicional de nutrientes. [3].

Una célula puede contener varios cientos de vacuolas lisosomales, las cuales son variables en tamaño, forma y contenido. La apariencia del lisosoma refleja la naturaleza del material que contiene y que está en proceso de digestión; en ellos se pueden observar desde materiales recién ingeridos, cuyo origen puede ser fácilmente reconocido, hasta residuos que no pueden ser digeridos. A diferencia de otros organelos subcelulares, los lisosomas no pueden identificarse por criterios morfológicos habituales de tamaño, forma y estructura interna ya que en su interior no se detecta ninguna estructura fina. Complica aún más la identificación de estas vesículas la presencia de otros organelos celulares conocidos como "organelos relacionados a lisosomas" tales como gránulos líticos, cuerpos densos de plaquetas, melanosomas, etc. De esta heterogeneidad morfológica se desprende que los lisosomas al igual que otras vesículas intracelulares, solamente pueden identificarse si se utilizan marcadores específicos [4].

La diversidad de funciones en las que está involucrado el lisosoma hace que el estudio de este organelo celular sea relevante *per se*. Sin embargo, su estudio cobra

otro grado de importancia si se toma en cuenta el número y heterogeneidad de enfermedades descritas relacionadas a alteraciones: en la función y biogénesis de los lisosomas o de las enzimas y elementos que modulan la función enzimática. Hasta el momento se han descrito más de 30 errores innatos del metabolismo en los que hay una deficiencia de una enzima lisosomal; así como un número creciente de errores innatos del metabolismo en los que hay un defecto en el transporte o compartimentalización de una o varias de estas enzimas, o bien de componentes de la membrana lisosomal [5]. Así mismo, se han descrito una variedad de enfermedades en las que hay una alteración en la función lisosomal debido a fármacos. Por último, cada día cobra mayor importancia el estudio de los mecanismos de escape de parásitos intracelulares (*Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella*, *Listeria*, *Salmonella*, etc.) que residen en el fagolisosoma de monocitos y macrófagos. Se piensa que estos al alterar el tráfico intracelular de proteínas específicas relacionadas con la función o biogénesis del lisosoma, crean un microambiente que les permite sobrevivir dentro de éste organelo [6, 7].

TRANSPORTE INTRACELULAR DE HIDROLASAS ÁCIDAS

Desde el descubrimiento de los lisosomas por el grupo de De Duve alrededor de 1950, ha habido avances importantes en el conocimiento de su estructura, propiedades y función. Sin embargo, muchos de los mecanismos involucrados en su biogénesis, aún no son bien entendidos. Los primeros estudios sugirieron que los lisosomas se generaban directamente del complejo de Golgi, como lisosomas primarios (vesículas que no contienen sustratos) y que posteriormente se fusionaban con vesículas que contienen sustratos para formar a los lisosomas secundarios o maduros [1], hoy en día ésta visión funcional ha caído en desuso. Los conocimientos adquiridos en esta área permiten afirmar: que los componentes lisosomales (proteínas membranales e hidrolasas ácidas) son transportadas en vesículas recubiertas por clatrina desde complejo de Golgi a los endosomas tardíos y desde aquí a los lisosomas. Sin embargo, hay una controversia sobre el mecanismo de transferencia de componentes desde endosomas a lisosomas, no se sabe si es por medio de un transporte vesicular o por un proceso de fusión-fisión de endosomas y lisosomas [8]. Lo cierto es, que cualquiera que sea el modelo más cercano a la realidad, la célula

debe poseer mecanismos para: a) transportar a los diferentes elementos que componen al lisosoma; es decir, los componentes que forman parte de su membrana y los elementos solubles, b) segregar a las proteínas lisosomales del resto de proteínas sintetizadas por la célula y c) retener en el lisosoma a los elementos lisosomales.

Históricamente el estudio de fibroblastos provenientes de pacientes con la enfermedad de células "I" (Mucopolidosis II) ha jugado un papel importante en el conocimiento de los mecanismos involucrados en la segregación y transporte de las hidrolasas ácidas a los lisosomas. Este tipo de pacientes se distinguen por tener una serie de malformaciones, retraso mental y elevados niveles de enzimas lisosomales en suero; estas alteraciones producen la muerte del individuo a los 2-3 años de edad [9]. Inicialmente, el grupo de la Dra. Neufeld al realizar estudios de complementación metabólica observaron que los niveles de hidrolasas ácidas de fibroblastos en cultivo de estos pacientes estaban drásticamente reducidos; por el contrario los niveles extracelulares eran anormalmente elevados y que las hidrolasas secretadas por fibroblastos normales podían ser recapturadas (endocitadas) de igual manera por fibroblastos de células "I" que por fibroblastos normales; en tanto las hidrolasas lisosomales secretadas por fibroblastos de células "I", no podían ser endocitadas por ningún tipo de fibroblasto [10]. Estos resultados, permitieron proponer: a) la existencia de un "marcador de reconocimiento común" en las enzimas lisosomales, que permitían su compartimentación, así como de receptores específicos en la membrana plasmática para su recaptura. Este marcador estaba ausente en enzimas lisosomales de fibroblastos obtenidos de pacientes con la enfermedad de células "I" b) la segregación de enzimas ocurría extracelularmente, es decir; que las hidrolasas ácidas eran normalmente secretadas al medio extracelular y luego endocitadas por un receptor a los fibroblastos para que finalmente llegaran a los lisosomas. Este mecanismo para la segregación de proteínas fue conocido como hipótesis "secreción-recaptura" [10].

Posteriormente, von Figura y Weber [11] realizando estudios de inmunocitoquímica propusieron una hipótesis alterna para el transporte de las hidrolasas ácidas, en dicha hipótesis se sugería que una vez que las enzimas lisosomales eran transportadas a la membrana plasmática unidas a su receptor, el complejo ligando-receptor formado

debería ser transportado a los lisosomas. En cambio en las células "I", como el defecto residía en la incapacidad de incorporar un marcador de reconocimiento a las enzimas lisosomales, estas eran transportadas a la superficie celular en forma soluble por lo que eran secretadas al medio externo y al no ser reconocidas por su receptor, no podían ser recapturadas. Esta hipótesis fue apoyada por el hecho de que, anticuerpos en contra de hexosaminidasa era detectada en la membrana plasmática de fibroblastos de humanos normales que podía ser liberada con tripsina suave.

En la búsqueda de la naturaleza del marcador de reconocimiento, Hickman *et al.*, [12] sugirieron que los carbohidratos formaban parte de este marcador, ya que el tratamiento de la hexosaminidasa con periodato, inactivaba su endocitosis sin afectar su actividad catalítica. Por su parte Hieber *et al.*, [13] obtuvieron evidencias de que la manosa era parte del marcador de reconocimiento ya que altas concentraciones de este azúcar inhibía la pinocitosis de la β -galactosidasa por fibroblastos.

Subsiguientemente, Kaplan *et al.*, [14] mostraron que la pinocitosis de hidrolasas ácidas podía ser competitivamente inhibida por ciertas fosfomanasas de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*, siendo Man 6-P el inhibidor competitivo más potente. Basados en estas observaciones propusieron que Man 6-P podía ser el marcador de reconocimiento requerido para la endocitosis de hidrolasas ácidas por fibroblastos humanos. La cuantificación de Man 6-P en cadenas glicosídicas de la β -glucuronidasa humana [15] y de α -iduronidasa [16], permitieron determinar que el marcador de reconocimiento (Man 6-P) está localizado en cadenas de oligosacáridos tipo alta manosa, y que podía ser liberado de las enzimas lisosomales por el tratamiento con endoglicosidasa H [15].

El resultado de estudios estructurales sobre los oligosacáridos fosforilados demostraron que se trataba de azúcares tipo alta manosa, y que cinco de los nueve residuos de manosas presentes en las enzimas lisosomales son sitios potencialmente disponibles para la fosforilación [17], además un oligosacárido tipo alta manosa puede adquirir dos residuos de Man 6-P, este oligosacárido difosforilado es el ligando preferencial para los receptores que reconocen dicha señal [17].

Al conocer la naturaleza química del marcador de reconocimiento, se pudo poner a prueba la hipótesis de "secreción-recaptura". Si esta hipótesis era correcta, al crecer a los cultivos celulares en presencia de un inhibidor competitivo como Man 6-P, se

produciría depleción intracelular y acúmulo extracelular de las enzimas lisosomales. Empero esto no fue así, ya que solo se produjo poco cambio en los niveles intracelulares de la enzima [18]. Estos resultados sugerían que la hipótesis secreción y recaptura de enzimas lisosomales no explicaba adecuadamente como las hidrolasas ácidas son transportadas a lisosomas.

Aunado a estas observaciones, González-Noriega *et al.*, [19] estudiando el efecto de aminos en la secreción de enzimas lisosomales y su endocitosis, tanto en fibroblastos normales como de células "I" propusieron una hipótesis alterna a la secreción-recaptura que postulaba que el transporte de enzimas lisosomales ocurría en una vía intracelular y que era mediada por un receptor, además sugirieron que las hidrolasas ácidas que son sintetizadas en retículo endoplásmico, adquieren el marcador de reconocimiento Man 6-P intracelularmente. Las hidrolasas conteniendo el marcador, son reconocidas por un receptor específico para Man 6-P; de esta forma, las hidrolasas ácidas son separadas de las otras proteínas solubles que están presentes en el lumen de los sáculos de Golgi. Los complejos receptor-enzima salen del Golgi y son transportados a vesículas intermedias o prelisosomas. En este compartimento debido al pH moderadamente ácido, dicho complejo se disocia. Las hidrolasas ácidas son transportadas a los lisosomas y los receptores pueden ser reciclados al Golgi para transportar más hidrolasas ácidas. Una fracción de la población de receptores (10%) se localiza en la membrana plasmática, donde puede recapturar aquella cantidad de hidrolasas lisosomales que tiene el marcador y que han sido secretadas. Posteriormente, el mismo grupo confirmó esta hipótesis; realizando estudios de fraccionamiento celular, pudieron saber en que organelo se encontraba el receptor y determinaron en que compartimento, el receptor se encuentra libre u ocupado por enzimas lisosomales [20].

INCORPORACIÓN DEL MARCADOR DE RECONOCIMIENTO A LAS ENZIMAS LISOSOMALES

Los hallazgos del grupo del Dr. Sly en torno al transporte intracelular de enzimas lisosomales y los realizados posteriormente por el grupo del Dr. Kornfeld para determinar cómo y dónde las hidrolasas ácidas adquieren el marcador de reconocimiento, permitieron conocer los mecanismos específicos que controlan el

transporte y compartimentalización de enzimas lisosomales. En la figura 1 se describe el modelo más aceptado hoy en día.

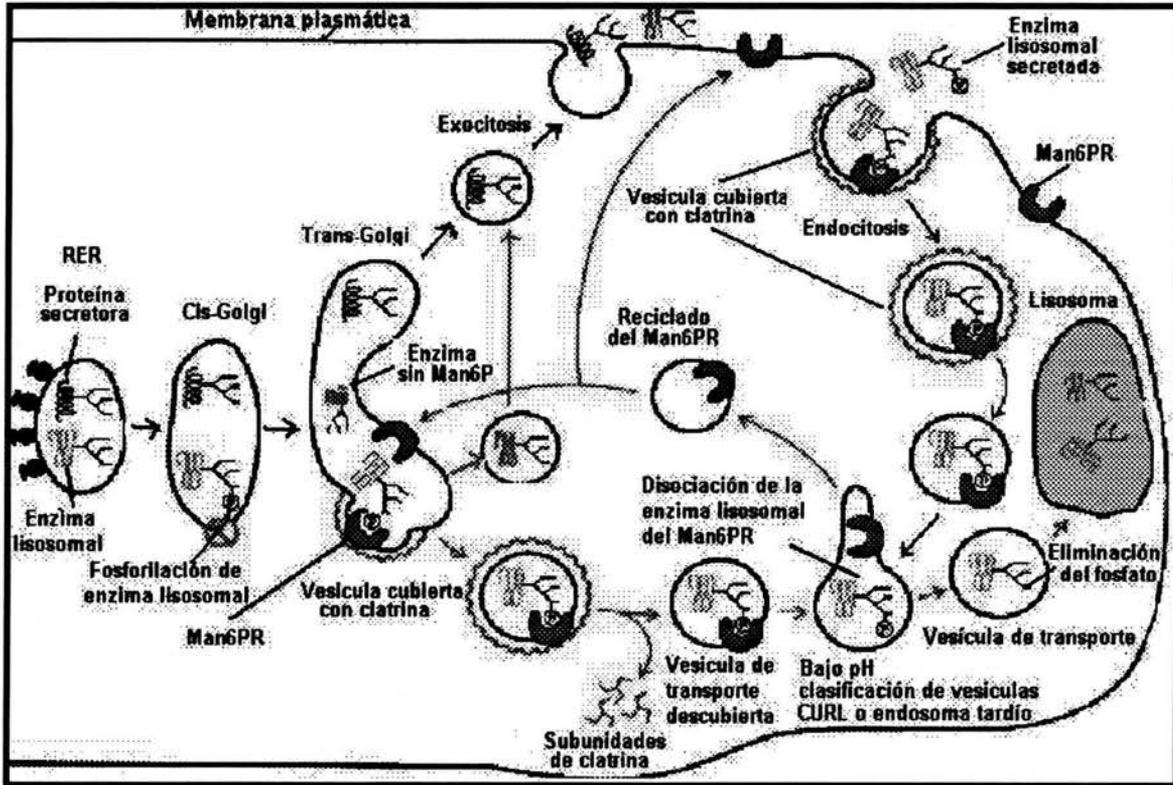


Figura1. Diagrama que representa la ruta de transporte de las enzimas lisosomales. Las enzimas lisosomales y las proteínas secretoras son sintetizadas en el retículo endoplasmático (RER), las cuales son transportadas al complejo de Golgi, en donde solo los oligosacáridos de las enzimas lisosomales son fosforilados, y el fosfomonoéster resultante (Man 6-P), es la señal de reconocimiento que será reconocida por un receptor específico (Man6PR) localizado principalmente en el trans-Golgi. El complejo enzima-receptor formado es transportado a endosomas tardíos, que se disocia debido al pH ácido. El receptor regresa al Golgi y a la membrana plasmática y las enzimas lisosomales son transportadas a los lisosomas. (figura tomada del libro Molecular Cell Biology; Darnel and Lodish 2001)

Las enzimas lisosomales son glicoproteínas que contienen cadenas glicosídicas unidas a residuos de asparagina (N-glicosídicas) y/o serina (O-glicosídicas). Como todas las proteínas secretorias, las enzimas lisosomales son sintetizadas en ribosomas unidos a las membranas del retículo endoplásmico rugoso. De forma cotraduccional, las cadenas nascentes de los péptidos al ir penetrando al lumen del retículo pueden ser glicosiladas en residuos de asparagina que están asociados a un residuo de aminoácido y seguido por una serina o una treonina. Las proteínas sintetizadas, secretorias y lisosomales, son transportadas en vesículas al Golgi, en donde únicamente ciertos residuos terminales de manosa de las cadenas glicosídicas de alta manosa presentes en las enzimas lisosomales, serán fosforiladas. Estos residuos de manosa 6-fosfato (Man 6-P) actuarán como marcadores específicos que permitirán que las proteínas lisosomales sean segregadas de las proteínas secretorias y a la vez transportadas a los lisosomas.

La generación del marcador Man 6-P ocurre de la siguiente manera: la incorporación de un fosfato en el carbono 6 (C-6) de manosas terminales comienza con la acción de dos enzimas de manera secuencial y que están localizadas en la parte Cis del aparato de Golgi [21]. En un primer paso una fosfotransferasa transfiere un residuo de N-acetilglucosamina 1-fosfato presente en una molécula de UDP-N-acetilglucosamina al grupo hidroxilo del C-6 de una de las manosas terminales de una cadena de alta manosa. Esta fosfotransferasa reconoce una señal que es común en al menos 40 diferentes enzimas lisosomales. En una segunda reacción una fosfodiesterasa específica remueve el grupo N-acetilglucosamina, quedando el fosfato unido al C-6 de las manosas [22]. Se ha encontrado que un defecto en la fosfotransferasa, provoca la Mucopolidosis II y Mucopolidosis III, y se debe a la secreción de enzimas no fosforiladas en fibroblastos de estos pacientes, así como elevadas cantidades de los sustratos de las enzimas a degradar.

Tan pronto la fosfodiesterasa ha removido el grupo de N-acetilglucosamina las enzimas lisosomales conteniendo el marcador de manosa 6-fosfato son reconocidas por dos tipos de receptores membranales, uno en que la unión depende de cationes (CD-MPR) y otro independiente de cationes (CI-MPR) [23].

De esta manera las enzimas lisosomales son segregadas de aquellas proteínas destinadas a secreción (Figura 1). Los análisis bioquímicos y estudios por

inmunolocalización demostraron que las vesículas provenientes del Golgi que contienen los complejos ligando-receptor son conducidas a compartimentos ácidos prelisosomales y endosomas tardíos en vez de los lisosomas [23]. En estas vesículas se lleva a cabo la disociación ligando-receptor y la enzima liberada es conducida a los lisosomas. En cambio, el receptor regresa al Golgi o a la membrana plasmática para iniciar otra ronda de transporte (Figura 1).

ESPECIFICIDAD DE LA FOSFOTRANSFERASA

No obstante, que en el esquema anterior se explica en términos generales como las enzimas lisosomales son segregadas y transportadas a endosomas una vez que adquieren el marcador de reconocimiento (Man 6-P) en el complejo de Golgi, no explica porque las proteínas secretorias no adquieren dicho marcador. A principio de los 80's ya se sabía que la composición de las cadenas de alta manosa presentes en las hidrolasas ácidas no eran diferentes del resto de las glicoproteínas que llegan a Golgi (26, 27). Este hecho no especifica porque la afinidad de la fosfotransferasa por las enzimas lisosomales es de 100-150 veces más grande que para las otras glicoproteínas no relacionadas [24, 25].

