



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Transporte de enzimas lisosomales: clonación y
secuenciación del cDNA que codifica para el receptor 78
kDa e identificación de las secuencias de aminoácidos para
su compartimentación.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

D O C T O R E N C I E N C I A S

P R E S E N T A

M.C. ALBERTO RAMÍREZ MATA

MÉXICO, D. F.

OCTUBRE, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**



**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y FISIOLÓGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS**

**Transporte de enzimas lisosomales: clonación y secuenciación del cDNA
que codifica para el receptor 78 kDa e identificación de las secuencias de
aminoácidos para su compartimentación.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

Presenta:

M. C. Alberto Ramírez Mata.

Tutor Principal:

Dr. Alfonso González Noriega.

Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Comité Tutorial:

Dr. Alfonso León Del Río
Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Dra. Martha Torres Rojas
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

PDCB/grad/049/Jur/2011

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR, UNAM
Presente.

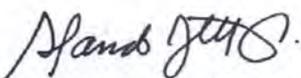
Nos permitimos informarle que el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión **286** del 07 de septiembre del 2011, designó el siguiente jurado para examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** de **ALBERTO RAMÍREZ MATA**, con número de cuenta **505013341**, con la tesis titulada "**TRANSPORTE DE ENZIMAS LISOSOMALES: CLONACIÓN, SECUENCIACIÓN DEL cDNA QUE CODIFICA PARA EL RECEPTOR DE 78kDa E IDENTIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS PARA SU COMPARTIMENTACIÓN**", dirigida por el Dr. Alfonso González Noriega.

Presidente: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
Vocal: Dr. Christian Sohlenkamp
Vocal: Dra. Rocío Salceda Sacanelles
Vocal: Dr. Guillermo Mendoza Hernández
Secretario: Dra. Blanca Haydé Ruíz Ordáz

El Comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizará a solitud del alumno **con cinco sinodales**, en apego a la nueva normatividad, acogiéndose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, con base a lo establecido en el **Artículo 31** del Reglamento General de Estudios de Posgrado.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria a 07 de septiembre del 2011


DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA
COORDINADOR


DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
RESPONSABLE DE ENTIDAD

c.c.p Expediente alumno

RCC/AZD/eaap

Teléfono 5623 0171 5623 0170 <http://www.pdcb.unam.mx> E-mail: pdcb@servidor.unam.mx

Este proyecto de investigación fue realizado bajo la asesoría del Dr. Alfonso González Noriega, en el Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM y financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 56087) y por un apoyo de la Comunidad Europea (ICA4-CT1999-10001).

Este trabajo fue realizado con el apoyo de una beca de Doctorado del CONACyT, con número de becario (173815).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por los recursos brindados y por la beca que me otorgaron para obtener este grado.

En especial agradezco a mi tutor y director de tesis, el Dr. Alfonso González Noriega, por todo lo que aprendí en estos 7 años. Fueron difíciles, pero creo que al final entendí que fue en pro de mi formación. Ahora estoy abierto a la crítica y a resolver problemas de una mejor manera. Gracias por el apoyo y las enseñanzas.

Al Dr. Alfonso León del Río, fue otra pieza importante en mi formación, por su motivación constante, entusiasmo y por considerarme siempre como parte de su equipo de trabajo.

A la Dra. Martha Torres Rojas, por su tiempo y por formar parte de mi comité tutorial.

Al Dr. Guillermo Mendoza Hernández por su apoyo y colaboración en la parte experimental de espectrometría de masas para la publicación de este trabajo.

A los miembros de mi jurado: Dra. Rocío Salceda Sacanelles, la Dra. Blanca Ruíz Ordaz, al Dr. Guillermo Mendoza Hernández, al Dr. Christian Sohlenkamp, y el Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes, por su tiempo y sus comentarios en la revisión de esta tesis.

Al Biol. Rafael Cervantes Roldan, por su apoyo metodológico en la parte de biología molecular. Por los comentarios, las ideas, las discusiones que ayudaron a analizar mejor mis resultados. Y porque sé que tengo un amigo en ti.

A los miembros del laboratorio del Dr. León, a Sandra Reyes Carmona, Tonatiuh Barrios, Laura Córdova, Anylu Pérez, Iván Meneses, Cynthia Montiel.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
APARTADO POSTAL 70228
CIUDAD UNIVERSITARIA
04510 MÉXICO, D. F.

A quien corresponda

Por medio de la presente hago de su conocimiento que la Bióloga. **Colette Ginette Michalak Sudomirska**, me ha apoyado metodológicamente en diferentes etapas de la elaboración de mi tesis de doctorado titulada: **"Transporte de enzimas lisosomales: clonación, secuenciación de cDNA que codifica para el receptor de 78 kDa e identificación de las secuencia de aminoácidos para su compartimentación"**. Cuando llegué al laboratorio, me enseñó técnicas básicas bioquímicas y de biología celular que se utilizan en el laboratorio. Posteriormente, me ha apoyado en el mantenimiento de cultivos celulares y ha colaborado conmigo activamente durante el desarrollo del proyecto de mi tesis en experimentos de endocitosis, inmunofluorescencia y fraccionamiento. Por lo que aprovecho esta oportunidad para expresarle mis más sinceros agradecimientos, ya que ha compartido conmigo su experiencia y conocimiento académico a lo largo de estos 6 años que he formado parte del laboratorio del Dr. Alfonso González Noriega.

Finalmente debo precisar que el jurado ha revisado el manuscrito de mi tesis y que su defensa la haré en el momento que se me asigne una fecha.

Atentamente

M.C. Alberto Ramírez Mata
Estudiante del doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM
Laboratorio B040, Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM
Ciudad Universitaria a 30 de Septiembre de 2011

DEDICATORIAS

A mis padres, Pablo Ramírez Cortes y Candelaria Mata Barrientos, los dos son parte fundamental de este nuevo logro, gracias a sus enseñanzas he tenido la confianza y la fuerza para mantenerme a flote, los amo y permanezcan mucho más tiempo conmigo.

A mi esposa, Claudia Mancilla Simbro, este año ha sido uno de los mejores de mi vida, nos casamos, tuvimos un hijo, y ahora obtengo el grado de doctor. Gracias por estar a mi lado porque sé que si necesito algo tu harás hasta lo imposible por concedérmelo. Te amo.

A mi hijo, Alberto Ramírez Mancilla, a partir del 5 de septiembre de 2011, me cayó el 20 que tengo un hijo y que eres el nuevo motor que impulsa mi vida, deseo que pueda ser un buen padre y el mejor amigo que tengas.

A mis hermanos Sandra, Luis y Pablo, cada uno me ha aportado buenas cosas y experiencias, cuando necesiten algo no duden en preguntarme y que los cuatro nos apoyemos siempre.

A toda la familia Ramírez Vélez: Johana, André, Johana Lizbeth, Amairani y Adonai. La Familia Ramírez Ventura: Pilar, Ximena y Alexa. A mi abuelita, Leonila Cortes, sigue con nosotros por muchos años más.

A mi nueva familia Mancilla Simbro: A mi suegra, María Elena y a mi cuñada Carolina, las dos me han admitido en su familia gracias.

Tabla de contenido

Índice de figuras.....XIV
Índice de tablas.....XVII
Abreviaturas.....XVIII
Resumen.....XXII

Capítulo I

1. Introducción.....24
1. Lisosomas.....24
 1.1. Función.....24
 1.2. Morfología de los lisosomas.....26
 1.3. Membrana lisosomal.....26
 1.3a. LAMP-1 y LAMP-2.....27
 1.3b. LIMP-1 (LAMP-3).....27
 1.3c. LIMP-II.....28
 1.3.1. Proteínas lisosomales solubles.....29
 1.4. Biogénesis de lisosomas.....31
 1.5. Transporte de proteínas solubles.....33
 1.5.1. Antecedentes históricos.....33
 1.5.2. Biogénesis y transporte de elementos solubles
 a lisosoma dependiente de Man6P.....36
 1.5.3. Incorporación del marcador de reconocimiento Man6P
 a las enzimas lisosomales.....37
 1.5.4. Especificidad de la fosfotransferasa.....38

1.6. Receptores Man6P.....	40
1.6.1. El CI-Man6PR.....	40
1.6.2. El CD-Man6PR.....	41
1.7. Transporte de proteínas integrales de membrana a lisosomas.....	43
1.8. Transporte de enzimas lisosomales independiente de Man6P.....	48
1.8.1. Modelo de estudio β -glucuronidasa bovina	50
1.8.2. Distribución subcelular y transporte biosintético del RI-Man6P.....	51
2. Hipótesis y Objetivos.....	54
3. Justificación.....	56
Capítulo II	
4. Materiales.....	58
4.1 Microorganismos.....	58
4.2. Líneas celulares de mamífero.....	58
4.3. Vectores plasmídicos.....	58
4.3.1. Vectores para la manipulación del ADN.....	58
4.3.2. Vectores para la producción de proteínas en <i>E. coli</i>	59
4.3.3. Vectores para transfección en células de mamífero.....	59
4.4. Anticuerpos.....	61
4.5. Medios de cultivo.....	62
4.5.1. Cultivo de <i>E. coli</i>	62
4.5.2. Cultivo de líneas celulares de mamífero.....	62
4.6. Soluciones de uso general.....	62

4.6.1. Soluciones para PAGE-SDS.....	62
4.6.2. Tinción Azul de Coomasie.....	63
4.6.3. Tinción de Plata.....	63
4.7. Métodos.....	64
4.7.1. Purificación de β -glucuronidasa de rata, bovina y humana.....	64
4.8. Generación de columnas de afinidad.....	65
4.9. Purificación del receptor independiente de Man6P a partir de hígado bovino.....	65
4.10. Electroforesis en SDS-PAGE.....	66
4.11. Inmunotransferencia.....	67
4.12. Cultivos Celulares.....	67
4.13. Extracción del ARNm.....	67
4.14. RT-PCR (Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa).....	68
4.15. Reacción en cadena de la polimerasa.....	68
4.16. Oligonucleótidos.....	69
4.17. Clonación del ADNc de AnxA6.....	69
4.18. Clonación del ADNc de AnxA6 en el plásmido pGEM-TEasy.....	70
4.19. Clonación del ADNc de AnxA6 en el plásmido de expresión pQE-31.....	70
4.20. Expresión y purificación de la proteína recombinante AnxA6 humana.....	71
4.21. Unión de β -glucuronidasa bovina a AnxA6 recombinante.....	72
4.22. Clonación del ADNc de AnxA6 en el plásmido de expresión pcDNA 3.1 + para células eucariotas.....	73

4.23. Transfecciones Estables de AnxA6 a células A431 por el método de SuperFect.....	65
4.24. Transfecciones Estables de AnxA6 a células A431 por el método FUGENE 6.....	75
4.25. Ensayos de endocitosis de β -glucuronidasa bovina a células A431 transfectadas establemente con AnxA6.....	75
4.26. Ensayo de actividad de β -glucuronidasa.....	75
4.27. Inmunofluorescencia.....	76

Capítulo III

5. Resultados.....	78
5.1. Inmunodetección.....	78
5.2. Purificación del RI-Man6P a partir de hígado bovino a través de columnas de afinidad.....	80
5.3. Identificación del RI-Man6P por inmunotransferencia (Western blot).....	82
5.4. Ensayo de unión de la β -glucuronidasa bovina al receptor purificado a partir de hígado bovino (Far Western blot).....	83
5.5. Análisis por LC/ESI-MS/MS del receptor purificado a partir de hígado bovino.....	84
5.6. Análisis bioinformático de AnxA6.....	85
5.7. Alineamientos de AnxA6 humana y bovina.....	86
5.8. Predicción de la localización subcelular de AnxA6 en función de su secuencia de aminoácidos.....	93
5.9. Señal líder y perfil de hidrofobicidad de AnxA6.....	93
5.10. AnxA6 y RI-Man6P son la misma proteína.....	94
5.10.1. Ensayos de Western Blot confirman que el RI-Man6P es AnxA6.....	94
5.11. Clonación del ADNc de AnxA6 humana.....	95
5.11.1. Clonación de AnxA6 al vector de expresión pQE31.....	97

5.11.2. Clonación de AnxA6 al vector de expresión para eucariontes, pcDNA 3.1+.....	98
5.11.3. Clonación de AnxA6 en el vector pIRESneo3.....	99
5.12. Purificación de AnxA6 recombinante en <i>E. coli</i> XL1-Blue.....	100
5.13. Identificación de AnxA6 recombinante purificada con anticuerpos generados para el RI-Man6P y comerciales en contra de AnxA6.....	102
5.14. Ensayo de unión de la β -glucuronidasa bovina a AnxA6 recombinante (Far Western blot).....	103
5.15. Funcionalidad de AnxA6 como receptor endocítico de β -glucuronidasa bovina, un mecanismo independiente de Man6P.....	103
5.15.1. Transfección estable de AnxA6 a células A431.....	103
5.15.2. Análisis de la expresión de AnxA6 transfectada establemente en células A431.....	104
5.15.3. Análisis de la funcionalidad de AnxA6 transfectada en células A431+A6 por endocitosis de β -glucuronidasa bovina.....	105
5.15.4. Transfección estable de AnxA6 a células A431 con el vector pIRES+A6.....	106
5.16. Expresión de AnxA6 humana en la superficie de células BGH-1y A431+A6.....	108
5.17. Transfección de AnxA6 en células L929.....	111
5.18. Ensayos de endocitosis de β -glucuronidasa bovina en células L929 transfectadas establemente con AnxA6.....	112
5.19. Colocalización de AnxA6 y β -glucuronidasa bovina en la superficie celular de células BGH-1 y A431+A6.....	113
5.20. Inhibición de la endocitosis de β -glucuronidasa bovina por anticuerpos en contra de AnxA6.....	116
5.21. Colocalización de AnxA6 y β -glucuronidasa bovina en vesículas endocíticas.....	117

Capítulo IV

6. Discusión.....	120
6.1. Isoformas de AnxA6.....	121
6.2. AnxA6 como receptor.....	123
7. Conclusiones.....	129
8. Anexo I (Las Anexinas).....	131
9. Anexo II (Publicación).....	139
10. Bibliografía.....	150

Índice de figuras

1. Micrografía electrónica de un lisosoma.....	26
2. Diagrama de proteínas de membrana lisosomal.....	28
3. Modelos para la biogénesis lisosomal	33
4. Modelo para el transporte de enzimas lisosomales sintetizadas de novo al lisosoma.....	37
5. Generación del marcador de Manosa-6-fosfato.....	39
6. Representación esquemática de los receptores CI-Man6PR y CD-Man6PR.....	42
7. Mapa del vector pGEM-TEasy.....	58
8. Mapa del vector pQE-31.....	59
9. Mapa del vector pcDNA3.1+.....	59
10. Mapa y sitio múltiple de clonación del vector pIRESneo3.....	60
11. Inmunodetección de proteínas expresadas en un vector Lambda ZAP.....	79
12. Graficas del perfil de elución para la purificación del RI-Man6P.....	81
13. Patrón electroforético del receptor independiente de Man6P a partir de hígado bovino.....	82
14. Inmunodetección del receptor purificado con anticuerpos generados en el laboratorio.....	83
15. Ensayo Far Western Blot del receptor purificado.....	84
16. Secuencia de péptidos hallados en LC/ESI-MS/MS.....	87
17. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de AnxA6 humana y bovina.....	89
18. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de AnxA6 humana y bovina.....	90
19. Perfil de hidrofobicidad de AnxA6 y LIMP II.....	94

20. Inmunodetección de AnxA6 con anticuerpos generados en el laboratorio y anticuerpos comerciales.....	95
21. Electroforesis en gel de agarosa de un producto de PCR de AnxA6.....	96
22. Estrategia de clonación de AnxA6 al vector pGEM-TEasy.....	97
23. Estrategia de clonación de AnxA6 en el vector pQE-31.....	98
24. Análisis de los productos de digestión del plásmido pcDNA+ A6.....	99
25. Análisis de los productos de digestión del plásmido pIRES+A6.....	100
26. Análisis por PAGE-SDS de la expresión de ANxA6 recombinante.....	101
27. Perfil de elución de AnxA6 recombinante.....	102
28. Identificación de AnxA6 recombinante por inmunodetección.....	102
29. Far Western Blot de AnxA6 recombinante.....	103
30. Expresión de AnxA6 en células A431 y A431+A6 transfectadas con el plásmido pcDNA+A6.....	104
31. Endocitosis de β -glucuronidasa bovina a células A431 transfectadas establemente con AnxA6.....	106
32. Inmunodetección de AnxA6 en células A431+A6.....	106
33. Inmunodetección de AnxA6 en células A431+A6 transfectadas establemente con pIRES+A6.....	108
34. Inmunofluorescencia para detectar AnxA6 en la superficie de células BGH-1.....	110
35. Inmunolocalización de AnxA6 en células A431 y A431+A6.....	111
36. Inmunodetección para probar la sobreexpresión de AnxA6 en células L929+A6.....	112
37. Inmunolocalización de AnxA6 en células L929 y L929+A6.....	113

38. Colocalización en la superficie celular de β -glucuronidasa bovina y AnxA6 en células BGH-1.....	115
39. Colocalización en la superficie celular de β -glucuronidasa bovina y AnxA6 en células A431+A6.....	116
40. Inhibición de la endocitosis de β -glucuronidasa bovina por anticuerpos en contra de AnxA6.....	117
41. Análisis de inmunofluorescencia de AnxA6 en fibroblastos humanos.....	118
42. Estructura de las anexinas.....	132
43. Modelo de unión periférica a la membrana e inserción de anexina a la membrana.....	133

Índice de tablas

1. Hidrolasas ácidas.....	31
2. Señales de segregación presentes en las colas citosolicas de Proteínas membranales.....	46
3. Anticuerpos utilizados en este trabajo.....	61
4. Oligonucleótidos.....	69
5. Plásmidos.....	70
6. Proteínas halladas por inmunodetección utilizando una librería de ADNc Lambda ZAP.....	79
7. Péptidos obtenidos en el análisis por LC/ESI-MS/MS del receptor independiente de Man6P.....	88
8. Endocitosis de β -glucuronidasa bovina en células L929 transfectadas con AnxA6.....	113

Abreviaturas

Å Ångstrom

ADN Ácido desoxirribonucleico

ADNc ADN copia

AG Aparato de Golgi

AnxA6 Anexina VI, anexina 6

APS Persulfato de amonio

ARN Ácido ribonucleico

ATP Adenosín trifosfato

BSA Albúmina sérica bovina

CD-Man6PR Receptor de manosa 6 fosfato dependiente de cationes

Células NRK Células normales de riñón de rata

CI-Man6PR Receptor de manosa 6 fosfato independiente de cationes

CMV Citomegalovirus

D.O. Densidad óptica

DAPI 4,6 diamidino-2-fenilindol

DEPC Dietilpirocarbonato

DTT Ditiotreititol

EDTA Ácido Etilen-diamino-tetracético

EE endosomas tempranos

EGTA Etilen glicol ácido tetracético

G418 Geneticina

Glc3Man9GlcNAc2 Tetradecasacarido triglucosilaso. Oligosacarido precursor ligado a asparagina

Gly Aminoácido glicina

GPN glicil-L-fenilalanina-2-naftilamida

GTP Guanosin trifosfato

H⁺ Protones

HA Hidrolasas ácidas, proteínas lisosomales solubles, enzimas lisosomales

HEPES Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfónico

IPTG Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

IRES Sitio interno de entrada al ribosoma

kb kilobase

kDa Kilodalton

LAMP-1 Proteína asociada a la membrana lisosomal 1

LAMP-2 Proteína asociada a la membrana lisosomal 2

LAP Fosfatasa ácida lisosomal

LC/ESI-MS/MS Cromatografía líquida/ Ionización por electrospray/ Espectrometría de masas en tandem

LDL Liproteína de baja densidad

LE endosomas tardíos

LIMP-1 Proteína integral de membrana lisosomal 1

LIMP-II Proteína integral de membrana lisosomal 2

LMP Proteínas de la membrana lisosomal

M Molar

Man6P Manosa-6-fosfato, M6P

MAPK Proteína cinasa activada por mitógeno

MCS Sitio múltiple de clonación

Medio LB Medio Luria-Bertani

mg Milsesima parte de un gramo

MLP II Enfermedad mucopolidosis II

MWCO Corte de peso molecular

Ni-NTA agarosa Niquel-ácido nitriloacético inmovilizado sobre una resina de agarosa

nm nanómetro (equivale a una milmillonésima de metro), 10⁻⁹ m

- ORF** Marco de lectura abierta (*Open Reading Frame*)
- ORLs** Organelos relacionados a lisosomas
- PAGE-SDS** Gel de poliacrilamida SDS
- pb** Pares de bases
- PBS** Buffer fosfato salino
- PCR** Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
- pH** Potencial de hidrógeno
- PHMB** Ácido p-hidroximercuribenzoico
- PKC** Proteína kinasa C
- PMSF** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- PVDF** Polifluoruro de vinilideno
- PVP** Polivinilpirrolidona
- RBS** Sitio de unión a ribosoma
- RE** Retículo endoplásmico
- RI-Man6P** Receptor independiente de Man6P, Receptor 78/72 kDa.
- RT** Retrotranscripción
- s** Segundos
- SAP** Saposinas
- SDS** Dodecil sulfato de sodio
- Ser** Aminoácido serina
- TCA** Ácido tricloroacético
- TEMED** Tetrametilendiamino
- TGN** Red del trans Golgi
- Trp*** Aminoácido Triptófano modificado
- Tyr** Aminoácido tirosina
- UDP** Uridina difosfato

UMP Uridina monofosfato

VAD Vesículas de alta densidad

α -MEM Alfa medio mínimo esencial

β GC Enzima lisosomal β -glucocerebrosidasa

μ g Microgramo ó la millonésima de un gramo, 10^{-6} g

μ m Micrómetro (millonésima de metro), 10^{-6} m

Resumen

La endocitosis y transporte de β -glucuronidasa bovina a lisosomas en fibroblastos humanos es mediada por dos receptores: el bien caracterizado receptor de manosa 6-fosfato independiente de cationes (CI-Man6PR) y un receptor independiente de Man6P (RI-Man6P/ 78/72 kDa), el cual reconoce una secuencia presente en el ligando Ser-Trp*-Ser. Este último receptor fue extraído y purificado con detergente a partir de membranas de hígado bovino. Análisis de LC/ESI-MS/MS revelaron que este receptor endocítico es Anexina VI (AnxA6). Varios experimentos permitieron confirmar este hallazgo. Primero, la unión de β -glucuronidasa bovina al receptor purificado de membranas de hígado bovino y a AnxA6 humana recombinante se confirmó por ensayos de “Far Western Blot”. Segundo, análisis de “Western Blot” usando anticuerpos en contra del RI-Man6P así como también anticuerpos contra AnxA6 comerciales confirmaron que el RI-Man6P y AnxA6 son la misma proteína. Tercero, experimentos de doble inmunofluorescencia en fibroblastos humanos confirmaron una completa colocalización de β -glucuronidasa bovina y AnxA6 en la membrana plasmática. Finalmente, dos líneas celulares fueron establemente transfectadas con un plásmido que contiene el cDNA de AnxA6 humana. Ambas líneas celulares transfectadas incrementaron la endocitosis de β -glucuronidasa bovina dependiente de AnxA6. Estos resultados indican que AnxA6 es un nuevo receptor que promueve la endocitosis de la β -glucuronidasa bovina en fibroblastos humanos.

Capítulo I

Introducción

1. Lisosomas

1.1. Función

Los lisosomas son una familia heterogénea de vesículas membranosas con la característica común que contienen un elevado número de enzimas hidrolíticas cuyo pH óptimo es de 4.5-5.0. Los lisosomas tienen la capacidad de hidrolizar prácticamente cualquier tipo de partícula biológica extracelular (macromoléculas), capturadas por la célula por endocitosis, o bien intracelular por autofagia (De Duve., 1983). En estas vesículas, macromoléculas como cadenas: lipídicas, glicosídicas, proteicas o de ácidos nucleicos, son degradadas a sus componentes unitarios. Los metabolitos generados de esta digestión, pueden atravesar la membrana lisosomal permitiendo a la célula obtener un aporte adicional de nutrientes, de ahí que el proceso autofágico se incrementa cuando la célula es sometida a ayuno prolongado (Lloyd, J.B., 1996; de Duve, 1983; Kornfeld y Mellman, 1989).

Los lisosomas son organelos cuyo pH intravesicular es ácido debido a la presencia en sus membranas de una bomba de protones que se encarga de utilizar la energía de hidrólisis del ATP para bombear protones en contra del gradiente de protones desde el citosol al interior de las vesículas (Mellman, I y cols., 1986). Los lisosomas están involucrados en varios procesos fisiológicos, tales como, recambio de macromoléculas, homeostasis de colesterol, reparación de la membrana plasmática, remodelación de huesos y tejidos, defensa contra patógenos, muerte celular y señalización celular (Dell Angelica y cols., 2000., Raposo, G., y cols. 2007). Estas funciones complejas permiten visualizar a los lisosomas como organelos que intervienen en el recambio de macromoléculas y no solamente, como estación final o de desecho de la vía endocítica. La diversidad de funciones en las que está involucrado el lisosoma hace que el estudio de este orgánulo celular sea relevante *per se*. Sin embargo, su estudio presenta otro grado de importancia si se toma en cuenta el número y heterogeneidad de enfermedades descritas y relacionadas con 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 más de 40 errores innatos del metabolismo en los que se presenta un defecto en el transporte ó

compartimentación de una o varias de estas enzimas, o bien de componentes de la membrana lisosomal (Seabra, M., y cols., 2002; Aridor, M. y Hannan, L. A., 2002; Gieselmann, V., 1995); así mismo, se ha descrito una gran variedad de enfermedades en las que hay una alteración en la función lisosomal debido a fármacos. Por otra parte, 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. Estos microorganismos alteran el tráfico intracelular de proteínas específicas relacionadas con la función o biogénesis del lisosoma creando un micro ambiente que les permite sobrevivir dentro de éste orgánulo (Kornfeld, S., 1987., Portnoy, D.A., 1992). Actualmente a los lisosomas también se les ha implicado en patologías como la enfermedad de Alzheimer, enfermedades autoinmunes, cáncer y drogas (Tardy, C. y cols., 2006).

La función catabólica de los lisosomas se complementa con los orgánulos relacionados a lisosomas (ORLs), tales como melanosomas, gránulos líticos, compartimentos del complejo mayor de histocompatibilidad clase II y los gránulos densos de plaquetas, gránulos basófilos, gránulos azurófilos. Los ORLs tienen muchas propiedades similares con los lisosomas, pero estos contienen proteínas específicas del tipo celular y pueden requerir maquinarias celulares adicionales para su biogénesis (Bonifacino, J. S., 2004; Dell'Angelica, E. C., 2004). También comparten la presencia de marcadores membranales, la presencia de hidrolasas ácidas, tener un pH ácido y ser accesible a compuestos endocitados.

1.2. Morfología de los lisosomas

Los lisosomas se encuentran en casi todas las células eucariotas y presentan una gran diversidad en cuanto a forma y tamaño (oscilan entre 0,05 y 1µm de diámetro) y se cree que ocupan el 5% del volumen intracelular. Ellos pueden contener depósitos electrodensos y restos de membranas.

Están rodeados por una membrana simple, que contiene proteínas de transporte que permiten el paso de los productos finales de la digestión de macromoléculas hacia el citoplasma (de Duve, C y Wattiaux, R. 1966., Loyd, J.B. 1986., Luzio, y cols. 2007).

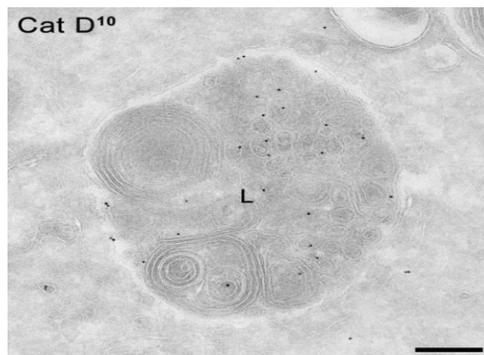


Figura 1. Micrografía electrónica, se observa un lisosoma marcado con catepsina D (Cat D¹⁰) (marcaje, partículas de oro de 10 nm) muestra de un paciente con enfermedad de células I. Esta micrografía indica que aunque la vía de Man6P está ausente en estas células, la enzima sigue llegando a lisosomas. Bar 200 nm.

A diferencia de otros orgánulos subcelulares, los lisosomas no pueden identificarse por criterios morfológicos habituales de tamaño, de forma o estructura fina. A nivel ultraestructural los lisosomas tienen una forma parecida a cuerpos densos, esféricos, ovoides y ocasionalmente tubulares, (Swanson, J., y cols. 1987). La medida de los lisosomas varía dependiendo del tipo celular por ejemplo en hepatocitos y neuronas miden 1µm y varios micrones en macrófagos. De ésta heterogeneidad morfológica se desprende que los lisosomas al igual que otras vesículas intracelulares, solamente pueden identificarse a través de marcadores específicos tales como fosfatasa ácida entre otros (Novikoff, A. B., y cols. 1956).

1.3. Membrana lisosomal

Se han reportado aproximadamente 25 proteínas integrales de la membrana del lisosoma, las cuales tienen diversas funciones, entre las que se incluyen: biogénesis del lisosoma, mantenimiento de la integridad estructural del lisosoma, acidificación del lumen lisosomal, importación de proteínas desde el citoplasma, fusión de membranas y transporte de productos generados de la degradación de macromoléculas al citoplasma (Lübke, y

cols., 2009). Entre las proteínas mejor estudiadas está: LAMP-1, LAMP-2, LIMP-1, LIMP-II y LAP, (figura 2) las cuales están altamente glicosiladas, en sus dominios luminales, los cuales las protegen tanto a estas como a la membrana lisosomal de la degradación, (Lewis, V y Cols., 1985; Reggio, H., y cols. 1984).

1.3a. LAMP-1 y LAMP-2

Estas dos proteínas tienen una alta homología a nivel de secuencia de aminoácidos además de propiedades bioquímicas, estructurales y dominios similares. Ambas son proteínas de membrana tipo 1, con un ectodominio luminal largo, conectado a la región transmembranal y una cola citosólica corta. (Viitala, J., y cols. 1988; Hatem, C., y cols., 1995; Carlsson, S.R. y Fukuda, M. 1989; Arterburn, L.M. y cols., 1990). Contienen de 16 a 20 sitios potenciales para N-glicosilación, produciendo un peso molecular aparente de 90 a 120 kDa no obstante que el peso molecular de la secuencia de aminoácidos es de aproximadamente 40 kDa, lo que corrobora que son proteínas altamente glicosiladas (Lewis, V., y cols. 1985; Fambrough, D.M., y cols., 1988; Granger, B.L., y cols., 1990). LAMP-1 y LAMP-2 también contienen oligosacáridos O-glicosídicos en su región de bisagra (Carlsson, S.R. y Fukuda, M. 1989; Granger, B.L., y cols., 1990). Los dominios citosólicos de las proteínas LAMP-1 y LAMP-2 es de 11 residuos y altamente conservado entre las dos proteínas. Mientras la cola citosólica de LAMP-1 es idéntica en humanos, ratón, rata y pollo, la LAMP-2 tiene un alto grado de diversidad entre las diferentes especies. Recientemente se ha encontrado que la proteína LAMP-2 sufre splicing alternativo produciendo tres isoformas que codifican para distintos dominios transmembranales y citosólicos (Hatem, C., y cols 1995; Gough, N.R., y cols., 1995).

Existe una secuencia conservada común en las proteínas LAMP-1 y las diferentes isoformas de LAMP-2 en el C-terminal, para su transporte a lisosomas, el motivo es GYXXZ donde Z corresponde a isoleucina (Ile) en LAMP-1 o fenilalanina, leucina o valina en las diferentes isoformas de las proteínas LAMP-2 (tabla 2).

1.3b. LIMP-1 (LAMP-3)

La proteína LIMP-1, también conocida como LAMP-3 se ha clonado de humanos, ratón, y rata (Metzelaar, M. J. y cols 1991; Miyamoto, H. y cols., 1994; Nishikata, H., y cols., 1992). Esta proteína tiene una alta homología con LAMP-1 y LAMP-2 solo que ésta

atraviesa cuatro veces la bicapa lipídica, por lo que se clasifica dentro de las proteínas transmembranales tipo IV. Su secuencia de aminoácidos genera un peso molecular de 25 kDa tiene tres sitios potenciales para N-glicosilación formando una proteína madura con un peso molecular aparente de 30-54 kDa. LIMP-1 tiene una cola citosólica corta de 11 residuos, en la cual ésta codificada la secuencia (GYXXM) en su extremo C-terminal, que es similar a la presente en las proteínas LAMP-1 y LAMP-2 y que promueven su transporte a los lisosomas.

1.3c. LIMP-II

La proteína LIMP-II tiene dos dominios transmembranales uno ubicado cerca al extremo N-terminal de la proteína y el otro en el extremo C-terminal (Fujita, H. y cols., 1991; Vega, M.A. y cols., 1991). La mayor cantidad de la proteína está ubicada en el lumen del lisosoma tomando una estructura de asa. Esta proteína tiene 11 sitios potenciales de N-glicosilación produciendo una proteína madura de 74-85 kDa. No obstante que a la secuencia de aminoácidos le corresponde un peso molecular de 47 kDa.

No hay homología entre LIMP II y las proteínas LAMP-1, LAMP-2 ó LIMP-1 y tampoco tiene el motivo GYXXZ, en su lugar la señal para su transporte a lisosomas, está basada en un dominio dileucina (DE)XXXL(LI) (tabla 2) .

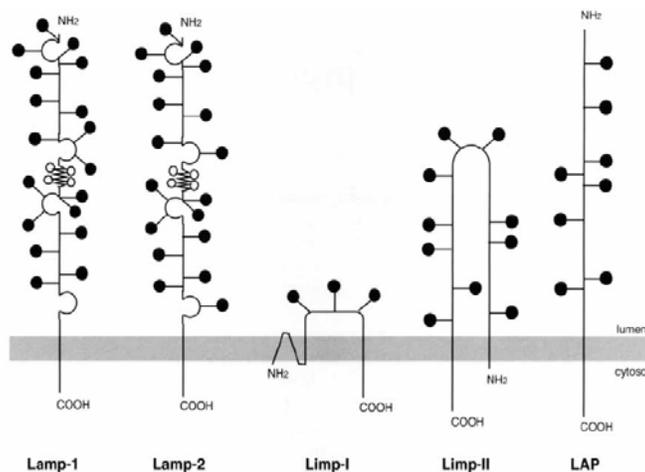


Figura 2. Estructura putativa y orientación en la membrana de los diferentes miembros de las proteínas de membrana lisosomal. Los círculos en blanco representan carbohidratos con enlaces O-glicosídicos sobre las asas formadas por los enlaces disulfuro de la proteínas LAMP-1 y LAMP-2. Círculos oscuros representan carbohidratos con enlaces N-glicosídicos.