Inicialmente se infirió que las enzimas lisosomales sin oligosacáridos son potenciales inhibidores de la fosforilación [26]. La primera evidencia de la naturaleza del dominio de reconocimiento provino de estudios en proteínas quiméricas derivadas de catepsina D y pepsinógeno, aunque estas dos aspartil proteasas tienen un 45% de homología en su secuencia peptídica, el pepsinógeno es una proteína secretoria y la catepsina D es una enzima lisosomal. Este estudio reveló que la sustitución de dos residuos provenientes de regiones diferentes del extremo carboxilo de la catepsina D (lisina 203 y la 293 colocadas en el pepsinógeno) fueron suficientes para generar un dominio de reconocimiento para la fosfotransferasa. Cuando se localizó la posición homóloga en la estructura tridimensional del pepsinógeno de porcino, se encontró que estos residuos se localizan en la superficie de la molécula [27].

Estudios en otras enzimas lisosomales han confirmado que las lisinas seleccionadas son críticas para la unión de la fosfotransferasa [28]. En el caso de las catepsinas D y L, las dos lisinas representan la señal principal de fosforilación ya que están posicionadas a 34 Å alejados de una de las lisinas y cercanas a la asparagina

glicosilada en un microambiente básico, mientras que la otra lisina esta situada en un ambiente más ácido [29].

En su conjunto, todos estos resultados demuestran que el dominio de reconocimiento está en la parte superficial y que los elementos críticos (lisinas) están espaciados por residuos de carbohidratos, de manera que la fosfotransferasa pueda reconocer de manera eficiente a las cadenas glicosídicas de las glicoproteínas susceptibles a ser fosforiladas.

RECEPTORES MAN 6-P (MPRs)

El transporte de enzimas lisosomales solubles desde su sitio de síntesis así como su correcta clasificación depende principalmente de receptores que reconocen a la señal Man 6-P. A la fecha se conocen dos diferentes tipos de receptores para Man 6-P (MPRs). Estos han sido purificados a partir de membranas celulares solubilizadas por cromatografía de afinidad utilizando matrices que contienen unido el ligando. Ambos receptores difieren en sus propiedades de unión y requerimientos de cationes divalentes para la unión al ligando.

EL CI-MPR

El primer receptor que fue identificado, es referido como CI-MPR, MPR-300 o Man-6-P/IGFII, es una glicoproteína de 275-300 kDa que no requiere de cationes para unirse a su ligando [30]. La secuencia completa de aminoácidos de este receptor, se dedujo a partir de clones de cDNA que codifican para esta proteína y revela que es una glicoproteína transmembranal tipo I, que tiene un pequeño segmento de 17 kDa expuesto al lado citoplasmático [31]. El dominio luminal donde se lleva a cabo la unión del ligando, esta compuesto de 15 segmentos homólogos, cada uno consta de aproximadamente 145 aminoácidos. Estudios realizados por técnicas de inmunocitoquímica, demuestran que el receptor CI-MPR se localiza principalmente en endosomas, membrana trans de Golgi, pero no en lisosomas y solo una pequeña cantidad de receptor CI-MPR que se encuentra en la membrana plasmática [32]. Estudios sobre su biosíntesis evidencia que el MPR-300 sufre algunas modificaciones postraduccionales: a) glicosilación del dominio extracitoplasmático [33], fosforilación de cuatro de los cinco sitios en el dominio citoplasmático, c) palmitilación [34] y d)

formación de tres o cuatro puentes de disulfuro con cada repetición [35], además se ha reportado que CI-MPR une dos moléculas de Man 6-P por molécula de un oligopéptido difosforilado, este último con una afinidad de aproximadamente $2 \times 10^9 M$, y que fragmentos solubles del receptor CI-MPR formados por cortes proteolíticos, son capaces de conservar sus propiedades de unión al ligando [36].

La función principal del CI-MPR es transportar a las enzimas lisosomales solubles recién sintetizadas en el TGN y subsecuentemente liberadas en el endosoma tardío. El CI-MPR que se localiza en la membrana plasmática media la endocitosis de ligandos exógenos que contienen Man 6-P. Se han realizado experimentos en donde se inactivó el gen que codifica para este receptor y se ha encontrado que las células secretan la mayoría de hidrolasas ácidas [36].

EL MPR-46

Otro receptor que reconoce la señal Man 6-P es conocido como CD-MPR ó MPR-46. Este receptor es una glicoproteína con un peso molecular de 46 kDa que requiere cationes divalentes (particularmente Mg^{2+}), así como de un pH ligeramente ácido (6.3) para unirse a su ligando, en comparación al receptor CI-MPR que tiene una alta afinidad por su ligando a pH neutral [37]. La secuencia de aminoácidos para el receptor de 46 kDa, muestra que éste es también una proteína transmembranal, con un dominio citoplasmático de 69 residuos y un dominio luminal que muestra homología en repetidos segmentos con el CI-MPR. El descubrimiento del receptor MPR-46 fue resultado de observaciones realizadas en líneas celulares deficientes para el CI-MPR, ya que se encontró que eran capaces de transportar algunas de las hidrolasas ácidas (aproximadamente el 40% de eficacia) [38]. Este receptor tiene una función menos importante en el transporte de enzimas lisosomales que el MPR-300, ya que en algunos experimentos se ha encontrado que el CI-MPR puede compensar la pérdida del MPR-46. Empero, la expresión de altos niveles del MPR-46 en células, después de la transferencia con el apropiado cDNA, solo incrementa un poco su capacidad de endocitar a las hidrolasas exógenas en medio neutral [39, 40].

En resumen, los receptores MPRs han sido intensamente estudiados con relación a sus propiedades de unión a su ligando, tráfico intracelular, etc., y ahora se tiene un consenso en todos los investigadores que la principal función de ambos receptores es

la de transportar enzimas lisosomales al lisosoma. Sin embargo aún no se sabe con exactitud porqué la célula posee dos receptores para una misma familia de proteínas.

TRANSPORTE INTRACELULAR DE LOS MPRs

El transporte de enzimas lisosomales solubles dependientes del Manosa 6-P, es un paso crucial para la biogénesis del lisosoma. Las enzimas lisosomales sintetizadas *de novo*, son acarreadas desde su sitio de síntesis en el retículo endoplásmico, y pasan a través del complejo de Golgi y membrana endosomal hacia el lisosoma por medio de transporte vesicular.

Se han realizado diversos estudios inmunocitoquímicos y bioquímicos para determinar la distribución celular de los receptores MPRs. Primero se ha establecido que los MPRs no están presentes en los lisosomas [41]; sino que se encuentran principalmente en endosomas tardíos, Golgi y una pequeña cantidad (5-10%) se localiza en la membrana plasmática. Sin embargo ¿En qué compartimento ocurre el primer reconocimiento entre la enzima lisosomal y el receptor?

Duncan y Kornfeld [42] monitorearon el transporte de los MPRs, marcando la superficie celular, y encontraron que ambos receptores reciclan al sitio donde se localiza la silaliltransferasa (TGN y trans Golgi) con una vida media de aproximadamente 3 horas. Sorprendentemente, el transporte hacia el Golgi en donde se encuentra la galactosiltransferasa (el trans Golgi) no fue detectado.

Estos experimentos fuertemente sugerían que los receptores MPRs unían a las hidrolasas en el TGN. Después de la unión de las hidrolasas ácidas en el TGN, los complejos ligando-receptor eran transportados en vesículas recubiertas de clatrina que se generan por gemación del TGN [23]. Estas vesículas transportadoras llevan a los receptores a un compartimento endosomal ácido, en el que las enzimas lisosomales son liberadas [19], [43]. Posteriormente, Griffiths *et al.*, [44] y Geuze *et al.*, [45] demostraron mediante microscopía electrónica que se trataba de endosomas tardíos, que se localizaban muy cerca del TGN y que marcadores endocitados a diferentes tiempos de internalización se localizaban en diferentes vesículas, es decir; mostraban que había varios tipos de endosomas que pueden servir como aceptores para vesículas que acarrear hidrolasas para que se lleve a cabo la biogénesis de lisosomas [44]. Algunos investigadores reportan que la mayoría de las moléculas Cl-

MPR están localizadas en el compartimento endosomal, pero que es inaccesible durante la incubación de los cultivos con moléculas endocíticas a 20°C. Este compartimento prelisosomal o intermediario tiene propiedades de endosomas desde el cual un lisosoma podría generarse por una continua liberación de hidrolasas y proteínas de membrana, seguidas por la recuperación de todas las moléculas de MPRs. Otros investigadores han encontrado substanciales cantidades de MPRs y algunos enzimas lisosomales aún en endosomas tempranos. Estos son rápidamente marcados a 37°C, por moléculas endocíticas, pero además pueden ser marcados después de largos tiempos de incubación a 18.5°C. Estas observaciones son consistentes con el modelo de maduración para la biogénesis de lisosomas que involucran la progresiva transformación de endosomas tempranos a endosomas tardíos y finalmente a lisosomas. [8]

Existen algunas controversias acerca de si el movimiento del receptor desde Golgi a endosomas toma lugar solo si el receptor esta ocupado por su ligando, o si el receptor se mueve constitutivamente. Un grupo de investigadores ha reportado que el receptor se acumula en membrana del Golgi y que no existen receptores en endosomas cuando las células son tratadas con tunicamicina [46] (una droga que bloquea la glicosilación en el retículo endoplásmico), por lo tanto inhibe en la formación de marcador de Man 6-P para las nuevas enzimas sintetizadas. El mismo grupo también ha observado que cuando a un medio de cultivo se le adicionan drogas lisosomotróficas, tal como cloroquina o cloruro de amonio, los receptores se acumulan en endosomas [43]. Los autores demuestran que en estas condiciones, la incapacidad de los receptores de regresar al Golgi es el resultado de la incapacidad que tiene el receptor de liberarse de su ligando y no por el alterado pH de endosomas.

Así mismo, se ha demostrado que los receptores MPRs además de sufrir reciclamiento de Golgi a endosomas, también reciclan a través de la membrana plasmática, encontrándose aproximadamente el 10% en la mayoría de las células estudiadas [46]. Experimentos en los que los receptores localizados en la superficie celular fueron desializados por el tratamiento con neuroaminidasa, seguida por su resialización por la sialiltransferasa del TGN, indica que después de la internalización por endocitosis, los receptores MPRs alcanzan al TGN con una vida media es de tres

horas [45]. La presencia de los receptores en la membrana plasmática y su reciclamiento, así como el significativo nivel de hidrolasas ácidas encontradas en el suero, sugiere que la secreción y captura de enzimas lisosomales (que no es la vía principal) es un proceso normal.

TRANSPORTE DE PROTEINAS MEMBRANALES DEL LISOSOMA.

Los lisosomas están delimitados por una membrana lisosomal que es responsable de algunos procesos como la acidificación del interior del lisosoma, y formar una barrera de permeabilidad selectiva entre el citoplasma y el interior del lisosoma. A su vez, contiene varias proteínas altamente glicosiladas, conocida como Lamp1, Lamp2, Limpl , LimpII, y fosfatasa ácida lisosomal (LAP), cuya función es la de proteger a la membrana lisosomal de la degradación por las hidrolasas ácidas presentes en el lumen del lisosoma. El transporte de las proteínas integrales de la membrana de los lisosomas (LIMP) no es mediada por el marcador de reconocimiento manosa 6-fosfato. Primero, el transporte y los niveles de las LIMPs son similares en fibroblastos de células "I" y en fibroblastos normales [49]. Segundo, no se ha detectado fosforilación en las cadenas glicosídicas de estas glicoproteínas. Por último, si el proceso de glicosilación de proteínas se inhibe con tunicamicina, ninguna proteína puede adquirir el marcador de reconocimiento fosforilado; en estas circunstancias, las LIMPs siguen siendo transportadas en forma normal a lisosomas. Con el fin de conocer si algún componente de las LIMPs posee algún elemento informativo que sea responsable de la vía de transporte y destino final de este tipo de proteínas de membrana se han clonado los genes que las codifican. Además se alteró su composición y se transfectaron células con el fin de expresar la nueva proteína para examinar su destino final. De esta forma se han obtenido proteínas membranales quiméricas de la membrana plasmática conteniendo segmentos de las LIMPs, se ha observado que aquellas que contienen uno de los segmentos peptídicos de las LIMPs que se encuentran en el lado citosólico de estas proteínas integrales de membrana, son transportadas a lisosomas [50]. Seguidamente, por medio de mutagénesis dirigida se ha podido alterar de diferentes formas la composición de amino ácidos de las regiones citosólicas de las proteínas integrales de las membranas lisosomales. Este tipo de estudios realizados con diferentes proteínas de membrana lisosomal de

diversas especies ha permitido concluir que en los segmentos de las colas citosólicas, amino o carboxilo terminal, reside una señal que es indispensable para el transporte y destino final de este tipo de proteínas membranales [51]. Se han podido detectar dos secuencias de amino ácidos específicos, localizadas en diferentes LIMPs, que determinan una compartimentalización correcta de las proteínas de la membrana lisosomal, una dada por la secuencia Gly-Tyr que está presente en prácticamente todas las glicoproteínas de la membrana lisosomal [52] y otra dada por Leu(Ileu)-Ileu presente en la LIMP II [53]. Cualquier sustitución en alguno de estos aminoácidos altera el destino final de estas proteínas, bien no permitiéndolas salir del retículo endoplásmico, transportándolas a la región de Golgi o bien a la membrana plasmática, pero no a lisosomas. No obstante este tipo de experimentos, complementados con experimentos de pulso y caza y microscopía (para los que se han utilizado anticuerpos fluoresceinados, específicos para las LIMPs) han permitido detectar que las proteínas de membrana lisosomal, son sintetizadas en la membrana del retículo endoplásmico y como proteínas integrales son transportadas a la región Trans de Golgi, de aquí en pequeñas vesículas a los endosomas y por último a los lisosomas. En condiciones normales una pequeña cantidad de algunos tipos de LIMPs (conteniendo la secuencia Gly-Tyr), es transportada primero a la membrana plasmática, de donde son transportadas a endosomas y de allí a lisosomas. En células transfectadas con el gen de alguna de estas proteínas, se incrementa en forma importante la fracción que recicla a través de la membrana plasmática antes de llegar a lisosomas, lo que sugiere que quizás se satura la vía directa de transporte a lisosomas. Por último, se ha encontrado que el número de moléculas de las LIMPs presente en las membranas de lisosomas es diferente, así como también lo es la velocidad de transportación desde retículo endoplásmico a lisosomas y la vida media de cada una de ellas. Estas observaciones sugieren que debe haber algún tipo de regulación en la síntesis y degradación de las LIMPs de forma que permita mantener la identidad de los lisosomas [50].

MECANISMO DE TRANSPORTE INDEPENDIENTE DE Man 6-P

Anteriormente se hizo referencia sobre el mecanismo de transporte de hidrolasas ácidas al lisosoma que es mediado por el marcador Man 6-P. No obstante a la importancia que tiene este sistema de transporte para las hidrolasas ácidas, no es el único. Existen evidencias que indican la presencia de vías alternas de transporte que son independientes a la de Man 6-P. Las primeras observaciones que apoyan esta hipótesis, fueron realizadas en pacientes que presentan la enfermedad de Mucopolidosis II y III, en que la fosfotransferasa (enzima crítica para la formación de la señal de reconocimiento Man 6-P) es defectuosa [24, 55]. Así, los fibroblastos derivadas de estos pacientes son incapaces de sintetizar el marcador de reconocimiento Man 6-P y como consecuencia secretan la mayor parte de las enzimas lisosomales sintetizadas *de novo*. Sin embargo, esto no sucede para todas las enzimas lisosomales, ya que se encontró que la actividad enzimática de α -Glucosidasa y fosfatasa ácida es cercana a la normal. Por el contrario en otros tipos celulares, tal como hepatocitos, células de Kupffer, leucocitos, timocitos y en células de hígado; los niveles de prácticamente todas las enzimas lisosomales son normales [56].

Otras evidencias sobre un sistema de transporte independiente de Man 6-P, surgen de estudios realizados por Ullrich *et al.*, [57] quienes encontraron que la endocitosis de la β -glucuronidasa de hígado de rata no se ve afectada por la presencia de azúcares fosforilados o por tratamientos de la enzima con fosfatasa alcalina. De igual manera, Hieber *et al.*, [58] evidenciaron que la endocitosis de la β -glucuronidasa de hígado bovino tampoco se ve afectada por la presencia de Man 6-P o por las altas concentraciones de otras enzimas lisosomales que contienen el residuo de Man 6-P. Adicionalmente a estas observaciones González Noriega *et al.*, [59] estudiando la endocitosis de la β -glucuronidasa, de hígado bovino a fibroblastos humanos provenientes de paciente deficientes para dicha enzima, encontraron que esta hidrolasa ácida puede ser endocitada por dos sistemas de transporte diferentes: uno que reconoce en la enzima el marcador Man 6-P y el otro a un elemento hasta entonces desconocido. Al caracterizar dicho sistema se encontró que: a) la cinética de endocitosis (V_{max} y K_m) de ambos sistemas es similar. b) La enzima capturada por uno u otro sistema es transportada a lisosomas secundarios. c) Anticuerpos dirigidos

en contra del receptor CI-MPR bloquean la endocitosis de la enzima que contiene el marcador Man 6-P, pero no la que contiene el nuevo marcador d) Aminas primarias o monensina, que incrementan el pH intracelular e inhiben la endocitosis del receptor CI-MPR, pero no ejercen ningún efecto sobre el nuevo receptor [59]. Basados en estos resultados, propusieron que en fibroblastos humanos hay dos sistemas funcionales para endocitar enzimas lisosomales y transportarlas a lisosomas.

Estudios un poco más recientes en ratones knock out para los genes que codifican para los receptores MPRs [60], reportan la existencia de mecanismos de transporte independientes de MPRs para algunas hidrolasas ácidas, ya que al cuantificarlas los niveles son normales en algunos órganos de estos animales [60]. Estos autores proponen que los mecanismos de transporte, podrían estar mediados por otros receptores no conocidos. Por ejemplo, se ha reportado que formas precursoras de enzimas lisosomales solubles pueden asociarse con membranas celulares independiente de Man 6-P [61]. Aunque el mecanismo de asociación permanece aún desconocido, los resultados de Rijnboutt *et. al.*, [62], McIntyre y Erickson [63], sugieren que esta asociación de la proenzima lisosomal ocurre a través de interacciones proteína–proteína con alguna proteína de membrana. Así mismo, se ha reportado que la endocitosis de procatepsina D se lleva a cabo por un receptor membranal que es independiente de Man 6-P que aún es desconocido [64]. Todas estas evidencias sugerían que el transporte de enzimas lisosomales independientes del marcador de Man 6-P, estaba mediado por una proteína membranal. El grupo del Dr. González Noriega se dio a la tarea de caracterizar al nuevo sistema de transporte, y encontró que el marcador de reconocimiento está ubicado en la cadena peptídica de la β -glucuronidasa, y que esta señal consiste de un tripéptido que contiene Ser-X-Ser, proponiendo que X es un triptófano modificado postraduccionalmente [65]. Una vez obtenida la señal de reconocimiento se pudo purificar al receptor, mediante cromatografía de afinidad acoplado a sefarosa la β -glucuronidasa de hígado bovino o el péptido que contiene la secuencia señal. Al determinar el peso molecular de la proteína purificada en SDS-PAGE en condiciones reductoras se encontró que tiene un peso molecular de 78 kDa. Estudios de la unión a su ligando demuestran que es dependiente de pH, cationes divalentes y temperatura. Anticuerpos dirigidos en contra de este receptor son capaces de bloquear de manera específica la endocitosis de la

β -glucuronidasa de hígado bovino a fibroblastos humanos [66]. Además, se ha podido detectar la existencia de este receptor en células en cultivo de humano, bovino, rata y mono; lo cual indica que la presencia de este receptor no está circunscrita a una especie o a un tipo de células.

JUSTIFICACIÓN

No obstante, a los avances obtenidos en el conocimiento de los mecanismos involucrados en la biogénesis de lisosomas, es necesario indagar más sobre el sistema de segregación y transporte independiente de Man 6-P. Si bien desde hace aproximadamente veinte años se sabe de dicho sistema, se ha estudiado poco al respecto. Sin duda, el descubrimiento del grupo del Dr. González Noriega sobre un nuevo marcador de reconocimiento presente al menos en una enzima lisosomal, así como del receptor que reconoce dicha señal, aporta mas evidencias sobre la existencia de sistemas de transporte alternos para hidrolasas ácidas. Sin embargo, aún no se tiene conocimiento sobre la significancia biológica de este nuevo receptor. Hasta ahora solo sabemos que es capaz de endocitar al menos a una enzima lisosomal que es capaz de llegar al lisosoma. Pero aún ignoramos si el receptor transporta a las hidrolasas ácidas sintetizadas *de novo*.

Por lo que, como inicio para responder algunas de estas cuestiones en el presente trabajo nos enfocamos específicamente a examinar la ruta de transporte que sigue dicho receptor que es sintetizado *de novo*, así como su procesamiento intracelular.

OBJETIVO GENERAL.

Conocer los mecanismos de biosíntesis, transporte y compartimentación del receptor 78 kDa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1.- Estudiar la biosíntesis del receptor 78 kDa

Metas

- Determinar si el receptor tiene un forma precursora.
- Determinar si el receptor esta formado por una sola proteína
- Determinar si el receptor se glicosila

2.- Identificar la ruta de transporte que sigue receptor 78 kDa sintetizado *de novo*.

Metas

- Determinar la ruta de transporte del receptor 78 kDa en cada uno de los compartimentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

I.- CULTIVOS CELULARES

La línea celular HepG2, derivada de hematoma humano, fue donada por el Dr. S. Cederbaun (University of California at Los Ángeles, Ca). Los cultivos se crecieron en α -MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado, 1Mm de piruvato de sodio, 100u/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina, y mantenidas a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

II.- OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS

El receptor 78 kDa fue purificado a partir de hígado bovino utilizando el protocolo descrito por González-Noriega y Michalak [66]. La proteína 78 kDa purificada (100 μ g) fue mezclada con un volumen igual de adyuvante de Freund's completo, e inyectada subcutáneamente en un conejo de Nueva Zelanda. Antes de la primera inyección, el suero preinmune fue obtenido. Refuerzos del antígeno en adyuvante incompleto se hicieron a las 2, 4, 8 semanas, el conejo se sangró dos semanas después de la última inyección y el suero fue cosechado para purificar las IgG's. El suero inmune fue absorbido a una columna de proteína A-sefarosa (Zymed) y la IgG fue eluída con ácido cítrico 0.1 M a pH 3.5. Las fracciones que contienen las inmunoglobulinas fueron precipitadas con 50% de sulfato de amonio pH 7.0, el botón fue resuspendido y dializado contra PBS.

III.-MARCAJE METABÓLICO

Las células HepG2 se crecieron en cajas Petri de 100mm de diámetro a 80% de confluencia. A fin de depletar la poza intracelular de metionina, los cultivos se incubaron con 5 ml de α -MEM sin metionina, haciendo tres cambios durante 30 minutos. Para el marcaje metabólico, los cultivos se incubaron con 3.5 ml de medio conteniendo: α -MEM sin metionina, α -MEM-suero dializado (10%) y 300 μ Ci de ³⁵S-metionina por caja a diferentes tiempos (15 minutos a 37 °C en experimentos de pulso y caza o toda la noche), seguidamente los cultivos se lavaron tres veces con α -MEM sin metionina. La caza se inició adicionando α -MEM normal a diferentes tiempos: 0, 30, 60, 120, 240 minutos o durante toda la noche (para el experimento en el que se

utilizó cloruro de amonio o donde se evidenció el receptor en estado de equilibrio). Terminado el tiempo de caza, las células se colocaron en hielo y cosecharon en PBS. La suspensión celular fue procesada para fraccionamiento subcelular en Percoll como se describe posteriormente.

IV. - FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

Las células fueron fraccionadas en un gradiente de Percoll utilizando el protocolo descrito por Merion y Sly [70]. Cultivos de células HepG2 crecidas a un 80% de confluencia en cajas de Petri de 100mm, se lavaron tres veces con 10 ml de PBS y dos veces con 5 ml de una solución isotónica de sacarosa, que contiene: 0.25M de sacarosa, 10mM de HEPES, 1mM EDTA, timerosal 0.1% a un pH 7.2. Después de 10 minutos a 4 °C, las células fueron cosechadas utilizando un gendarme de teflón. La suspensión celular fue centrifugada a 1000g por 10 minutos a 4 °C. El botón celular obtenido se resuspendió en 1.5 ml de la solución isotónica de sacarosa conteniendo 15mM de KCl e inhibidores de proteasas (Leupeptina 0.1mM, PMSF 0.2mM, EDTA 2mM, PHMB 1mM). Las células se homogeneizaron con un homogenizador Potter-Elvehjen de teflón hasta que se lisaron más del 50% de las células. El homogenizado resultante se centrifugó a 700g durante 10 minutos a 4 °C. Un mililitro del sobrenadante post-nuclear (SPN) se colocó sobre 9 ml de una solución de Percoll al 30%, (densidad de 1.07 g/ml) preparada con la solución isotónica de sacarosa, y se centrifugó a 33,000g durante 50 minutos a 4 °C en un rotor F0650 en una centrífuga Avanti-Beckman. Después de la centrifugación, se colectaron fracciones de 0.4 ml desde el fondo del tubo con una bomba peristáltica. Alícuotas de 0.25 ml de las fracciones 16-21 del primer gradiente se mezclaron y se colocaron sobre 8 ml de una solución de Percoll al 15% con una densidad de 1.044 g/ml. Las muestras se centrifugaron a 33,000g durante 50 minutos a 4 °C. Se colectaron fracciones de 0.4 ml cada una como se describió anteriormente.

V.- ENSAYOS ENZIMÁTICOS

La actividad enzimática de la β -hexosaminidasa se determinó usando como sustrato 4-metilumbeliferil-2-acetoamida-2-deoxi- β -D-glucopiranosido a 5mM en amortiguador fosfato-citrato 0.08M, pH 4.4 [70]. La fosfatasa ácida se determinó usando como

sustrato a 4-metilumbeliferil fosfato a 1 mM en 0.1M de citrato de sodio, pH 5.0 [70]. La glucosidasa II se midió usando 4-metilumbeliferil- α -D-glucósido 1mM en fosfato de sodio 0.1M, pH 6.7 [71]. La Manosidasa II se determinó utilizando 4-metilumbeliferil- α -D-manósido 1mM en fosfato de sodio 100mM, 12.5mM de $MgCl_2$, pH 6.8 [72]. Cada uno de los ensayos se realizaron adicionando 25 μ l de muestra a 100 μ l del sustrato en presencia de 0.1% de Tritón X-100. Al cabo de 30 minutos a 37 °C, las reacciones se detuvieron con la adición de 1.9 ml de amortiguador compuesto de 0.3M de glicina, 0.2M de carbonato, pH 10.5. La fluorescencia se midió en un espectrofluorómetro Aminco-Bowman a una emisión de 360 y excitación 448nm. La actividad de la fosfodiesterasa alcalina, se determinó colorimétricamente utilizando como sustrato bis(p-nitrofenol) fosfato 20mM en Tris base pH 9.0 [73]. El ensayo se realizó adicionando a 25 μ l de muestra, 100 μ l de sustrato de 6.5 μ l de deoxicolato en 2%, 8 μ l $MgCl_2$ 75 mM. Después de incuba 1 hora de incubación a 37°C la reacción se detiene con la adición de 1 ml de amortiguador de 0.3M de glicina, 0.2M de carbonato, pH 10.5. Las muestras se leyeron a 420 nm en espectrofotómetro.

La actividad enzimática de la HRPasa, se determinó colorimétricamente usando o-fenilendiamina 4mg/ml y 0.03% de H_2O_2 como sustrato. El ensayo se realizó adicionando 50 μ l de muestra, 50 μ l de amortiguador que contiene 0.15% de Tritón X-100 y 100Mm de acetato de amonio, pH 6.0. La reacción se desarrolló durante 10-15 minutos a temperatura ambiente, y se detuvo con 3M de ácido sulfúrico. Las muestras se leen a 490nm en lector de ELISA (BIO-RAD).

VI.- IDENTIFICACIÓN DE VESÍCULAS ENDOCÍTICAS

Para identificar las diferentes vesículas endocíticas (endosomas tempranos, endosomas tardíos y lisosomas) los cultivos se incubaron en presencia de HRPasa (5mg/ml) en α -MEM durante 15 minutos. Después de un pulso con esta enzima, las monocapas celulares se lavaron 5 veces con α -MEM e incubaron 0, 60 o 240 minutos a 37 °C o 60 minutos a 20 °C en presencia de α -MEM. Terminado el tiempo de caza, las células se colocaron en hielo, se lavaron con PBS, y se homogenizaron y, el sobrenadante post-nuclear se fraccionó en un gradiente de Percoll al 30%. La actividad de HRPasa presente en las fracciones colectadas se midió como se describió anteriormente.

VII.- ROMPIMIENTO SELECTIVO DE LISOSOMAS.

Previamente se ha descrito que glycil-L-phenylalanine 2-naphthylamide (GPN) es un sustrato para catepsina C, que selectivamente rompe a los lisosomas pero no a endosomas [74]. Por lo tanto, el sobrenadante posnuclear fue incubado con 300 μ M de GPN, que está preparado en una solución de dimetil sulfóxido (DMSO), a 37°C por 10 minutos. Después este tiempo, el sobrenadante se sometió a fraccionamiento subcelular como se describió anteriormente. Los lisosomas no son afectados por el DMSO.

VIII.-EFECTO DE DROGAS EN CULTIVOS CELULARES

Cultivos celulares de HepG2 marcadas con ³⁵S-metionina durante toda la noche, se lavaron tres veces en α - MEM sin metionina y se incubaron con cloruro de amonio (NH₄Cl) a una concentración de 50mM en α - MEM normal a 37 °C durante tres horas. Este agente cambia el pH y vacuoliza a endosomas, lisosomas y altera el tráfico de algunos receptores membranales. Terminado el tiempo de incubación el medio fue removido, y las células se cosecharon en PBS frío. La suspensión celular fue procesada para fraccionamiento subcelular en Percoll.

Con el fin de determinar si el receptor 78 kDa se glicosila, las células fueron incubadas dos horas antes del marcaje con 5 mg/ml de tunicamicina (Sigma), el marcaje de las células con ³⁵S-metionina se llevó a cabo en presencia de tunicamicina. La concentración utilizada de la droga inhibe completamente la adición de cadenas N-glicosídicas a proteínas sintetizadas *de novo* [67]. Al término del marcaje, el medio fue removido, y las células se cosecharon en PBS frío. La suspensión celular se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 minutos, el botón celular se resuspendió en 1 ml de amortiguador de homogenizado que contiene inhibidores de proteasas (Leupeptina 0.1mM, PMSF 0.2 mM, EDTA 2mM, PHMB 1mM), 50 μ g/ml RNAsa, 100 μ g/ml, DNAsa en PBS pH 7.2. Las células se lisaron congelando y descongelando tres veces en nitrógeno líquido, el homogenizado se centrifugó a 50,000g a 4 °C durante 20 minutos. Las membranas obtenidas se solubilizaron durante 30 minutos en 1 ml de amortiguador de lisis compuesto por: 0.5% de Tritón X-100, inhibidores de proteasas en PBS pH 7.2. Seguidamente se retiró el material no solubilizado centrifugando a 50,000g durante 20 minutos y la muestra sometida a inmunoprecipitación.

IX.- INMUNOPRECIPITACIÓN.

Se tomaron alícuotas de 25µl de proteína A-sefarosa resuspendida en amortiguador 0.2 M de fosfatos, pH 8.0, se mezclaron con 40 µl de antisuero en contra del receptor 78 kDa o del CI-MPR y se incubaron por 2 horas a 4 °C con agitación constante. Las esferas se lavaron dos veces con 1 ml del mismo amortiguador de fosfatos. Posteriormente, las esferas se incubaron con el lisado celular marcado con ³⁵S-metionina en presencia de la mezcla de inhibidores de proteasas mencionada en la sección VII durante 2 horas a 4 °C con agitación constante. Terminada la incubación las esferas se colectaron centrifugando a 12,000 rpm durante 1 minuto y se lavaron dos veces con 1 ml PBS que contiene inhibidores de proteasas, 1mg/ml de BSA y Tritón X-100 al 0.5% y 0.05% respectivamente. Finalmente, a los complejos inmunes se les adicionó amortiguador de muestra para la SDS-PAGE en condiciones reductoras y se hirvieron por 4 minutos, se centrifugaron a 12,000 rpm por un minuto y se tomó el sobrenadante que se analizó por SDS-PAGE.

X.- ELECTROFORESIS.

Los extractos celulares derivados de muestras solubilizadas con 1% de SDS, 0.5% de Tritón X-100, así como todos los inmunoprecipitados fueron sometidos a SDS-PAGE para separar las proteínas, usando mini-geles al 8% de acuerdo al método de Laemmli [68]. Las muestras marcadas con ³⁵S-metionina se analizaron por autoradiografía después del tratamiento de los geles con salicilato de sodio al 1%. EL análisis cuantitativo de las bandas se hizo por medio de un Scanner Biorad

XI.- INMUNOTRANSFERENCIA

Después de SDS-PAGE, las proteínas se electrotransferieron a membranas de nitrocelulosa de 0.45µm (BioRad). La solución amortiguadora para dicha transferencia está compuesta por 25mM de Tris, 192mM de glicina y 20 % de metanol a un pH 8.3. La transferencia se llevó a cabo a corriente constante de 190mA durante 80 minutos, [69]. Los sitios no específicos fueron bloqueados por inmersión de las membranas en un amortiguador de bloqueo (pH 7.0) que contiene; 10mM de NaCl, 2.5mM KCl, 25mM de BES y 25mM ácido maleico (SSMB) y 2% de Polivinilpirrolidona durante toda la noche a 4 °C. Las membranas fueron lavadas varias veces con el

amortiguador SSMB. Los Blots fueron incubados con suero de conejo (421) anti-78/72 kDa durante 2 horas, después de hacer varios lavados con el amortiguador de SSMB, los Blots se revelan con IgG anti-conejo-peroxidasa, y desarrollando el color por medio de 4-cloro-1-naptol. Alternativamente la presencia del receptor se detectó usando un kit de quimioluminiscencia (ECL Western Blotting, Amersham, Bucks, UK).

RESULTADOS

IDENTIFICACIÓN DEL RECEPTOR 78/72 kDa POR INMUNOTRANSFERENCIA.

El análisis de la especificidad del antisuero policlonal (Rb 421), generado en conejo en contra de la proteína 78/72 kDa, se realizó por medio de inmunotransferencia. Membranas totales de células HepG2 se solubilizaron con SDS al 1%. Las proteínas extraídas se desnaturalizaron en presencia de 2-mercaptoetanol y se resolvieron en SDS-PAGE al 8%. Posteriormente fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa, las cuales se incubaron con el anticuerpo (Rb 421) en contra de la proteína de 78/72 kDa, y seguidamente con un anticuerpo de cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa y reveladas con 4-cloro-1-naftol. Como se muestra en la Figura 1A, el antisuero Rb421 únicamente reconoce dos péptidos cuyo peso molecular corresponde al de los péptidos obtenidos (78/72 kDa) cuando se purificó el receptor [66]. Los mismos resultados se han obtenido cuando se utilizan anticuerpos en contra de esta misma proteína producidos en conejos, utilizando diferentes protocolos de inmunización (resultados no mostrados).