1.3.1. Proteínas lisosomales solubles

A la fecha se han descrito alrededor de 50 enzimas lisosomales entre las que se encuentran: fosfatasas, nucleasas, glicosidasas, proteasas, sulfatasas y lipasas, cuyo pH óptimo es ácido (4.8-5.2) (Conus, S. y Simon, H.U., 2008).

En la Tabla I se enumeran por familias, según su especificidad, algunas de las principales enzimas presentes en lisosomas. El grupo de enzimas lisosomales mejor estudiadas es el de las glicosidasas, las cuales están involucradas en la degradación de glucógeno intracelular, mucopolisacáridos presentes en la lámina basal, cartílago, líquido sinovial, etc., de cadenas glicosídicas presentes en glicoproteínas y de glicolípidos solubles o que forman parte de las membranas celulares. Casi todas las enzimas de este grupo son exoglicosidasas, es decir cortan únicamente la unión glicosídica de los azúcares terminales, por lo que deben actuar en forma secuencial. Se han descrito dos endoglicosidasas presentes en prácticamente todos los seres vivos: la hialuronidasa y la lisozima, la primera es capaz de cortar en fragmentos pequeños cadenas extracelulares de mucopolisacáridos como paso previo para su endocitosis y degradación en lisosomas. La lisozima es una endoglicosidasa, presente en prácticamente todo tipo de microorganismos, que hidroliza la unión entre acetilmurámico y N-acetil-glucosamina presente en proteoglicanos de la pared de varias bacterias. Dentro del grupo de las glicosidasas se pueden considerar las sulfatasas (arilsulfatasas), las cuales hidrolizan a grupos arilo presentes en azúcares de mucopolisacáridos. La especificidad de este tipo de enzimas está dada por el azúcar que contiene al arilo, y el carbono al cual se une el arilo.

La digestión de proteínas y péptidos se lleva a cabo mediante la acción simultánea de endo- y exopeptidasas las cuales liberan como productos finales dipéptidos y amino ácidos. Aunque las proteasas actúan principalmente dentro de los lisosomas, han sido involucradas en la degradación de proteínas presentes en matrices extracelulares, tales como proteínglicanos presentes en cartílago, elastina y colágena presente en tejido conectivo. En cuanto al catabolismo de lípidos se ha descrito que las grasas neutras y fosfolípidos son degradados a ácidos grasos y glicerol o glicerofosfodiésteres, los esfingolípidos a esfingosina, ácidos grasos, fosfato inorgánico, colina y monosacáridos libres. El colesterol que es transportado en el suero como ésteres de colesterol en lipoproteínas, es liberado en

lisosomas y transportado al citoplasma. Por último el catabolismo de DNA y RNA se lleva a cabo en dos pasos, primero por medio de endonucleasas se pueden detectar oligonucleótidos, posteriormente aparecen purinas, pirimidinas y fosfato inorgánico. La desoxirribonucleasa genera oligonucleótidos conteniendo de 10 a 12 nucleótidos, se ha encontrado que en 80% de las cadenas formadas, el 3'-nucleótido fosforilado es una purina.

Las exonucleotidasas presentes tienen una amplia especificidad; identifican el extremo 5'-hidroxi y liberan 3'- fosfonucleótido. Otros nucleósidos trifosfato (ATP) son convertidos a nucleósidos monofosfatados por acción de una fosfodiesterasa, y después una fosfatasa hidroliza el último fosfato.

La capacidad digestiva de los lisosomas presenta una paradoja, ya que mientras que proteínas añadidas exogenamente a macrófagos son capturadas y degradadas en los lisosomas en cuestión de minutos, se ha reportado que la vida media de las hidrolasas ácidas y de los componentes de la membrana del lisosoma fluctúa desde horas hasta varios días. Esta resistencia a la degradación por autodigestión evita a la célula un gasto en cuanto a energía y precursores necesarios para mantener un nivel constante de las enzimas lisosomales y sus membranas por medio de síntesis *de novo* de sus componentes (Fisher y col., 1980; Griffiths y Grunber, 1991; Harikumar y Reeves, 1991; Helenius y cols., 1983)

Tabla 1. Hidrolasas ácidas

A. Glicosidasas. Grupo de enzimas lisosomales involucradas en la degradación de cadenas glicosídicas presentes en: glicoproteínas, esfingolípidos, glucógeno o mucopolisacáridos.

1. Exoglicosidasas	2. Endoglicosidasas	3. Sulfatasas
α -Glucosidasa	Hialuronidasa	Aril-sulfatasa A
β -Glucosidasa	Lisozima	Aril-sulfatasa B
β -Xilosidasa	Endo- β -N-acetilglucosaminidasa	α -Iduronidato-sulfato-sulfatasa
α -Galactasidas	Aspartil-glucosaminidasa	N-Acetil- α -glucosaminido-
sulfato-sulfatasa		
β -Galactosidasa		N-Acetil- α -galactosaminido-
sulfato-sulfatasa		
α -Fucosidasa		
β -Fucosidasa		
α -Manosidasa		
β -Glucuronidasa		
α -Iduronidasa		
N-Acetil- β -hexosaminidasa		
N-Acetil- α -glucosaminidasa		
N-Acetil - α -galactosidasa		
Neuraminidasa (sialidasa)		
Galactocerebrosidasa		

B. Proteasas. Grupo de enzimas lisosomales involucradas en la hidrólisis de cadenas peptídicas.

1. Endopeptidasas	2. Aminopeptidasas	3. Carboxipeptidasas
Catepsina B	Catepsina C	Catepsina A
Catepsina D	Dipeptidilamino-peptidasa II	Catepsina IV
		Carboxipeptidasa ácida

C. Lipasas. Grupo de enzimas que hidrolizan esfingolípidos, ésteres de ácidos grasos y fosfoglicéridos.

Galactosilceramidasa	Ceramidasa	Lipasa ácida
Esfingomielinasa	Estearasa	

D. Fosfatasas. Hidrolizan grupos fosfato presentes en ácidos nucleicos, proteínas, lípidos o carbohidratos.

Fosfatasa ácida	Fosfolipasas	Nucleotidasa ácida
Esfingo-fosfodiesterasa	Exonucleasa ácida	

E. Nucleotidasas. Hidrolizan ácidos nucleicos.

Endonucleasas	Desoxirribonucleasa	Ribonucleasa
---------------	---------------------	--------------

Tomada del libro biología celular y molecular (2003) Luis Felipe Jiménez y Horacio Merchant Prentice Hall

1.4. Biogénesis de lisosomas

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 mecanismos que proponen su formación han ido cambiando a la par del conocimiento que se ha tenido de la célula. Los primeros estudios sugirieron que los lisosomas se generaban como microvesículas directamente a partir del complejo de Golgi. Estas vesículas fueron llamadas lisosomas primarios (vesículas que contienen enzimas lisosomales pero no sustratos). Aunque su existencia no pudo ser demostrada se asumió que estas vesículas se fusionaban con otras vesículas que contienen sustratos para formar a los lisosomas secundarios o maduros (De Duve, C. y Wattiaux, R. 1966).

Hoy en día ésta visión funcional ha cambiado. Los conocimientos adquiridos en ésta área permiten afirmar: que los componentes lisosomales (proteínas membranales e hidrolasas ácidas) son transportadas en vesículas recubiertas por clatrina desde el 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. Se han propuesto diversos mecanismos (Mullins, C., y Bonifacino, J.S. 2001) entre los que destacan los siguientes: a) maduración, en este modelo a una vesícula base (endosoma temprano) se le van adicionando marcadores específicos, esto permite una transformación paulatina de endosoma temprano- endosoma tardío- lisosomal. Esta teoría ha sido descartada ya que cada uno de estos compartimientos tiene una morfología diferente y marcadores específicos, b) transporte vesicular, componentes específicos de cada compartimiento son transportados al siguiente por medio de vesículas que se generan en un compartimiento y son transportados al siguiente compartimiento. Este modelo ha sido cuestionado debido a que no se han podido encontrar las vesículas transportadoras, c) el modelo de Kiss and Run, propone que la biogénesis ocurre a través de un ciclo continuo de contacto lisosoma-endosoma (o Kiss) transfiriendo materiales de un compartimiento a otro, seguido por la disociación (o Run) (Storrie, B. y Desjardins, M. 1996), d) finalmente, el modelo fusión-fisión es una variación del modelo anterior en el cual los endosomas tardíos y lisosomas experimentan una fusión heterotípica produciendo un orgánulo híbrido que contiene marcadores de ambos compartimientos (Mullock, B. M. y cols. 1998). En detrimento de estos dos últimos modelos se debe señalar que no se han encontrado vesículas híbridas que contengan marcadores de ambos compartimientos (Mullins y Bonifacino, 2001). 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 (figura 3).

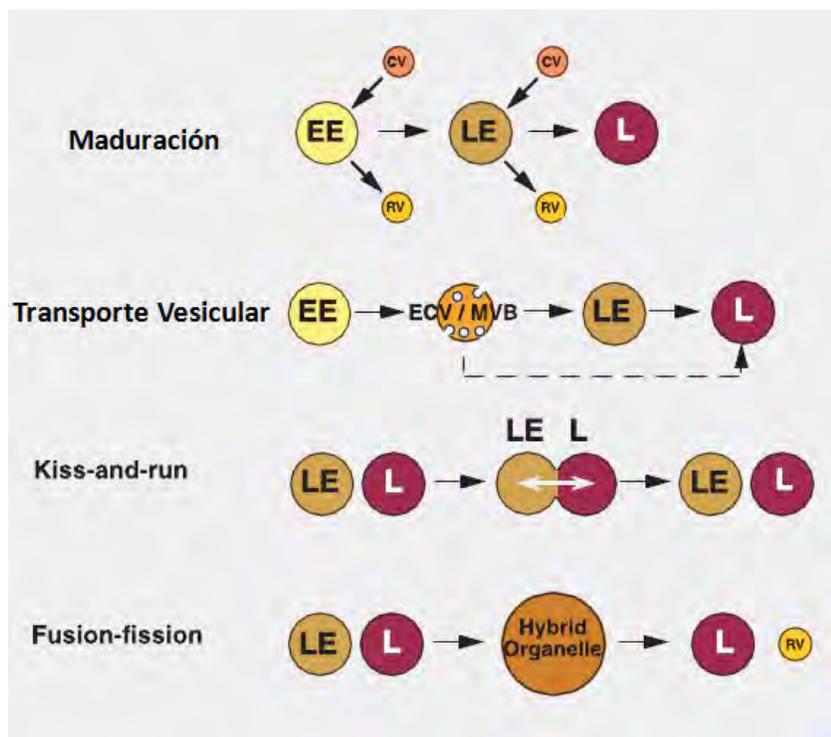


Figura 3. Modelos para la biogénesis lisosomal. Los modelos de maduración sugieren que los endosomas tempranos se forman por la coalescencia de vesículas derivadas de la membrana plasmática. Estos endosomas eventualmente maduran a endosomas tardíos y finalmente a lisosomas por la incorporación de vesículas derivadas de trans-Golgi (TNG) y la remoción de materiales en vesículas de reciclaje destinadas a otro compartimiento y/o a la membrana plasmática. Abreviaciones TGN, red del trans-Golgi; EE, endosomas tempranos; LE, endosomas tardíos; L, lisosomas; CV, vesículas cargadas; RV, vesículas de reciclaje.

1.5. Transporte de proteínas solubles

1.5.1. Antecedentes históricos

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 enzimas lisosomales a los lisosomas. Estos pacientes se distinguen por tener una serie de malformaciones, retraso mental y elevados niveles de enzimas lisosomales en suero que producen la muerte del individuo a los 2-3 años de edad (Neufeld, E.F., y Muezer, I. 2001). En líneas de

fibroblastos provenientes de estos pacientes, se encontró que los niveles intracelulares de enzimas lisosomales están drásticamente reducidos; por el contrario, los niveles extracelulares están anormalmente elevados. El grupo de la Dra. Neufeld en 1977, al realizar estudios de complementación metabólica, observaron que las enzimas lisosomales secretadas por fibroblastos normales podían ser recapturadas (endocitadas) de igual manera por fibroblastos de células “T”, que por fibroblastos normales; en tanto las enzimas lisosomales secretadas por fibroblastos de células “T”, no podían ser endocitadas por ningún tipo de fibroblasto (Neufeld, E.F. y cols. 1977).

Estas observaciones permitieron proponer: a) la existencia de un “marcador de reconocimiento común” para todas las enzimas lisosomales, que permite su compartimentación, así, como la existencia de receptores específicos en la membrana plasmática para su recaptura. Este marcador está ausente en enzimas lisosomales de fibroblastos obtenidos de pacientes con la enfermedad de células “T”. b) la segregación de enzimas se lleva a cabo extracelularmente, es decir, que las enzimas lisosomales son normalmente secretadas al medio extracelular y luego endocitadas por un receptor a los fibroblastos para que finalmente lleguen a los lisosomas. Este mecanismo para la segregación de proteínas fue conocido como hipótesis de secreción recaptura (Neufeld, E.F. y cols. 1977).

Posteriormente, von Figura y Weber en 1978 (von Figura, K. y Weber, E., 1978) propusieron una hipótesis alterna para el transporte de las hidrolasas ácidas, en la cual se sugería que las enzimas lisosomales eran transportadas a la membrana plasmática unidas a su receptor y, posteriormente a los lisosomas. En cambio en las células “T”, como el defecto reside en la incapacidad de incorporar el marcador de reconocimiento a las enzimas lisosomales, las enzimas son transportadas a la superficie celular en forma soluble, por lo que son secretadas al medio externo y al no ser reconocidas por su receptor, no pueden ser recapturadas. Esta hipótesis fue aceptada debido a que observaron que anticuerpos en contra de hexosaminidasa podían ser detectados en la membrana plasmática de fibroblastos de humanos normales.

En la búsqueda de la naturaleza del marcador de reconocimiento, Hichman y cols., (Hichman, S., y cols. 1974) sugirieron que los carbohidratos formaban parte de este

marcador, ya que el tratamiento de la hexosaminidasa con periodato, impide su endocitosis sin afectar su actividad catalítica. Por su parte Hieber y cols., (Hieber, V., y cols. 1976) obtuvieron evidencias donde el carbohidrato manosa el cual formaba parte del marcador de reconocimiento ya que altas concentraciones de este azúcar inhibía la pinocitosis de la β -galactosidasa en fibroblastos. Subsiguientemente, Kaplan y cols., (Kaplan y cols. 1977) mostraron que la pinocitosis de hidrolasas ácidas era inhibida competitivamente, por fosfomananas de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*, el hecho que estas estructuras contienen Man6P, permitió sugerir que este azúcar fosforilado era un componente importante del marcador de reconocimiento propuesto por el grupo de Neufeld y que es necesario para la endocitosis de hidrolasas ácidas en fibroblastos humanos. Posteriormente se confirmó que el marcador común de reconocimiento es Man6P y que está ubicado en la parte más distal de cadenas glicosídicas de alta manosa de la β -glucuronidasa humana (Natowicz, M.R., y cols. 1979) y de α -iduronidasa (Rome, L.H., y cols. 1979),

Al conocer la naturaleza química del receptor de reconocimiento, se pudo poner a prueba la hipótesis de secreción-recaptura. Si ésta hipótesis era correcta, se podía predecir que al crecer cultivos celulares en presencia de un inhibidor competitivo como Man6P, se produciría una depleción intracelular y acumulo extracelular de las enzimas lisosomales. Pero este no es el caso, ya que los niveles intracelulares y extracelulares de las enzimas no se alteraron (Sly, W.S., y cols. 1981). Estos resultados indicaron que la hipótesis de secreción y recaptura de enzimas lisosomales no explicaba adecuadamente como las hidrolasas ácidas son transportadas a lisosomas. Aunado a estas observaciones González-Noriega y cols. (1980) estudiando el efecto de aminos en la secreción de enzimas lisosomales y su endocitosis, tanto en fibroblastos normales como en células "I" propusieron una hipótesis alterna a la secreción recaptura, que postula que la segregación y el transporte de enzimas lisosomales (mediada por un receptor) se lleva a cabo intracelularmente en el aparato de Golgi y que la vía de transporte es completamente intracelular. Esto es, las hidrolasas ácidas sintetizadas en el retículo endoplásmico son transportadas al aparato de Golgi, en este compartimento adquieren el marcador de reconocimiento Man6P que es reconocido por un receptor específico para Man6P; de ésta forma, las hidrolasas ácidas son separadas de las otras proteínas solubles que están

presentes en el lumen de los sáculos del aparato de Golgi. Los complejos receptor-enzima salen del Golgi y son transportados a prelisosomas (actualmente conocidos como endosomas). Debido al pH moderadamente ácido de este compartimento, 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 pueden recapturar una pequeña fracción de hidrolasas ácidas que tienen el marcador y que han sido secretadas, (figura 2). Posteriormente, el mismo grupo corroboró ésta hipótesis: realizando estudios de fraccionamiento celular para determinar en que organelo se encuentra el receptor y determinar en qué compartimento, el receptor se encuentra libre u ocupado por enzimas lisosomales (Fisher, H.D., y cols. 1980a). En su conjunto estos estudios permitieron establecer los siguientes principios: a) para transportar una proteína al lumen de los lisosomas, se requiere de un receptor membranal que reconozca marcadores de reconocimiento específicos en dichas proteínas, b) la unión de las enzimas al receptor permite la segregación y transporte de proteínas y c) la distribución subcelular del receptor y su ocupancia determina la vía del transporte, esperándose que esté enriquecido en el compartimento inicial y final de la vía de transporte; pero que su ocupancia sea máxima en el compartimento en que reconoce a la proteína y mínimo en el compartimento que la descarga (Fisher, H.D., y cols. 1980b).

En los siguientes años se llevaron a cabo estudios que corroboraron ésta hipótesis. Así, mismo, se profundizó en los mecanismos del transporte intracelular y compartimentación dependiente del marcador Man6P. En la figura 4 se muestra el modelo de segregación de HAs a través del marcador Man6P.

1.5.2. Biogénesis y transporte de elementos solubles de lisosoma dependiente de Man6P

Las proteínas lisosomales solubles al igual que las proteínas secretorias poseen un péptido señal en el amino terminal que promueve que los ribosomas en los que se lleva a cabo su síntesis se asienten en la superficie del retículo endoplásmico, formen poros transitorios a través de los cuales el péptido nascente se introduce al lumen del RE. Previo al plegamiento de la proteína, una cadena de oligosacáridos (Glc3Man9GlcNAc2) es

transferido a un residuo de asparagina específico, sobre la proteína naciente (Rothman. Y cols., 1978; Ruddock y Molinari, 2006). La asparagina debe formar parte de la secuencia consenso Asn-X-Thr/Ser (donde X es cualquier aminoácido excepto Prolina) que funciona como una señal de reconocimiento que permite que las proteínas sean glicosiladas. Estas cadenas glicosídicas, N-ligadas a las enzimas lisosomales, sufren modificaciones, las cuales son iniciadas en el RE antes que se complete la traducción de la proteína. Una vez que la glucosidasa I y II remueven las tres glucosas terminales, se libera la proteína lisosomal de la chaperona que dirige su plegamiento y una α -manosidasa elimina una manosa del conjunto de oligosacáridos, para formar la estructura de ocho manosas denominada cadenas tipo alta manosa. Posteriormente, las enzimas lisosomales y las proteínas secretorias viajan al aparato de Golgi en donde únicamente residuos terminales de manosa presentes en las enzimas lisosomales, son fosforiladas. Estos residuos de Man6P actuarán como marcadores específicos que permitirán que las proteínas lisosomales sean segregadas de las proteínas secretorias y a la vez transportadas a los lisosomas

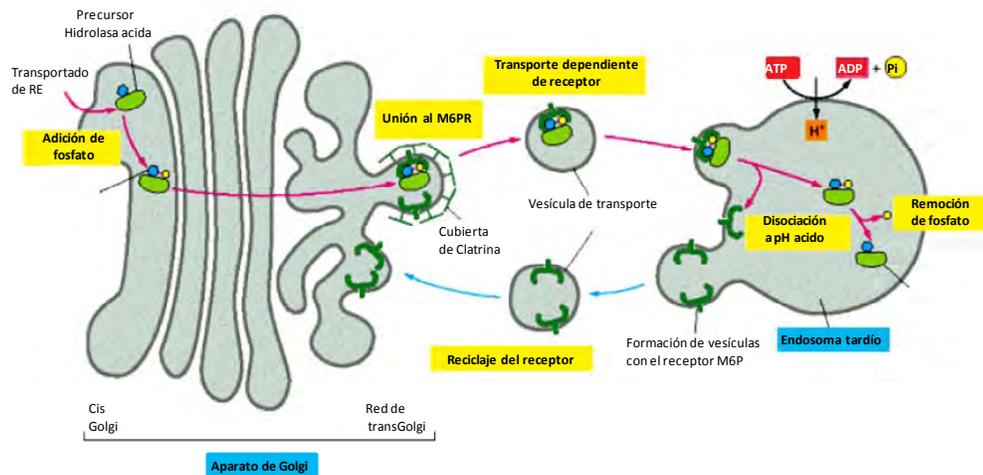


Figura 4. Transporte de enzimas lisosomales sintetizadas de novo a lisosoma.

1.5.3. Incorporación del marcador de reconocimiento Man6P a las enzimas lisosomales

La generación del marcador Man6P ocurre de la siguiente manera: la incorporación de un fosfato en el carbono seis (C-6) de manosas terminales comienza con la acción de dos enzimas que de manera secuencial completan la señal, las cuales están localizadas en la parte cis del aparato de Golgi (Rietman, M.L. y Kornfeld, S. 1981). 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 presentes en las hidrolasas ácidas. Esta fosfotransferasa reconoce una señal que es común en al menos 40 diferentes proteínas lisosomales. En una segunda reacción una fosfodiesterasa específica remueve el grupo N-acetilglucosamina, quedando el fosfato unido al C-6 de la manosa (Varki, A.P., y cols. 1981). Tan pronto la fosfodiesterasa ha removido el grupo 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-Man6PR) y otro independiente de cationes (CI-Man6PR) (von Figura, K. y Hasilik, A. 1986). La fosforilación de los residuos de manosa impide el subsecuente procesamiento de las cadenas glicosídicas; ésto es, no son transformadas a cadenas complejas.

Los pacientes que cursan mucopolidosis II o mucopolidosis III son deficientes de la fosfotransferasa, por lo cual no se puede formar el marcador de reconocimiento Man6P. Esta deficiencia, no permite que los receptores reconozcan a las proteínas lisosomales como tales por lo cual son secretadas junto con proteínas secretorias. De ésta manera las enzimas lisosomales son segregadas de aquellas proteínas destinadas a secreción.

1.5.4. Especificidad de la fosfotransferasa

No obstante, que en la sección anterior se explica en términos generales como las enzimas lisosomales son segregadas y transportadas a endosomas, una vez que adquieren el marcador de reconocimiento (Man6P) en el complejo de Golgi, no explica porque las glicoproteínas 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 (Baranski, T. J., y cols. 1990; Baranski, T. J., y cols. 1992). Este hecho no especifica porque la afinidad de la fosfotransferasa por las enzimas lisosomales es de 100-150 veces más elevada que para las otras glicoproteínas no relacionadas (Reitman, M.L. y Kornfeld, S. 1981; Bao, M. y cols. 1996).

Inicialmente se infirió que las enzimas lisosomales sin oligosacáridos son potenciales inhibidores de la fosforilación (Baranski, T.J., y cols. 1990). La primer evidencia de la

naturaleza del dominio de reconocimiento provino del estudio de 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 origen porcino, se encontró que estos residuos se localizan en la superficie de la molécula (Baranski, T. J., y cols. 1992).

Estudios en otras enzimas lisosomales han confirmado que las lisinas seleccionadas son críticas para la unión de la fosfotransferasa (Cuozzo, J. W. y Sahagian, G. G. 1994). En el caso de las catepsinas D y L, las dos lisinas representan la principal señal de fosforilación ya que están posicionadas a 34 Å alejadas de una de las lisinas y cercanas a la asparagina glicosilada en un microambiente básico, mientras que la otra lisina está situada en un ambiente más ácido (Cuozzo, J.W., y cols. 1998).

En su conjunto, todos estos resultados sugieren que el dominio de reconocimiento está en la parte superficial de las hidrolasas ácidas y que los elementos críticos (lisinas) están espaciados por residuos de carbohidratos, de manera que para que la fosfotransferasa ejerza su función, primero se debe posicionar en la proteína lisosomal, lo cual permite reconocer de manera eficiente a las cadenas glicosídicas de las glicoproteínas susceptibles a ser fosforiladas ver figura 5.

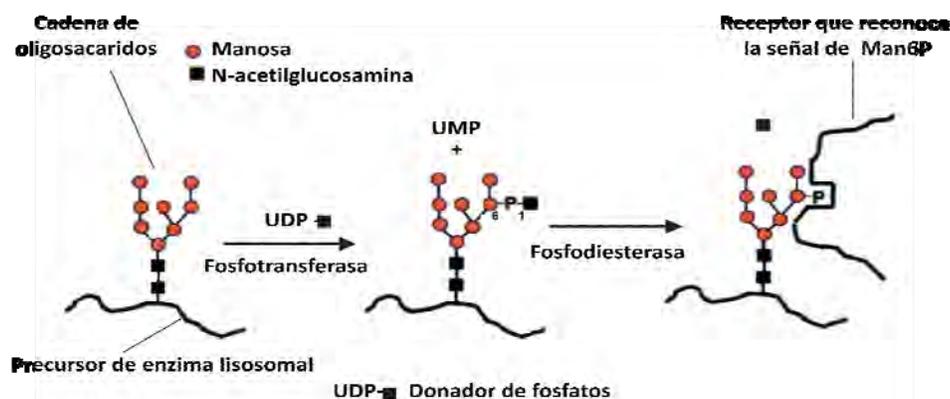


Figura 5. Generación del Marcador Manosa 6-Fosfato.

1.6. Receptores Man6P

El transporte de enzimas lisosomales solubles desde su sitio de síntesis así como su correcta clasificación dependen principalmente de receptores que reconocen a la señal de Man6P. A la fecha se conocen dos diferentes tipos de receptores para Man6P (Man6PRs). Estos han sido purificados a partir de membranas celulares por cromatografía de afinidad utilizando matrices que contienen unido el ligando Man6P (Lobel, P., y cols. 1987; Dahms, N.M., y cols. 1987). Ambos receptores difieren en sus propiedades de unión y requerimientos de cationes divalentes para la unión al ligando, así como en su peso molecular.

1.6.1. El CI-Man6PR

El receptor, CI-Man6PR, fue el primero que se reportó y, es referido como CI-Man6PR, Man6PR-300 o IGFII/Man6PR, es una glicoproteína de 300 kDa que no requiere de cationes para unirse a su ligando (Sahagian, G.G., y cols. 1981). El CI-Man6PR bovino contiene una secuencia señal amino terminal de 44 residuos, una región extracitoplásmica de 2269 residuos, una región transmembranal de 23 residuos y un dominio citoplásmico carboxilo terminal de 163 residuos. La región extracitoplasmática está compuesta de 15 dominios repetidos acomodados en tándem, cada dominio consta de 150 residuos aproximadamente y presenta una identidad significativa del 14 al 30% con el otro receptor (CD-Man6PR). La secuencia completa de aminoácidos de este receptor, se dedujo a partir de clonas de cDNA que codifican para ésta proteína y revela que es una glicoproteína transmembranal tipo I.

Estudios llevados a cabo mediante técnicas de inmunocitoquímica demuestran que el receptor CI-Man6PR se localiza principalmente en endosomas, membranas trans del Golgi, pero no en lisosomas y solo una pequeña cantidad de receptor CI-Man6PR se encuentra en la membrana plasmática (Kyle, J.W., y cols. 1988). Estudios sobre su biosíntesis indican que el Man6PR-300 presenta algunas modificaciones postraduccionales: a) glicosilación del dominio extracitoplasmático (Kiess, W., y cols. 1991), b) fosforilación de cuatro de los cinco sitios en el dominio citoplasmático, c) palmitoilación (Westcott, K.R. Y Rome, L.H. 1988) y d) formación de tres o cuatro puentes disulfuro con cada repetición (Tong, P., y cols., 1989).

Se ha reportado que CI-Man6PR une dos moléculas de Man6P por molécula de un oligopéptido difosforilado, este último con una afinidad de aproximadamente 2×10^{-9} M, y que fragmentos solubles del receptor CI-Man6PR formados por cortes proteolíticos, son capaces de conservar sus propiedades de unión al ligando (Kiess, W., y cols. 1987).

La principal función del CI-Man6PR es transportar a las enzimas lisosomales solubles recién sintetizadas desde el TGN y subsecuentemente liberarlas a endosomas tardíos. Aproximadamente 10 % del CI-Man6PR se localiza en la membrana plasmática, donde promueve la endocitosis de ligandos exógenos que contienen Man6P (Fischer, H.D., y cols. 1980). Se han realizado experimentos en donde se inactivó el gen que codifica para este receptor en fibroblastos y se encontró que las células secretan la mayoría de las hidrolasas ácidas debido a que no son segregadas de las proteínas secretorias (Kiess, W., y cols. 1987).

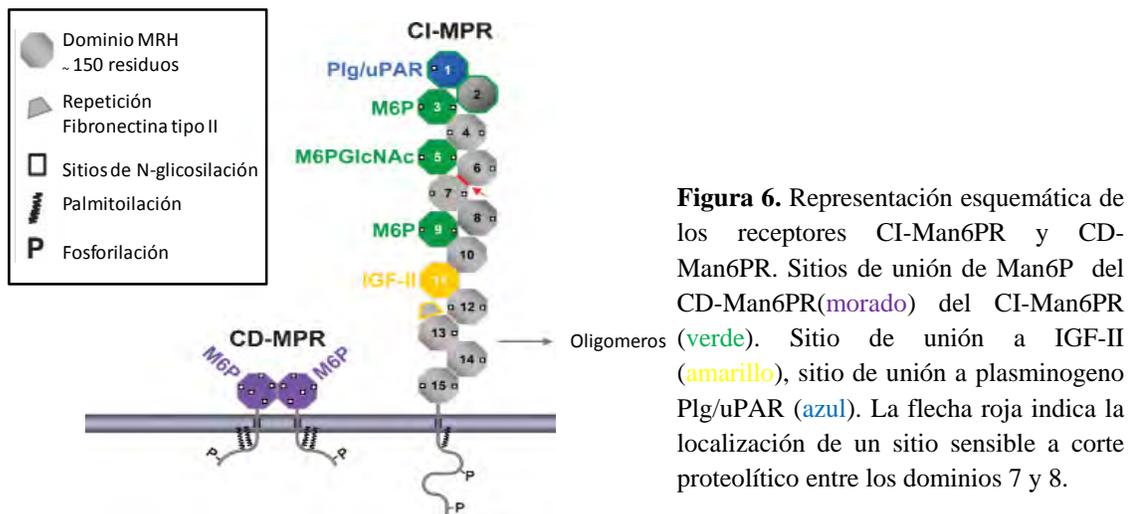
1.6.2. El CD-Man6PR

Otro receptor que reconoce la señal Man6P es conocido como CD-Man6PR ó Man6PR-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 unir a su ligando, en comparación al receptor CI-Man6PR que tiene una alta afinidad por su ligando a $pH < 6.5$ (Hoflack, B. y Kornfeld, S. 1985). La secuencia de aminoácidos para el receptor de 46 kDa, muestra que es una proteína transmembranal tipo I, es un homodímero. El CD-Man6PR de bovino está compuesto de una secuencia señal amino terminal de 28 residuos, una región extracitoplásmica de 159 residuos, una región transmembranal de 25 residuos y un dominio citoplásmico carboxilo terminal de 67 residuos. La región extracitoplásmica de el CD-Man6PR contiene seis residuos de cisteína que están involucrados en la formación de tres enlaces disulfuro intramoleculares que juegan papeles esenciales en el plegamiento del receptor (Wendland, M., y cols. 1991)

El descubrimiento del receptor CD-Man6PR fue resultado de observaciones realizadas en líneas celulares deficientes para el CI-Man6PR, ya que se encontró que eran capaces de transportar algunas de las hidrolasas ácidas (aproximadamente el 40% de eficacia) (Hoflack, B. y Kornfeld, S. 1985). Este receptor tiene una función menos importante en el transporte de enzimas lisosomales que el CI-Man6PR, ya que en algunos experimentos se

ha encontrado que el CI-Man6PR puede compensar la pérdida del CD-Man6PR. Pero, la expresión de altos niveles del CD-Man6PR en células, después de la transfección con el apropiado cDNA, solo incrementa un poco su capacidad de endocitar a las hidrolasas exógenas en medio neutro. En condiciones normales este receptor no endocita hidrolasas ácidas presentes en el espacio extracelular (Watanabe, H., y cols. 1990; Fischer, H. D., y cols. 1982).

En resumen, los receptores Man6PRs han sido ampliamente estudiados en relación a sus propiedades de unión a su ligando, tráfico intracelular, etc. Hasta ahora existe un consenso en la literatura en relación a 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.



1.7. Transporte de proteínas integrales de membrana a lisosomas

El estudio para identificar la manera de transportar a las proteínas integrales de la membrana lisosomal se ha llevado a cabo principalmente con las LIMPs. Se sabe que el transporte y los niveles de las LIMPs son similares en fibroblastos de células "T" y en fibroblastos normales (Hunziker, W, y Geuze, H. J., 1996). Así mismo, no se ha detectado fosforilación en las cadenas glicosídicas de estas glicoproteínas. El proceso de glicosilación de proteínas se inhibe con tunicamicina, ninguna proteína puede adquirir el marcador de reconocimiento fosforilado, las LIMPs siguen siendo transportadas en forma normal a

lisosomas, todo esto sugiere que este tipo de proteínas no requiere del marcador de reconocimiento Man6P.