Al corroborar la especificidad del antisuero Rb421 por medio de inmunoprecipitación de proteínas membranales extraídas con Tritón X-100 procedentes de células a las que se incorporó ³⁵S-Metionina durante 18 horas, se obtuvieron dos proteínas con un peso molecular de 47 y 42 kDa (Figura 2). Previamente González-Noriega *et al.*, [66] han reportado que el peso molecular de la proteína de 78/72 kDa varía dependiendo el método utilizado para eliminar el Tritón X-100 durante la purificación del receptor. Con el fin de demostrar que la variación del peso molecular aparente del receptor en los geles de SDS-PAGE, se debe a la presencia del Tritón X-100, el receptor se extrajo de membranas de células HepG2 con 0.5% (8mM) de Tritón X-100. Seguidamente al material solubilizado se le adicionó igual volumen del amortiguador de cargado que contiene 86mM de SDS. Alternativamente, las proteínas extraídas en la solución de Tritón X-100 al 0.5% fueron precipitadas con TCA al 20%, y el precipitado se resuspendió con el mismo amortiguador de cargado. De esta forma las muestras cargadas en los geles contienen: una, la concentración de 0.25% de Tritón X-100 y la otra, solo el Tritón X-100 unido a la proteína. Como se observa en la figura 1; el peso molecular del receptor cambia de 78/72 kDa (en la muestra solubilizada con SDS) a 65/58 kDa (figura 1b), cuando las membranas se solubilizaron con Tritón X-

100 y el exceso de detergente se eliminó precipitando a la proteína con TCA. Sin embargo, en la muestra cuya cantidad de Tritón X-100 es mayor; el peso molecular se reduce aún más a 59/49 kDa (figura 1C). Esta reducción en el peso molecular del receptor sugiere que el SDS no desplaza completamente el Tritón X-100 unido al receptor y por ende no pasa completamente de una forma globular a una tubular, afectando su movilidad electroforética.

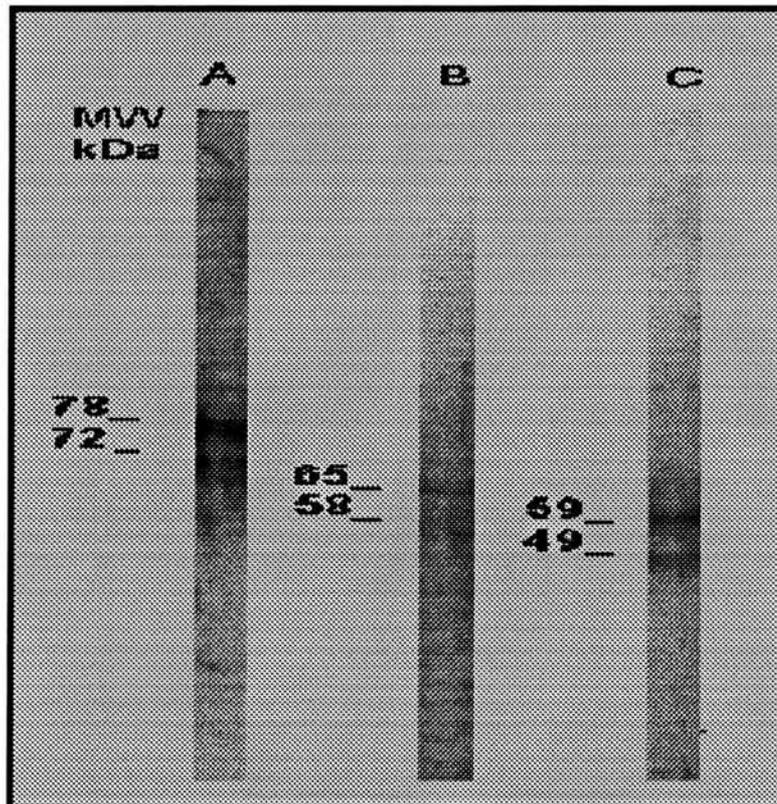


Figura 1. Efecto de Tritón X-100 en el peso molecular del receptor 78 kDa. El receptor fue extraído a partir de membranas de células HepG2 con SDS 1% (A) o 0.5 %Tritón X-100, (B y C). En la muestra B, el exceso de detergente fue eliminado precipitando a las proteínas con TCA al 20%. En cambio en la muestra C, se adicionó directamente el amortiguador de muestra y entonces analizadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se detectaron con un anticuerpo de cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa y revelado con cloronaftol.

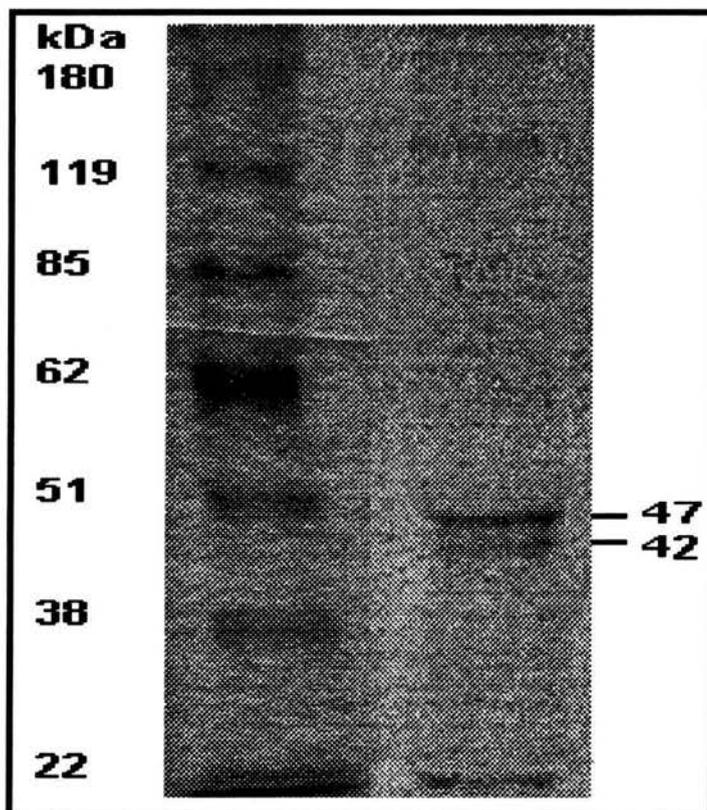


Figura 2. Efecto de Tritón X-100 en inmunoprecipitación del receptor 78 kDa. Cultivos celulares de células HepG2, se marcaron con ^{35}S -metionina durante 18 horas, las Membranas fueron obtenidas y solubilizadas con 0.5% de Tritón X-100, e inmunoprecipitadas con el antisuero anti-78 KDa. Los antígenos precipitados se resolvieron por SDS-PAGE (acrilamida al 8%) en condiciones reductoras y visualizados por fluorografía.

BIOSÍNTESIS DEL RECEPTOR 78/72 kDa

Previamente hemos mostrado que el antisuero generado en conejo reconoce de manera específica al receptor 78/72 kDa. Si bien el peso molecular de éste varía de acuerdo al detergente utilizado cuando se extrae dicho receptor, se asume que se trata de la misma proteína. Como mostramos anteriormente el receptor presenta dos bandas. Con el fin de saber si la presencia de ambas bandas es el resultado de modificaciones postraduccionales, los cultivos de células HepG2 fueron marcados con ³⁵S-Metionina durante 15 minutos y cazadas a diferentes periodos de tiempo (0, 30 y 120 minutos) en medio sin metionina radioactiva. Seguidamente, las células fueron cosechadas, lavadas e inmunoprecipitadas usando el antisuero anti-78kDa. Los péptidos inmunoprecipitados se resolvieron en SDS-PAGE, y se revelaron por fluorografía. Como se muestra en la figura 3, el receptor inmunoprecipitado inmediatamente después del pulso muestra dos bandas con un peso molecular aparente de 47/42 kDa, las cuales se mantienen sin cambios cuando la caza se prolonga a 30 y 120 minutos, (figura 3). Este resultado sugiere que el receptor no sufre modificación postraducciona, ya que de ser así, habría un cambio en el peso molecular de las bandas en algún momento de la caza, que generalmente ocurre en los primeros minutos después de que se sintetizan las proteínas.

Con el fin de establecer si alguna banda se debe a modificación postraducciona debido a la glicosilación en el retículo endoplásmico, o a la transformación de las cadenas glicosídicas a su paso por el complejo de Golgi, lo cual generalmente se traduce en un cambio en el peso molecular aparente de la proteína, las células fueron pulso-marcadas con ³⁵S-Metionina durante toda la noche y tratadas por dos horas en presencia o ausencia de tunicamicina (un inhibidor que bloquea la adquisición de oligosacáridos por las proteínas recién sintetizadas). Como se muestra en la figura 4, la proteína de 47/42 kDa conserva el mismo peso molecular en las dos condiciones, lo cual sugiere que esta proteína no contiene cadenas N-glicosídicas. Cabe mencionar que en los experimentos anteriores, la banda de 47 kDa se encuentra más enriquecida con respecto a la de 42 kDa.

Alternativamente para descartar que la doble banda se debe a la acción por proteasas cuando se inmunoprecipita el receptor, los cultivos fueron marcados con ³⁵S-Metionina durante toda la noche, seguidamente fueron removidas de la caja de cultivo y la suspensión celular obtenida se dividió en dos alícuotas. Una de las cuales fue lisada

en presencia de un cóctel de inhibidores de proteasas que esta compuesto por: Leupeptina 0.1mM, PMSF 0.2mM, EDTA 2mM, PHMB 1mM. Esta mezcla inhibe a la mayoría de las proteasas excepto a algunas de las proteasas de serina. A la otra alícuota se le adicionó un inhibidor de proteasas comercial "Complete" (Roche), que inhibe un amplio espectro de proteasas como: serinas, cisteínas, calpapaínas y metaloproteasas. En la figura 5, se muestra que entre ambos inhibidores de proteasas no existen diferencias. No obstante a estos resultados, aún no se descarta que la presencia de las dos bandas sea debido a la acción de alguna proteasa que no se puede inhibir. Otra posibilidad es que la doble banda sea resultado de algún artificio que se genera durante la inmunoprecipitación.

En la literatura se ha reportado que las proteínas periféricas están asociadas a la membrana, o a proteínas integrales de membrana mediante fuerzas electrostáticas y por puentes de hidrogeno que fácilmente pueden ser removidas por cambios de pH o por elevada fuerza iónica. Con el fin de determinar si alguna de las bandas es una proteína asociada al receptor, las células se marcaron como en el experimento anterior, con la diferencia de que aquí los homogenizados fueron tratados en presencia o ausencia de carbonato de sodio 0.1 M, en estas condiciones si una proteína esta unida por interacciones no covalentes con el receptor, tendría que desaparecer, sin embargo en las dos condiciones, ambas bandas continúan presentes. (resultado no mostrado).

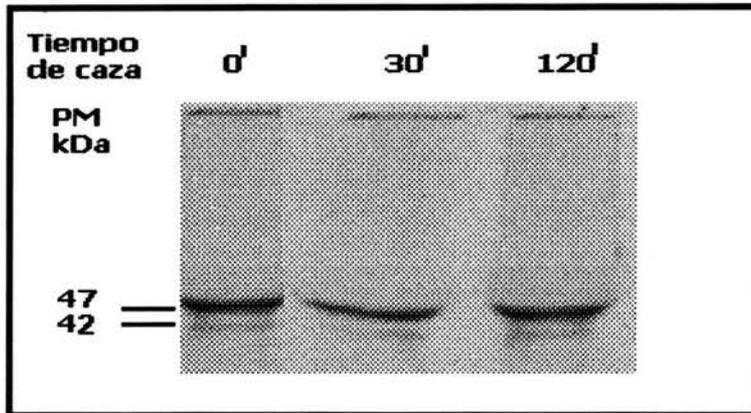


Figura 3. Identificación del receptor a diferentes tiempos. Cultivos celulares de células HepG2, se pulso-marcaron durante 15 minutos con ^{35}S -metionina y cazadas a tiempos 0, 30 y 120 minutos. Las membranas fueron obtenidas y solubilizadas con Tritón X-100, e inmunoprecipitadas con el antisuero anti-78 kDa. Los antígenos precipitados se resolvieron por SDS-PAGE (acrilamida al 8%) en condiciones reductoras y visualizados por fluorografía.

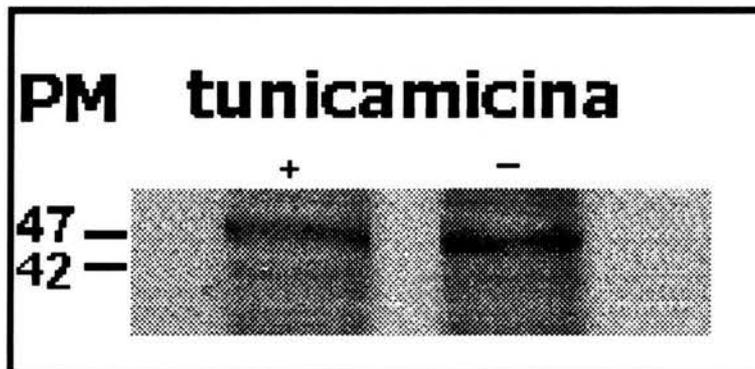


Figura 4. Efecto de tunicamicina. Cultivos celulares de células HepG2, fueron tratadas en presencia (+) o ausencia (-) de tunicamicina, a una concentración de 5mg/ml durante dos horas. Posteriormente se marcaron con ^{35}S -metionina durante tres horas y las membranas fueron obtenidas y solubilizadas, con Tritón X-100, e inmunoprecipitadas con el antisuero anti-78 KDa. Los antígenos precipitados se resolvieron por SDS-PAGE (acrilamida al 8%) en condiciones reductoras y visualizados por fluorografía.

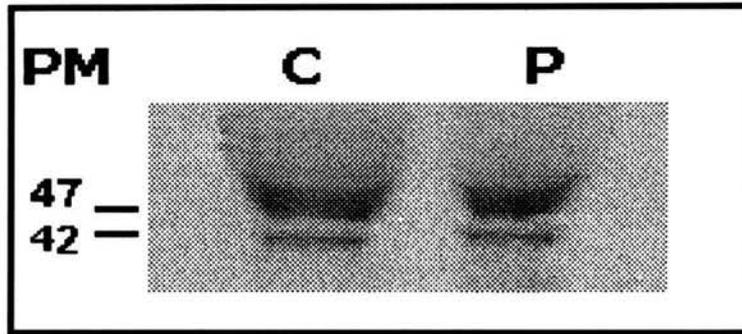


Figura 5. Efecto de proteasas sobre el peso molecular del receptor 78 kDa. Cultivos celulares de células HepG2, se marcaron con ^{35}S -Metionina durante toda la noche, las membranas fueron obtenidas y se adicionaron dos diferentes cócteles de inhibidores de proteasas, "Complete" (C), y Preparado. (P). Posteriormente fueron solubilizadas, con Tritón X-100, e inmunoprecipitadas con el antisuero anti-78 KDa. Los antígenos precipitado se resolvieron por SDS-PAGE (acrilamida al 8%) en condiciones reductoras y visualizados por fluorografía.

IDENTIFICACIÓN DE ORGANELOS POR FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

Con el fin de obtener información acerca de la localización y ruta de transporte del receptor 78 kDa, el sobrenadante post-nuclear de células HepG2 fue fraccionado en gradientes de densidad con Percoll. Para localizar las fracciones que contienen lisosomas, Golgi, retículo endoplásmico y membrana plasmática en el gradiente con Percoll, se determinaron las actividades de hexosaminidasa, manosidasa neutra, glucosidasa neutra y fosfodiesterasa alcalina que son enzimas marcadoras para cada uno de los organelos. Como se muestra en la figura 6, la mayor parte de la actividad de hexosaminidasa se encuentra en la parte inferior del gradiente, en las fracciones 2-5 cuya densidad es de 1.07-1.09 g/ml. Previamente se ha mostrado que en estas fracciones se ubican lisosomas secundarios [70]. En tanto la actividad para glucosidasa, manosidasa, fosfodiesterasa alcalina se localiza en las mismas fracciones, en la parte superior del gradiente (fracciones 16-20) que corresponde a una densidad de 1.04 g/ml. Un pico pequeño de hexosaminidasa se sobrelapa en esta misma densidad, esta actividad se debe a la presencia de una pequeña cantidad de hexosaminidasa microsomal [75]. Por ultimo, una reducida actividad de cada uno de

los marcadores se localiza en la parte más alta del gradiente (fracciones 22-25) que corresponde a las sustancias solubles que se liberan de los diferentes organelos que se lisan al homogeneizar las células (Figura 6).

Para determinar en que fracciones se encuentran los endosomas tempranos y tardíos, se utilizó a la peroxidasa de rábano (HRPasa) que es endocitada a hepatocitos por un proceso de pinocitosis fluida. Primero, para conocer la ubicación de los endosomas tempranos, los cultivos fueron incubados en presencia de HRPasa (5mg/ml) durante 15 minutos a 37°C. Bajo estas condiciones la mayor parte de la HRPasa se detectó en las fracciones 16-20 cuya densidad es de 1.04 g/ml (Figura 6), en estas fracciones se localizan también las membranas plasmáticas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi [76]. Es sabido que cuando las células se colocan a temperaturas de 16 a 20°C no permiten que las moléculas endocitadas sean transportadas a lisosomas. Por ende, después que los cultivos fueron incubados en presencia de HRPasa 15 minutos a 37°C, los cultivos se incubaron en ausencia de la peroxidasa por 60 minutos (caza) a 20°C. Bajo estas condiciones, una pequeña fracción de peroxidasa se desplazó desde la fracción con densidad ligera, a las fracciones con una densidad más alta (10-15), pero no es transferida a lisosomas (Figura 6). Si después de incubar a los cultivos en presencia de peroxidasa 15 minutos a 37°C, estos mismos se incubaron en ausencia de HRPasa a 37°C por varios periodos de tiempo y después fraccionados, la marca se desplaza a fracciones de mayor densidad. Esto es, después de una caza de 60 minutos, la marca aparece en fracciones 6-7 en las que se encuentran los prelisosomas. Si la caza se prolonga 2 horas, la HRPasa se puede ubicar en lisosomas (fracciones 2-5, figura 6).

En suma, en esta serie de experimentos se puede observar que la peroxidasa endocitada por un proceso de pinocitosis fluida, sigue la vía endocítica de transporte, es decir; una vez que es endocitada sé transporta desde endosomas tempranos (fracciones 16-20) a endosomas tardíos (fracciones 10-15), seguido a prelisosomas (fracciones 6-7) y finalmente a las fracciones de mayor densidad (fracciones 2-5) donde se ubican los lisosomas.

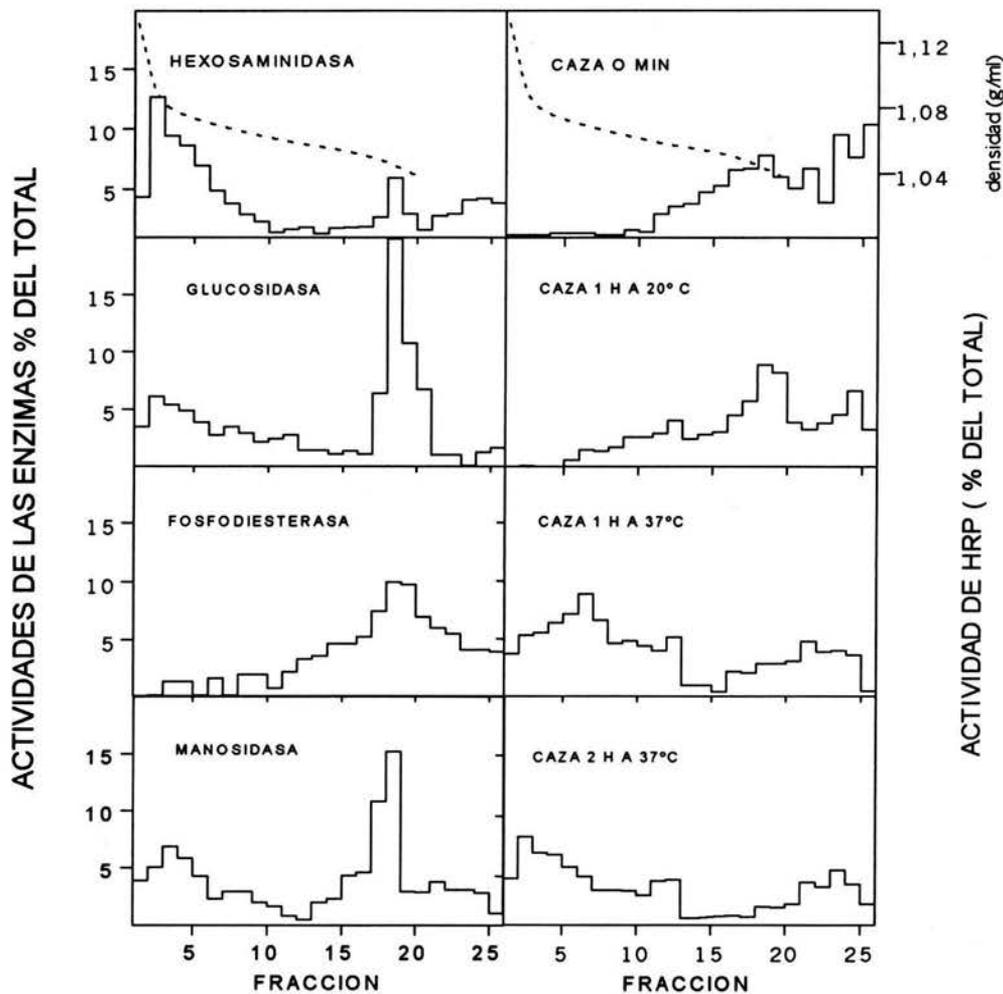


Figura 6. Identificación de organelos endocíticos en el primer fraccionamiento subcelular con Percoll. Cultivos de células HepG2 se incubaron con HRPasa (5mg/ml) bajo las siguientes condiciones. Después de varios lavados con PBS, las células fueron homogeneizadas y centrifugadas a 700g por 10 minutos. El sobrenadante posnuclear (SPN) resultante se fraccionó por gradiente de densidad con Percoll. Los marcadores enzimáticos y la HRPasa contenida en cada una de las fracciones fueron determinados. La columna izquierda muestra la distribución de los diferentes marcadores enzimáticos: hexosaminidasa (lisosomas), glucosidasa (retículo endoplásmico), manosidasa (Golgi) y fosfodiesterasa alcalina (membrana plasmática). La columna derecha representa la distribución de HRPasa. Las células se incubaron con HRPasa durante 15 minutos (pulso) y cazadas a tiempo cero, 1 hora a 20°C, y durante 1 y 2 h a 37°C.

LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DEL RECEPTOR 78 KDa

Previamente González-Noriega *et al.*, 2003 (manuscrito sometido a publicación) determinaron la distribución de los receptores 78 kDa y CI-MPR en dos líneas celulares diferentes (Clona 9 y H4. En ambas líneas celulares el receptor CI-MPR fue localizado principalmente en las fracciones donde se localiza el aparato de Golgi, endosomas tardíos y en menor cantidad en las fracciones que corresponden a lisosomas ligeros o prelisosomal. Por el contrario, el receptor 78 kDa se ubicó en cuatro diferentes fracciones. Cerca del 40 o 50% del receptor es localizado en la parte más baja del gradiente de Percoll (fracciones 1-5). Cantidades menores fueron detectadas en fracciones cuya densidad es de 1.07 y 1.05 g/ml, fracciones en la que se encontrarían la fracción prelisosomal y los endosomas tardíos. Por último solamente se encontraron trazas del receptor en las fracciones en que migra el retículo endoplásmico, endosomas tempranos, las membranas plasmáticas y el Aparato de Golgi. Estos resultados sugieren que aunque el receptor 78 kDa puede coincidir con el receptor CI-MPR en la fracción endosomal, ambos receptores están enriquecidos en diferentes fracciones.

En este trabajo, nosotros corroboramos estos resultados en las células HepG2 mediante fraccionamiento subcelular. Para descartar la posibilidad de que el receptor 78 kDa, presente en las fracciones 1-5 esté en lisosomas, el sobrenadante post-nuclear de estas células, se incubó en presencia de glycil-L-phenylalanine 2-naphthylamide (GPN) a una concentración de 300 μ M durante 10 minutos a 37°C. El GPN es un sustrato para catepsina C, que selectivamente rompe a los lisosomas pero no a endosomas [74]. Como se muestra en la figura 7 A, el pico principal del marcador para lisosomas (β -hexosaminidasa) se encuentra en el fondo del gradiente (fracciones 2-5) en homogenizado no tratados. Sin embargo, cuando el homogenizado se incubaba en presencia de GPN, la distribución de β -hexosaminidasa en el gradiente cambió, encontrándose que la principal actividad se localiza en la parte superior del gradiente, donde se tienen las sustancias solubles (figura 7 A). Anteriormente se mostró, que cuando la HRPasa sé endocita por un periodo de 2 horas a 37°C, la mayor parte de la enzima llega a lisosomas (figura 8 B), cuando el homogenizado se trato con GPN, ahora la principal actividad de la enzima se encuentra en las fracciones altas del gradiente donde se localizan las sustancias solubles, cabe destacar que en las

fracciones donde se localizan los endosomas tardíos (fracciones 10-15) permanece básicamente sin cambio, lo cual corrobora las observaciones de Akasaki et al., [74] (Figura 7 B).

Al analizar la distribución del receptor 78 kDa en estos homogenizados tratados con y sin GPN por inmunoblot, y revelados por quimioluminiscencia, encontramos que en ambos casos la distribución es prácticamente la misma. Es decir; el receptor se distribuye principalmente en tres picos, el primero se encuentra en las fracciones donde se localizan los endosomas tardíos (19%), seguido de vesículas acarreadoras (18%), pero principalmente en las vesículas de alta densidad (Figura 8 A y B). Estos resultados confirman que el receptor no está en lisosomas, y sugiere que aquellas sustancias endocitadas por pinocitosis fluida no alcanzan a ser transportadas a las vesículas de alta densidad.

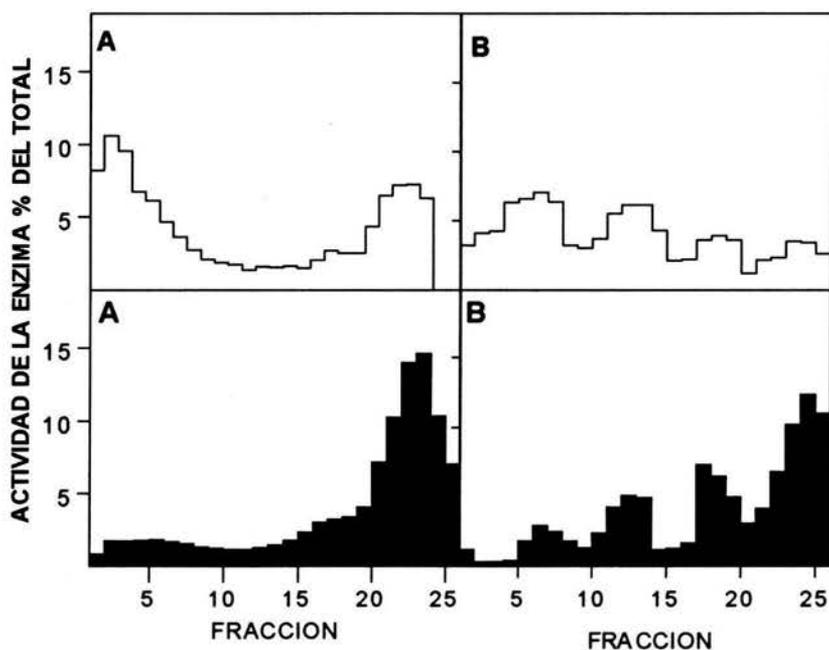
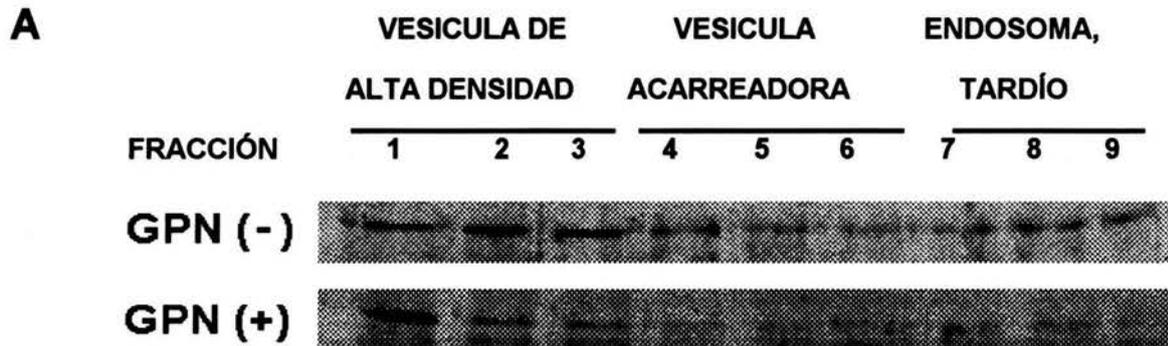


Figura 7. Ruptura selectiva de lisosomas con glycil-L-phenylalanine 2-naphtylamide (GPN). Sobrenadante postnuclear (SPN) de células HepG2 se incubó con 300 μ M de GPN en una solución isotónica durante 10 minutos a 37°C y fue fraccionado por centrifugación en gradiente de densidad con Percoll.

A) Distribución de la Hexosaminidas y B) HRPasa
 □) sin y ■) con GPN.



B

	VESICULA DE ALTA DENSIDAD	VESICULA ACARREADORA	ENDOSOMA TARDÍO	R.E., GOLGI, E.T., M.P.
RECEPTOR 78kD GPN (-)	45.2	21	16.2	17.3
GPN (+)	43.5	18.6	19.3	17.9

Figura 8. Distribución del receptor 78 kDa en células HepG2 tratadas con glycil-L-phenylalanine 2-naphtylamide (GPN). Sobrenadante postnuclear (SPN) se incubó con 300µM de GPN en una solución isotónica durante 10 minutos a 37°C y después fue fraccionado por centrifugación en gradiente de densidad con Percoll.

A) Blots de fracciones obtenidas del SPN tratadas en presencia (+) o ausencia (-) de GPN.

B) Los Blots del panel A se cuantificaron por densitometría óptica y la cantidad del receptor 78 kDa en cada tres fracciones se expresó como porcentaje del total

TRANSPORTE INTRACELULAR DEL RECEPTOR 78 KDa SINTETIZADO DE NOVO.

Dado que al fraccionar las células en gradientes de Percoll al 30% no se logra la separación de retículo endoplásmico, Golgi, membrana plasmática y endosomas tempranos, las fracciones 16-20 del primer gradiente se juntaron y se fraccionaron en otro gradiente de Percoll al 15%. En este segundo gradiente, la α -glucosidasa neutra (marcador para retículo endoplásmico) se localiza en el fondo del gradiente (fracciones 1 y 2, figura 7). La fosfodiesterasa alcalina, marcador para la membrana plasmática, se ubica en la parte superior del mismo gradiente (fracciones 17-20). Sin embargo, bajo estas condiciones no se puede separar el complejo de Golgi y los endosomas tempranos (Figura 7).

En suma, después del fraccionamiento subcelular se tomaron las fracciones 1-5, 6-9, 10-15, del primer gradiente; y las fracciones 1-3, 8-12 y 15-19 del segundo gradiente como lisosomas, vesículas acarreadoras, endosomas tardíos, retículo endoplásmico, Golgi-endosomas tempranos, y membrana plasmática respectivamente, para la determinación la ruta de transporte, así como la ubicación intracelular del receptor.

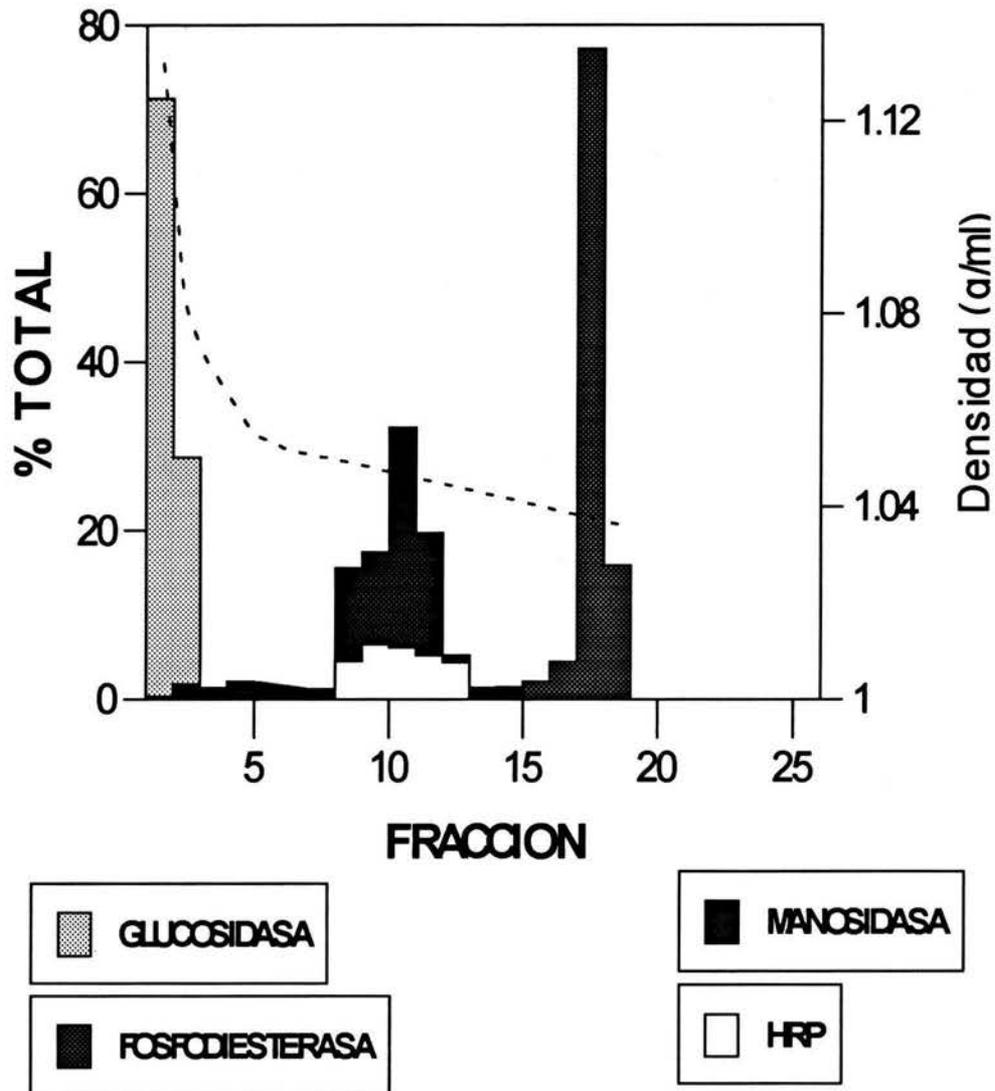


Figura 9. Segundo fraccionamiento subcelular por gradiente de densidad con Percoll. Las fracciones 16-20 obtenidas del primer gradiente de densidad con Percoll (figura 6), se juntaron y fraccionaron en un segundo gradiente de densidad con Percoll al 15%. Las fracciones se colectaron por desplazamiento del flujo a partir del fondo. Los actividades enzimáticas, de glucosidasa (▨), manosidasa (■), HRPasa (□) y fosfodiesterasa alcalina (■), que representan a los marcadores de retículo endoplásmico, Golgi, endosomas tempranos y membrana plasmática fueron determinadas.

Una vez que establecimos las condiciones que permiten separar los organelos subcelulares, en gradientes de densidad con Percoll, se procedió a identificar la ruta de transporte del receptor 78 kDa, desde su sitio de síntesis en el retículo endoplásmico hasta su destino final.

Para este fin, se realizaron experimentos de pulso y caza, seguido de fraccionamiento subcelular e inmunoprecipitación. Las células fueron marcadas con ^{35}S -metionina a 37°C durante 15 minutos y seguidamente incubadas con metionina no radioactiva de 0-240 minutos. Las células fueron homogenizadas, y la fracción post nuclear fue fraccionada en dos gradientes de Percoll. Las fracciones 1-5, 6-9, 10-15 del primer gradiente y 1-3, 8-12 y 15-19 segundo gradiente, se utilizaron para determinar el contenido del receptor 78 kDa en vesículas de alta densidad, prelisosomas, endosomas tardíos, retículo endoplásmico, Aparato de Golgi junto con endosomas tempranos y las membranas plasmáticas respectivamente. El receptor 78 kDa fue inmunoprecipitado y analizado por SDS-PAGE y fluorografía.