Con el propósito de conocer si algún componente de la LIMP presenta 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 ha alterado su composición y se han transfectado células con el fin de expresar la nueva proteína para examinar su destino final. De esta forma se han obtenido proteínas quiméricas de la membrana plasmática conteniendo segmentos de las LIMPs, con ellas se ha observado que aquellas que contienen uno de los segmentos peptídicos de las LIMPs que se encuentran en las colas citosólicas de estas proteínas integrales de membrana lisosomal, son transportadas a lisosomas (Eskelinen, E.L., y cols. 2003). Por medio de mutagénesis dirigida se han podido alterar de diferentes formas, la composición de aminoácidos 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 han permitido concluir que en los segmentos de las colas citosólicas, amino o carboxilo terminal, hay secuencias de aminoácidos que son indispensables para el transporte y destino final de este tipo de proteínas membranales (Guarnieri, F.G., y cols. 1993). Se han podido detectar dos secuencias de aminoácidos específicas, que determinan una compartimentación correcta de las proteínas de la membrana lisosomal, una dada por la secuencia Gly-Tyr (glicina-tirosina) que está presente prácticamente en todas las glicoproteínas de la membrana lisosomal (Fukuda, M. 1991) y otra por Leu (Ile)-Ile (Leucina, Isoleucina) presente en la LIMP II (Sandoval, I., y cols. 1994).

Cualquier sustitución en alguno de los aminoácidos de la señal de reconocimiento 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 e inmunofluorescencia, han permitido detectar que las proteínas de membrana lisosomal, se sintetizan 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 como LAMP1 y 2, conteniendo la secuencia Gly-Tyr, se transportan primero a la membrana plasmática y de allí a endosomas y lisosomas (Janvier, K. y Bonifacino, J. S. 2005).

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. Por último, se ha encontrado que el número de moléculas de las LIMPs presentes en las membranas de lisosomas es diferente, así como también 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 (Eskelinen, E.L., y cols. 2003).

En resumen, está bien establecido que el transporte de proteínas de membrana lisosomal a endosomas tardíos y lisosomas no requiere de la acción de los receptores de Man6P ya que su transporte no depende de la glicosilación de estas proteínas. Mutantes de LAMP-1 o LAP que pierden su cola citosólica fallan para llegar a lisosomas.

Además, una proteína quimérica conteniendo el dominio luminal de LIMP II y la cola citosólica de una proteína residente de la membrana no fue transportada a lisosomas, por lo que estos experimentos indican que las colas citosólicas contienen la información necesaria para el envío de este tipo de proteínas a lisosomas (Peter, C., y cols. 1990). Por el contrario las colas citosólicas de LAMP-1 (Mathews, P., y cols. 1992; Honing, S, y Hinziker, W. 1995; Williams, M.A. y Fukuda, M. 1990; Guarnieri, F. G., y cols. 1993), LAP (Peter, C., y cols 1990; Lehiman, L.E., y cols. 1992) y LIMP II (Vega, M.A., y cols. 1991) son suficientes para redireccionar proteínas residentes de la membrana plasmática a lisosomas. A la fecha, han sido identificadas dos distintas clases de señales citosólicas capaces de promover el transporte a endosomas y lisosomas en proteínas de membrana lisosomal. Uno de estos determinantes, presente en LAMP-1, LAMP-2, LIMP-1, LIMP-II y LAP está basado en el siguiente motivo GYXXZ donde el residuo crítico es la tirosina. La segunda señal es LI (Leucina, isoleucina) encontrada en la proteína LIMP-II y está relacionada a los motivos dileucina.

Estas señales citosólicas son reconocidas por dos tipos de adaptadores de clatrina, los complejos adaptina y las proteínas GGA. Estas últimas son proteínas que al igual que las adaptinas sirven como proteínas de andamiaje y reclutamiento de clatrina, éstas se dividen en tres clases, GGA1, GGA2 y GGA3, las cuales son codificadas por tres genes diferentes, las tres proteínas tienen una estructura conservada, formada por los dominios VHS, GAT, Hinge y GAE. Los dominios VHS, GAT y GAE son globulares, mientras que el dominio Hinge no forma una estructura definida. El dominio VHS es el responsable de reconocer las señales DXXLL (54,57), los residuos clave D y LL se unen a los residuos cargados positivamente y a los hidrofóbicos respectivamente del dominio VHS (63,65). Por su parte el dominio GAT es el responsable del reclutamiento de las GGAs a la membrana ya que este dominio interactúa con el fosfoinosítido P14P (73). Mientras que el dominio Hinge contiene regiones que se unen al dominio N-terminal de la cadena pesada de la clatrina (67,74) y a los motivos DXXLL que se unen intramolecularmente al dominio VHS de la misma GGA (75). Finalmente, el dominio GAE se une a proteínas accesorias que contribuyen a la formación, movimiento y/o fusión de vesículas cubiertas de clatrina derivadas del TGN que pueden funcionar como adaptadores adicionales (78,81). Estas propiedades de los diferentes dominios definen a las GGAs como adaptadores de clatrina que son reclutados al TGN en una manera dependiente de GTPasas Arf clase 1 para la segregación de proteínas transmembranales que tienen las señales DXXLL en vesículas cubiertas de clatrina.

Por otra parte los complejos Adaptina también encargados de reconocer las señales en las colas citosólicas de las proteínas membranales permiten el transporte y segregación de este tipo de proteínas. Existen 4 tipos de complejos adaptina: AP-1, AP-2, AP-3 y AP-4. Los cuales se caracterizan por su localización. El complejo AP-1 se localiza en el TGN y endosomas y consiste de 4 subunidades llamadas γ , $\beta 1$, $\mu 1$ y $\sigma 1$. Estas se ensamblan en una estructura globular compuesta del N-terminal plegado de la subunidad γ y $\beta 1$ que se extiende a lo largo de un dominio de bisagra no estructurado que tiene un dominio final plegado denominado oreja (86). Las secuencias YXX ϕ y DEXXXLLI de los receptores MPR así como de otras proteínas se unen a las subunidades $\mu 1$ y $\sigma 1$ del complejo AP-1 respectivamente (87-90). Lo que trae como consecuencia el reclutamiento de la clatrina para formar la vesícula cubierta de clatrina y transportar a la proteína transmembranal.

Finalmente, en la tabla 2 se muestra los diferentes tipos de señales involucradas en el transporte de proteínas transmembranales.

Tabla 2. Ejemplos de señales de segregación basadas en dominios dileucina y tirosina presentes en las colas citosólicas de las proteínas membranales.

Proteína transmembranal	Señal de reconocimiento
	DXXLL
MPR300/CI-Man6PR	SFHDDS DE DL L
MPR46/CD-Man6PR	EESEERDDH L
Sortilina	GYHDDS DE DL L
SorLA/SORL1	ITGFSD D VP M V
GGA1 (1)	ASVSL L DD E LM
GGA1 (2)	ASSGLDD L DL L
GGA2	VQNPSADRN L
GGA3	NALSW L DE E LL
	(DE)XXX L (LI)
LIMPII	DERAP L I
NPC1	TERER L L
Mucolipina-1	SETER L L
Sialina	TDRT P LL
GLUT8	EETQ P LL
Cadena Invariante (li)(1)	DDQR D LI
Cadena Invariante (li)(2)	NEQL P ML
	YXXφ
LAMP-1	GYQ T I
LAMP-2 ^a	GYEQ F
LAMP-2B	GYQ T L
LAMP-2C	GYQ S V
CD63	GYEV M
CD68	AYQ A L
Endolina	NYH T L
DC-LAMP	GYQ R I
Cistinosina	GYD Q L
Intercambiador fosfato azúcar	GY K EI
Fosfatasa ácida	GYR H V

Todas las secuencias corresponden a proteínas humanas. Algunas señales varían en una posición del motivo consenso. Las señales DXXLL se cree están principalmente involucradas en el transporte TGN-endosomas. Las señales YXXφ y (DE)XXX(LI) dirigen el transporte directo a lisosoma. Los residuos clave se presentan en negrita. Tomado de Braulke, T. y Bonifacino, J.S. 2009.

1.8. Transporte de enzimas lisosomales independiente de Man6P

No obstante la importancia que tiene el marcador Man6P en el transporte de proteínas solubles de lisosoma, desde los años ochenta se obtuvo evidencias sobre la existencia de posibles mecanismos alternos para el transporte y compartimentación de enzimas lisosomales. Pacientes con MLPII han servido como modelo para probar estos hallazgos. Estos pacientes son deficientes de una fosfotransferasa (enzima que fosforila la manosa) debido a esto las HAs no adquieren el marcador de reconocimiento, y no son reconocidas por los receptores Man6PR y son secretadas al medio extracelular. Sin embargo, en los años 80's, se encontró que no obstante la carencia del marcador Man6P en células Kupffer, hepatocitos, leucocitos y timocitos de pacientes con MLPII, los niveles intracelulares de enzimas lisosomales son normales. Estas observaciones fueron corroboradas en modelos de animales deficientes para los dos receptores de Man6P con lo cual se confirmó la existencia de mecanismos alternos para el transporte de proteínas solubles de lisosoma (Waheed, A., y cols. 1982; Dittmer, F., y cols. 1999).

Hoy en día se sabe que existen marcadores de reconocimientos alternos para el transporte de las proteínas solubles de lisosomas desde su sitio de síntesis a lisosomas que son reconocidos por receptores específicos. Dependiendo del marcador de reconocimiento las proteínas lisosomales pueden ser agrupadas en tres familias. En la primera se pueden agrupar aquellas proteínas que son transportadas exclusivamente por receptores membranales (Man6PRs) que reconocen al marcador Man6P, presente en las cadenas glicosídicas de la mayoría de las enzimas lisosomales. Este mecanismo ya fue descrito anteriormente.

En la segunda familia se agrupan, aquellas enzimas lisosomales que no contienen el marcador Man6P. En este grupo se incluye a la fosfatasa ácida que es transportada como proteína integral de membrana, y a la β -glucocerebrosidasa (β GC) que es transportada por una proteína integral de membrana lisosomal (la proteína LIMP-II) (Reczek, D., y cols. 2007).

Aunque la proteína LAP es una enzima lisosomal soluble, ésta es transportada como proteína integral de membrana desde retículo endoplásmico a la membrana del lisosoma o

de endosomas tardíos. En donde es procesada proteolíticamente, resultando en la liberación del ectodominio que codifica para la actividad enzimática (Pohlmann, R. y cols., 1988; Waheed, A. y cols., 1988).

El precursor de LAP es una proteína transmembranal tipo I, con un dominio luminal largo, un solo dominio transmembranal, y una cola citosólica de 19 aminoácidos. Tiene ocho sitios potenciales de glicosilación. La señal para el transporte lisosomal de ésta proteína es realizada por el motivo GYXXV el cual, no se encuentra en el extremo de la cola citosólica sino mas internamente (tabla 2).

A diferencia de muchas enzimas lisosomales, la (β GC) no adquiere la señal de Man6P y en células I ó en células deficientes de los M6PRs, la β GC es transportada normalmente a lisosomas. Se ha encontrado que en ratones que son deficientes de LIMP-II, la β GC no llega a lisosomas, la cual es secretada y concuerda con que LIMP-II es la proteína que funciona como receptor para el transporte de β GC. En estudios recientes se encontró que β GC se une a la proteína de la membrana lisosomal LIMP-II y ésta unión permite el transporte de la enzima al lisosoma (Reczek. D., y cols. 2007). Esta unión es dependiente de pH, el cual posibilita la formación del complejo (receptor-enzima) en el RE y en todo el trayecto hasta llegar a lisosomas en donde se disocian debido al pH ácido de los organelos. El sitio de interacción entre β GC y LIMP-II ha sido identificado y se trata de un motivo coiled-coil altamente conservado en el dominio luminal de la LIMP-II. Sin embargo, éste no se ha encontrado en la β GC (Dvir, H. y cols. 2003). No se sabe si LIMP-II solo transporta a la β GC o si ésta transporta a otras enzimas lisosomales. Además estos datos sugieren que el transporte de las LMPs puede estar ligado a las vías de transporte de enzimas lisosomales.

En la última familia se incluyen aquellas HA que contienen el marcador de Man6P pero también tienen otros marcadores, por lo que pueden ser transportadas por diferentes receptores. En este grupo se han descrito dos receptores independientes de Man6P, uno la sortilina que transporta a la catepsina D y H, saposinas (SAPs) y esfingomielinasa (Canuel, M., y cols. 2008) y otro el receptor independiente de Man6P (RI-Man6P) a la β -glucuronidasa bovina, el cual estudiamos en el laboratorio.

En el caso de la sortilina, ésta es un miembro de la familia de las proteínas Vps10p tipo1 (son proteínas que portan un dominio de segregación de proteínas vacuolares). Estas proteínas forman una familia de receptores transmembranales tipo I. Ellas son expresadas en muchos tejidos y se unen a una gran variedad de ligandos (Hermey et al., 1999; Jacobsen, y cols., 2001). En células de mamífero la familia VpS10p está formada por 5 miembros: SorLA (250kDa) (Jacobsen, y cols., 1996) Sortilina (100 kDa) (Petersen, y cols., 1997), SorCS1, SorCS2 y SorCS3(130 kDa) (Hermey, y cols., 1999). Se ha demostrado que el carboxilo terminal de la sortilina contiene motivos de unión a AP-1 y GGA que son esenciales para su tráfico.

La estructura cristalina de la sortilina humana en complejo con neurotensina revelaron que la unión de sortilina a su ligando ocurre a través de un túnel formado por un dominio de β propela (Quistgaard, E. M. y cols. 2009). Lo cual demuestra que sortilina se une a su ligando de una manera similar a como lo hace la LIMP-II a través de una interacción proteína-proteína. Finalmente, se ha demostrado que catepsina D una enzima lisosomal puede ser transportada tanto por Man6PR así como por sortilina esto observó cuando se eliminó la expresión de sortilina a través de RNA de interferencia el tráfico de catepsina D continuaba el cual se asocia a Man6PR y viceversa. Mientras que catepsina H solo es transportada por sortilina (Canuel, M. y cols. 2008).

1.8.1. Modelo de estudio β -glucuronidasa bovina

El siguiente modelo es la β -glucuronidasa bovina. En el laboratorio al estudiar la cinética de endocitosis de ésta enzima a fibroblastos humanos provenientes de pacientes deficientes para dicha enzima, se encontró que puede ser endocitada por dos sistemas de transporte diferentes: uno reconoce el marcador Man6P y el otro reconoce a un marcador hasta entonces desconocido. Al caracterizar éste sistema desconocido se encontró que: a) La endocitosis de la β -glucuronidasa bovina se reduce solo 30% en presencia de Man6P o bien si la enzima es tratada con endoglicosidasas o fosfatasas. b) La cinética de endocitosis (V_{max} y K_m) de ambos sistemas es similar. c) La enzima capturada por uno u otro sistema es transportada a lisosomas. d) Anticuerpos dirigidos en contra del receptor CI-ManPR bloquean la endocitosis de la enzima que contiene el marcador Man6P, pero no el que contiene el nuevo marcador y la enzima sigue entrando. e) Aminas primarias, que

incrementan el pH intracelular e inhiben la endocitosis del receptor CI-Man6PR, no ejercen ningún efecto sobre el nuevo mecanismo de transporte (González-Noriega, A., y cols. 2006). Estas observaciones indican que ambos receptores corresponden a dos proteínas diferentes en su estructura, especificidad e independientes en su función.

El marcador de reconocimiento para este nuevo sistema de transporte independiente de Man6P (RI-Man6P), se ha podido aislar a partir de hidrolizados de β -glucuronidasa de hígado bovino encontrándose que es una secuencia de aminoácidos, la cual está formada por la secuencia Ser-Trp*-Ser, en donde * es un residuo de 15 Da que posiblemente modifica postraduccionalmente a un residuo de triptófano. Anticuerpos generados en contra de este tripéptido inhiben competitivamente la endocitosis de la β -glucuronidasa bovina en fibroblastos humanos. Por otra parte, también se han podido purificar a través de cromatografía de afinidad unas proteínas, con un peso molecular de 78/72 kDa que mostraron ser capaces de reconocer específicamente a la β -glucuronidasa de hígado bovino las cuales corresponden al receptor propuesto, además, que tienen la capacidad de endocitar a ésta enzima en fibroblastos humanos. La obtención de anticuerpos en contra del receptor lo cuales son capaces de bloquear específicamente la endocitosis de β -glucuronidasa bovina en fibroblastos humanos, permitió confirmar que la proteína purificada corresponde al receptor. Estos anticuerpos también permitieron, detectar el receptor en varios tejidos de diferentes especies animales. Por otro lado, en estas primeras purificaciones no fue posible la secuenciación del receptor, debido a la pequeña cantidad de muestra que se obtenía. Sin embargo, se continuó con el estudio de la localización y transporte biosintético del RI-Man6P, el cual se describe a continuación (González-Noriega, A., y cols. 1989; González-Noriega, A., y cols. 2001; González-Noriega, A., y Michalak, C. 2001).

1.8.2. Distribución subcelular y transporte biosintético del RI-Man6P

Una vez que se identificó el receptor y que se obtuvieron los respectivos anticuerpos, se procedió a determinar la distribución intracelular y la ruta a través de la cual el RI-Man6P transporta a la β -glucuronidasa que contiene el nuevo marcador de reconocimiento. Utilizando gradientes de Percoll, se encontró que mientras que el receptor CI-Man6P está enriquecido en Golgi y endosomas, en contraste, el 50% del RI-Man6P se

ubica en fracciones que se traslapan parcialmente donde se encuentran los lisosomas y en menor cantidad en endosomas y en la membrana plasmática. La fracción de “alta densidad” (VAD) (vesículas de alta densidad), en que se encuentra enriquecido el nuevo receptor, no corresponde a lisosomas ya que: no contienen enzimas lisosomales, ni el marcador de membrana lisosomal LIMP-II, no son lisadas como los lisosomas con el sustrato GPN (glicil-L-fenilalanina 2-naftilamida) para catepsina C y su pH aparentemente es neutro (González-Noriega, A., y cols. 2006).

Con base al trabajo anterior se estableció la ruta biosintética del RI-Man6P desde retículo endoplásmico a las vesículas de alta densidad. Experimentos de pulso y caza permitieron conocer la cinética de transporte. Las rutas que sigue el RI-Man6P a los compartimentos mencionados en la sección anterior, pero lo más importante, ubicar las VAD dentro de ésta vía de transporte. Los resultados obtenidos sugieren que: Existen dos vías por las cuales el receptor es transportado a las vesículas de alta densidad, una a través de la membrana plasmática, la otra intracelular de Golgi a endosomas, prelisosomas y vesículas de alta densidad. El RI-Man6P empieza a llegar a las VAD 120 min después de su síntesis; esto es, las VAD se encuentran al final de la vía biosintética. La cinética de transporte, tipo hipérbola, sugiere que el transporte a través de los diferentes organelos no es unidireccional, sino que el receptor cicla entre los diferentes compartimentos. Esta observación fue corroborada al tratar los cultivos con cloruro de amonio, se encontró que ésta amina estimula el transporte del receptor en sentido inverso, esto es desde las VAD a los endosomas y membrana plasmática (González-Noriega, A., y cols., 2005).

Normalmente se espera que una proteína se encuentre enriquecida en aquellos orgánulos en las cuales ejerce su función. Por ejemplo, el receptor CI-Man6PR se encuentra enriquecido en el compartimento en que capta a las enzimas lisosomales (Golgi) y en el compartimento en que descarga las enzimas lisosomales (endosomas tardíos). Los resultados que se han obtenido para este nuevo transportador contradicen lo reportado para los transportadores Man6PR y sortilina, ya que se ha encontrado al RI-Man6P al final de su vía biosintética, por lo que es necesario continuar con el estudio de este receptor y de las vesículas en las cuales se encuentra este receptor.

El comportamiento anómalo de este receptor en PAGE-SDS dificultó los intentos realizados para caracterizarlo. Como receptor endocítico, este receptor se extrajo de las membranas con Tritón X-100. Una vez purificado, se observó que dependiendo de las condiciones utilizadas para concentrarlo variaba su peso molecular aparente en PAGE-SDS desde 47/42 kDa hasta 78/72 kDa. En el laboratorio se pensó que ello era debido que al extraerse con 1.5 % de tritón X-100 el receptor quedaba incluido en micelas y el detergente que englobaba al receptor es difícilmente extraído. Para probar esta hipótesis se vio que el peso molecular aparente del receptor al extraerse con SDS era de 78/72 kDa, y si a esta preparación se añadía Tritón, su peso molecular era reducido hasta llegar a 47/42 kDa. Este comportamiento anómalo no permitió confirmar sin duda que contrariamente a lo observado con otras proteínas que atraviesan endosomas estaba glicosilado. Por último, al resolver el receptor en PAGE-SDS en condiciones no reductoras se observó una sola banda cuyo peso molecular aparente era de 68 kDa, esto sugerí que el receptor está compuesto por un solo tipo de proteína y que las bandas que se observan quizá eran isoformas que se obtienen al reducirse.

Hipótesis
y
Objetivos

Hipótesis

La endocitosis no dependiente de manosa-6-fosfato en fibroblastos humanos es saturable, específica, dependiente de tiempo, temperatura y pH, por lo que debe ser mediada por una proteína específica que actúe como receptor membranal endocítico.

2. Objetivo general

Determinar la estructura molecular del receptor independiente de Man6P y las secuencias de aminoácidos que conforma las señales necesarias para su compartimentación.

Metas

- 1) Clonar y secuenciar el cDNA del receptor independiente de Man6PR.
- 2) Determinar si el receptor independiente de Man6PR es codificado por un mismo gen o son isoformas de una misma proteína.
- 3) Expresar el cDNA, con el fin de probar la funcionalidad del receptor independiente de Man6P
- 4) Determinar la secuencia de aminoácidos presentes en las colas citosólicas que controlan el transporte del receptor independiente de Man6P.

Justificación

3. Justificación

En el laboratorio se ha encontrado un nuevo receptor para la endocitosis no dependiente de Man6P y su transporte a lisosomas. Este receptor aunque ya se purificó no se ha identificado. Su identificación permitirá su caracterización. Existe la posibilidad de que sea una proteína con una función ya conocida, en este caso tendremos que obtener evidencias de que es una proteína multifuncional; en caso de que fuese una proteína no reportada, se clonará su gen para saber su secuencia de aminoácidos como primer paso para conocer su estructura.

Capítulo II

Material y Métodos

4. MATERIALES

4.1 Microorganismos

Cepa de *Escherichia coli* usada para la manipulación del DNA.

XL1-Blue: endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44F'[:Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ) M15] hsdR17(r_k⁻ m_k⁺, resistente natural a ácido nalidíxico y tetraciclina.

4.2. Líneas celulares de mamífero

HepG2: línea celular de epitelio de hígado humano, obtenida de un joven de 15 años de edad con carcinoma hepatocelular.

A431: línea celular epitelial establecida de un carcinoma epidermoide de una mujer de 85 años.

L929: línea celular fibroblastoide, es una subclona de la línea celular L establecida por W. R. Earle en 1940. La clona L se estableció a partir de un tejido adiposo y areolar subcutáneo normal de un ratón macho C3/An de 100 días de vida.

BGH-1: cultivo primario de células fibroblastoides, obtenidas de una paciente deficiente de β-glucuronidasa.

4.3. Vectores plasmídicos

4.3.1. Vectores para la manipulación del DNA

pGEM-TEasy: Se ha utilizado para clonar fragmentos de DNA obtenidos por PCR siguiendo el protocolo del kit de clonación pGEM-TEasy (Promega). El plásmido de 3.0 kb, contiene un gen de resistencia a ampicilina, está linearizado y posee un residuo de timina protuberante en el extremo 5'. De esta forma, se facilita la inserción de los fragmentos amplificados por PCR que presentan una adenina protuberante en 3' (figura 7).

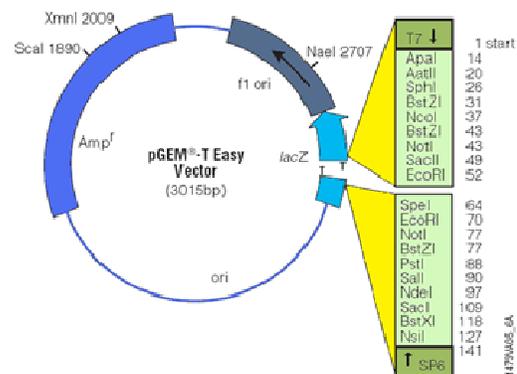


Figura 7. Mapa del vector pGEM-T Easy. Promega

pIRESneo3: vector de expresión bicistrónico que permite la rápida y eficiente selección de clonas positivas que expresan la proteína de interés. Éste incluye un cassette que expresa ambos el gen de interés y el marcador de selección a partir de un solo promotor. Contiene un sitio interno de entrada a ribosoma que fue obtenido del virus ECMV (virus de la encefalomiocarditis), el cual permite la traducción de dos fragmentos de lectura abierta a partir de un solo RNA mensajero. Después de la selección con G418 (geneticina), todas las colonias que sobreviven expresarán establemente el gen de interés, esto elimina la necesidad de sondear un gran número de colonias para encontrar la clona funcional. Éste vector tiene un tamaño de 5.2 kb, contiene el promotor principal inmediatamente temprano de citomegalovirus humano, seguido por el sitio múltiple de clonación (figura 10).

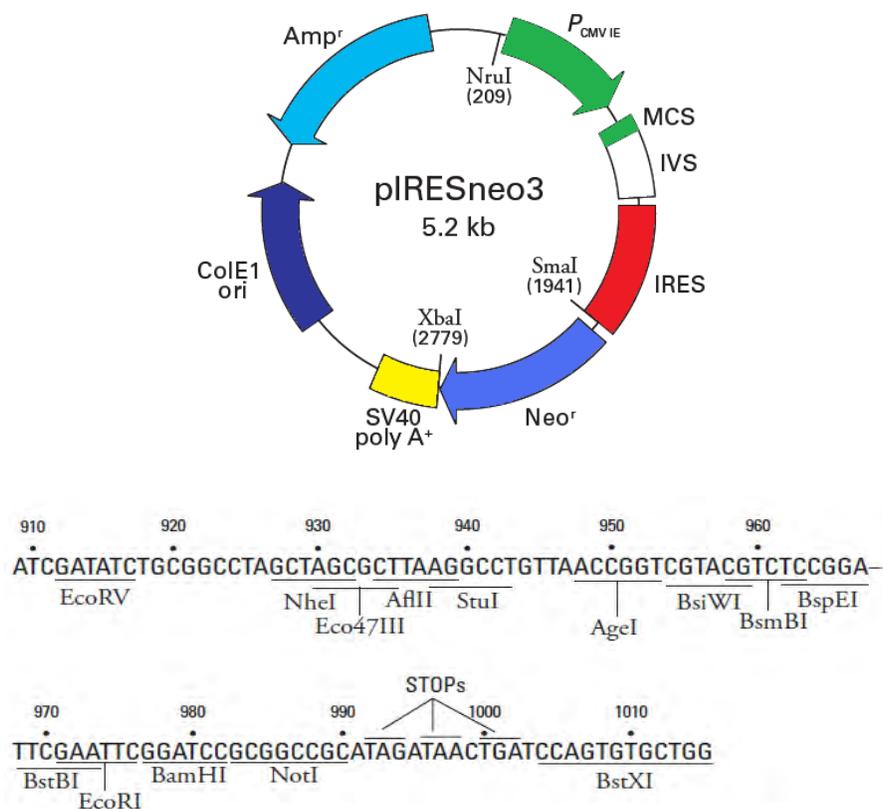


Figura 10. Mapa y sitio múltiple de clonación del vector de expresión pIRESneo3, Clontech

4.4. Anticuerpos

Nombre Anticuerpos	Tipo	Epítipo	Generado en	Origen
Generados en el laboratorio				
Rb-1	Policlonal	Proteína completa RI-Man6P	Conejo	Dr. Alfonso González
Rb-646	Policlonal	Proteína completa RI-Man6P	Conejo	Dr. Alfonso González
Rb-421	Policlonal	Proteína completa RI-Man6P	Conejo	Dr. Alfonso González
Cy-422	Policlonal	Proteína completa RI-Man6P	Cuyo	Dr. Alfonso González
Rb-5	Policlonal	Ser-Trp-Ser de β -glucuronidasa bovina	Conejo	Dr. Alfonso González
Rb-164	Policlonal	Proteína completa CI-Man6P	Conejo	Dr. Alfonso González
Rb-301	Policlonal	Proteína completa β -glucuronidasa prepucial de rata	Conejo	Dr. Alfonso González
Comerciales				
B01	Policlonal	Proteína completa AnxA6 humana	Ratón	Abnova
N-19	Policlonal	Aminoácidos 1-50 de AnxA6 humana	Cabra	Santa Cruz
Clona-73	Monoclonal	Proteína completa AnxA6 humana	Ratón	BD Biosciences
K-14	Policlonal	C-terminal de Anx6 humana	Cabra	Santa Cruz
Anti-Conejo IgG conjugado a peroxidasa (HRP)	Secundario	IgG de conejo	Cabra	Zymed
Anti-Cabra IgG conjugado a peroxidasa (HRP)	Secundario	IgG de Cabra	Conejo	Zymed
Anti-Ratón IgG conjugado a peroxidasa (HRP)	Secundario	IgG de Ratón	Conejo	Pierce
Alexa Fluor 594 anti -cabra	Secundario	IgG de Ratón	Burro	Molecular Probes
Alexa Fluor 594 anti-Conejo	Secundario	IgG de Conejo	Cabra	Molecular Probes
Texas Red anti-Ratón	Secundario	IgG de Ratón	Caballo	Vector Laboratories
FITC anti-Guinea Pig	Secundario	IgG de Guinea Pig	Conejo	Zymed
FITC anti-Conejo	Secundario	IgG de Conejo	Burro	Jackson ImmunoResearch
FITC anti-Conejo	Secundario Monoclonal	IgG de Conejo	Ratón	Sigma

4.5. Medios de cultivo

Los medios que se describen a continuación se utilizaron posterior a su esterilización en autoclave durante un ciclo de 20 min., a 120°C o mediante filtración a través de filtros de 0.22 µm.

4.5.1. Cultivo de *E. coli*

LB (Sambrook y col., 1989), medio empleado para el crecimiento de las cepas bacterianas con el objeto de purificar plásmidos a pequeña o gran escala. Éste medio contiene bacto triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl g/l. Para el crecimiento de las bacterias en medio sólido se añadió agar 15 g/l. Para la selección de transformantes de *E. coli* se añadió a los medios ampicilina (100 µg/ml).

4.5.2. Cultivo de líneas celulares de mamífero

α-MEM (GIBCO): suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado, 1mM de piruvato de sodio, 5 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin.

4.6. Soluciones de uso general

PBS 1X: NaCl 0.137 M, KCl 0.0026 M, Na₂HPO₄ 0.008 M, KH₂PO₄ 0.0014M

SSMALBES: NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, BES 25 mM, ácido maléico 25 mM, pH 7.0

TBE: Tris-borato 0.045 M (10.8 g/l de Tris-base y 5.5 g/l de ácido bórico), EDTA 1mM.

Buffer de muestra DNA 6X: Azul de bromofenol 0.25%, cianol de xileno 0.25%, glicerol 30%

TE: Tris 10 mM, EDTA 1mM, pH 7.5-8.0

4.6.1. Soluciones para PAGE-SDS

Gel separador 8%: 1.26 ml Acrilamida 30%, 1.04 ml Bisacrilamida 1%, 0.938 ml Tris 2M pH 8.8, 0.05 ml SDS 10%, 1.658 ml H₂O, 0.010 ml APS 10%, 0.004 ml TEMED, volumen final 5 ml.

Gel concentrador 4%: 0.266 ml Acrilamida 30%, 0.220 ml Bisacrilamida 1%, 0.125 ml Tris 2M pH 6.8, 0.020 ml SDS 10%, 1.346 ml H₂O, 0.005 ml APS 10 %, 0.002 ml TEMED, volumen final 2ml.

Buffer de muestra 2X: SDS 10%, DTT ó Mercaptoetanol 10 mM, Glicerol 20%, Tris-HCl 0.2 M pH 6.8, Azul de bromofenol 0.05%.

Buffer de corrida 1X (electroforesis de proteínas): Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1% pH 8.3.

4.6.2. Tinción Azul de Coomasie

Azul de Coomasie R-250: Coomasie R-250 0.1%, Metanol 50%, Acido acético 7%.

Solución para desteñir Azul de Coomasie: Metanol 40%, Acido acético 10%, H₂O 50%.

4.6.3. Tinción de Plata

Solución para fijar: Metanol 40%, TCA 10%, H₂O 50%.

Solución de lavado: Etanol 30%

Solución de nitrato de plata: Nitrato de plata 0.012 M

Solución de revelado: Carbonato de Sodio 0.28 M, Paraformaldehido 1.85%

Solución para parar la reacción: ácido acético 5%

4.6.4. Transferencia a membranas de nitrocelulosa o PVDF

Buffer de transferencia: Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 1%, Metanol 20%.

Solución bloqueadora: SSMALBES, Polivinilpirrolidona 2 %, albumina sérica bovina 1 %, Tween 20 0.1%.

Solución stock de 4-cloro-1-naftol: 4-cloro-1-naftol 0.167 M, disolver en etanol 100 %

4.7. METODOS

4.7.1. Purificación de β -glucuronidasa de rata, bovina y humana

β -glucuronidasa prepuccial de rata

39 glandulas prepucciales de rata fueron homogenizadas para purificar β -glucuronidasa de acuerdo al método descrito por Himeno M. y cols., en 1975. Se purificó a homogeneidad se utilizó para generar un anticuerpo policlonal denominado Rb-301.

β -glucuronidasa bovina

Se purificó parcialmente la β -glucuronidasa de hígado bovino, de acuerdo al método descrito por Natowicz, M.R. y cols., 1979. La cual se utilizó para ensayos de endocitosis, “Far Western Blot” e Inmunofluorescencia,

β -glucuronidasa humana

A partir de sobrenadantes de células Hela. Se purificó parcialmente β -glucuronidasa humana, se partió de 5.72 l de sobrenadante, el cual se concentró en una membrana Amicon Mx100 de un tamaño de 100 kDa, se concentró a un volumen final de 800 ml, el cual se precipitó con sulfato de amonio a una saturación del 55%, al cual se le añadió 25 mM de EDTA, 25 mM de tartrato de sodio, e inhibidor de fosfatasas pH 6.3, se precipitó toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a 16,000 g por 30 min y se recuperó el precipitado, el cual se resuspendió en 200 ml de 25 mM de Tris-HCl 25mM NaH₂PO₄, 100mM NaCl pH 6.8, ésta muestra fue dializada con la anterior solución para eliminar el exceso de sulfato de amonio se realizaron tres cambios de solución durante la diálisis. La muestra se centrifugó a 25,000 g por 20 min y se recuperó el sobrenadante el que se depositó en un matraz para dejarlo interactuando toda la noche a 4°C con la resina que tiene acoplado el anticuerpo anti- β -glucuronidasa (Rb-301), transcurrido éste tiempo la resina fue transferida a una columna y se lavó con PBS adicionado con 100mM de NaCl, la proteína se eluyó con 6M de urea en PBS, las fracciones que forman el pico de actividad se juntaron y concentraron en un filtro Amicon de 15 ml con una membrana de 30 kDa, éste se lavó con 25 mM Tris, 25mM de NaH₂PO₄, 100 mM de NaCl, para eliminar la urea, finalmente se hicieron alícuotas las cuales se congelaron a -70°C hasta su uso.

4.8. Generación de columnas de afinidad

β -glucuronidasa bovina acoplada a Sepharosa 4B

Un gramo de sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno (Sigma Aldrich), se hidrató con lavados de agua y una solución de HCl 1.0 mM. La β -glucuronidasa bovina comercial de Sigma Aldrich, se equilibró en solución amortiguadora de bicarbonato de sodio 0.1M, pH 8.3, NaCl 0.5M, se acopló a la resina en agitación constante (rotación) durante toda la noche a 4 °C. Transcurrido éste tiempo, se decantó el sobrenadante y a la resina se le adicionó igual volumen de etanolamina 1M, se agitó durante 2 h a temperatura ambiente, se lavó varias veces con solución de acetato 0.1M pH 4, NaCl 0.5M y 2 lavados finales con bicarbonato de sodio 0.1M, pH 8.3, NaCl 0.5M para obtener un pH de 8.3. Se siguió el mismo procedimiento para preparar la columna del tripetido Ser- Trp*- Ser.

4.9. Purificación del receptor independiente de Man6P a partir de hígado bovino.

La purificación del receptor a partir de hígado bovino se realizó de acuerdo con el método descrito por González-Noriega y cols., (2001) con algunas modificaciones. Hígado bovino (500 g) se homogeneizó con un Polytrón (Kinematica CH-6010). En 1.5 l de una solución amortiguadora de acetatos 0.007 M, pH 5.0, que contenía 1 mM de EDTA. El homogenado fue centrifugado a 10,000 X g por 25 minutos, el sobrenadante se descartó. Con el fin de eliminar proteínas periféricas de membrana, el precipitado se lavó dos veces en carbonato de sodio 100 mM pH 11.5 a 4°C. La solución se centrifugó a 25,000 X g 30 minutos a 4°C, el sobrenadante fue descartado y el precipitado se resuspendió en solución amortiguadora (solución A) 20 mM de Tris-HCl pH 7.0, 0.4 M KCl, 2% de Triton X-100, 0.1 mM PMSF. La mezcla después de ser incubada toda la noche a 4°C, se centrifugó a 15,000 X g por 30 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó y el precipitado se extrajo por 6 h a 4°C una vez más con la misma solución, el precipitado se desechó. Los 2 sobrenadantes se juntaron, una tercera parte se adsorbió toda la noche a 30 ml de sefarosa a la cual previamente se acopló β -glucuronidasa bovina. Tanto la resina como la muestra fueron equilibradas con 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂ y 10 mM MnCl₂. Después de incubar toda la noche a 4°C, la resina fue transferida a una columna y lavada exhaustivamente con SSMALBES (pH 7.0) 2 % Triton X-100, 0.1 mM PMSF, 1 mM PHMB, 0.1 mM leupetina (solución A) conteniendo cationes 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂. Después

de eliminar el material no adsorbido, la resina se equilibró con Triton a 0.05% haciendo lavados con SSMALBES (pH 7.0) 0.05% Triton X-100, 0.1 mM PMSF, 1 mM PHMB, 0.1 mM leupetina (solución B) a la cual se le añadió: 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂. El material retenido en esta columna de afinidad fue eluido con solución B adicionada con 5 mM de EDTA. Las fracciones que contenían la proteína se juntaron y equilibraron con 10 mM (concentración final) de CaCl₂, MgCl₂ y MnCl₂ e incubados toda la noche a 4°C con la resina sefarosa-IIIb2 (marcador de reconocimiento). Al día siguiente se transfirió la resina a una columna y se lavó con solución B y se eluyó con solución B adicionada con 5 mM de EDTA, sin cationes. Los picos conteniendo proteína se unieron y precipitaron con ácido tricloroacético/deoxicolato de sodio/acetona (TCA/DOC/Acetona). El DOC se agregó a una concentración de 0.02 %. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 15 min y enseguida se añadió TCA a una concentración final de 10 % después de una hora de incubación a temperatura ambiente se centrifugó a 50,000 X g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el precipitado se lavó (sin resuspender) con 500 µl de acetona fría, los tubos se centrifugaron 10 minutos a 50,000 X g a 4 °C. El sobrenadante se eliminó, mientras el botón de proteína se secó en una centrifuga de vacío (SAVANT) por 10 minutos. La proteína se resuspendió en 1 ml Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 conteniendo 0.02 % de SDS. La mezcla se dializó en un Vivaspin2- 10,000 Mw (Sartorius) con el mismo buffer hasta que la densidad óptica (280 nm) de la solución no retenida fuese igual a la del buffer de diálisis.

4.10. Electroforesis en PAGE-SDS.

La proteína obtenida anteriormente se resolvió en geles desnaturalizantes (PAGE-SDS) en condiciones reductoras de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970). Las muestras de proteína se disolvieron en solución amortiguadora de cargado 2X (buffer de cargado 2X) conteniendo mercaptoetanol o DTT 10 mM y se hirvieron durante 5 minutos antes de su aplicación al gel. Las electroforesis se llevaron a cabo en cámaras Mini-Protean II de Bio-Rad, las placas fueron de 1 mm de espesor y los geles contenían acrilamida al 8 %. La solución amortiguadora de corrida contenía Tris-base 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0.1 % pH 8.3. Las muestras se corrieron a voltaje constante de 120 volts. Las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie R-250, y con PhastGel BlueR, siguiendo las

recomendaciones del fabricante (Amersham Biosciences). Los geles se destiñeron con 40 % MetOH, 10 % acético: 50 % agua. Alternativamente se tiñeron con plata (método nitrato de plata Sambrook y cols., 1989).

4.11. Inmunotransferencia

Las proteínas resueltas en PAGE-SDS fueron electrotransferidas siguiendo dos protocolos diferentes: las muestras se transfirieron a membranas de Immobilon de 0.45 μm (Millipore) a 100 mA durante 16 h o a membranas de nitrocelulosa 0.2 μm (Biorad) a 200 mA durante 2 h. La solución amortiguadora para la transferencia está compuesta por 25 mM de Tris, 192 mM de glicina, 1 % de SDS y 20 % de metanol. Los sitios no específicos fueron bloqueados por inmersión de las membranas en un amortiguador de bloqueo pH 7.0 que contiene: 10 mM de NaCl, 2.5 mM KCl, 25 mM de BES, 25 mM de ácido maléico (SSMALBES), 2 % de Polivinilpirrolidona, 1 % de Albumina Sérica Bovina, 0.01 % de Tween 20 durante toda la noche a 4°C: Los transferencias fueron incubados con diferentes anticuerpos dependiendo del experimento. Después de hacer varios lavados con el amortiguador SSMALBES las transferencias se incubaron con IgG anti-conejo-peroxidasa, y se revelaron con 4-cloro-1-naftol 0.167 M.

4.12. Cultivos Celulares

Todas las células, se crecieron en α -MEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado, 1 mM de piruvato de sodio, 100 U/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina, y mantenidas a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂.

4.13. Extracción del mRNA

El RNA total fue aislado a partir de cultivos celulares de la línea celular (HepG2). Las células crecidas en un T75 a un 80 % de confluencia se cosecharon por pipeteo en 7 ml de *Trizol* (Gibco/BRL, Life Technology, Heidelberg, Alemania). Posteriormente se realizó una extracción selectiva del RNA por separación de fases mediante la adición de 200 μl de cloroformo por cada ml de *Trizol* inicial y centrifugación a 12000 g durante 15 min., a 4 °C. El RNA obtenido en la fase acuosa se precipitó con un volumen de isopropanol igual a la mitad del *Trizol* utilizado en el primer paso y se centrifugó a 12000 g durante 10 min. a 4

°C. A continuación tras retirar el isopropanol, el precipitado obtenido se lavó con un volumen de etanol 70 % igual al de *Trizol* utilizado en el primer paso y se centrifugó a 7000 g durante 5 min, a 4 °C. Finalmente, después de eliminar el sobrenadante y secar el RNA para eliminar cualquier resto de etanol, se resuspendió en agua tratada con DEPC (0,1 % dietilpirocarbonato, Sigma), incubando a 60 °C durante 10 min. Para favorecer la disolución del mismo.

La concentración de RNA fue determinada por absorbancia a 260 nm y la integridad de las muestras se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

4.14. RT-PCR (Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa)

Transcripción reversa

Se sintetizó cDNA a partir de 5µg de RNA total utilizando la enzima Superscript II transcriptasa reversa (GIBCO/BRL) siguiendo las especificaciones del fabricante. Inicialmente se desnaturalizó por calor una mezcla de 5 µg de RNA total y 0.5 µM del oligonucleótido oligo-dT a 65 °C durante 5 min, tras lo cual se enfrió rápidamente en hielo. Éste paso evita las posibles estructuras secundarias que puedan aparecer en los RNAs. Posteriormente a esta reacción se añadieron 4 µl de buffer 5X first strand, 2 µl DTT 0.1M (ditiotreitól), 1µl de inhibidor de RNAsa, la cual se incubó a 42 ° C por 2 minutos. Transcurrido éste tiempo se agregó 1 µl de la enzima Superscript II, se incubó la mezcla a 42°C por 50 minutos, para que la retrotranscriptasa sintetizara el cDNA. Finalmente la enzima se inactivó incubando 15 min a 70 °C. Un control de reacción sin transcriptasa reversa fue utilizado para cada una de las muestras de RNA con el fin de verificar que los productos de PCR no fueran el resultado de contaminación por DNA genómico.

4.15. Reacción en cadena de la polimerasa

La amplificación del cDNA de la AnxA6 humana fue realizada por PCR usando oligonucleótidos específicos: oligonucleótido sentido An6HEF 5'GGCAAGCTTATGGCAAAC CAGCACAGGGT3' oligonucleótido antisentido An6XER 5'CGCCTCGAGCTAGTCCTCACCA CCACAGAG3' que permiten amplificar los 2022 pb del gen de AnxA6. A cada oligonucleótido se le agregó un sitio de restricción que se explotó en las etapas siguientes, un sitio *Hind*III en el oligo sentido y un sitio *Xho*I

en el oligo antisentido, éste par de oligos sirvieron para clonar el cDNA de AnxA6 al vector de expresión pcDNA3.1+ para el plásmido pQE-31 se utilizaron los oligos sentido AN6SPF 5'GGCGTTCGACATGGCCAAACCAGCACAGGGT3' y el oligo antisentido An6HPR 5'CGCAAGCTTCTAGCTCTCACCACCACAGAG3' con los sitios de restricción *Sall* y *HindIII* respectivamente y para el plásmido pIRESneo3 se clonó de acuerdo a Takagi H y cols. (2002). La PCR fue realizada usando el siguiente programa: precalentamiento de la muestra durante 5 minutos a 95°C, seguido de un programa de 30 ciclos, cada ciclo se desarrolla en 3 etapas: 1) etapa de desnaturalización durante 1 minuto a 94°C, 2) etapa de alineación de oligonucleótidos de 1 minuto a 56°C, 3) etapa de elongación a 72°C por 3 minutos. La amplificación termina con una incubación de 10 minutos a 72 °C. Después de la etapa de PCR, el fragmento obtenido fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1 %. En la siguiente tabla se muestran los oligonucleótidos utilizados para clonar, expresar y secuenciar el cDNA de AnxA6.

4.16. Oligonucleótidos

Utilidad	Secuencia	Enzima de Restricción
Clonación		
An6HEF	5'GGC <u>AAG CTT</u> ATG GCC AAA CCA GCA CAG GGT 3'	<i>HindIII</i>
An6XER	5'CGC <u>CTC GAG</u> CTA GTC CTC ACC ACC ACA GAG 3'	<i>XhoI</i>
An6SPF	5'GGC <u>GTC GAC</u> ATG GCC AAA CCA GCA CAG GGT 3'	<i>Sall</i>
An6HPR	5'CGC <u>AAG CTT</u> CTA GTC CTC ACC ACC ACA GAG 3'	<i>HindIII</i>
A6F	5'GGC <u>GCT AGC</u> TGC GTC CGT CTG CGA CCC GAG 3'	<i>NheI</i>
A6R	5'CAT <u>GCG GCC GCG</u> CGT TTC CTA AGC TCC ACT GAA G 3'	<i>NotI</i>
Secuenciación		
An6F539	5'ATG TCC AGG ACC TAT ACG AGG 3'	*
An6R631	5'GAT GCT GCT TGC TGC GAT TTC 3'	*
An6F1240	5'ATG ACT GAC CTG AAG CTC GAG 3'	*
An6R1332	5'CAA CTG CTT GGC ATC GTA ATG 3'	*

___ Sitio de restricción. * Sin sitio de restricción

4.17. Clonación del cDNA de AnxA6

Vectores Plasmídicos

Los vectores de expresión utilizados en éste trabajo se muestran en la tabla reflejándose su origen y su resistencia. Esta tabla se divide en dos: vectores plasmídicos vacíos y vectores de expresión con el cDNA de AnxA6.

Plásmidos

Nombre	Origen	Resistencia
pGEM-TEasy	Promega	Ampicilina
pQE-31	Qiagen	Ampicilina
pcDNA 3.1 (+)	Invitrogen	Neomicina/Ampicilina
pIRESneo3	Clontech	Neomicina/Ampicilina
pGEM+A6-1	Éste trabajo	Ampicilina
pGEM+A6-2	Éste trabajo	Ampicilina
pGEM+A6-3	Éste trabajo	Ampicilina
pQE+A6	Éste trabajo	Ampicilina
pcDNA+A6	Éste trabajo	Neomicina/Ampicilina
pIRES+A6	Éste trabajo	Neomicina/Ampicilina

A6: DNA complementario de Anxina 6 humana

4.18. Clonación del cDNA de AnxA6 en el plásmido pGEM-TEasy

Al final de la etapa de elongación a los fragmentos de la PCR se les agrega en el extremo 3' un nucleótido adenosina monofosfato por la Taq DNA polimerasa, de éste hecho resultan dos extremidades protuberantes de A (adenina) a cada extremo del producto de PCR, que son posteriormente explotados para la clonación de los fragmentos de PCR en el plásmido pGEM-T easy el cual esta linearizado y posee una timina en cada extremidad 5' permitiendo la clonación de cualquier producto de PCR en éste caso de AnxA6, en presencia de T4 DNA ligasa. Con el fin de identificar las clonas positivas después de la ligación se realizo una digestión enzimática con las enzimas *SalI* y *HindIII* la que nos permitió extraer un fragmento de 2022pb correspondiente al cDNA de AnxA6 de la misma forma se clono el PCR de AnxA6 que proviene de los oligonucleótidos An6HEF y An6XER con los sitios de restricción *Hind III* y *Xho I* respectivamente.

4.19. Clonación del cDNA de AnxA6 en el plásmido de expresión pQE-31

El plásmido pQE-31 contiene una etiqueta de histidinas que se agrega en el N-terminal del producto del gen que se clone en el sitio múltiple de clonación de éste vector, la cual nos permite purificar las proteínas mediante cromatografía de afinidad. 100 nanogramos de plásmido pQE-31 y 300 nanogramos de plásmido pGEM+An6-1 fueron digeridos con las

enzimas *Sal I* y *Hind III* durante 1 hora a 37°C con el fin de subclonar el cDNA de AnxA6 al vector de expresión pQE-31. El corte se verificó en un gel de agarosa al 1%, posteriormente se purificaron tanto el vector como el inserto siguiendo el protocolo propuesto en el kit Gel Extraction Quiagen. Una vez purificados los DNAs, se realizó la ligación de los fragmentos utilizando 50 ng de vector y 200 ng de inserto en presencia de T4 DNA ligasa. La búsqueda de las clonas positivas fue realizada de la misma manera que la de pGEM+An6-1 arriba mencionado. Se transformaron células de *E.coli* XL1Blue con el vector pQE+An6 con el fin de mantener el plásmido y expresar la proteína. Por otra parte se envió a secuenciar el plásmido pQE+An6 para verificar la integridad del cDNA así como la orientación correcta del mismo para su buena expresión.

4.20. Expresión y purificación de la proteína recombinante AnxA6 humana

La cepa competente *E. coli* XL1Blue, que permite la traducción de proteínas recombinantes, fue transformada con el plásmido pQE+An6. De esta cepa se hizo un precultivo incubándolo toda la noche a 37°C en medio LB (Luria Bertani adicionado con 100 µg/ml de ampicilina). Al día siguiente una alícuota (2.5 ml) de éste precultivo se inoculó a 50 ml de medio LB conteniendo ampicilina, se creció con agitación constante de 150 rpm y temperatura ambiente hasta alcanzar una D.O. de 0.6. En éste momento se indujo la síntesis de anexina con IPTG 0.7 mM y el cultivo se continuó toda la noche a temperatura ambiente con agitación constante. Al día siguiente se centrifugó el cultivo 4,000 X g a 4° C, se recuperó el paquete bacteriano y las células se lisaron en 5 ml de una solución amortiguadora, que contiene 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM de imidazol, 1 mg/ml lisozima, 0.1mM PMSF, 10 µM/ml leupeptina. La mezcla se incubó 30 minutos a 4°C y se sonicó 3 veces con pulsos de 10 segundos a 60 Hertz y 2 veces a 80 Hertz por 10 segundos, enseguida se centrifugó a 12,000 X g por 20 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante mientras que el precipitado se resuspendió en otros 5 ml de la misma solución, repitiendo el mismo procedimiento con el fin extraer mas proteína de células que no se hubieran roto anteriormente. Se juntaron los dos sobrenadantes obtenidos se adsorbió a 1 ml de Ni-NTA (níquel-acido nitriloacético inmovilizado sobre una resina de agarosa) la cual previamente fue equilibrada con 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM de Imidazol. Después de 2 horas a 4°C en agitación circular, la resina se transfirió a una

columna, la cual se lavó con 50 mM NaH₂ PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM de Imidazol, 0.1mM PMSF hasta tener una D.O. de cero. Para poder eluir la proteína, la solución amortiguadora que se utiliza debe tener un exceso de imidazol (que es una molécula con una estructura muy similar a la histidina, que por competencia va a liberar la proteína fijada a la resina de Ni-NTA gracias a la etiqueta de histidinas presente en la proteína) por lo tanto se eluyó con 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM de Imidazol, 0.1mM PMSF, 10µM/ml leupeptina. La proteína recuperada fue concentrada usando un filtro Amicon Ultra 4 siguiendo las recomendaciones del fabricante, finalmente se corrió un gel PAGE-SDS al 8 % y se tiñó con Coomassie PhastGel Blue R y se observa que la proteína se purificó un 90 %.

4.21. Unión de β-glucuronidasa bovina a AnxA6 recombinante

La AnxA6 recombinante fue incubada a temperatura ambiente por 2 horas (sin hervir) en solución de cargado conteniendo β-mercaptoetanol. Las muestras se resolvieron en PAGE-SDS al 8 %, se transfirieron a una membrana de Inmobilon durante toda la noche a temperatura ambiente, 100 mA constante. La membrana se bloqueó toda la noche con SSMALBES, 2 % PVP, 1 % albumina, 0.1 % Tween 20 a 4° C. Al día siguiente se retiró esta solución y se cortaron los carriles. Uno de los carriles fue incubado con 10,000 U/ml de β-glucuronidasa bovina en SSMALBES, 2 % PVP, 1 % albumina, 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂, 0.1 % Tween 20, durante 2 horas a temperatura ambiente. El segundo carril fue incubado con la misma cantidad de β-glucuronidasa bovina sin cationes y adicionado con 5 mM de EDTA (para demostrar que la unión es dependiente de cationes). El tercer carril fue incubado con 2,000 U/ml de β-glucuronidasa humana SSMALBES, 2 % PVP, 1 % albumina, 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂, 0.1 % Tween 20, durante 2 horas a temperatura ambiente. El cuarto carril es un control negativo aquí solo se incubará con el anticuerpo anti- β-glucuronidasa (es un anticuerpo generado en conejo a partir de β-glucuronidasa prepuccial de rata). Después de incubar las membranas con las diferentes β-glucuronidasas se lavaron éstas para eliminar el exceso de enzima, fueron 3 lavados a temperatura ambiente con SSMALBES, 2 %PVP con o sin cationes dependiendo el caso. Al terminar éste paso se incubaron las membranas con un anticuerpo primario en contra de β-glucuronidasa, (anticuerpo 301) se utilizó una dilución 1:500 en SSMALBES,

2 % PVP, 1 % albumina, 0.1 % Tween 20 y dependiendo del carril se agregaron cationes o EDTA y se incubaron por 1 hora 30 minutos a temperatura ambiente, enseguida se lavaron las membranas de la misma forma como se realizó el primer lavado. El siguiente paso consistió en incubar las membranas con el anticuerpo secundario que es un cabra anti conejo conjugado a peroxidasa a una dilución de 1:2000 se incubó por 1 hora 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se lavaron las membranas extensivamente para eliminar el exceso de anticuerpo secundario y se revelaron las membranas con 4-cloro-1-naphtol.

4.22. Clonación del cDNA de AnxA6 en el plásmido de expresión pcDNA 3.1 + para células eucariotas.

El plásmido pcDNA 3.1 + está diseñado para transfectar genes tanto transitoriamente como establemente en un hospedero mamífero. El vector contiene un promotor de citomegalovirus humano (CMV) para un alto nivel de expresión en una gran variedad de células de mamífero, un sitio múltiple de clonación para facilitar la clonación y un gen de resistencia a Geneticina para la selección de líneas celulares estables.

La subclonación del cDNA de AnxA6 a éste vector se realizó de la siguiente manera. El cDNA de AnxA6 se obtuvo del plásmido pGEM+An6-2 cortando con las enzimas *HindIII* y *XhoI* al igual que el vector pcDNA 3.1 +. Después de la subclonación y ligación de ambos fragmentos se verificó la construcción tanto por restricción enzimática así como por secuenciación del plásmido, para verificar la integridad y la correcta orientación del gen de AnxA6 en el vector pcDNA+AnxA6.

3.23. Transfecciones Estables de AnxA6 a células A431 por el método de SuperFect

Se generaron transfectantes estables de AnxA6 en células A431 por el método de Superfect (Qiagen Sciences, Maryland, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Se realizó una curva de sensibilidad a Geneticina (G418) en células A431, se probaron diferentes concentraciones de antibiótico desde 0 a 800 µg/ml. Se encontró que la concentración de 400 µg/ml mata a las células en 1 semana, por lo cual esta concentración se utilizó para generar las transfectantes estables.

La calidad del DNA plasmídico es esencial para una mejor eficiencia y reproducibilidad. Por otra parte para generar una transfección estable eficiente es necesario introducir el

plásmido en forma lineal para lo cual se linearizó, dicho corte debe estar lejos tanto del gen de interés así como del origen de replicación, por lo que se recomienda que el corte se realice en el gen que codifica para la resistencia a ampicilina. Basándonos en lo anterior el plásmido pcDNA+An6 se cortó en el sitio *ScaI* que se encuentra en la región que codifica para la resistencia a ampicilina, se cortaron 120 µg de DNA con esta enzima por 5 horas, el corte se verificó en un gel de agarosa al 0.6 %, ya digerido el DNA se lavó y precipitó con fenol cloroformo alcohol isoamilico (25:24:1) un lavado mas con cloroformo, para recuperar el sobrenadante (que es donde se encuentra el DNA) se centrifugó a 13,000 rpm, a temperatura ambiente, éste se precipitó con 5 M de NaCl y 1 ml de etanol 100 % se dejo 1 h a 4°C, transcurrido éste tiempo se centrifugó a 13,000 X g por 12 min a 4°C, se recuperó el precipitado el que se lavó con etanol al 80 % se centrifugó a la misma velocidad por 8 min se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 24 µl de agua Gibco para finalmente cuantificarlo a 280 nm.

Un día antes de la transfección se sembraron 0.5×10^6 células A431 en placas de 60 mm. El día de la transfección, se diluyeron 10 µg de DNA en 13.5 ml de medio de cultivo libre de suero ni antibióticos, se mezcló e incubó por algunos segundos, se agregaron 10 µl de SuperFect a la solución de DNA se mezcló y agitó en vortex por 10 segundos se incubó la muestra por 10 min a 25°C para que se formara el complejo de transfección. Mientras se formó el complejo se aspiró el medio de cultivo de las células y se lavaron con 4 ml de medio libre de suero y antibióticos. Al complejo de transfección ya formado se le adicionó 1 ml de medio de cultivo, se mezcló y se depositó inmediatamente a los platos. Se incubaron las células con el complejo de transfección 3 h a 37°C con 5 % de CO₂. Transcurrido el tiempo se lavaron las células con medio de cultivo MEM sin antibióticos ni suero, se incubaron por 48 h en medio de cultivo completo, después de éste tiempo se cambió el medio de cultivo a un medio adicionado con 400 µg/ml de geneticina, se puso como control células A431 sin transfectar la cual después de 48 h también se cultivó con la misma cantidad de antibiótico que las células transfectadas con el fin de monitorear la transfección, además se transfectaron células con el vector vacío como control.

4.24. Transfecciones Estables de AnxA6 a células A431 por el método FUGENE 6

Las células se siembran el día anterior en frascos T-75 con el objetivo que presenten una confluencia del 50-60 % en el momento de la transfección. Las células se lavaron 2 veces con medio sin suero y sin antibióticos. Mientras se prepara el complejo de transfección que consiste en una relación 1:2.5 (p/v), entre el DNA de interés y Fugene 6 (Roche), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El complejo de transfección debe incubarse entre 15 y 45 min, para posteriormente añadirse a las células que se incuban durante 48 h. Después de éste tiempo se cambió el medio de cultivo a un medio adicionado con 400 µg/ml de geneticina, la búsqueda de transfectantes estables duró entre 1 y 2 meses después de la transfección.

4.25. Ensayos de endocitosis de β -glucuronidasa bovina a células A431 transfectadas establemente con AnxA6.

Una vez que los cultivos llegan a confluencia se incubaron en MEM-BES, pH 6.8 conteniendo 1 mg/l de albumina bovina y 5,000 U/ml de β -glucuronidasa, la cantidad de ésta disminuyó o aumentó dependiendo del experimento. Después de dos horas de incubación a 37°C las placa se pusieron sobre una capa de hielo y las placas se lavaron 6 veces con PBS frío. Las células se lisaron con 500 µl de deoxicolato de sodio 0.25 % durante 30 minutos a 4°C. En el lisado celular se cuantificó la cantidad de β -glucuronidasa bovina asociada a las células así como la proteína celular. La velocidad de internalización se expresó, como la cantidad de enzima asociada a las células por unidad de tiempo (unidades de β -glucuronidasa/mg de proteína celular/hora de internalización). La proteína total fue cuantificada por el método de Lowry.

4.26. Ensayo de actividad de β -glucuronidasa

La actividad enzimática de la β -glucuronidasa se determinó usando como sustrato 4-metilumbeliferil- β -D-glucoronato 10 mM en 0.1 M de acetato de sodio, pH 4.8. El ensayo fue realizado con 100 µl de sustrato 25 µl de enzima, en presencia de 0.25% de deoxicolato de sodio. La reacción fue parada con 1.9 ml de 0.3 M de glicina, 0.2 M de carbonato a pH 10.5. La fluorescencia se midió en un espectrofotómetro Aminco-Bowman a una emisión de 448 y una excitación de 360 nm.

4.27. Inmunofluorescencia

Las células se crecieron en cubre objetos circulares y fueron incubadas en presencia o ausencia de 10,000 U/ml de β -glucuronidasa bovina y 1mM de Man6P en MEM-BES (pH 6.8-7.0). Después de 2 h de incubación a 4°C ó a 37°C, las células fueron lavadas con 100 mM de NaCl/10 mM CaCl₂/25 mM BES/ 25 mM Maleato pH 6.8 y fueron fijadas por 15 min con 2 % de paraformaldehído. La incubación con los anticuerpos se realizó en presencia o ausencia de 0.1 % de saponina. En el primer paso, las células fueron incubadas con clona-73 y Rb301. En el segundo paso, las células fueron lavadas e incubadas con Texas red-caballo IgG anti-ratón (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) y FITC-burro anti-conejo (Jackson ImmunoResearch Labs INC., West Grove, PA, USA). Los cubre objetos fueron montados en Mowiol (Calbiochem, San Diego, CA, USA), y las laminillas fueron examinadas usando un microscopio Olympus BX51 (Tokio, Japan) equipado para epifluorescencia con un objetivo UPlanAPO 100x.

Capítulo III

Resultados

5. Resultados.

La endocitosis de la β -glucuronidasa bovina a fibroblastos humanos es mediada por dos receptores diferentes, el IGF-II/Man6PR y un RI-Man6P. Este último receptor, reconoce la secuencia Ser-Trp*-Ser en la β -glucuronidasa bovina (González-Noriega, A., y cols 1989; González-Noriega, A., y cols. 2001). Este receptor ya ha sido purificado y se han obtenido anticuerpos, los cuales son capaces de bloquear específicamente la endocitosis de β -glucuronidasa bovina en fibroblastos humanos, confirmando con ello que la proteína purificada corresponde al receptor propuesto. Estos anticuerpos permiten detectar el receptor en varios tejidos de varias especies de mamíferos, sugiriendo que el receptor es una proteína conservada (González-Noriega, A., y Michalak, C., 2001).

El objetivo de este trabajo fue clonar y expresar el cDNA que codifica para el RI-Man6P, como herramienta para identificar al receptor; inicialmente, se hizo una inmunodetección de proteínas expresadas a partir de una librería de cDNA de hígado humano en el vector Lambda ZAP, (picoBlue Immunoscreening Kit Stratagene) con anticuerpos policlonales generados en el laboratorio en contra del receptor.

5.1. Inmunodetección

Para la clonación del cDNA que codifica para el RI-Man6P, se utilizó una librería de cDNA de hígado humano, expresable Lambda ZAP, la cual expresa fragmentos de proteínas capaces de ser reconocidos por un anticuerpo específico en este caso en contra del receptor (Ab policlonal 421 dirigido en contra del RI-Man6P, generado en el laboratorio). Para corroborar que las clonas positivas con el Rb-421 contuvieran información relacionada al RI-Man6P fueron inmunodetectadas con otros dos antisueros diferentes en contra del mismo receptor (Rb-1, y Rb-646). La membrana de nitrocelulosa se dividió en cuatro partes (figura 11) cada una de ellas se incubó con uno de los diferentes anticuerpos y como control se utilizó solo el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa, o bien un suero preinmune Rb-421 (figura 11d). Se expresaron 5 millones de placas líticas obteniéndose 32 clonas positivas de las cuales 65 % de las clonas correspondieron a rRNA 18S mientras que el 35 % restante correspondió a diferentes proteínas enumeradas en la tabla 6. Se consideró que ninguna de las proteínas halladas correspondieron al RI-Man6P, ya que las proteínas encontradas: a) son solubles o exclusivas de núcleo, b) ninguna de ellas relacionada a una proteína membranal, c) ninguna de ellas tiene un peso similar al del receptor d) y ninguna

de ellas se expresó más de una vez. Es difícil saber con certeza porque los tres diferentes anticuerpos contra el receptor no fueron capaces de detectar la presencia de esta proteína en la biblioteca de cDNA. Es posible que la baja tasa de expresión del receptor, la alta hidrofobicidad del mismo, el tamaño de los péptidos o su conformación, aunado a la presencia de colonias falso-positivas hayan impedido el reconocimiento de esta proteína.

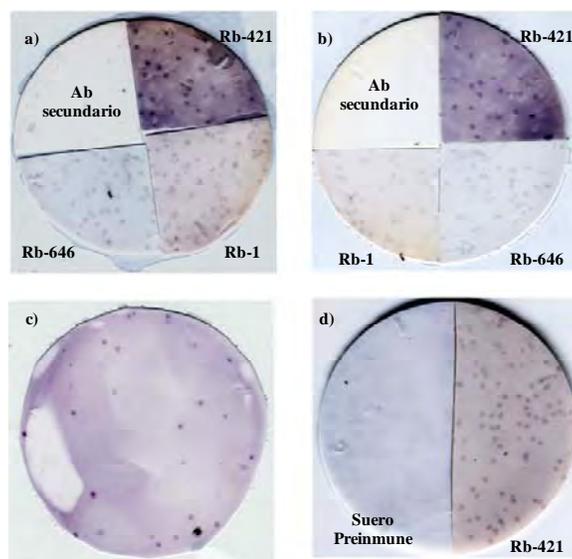


Figura 11. Inmunodetección de proteínas expresadas en un vector Lambda ZAP. Las placas líticas de lambda previamente crecidas en células de *E. coli* XL-Blue fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y tamizadas con el anticuerpo Rb-421 y un anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina. **a)** y **b)** Clona identificada con el Rb-421 capaz de ser reconocida por los anticuerpos Rb1 y Rb-646 anticuerpos generados en contra del mismo receptor. **c)** Clona purificada reconocida por el Rb- 421. **d)** Clona detectada por el Rb-421, la otra mitad de la membrana incubada con el suero preimmune se observa que no hay reconocimiento.