Como se muestra en la Figura 10, al término de los 15 minutos de pulso, alrededor del 71% del receptor se localiza en retículo endoplásmico, 17% en el Aparato de Golgi y/o en endosomas tempranos, 8 % en endosomas tardíos y 4% en la membrana plasmática. Debido a que con la metodología utilizada no se separa el complejo de Golgi de los endosomas tempranos y que el receptor no sufre modificaciones postraduccionales aparentes (glicosilación o cortes en la cadena peptídica) no se ha podido establecer el tiempo de llegada y salida del complejo de Golgi y endosomas tempranos. Los resultados obtenidos sugieren que la velocidad media de salida del receptor del retículo endoplásmico es de 5 minutos y asumimos que el receptor pasaría también rápidamente a través de Golgi, ya que al finalizar el pulso de 15 minutos, ya se puede localizar la marca en endosomas tardíos. Alternativamente, dado que la máxima marca en endosomas tardíos aparece al mismo tiempo en el complejo de Golgi/endosomas tempranos, se puede asumir que el receptor al salir de Golgi puede ser dirigido bien a endosomas tempranos o bien a endosomas tardíos. La curva de campana que se genera al estudiar el paso del receptor a través de Golgi/endosomas tempranos y tardíos sugiere que son compartimentos transitorios en su ruta de transporte. El tiempo medio de permanencia del receptor en su conjunto en estos dos compartimentos (endosomas tempranos y tardíos) sería de menos de 70 minutos, llegando prácticamente a cero (Figura 10).

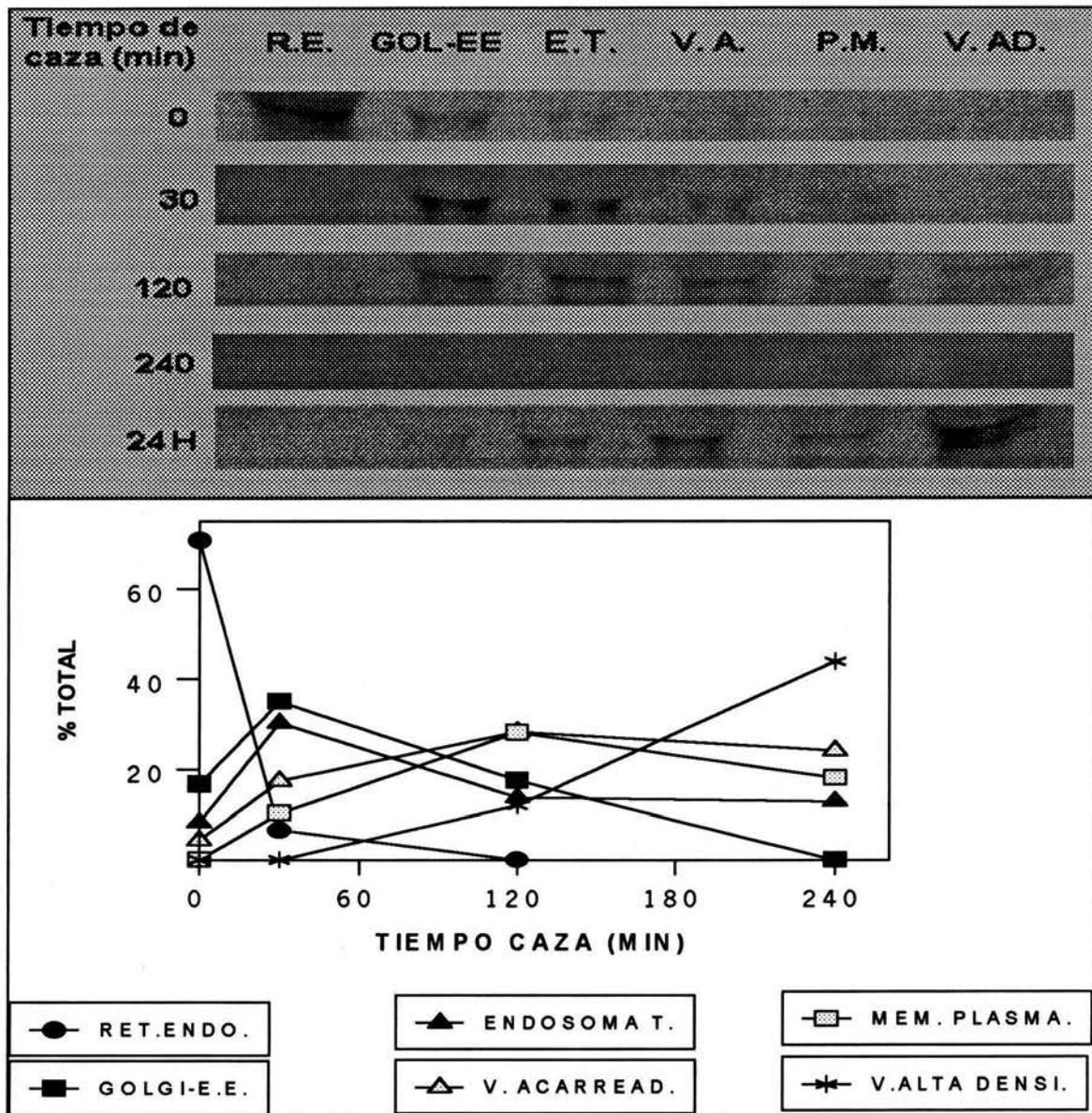


Figura 10. Distribución subcelular del receptor 78 kDa. Cultivos celulares de HepG2 fueron pulso-marcados con ^{35}S -Metionina y cazadas a diferentes periodos de tiempo. Después de cada uno de los periodos de caza, el SPN fue separado por gradiente de densidad con Percoll y las fracciones que tiene cada uno de los organelos (figuras 6 y 7) fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo Rb 421 anti-78 kDa, y entonces resuelto por SDS-PAGE y visualizado por fluorografía, Arriba) Blot de fracciones obtenidas después del tiempo de caza establecidos. Abajo) Gráfica que representa la cuantificación por densitometría óptica del blot de arriba y es expresada en porcentaje del total. RE: Retículo endoplásmico, GOL-E.E.: Golgi-endosomas, ET: Endosoma Tardío, VA: Vesícula Acarreadora, PM: Membrana Plasmática, V. AD.: Vesícula de Alta Densidad.

Al examinar la cinética de aparición del receptor en la membrana plasmática se puede observar que la marca se incrementa rápidamente después de que se retiró el marcaje de proteínas y alcanza un máximo de 28% a los 120 minutos de la caza ($t_{1/2}$ 40 minutos), seguidamente disminuye sin desaparecer. En condiciones de equilibrio se observa que aproximadamente el 13% de la marca se encuentra en la membrana plasmática. Estos resultados sugieren que el receptor una vez que sale del Aparato de Golgi posiblemente pasa a través de los endosomas tempranos antes de llegar a la membrana plasmática (Figura 10).

Como es sabido, los endosomas secundarios son parte de la vía biosintética, por lo que la mayoría de las proteínas sintetizadas *de novo* son transportadas directamente desde el Aparato de Golgi a los endosomas tardíos. En la Figura 10 se puede detectar que un 8% de la marca incorporada al receptor se encuentra en endosomas tardíos al momento de iniciarse la caza. La cantidad de marca ligada al receptor se incrementa a 30% ($t_{1/2}$ =15min) de iniciado el período de caza, seguidamente la marca se reduce y se mantiene a 19%, cantidad que es muy similar a la observada en condiciones de equilibrio, lo cual sugiere que el receptor que se encuentra en este compartimento podría estar en equilibrio con otros organelos relacionados a endosomas tardíos. Posiblemente el receptor que sale de endosomas tardíos es transportado a las vesículas prelisosomales (acarreadoras). Aunque al inicio de la caza se detecta que 4% la marca ya se encuentra en estas vesículas, la marca incorporada al receptor se incrementa hasta alcanzar el 28% del total ($t_{1/2}$ =25min). El porcentaje de marca ligada al receptor se mantiene en este rango aún en condiciones de equilibrio. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que el receptor que sale de los endosomas tardíos podría ser transportado a las vesículas acarreadoras; por otra parte, el contenido de estas vesículas posiblemente y debido a reciclamiento está en equilibrio con los endosomas tardíos y con las vesículas de alta densidad (Figura 10). Por último, al analizar la cinética de llegada del receptor a las vesículas de alta densidad, se puede observar que después de un período de retraso de 30 minutos posterior al inicio de la caza, la cantidad de receptor que llega a este compartimento se incrementa rápidamente hasta alcanzar un máximo de 44% a los 240 min. ($t_{1/2}$ =130min). En condiciones de equilibrio llega hasta 50%, sugiriendo que este compartimento aunque es el final de una vía de transporte, el receptor no permanece en forma definitiva en este compartimento, esto es; el receptor puede reciclar con los

compartimentos directamente asociados a las vesículas de alta densidad ya que cuando las células fueron tratadas con cloruro de amonio, existe una disminución drástica en la vesícula de alta densidad y un enriquecimiento en las demás vesículas (endosomas y vesícula de reciclaje) (Figura 11) .

COMPARTIMIENTO CELULAR	% TOTAL DE DENSITOMETRÍA			
	78kDa		CI-MPR	
	NH ₄ CL (3H)	+	-	+
RETICULO ENDOPLASMATICO	0.0	1.79	0.0	0.0
GOLGI-ENDOSOMA TEMPRANO	29.32	0.40	20.39	25.50
ENDOSOMA TARDIO	34.32	10.92	52.94	44.29
VESICULA ACARREADORA	12.50	20.67	12.83	19.65
MEMBRANA PLASMATICA	23.84	13.08	8.82	10.46
VESICULA DE ALTA DENSIDAD	0.0	44.38	0.0	0.0

Figura 11. Redistribución de los receptores 78 kDa y CI-MPR en células tratadas con NH₄Cl. Los Cultivos celulares de HepG2 fueron incubados por tres horas con 50mM de NH₄Cl, posterior al marcaje con ³⁵S-metionina durante toda la noche, el SPN fue separado por gradiente de densidad con Percoll y las fracciones fueron inmunoprecipitadas con el anticuerpo correspondiente para cada receptor, y entonces resuelto por SDS-PAGE y visualizado por fluorografía.

LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DEL RECEPTOR 78 KDa, EN CULTIVOS CELULARES TRATADOS CON CLORURO DE AMONIO (NH₄Cl)

Estudios previos han demostrado que cuando cultivos celulares son tratados con agentes lisosomotróficos como monensina, cloroquina o cloruro de amonio (NH₄Cl) inhibe el reciclamiento de los numerosos receptores membranales, como ejemplo: los receptores para asialoglicoproteínas, α₂-macroglobulinas, LDL, y el CI-MPR, causando un acúmulo de estos en vesículas endocíticas y una disminución considerable de receptores en la membrana plasmática [77]. Basados en esta información, las células HepG2 fueron pulso-marcadas con ³⁵S-Metionina durante toda la noche e incubadas durante tres horas en presencia o ausencia de cloruro de amonio y entonces fraccionadas en gradientes de Percoll seguido de inmunoprecipitación. Geuze *et al.*, [45] ha reportado que en células HepG2 el CI-MPR se localiza principalmente en endosomas tardíos. Para confirmar dicha observación las fracciones del gradiente se inmunoprecipitaron, con el anticuerpo anti-CI-MPR, y se corroboró que efectivamente el CI-MPR está concentrado en endosomas tardíos en los controles (figura 11); como se esperaba cuando las células son tratadas con cloruro de amonio, la distribución del receptor CI-MPR cambia, concentrándose aún más en endosomas tardíos, seguido de una desaparición paralela en Golgi (figura 11). Por otra parte, como mostramos anteriormente, el receptor de 78 KDa en estado de equilibrio se localiza principalmente en vesícula de alta densidad y en menor cantidad en endosomas y membrana plasmática. En células tratadas durante 3 horas con NH₄Cl, el receptor 78 kDa se redistribuye, saliéndose de la vesícula de alta densidad (donde está enriquecido) y viaja a endosoma tardío, Golgi y/o endosoma temprano (como mostramos anteriormente no se separan) y a la membrana plasmática (figura 11) Estos resultados sugieren que el receptor está reciclando de la vesícula de alta densidad al endosoma tardío y a la membrana plasmática donde posiblemente este internalizando aquellas enzimas lisosomales, que son secretadas cuando existe una mutación en la enzima responsable de adicionar la señal de manosa o del receptor CI-MPR.

DISCUSIÓN

La β -glucuronidasa posee dos marcadores de reconocimiento por medio de los cuales puede ser endocitada y transportada a lisosomas por fibroblastos humanos. Uno de estos marcadores es el de Man6-P que es reconocido por el receptor CI-MPR. El otro marcador, un triptófano modificado postraduccionalmente es reconocido por una proteína de 78 kDa [66]. Esta proteína es un receptor capaz de endocitar a la β -glucuronidasa bovina ya que anticuerpos dirigidos en su contra bloquean su función endocítica. Estudios previos para determinar su peso molecular en SDS-PAGE en presencia de mercaptoetanol muestran dos bandas, una con peso molecular de 78 y la otra de 72 kDa. En inmunoblots ambas formas son capaces de reconocer a la β -glucuronidasa bovina [66]. Con el fin de iniciar a comprender la función de este receptor, en este trabajo se ha estudiado su biosíntesis y su vía de transporte desde su sitio de síntesis hasta los organelos en los que posiblemente realiza su función.

BIOSÍNTESIS

Los estudios de biosíntesis tuvieron la finalidad de evidenciar, si el receptor 78 kDa es sintetizado como una proteína que sufre cambios postraduccionales o bien que esté formado por dos péptidos diferentes. Los resultados obtenidos indican: a) que el receptor es una proteína cuyo peso molecular aparente es modificado por la presencia de Tritón X-100, b) se observan dos bandas cuando las células son lisadas y el receptor extraído con SDS o Tritón X-100, c) la presencia de las bandas se obtienen aún cuando la lisis se efectúa con dos diferentes cócteles de inhibidores de proteasas, d) experimentos de pulso y caza no muestran que exista una alteración en el peso molecular de las dos bandas, sin embargo hay un enriquecimiento en la de mayor peso, y e) la inhibición de la adición de cadenas glicosídicas con tunicamicina, sugiere que esta proteína no sufre modificaciones postraduccionales.

Estudios previos realizados por González Noriega et al., [66], evidenciaron que el peso molecular del receptor 78/72 kDa varía dependiendo el método utilizado para eliminar el Tritón X-100 durante el proceso de purificación del receptor. Nuestros resultados confirmaron esta observación ya que cuando el receptor se extrajo con Tritón X-100 el peso molecular aparente se modifica según la concentración de dicho detergente contenido en cada muestra; siendo más afectado cuando la concentración

es mayor. Este efecto causado por el detergente no es único para el receptor 78 kDa, por ejemplo; la proteína relacionada a tirosina (TRP1) que es una proteína integral de la membrana del melanosoma, también afecta su movilidad electroforética cuando se extrae con detergentes no iónicos (entre ellos el Tritón X-100). Se sugiere que debido a su hidrofobicidad, el Tritón X-100 tiende a unírsele muy fuertemente a las regiones hidrofóbicas de la proteína, formando complejos proteína-detergente, que provoca alteraciones en su peso molecular aparente cuando es separada por SDS-PAGE. El mismo autor propone que es debido a la preservación de diferentes conformaciones que adquiere la proteína, aún a pesar de la presencia de altas concentraciones de SDS en el amortiguador de muestra, y que no se puede desplazar totalmente al detergente no iónico unido a la proteína [78].

La proteólisis en las cadenas peptídicas y la glicosilación son ejemplos típicos de modificaciones postraduccionales que ocurren para que se lleve a cabo la maduración de proteínas durante su transporte intracelular. Estas modificaciones postraduccionales se pueden evidenciar mediante experimentos de pulso y caza. Generalmente a tiempos cortos de caza, la proteína se encuentra en el retículo endoplásmico como forma precursora, y una vez que la proteína llega a la región de Golgi cambia de peso molecular (madura). Basados en esta información y debido a que el receptor 78 kDa se inmunoidentifica como dos péptidos (78 y 72 kDa), nos enfocamos a determinar si alguna banda se debe a un cambio postraducciona. La evidencia obtenida en este trabajo muestra que la doble banda asociada al receptor, al parecer no es resultado de un procesamiento intracelular, como corte en su cadena peptídica o adición de oligosacáridos ya que ambas bandas están presentes en retículo endoplásmico, y permanecen sin cambio a su paso por Golgi. Es decir, que no existe una transición de forma precursora a madura, como sucede con otras proteínas lisosomales (catepsina D, L, etc.) o el péptido H1 que es una subunidad del receptor para asialoglicoproteínas que se sintetiza como un precursor de 40 kDa y que madura a 46 kDa después de su paso por Golgi, es decir; este cambio se debe a la adición de oligosacáridos. Más interesante aún, este receptor está constituido por dos péptidos (H1 y H2) que se modifican y transportan de manera similar a la membrana plasmática, y que solo cuando se dimerizan conforman al receptor que es capaz de unir a su ligando [79]. Sin embargo este fenómeno al parecer no ocurre con el

receptor en estudio; debido a que existe una inconsistencia en la aparición de la doble banda, es decir; en algunos experimentos de pulso y caza, solo se observaba una banda y en otros dos. Estos resultados más bien nos indican que posiblemente se trata de algún artificio que se genera cuando se manipula la muestra que aún no hemos podido identificar. Otra especulación, que podría explicar la existencia de la doble banda, es que existen innumerables evidencias de proteínas que se sintetizan como isoformas que provienen de una misma secuencia génica, cuyo peso molecular puede variar ligeramente entre ambas proteínas, y puede hacerse evidente tan solo con someterlas a SDS-PAGE. Un ejemplo de este caso es proporcionado por una proteína integral de membrana de las caveolas llamada caveolina. Anticuerpos dirigidos en su contra muestran dos bandas, una de 24 y otra de 21 kDa. Al analizar si ambas bandas están relacionadas a un proceso de maduración y que alguna se debe a un precursor, se encontró que ambas bandas se localizan tanto inmediatamente después de su síntesis, así como en el estado de equilibrio [80]; más aún, el análisis sobre su secuencia peptídica indica que se trata de isoformas, cuya diferencia sólo radica en algunos aminoácidos en el extremo amino terminal.