Tabla 6. Reporte de las proteínas halladas por inmunodetección utilizando la librería de cDNA Lambda ZAP.

1. Subunidad alfa fibrinogeno	6. Enoil CoA hidratasa
2. Apolipoproteina A-I	7. Inhibidor de serin proteasas
3. Aldehído Oxidasa 1	8. Transportador de Zinc
4. Proteína F-Box	9. Precursor de Albúmina
5. Heat Shock 70 kDa	10. Insulin like growth factor

Este enfoque no permitió detectar clonas conteniendo el receptor independiente de IGF-II/Man6PR. Por esta razón, de manera alterna, el receptor purificado fue identificado

por espectrometría de masas. Se clonó el gen correspondiente a la proteína identificada y se expresó para confirmar su función.

5.2. Purificación del receptor independiente de IGF-II/Man6PR a partir de hígado bovino a través de columnas de afinidad.

Para purificar el receptor se utilizaron dos columnas de afinidad, una que contiene la β -glucuronidasa bovina, la otra el marcador de reconocimiento Ser-Trp*-Ser. A la primera columna se espera se adsorba el receptor independiente de IGF-II/Man6PR y otros receptores que reconocen residuos de manosa, manosa 6-fosfato, galactosa, etc; cuya unión requiere de cationes divalentes, a la segunda columna se espera solo se adsorba el receptor de interés (González-Noriega, A., y Michalak, C. 2001).

El receptor fue purificado a partir de membranas de hígado bovino. Las membranas fueron lavadas con carbonato de sodio a fin de eliminar proteínas periféricas de membrana. Seguidamente la proteína membranal fue extraída con niveles elevados de Triton X-100 y adsorbida a la columna de afinidad β -glucuronidasa bovina Sefarosa en presencia de cationes divalentes. La columna se lavó con esta misma solución amortiguadora hasta que se eliminó la proteína adsorbida inespecíficamente, seguidamente se lavó con 0.05% de Triton X-100 a fin de disminuir la concentración de este detergente y poder cuantificar por densidad óptica la proteína que se eluyó. Al no poder generar cantidades suficientes del marcador de reconocimiento para eluir específicamente el receptor, se optó por eluirlo de forma no específica, esto es con EDTA a fin de quelar los sitios de unión receptor-ligando (Figura 12 A). Las fracciones 35-42 se juntaron, se les añadieron la mezcla de cationes divalentes, y se adsorbieron a la segunda columna de afinidad (Sepharosa Ser-Trp*-Ser). Para eliminar proteínas no adsorbidas a esta segunda resina se lavó con Tritón 0.05% en solución B hasta obtener densidades ópticas igual a cero. La proteína unida a la resina se eluyó con EDTA 5 mM en solución B sin cationes (Figura 12 B). Con la finalidad de obtener mayor cantidad de proteína se realizaron cuatro rondas de adsorción a cada una de las columnas de afinidad utilizando un nuevo extracto membranal en cada adsorción.

El receptor previamente purificado con este protocolo al resolverse en PAGE-SDS mostraba estar formado por dos péptidos de 78 y 76 kDa que teñían escasamente con Coomassie. En este trabajo la proteína purificada fue concentrada por el método descrito por

Ozols (Nobrega, F.G., y Ozols, J. 1971) que incluye precipitación de la proteína con 10 % TCA, 0.02 % deoxicolato de sodio, seguido por diálisis en presencia de SDS. El material preipitado, se dializó extensivamente en contra de Tris-HCl 16 mM pH 8.0 adicionado con SDS al 0.2 % en un filtro Vivaspin2 (10,000 MWCO).

Para verificar la pureza del receptor se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida SDS al 8% en presencia de mercaptoetanol. Como se observa en la Figura 13 la proteína purificada está compuesta por tres proteínas con un peso molecular aparente de 68, 64 y 56 kDa. Estos pesos moleculares fueron calculados usando como estándar el marcador de peso molecular Dual color (Biorad).

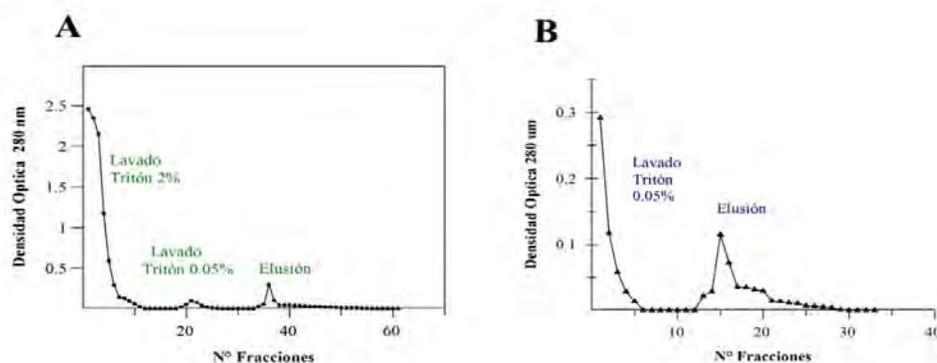


Figura 12. A): Se muestra el perfil de elución de la proteína unida a la columna de β -glucuronidasa bovina, extraída a partir de hígado bovino. **B):** perfil de elución de la segunda columna de afinidad para purificar el receptor independiente de Man6P (sepharosa 4B Ser-Trp*-Ser) se graficó en el eje de las abscisas el número de fracciones y en el eje de las ordenadas la densidad óptica a 280 nanómetros.

Previamente se ha reportado que el peso molecular del receptor varía dependiendo del método utilizado para eliminar el Tritón X-100, detergente con el que se solubilizan las membranas durante el proceso de purificación del receptor (González-Noriega, A., y cols. 2005). Al dializar extensivamente la proteína con SDS en el filtro Vivaspin2 (10,000 MWCO) posiblemente se eliminaron sales, detergentes y lípidos que modificaban el peso molecular así como impedían la tinción del receptor con azul de Coomassie, lo cual ha ayudado a identificar el peso molecular real de las proteínas halladas en la purificación.

Por otra parte y como se mencionó en los antecedentes, el receptor purificado en el 2001 (González-Noriega, A., y Michalk, C. 2001) se resuelve en solo 2 bandas de proteína debido a que posiblemente están contaminadas con otras moléculas como son detergentes, sales y glicolípidos que interactúan con el receptor, impiden la visualización de las tres bandas complicando el cálculo real del peso molecular así como la tinción de la proteína, no

importando la sensibilidad de la técnica, donde la banda de 68 kDa es la más afectada por este tipo de moléculas debido a que no era visible anteriormente.

Con el fin de comprobar que las tres bandas en que se resuelven los geles corresponden al receptor se utilizaron dos enfoques diferentes: uno es comprobar la capacidad que tiene el receptor de reconocer a su ligando (β -glucuronidasa bovina) y el otro el reconocimiento por anticuerpos específicos.

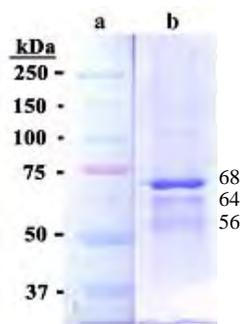


Figura 13. Electroforesis PAGE-SDS al 8% del receptor purificado a partir de hígado bovino teñido con Coomassie Phast Blue R marcador de peso molecular Dual color (Biorad).

5.3. Identificación del receptor independiente de IGF-II/Man6PR por inmunotransferencia (Western blot)

En el laboratorio se han generado 3 anticuerpos policlonales de conejo en contra del receptor independiente de IGF-II/Man6PR, denominados Rb1, Rb421 y Rb646. Estos anticuerpos se obtuvieron inyectando a conejos muestras obtenidas de diferentes purificaciones del receptor y siguiendo 3 protocolos de inmunización diferentes (González-Noriega, A., y Michalk, C. 2001, González-Noriega, A., y cols. 2005; González-Noriega, A., y cols. 2006). La muestra purificada se desnaturalizó en presencia de 2-mercaptoetanol y se resolvió en PAGE-SDS al 8 %; seguidamente se electrotransfirió a membranas de nitrocelulosa, las cuales se incubaron con los anticuerpos Rb1 ó Rb421, y con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa, por último se reveló con 4-cloro-naftol. Como se muestra en la Figura 14 los antisueros Rb1 y Rb421 reconocen a las 3 proteínas purificadas cuyo peso molecular es de 68, 64 y 56 kDa. Es importante mencionar que la banda de 68 kDa es reconocida por estos anticuerpos con una menor afinidad con respecto a las bandas de 64 y 56 kDa, no obstante la mayor concentración de la proteína de 68 kDa.

Dado que las tres bandas de proteína son reconocidas por los anticuerpos con mayor o menor afinidad, fue importante analizar si las tres proteínas son capaces de unir específicamente β -glucuronidasa bovina, para esto se realizaron ensayos de Far Western Blot.

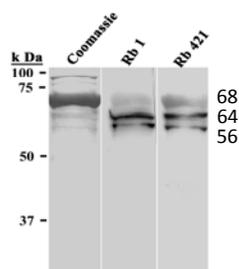


Figura 14. Identificación del RI-Man6P por inmunotransferencia. Receptor purificado a partir de hígado bovino transferido a membranas PVDF, teñido con Coomassie y detectado con anticuerpos Rb1 y Rb 421. Marcador de peso molecular Dual color Biorad.

5.4. Ensayo de unión de la β -glucuronidasa bovina al receptor purificado a partir de hígado bovino (Far Western blot).

Este ensayo nos permitió comprobar *in vitro* que la β -glucuronidasa bovina interactúa directamente con las 3 proteínas purificadas a través de las columnas de afinidad. El receptor se desnaturalizó suavemente por 2 horas a temperatura ambiente (sin hervir la muestra) en presencia de la solución amortiguadora de cargado conteniendo 2-mercaptoetanol. Las muestras después de resolverse en PAGE-SDS al 8% y electrotransferirse a membranas de nitrocelulosa, se incubaron con 10,000 U/ml de β -glucuronidasa bovina en presencia o ausencia de cationes divalentes, y seguidamente con un anticuerpo anti- β -glucuronidasa (Rb 301), finalmente se incubaron las membranas con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa y reveladas con 4-cloro-naftol. Como se muestra en la figura 15 las tres bandas interactúan con β -glucuronidasa bovina en presencia de cationes mientras que en presencia de EDTA la interacción no se realiza, de esta manera corroboramos que la interacción del receptor con β -glucuronidasa bovina es dependiente de cationes divalentes (González-Noriega, A., y Michalk, C. 2001). Por otro lado se utilizó β -glucuronidasa humana, como control negativo, así como el anticuerpo en contra de β -glucuronidasa para verificar la especificidad del ensayo. Como se observa en la figura 4 la interacción que existe entre la β -glucuronidasa bovina y la proteína 68 kDa es menos intensa con respecto a las otras dos proteínas 64/56

kDa no obstante la cantidad de proteína, lo que sugiere hay una afinidad diferencial de la β -glucuronidasa bovina por cada una de las bandas.

Por lo que fue importante analizar cada una de las bandas por ensayos de LC/ESI-MS/MS y determinar si se trata de una misma proteína o son proteínas diferentes, para lo cual se cortaron cada una de estas bandas y se enviaron a analizar al laboratorio de proteómica de la facultad de medicina de la UNAM con el Dr. Guillermo Mendoza, quien analizó cada una de las proteínas por LC/ESI-MS/MS.

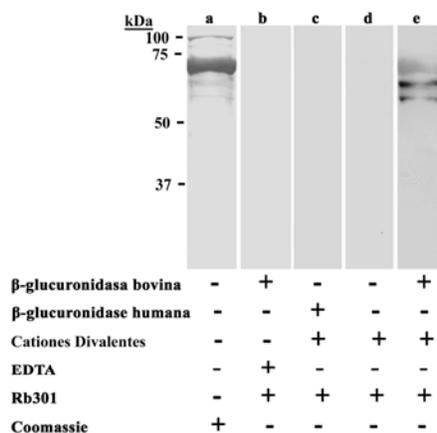


Figura 15. Interacción del RI-Man6P y β -glucuronidasa bovina (Far Western blot). Receptor purificado a partir de hígado bovino corrido en un PAGE-SDS y transferido a membranas de nitrocelulosa. a) Receptor teñido con Coomassie, b) receptor incubado con β -glucuronidasa bovina en presencia de EDTA detectado con un anticuerpo anti β -glucuronidasa, c) receptor incubado con β -glucuronidasa humana en presencia de cationes detectada con un anti β -glucuronidasa d) receptor incubado con el anticuerpo anti β -glucuronidasa en presencia de cationes e) receptor incubado con β -glucuronidasa bovina en presencia de cationes detectada con anti β -glucuronidasa bovina, marcador Dual color de Biorad.

5.5. Análisis por LC/ESI-MS/MS del receptor purificado a partir de hígado bovino

Para realizar el análisis las proteínas purificadas previamente fueron corridas en un gel PAGE-SDS al 8 %, éste se tiñó con Azul de Coomassie, se cortaron cada una de las bandas. Las proteínas se digirieron con tripsina para finalmente ser analizadas por LC/ESI-MS/MS. Esta técnica nos permitió identificar la secuencia primaria de cada uno de los péptidos obtenidos después de la digestión con tripsina. La secuencia de cada uno de los péptidos obtenidos se buscó en las bases de datos, en este caso se utilizó la de *Bos taurus* con número de acceso gi/124426044. En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos.

De la proteína de 68 kDa se pudieron analizar 23 péptidos los cuales cubren el 62 %, de la proteína, de la banda de 64 kDa se analizaron 18 péptidos que cubren el 42 %, mientras que la proteína de 56 kDa se analizaron 12 péptidos que cubren el 22 % de la

misma. Se encontró que las tres proteínas purificadas corresponden a AnxA6 con altos valores de score (tabla 7).

Los reportes de secuencia mostraron que el péptido (ALLAICGGED), localizado en el carboxilo terminal de AnxA6, está presente en los tres péptidos analizados, lo que indica que el extremo C-terminal de la AnxA6 no sufrió cortes proteolíticos en este extremo, que expliquen la diferencia en el peso molecular de las proteínas. Por otra parte, para verificar cortes proteolíticos en el N-terminal de las tres proteínas, se analizó el extremo N-terminal de cada una de estas proteínas, por medio del método de degradación de Edman. Debido a que el extremo N-terminal de cada péptido, estaba bloqueado, se obtuvieron secuencias internas de cada uno de los péptidos digeridos con tripsina, el péptido más próximo al extremo N-terminal inicia en el residuo 16 en el caso de la proteína de 68 kDa (DFPDFNPSQDAETLYNAMKGF) y en el residuo 41 de las proteínas 64/56 kDa (EAILELITSR) de AnxA6. Esto sugeriría un corte en el N-terminal de la proteína de 68 kDa lo cual debe ser analizado posteriormente; sin embargo, el hallazgo del mismo péptido en las proteínas 64/56 kDa sugiere que la diferencia en su peso molecular aparente pueden ser debidas a cambios conformacionales los que pudieran estar ocurriendo en estas isoformas de AnxA6.

En su conjunto estos resultados proponen que los 3 péptidos que se obtienen al purificar al receptor son productos de un mismo gen. Al presente no podemos determinar si los tres péptidos son isoformas de AnxA6 o bien modificaciones debidas al protocolo de purificación utilizado.

Dadas las implicaciones que tienen nuestro hallazgo fue importante analizar a través de herramientas bioinformáticas a la AnxA6 con el fin de hallar pistas que nos permitan determinar como una proteína citosólica puede funcionar como un receptor endocítico.

5.6. Análisis bioinformático de AnxA6

En la actualidad múltiples herramientas bioinformáticas permiten predecir las características o propiedades de las proteínas a partir de su secuencia primaria de aminoácidos. Por ejemplo, es factible identificar y caracterizar proteínas en términos de sus posibles modificaciones postraduccionales, realizar clasificaciones de acuerdo con la

topología, o existen programas que permiten predecir la localización subcelular de una proteína, la estructura secundaria y terciaria, entre otros.

5.7. Alineamientos de AnxA6 humana y bovina.

Se realizaron alineamientos tipo BLAST P y BLAST N para identificar la homología entre la AnxA6 humana y bovina utilizando el programa de alineamiento de dos secuencias encontrándose una identidad del 94 % a nivel de aminoácidos (ver figura 16) mientras que a nivel de nucleótidos fue del 92 % (ver figura 17) lo que demuestra que la AnxA6 es una proteína altamente conservada entre estas dos especies según consta en las figuras 16 y 17. Dados los resultados de alineamiento, se clonó el cDNA a partir de una fuente humana gracias a la alta homología que existe de AnxA6 entre estas dos especies. Otro motivo por el cual se clonó de humanos fue para corroborar que esta proteína realiza la misma función en fibroblastos humanos.

1	MAKPAQGAKYRGSIRDFPDFNPSQDAETLYNAMKGFSGDKEAILELITSR
51	SNRQRQEICQNYKSLYKDLIADLKYELTGKFERLIVGLMRPPAYADAKE
101	IKDAISGIGTDEKCLIEILASRTNEQIHQLVAAYKDAYERDLEADITGDT
151	SGHFRKMLVLLQGTREEDDVVSEDLVQQDVQDLYEAGELKWGTDEAQFI
201	YILGNRSKQHLRLVFDEYLKTTGKPIEASIRGELSGDFEKLMLAVVKCIR
251	STAEYFAERLRFKAMKGLGTRDNTLIRIMVSRSELDMLDIREIFRTKYEKS
301	LYSMIKNDTSGEYKKTLLKLCGGDDAAGQFFPEAAQVAYQMWELSAVAR
351	VELKGTVRPAGDFNPDADAKALRKAMKGLGTDEDTIIDIIAHRNSNAQRQQ
401	IRQTFKSHFGRDLMDLKSSELSGDLARLILGLMPPAHDYDAKQLKKAMEG
451	AGTDEKALIEILATRTNAEIQAINKAYKEDYHKSLEDALSSDTSGHFKRI
501	LISLATGNREEGGEDRERAREDAQVAEILEIADTTSGDKSSLETRFMMI
551	LCTRSYPHLRRVFQEFIKMTNYDVEHTIKKEMSGDVRDVFVAIVQSVKNK
601	PLFFADKLYKSMKGAGTDEKTLTRIMVSRSEIDLLNIRREFIEKYDKSLH
651	QAIEGDTSGHFLKALLAICGGED

Figura 16. Secuencia de péptidos encontrados después de el análisis de cada una de las bandas obtenidas de la purificación del RI-Man6P de la banda de 68 kDa cubrió el 62 % de la proteína marcada en verde —, la banda de 64 kDa se cubrió el 42 %, marcada con rojo —, la banda de 56 kDa se cubrió el 22 %, marcada con azul —.

Tabla 7 Reporte de secuenciación de la proteínas 68,64 y 56 kDa por LC/ESI-MS/MS.

Secuencia de aminoácidos	Proteína Identificada	Cobertura de la secuencia (%)	Mowse score
Proteína purificada 68 kDa			
1 DFPDFNPSQDAETLYNAMKGFSDKEAILELITSR	AnxA6		
2 QEICQNYK	✓		
3 DLIADLKYELTGK	✓		
4 LIVGLMRPPAYADAK	✓		
5 DAISGIGTDEKCLIEILASRTNEQIHLVAAYK	✓		
6 DLEADITGDTSGHFR	✓		
7 MLVV LLQGTR	✓		
8 WGTDEAQFIYILGNR	✓		
9 LVFDEYLKTTGKPIEASIRGELSGDFEKLMLAVVK	✓		
10 STAEYFAER	✓		
11 SELDMLDIR	✓		
12 SLYSMIK	✓		
13 QMWELSAVAR	✓		
14 GTVRPA GDFNPDADAK	✓	62	1905
15 GLG TDEDTIIDII AHR	✓		
16 DLMADLKSE LSGDLARLIL GLMMPPAHYD AK	✓		
17 ALIEILATRTRNAEIQAINKAYKEDYHKSLEDALSSDTSGHFK	✓		
18 ILISLATGNR	✓		
19 EDAQVAEIL EIADTTSGDK	✓		
20 FMMILCTRSYPHLRRVVFQEFIKMTNYDVEHTIK	✓		
21 DVFVAIVQSVKKNPLFFADK	✓		
22 SEIDLLNIR	✓		
23 ALLAICG GED	✓		
Proteína purificada 64 kDa			
1 EAILELITSR	AnxA6		
2 DLIADLKYELTGK	✓		
3 CLIEILASRTNEQIHLVAAYK	✓		
4 DLEADITGDTSGHFR	✓		
5 WGTDEAQFIYILGNR	✓		
6 LVFDEYLKTTGKPIEASIRGELSGDFEKLMLAVVK	✓		
7 STAEYFAER	✓		
8 SELDMLDIR	✓		
9 GTVRPAGDFNPDADAK	✓	42	1461
10 GLGTDEDTIIDIIAHR	✓		
11 DLMADLKSELSGDLAR	✓		
12 ALIEILATRTRNAEIQAINK	✓		
13 SLEDALSSDTSGHFK	✓		
14 ILISLATGNR	✓		
15 SYPHLRRVVFQEFIKMTNYDVEHTIK	✓		
16 DVFVAIVQSVKKNPLFFADK	✓		
17 SEIDLLNIR	✓		
18 ALLAICGGED	✓		
Proteína purificada 56 kDa			
1 EAILELITSR	AnxA6		
2 TNEQIHLVAAYK	✓		
3 DLEADITGDTSGHFR	✓		
4 LVFDEYLK	✓		
5 SELDMLDIR	✓		
6 GLGTDEDTIIDIIAHR	✓	22	1429
7 ALIEILATRTRNAEIQAINK	✓		
8 AREDAQVAEILEIADTTSGDK	✓		
9 SLEDALSSDTSGHFK	✓		
10 DVFVAIVQSVK	✓		
11 SEIDLLNIR	✓		
12 ALLAICGGED	✓		

Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de AnxA6 humana y bovina

	10	20	30	40	50
An6 <i>Homo sapiens</i>	MAKPAQGAKY	RGSIHDFPGF	DPNQDAEALY	TAMKGFSGDK	EAILDIITSR
An6 <i>Bos taurus</i>	MAKPAQGAKY	RGSIRDFPDF	NPSQDAETLY	NAMKGFSGDK	EAILLELITSR
Clustal Concenso	*****	****:***.*	:*.****:**	.*****	****:****
	60	70	80	90	100
An6 <i>Homo sapiens</i>	SNRQRQEVQ	SYKSLYGKDL	IADLKYELTG	KFERLIVGLM	RPPAYCDAKE
An6 <i>Bos taurus</i>	SNRQRQEQ	NYKSLYGKDL	IADLKYELTG	KFERLIVGLM	RPPAYADAKE
Clustal Concenso	*****:**	.*****	*****	*****	*****.****
	110	120	130	140	150
An6 <i>Homo sapiens</i>	IKDAISGIGT	DEKCLIEILA	SRTNEQMHQL	VAAYKDAYER	DLEADIIGDT
An6 <i>Bos taurus</i>	IKDAISGIGT	DEKCLIEILA	SRTNEQIHQL	VAAYKDAYER	DLEADITGDT
Clustal Concenso	*****	*****	*****:**	*****	***** **
	160	170	180	190	200
An6 <i>Homo sapiens</i>	SGHFQKMLVV	LLQGTREEDD	VVSEDLVQQD	VQDLYEAGEL	KWGTDEAQFI
An6 <i>Bos taurus</i>	SGHFRKMLVV	LLQGTREEDD	VVSEDLVQQD	VQDLYEAGEL	KWGTDEAQFI
Clustal Concenso	****:*****	*****	*****	*****	*****
	210	220	230	240	250
An6 <i>Homo sapiens</i>	YILGNRSKQH	LRLVFDEYLK	TTGKPIEASI	RGELSGDFEK	LMLAVVKCIR
An6 <i>Bos taurus</i>	YILGNRSKQH	LRLVFDEYLK	TTGKPIEASI	RGELSGDFEK	LMLAVVKCIR
Clustal Concenso	*****	*****	*****	*****	*****
	260	270	280	290	300
An6 <i>Homo sapiens</i>	STPEYFAERL	FKAMKGLGTR	DNTLIRIMVS	RSELDMLDIR	EIFRTKYEKS
An6 <i>Bos taurus</i>	STAEYFAERL	FKAMKGLGTR	DNTLIRIMVS	RSELDMLDIR	EIFRTKYEKS
Clustal Concenso	**.******	*****	*****	*****	*****
	310	320	330	340	350
An6 <i>Homo sapiens</i>	LYSMIKNDTS	GEYKKTLLKL	SGGDDDAAGQ	FFPEAAQVAY	QMWELSAVAR
An6 <i>Bos taurus</i>	LYSMIKNDTS	GEYKKTLLKL	CGGDDDAAGQ	FFPEAAQVAY	QMWELSAVAR
Clustal Concenso	*****	*****	.*****	*****	*****
	360	370	380	390	400
An6 <i>Homo sapiens</i>	VELKGTVRPA	NDFNPDADAK	ALRKAMKGLG	TDEDTIIDII	THRSNVQRQQ
An6 <i>Bos taurus</i>	VELKGTVRPA	GDFNPDADAK	ALRKAMKGLG	TDEDTIIDII	AHRNAQRQQ
Clustal Concenso	*****	.*****	*****	*****	:****.***
	410	420	430	440	450
An6 <i>Homo sapiens</i>	IRQTFKSHFG	RDLMTDLKSE	ISGDLARLIL	GLMPPAHYD	AKQLKKAMEG
An6 <i>Bos taurus</i>	IRQTFKSHFG	RDLMADLKSE	LSGDLARLIL	GLMPPAHYD	AKQLKKAMEG
Clustal Concenso	*****	****:*****	:*****	*****	*****
	460	470	480	490	500
An6 <i>Homo sapiens</i>	AGTDEKALIE	ILATRTNAEI	RAINEAYKED	YHKSLEDALS	SDTSGHFRRI
An6 <i>Bos taurus</i>	AGTDEKALIE	ILATRTNAEI	QAINKAYKED	YHKSLEDALS	SDTSGHFKRI
Clustal Concenso	*****	*****	:**:*	*****	*****:**
	510	520	530	540	550
An6 <i>Homo sapiens</i>	LISLATGHRE	EGGENLDQAR	EDAQVAEIL	EIADTPSGDK	TSLETRFMTI
An6 <i>Bos taurus</i>	LISLATGNRE	EGGEDRERAR	EDAQVAEIL	EIADTTSGDK	SSLETRFMMI
Clustal Concenso	*****:**	****:***	*****	*****.****	:***** *
	560	570	580	590	600
An6 <i>Homo sapiens</i>	LCTRSYPHLR	RVFQEFIKMT	NYDVEHTIKK	EMSGDVRDAF	VAIVQSVKKN
An6 <i>Bos taurus</i>	LCTRSYPHLR	RVFQEFIKMT	NYDVEHTIKK	EMSGDVRDVF	VAIVQSVKKN
Clustal Concenso	*****	*****	*****	*****.	*****
	610	620	630	640	650
An6 <i>Homo sapiens</i>	PLFFADKLYK	SMKGAGTDEK	TLTRIMVSRS	EIDLLNIRRE	FIEKYDKSLH
An6 <i>Bos taurus</i>	PLFFADKLYK	SMKGAGTDEK	TLTRIMVSRS	EIDLLNIRRE	FIEKYDKSLH
Clustal Concenso	*****	*****	*****	*****	*****
	660	670			
An6 <i>Homo sapiens</i>	QAIEGDTSGD	FLKALLALCG	GED		
An6 <i>Bos taurus</i>	QAIEGDTSGH	FLKALLAICG	GED		
Clustal Concenso	*****.	*****:**	***		

Figura 17. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de AnxA6 Humana y Bovina, realizado en el programa Clustal X. 94% de identidad existe entre estas dos secuencias, algoritmo BLAST P Basic Local Alignment Search Tool Protein).

Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de AnxA6 humana y bovina

	10	20	30	40	50
An6 <i>Bos taurus</i>	ATGGCCAAAC	CAGCACAGGG	TGCCAAGTAC	CGGGGCTCCA	TTCGTGACTT
An6 <i>Homo sapiens</i>	ATGGCCAAAC	CAGCACAGGG	TGCCAAGTAC	CGGGGCTCCA	TCCATGACTT
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	* * *****
	60	70	80	90	100
An6 <i>Bos taurus</i>	CCCCGACTTC	AACCCAGCC	AGGATGCCGA	GA	ACTCTGTAC
An6 <i>Homo sapiens</i>	CCCAGGCTTT	GACCCCAACC	AGGATGCCGA	GGCTCTGTAC	ACTGCCATGA
Clustal Co	*** * **	***** *	*****	* *****	* *****
	110	120	130	140	150
An6 <i>Bos taurus</i>	AGGGCTTTGG	CAGTGACAAG	GAGGCCATCC	TGGAGTTGAT	TACTTCCCGG
An6 <i>Homo sapiens</i>	AGGGCTTTGG	CAGTGACAAG	GAGGCCATAC	TGGACATAAT	CACCTCACGG
Clustal Co	*****	*****	***** *	**** * **	** ** **
	160	170	180	190	200
An6 <i>Bos taurus</i>	AGCAACAGGC	AGAGGCAGGA	GATCTGCCAG	AACTACAAGT	CCCTCTATGG
An6 <i>Homo sapiens</i>	AGCAACAGGC	AGAGGCAGGA	GGTCTGCCAG	AGCTACAAGT	CCCTCTACGG
Clustal Co	*****	***** *	* *****	* *****	***** **
	210	220	230	240	250
An6 <i>Bos taurus</i>	CAAGGACCTC	ATTGCAGACT	TGAAGTATGA	GTTGACAGGG	AAGTTTGAAC
An6 <i>Homo sapiens</i>	CAAGGACCTC	ATTGCTGATT	TAAAGTATGA	ATTGACGGGC	AAGTTTGAAC
Clustal Co	*****	***** ** *	* *****	***** **	*****
	260	270	280	290	300
An6 <i>Bos taurus</i>	GCCTGATTGT	GGGTCTTATG	AGGCCACCTG	CCTATGCTGA	TGCCAAAGAA
An6 <i>Homo sapiens</i>	GGTTGATTGT	GGGCTGATG	AGGCCACCTG	CCTATTGTGA	TGCCAAAGAA
Clustal Co	* *****	*** ** **	*****	***** **	*****
	310	320	330	340	350
An6 <i>Bos taurus</i>	ATTAAAGATG	CCATCTCGGG	CATTGGGACC	GATGAGAAGT	GCCTCATTGA
An6 <i>Homo sapiens</i>	ATTAAAGATG	CCATCTCGGG	CATTGGCACT	GATGAGAAGT	GCCTCATTGA
Clustal Co	*****	*****	***** **	*****	*****
	360	370	380	390	400
An6 <i>Bos taurus</i>	GATCTTGGCT	TCTCGGACCA	ACGAGCAGAT	CCACCAGCTG	GTGGCAGCAT
An6 <i>Homo sapiens</i>	GATCTTGGCT	TCCCGGACCA	ATGAGCAGAT	GCACCAGCTG	GTGGCAGCAT
Clustal Co	*****	** ***** *	*****	*****	*****
	410	420	430	440	450
An6 <i>Bos taurus</i>	ACAAAGATGC	CTACGAGCGA	GACCTGGAGG	CTGACATCAC	TGGGGACACC
An6 <i>Homo sapiens</i>	ACAAAGATGC	CTACGAGCGG	GACCTGGAGG	CTGACATCAT	CGGCGACACC
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	** *****
	460	470	480	490	500
An6 <i>Bos taurus</i>	TCTGGCCACT	TCCGGAAGAT	GCTCGTGGTC	CTGCTGCAGG	GTACCAGGGA
An6 <i>Homo sapiens</i>	TCTGGCCACT	TCCAGAAGAT	GCTTGTGGTC	CTGCTCCAGG	GAACCAGGGA
Clustal Co	*****	*** *****	*** *****	***** **	* *****
	510	520	530	540	550
An6 <i>Bos taurus</i>	GGAGGATGAC	GTAGTGAGCG	AGGACTTGGT	GCAGCAGGAC	GTCCAGGACC
An6 <i>Homo sapiens</i>	GGAGGATGAC	GTAGTGAGCG	AGGACCTGGT	ACAACAGGAT	GTCCAGGACC
Clustal Co	*****	*****	***** **	** *****	*****
	560	570	580	590	600
An6 <i>Bos taurus</i>	TGTATGAGGC	AGGGGAAGT	AAATGGGGAA	CAGATGAAGC	CCAGTTCATT
An6 <i>Homo sapiens</i>	TATACGAGGC	AGGGGAAGT	AAATGGGGAA	CAGATGAAGC	CCAGTTCATT
Clustal Co	* ** *****	*****	*****	*****	*****
	610	620	630	640	650
An6 <i>Bos taurus</i>	TACATTTTGG	GAAATCGCAG	CAAGCAGCAT	CTCCGGTTGG	TATTTGATGA
An6 <i>Homo sapiens</i>	TACATCTTGG	GAAATCGCAG	CAAGCAGCAT	CTTCGGTTGG	TGTTTCGATGA
Clustal Co	*****	*****	*****	** *****	* ** *****

	660	670	680	690	700
An6 <i>Bos taurus</i>	GTATCTGAAG ACCACGGGGA	AGCCGATTGA	AGCCAGCATC	CGAGGGGAGC	
An6 <i>Homo sapiens</i>	GTATCTGAAG ACCACAGGGA	AGCCGATTGA	AGCCAGCATC	CGAGGGGAGC	
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****
	710	720	730	740	750
An6 <i>Bos taurus</i>	TGTCGGGGGA CTTTGAGAAG	CTGATGCTGG	CTGTGGTGAA	GTGTATCCGG	
An6 <i>Homo sapiens</i>	TGTCGGGGGA CTTTGAGAAG	CTAATGCTGG	CCGTAGTGAA	GTGTATCCGG	
Clustal Co	****	*****	**	*****	*****
	760	770	780	790	800
An6 <i>Bos taurus</i>	AGCACCGCAG AGTATTTTGC	TGAGAGGCTA	TTCAAGGCCA	TGAAGGGCCT	
An6 <i>Homo sapiens</i>	AGCACCCGG AATATTTTGC	TGAAAGGCTC	TTCAAGGCTA	TGAAGGGCCT	
Clustal Co	*****	*	*	*****	*****
	810	820	830	840	850
An6 <i>Bos taurus</i>	GGGGACGCGG GACAACACCC	TGATCCGCAT	CATGGTCTCC	CGCAGTGAGC	
An6 <i>Homo sapiens</i>	GGGGACTCGG GACAACACCC	TGATCCGCAT	CATGGTCTCC	CGTAGTGAGT	
Clustal Co	*****	***	*****	*****	**
	860	870	880	890	900
An6 <i>Bos taurus</i>	TGGACATGCT CGACATCCGG	GAGATATTCC	GGACCAAGTA	CGAGAAGTCC	
An6 <i>Homo sapiens</i>	TGGACATGCT CGACATTCGG	GAGATCTTCC	GGACCAAGTA	TGAGAAGTCC	
Clustal Co	*****	*****	***	*****	*****
	910	920	930	940	950
An6 <i>Bos taurus</i>	CTGTACAGTA TGATCAAGAA	CGATACCTCT	GGCGAATACA	AGAAGACTCT	
An6 <i>Homo sapiens</i>	CTCTACAGCA TGATCAAGAA	TGACACCTCT	GGCGAGTACA	AGAAGACTCT	
Clustal Co	**	*****	*	*****	*****
	960	970	980	990	1000
An6 <i>Bos taurus</i>	GCTGAAGCTG TGTGGGGGAG	ATGATGATGC	TGCTGGCCAG	TTCTTCCCGG	
An6 <i>Homo sapiens</i>	GCTGAAGCTG TCTGGGGGAG	ATGATGATGC	TGCTGGCCAG	TTCTTCCCGG	
Clustal Co	*****	*	*****	*****	*****
	1010	1020	1030	1040	1050
An6 <i>Bos taurus</i>	AGGCAGCGCA GGTGGCCTAT	CAGATGTGGG	AACTTAGTGC	AGTGGCCCGA	
An6 <i>Homo sapiens</i>	AGGCAGCGCA GGTGGCCTAT	CAGATGTGGG	AACTTAGTGC	AGTGGCCCGA	
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****
	1060	1070	1080	1090	1100
An6 <i>Bos taurus</i>	GTAGAGCTGA AAGGAACCGT	GCGCCAGCT	GGTGACTTCA	ACCCTGATGC	
An6 <i>Homo sapiens</i>	GTAGAGCTGA AGGGAACCTGT	GCGCCAGCC	AATGACTTCA	ACCCTGACGC	
Clustal Co	*****	*	*****	*****	*****
	1110	1120	1130	1140	1150
An6 <i>Bos taurus</i>	AGACGCCAAA GCCTTGC GGA	AAGCCATGAA	GGGGCTTGA	ACTGACGAGG	
An6 <i>Homo sapiens</i>	AGATGCCAAA GCGCTGC GGA	AAGCCATGAA	GGGACTCGGG	ACTGACGAAG	
Clustal Co	***	*****	*****	***	*****
	1160	1170	1180	1190	1200
An6 <i>Bos taurus</i>	ACACCATCAT CGACATCATC	GCCACCGCA	GCAACGCCCA	GCGGCAGCAG	
An6 <i>Homo sapiens</i>	ACACAATCAT CGATATCATC	ACGCACCGCA	GCAATGTCCA	GCGGCAGCAG	
Clustal Co	****	*****	*	*****	*****
	1210	1220	1230	1240	1250
An6 <i>Bos taurus</i>	ATCCGCCAGA CCTTCAAGTC	TCACTTTGGC	CGGGACTTGA	TGGCTGACCT	
An6 <i>Homo sapiens</i>	ATCCGGCAGA CCTTCAAGTC	TCACTTTGGC	CGGGACTTAA	TGACTGACCT	
Clustal Co	*****	*****	*****	*	*****
	1260	1270	1280	1290	1300
An6 <i>Bos taurus</i>	GAAGTCTGAG CTCTCCGGAG	ACCTGGCAAG	GCTCATTCTG	GGGCTCATGA	
An6 <i>Homo sapiens</i>	GAAGTCTGAG ATCTCTGGAG	ACCTGGCAAG	GCTGATTCTG	GGGCTCATGA	
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****
	1310	1320	1330	1340	1350
An6 <i>Bos taurus</i>	TGCCACCGGC CCATTATGAT	GCCAAGCAGT	TGAAGAAAGC	CATGGAGGGA	
An6 <i>Homo sapiens</i>	TGCCACCGGC CCATTACGAT	GCCAAGCAGT	TGAAGAAAGC	CATGGAGGGA	
Clustal Co	*****	*****	*****	**	*****

	1360	1370	1380	1390	1400
An6 <i>Bos taurus</i>	GCTGGCACAG	ATGAAAAGGC	TCTCATCGAG	ATCCTGGCCA	CTCGGACCAA
An6 <i>Homo sapiens</i>	GCCGGCACAG	ATGAAAAGGC	TCTTATTGAA	ATCCTGGCCA	CTCGGACCAA
Clustal Co	** *****	*****	*** ** *	*****	*****
	1410	1420	1430	1440	1450
An6 <i>Bos taurus</i>	CGCCGAAATC	CAGGCCATCA	ATAAGGCCTA	CAAGGAGGAC	TATCACAAGT
An6 <i>Homo sapiens</i>	TGCTGAAATC	CGGGCCATCA	ATGAGGCCTA	TAAGGAGGAC	TATCACAAGT
Clustal Co	** *****	*****	** *****	*****	*****
	1460	1470	1480	1490	1500
An6 <i>Bos taurus</i>	CCCTGGAGGA	TGCTCTGAGC	TCAGACACGT	CTGGCCACTT	CAAGAGGATC
An6 <i>Homo sapiens</i>	CCCTGGAGGA	TGCTCTGAGC	TCAGACACAT	CTGGCCACTT	CAGGAGGATC
Clustal Co	*****	*****	***** *	*****	** *****
	1510	1520	1530	1540	1550
An6 <i>Bos taurus</i>	CTCATCTCTC	TGGCCACGGG	GAACCGTGAA	GAGGGAGGAG	AAGATCGGGA
An6 <i>Homo sapiens</i>	CTCATTTCTC	TGGCCACGGG	GCATCGTGAG	GAGGGAGGAG	AAAACCTGGA
Clustal Co	***** **	*****	* * *****	*****	** * * **
	1560	1570	1580	1590	1600
An6 <i>Bos taurus</i>	ACGGGCCCGG	GAAGATGCC	AGGTGGCTGC	TGAGATCTTG	GAAATAGCAG
An6 <i>Homo sapiens</i>	CCAGGCACGG	GAAGATGCC	AGGTGGCTGC	TGAGATCTTG	GAAATAGCAG
Clustal Co	* ** * **	*****	*****	*****	*****
	1610	1620	1630	1640	1650
An6 <i>Bos taurus</i>	ACACAACCAG	CGGAGACAAG	TCTTCCCTGG	AGACACGATT	CATGATGATC
An6 <i>Homo sapiens</i>	ACACACCTAG	TGGAGACAAA	ACTTCCCTGG	AGACACGTTT	CATGACGATC
Clustal Co	***** * **	*****	***** **	***** **	***** **
	1660	1670	1680	1690	1700
An6 <i>Bos taurus</i>	CTCTGCACGC	GGAGCTATCC	GCACCTCCGG	AGAGTCTTCC	AGGAGTTCAT
An6 <i>Homo sapiens</i>	CTGTGTACCC	GGAGCTATCC	GCACCTCCGG	AGAGTCTTCC	AGGAGTTCAT
Clustal Co	** ** * *	*****	*****	*****	*****
	1710	1720	1730	1740	1750
An6 <i>Bos taurus</i>	CAAGATGACC	AACTATGACG	TGGAGCACAC	CATCAAGAAG	GAGATGTCTG
An6 <i>Homo sapiens</i>	CAAGATGACC	AACTATGACG	TGGAGCACAC	CATCAAGAAG	GAGATGTCTG
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****
	1760	1770	1780	1790	1800
An6 <i>Bos taurus</i>	GGGATGTCCG	AGACGTGTTT	GTGGCCATTG	TTCAAAGTGT	CAAGAACAAG
An6 <i>Homo sapiens</i>	GGGATGTGAG	GGATGCATTT	GTGGCCATTG	TTCAAAGTGT	CAAGAACAAG
Clustal Co	***** *	** * **	*****	*****	*****
	1810	1820	1830	1840	1850
An6 <i>Bos taurus</i>	CCTCTCTTCT	TTGCTGACAA	ACTTTACAAA	TCCATGAAGG	GTGCGGCAC
An6 <i>Homo sapiens</i>	CCTCTCTTCT	TTGCGGACAA	ACTTTACAAA	TCCATGAAGG	GTGCTGGCAC
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****
	1860	1870	1880	1890	1900
An6 <i>Bos taurus</i>	GGATGAGAAG	ACCCTCACCA	GGATCATGGT	CTCACGAAGT	GAGATCGACC
An6 <i>Homo sapiens</i>	AGATGAGAAG	ACTCTGACCA	GGATCATGGT	ATCCCGCAGT	GAGATTGACC
Clustal Co	*****	** ** **	*****	** ** **	***** **
	1910	1920	1930	1940	1950
An6 <i>Bos taurus</i>	TGCTCAACAT	CCGGCGGGAG	TTCATCGAGA	AATATGACAA	GTCTCTCCAC
An6 <i>Homo sapiens</i>	TGCTCAACAT	CCGGAGGGAA	TTCATTGAGA	AATATGACAA	GTCTCTCCAC
Clustal Co	*****	**** **	**** **	*****	*****
	1960	1970	1980	1990	2000
An6 <i>Bos taurus</i>	CAAGCCATTG	AGGGTGACAC	CTCCGGGCAC	TTCCTGAAGG	CCTTGCTGGC
An6 <i>Homo sapiens</i>	CAAGCCATTG	AGGGTGACAC	CTCCGGAGAC	TTCCTGAAGG	CCTTGCTGGC
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****
	2010	2020			
An6 <i>Bos taurus</i>	CATCTGTGGA	GGCGAGGACT	GA		
An6 <i>Homo sapiens</i>	TCTCTGTGGT	GGTGAGGACT	AG		
Clustal Co	*****	** *****			

Figura 18. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de AnxA6 Humana y Bovina, realizado en el programa Clustal X. 92% de identidad existe entre estas dos secuencias, algoritmo BLAST N.

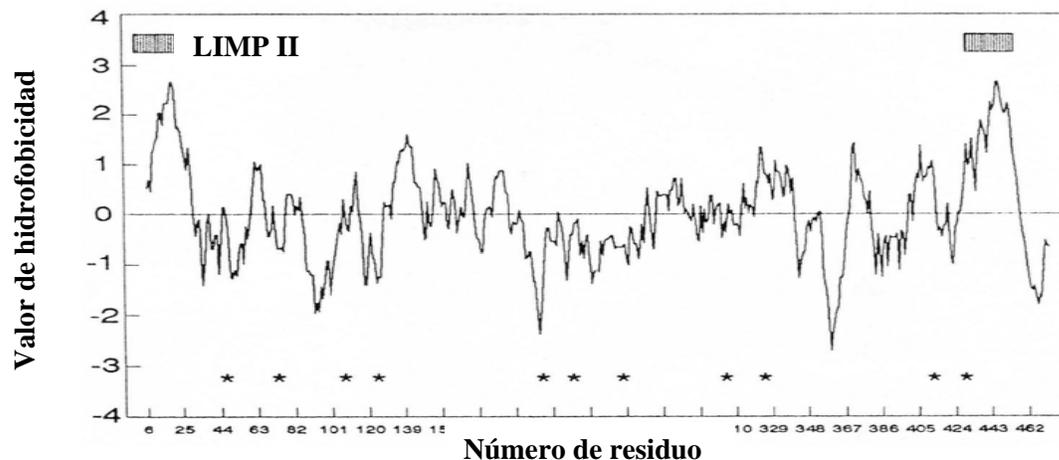
5.8. Predicción de la localización subcelular de AnxA6 en función de su secuencia de aminoácidos

Dado que el RI-Man6P que proponemos endocita a β -glucuronidasa bovina, éste debería ser una proteína integral de membrana y la AnxA6 ha sido descrita como una proteína citosólica, buscamos en bases de datos si esta proteína posee una señal líder que la permitan integrar a la membrana durante la síntesis, por otra parte también se investigó su perfil de hidrofobicidad, o si posee dominios que sugieran pueda ser una proteína integral de membrana y si contiene dominios reconocidos por adaptinas, que son necesarios para la endocitosis.

5.9. Señal líder y perfil de hidrofobicidad de AnxA6

Con ayuda de herramientas bioinformáticas se determinó que AnxA6 no posee una señal líder que permitan su integración a la membrana, además se analizó el perfil de hidrofobicidad de esta proteína con el programa de Kyte and Doolittle, los resultados fueron comparados con el perfil de hidrofobicidad de la proteína integral de membrana lisosomal LIMPII, esta grafica fue tomada de (Vega, M.A. y cols.1991), en donde se muestra que esta proteína tiene dos cruces transmembranales, en dos regiones de la proteína, con un valor de 2.7, mientras que el perfil de hidrofobicidad para AnxA6 es de 2.4, la cual no es suficiente para poder atravesar la membrana lipídica (figura 18).

A)



B)

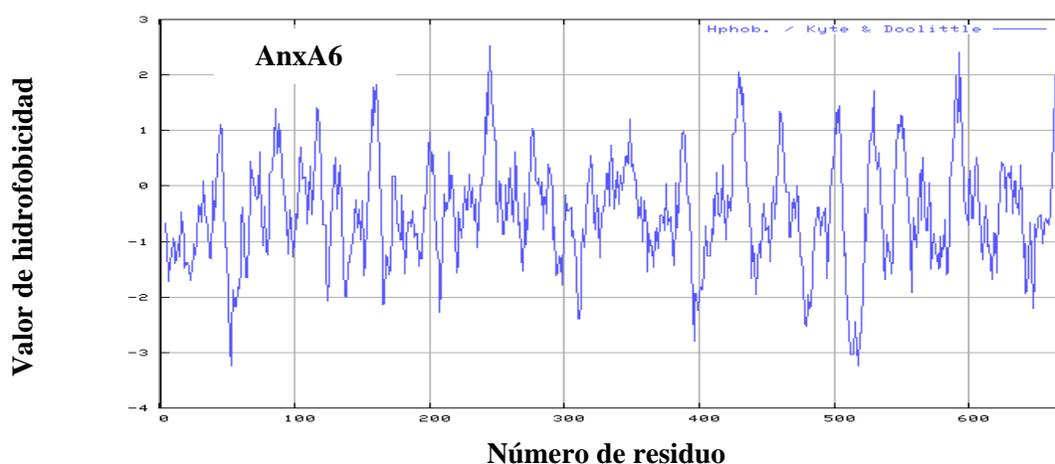


Figura 19. Perfil de hidrofobicidad de AnxA6. Panel A Perfil de hidrofobicidad de LIMP II (proteína transmembranal de lisosoma) tomado del artículo de Vega, M.A., y cols. 1991). Panel B Perfil de hidrofobicidad de AnxA6. Se utilizó el algoritmo de Kite and Doolittle.

5.10. AnxA6 y el RI-Man6P son la misma proteína

En las siguientes secciones se describen estrategias seguidas para confirmar que AnxA6 y el RI-Man6P para la endocitosis de la β -glucuronidasa bovina son la misma proteína.

5.10.1. Ensayos de Western Blot confirman que el RI-Man6P es AnxA6

Como se muestra en la figura 19, el receptor purificado fue reconocido por anticuerpos comerciales en contra de AnxA6 y anticuerpos generados en el laboratorio contra el RI-Man6P, lo que sugiere la identidad de los dos antígenos. Las diferencias

observadas en los ensayos de Western Blot indican que cada anticuerpo reconoce diferentes epitopos en el receptor; algunos de ellos pudieran no estar presentes en las tres isoformas debido a cortes proteolíticos que hubiera sufrido durante la purificación o por cambios conformacionales de la proteína disparados por la extracción con detergentes. Un ejemplo de esto lo observamos con el anticuerpo policlonal N-19, el cual está dirigido en contra de una secuencia que forma parte del amino terminal de la proteína, y solo reacciona con la banda de 68 kDa, sugiriendo que el receptor puede haber sido cortado en el extremo amino terminal. Consecuentemente, este epitopo no estuvo presente en las bandas de 64/56 kDa.

Por otra parte el anticuerpo monoclonal Clona-73 dirigido en contra de la región media de AnxA6, y los sueros Rb-1 y Rb-421 están dirigidos contra la proteína nativa reconocen a la AnxA6, estos últimos fueron generados siguiendo diferentes protocolos de inmunización ver figura 19 (González-Noriega, A., y Michalak, C. 2001).

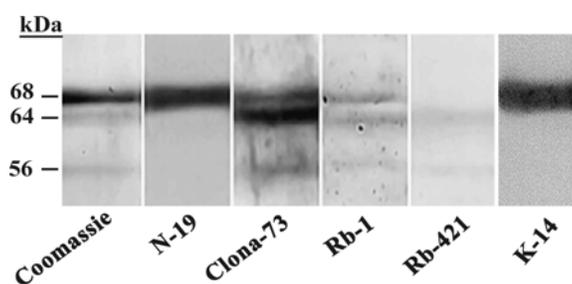


Figura 20. AnxA6 purificada a partir de hígado bovino transferido a membranas de nitrocelulosa, teñido con Coomassie y detectado con anticuerpos.

5.11. Clonación del cDNA de AnxA6 humana.

En primer lugar obtuvimos el cDNA, correspondiente al marco de lectura abierta u ORF (*Open Reading Frame*) del gen AnxA6. Para ello se extrajo RNA total a partir de una línea celular de humanos HepG2 y se llevó a cabo la retrotranscripción del mismo utilizando como cebador un oligonucleótido (OligodT). Posteriormente, realizamos una PCR utilizando oligonucleótidos específicos para la amplificación del ORF de AnxA6. Una vez realizada la RT-PCR los productos se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1% lo que nos permitió comprobar su tamaño y la ausencia de contaminantes o amplificaciones inespecíficas.

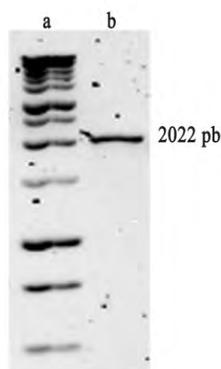


Figura 21. Producto de PCR de AnxA6 por electroforesis en gel de agarosa. El resultado muestra una banda única a la talla esperada 2022 pb. a) Marcador de Peso molecular, b) amplificado se sitúa a la altura del tamaño esperado.

Como se observa en la fotografía del gel (figura 20) obtuvimos una única banda cuyo patrón de migración se ajusta al tamaño esperado de 2022 pares de bases que corresponde al ORF de AnxA6.

La clonación del cDNA de AnxA6 al vector pQE-31, se realizó en dos pasos. En un primer paso se utilizó el plásmido pGEMTeasy. Este tipo de clonación utiliza la capacidad de la Taq DNAPolimerasa de agregar una adenina en posición 3' al producto amplificado. Mientras que el plásmido pGEM®-T Easy linearizado tiene una timina protuberante en la posición 5'. Así por complementariedad entre la timina del vector y la adenina del producto de PCR permiten su clonación eficiente. El objetivo de esta etapa fue asegurar la correcta clonación del producto, además de replicar el fragmento de PCR para secuenciar y obtener alta cantidad del producto para posteriormente ser clonado en los vectores de expresión. Tras la unión o ligación del plásmido con el cDNA correspondiente a la ORF de AnxA6 se procedió a la transformación de bacterias competentes para, posteriormente, analizar las colonias formadas en busca de nuestro inserto. De las colonias obtenidas tras la transformación se seleccionaron al azar entre 6 y 10 y se llevó a cabo la extracción y purificación de los plásmidos que contenían. El análisis posterior mediante enzimas de restricción nos confirmó que el tamaño del inserto es el correcto. Como se muestra en la figura 9 el producto de PCR de AnxA6 se clonó en el vector linearizado pGEM®-T Easy generándose el vector pGEM-A6. Con la ayuda del set de oligonucleótidos descritos en la sección de materiales, se clonó el cDNA de AnxA6 primero en el plásmido pGEM®-T Easy y después en los diferentes vectores de expresión utilizados en este trabajo (figura 21).

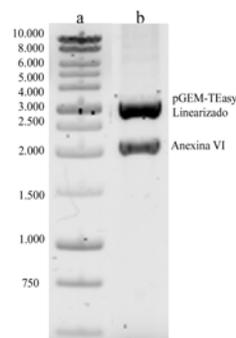


Figura 22. Estrategia de clonación de AnxA6 al vector de clonación pGEM®-T Easy. La flecha azul se corresponde con el gen de la β -galactosidasa que al quedar interrumpido no podrá transcribirse y por tanto las bacterias que tengan esta construcción no serán capaces de degradar el X-Gal del medio y serán de color blanco; Amp^r, gen de resistencia a ampicilina. El gel muestra el análisis de restricción del plásmido pGEM+A6; a) Marcador de peso molecular, b) pGEM+A6 sitios de restricción: *SalI* y *HindIII*.

5.11.1. Clonación de AnxA6 al vector de expresión pQE31.

A partir del plásmido pGEM-A6 se obtuvo el fragmento de 2022 pb que corresponde a la AnxA6 liberado por las enzimas *SalI* y *HindIII* por otro lado el plásmido pQE31 se cortó con estas mismas enzimas, se purificaron, se ligaron y la búsqueda de transformantes se realizó por la digestión del vector con las enzimas *SalI* y *HindIII* los plásmidos generados se denominaron pQE+A6. Las clonas positivas fueron verificadas haciendo una doble restricción con las enzimas *Sal I* que se localiza en el extremo 5' y *EcoRV* que se localiza internamente en el gen de AnxA6 en la posición 1164, obteniéndose fragmentos de 4258 pb y 1164 pb (figura 22). Finalmente se enviaron a secuenciar las clonas que cortaron con las enzimas antes mencionadas, para así corroborar que la secuencia no había sufrido cambios o mutaciones y poder así abordar la etapa de expresión y purificación de AnxA6 recombinante.

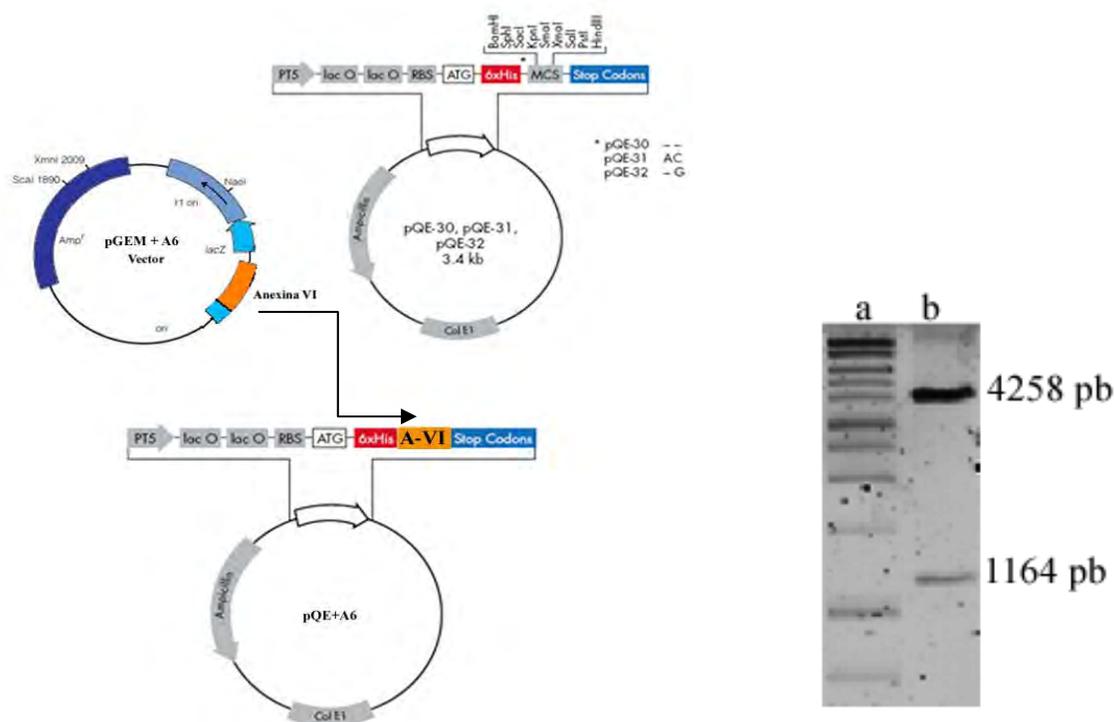


Figura 23. Estrategia de clonación de AnxA6 al vector de expresión pQE-31. El gel muestra el análisis de restricción del plásmido pQE+A6; a) Marcador de peso molecular, b) pGEM+A6 sitios de restricción: *SalI* y *EcoRV*.

5.11.2. Clonación de AnxA6 al vector de expresión para eucariontes, pcDNA 3.1+.

Este plásmido nos permite que el inserto sea transcrito en nuestro sistema de expresión, las células A431. Se ha verificado por Northern blot y Western blot. Esta línea celular no expresa AnxA6 La clonación AnxA6 al vector pcDNA 3.1+ fue como sigue, se tomó el gen de AnxA6 del vector pGEM+A6, cortado con las enzimas de restricción *HindIII* y *XhoI*, mientras que el vector pcDNA 3.1+ fue digerido con estas mismas enzimas, para verificar la correcta inserción del gen al vector, se digirió con las enzimas *HindIII* y *XhoI* obteniéndose fragmentos 5428 y 2022 que corresponden al vector y al inserto respectivamente (figura 23), las clonas que fueron positivas bajo este criterio se mandaron a secuenciar para comprobar la secuencia.

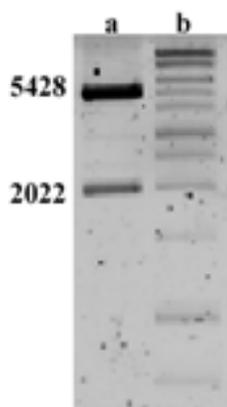


Figura 24. Análisis de los productos de digestión de las clonas pcDNA+A6 con las enzimas de restricción *HindIII* y *XhoI*; a) pcDNA+A6, b) marcador de pesos molecular.

5.11.3. Clonación de AnxA6 en el vector pIRESneo3.

Para clonar el cDNA de AnxA6 en este vector se diseñaron oligonucleótidos específicos que corresponden a la posición -70 a -30 (oligonucleótido sentido A6F) y 2157 a 2179 (oligonucleótido antisentido A6R) del gen humano de AnxA6 para generar líneas celulares que expresen este gen establemente. Esto con la finalidad de tener regiones promotoras tanto río arriba del ORF de AnxA6 así como río abajo y con esto favorecer una alta expresión del gen en nuestro sistema de expresión (McBurney, M. W., y cols. 2003). Se utilizó el plásmido pIRESneo3 debido a que es un plásmido que tiene la capacidad de sintetizar un solo ARN mensajero bicistronico que porta el gene de resistencia y el gen de interés asegurándose con esto que las células seleccionadas con el antibiótico expresan también el gen de interés. Los cebadores se diseñaron con sitios artificiales de restricción para *Nhe I* (oligonucleótido sentido) y *Not I* (oligonucleótido antisentido) respectivamente para orientar adecuadamente el ORF de AnxA6 en el vector pIRESneo3. A partir del plásmido pGEM+A6 se obtuvo el fragmento de 2239 pb que corresponde a la AnxA6 liberado por las enzimas *Nhe I* y *Not I* mientras que el plásmido pIRESneo3 se cortó con estas mismas enzimas, se purificaron, se ligaron y la búsqueda de transformantes se realizó por la digestión del vector con las enzimas *Nhe I* y *Not I* obteniéndose fragmentos 5275 y 2239 que corresponden al vector y al inserto respectivamente (figura 24), las clonas que fueron positivas bajo este criterio se mandaron a secuenciar para comprobar que no se había producido ningún cambio en el inserto durante su replicación en las bacterias.

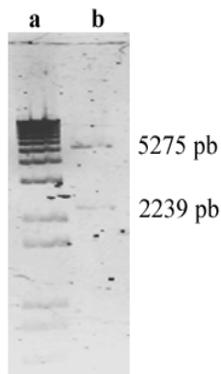


Figura 25. Electroforesis correspondiente a la digestión de la construcción pIRES+A6. El carril a muestra el marcador de peso molecular. El carril b muestra la digestión del plásmido pIRES+A6.

5.12. Purificación de AnxA6 recombinante en *E. coli* XL1-Blue

Como se ha mencionado en el apartado de métodos, este sistema de expresión hace posible la obtención de AnxA6 recombinante fusionada a un tallo de histidinas que permite su purificación en un solo paso. Se sabe que existen diferentes parámetros que influyen en el crecimiento bacteriano como: la temperatura, la agitación, la cepa bacteriana y el tiempo de inducción, los cuales se modificaron hasta encontrar las condiciones óptimas donde se induce la proteína recombinante. La producción de AnxA6 recombinante se llevó a cabo en la cepa *E. coli* XL1-Blue a 24 °C, la inducción se realizó con 0.7 M de IPTG toda la noche. En paralelo, un cultivo sin IPTG fue realizado como control negativo además de la cepa silvestre sin el plásmido. Alícuotas de todos estos cultivos fueron analizadas por SDS-PAGE (figura 25). Los carriles d y e, corresponden a las cepas de *E. coli* XL1-Blue que contienen el plásmido pQE+A6, en estos se observa una proteína inducida de 70 kDa que corresponde a la masa molecular esperada para AnxA6 recombinante, que no está presente en las cepas sin el plásmido y no inducidas con IPTG las cuales funcionan como control y se muestran en los carriles b y c de la misma figura, indicando que la expresión de AnxA6 recombinante es inducida por el IPTG adicionado.

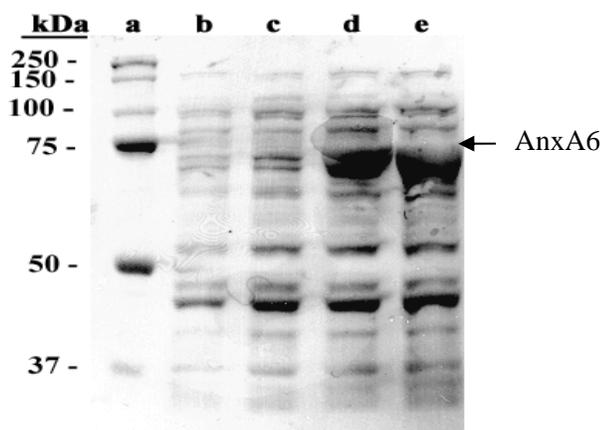


Figura 26. Análisis por PAGE-SDS de la expresión de la proteína de fusión AnxA6 en *E. coli* XL1-Blue a) Marcador Dual Color Biorad, b) Cepa *E. coli* XL1-Blue sin el plásmido pQE31+A6 sin inducir, c) Cepa *E. coli* XL1-Blue con el plásmido pQE31+A6, sin inducir, d) Cepa *E. coli* XL1-Blue con el plásmido pQE31+A6 inducida (clona 1) e) Cepa *E. coli* XL1-Blue con el plásmido pQE31+A6 inducida (clona 2) inducidas con 0.7 M de IPTG.

La purificación de AnxA6 humana recombinante se realizó por cromatografía de afinidad Ni-NTA. La proteína se eluyó con 250 mM de Imidazol. En la figura 26 A, se muestra el grado de purificación con el pico único y simétrico que se obtuvo en la cromatografía, se calcula que se purificó un 90% en un solo paso. La proteína recuperada se concentró en un filtro Amicon Ultra 4 siguiendo las recomendaciones del fabricante, finalmente, se corrió un gel PAGE-SDS al 8% y se tiñó con Coomassie PhastGel Blue R. En la figura 26 B, se muestra el perfil electroforético de la AnxA6 purificada, el cual concuerda con la pureza que el perfil cromatográfico nos mostró. Es importante mencionar que un lavado adicional con 1 M de NaCl contribuye importantemente a la pureza de la proteína. El rendimiento de la producción es de 10 mg de AnxA6 recombinante pura por litro de cultivo bacteriano.

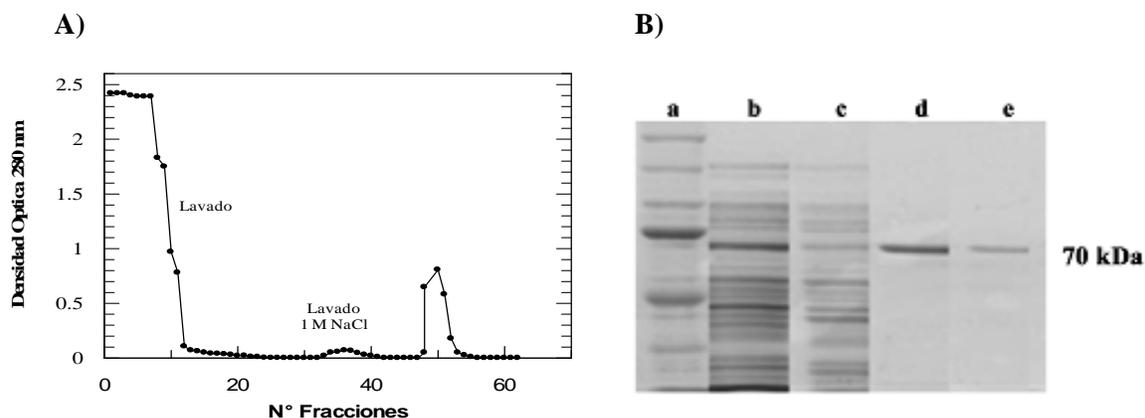


Figura 27. A) Se muestra el perfil de elución de la AnxA6 unida a la columna Ni-NTA, extraída a partir de extractos bacterianos transformados con el plásmido pQE+A6. Se graficó en el eje de las abscisas el número de fracciones y en el eje de las ordenadas la densidad óptica a 280 nanómetros. B) PAGE-SDS de la purificación de AnxA6 recombinante expresada en *E. coli* XL1-Blue a) Marcador Dual Color Biorad, b) Extracto total Cepa *E. coli* XL1-Blue con el plásmido pQE31+A6 inducida, c) No Adsorbido d) y e) AnxA6 eluida de la columna de afinidad Ni-NTA La AnxA6 recombinante tiene un peso molecular de 70 kDa debido a la etiqueta de histidinas que tiene fusionado a su extremo N-terminal. (figura 14)

5.13. Identificación de AnxA6 recombinante purificada con anticuerpos generados en el laboratorio para el RI-Man6P y comerciales en contra de AnxA6

Para corroborar que el RI-Man6P y AnxA6 son la misma proteína, se ha ensayado, mediante inmunotransferencia, el reconocimiento de anticuerpos generados en el laboratorio y comerciales de AnxA6 (figura 27). Para ello se empleó la AnxA6 recombinante purificada, en presencia de β -mercaptoetanol y tratamiento térmico a 100°C. Después de la detección con los diferentes anticuerpos, se observó que todos ellos reconocen de igual forma a la AnxA6 recombinante.