No obstante, a que la existencia de la doble banda se pueda explicar por los fenómenos anteriores, cabe señalar que aún no se descarta la posibilidad de que ambas bandas sean el resultado de una proteólisis por alguna proteasa al momento de manipular la muestra, ya que aún cuando se utilizan dos cócteles de inhibidores de proteasas de amplio espectro, estos no son capaces de inhibir a todas las proteasas y abre la posibilidad de que sea una sola proteína que sufre corte proteolítico por proteasas.

En suma, aún no podemos determinar si el receptor 78 kDa está formado por uno o dos péptidos diferentes ya que tenemos evidencias en ambos sentidos: 1) podría tratarse de un péptido, debido a que ambas bandas se modifican por igual con Tritón X-100, ambas bandas tienen actividad ya que unen a su ligando, 2) de dos péptidos, no es una proteína asociada, ambas bandas están presentes inmediatamente después de su síntesis y en el estado de equilibrio. Por todo lo anterior, a futuro se deberá de secuenciar los amino terminales de ambas bandas encontradas, o clonar el gen que codifica para dicho receptor, lo cual permitirá determinar con exactitud si ambas bandas son o no péptidos diferentes.

RUTA DE TRANSPORTE DEL RECEPTOR 78 KDA

Generalmente es aceptado que los receptores membranales que se encargan de transportar proteínas, se encuentran en mayor cantidad en aquel compartimento en el que inician el acarreo de una determinada proteína. De esta forma, el receptor CI-MPR que transporta enzimas lisosomales desde Golgi a endosomas, o desde la membrana plasmática a endosomas, se halla en mayor cantidad en el aparato de Golgi, seguido de la membrana plasmática y por último en endosomas [81]. Siguiendo este principio, González-Noriega *et al.*, (manuscrito sometido a publicación) evidenciaron que en dos líneas celulares diferentes (H4 y clona 9) los receptores CI-MPR y 78 kDa están enriquecidos en compartimentos celulares diferentes, y que sólo una pequeña fracción de ambos receptores comparten los mismos organelos. El receptor CI-MPR está enriquecido en Golgi, organelo en el que se identifica a las enzimas lisosomales y en menor cantidad en endosomas tardíos, en los que se lleva a cabo la disociación del complejo enzima-receptor. Por el contrario el receptor 78 kDa se ubicó en cuatro fracciones diferentes. Cerca del 40 - 50% del receptor está localizado en la parte más baja del gradiente de Percoll (fracciones 1-5). Cantidades menores fueron detectadas en fracciones cuya densidad es de 1.07 y 1.05 g/ml, fracciones en las que se encontrarían la fracción prelisosomal y los endosomas tardíos. Por último, solamente se encontraron trazas del receptor en las fracciones en las que migra el retículo endoplásmico, endosomas tempranos, las membranas plasmáticas y el aparato de Golgi. Estos resultados sugirieron que aunque el receptor 78 kDa puede coincidir con el receptor CI-MPR en la fracción endosomal, se encuentra más enriquecido en las fracciones del fondo del gradiente, que son más densas que los lisosomas y una cantidad sobrelapada con lisosomas. Cuando analizaron si el receptor estaba ubicado con la fracción lisosomal, (utilizando un segundo gradiente de densidad con Percoll al 68%), encontraron que el receptor solo se localiza en las vesículas de mayor densidad donde no existen hidrolasas ácidas y por ende los lisosomas están ausentes.

Nuestro análisis sobre la distribución del receptor 78 kDa en la línea celular de HepG2 por fraccionamiento subcelular e inmunoblot es consistente con las observaciones anteriores. Esta valoración se basó en la cuantificación del receptor 78 kDa en cada una de las fracciones obtenidas del fraccionamiento subcelular, encontrando que se

distribuye en cuatro picos principales, el primero se localiza en las fracciones más ligeras del gradiente (fracciones 16-18), y dos picos en las partes medias del gradiente que corresponden a endosomas y vesícula acarreadora, pero el pico principal está ubicado en el fondo del gradiente, que denominamos vesículas de alta densidad (figura 10), las cuales hasta el momento no se han caracterizado. Hasta ahora solo Yeyeodu et. al., [82] estudiando el transporte de procathepsina L, ha reportado que esta proenzima se localiza en pequeñas vesículas cerca de la membrana plasmática y en cuerpos multivesiculares. Dichas vesículas al separarlas en gradientes de densidad con sacarosa, curiosamente son más densas que los lisosomas y no comigran con proteínas marcadoras de retículo endoplásmico, Golgi, endosomas y lisosomas. Sin embargo aún no podemos determinar si estas vesículas son similares a las encontradas en nuestro laboratorio.

En general, la ruta de transporte de retículo endoplásmico a Golgi es compartida para la mayoría de las proteínas, tanto para las que son destinadas a secreción, así como para aquellas cuyo destino final es un organelo intracelular.

El estudio de la ruta de transporte intracelular del receptor 78 kDa, indica que éste es transportado rápidamente del retículo endoplásmico al complejo de Golgi, con un tiempo de vida media de 5 minutos. Aún no se ha podido establecer el tiempo de permanencia del receptor en el Golgi, pero podemos asumir que es menor a 30 minutos. Desafortunadamente no se puede establecer si hay dos vías de transporte después del Golgi debido a que con la metodología empleada no es posible separar endosomas tempranos de Golgi. No obstante a lo anterior, podemos asumir que después de su biosíntesis, el receptor 78kDa es transportado al complejo de Golgi y probablemente de aquí a endosomas tempranos y tardíos, debido a que la cantidad identificada del receptor en ambos compartimentos es muy similar. Seguidamente el receptor 78 kDa disminuye rápidamente de 30 a 120 minutos de caza en los endosomas tempranos y tardíos, después de que la cantidad del receptor 78 kDa permanece casi constante hasta 70 minutos; sin embargo, a diferencia de los endosomas tempranos, en los endosomas tardíos, la cantidad del receptor no desaparece y se mantiene en un 19%, lo que sugiere que en este organelo el receptor puede estar en equilibrio con otros compartimentos.

Al estudiar la llegada del receptor en la membrana plasmática, se observó que su aparición máxima es a los 120 minutos con una vida media de 40 minutos, considerando que la cantidad del receptor en la membrana plasmática en estado de equilibrio es de 13%, sugiere que después de Golgi, el receptor primero es transportado a endosomas antes de alcanzar a la membrana plasmática (figura 10). Siguiendo con la cinética de transporte, después de que el receptor 78 kDa deja al endosoma tardío, se dirige a una vesícula de alta densidad, pasando por vesículas intermedias o acarreadoras, y que en condiciones de equilibrio alcanza una cantidad de 50%, la cinética de llegada del receptor 78 kDa a la vesícula de alta densidad, alcanza un máximo de 44% en un tiempo de 240 minutos.

Como se describió anteriormente, el receptor 78 kDa sintetizado *de novo* es transportado a la vesícula de alta densidad por al menos dos rutas, una que va de Golgi, a los endosomas tardíos y de aquí a la membrana plasmática, al parecer pasando por los endosomas tempranos (figura 12). Este mecanismo de transporte es consistente con algunas enzimas lisosomales, cuyo transporte es independiente de los receptores MPRs. Varias observaciones sugieren que el tráfico de las glicoproteínas (Lamp-1 y catepsina D,) que se transportan al lisosoma, es mediado por mecanismos diferentes al de las hidrolasas solubles [74, 62]. Se ha sugerido que estas hidrolasas pueden ser transportadas por dos rutas para alcanzar a lisosomas. En una de estas rutas, las hidrolasas ácidas son primero transportadas a la membrana plasmática, a través de los endosomas tardíos y tempranos, y entonces internalizadas por endocitosis. Sin embargo, cabe señalar que la ruta de transporte principal de la Lamp-1 va del TGN a endosomas tardíos y de aquí a los lisosomas sin pasar a la membrana plasmática, junto con las hidrolasas solubles [52].

Por otra parte, comparando el transporte del receptor 78 kDa con el receptor CI-MPR, indica que dos mecanismos diferentes operan para su transporte, con algunos puntos en común, es decir; la ruta de transporte que va de complejo de Golgi hacia endosomas tardíos, hasta llegar a la membrana plasmática es similar para ambos receptores. Nuestra propuesta es que el receptor 78 kDa utiliza esta ruta para llegar a la membrana plasmática en donde lleva a cabo la endocitosis hidrolasas ácidas. Esta hipótesis se basa en las siguientes observaciones, a) el receptor es capaz de endocitar por lo menos a una enzima lisosomal (la β -glucuronidasa), b) Existen

evidencias que indican que cuando la procathepsina D es sobre expresada, es secretada, y endocitada por las mismas células por un receptor membranal saturable diferente al los MPRs, [64] cuya naturaleza es desconocida, y cabe la posibilidad que sea el receptor 78 kDa responsable de endocitar a dicha enzima.

En la otra ruta de transporte del receptor 78 kDa que es totalmente diferente al CI-MPR; es a partir de endosomas tardíos, y de aquí hacia las vesículas de alta densidad (figura 12), podría decirse que es una ruta alterna para el transporte de al menos hidrolasas ácidas. La pregunta que surge es ¿por qué la célula tiene otra ruta alterna? Una posible respuesta y no única, es que existen evidencias que indican que el receptor CI-MPR además de unir a las enzimas lisosomales, tiene afinidad por un amplio espectro de proteínas que contienen o no Man 6-P [83]. Dicha naturaleza multifuncional, podría de alguna manera explicar el porque de otros mecanismos de transporte para hidrolasas ácidas, ya que se ha evidenciado que el factor de crecimiento para insulina (IGF-II que juega un papel importante en el crecimiento de mamíferos) puede inducir alteraciones en la distribución del MPR, que se traduce en una reducción en la concentración del receptor en el complejo de Golgi, y además de que el receptor presente en éste está saturado con enzimas que tiene mayor afinidad [84,85]. Entonces proponemos que el receptor 78 kDa, está coadyuvando en el transporte de hidrolasas ácidas a través de una ruta alterna para mantener el equilibrio homeostático de enzimas lisosomales en la célula, mecanismo que posiblemente solo opere en ciertos órganos, o que sea célula tipo específico.

En conclusión, aparentemente la vesícula de alta densidad es el fin de una ruta, de la cual no conocemos su función (últimos datos muestran que cuando la β -glucuronidasa bovina es endocitada, no llega a vesículas de alta densidad, sin embargo si contiene a la Lamp II que también existe en lisosomas).

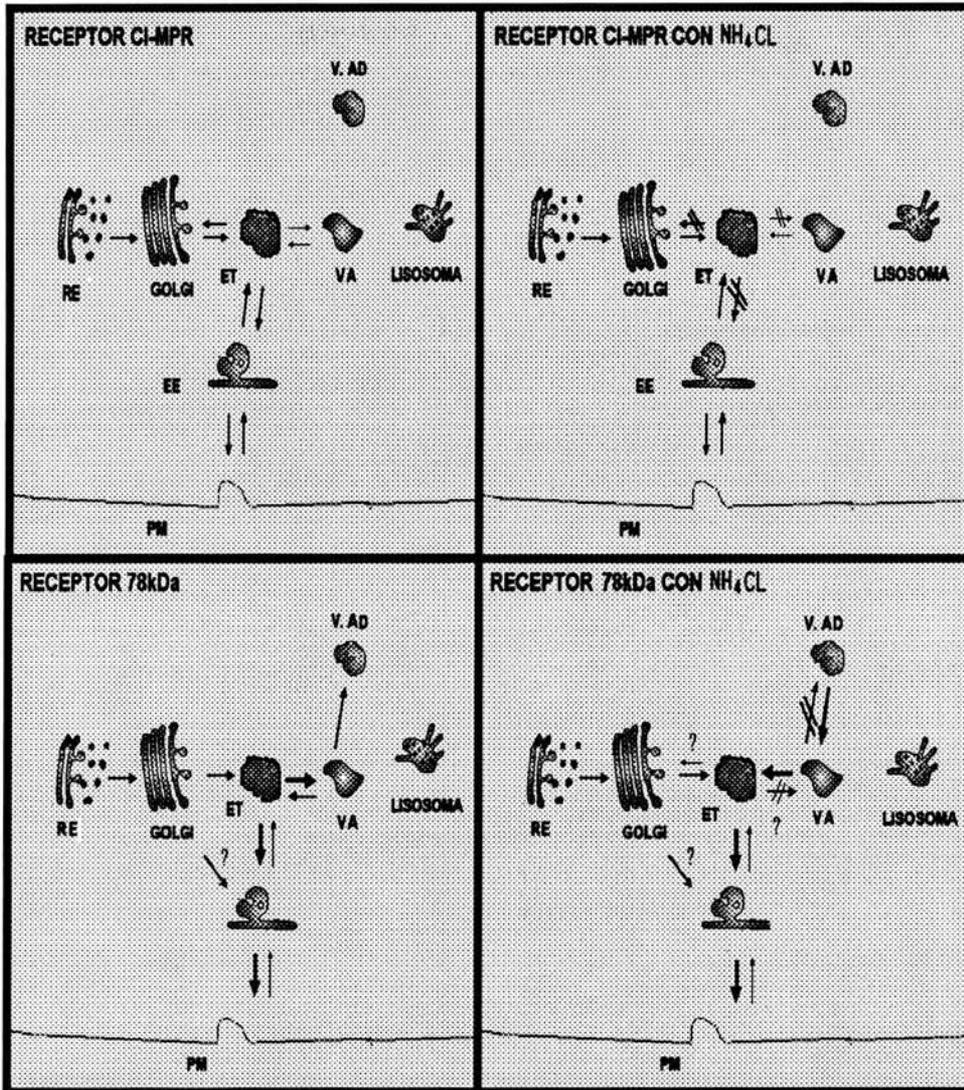


Figura 12. Representación esquemática de la ruta de transporte del receptor 78 kDa y el CI-MPR, en células HepG2, así como el efecto que tiene el NH_4Cl en su transporte. El receptor CI-MPR circula desde Golgi a endosomas, transportando a las hidrolasas ácidas entre estos dos compartimentos, el nuevo receptor 78 kDa después de su biosíntesis es transportado a Golgi, y de aquí sigue dos rutas. Una que va hacia endosomas tardíos, vesícula acarreadora y vesícula de alta densidad. La otra posiblemente a endosomas tempranos, membrana plasmática. RE: Retículo endoplásmico, GOL-E.E.: Golgi-endosomas, ET: Endosoma Tardío, VA: Vesícula Acarreadora, PM: Membrana Plasmática, V. AD.: Vesícula de Alta Densidad.

EFFECTO DEL CLORURO DE AMONIO.

Un original hallazgo, en el que en células tratadas con drogas lisosomotróficas, como cloroquina o cloruro de amonio, existe un aumento en la secreción de enzimas lisosomales, condujo a proponer que el transporte de enzimas lisosomales ocurre en una vía intracelular y que está mediado por un receptor [19]. Así mismo, se ha demostrado que con estos agentes se inhibe el reciclamiento de numerosos receptores endocíticos de diversos tipos celulares. Esto es, debido a que las aminos primarias al incrementar el pH endosomal y lisosomal evitan la disociación intracelular del complejo receptor-ligando y por ende el regreso del receptor libre a la membrana plasmática lo cual se traduce en una disminución en la endocitosis. Así mismo las aminos evitan su reciclamiento a Golgi, es decir con este experimento se pudo determinar que el receptor CI-MPR, tiene un flujo retrogrado entre los endosomas tardíos y el Golgi.

Aunque en el laboratorio se había observado que aminos primarias no tenían ningún efecto en la endocitosis de β -glucuronidasa mediada por el receptor 78 KDa en fibroblastos humanos, se decidió investigar un posible efecto de estas en la distribución intracelular del receptor. Encontramos que el cloruro de amonio provoca una redistribución del receptor 78 kDa, es decir que puede inhibir el transporte anterógrado del receptor 78 kDa desde el aparato de Golgi a endosomas tardíos, o de endosomas a las vesículas acarreadoras y por último a las vesículas de alta densidad. Por el contrario, aparentemente el transporte retrógrado no es afectado por lo que tiende a incrementarse en endosomas tardíos, tempranos y en la membrana plasmática (figura 12). Es decir en células tratadas con cloruro de amonio, el receptor 78 kDa se acumula principalmente en endosomas tardíos, golgi-endosomas tempranos y la membrana plasmática. Como mencionamos anteriormente el efecto de las aminos sobre el receptor CI-MPR, es una depleción en la membrana plasmática, sin embargo en el caso del receptor 78 kDa, dicho efecto es contrario ya que la cantidad de receptor aumenta y posiblemente su movimiento de la membrana plasmática a endosomas no se vea afectado. Este efecto podría explicar las observaciones anteriores en el sentido de que el cloruro de amonio no afecta la endocitosis de la β -glucuronidasa. Este resultado también se ha observado para una enzima lisosomal (LEP100), [77] donde el cloruro de amonio no afecta el transporte de

endosomas a la membrana plasmática, en cambio el transporte de lisosomas a endosomas si es afectado.

CONCLUSIÓN

1.- Aún no se puede establecer si las dos bandas inmunoidentificadas son o no peptidos diferentes, por lo que a futuro se deberán de realizar otro tipo de experimentos (por ejemplo clonar el gen que codifica para el receptor) lo cual permitirá establecer con precisión sí ambas bandas representan al receptor 78 kDa.

2).- El receptor 78 kDa no se glicosila, ya que su peso molecular aparente no se ve afectado cuando los cultivos fueron tratados con tunicamicina.

3).- El receptor 78 kDa se encuentra enriquecido en vesículas cuya densidad es mayor que la de lisosomas. Dichas vesículas aún no se han caracterizado, por lo que no se sabe cuál es su función. Experimentos recientes han mostrado que en ella se puede localizar a una proteína lisosoma (Lamp-II). Sin embargo aún se desconoce su naturaleza.

4).- La ruta de transporte del receptor 78 kDa es diferente al receptor CI-MPR, al parecer puede llegar a la vesícula de alta densidad de dos maneras: una ruta indirecta, ya que después de dejar al complejo Golgi se dirige a los endosomas tempranos y de ahí la membrana plasmática, para que después arribe a la vesícula de alta densidad. La otra que es directa; es decir después de salir del complejo Golgi del llega a endosomas tardíos, pasando por vesícula acarreadora hasta alcanzar la vesícula de alta densidad.