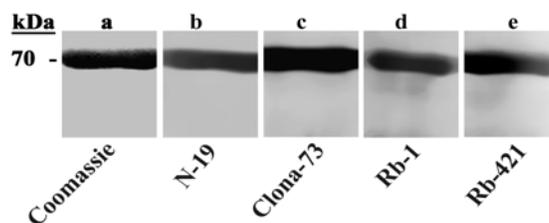


Figura 28. Identificación de AnxA6 recombinante, por inmunotransferencia. AnxA6 recombinante purificada detectada con los diferentes anticuerpos.

5.14. Ensayo de unión de la β -glucuronidasa bovina a AnxA6 recombinante (Far Western blot)

Para complementar los estudios con la AnxA6 recombinante probamos que ésta tiene la misma capacidad de unir β -glucuronidasa bovina como la proteína purificada a partir de hígado bovino in vitro por ensayos de Far Western blot, para este ensayo se trabajó bajo las mismas condiciones que la AnxA6 purificada de hígado bovino y se encontró que esta unión es específica y dependiente de cationes según consta en la figura 28, lo cual constata los resultados obtenidos anteriormente con la proteína bovina y de esta manera demostramos que AnxA6 y el receptor que hemos venido describiendo son la misma proteína.

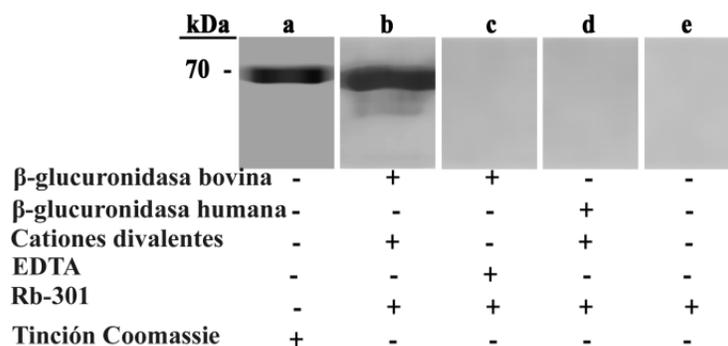


Figura 29. Interacción de AnxA6 recombinante y β -glucuronidasa bovina por Far Western blot. AnxA6 recombinante corrida en un PAGE-SDS y transferida a membranas de nitrocelulosa. a) AnxA6 recombinante teñida con Coomassie, b) AnxA6 recombinante incubada con β -glucuronidasa bovina en presencia de cationes detectada con anti β -glucuronidasa bovina c) AnxA6 recombinante incubada con β -glucuronidasa bovina en presencia de EDTA detectado con un anticuerpo anti β -glucuronidasa, d) AnxA6 recombinante incubada con β -glucuronidasa humana en presencia de cationes detectada con un anti β -glucuronidasa e) AnxA6 recombinante incubada con el anticuerpo anti β -glucuronidasa en presencia de cationes.

5.15. Funcionalidad de AnxA6 como receptor endocítico de β -glucuronidasa bovina, un mecanismo independiente de Man6P

5.15.1 Transfección estable de AnxA6 a células A431.

Con el fin de confirmar que AnxA6 es el receptor que promueve la endocitosis independiente de Man6P de la β -glucuronidasa bovina se transfectó el plásmido pcDNA+A6 en células A431. Esta línea celular es la única hasta ahora reportada carente de AnxA6 (Smythe, E., y cols. 1994).

La transfección se realizó de acuerdo al método descrito en el capítulo de material y métodos. Se seleccionaron aquellas células que integraron el plásmido a su genoma, debido a que la eficiencia de transfección no es del 100% se tuvieron que seleccionar aquellas células que integraron establemente el plásmido, para lo cual se utilizó el antibiótico G-418 (geneticina). Para esta transfección se utilizó una concentración de 400µg/ml. De esta forma todas aquellas células que contenían el plásmido integrado en su genoma fueron capaces de crecer en un medio de cultivo adicionado con el antibiótico. En paralelo se transfectaron células con el plásmido pcDNA3.1+ (vector vacío) como control. Tras un periodo de selección que oscila entre uno y dos meses se considera que las células han quedado transfectadas de forma estable.

5.15.2. Análisis de la expresión de AnxA6 transfectada establemente en células A431

Para demostrar que AnxA6 se está expresando en estas células, después de la transfección se realizaron ensayos de Western blot, en el cual se utilizaron 70 µg de un extracto membranal de proteínas, tanto de células transfectadas con AnxA6 (A431+A6) así como células transfectadas con el vector vacío (mock), células parentales (A431) y fibroblastos BGH-1 (control positivo), las cuales se detectaron con los anticuerpos Clona-73 y N-19 los que detectaron la presencia de una proteína de 68 kDa que corresponde a AnxA6 en el extracto membranal de la línea celular A431+A6 al igual que el control positivo células BGH-1, mientras los extractos de las células A431 y A431 (mock), no reconocen ninguna proteína, (figura 29). Con estos resultados queda demostrado que el ADN introducido ha quedado integrado en el genoma de la célula, y AnxA6 se está expresando en estas células, por lo que se pudo empezar a analizar la actividad del receptor.

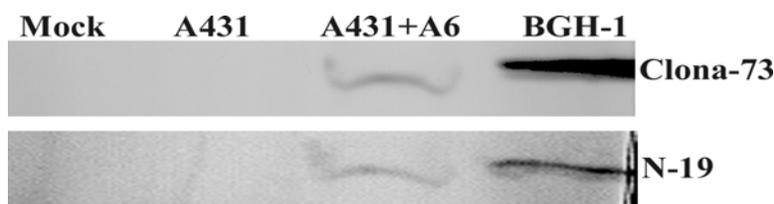


Figura 30. Inmunotransferencia para comprobar la expresión de AnxA6 en la línea establecida por transfección estable de células A431+A6. Extractos membranales con 70 µg de proteína por carril, se sometieron a electroforesis en condiciones reductoras y posterior transferencia a membrana de nitrocelulosa e incubación con los anticuerpos Clona-73 y N-19 contra AnxA6, Como control positivo un extracto membranal de células BGH-1 y como controles negativos extractos de células A431 y A431 transfectadas con el vector vacío.

5.15.3. Análisis de la funcionalidad de AnxA6 transfectada en células A431+A6 por endocitosis de β -glucuronidasa bovina

Tras conseguir una línea celular que expresa de forma estable a la proteína AnxA6, probamos que estas células son capaces de endocitar β -glucuronidasa bovina a través de esta. Para cumplir con esta meta se realizaron ensayos de endocitosis de β -glucuronidasa bovina en células A431+A6 así como A431 sin transfectar. Se observa la endocitosis de β -glucuronidasa bovina en células A431 no se realiza mientras que hay un pequeño incremento en las línea celular estable A431+A6 el cual es dependiente de la proteína transfectada (figura 30). Sin embargo este incremento no se mantiene y va decayendo con la división del cultivo como se muestra en el panel B de la figura 30, no obstante que las células mantienen la resistencia a geneticina, lo cual sería indicativo que la expresión de AnxA6 se va perdiendo, sin embargo cuando se verificó la expresión de AnxA6 en ensayos de western blot y como se observa en la figura 31 la proteína no deja de expresarse, el único cambio que se podría notar es que disminuye levemente la expresión con respecto a la primera detección realizada un mes antes (figura 30). Es difícil determinar a qué se deben estos tipos de cambios en la expresión de la AnxA6 el más lógico es que como se trata de una línea celular que no expresa esta proteína normalmente la célula pudiera estar apagando la expresión del transgen, y dado que el plásmido que utilizamos para generar la línea celular estable transcribe por separado tanto el gen de interés así como el gen de resistencia, la célula tendría la capacidad de apagar el gen de AnxA6 quedándose solo con el gen de resistencia, complicando la expresión de AnxA6 y por tanto la endocitosis dependiente de esta. Otra opción es que sí se exprese el gen pero este tipo celular es incapaz de insertar a la AnxA6 a la membrana plasmática y nuevamente comprometer la endocitosis.

A) Endocitosis de β -glucuronidasa bovina en células A431 transfectadas con AnxA6

Línea celular	Endocitosis de β -glucuronidasa U/mg/h	
	Control	Transfectadas con AnxA6
A431	1.4 \pm 1.0	5.7 \pm 1.9

Monocapas de fibroblastos confluentes fueron incubadas por 2 h a 37 °C con 5,000U/ml de β -glucuronidasa bovina en presencia de 1 mM Man6P.

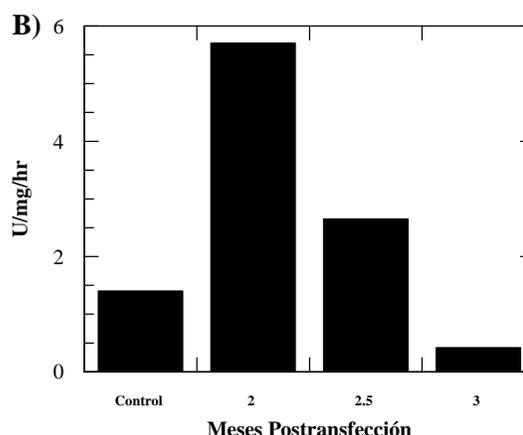


Figura 31. A) Tabla de endocitosis de β -glucuronidasa bovina en células A431+A6, ensayo realizado por duplicado. B) Grafica muestra la endocitosis a través de la división del cultivo en células A431+A6 a partir de dos meses postransfección.

En resumen sabemos que la endocitosis en las células A431 transfectadas con AnxA6 (generadas con el plásmido pcDNA+A6) es mínima y va disminuyendo conforme transcurre el tiempo. Por Western Blot vimos que no disminuye la expresión de AnxA6 con respecto al tiempo. Sin embargo, creemos que el plásmido no es el adecuado para mantener una buena expresión estable de AnxA6 en este tipo celular, la otra posibilidad es que la línea celular no endocite ó no sea un buen modelo para demostrar endocitosis, además recordemos que es una línea celular epitelial y que dicho mecanismo lo encontramos en un cultivo primario de fibroblastos lo que sugeriría que este nuevo mecanismo pudiera ser tejido específico.

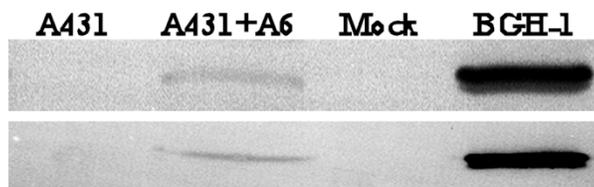


Figura 32. Inmunotransferencia para comprobar la expresión de AnxA6 en células A431+A6. Extractos membranales con 70 μ g de proteína por carril, se sometieron a electroforesis en condiciones reductoras y posterior transferencia a membrana de nitrocelulosa e incubación con el anticuerpo Clona-73, contra AnxA6. Como control positivo un extracto membranal de células BHG-1 y como controles negativos extractos de células A431 y A431 transfectadas con el vector vacío.

5.15.4. Transfección estable de AnxA6 a células A431 con el vector pIRES+A6.

Para verificar que el plásmido pcDNA 3.1 no sea el responsable de los bajos niveles de endocitosis en las células A431+A6, clonamos el gen de AnxA6 al vector de

expresión pIRESneo3, que tiene la capacidad de transcribir un solo ARNm bicistronico regulado bajo el mismo promotor que asegura la transcripción de los dos genes tanto el de resistencia como el de AnxA6. Obtuvimos el vector pIRES+A6 el cual se utilizó para generar las transfectantes estables de la línea celular A431, utilizando el reactivo FUGENE 6 (Roche). Las células se sembraron el día anterior en frascos de cultivo de 75 cm con el objetivo que presenten una confluencia del 60-70% en el momento de la transfección. Las células se lavaron 2 veces con α -MEM sin suero y sin antibióticos y se incubaron durante 1 hora con medio fresco. Mientras se preparaba la solución de transfección que consistió en una relación 1:2.5 (p/v), entre el ADN de interés y FUGENE 6, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La solución de transfección se incubó entre 15 y 45 minutos, para posteriormente añadirse a las células las cuales se incubaron con esta durante 48 h.

Transcurrido este tiempo se inició la selección de clonas con el antibiótico G418 a una concentración de 400 μ g/ml. Se utilizó como control de transfección el vector vacío. Para verificar que se transfectaron las células A431 con AnxA6 se realizaron ensayos de Western Blot (figura 32), los anticuerpos reconocen una banda de 68 kDa en extractos membranales de cada una de las células utilizadas, lo cual confirma la expresión de la proteína en esta línea celular, los controles de transfección fueron la línea parental y esta misma transfectada con el vector pIRESneo3, como se muestra en la figura los extractos que corresponden a las células transfectadas hay reconocimiento de una banda de 68 kDa con los anticuerpos N-19, Clona-72 y Rb-421, mientras que en los extractos de las células control no hay reconocimiento de ninguna proteína lo cual demuestra que la transfección se realizó de acuerdo a lo planteado.

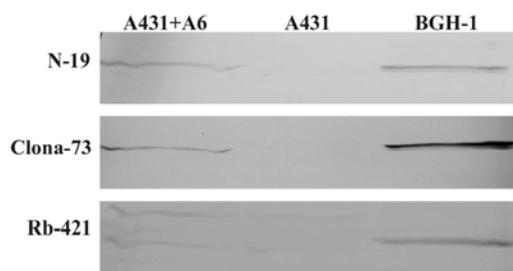


Figura 33. Inmunotransferencia para comprobar la expresión de AnxA6 en células A431+A6. (transfectadas con el plásmido pIRES+A6. Extractos membranales con 70 μ g de proteína por carril, se sometieron a electroforesis en condiciones reductoras y posterior transferencia a membrana de nitrocelulosa e incubación con el anticuerpo N-19, Clona-73 y Rb-421, contra AnxA6. Como control positivo un extracto membranal de células BGH-1 y como control negativos extractos de células A431.

Después de la transfección, probamos la capacidad de la línea celular A431+A6-1 de endocitar β -glucuronidasa bovina. La endocitosis en esta línea celular permanece en bajos niveles a pesar del uso del nuevo plásmido. Esto sugiere que la AnxA6 no se está integrando a la membrana plasmática, y por lo tanto no hay un incremento significativo de la endocitosis dependiente de AnxA6. Para determinar si la proteína se está expresando en la superficie celular realizamos ensayos de inmunofluorescencia en fibroblastos normales y en células transfectadas con AnxA6.

5.16. Expresión de AnxA6 humana en la superficie de células BGH-1 y A431+A6.

Para probar que AnxA6 se expresa en la superficie de células BGH-1 se analizó la distribución de esta a través de inmunofluorescencia, las células se fijaron con paraformaldehído y no se permeabilizaron cuando se incubaron con los anticuerpos, se utilizaron los anticuerpos N-19, Clona 73 y Rb-1, (si es verdad que AnxA6 se expresa en la superficie de estas células encontraremos señal de reconocimiento debido a que no se agregó algún agente que permita la internalización de los diferentes anticuerpos) finalmente se incubaron con los anticuerpos secundarios sin permeabilizar, y se analizaron las laminillas en un microscopio Olympus BX51, como se observa en la figura 33 el panel B corresponde a el anticuerpo Clona-73, mientras que los anticuerpos N-19 y Rb-1 corresponden a los paneles (E y H) respectivamente donde se observan señales positivas en la superficie de la célula lo que sugiere que en este tipo de células, AnxA6 se expresa en la superficie celular, cuando se hace la superposición de la imagen de inmunofluorescencia

con la de contraste de fase se vuelve más evidente la presencia de AnxA6 en la membrana plasmática.

Con estos resultados se analizaron las transfectantes estables de AnxA6 (A431+A6), para verificar que la proteína también se exprese en la superficie de la célula al igual que las BGH-1, y lo que observamos fue, solo del 5 al 10% de las células transfectadas expresan AnxA6 en la superficie celular estos resultados obtenidos sin permeabilizar células pero cuando se permeabilizan las células con saponina se observa que estas células expresan AnxA6 la cual se localiza en vesículas que se encuentran en todo el citoplasma celular también observándose en vesículas cercana al núcleo lo que indica que este tipo celular no tiene la capacidad de expresarla en la superficie celular. Mientras una pequeña fracción de la proteína transfectada se inserta a la membrana plasmática, lo que trae como consecuencia que la endocitosis se realice en bajos niveles en este tipo celular, esto sugeriría que en estas células A431, la endocitosis de β -glucuronidasa bovina es dependiente de la cantidad de AnxA6 que esté presente en la superficie celular y por lo tanto no es un buen modelo para demostrar endocitosis (figura 34).

Por lo que fue necesario hacer un análisis con un tipo celular fibroblastoide, para confirmar la funcionalidad de este nuevo receptor que estamos proponiendo.

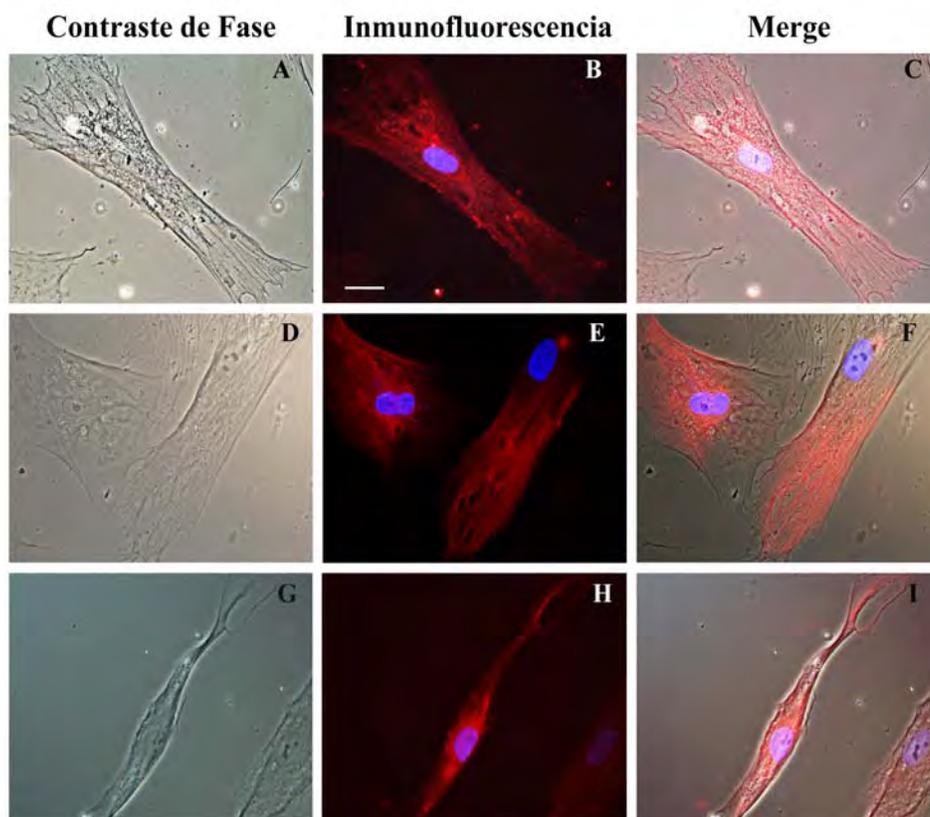


Figura 34. Inmunolocalización de AnxA6 en la superficie de células BGH-1, fijadas con paraformaldehído, no permeabilizadas y detectadas con los anticuerpos B Clona-73. E, N-19. H, Rb-1. Paneles A, D, G, fotografía de contraste de fase. Paneles C, F, I suma de fluorescencia con el contraste de fase. Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

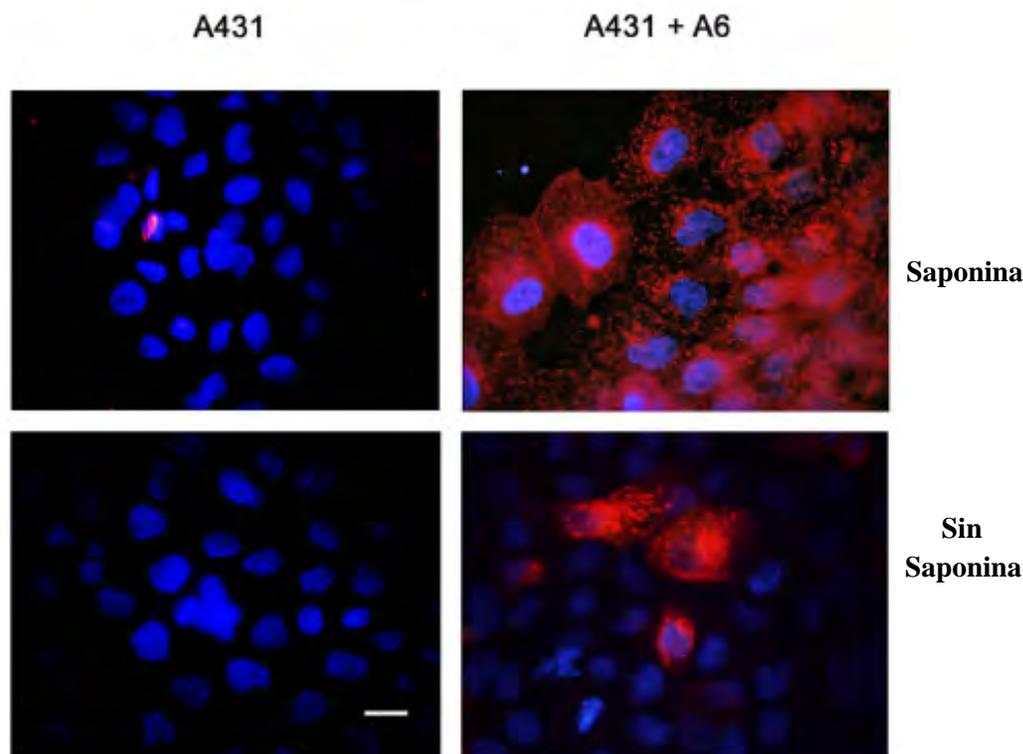


Figura 35. Inmunolocalización de AnxA6 en células A431 y A431+A6. En la fila superior se muestran células tratadas con saponina (interior celular) y en la fila inferior son células sin el tratamiento de saponina (superficie celular). Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

5.17. Transfección de AnxA6 en células L929

Con el objetivo de obtener unos niveles de endocitosis mayores dependientes de AnxA6, y pensando que al utilizar una línea celular fibroblastoide obtendremos mejores niveles de endocitosis de β -glucuronidasa bovina por AnxA6 no olvidando que ésta depende de la cantidad de AnxA6 que se encuentre disponible en la superficie celular, utilizamos la línea celular de ratón L929, esta línea se ha utilizado para transfectar al receptor Man6P para análisis de endocitosis lo cual la hacen un buen modelo para este tipo de experimentos y poder corroborar la funcionalidad de AnxA6 de endocitar β -glucuronidasa bovina. Para esto se transfectaron las células L929, con el plásmido pIRES+A6, con el reactivo FUGENE 6 siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez obtenidas las transfectantes estables se probó la sobreexpresión de AnxA6 en este tipo celular debido a que esta línea expresa pequeñas cantidades de AnxA6 y como mostramos en un ensayo de inmunotrasferencia logramos obtener una línea estable que expresa mayor

cantidad de AnxA6 con respecto a la célula parental. Sin embargo son mayores los niveles de AnxA6 en las células BGH-1 (figura 55).

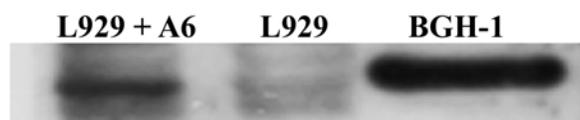


Figura 36. Inmunotransferencia para comprobar la expresión de AnxA6 en células L929+A6. (transfectadas con el plásmido pIRES+A6, extractos membranales con 70 µg de proteína por carril, se sometieron a electroforesis en condiciones reductoras y posterior transferencia a membrana de nitrocelulosa e incubación con el anticuerpo Clona-73, contra AnxA6. Como controles un extracto membranal de células BHG-1 y extracto de células L929.

5.18. Ensayos de endocitosis de β -glucuronidasa bovina en células L929 transfectadas establemente con AnxA6

Una vez que verificamos que la línea L929+A6 sobreexpresa AnxA6 realizamos ensayos de endocitosis de β -glucuronidasa bovina, se agregaron 5,000 U/ml de la enzima en presencia de 1 mM de Man6P. Hay un mayor incremento de endocitosis dependiente de AnxA6 en esta línea celular, sin embargo, con respecto a nuestro control positivo, las células BGH-1 los niveles de endocitosis siguen siendo bajos, pero tal incremento es dependiente de AnxA6.

En células L929 por inmunofluorescencia se pudo ver un mayor nivel de expresión de AnxA6 en la superficie celular lo que correlacionaría con los mejores niveles de endocitosis. Como se muestra en la figura 36, cuando se trata a las células con saponina también hay un exceso de AnxA6 citoplasmática, pero no sabemos qué mecanismo es el que dirige que esta proteína se inserte en la membrana y funcione como receptor.

A futuro se debe analizar que mecanismo es el que impide tener un mayor incremento en la endocitosis dependiente de AnxA6 en células transfectadas con este gen, debido a que dos tipos celulares están regulando la expresión de esta proteína además también se tendrá que evaluar a futuro que mecanismos son los que disparan la inserción de AnxA6 a la membrana plasmática para que dicha proteína se comporte como receptor.

Tabla 8. Endocitosis de β -glucuronidasa bovina en células L929 transfectadas con AnxA6

Línea Celular	Endocitosis de β -glucuronidasa U/mg/h	
	Control	Transfectadas con AnxA6
L929	6.7 \pm 0.5	21.9 \pm 2.5

Monocapas de fibroblastos confluentes fueron incubadas por 2 h a 37 °C con 5,000U/ml de β -glucuronidasa bovina en presencia de 1 mM Man6P.

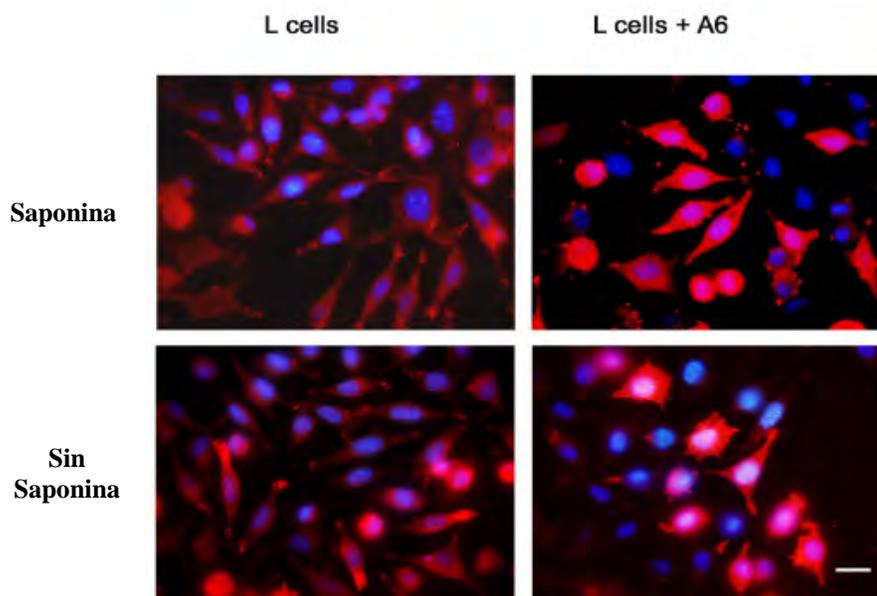


Figura 37. Inmunolocalización de AnxA6 en células L929 y L929+A6. En la fila superior se muestran células tratadas con saponina (interior celular) y en la fila inferior son células sin el tratamiento de saponina (superficie celular). Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

5.19. Colocalización de AnxA6 y β -glucuronidasa bovina en la superficie celular de células BGH-1 y A431+A6

La AnxA6 que se inserta a la membrana plasmática debe unir β -glucuronidasa agregada al medio de cultivo, para probar esta hipótesis, las células BGH-1 fueron incubadas en presencia de esta enzima y Man6P a 4°C, para permitir la unión de β -glucuronidasa y AnxA6. Posteriormente los cultivos fueron lavados, y la enzima junto con las células fueron fijadas con paraformaldehído, después las células fueron incubadas en ausencia de saponina con anticuerpos contra AnxA6 (Clona-73, N-19 y Cy-422) y β -glucuronidasa (Rb-301). Como esperábamos la β -glucuronidasa bovina se localizó en la

superficie celular asociada con AnxA6, según se observa por la coloración amarilla en la imagen superpuesta (merge) figura 37.

Estos experimentos presentan que ambas señales colocalizan en la superficie de la célula lo que demuestra que AnxA6 interactúa con β -glucuronidasa bovina y se acumulan en parches, posiblemente debido a la multivalencia del ligando (ver figura 37) observándose el mismo patrón con los diferentes anticuerpos tanto comerciales así como los generados en el laboratorio, en resumen demostramos que AnxA6 en fibroblastos normales se expresa en la superficie celular así como también interactúa con β -glucuronidasa bovina.

Por otra parte se realizó el mismo experimento con las células A431+A6 donde se observó también una colocalización de β -glucuronidasa bovina y AnxA6.

Sin embargo, esta colocalización solo se realizó en aquellas células que expresan a la AnxA6 en la superficie celular lo que demuestra que en este tipo celular es muy poca la AnxA6 que se inserta a la membrana plasmática y por lo tanto es difícil conseguir incrementos substanciales de endocitosis de β -glucuronidasa bovina (figura 38). Lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Takagi, (Takagi, H., y cols., 2002) que reportan que AnxA6 está presente sobre la superficie celular de únicamente el 22 % de las células transfectadas con AnxA6.