REFERENCIAS

1. De Duve, C. y Wattiaux, R., Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol*, 1966. **28**: 435-92.
2. Lloyd, J.B., Disulphide reduction in lysosomes. *Biochem J*, 1986. **237**(1): 271-2.
3. Lloyd, J.B., Lysosome biosynthesis, In *Subcellular Biochemistry*, P.P. Press, Editor. 1996: New York.
4. Dell'Angelica, E.C., Mullins, C., Caplan, S., Bonifacino, J.S., Lysosome-related organelles. *FASEB J*, 2000. **14**(10): 1265-78.
5. Gieselmann, V., Lysosomal storage diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1995. **1270**(2-3): 103-36.
6. Kornfeld, S., Trafficking of lysosomal enzymes. *FASEB J*, 1987. **1**(6): p. 462-8.
7. Portnoy, D.A., Innate immunity to a facultative intracellular bacterial pathogen. *Curr Opin Immunol*, 1992. **4**(1): 20-4.
8. Mullins, C. y Bonifacino, J.S., The molecular machinery for lysosome biogenesis. *Bioessays*, 2001. **23**(4): 333-43.
9. Neufeld, E.F. y Muenzer L., The mucopolysaccharidoses. eighth ed. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.*, ed. McGraw-Hill. Vol. 3. 2001, New York: Scriber CR, Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D. 3421-3452.
10. Neufeld, E.F., Sando, G.N., Garvin, A.J., Rome, L.H., The transport of lysosomal enzymes. *J Supramol Struct*, 1977. **6**(1): 95-101.
11. von Figura, K. y Weber, E., An alternative hypothesis of cellular transport of lysosomal enzymes in fibroblasts. Effect of inhibitors of lysosomal enzyme endocytosis on intra-and extra-cellular lysosomal enzyme activities. *Biochem J*, 1978. **176**(3): 943-50.
12. Hickman, S., Shapiro, L.J. y Neufeld, E.F., A recognition marker required for uptake of a lysosomal enzyme by cultured fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 1974. **57**(1): 55-61.
13. Hieber, V., Distler, J., Myerowitz, R., Schmickel, R.D., Jourdian, G.W., The role of glycosidically bound mannose in the assimilation of beta-galactosidase by generalized gangliosidosis fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976. **73**(3): 710-7.

14. Kaplan, A., Achord, D.T. y Sly, W.S., Phosphohexosyl components of a lysosomal enzyme are recognized by pinocytosis receptors on human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. **74**(5): 2026-30.
15. Natowicz, M.R., Chi, M.M., Lowry, O.H., Sly, W.S., Enzymatic identification of mannose 6-phosphate on the recognition marker for receptor-mediated pinocytosis of beta-glucuronidase by human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(9): 4322-6.
16. Rome, L.H., Weissmann, B. y Neufeld, E.F., Direct demonstration of binding of a lysosomal enzyme, alpha-L-iduronidase, to receptors on cultured fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(5): 2331-4.
17. Varki, A. y Kornfeld, S., Structural studies of phosphorylated high mannose-type oligosaccharides. *J Biol Chem*, 1980. **255**(22): 10847-58.
18. Sly, W.S., Fischer, H.D., Gonzalez-Noriega, A., Grubb, J.H., Natowicz, M., Role of the 6-phosphomannosyl-enzyme receptor in intracellular transport and adsorptive pinocytosis of lysosomal enzymes. *Methods Cell Biol*, 1981. **23**: 191-214.
19. Gonzalez-Noriega, A., Grubb, J.H., Talkad, V., Sly, W.S., Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling. *J Cell Biol*, 1980. **85**(3): 839-52.
20. Fischer, H.D., Gonzalez-Noriega, A. Sly, W.S., Beta-glucuronidase binding to human fibroblast membrane receptors. *J Biol Chem*, 1980. **255**(11): 5069-74.
21. Reitman, M.L. y Kornfeld, S., UDP-N-acetylglucosamine: glycoprotein N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. Proposed enzyme for the phosphorylation of the high mannose oligosaccharide units of lysosomal enzymes. *J Biol Chem*, 1981. **256**(9): 4275-81.
22. Varki, A.P., Reitman, M.L., Kornfeld, S., Identification of a variant of mucopolidosis III (pseudo-Hurler polydystrophy): a catalytically active N-acetylglucosaminylphosphotransferase that fails to phosphorylate lysosomal enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. **78**(12): 7773-7.
23. von Figura, K. y Hasilik, A., Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu Rev Biochem*, 1986. **55**: 167-93.
24. Reitman, M.L. y Kornfeld, S., Lysosomal enzyme targeting. N-Acetylglucosaminylphosphotransferase selectively phosphorylates native lysosomal enzymes. *J Biol Chem*, 1981. **256**(23): 11977-80.

25. Bao, M., Booth, J.L., Elmendorf, B.J., Canfield, W.M., Bovine UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal-enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. I. Purification and subunit structure. *J Biol Chem*, 1996. **271**(49): 31437-45.
26. Baranski, T.J., Faust, P.L., Kornfeld, S., Generation of a lysosomal enzyme targeting signal in the secretory protein pepsinogen. *Cell*, 1990. **63**(2): 281-91.
27. Baranski, T.J., Faust, P.L., Kornfeld, S., Lysosomal enzyme phosphorylation. I. Protein recognition determinants in both lobes of procathepsin D mediate its interaction with UDP-GlcNAc:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. *J Biol Chem*, 1992. **267**(32): 23342-8.
28. Cuozzo, J.W. y Sahagian, G.G., Lysine is a common determinant for mannose phosphorylation of lysosomal proteins. *J Biol Chem*, 1994. **269**(20): 14490-6.
29. Cuozzo, J.W., Tao, K., Cygler, M., Mort, J.S., Sahagian, G.G., Lysine-based structure responsible for selective mannose phosphorylation of cathepsin D and cathepsin L defines a common structural motif for lysosomal enzyme targeting. *J Biol Chem*, 1998. **273**(33): 21067-76.
30. Sahagian, G.G., Distler, J., Jourdian, G.W., Characterization of a membrane-associated receptor from bovine liver that binds phosphomannosyl residues of bovine testicular beta-galactosidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. **78**(7): 4289-93.
31. Lobel, P., Dahms, N.M., Breitmeyer, J., Chirgwin, J.M., Kornfeld, S., Cloning of the bovine 215-kDa cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(8): 2233-7.
32. Kyle, J.W., Nolan, C.M., Sly, W.S., Expression of human cation-independent mannose 6-phosphate receptor cDNA in receptor-negative mouse P388D1 cells following gene transfer. *J Biol Chem*, 1988. **263**(31): 16230-5.
33. Kiess, W., Greenstein, L.A., Lee, L., Thomas, C., Nissley, S.P., Biosynthesis of the insulin-like growth factor-II (IGF-II)/mannose-6-phosphate receptor in rat C6 glial cells: the role of N-linked glycosylation in binding of IGF-II to the receptor. *Mol Endocrinol*, 1991. **5**(2): 281-91.
34. Westcott, K.R. y Rome, L.H., Cation-independent mannose 6-phosphate receptor contains covalently bound fatty acid. *J Cell Biochem*, 1988. **38**(1): 23-33.
35. Tong, P.Y., Gregory, W., y Kornfeld, S., Ligand interactions of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. The stoichiometry of mannose 6-phosphate binding. *J Biol Chem*, 1989. **264**(14): 7962-9.

36. Kiess, W., Greenstein, L.A., White, R.M., Lee, L., Rechler, M.M., Nissley, S.P., Type II insulin-like growth factor receptor is present in rat serum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(21): 7720-4.
37. Hoflack, B. y Kornfeld, S., Purification and characterization of a cation-dependent mannose 6-phosphate receptor from murine P388D1 macrophages and bovine liver. *J Biol Chem*, 1985. **260**(22): 12008-14.
38. Hoflack, B. y Kornfeld, S., Lysosomal enzyme binding to mouse P388D1 macrophage membranes lacking the 215-kDa mannose 6-phosphate receptor: evidence for the existence of a second mannose 6-phosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(13): 4428-32.
39. Watanabe, H., Grubb, J.H., y Sly, W.S., The overexpressed human 46-kDa mannose 6-phosphate receptor mediates endocytosis and sorting of beta-glucuronidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(20): 8036-40.
40. Fischer, H.D., Creek, K.E., y Sly, W.S., Binding of phosphorylated oligosaccharides to immobilized phosphomannosyl receptors. *J Biol Chem*, 1982. **257**(17): 9938-43.
41. von Figura, K., Gieselmann, V., y Hasilik, A., Antibody to mannose 6-phosphate specific receptor induces receptor deficiency in human fibroblasts. *Embo J*, 1984. **3**(6): 1281-6.
42. Duncan, J.R. y Kornfeld, S., Intracellular movement of two mannose 6-phosphate receptors: return to the Golgi apparatus. *J Cell Biol*, 1988. **106**(3): 617-28.
43. Brown, W.J., Goodhouse, J., y Farquhar, M.G., Mannose-6-phosphate receptors for lysosomal enzymes cycle between the Golgi complex and endosomes. *J Cell Biol*, 1986. **103**(4): 1235-47.
44. Griffiths, G., Hoflack B., Simons K., Mellman I., y Kornfeld S., The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell*, 1988. **52**(3): 329-41.
45. Geuze, H.J., Stoorvogel W., Strous GJ., Slot JW., Bleekemolen JE., Mellman I., Sorting of mannose 6-phosphate receptors and lysosomal membrane proteins in endocytic vesicles. *J Cell Biol*, 1988. **107**(6 Pt 2): 2491-501.
46. Brown, W.J., Constantinescu, E., y Farquhar, M.G., Redistribution of mannose-6-phosphate receptors induced by tunicamycin and chloroquine. *J Cell Biol*, 1984. **99**(1 Pt 1): 320-6.
47. Pfeffer, S.R., The endosomal concentration of a mannose 6-phosphate receptor is unchanged in the absence of ligand synthesis. *J Cell Biol*, 1987. **105**(1): 229-34.

48. Braulke, T., Gartung, C., Hasilik, A., von Figura, K., Is movement of mannose 6-phosphate-specific receptor triggered by binding of lysosomal enzymes? *J Cell Biol*, 1987. **104**(6): 1735-42.
49. Hunziker, W. y Geuze, H.J., Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *Bioessays*, 1996. **18**(5): 379-89.
50. Eskelinen, E.L., Tanaka, Y., y Saftig, P., At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol*, 2003. **13**(3): 137-45.
51. Guarnieri, F.G., Arterburn, L.M., Penno, M.B., Cha, Y., August, J.T., The motif Tyr-X-X-hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein 1. *J Biol Chem*, 1993. **268**(3): 1941-6.
52. Fukuda, M., Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J Biol Chem*, 1991. **266**(32): 21327-30.
53. Sandoval, I.V., Arredondo, J.J., Alcalde, J., Gonzalez Noriega, A., Vandekerckhove, J., Jimenez, M.A., Rico, M., The residues Leu(Ile)475-Ile(Leu, Val, Ala)476, contained in the extended carboxyl cytoplasmic tail, are critical for targeting of the resident lysosomal membrane protein LIMP II to lysosomes. *J Biol Chem*, 1994. **269**(9): 6622-31.
54. Kornfeld, S., Lysosomal enzyme targeting. *Biochem Soc Trans*, 1990. **18**(3): 367-74.
55. Waheed, A., Pohlmann, R., Hasilik, A., von Figura, K., van Elsen, A., Leroy, J.G., Deficiency of UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase in organs of I-cell patients. *Biochem Biophys Res Commun*, 1982. **105**(3): 1052-8.
56. Owada, M. y Neufeld, E.F., 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**(3): 814-20.
57. Ullrich, K., Mersmann, G., Weber, E., Von Figura, K., Evidence for lysosomal enzyme recognition by human fibroblasts via a phosphorylated carbohydrate moiety. *Biochem J*, 1978. **170**(3): 643-50.
58. Hieber, V., Distler, J., Myerowitz, R., Schmickel, R.D., Jourdian, G.W., Selective noncompetitive assimilation of bovine testicular beta-galactosidase and bovine liver beta-glucuronidase by generalized gangliosidosis fibroblasts. *J Clin Invest*, 1980. **65**(4): 879-84.

59. Gonzalez-Noriega, A., Coutino, R., Saavedra, V. M., 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**(2): 649-58.
60. Dittmer, F., Ulbrich, E.J., Hafner, A., Schmahl, W., Meister, T., Pohlmann, R., von Figura, K., Alternative mechanisms for trafficking of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient mice are cell type-specific. *J Cell Sci*, 1999. **112**(Pt 10): 1591-7.
61. Diment, S., Leech, M.S., y Stahl, P.D., Cathepsin D is membrane-associated in macrophage endosomes. *J Biol Chem*, 1988. **263**(14): 6901-7.
62. Rijnboutt, S., Kal, A.J., Geuze, H.J., Aerts, H., Strous, G.J., Mannose 6-phosphate-independent targeting of cathepsin D to lysosomes in HepG2 cells. *J Biol Chem*, 1991. **266**(35): 23586-92.
63. McIntyre, G.F. y Erickson, A.H., Procathepsins L and D are membrane-bound in acidic microsomal vesicles. *J Biol Chem*, 1991. **266**(23): 15438-45.
64. Laurent-Matha, V., Farnoud, M.R., Lucas, A., Rougeot, C., Garcia, M., Rochefort, H., Endocytosis of pro-cathepsin D into breast cancer cells is mostly independent of mannose-6-phosphate receptors. *J Cell Sci*, 1998. **111**(Pt 17): 2539-49.
65. Gonzalez-Noriega, A., Michalak, C., Cruz-Perez, J.R., Masso, F., Mannose 6-phosphate-independent endocytosis of beta-glucuronidase by human fibroblasts. I. Evidence for the existence of a membrane-binding activity. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1538**,141-51.
66. Gonzalez-Noriega, A. y Michalak, C., Mannose 6-phosphate-independent endocytosis of beta-glucuronidase. II. Purification of a cation-dependent receptor from bovine liver. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1538**(2-3): 152-61.
67. Barriocanal, J.G., Bonifacino, J.S., Yuan, L., Sandoval, I.V., Biosynthesis, glycosylation, movement through the Golgi system, and transport to lysosomes by an N-linked carbohydrate-independent mechanism of three lysosomal integral membrane proteins. *J Biol Chem*, 1986. **261**(35): 16755-63.
68. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970. **227**(259): 680-5.
69. Towbin, H., Staehelin, T., y Gordon, J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology*, 1992. **24**: 145-9.

70. Merion, M. y Sly, W.S., The role of intermediate vesicles in the adsorptive endocytosis and transport of ligand to lysosomes by human fibroblasts. *J Cell Biol*, 1983. **96**(3): 644-50.
71. Tabas, I. y Kornfeld, S., N-asparagine-linked oligosaccharides: processing. *Methods Enzymol*, 1982. **83**: 416-29.
72. Tulsiani, D.R., Hubbard, S.C., Robbins, P.W., Touster, O., Alpha-D-Mannosidases of rat liver Golgi membranes. Mannosidase II is the GlcNAcMAN5-cleaving enzyme in glycoprotein biosynthesis and mannosidases IA and IB are the enzymes converting Man9 precursors to Man5 intermediates. *J Biol Chem*, 1982. **257**(7): 3660-8.
73. Brightwell, R. y Tappel, A.L., Subcellular distributions and properties of rat liver phosphodiesterases. *Arch Biochem Biophys*, 1968. **124**(1): 325-32.
74. Akasaki, K., Michihara, A., Fujiwara, Y., Mibuka, K., Tsuji, H., Biosynthetic transport of a major lysosomal membrane glycoprotein, lamp-1: convergence of biosynthetic and endocytic pathways occurs at three distinctive points. *J Biochem (Tokyo)*, 1996. **120**(6): 1088-94.
75. Merion, M. y Poretz, R.D., The resolution of two populations of lysosomal organelles containing endocytosed *Wistaria floribunda* agglutinin from murine fibroblasts. *J Supramol Struct Cell Biochem*, 1981. **17**(4): 337-46.
76. van Weert, A.W., Dunn, K.W., Gueze, H.J., Maxfield, F.R., Stoorvogel, W., Transport from late endosomes to lysosomes, but not sorting of integral membrane proteins in endosomes, depends on the vacuolar proton pump. *J Cell Biol*, 1995. **130**(4): 821-34.
77. Lippincott-Schwartz, J. y Fambrough, D.M., Cycling of the integral membrane glycoprotein, LEP100, between plasma membrane and lysosomes: kinetic and morphological analysis. *Cell*, 1987. **49**(5): 669-77.
78. Jimenez-Cervantes, C., Garcia-Borron, J.C., Lozano, J.A., Solano, F., Effect of detergents and endogenous lipids on the activity and properties of tyrosinase and its related proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1995. **1243**(3): 421-30.
79. Stockert, R.J., The asialoglycoprotein receptor: relationships between structure, function, and expression. *Physiol Rev*, 1995. **75**(3): 591-609.
80. Scherer, P.E., Tang Z., Chun M., Sargiacomo M., Lodish HF., Lisanti MP., Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular

distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J Biol Chem*, 1995. **270**(27): 16395-401.

81. Griffiths, G., Matteoni, R., Back, R., Hoflack, B., Characterization of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor-enriched prelysosomal compartment in NRK cells. *J Cell Sci*, 1990. **95**(Pt 3): 441-61.
82. Yeyeodu, S., Ahn, K., Madden, V., Chapman, R., Song, L., Erickson, A.H., Procathepsin L self-association as a mechanism for selective secretion. *Traffic*, 2000. **1**(9): 724-37.
83. Dahms, N.M. y Hancock, M.K., P-type lectins. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1572**(2-3): 317-40.
84. Achkar, C., Gong, Q.M., Frankfater, A., Bajkowski, A.S., Differences in targeting and secretion of cathepsins B and L by BALB/3T3 fibroblasts and Moloney murine sarcoma virus-transformed BALB/3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*, 1990. **265**(23): 13650-4.
85. Prence, E.M., Dong, J.M., y Sahagian, G.G., Modulation of the transport of a lysosomal enzyme by PDGF. *J Cell Biol*, 1990. **110**(2): 319-26.