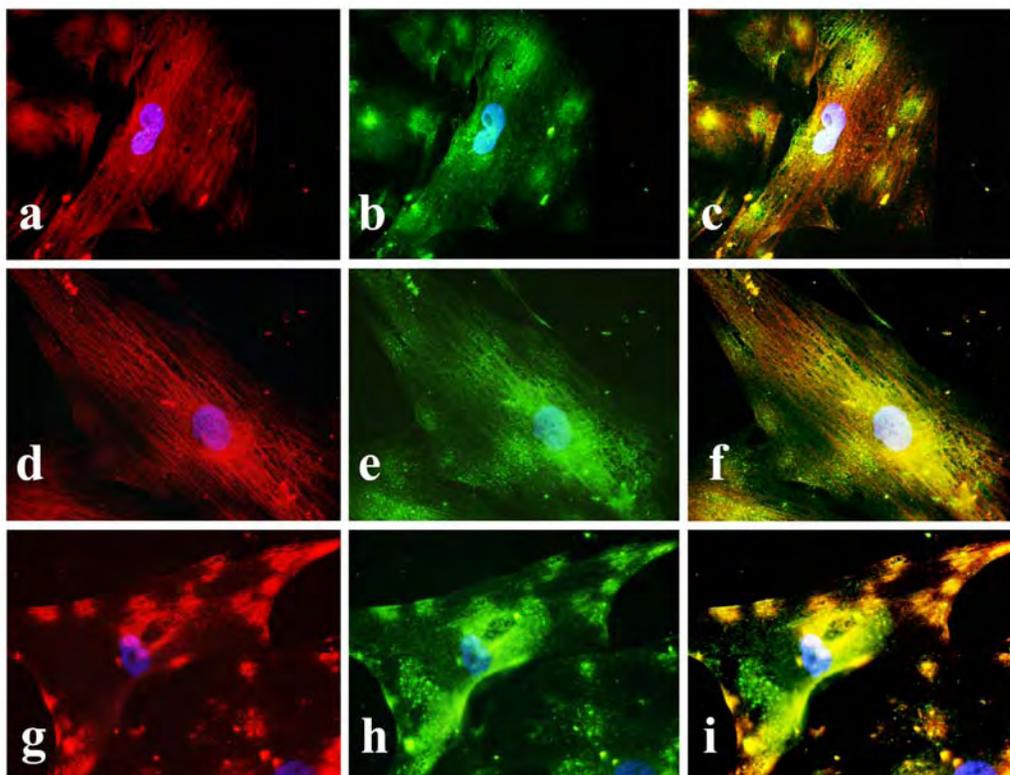


Figura 38. Colocalización en la superficie celular de β -glucuronidasa bovina y AnxA6 en células BGH-1. Las células fueron incubadas con β -glucuronidasa bovina a 4°C para permitir la unión de esta enzima con AnxA6 en la superficie celular y posteriormente se fijaron con paraformaldehído y se incubaron con los anticuerpos primarios en contra de AnxA6 y Rb-301 y finalmente con los anticuerpos secundarios, las imágenes se tomaron con un microscopio Olympus BX51 los anticuerpos en contra de AnxA6 (Clona-73, N-19,Cy-422) se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a Texas red (rojo), mientras que el anticuerpo en contra de β -glucuronidasa(Rb-301), se detecto con un anticuerpo secundario acoplado a FITC (verde) a Clona 73, d N-19, g Cy-422, b,e,h Rb-301, c,f,i imágenes compuestas. Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

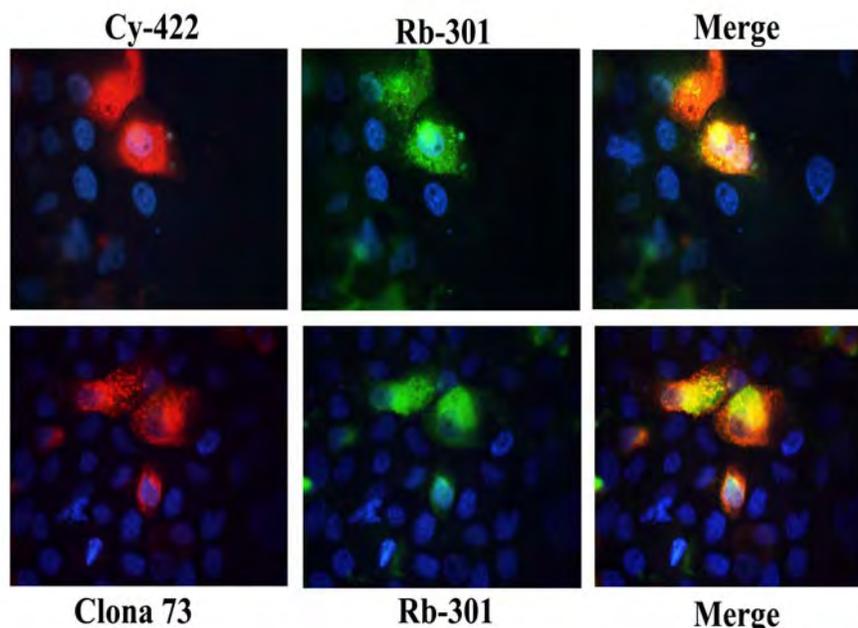


Figura 39. Colocalización en la superficie celular de β -glucuronidasa bovina y AnxA6 en células A431+A6. Las fotografías se tomaron con un microscopio de fluorescencia Olympus BX51. Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

5.20. Inhibición de la endocitosis de β -glucuronidasa bovina por anticuerpos en contra de AnxA6.

Para confirmar que AnxA6 se comporta como un receptor endocítico, independiente de Man6P, se probó la habilidad de los anticuerpos generados en el laboratorio y comerciales en contra de AnxA6 para inhibir la endocitosis de β -glucuronidasa bovina. Los cultivos de fibroblastos fueron incubados 1 hora con los anticuerpos antes de añadir la enzima bovina. Bajo estas condiciones el anticuerpo policlonal en contra de AnxA6 (B01) o anticuerpos generados en el laboratorio fueron capaces de inhibir arriba del 65% de la endocitosis de β -glucuronidasa bovina (figura 39). No encontrándose inhibición cuando se pone como control suero preinmune, el anticuerpo monoclonal Clona-73, o IgGs de conejo en contra del receptor CI-Man6PR (Rb164) a los cultivos. Juntando todos estos resultados sugieren que anticuerpos en contra de AnxA6 se unen a esta proteína, y eliminan su función como receptor endocítico. Las diferencias observadas en la habilidad de cada anticuerpo para eliminar la endocitosis de la enzima bovina implica que cada anticuerpo reconoce epitopos del receptor que no están expuestos en la superficie o no relacionados directamente con el sitio de unión del ligando (González-Noriega, A. y Michalak, C. 2001)

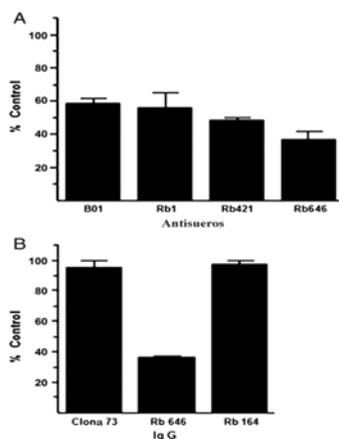


Figura 40. Inhibición de la endocitosis de β -glucuronidasa bovina con anticuerpos en contra de RI-Man6P. A) Antiserosos en contra de AnxA6, los fibroblatos deficientes de β -glucuronidasa fueron preincubados 1 hora a 37°C, con MEM-BES que contiene 24 μ l/ml con suero preimmune de conejo, 24 μ l del anticuerpo B01 (antisero en contra de AnxA6 proteína completa), o el antisero en contra del RI-Man6PR (Rb-1,Rb-421,Rb-646) previo a la adición de 5000U/ml de β -glucuronidasa bovina y 1 mM de Man6P. Después de dos horas a 37°C, la β -glucuronidasa asociada a la célula fue cuantificada. Los niveles de endocitosis se expresaron como porcentaje del control. B) Inmunoglobulinas, para la adición de las IgGs se siguió el mismo protocolo que el de los antiserosos que nos permitió la cuantificación del efecto de las inmunoglobulinas sobre la endocitosis de β -glucuronidasa bovina. Se agragaron 40 μ g/ml del anticuerpo Clona73 y 200 μ g/ml de IgG aislada del anticuerpo Rb-646 (RI-Man6P) o del anticuerpo Rb-164 (CI-Man6PR).

5.21. Colocalización de AnxA6 y β -glucuronidasa bovina en vesículas endocíticas.

Por otro lado también investigamos si la β -glucuronidasa bovina endocitada colocaliza con AnxA6 en vesículas endocíticas. Fibroblastos humanos fueron incubados en la presencia o ausencia de β -glucuronidasa bovina y 5mM de Man6P a 20°C para permitir el lento transporte de la enzima bovina endocitada de endosomas a lisosomas. En este momento, las células fueron fijadas y permeabilizadas con saponina, y la distribución de AnxA6 y la β -glucuronidas endógena fue analizada por microscopia doble inmunofluorescencia (figura 40). La β -glucuronidas endógena y AnxA6 se encuentran localizadas en vesículas diferentes. De hecho, se ha reportado previamente que AnxA6 no se encuentra en vesículas lisosomales (González-Noriega, A., y cols. 2006; Pons, M., y cols. 2001). Sin embargo, en fibroblastos incubados en presencia de β -glucuronidas bovina, se observaron vesículas que contenían ambas proteínas AnxA6 y β -glucuronidas bovina (figura 40), sugiriendo que por lo menos en el primer paso de endocitosis el complejo ligando-receptor se encuentra en las mismas vesículas.(González-Noriega, A., y cols. 2006)

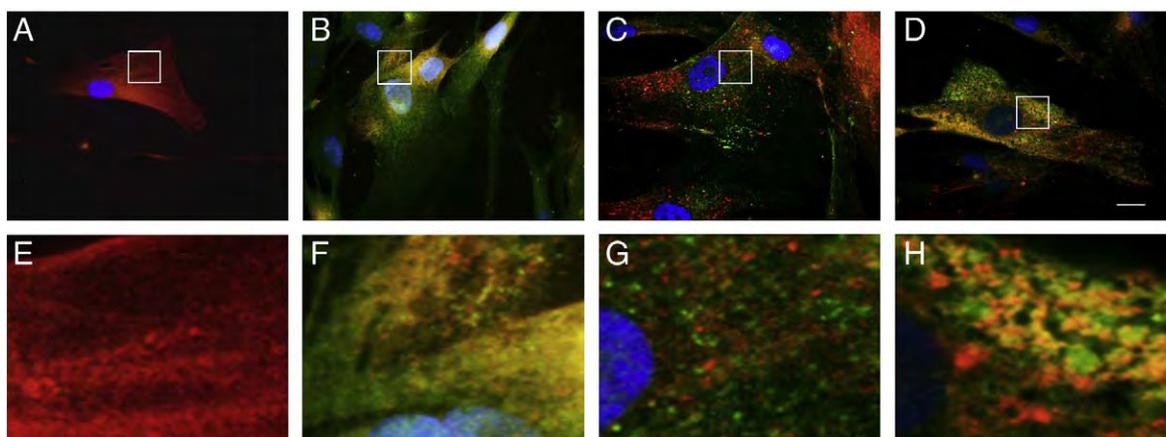


Figura 41. Análisis de inmunofluorescencia de AnxA6 en fibroblastos humanos. Las células se crecieron en cubre objetos y fueron incubados en la presencia (B,D) o ausencia (A,C) de 10,000 U/ml de β -glucuronidasa bovina y 1 mM de Man6P en MEM-BES (pH 6.8-7.0). Después de 2 horas de incubación a 4°C (A,B) o a 20°C (C,D), las células fueron lavadas con 100 mM NaCl/10 mM Ca Cl₂/25mM BES/ 25mM Maleato pH6.8 y fijadas después por 15 min con paraformaldehído al 2%. La incubación con los anticuerpos se realizó en presencia (C,D) o ausencia (A,B) de 0.1% de saponina. En el primer paso, las células fueron incubadas con los anticuerpos contra AnxA6 (Clona 73) y β -glucuronidasa bovina (Rb-301). En el segundo paso, las células fueron lavadas e incubadas con IgG anti-mouse Texas red- horse y anti-rabbit FITC-donkey. Las imágenes superpuestas se muestran a AnxA6 teñida con rojo y en verde la β -glucuronidasa bovina, colocalización se observa en amarillo. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. El recuadro en cada fotografía fue aumentada digitalmente con la ayuda del software Adobe Photoshop (E,F,G,H). Barra es igual a 40 μ m.

Capítulo IV

Discusión

6. Discusión

En el presente trabajo se han presentado resultados que confirman que el receptor independiente de Man6P para la endocitosis de β -glucuronidasa bovina es la proteína soluble AnxA6. Análisis de LC/ESI-MS/MS permitieron identificar que los tres péptidos que se obtienen al purificar este receptor, corresponden a AnxA6. Varios enfoques permitieron corroborar esta hipótesis: Primero, a través de ensayos Far Western Blot se probó la unión específica de β -glucuronidasa bovina y el receptor purificado a partir de hígado bovino, ó de AnxA6 humana recombinante expresada y purificada de *E. coli*. Segundo, a través de ensayos de Western Blot se probó que anticuerpos generados en el laboratorio en contra del RI-Man6P y anticuerpos comerciales en contra de AnxA6 tienen reacción cruzada tanto con el receptor purificado a partir de membranas de hígado bovino, así como con AnxA6 humana recombinante expresada en bacterias. Tercero, se observó un incremento en la endocitosis dependiente de AnxA6 de β -glucuronidasa bovina en dos líneas celulares que expresan establemente AnxA6 por transfección. Finalmente, anticuerpos contra AnxA6 permitieron corroborar la presencia de esta proteína en la superficie de la membrana plasmática, así también bloquean específicamente la endocitosis de β -glucuronidasa bovina dependiente de AnxA6. Estos resultados ponen de manifiesto una función no reportada para AnxA6.

AnxA6 se expresa en todos los tejidos de mamíferos, y tiene una alta concentración en el hígado, músculo, corazón y bazo (Kaetzel, M.A., y cols. 1994; Gerke, V., y Moss, S.E. 2002). AnxA6 es una proteína citosólica que se asocia a la cara interna de la membrana plasmática en presencia de cationes divalentes. Esta unión es reversible debido a la remoción de calcio o la presencia de agentes quelantes tales como EGTA y EDTA que promueven la liberación de la AnxA6 de la matriz de fosfolípidos (Gerke, V., y Moss, S.E. 2002). AnxA6 se encuentra asociada a microdominios membranales que tienen caveolina, estas regiones también son ricas en esfingolípidos y colesterol (Babiychuck, E.B., y Drager, A 2006). Hasta ahora, la AnxA6 ha sido considerada como una proteína multifuncional que ha sido relacionada a: proliferación, diferenciación, inflamación y migración celular. También tiene que ver con mecanismos de endocitosis, exocitosis y transporte de membrana. Aunque AnxA6 es una proteína citoplasmica multifuncional, varios grupos han

mostrado evidencias que AnxA6 también se expresa sobre la superficie de la membrana extracelular donde esta proteína interactúa con varios ligandos extracelulares tales como LRP-1, fetuina, heparina y condroitin sulfato. No obstante que el mecanismo de asociación de AnxA6 al lado externo de la membrana plasmática permanece desconocido, la función de AnxA6 en la superficie celular ha sido ligada a la adhesión y migración celular (Takagi, H., y cols. 2002; Grewal, T., y cols. 2010; Ishitsuka, R., y cols. 1998).

6.1. Isoformas de AnxA6

Considerando que el RI-Man6P es una proteína integral de membrana lo hemos extraído utilizando concentraciones altas de Tritón X-100. Como ya se mencionó anteriormente la presencia de este detergente produce un comportamiento anómalo en su migración en PAGE-SDS. En este trabajo hemos tenido especial cuidado en eliminar el Tritón X-100, desplazándolo con dos detergentes, deoxicolato de sodio y SDS. Debido a que el Tritón X-100 adsorbe a una densidad óptica de 280 nm se monitoreó su pérdida midiendo el eluato a esta longitud de onda. La teórica eliminación de este detergente ha tenido dos efectos: uno poder teñir al RI-Man6P con azul de Coomassie, el otro encontrar que el receptor purificado se resuelve en tres bandas de proteína en lugar de las dos inicialmente reportadas.

Los análisis de LC/ESI-MS/MS confirmaron que las tres proteínas corresponden a AnxA6, en la base de datos esta reportado que existe un solo gen que codifica para esta proteína, también se ha reportado que existe una sola copia de este, por lo tanto, la presencia de estos tres péptidos solo se puede explicar como isoformas de una misma proteína, las cuales presentan diferencias en su peso molecular aparente, en la conformación de la proteína, como se muestra en los ensayos de inmunotransferencia, usando un grupo de anticuerpos en contra de AnxA6, así como su afinidad para unir β -glucuronidasa bovina. Estas diferencias observadas pueden ser debidas a alteraciones en la medida del receptor o debido a las moléculas que no se han removido del péptido de 68 kDa, las cuales pueden inhibir la unión. Tenemos algunos resultados que sugieren que estas isoformas sean debidas a degradaciones que sufre la molécula de 68 kDa en el amino terminal ya que un anticuerpo policlonal (N-19) el cual está dirigido contra los primeros 50

aminoácidos de la Anx6 solo reconoce a la banda de mayor peso molecular y además el hecho que la secuencia amino-terminal de las bandas de 64 y 56 kDa inician en el aminoácido 40 de la secuencia total de la proteína revela dicha hipótesis. Cabe mencionar que se encontró en las tres proteínas el péptido carboxilo terminal completo. Lo cual descarta cortes en el extremo carboxilo terminal de AnxA6. Sin embargo, hay que probar dicha hipótesis.

Estudios preliminares del laboratorio, en donde se purifica parcialmente a AnxA6 a través de protocolos reportados en la literatura, permiten concluir que estas tres isoformas de AnxA6 son reales debido a que estas se pueden separar por peso molecular, hidrofobicidad y carga, fue posible también detectar estas isoformas de AnxA6 con anticuerpos comerciales en contra de AnxA6 reportados previamente.

Por otro lado se sabe que AnxA6 sufre un splicing alternativo pero este no corresponde a los pesos moleculares que nosotros hallamos, tal splicing alternativo lo sufre en el exón 21 de la AnxA6, el cual genera dos isoformas (Anx6-1 y Anx6-2) que varían solo por la secuencia 524-VAAEIL-529 (Langen, R., y cols. 1998; Moss, S.E., Crumpton, M.J. 1990). Recientemente el grupo de Bandorowicz Pikula presenta que Anx6-1 está asociada con endosomas tempranos, y Anx6-2 está asociada con endosomas tardíos. Las propiedades de su traslocación dependiente de calcio y pH entre endosomas tempranos y tardíos fueron diferentes (Moss, S.E., Crumpton, M.J. 1990).

También se han reportado cambios conformacionales de AnxA6, que pudieran explicar la presencia de isoformas de esta proteína, pero más que cambios conformacionales son cambios en la estructura secundaria de la proteína los cuales son inducidos principalmente por una baja en el pH o por interacción con GTP apareciendo estructuras de α hélice capaces de atravesar la membrana plasmática o cambios de estructuras de α hélice a estructuras de laminas β (Golczak, M., y cols. 2001; Kirilenko, A., y cols. 2002). Lo que sugeriría que esta proteína al cambiar de conformación tenga comportamientos diferentes en un corrimiento electroforético el cual observamos en las proteínas que hemos purificado. Sin embargo, esto tiene que corroborarse posteriormente. Hasta el momento lo único que es claro es que existen estas isoformas de AnxA6 las cuales no han sido reportadas

anteriormente y que creemos que no se habían reportado debido a que se han tomado como reconocimientos inespecíficos de algunos anticuerpos en contra de AnxA6, con respecto a lo anterior, algunos autores que trabajan con AnxA6 utilizan anticuerpos en contra de AnxA6 adsorbidos a la proteína de 68 kDa, (Thorin, B., y cols. 1991; Ortega, D., y cols. 1998; Grewal, T., y cols. 2000 Pons, M., y cols. 2001), los cuales ya no serían capaces de reconocer a las isoformas menores, las cuales nosotros estamos reportando. Todos estos trabajos, dejan ver que la presencia de isoformas de AnxA6 es factible, sin embargo se necesita trabajar en la caracterización de dichas isoformas de AnxA6 y encontrar su función dentro de la célula.

6.2. AnxA6 como receptor endocítico.

En este trabajo hemos encontrado que AnxA6 se comporta como un receptor endocítico, por lo cual debe cumplir varios requisitos propios de una proteína integral de membrana; esto es: a) la endocitosis mediada por este receptor putativo debe ser dependiente de tiempo y temperatura, b) alguno de sus dominios deben ser accesibles a anticuerpos añadidos al medio y estos deben inhibir la endocitosis de la β -glucuronidasa bovina, c) debe unirse a su ligando, d) células que no expresan la AnxA6 no deben endocitar a la β -glucuronidasa bovina, e) la sobreexpresión de la AnxA6 debe reflejarse en un incremento de la endocitosis de β -glucuronidasa bovina y f) la β -glucuronidasa cuya endocitosis es mediada por AnxA6 debe ser observada en vesículas endocíticas en que ligando y receptor estén juntos.

A la fecha no es claro como AnxA6 se puede integrar a la membrana para poder realizar esta función debido a su falta de péptido señal y dominios hidrofóbicos suficientemente largos que permitan atravesar la membrana plasmática para anclarse a la membrana plasmática o a la superficie de esta y captar ligandos; sin embargo posee dominios (YXX ϕ) que le permiten interactuar con Adaptina tipo 2 (Creutz, C.E., Snyder, S.L. 2005), lo que es consistente con el posible papel que puede desarrollar esta proteína como un receptor putativo endocítico transmembranal. Sin embargo; esto no se ha podido demostrar debido a que AnxA6 no posee dominios obvios transmembranales que le permitan insertarse a la membrana plasmática. No obstante, ha sido descrito para varias

anexinas un modo alternativo de unión a membranas, en el cuál se altera profundamente la estructura general y ello conlleva a la inserción de la proteína en la bicapa lipídica. El determinante de tal interacción es el pH del medio, de tal manera que a pH bajo, entre 4 y 5, se protonan (de forma reversible) diversos residuos de la proteína, lo cual modifica la conformación e incrementa la hidrofobicidad de las anexinas, apareciendo estructuras alfa hélice continuas y transmembranales.

El entorno lipídico (principalmente fosfolípidos) de la membrana contribuiría a que esta inserción se realizara en condiciones fisiológicas, ante transitorias y moderadas caídas del pH intracelular. Modelos análogos a éste, descritos para la anexina B12, son consistentes en la exposición de amplias zonas hidrofóbicas que, en las formas solubles, se hallan hacia el interior, explicando así mismo las inserciones inducidas a bajo pH observadas en las anexinas Anx5, Anx2 y Anx6. Esta última experimenta, a pH inferior a 6, una disminución en su contenido de α -hélices con la aparición de láminas- β y giros- β , que al insertarse en la membrana hacen que las anexinas son capaces de actuar como canales iónicos (Golczak, M., y cols. 2001a). Un mecanismo similar ha sido descrito, para AnxA6, en donde proponen la inserción de AnxA6 a la bicapa lipídica. Esta interactúa con la membrana de una manera independiente de calcio la cual se comporta como una proteína integral de membrana que es solo solubilizada con Triton X-100 y es resistente a EGTA y parcialmente solubilizada con bicarbonato de sodio. (Bianchi, R., y cols. 1992; Golczak, M., y cols. 2001).

También se sabe que AnxA6 y caveolina interactúan y se ha corroborado que AnxA2 y A6 se encuentran en fracciones caveolares purificadas de diferentes células y tejidos (Calvo, M. y Enrich, C. 2000; Pol, A. y cols., 1997; Foster, L.J. y cols. 2003; Aboulaich, N., y cols. 2004). Por otra parte, se ha encontrado un complejo formado por AnxA2 y caveolina el cual facilita el transporte de colesterol esterificado de la membrana plasmática a membranas internas. (Uittenbogaard, A. y cols. 2002; Smart, E.J. y cols. 2004). Sin embargo, se necesitan realizar estudios para verificar a través de cual intermediario interactúa AnxA6 para endocitar β -glucuronidasa bovina.

Aunque AnxA6 es una proteína citoplasmática, otros grupos han presentado evidencias que AnxA6 también existe en la superficie celular (Tressler, y cols., 1994). Un

número de artículos recientes han reportado que proteínas citoplasmicas pueden ser secretadas al espacio extracelular por un mecanismo desconocido; proteínas citoplasmicas pueden ser también encontradas en la superficie celular como receptores para varias proteínas. Por ejemplo AnxA5 fue identificada como receptor de colagena tipo II la cual usualmente es llamada ancorina CII (Kirsch y Pfaffle, 1992). AnxA2 es el receptor para tenascina C (Chung y Erickson, 1994) y, para plasminógeno y el activador de plasminógeno (Hajjar, y cols., 1994). Así también, se ha reportado que calreticulina, una proteína de unión a calcio expresada principalmente en el RE y en menor proporción en otros compartimentos celulares, puede funcionar como un receptor para trombospondina a pesar de su señal KDEL de retención en el RE está bien demostrado que se encuentra en la superficie celular (Goicoehea, y cols., 2000). Estos reportes soportan la presente noción que AnxA6 existe en la superficie y puede funcionar como receptor para condroitin sulfato, LRP-1, fetuina, heparina entre otras.

A la fecha hay varias hipótesis que explican cómo es que las anexinas pueden llegar a la superficie celular; la primera se han encontrado a diferentes Anexinas (A1, A2, A4, A5 y A6) en la superficie celular y en circulación y se cree que estas son liberadas al medio extracelular por exosomas (van Genderen, H. O. y cols. 2008; Sakwe, A. M., y cols. 2011) y de esta manera interactúan en la superficie con la membrana plasmática y captan a su ligando y promueven la adhesión celular. Por ejemplo, existen varios estudios con AnxA2, donde se ha demostrado que esta proteína es secretada en el ambiente extracelular en ambas formas soluble y unida a membranas (Siever, D. A., y Erickon, H. P. 1997). Aunque la función detallada de AnxA2 extracelular no es totalmente entendida, se ha reportado que interactúa con proteínas de la matriz extracelular y proteasas específicas, para regular la activación de plasminógeno, migración celular y adhesión celular (Tressler, R. J., y cols. 1993; Hajjar, K. A., y Krishnan, S 1999). Además AnxA2, unida a la membrana y la extracelular, pueden jugar papeles significativos en la invasión tumoral y metástasis. En la superficie de células tumorales, el heterotetrámero de AnxA2 interactúa con catepsina B, una cisteína proteasa que es secretada al medio extracelular y juega un papel importante en el desarrollo de tumor e invasión (Poole, A. R., y cols. 1978; Recklies, A. D., y cols.1980). Interacciones de AnxA2 con catepsina B pueden facilitar una cascada proteolítica en la

matriz extracelular, (Mai, J., Waisman, D. M., y Sloane, B. F. 2000). Sin embargo, los mecanismos que regulan el transporte de AnxA2 a través de la membrana celular son desconocidos (Creutz, C.E. 1992).

Avances recientes demuestran que la estimulación con insulina incrementa marcadamente la cantidad de AnxA2 extracelular, sugiriendo un puente entre la señalización del receptor de insulina (IR/IGF-1R) y la secreción de AnxA2, sin embargo, los resultados no son concluyentes (Zhao, W.Q., y cols. 2003). Todas estas hipótesis dejan claro que AnxA6 puede encontrarse en la superficie celular y por ende funcionar como receptor tipo lectina, involucrado en la adhesión y migración celular.

Aunque nuestros resultados sugieren que el receptor endocítico independiente de Man6P para la β -glucuronidasa es la proteína citosólica AnxA6, es necesario definir qué condiciones son las que disparan que AnxA6 se inserte en la membrana plasmática y qué mecanismos permiten a esta proteína comportarse como un receptor endocítico.

Nuestros hallazgos implican que esta proteína, al cambiar su configuración, adquiere una nueva función. Quizás es a través de este tipo de proteínas multifuncionales que podemos conectar más fácilmente fenómenos como la degradación y el recambio de macromoléculas con el crecimiento, la diferenciación y muerte celular. Curiosamente, el CI-Man6PR es una de las pocas proteínas que interactúan con múltiples ligandos, algunos de los cuales son importantes factores regulatorios del crecimiento (Kornfeld, S. 1992). El CI-Man6PR participa en la internalización y degradación lisosomal de IGF-II, un mitógeno que normalmente actúa a través del receptor IGF-I para estimular la proliferación celular (Ellis, M.J. y cols. 1996). El receptor CI-Man6PR es requerido para la activación de TGF- β (Dennis, P.A. y Rifkin, D.B. 1991) un potente inhibidor del crecimiento en muchos tipos celulares. Este receptor también está involucrado en la unión, transporte y activación de enzimas lisosomales sintetizadas de novo, tales como catepsinas (Dahms, N.M. y cols. 1989; Nolan, C.M. y Sly, W.S. 1987), las cuales han sido recientemente implicadas en la inducción de apoptosis (Zang, Y. y cols. 2001). Con base a estas funciones, el CI-Man6PR se ha propuesto que juega papeles principales en la regulación del crecimiento celular y apoptosis (Da Costa, S.A. y cols. 2000)

La existencia de receptores alternativos tales como LIMP II, sortilina y AnxA6 corroboran la existencia de diferentes mecanismos para el transporte de hidrolasas ácidas, estos podrían explicar porqué algunos tejidos de pacientes con la enfermedad de mucopolidosis II no son deficientes de enzimas lisosomales.

Conclusiones

7. Conclusiones

Los resultados que hasta ahora hemos obtenido permiten concluir:

1. El receptor para la endocitosis de β -glucuronidasa bovina independiente de Man6P es Anexina VI.
2. AnxA6 es codificado por un solo gen.
3. En geles de poliacrilamida se resuelve en tres bandas de proteína una mayoritaria de 68 kDa y dos isoformas de 64 y 56 kDa.
4. La AnxA6 une específicamente a la β -glucuronidasa bovina, no todas las isoformas reconocen con la misma afinidad a la β -glucuronidasa bovina.
5. La cinética de asociación de β -glucuronidasa bovina, a 4° y 37° C indica que debe haber una reposición de receptores para mantener la linealidad de endocitosis durante varias horas.
6. La presencia de AnxA6 en la membrana plasmática fue corroborada por métodos inmunocitoquímicos.
7. La AnxA6 recobinante expresada en *E. coli* solo presenta la banda de 68 kDa lo cual sugiere que solo las células eucariotas tienen capacidad de procesar la proteína de 68 kDa y generar las otras dos isoformas.
8. La β -glucuronidasa bovina inmediatamente después de ser endocitada se encuentra en vesículas endocíticas que contienen AnxA6.
9. Las líneas celulares que no expresan a la AnxA6 no endocitan β -glucuronidasa bovina.
10. La sobreexpresión de AnxA6 no necesariamente se traduce en un incremento en la endocitosis de la β -glucuronidasa bovina, ya que su endocitosis no es dependiente de la cantidad de AnxA6 total, sino de la fracción de AnxA6 que se integra a la membrana plasmática.

Anexo I

Las Anexinas

8. Anexo I

Las Anexinas

Las anexinas son proteínas solubles en agua, tienen la capacidad de unirse a calcio y a fosfolípidos (Edwards, H.C., y Crumpton, M. J. 1991). Forman canales de calcio dependientes de voltaje en bicapas lipídicas planares (Pollard, H.B., y Rojas, E. 1988). Brisson y cols., (1991) y Huber y cols. (1992) encontraron que estas proteínas presentan características estructurales y funcionales tanto de proteínas solubles así como de proteínas integrales de membrana. En esta naturaleza dual se refleja su clasificación anfipática (Huber, R., y cols. 1992). Las anexinas pertenecen a una enorme familia de proteínas que está conservada en todos los reinos eucariotas, salvo en hongos.

Propiedades funcionales y estructurales han sido usadas para determinar si una proteína pertenece a la familia de las anexinas. El principal motivo estructural por el cual las anexinas son definidas, es el dominio anexina, que es una secuencia conservada de 70 aminoácidos a través del cual unen calcio (Smith, P.D., y Moss, S.E. 1994).

Estructura de las Anexinas

Las anexinas se caracterizan por poseer una secuencia (motivo) de aproximadamente 70 aminoácidos los cuales se repiten 4 veces en cada uno de los miembros de esta familia excepto en AnxA6, en esta proteína el motivo se repite 8 veces, (figura 39). Estas repeticiones son altamente conservadas, cada una forma una estructura compacta alfa-helicoidal que comprende cinco α -hélices que giran a la derecha formando una estructura de súper hélice. Cuatro dominios son formados con estas estructuras denominados dominios I, II, III y IV, los cuales forman dos módulos simétricos. Un poro hidrofílico se encuentra en el centro de la molécula, formando un canal iónico cargado y formado por residuos conservados. Los sitios de unión a calcio de las anexinas se encuentran en el lado convexo de la molécula de anexina (Voges, E., y cols. 1994). Por otra parte tienen un carboxilo terminal conservado mientras que su extremo amino terminal es variable a través del cual se pueden diferenciar a las anexinas (Rojas, E., y cols. 1990). Las anexinas se han agrupado en tres categorías: 1) 4 repeticiones y amino terminal corto; 2) 4

repeticiones y amino terminal largo; y 3) 8 repeticiones y amino terminal corto, tal es el caso de la AnxA6. (Voges, E., y cols. 1994).

La función de las anexinas no es muy clara, por lo que se ha propuesto que realizan varias funciones que se han determinado gracias a estudios in vitro, por ejemplo: algunos miembros tienen que ver con la inhibición de la fosfolipasa A2 (Russo-Marie, F. 1992), actividad anticoagulante (Funakoshi, T., y cols. 1987), unión a proteínas del citoesqueleto (Ikebuchi, N. W., y Waisman, D. M. 1990), agregaciones de vesículas y membranas (Creutz, C.E. 1981) y actividad de canal iónico (Pollard, H.B., y cols. 1992).

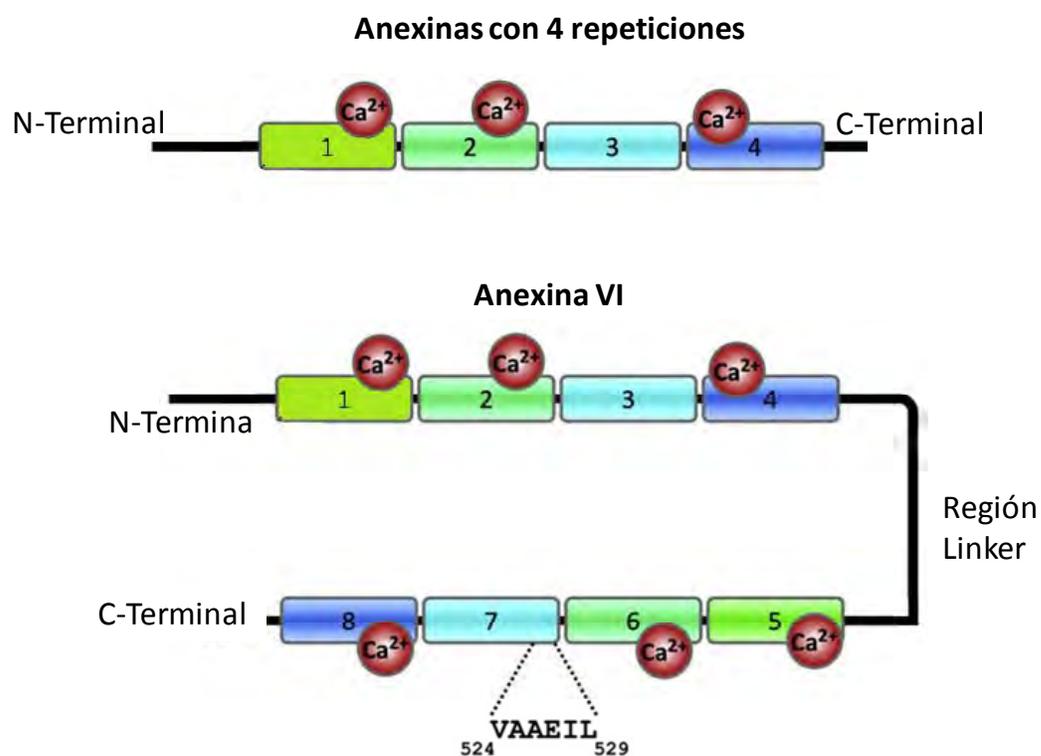


Figura 42. Estructura de las anexinas. En la parte superior de la figura se muestra una anexina con 4 repeticiones del dominio anexina, con algunos probables sitios de unión a calcio. En la parte inferior se muestra la estructura de AnxA6 con 8 repeticiones del dominio anexina, la región “linker” y el “splicing” alternativo que sufre esta proteína. Además de los sitios de unión probables de unión a calcio. Diagrama modificado del artículo de Enrich, C., y cols. 2011.

Generalidades de AnxA6

AnxA6 es una proteína monomérica con un peso molecular de 68-70 kDa, la cual corre como un doblete muy cerrado en geles de poli-acrilamida SDS. Tiene un punto

isoelectrónico de 5.6 a 5.8 y se ha reportado que tiene un sitio de unión para calcio y en la ausencia de fosfolípidos esta unión tiene una constante de disociación de 1.2 μM . Por otra parte se ha reportado que AnxA6 tiene ocho sitios de unión para calcio en la presencia de fosfolípidos lo cual indica la cooperatividad en esta unión de calcio y fosfolípidos por AnxA6.

Existen algunos reportes donde se describe que AnxA6 purificada interactúa directamente con matrices hidrofóbicas sugiriendo que ésta se puede comportar como una proteína integral de membrana o solo interactuar con los fosfolípidos través del calcio. (figura 40) Sin embargo, existen estudios donde se describe que AnxA6 es una proteína de naturaleza hidrofílica en lugar de una proteína anfipática. La asociación de AnxA6 con organelos membranosos u otras matrices hidrofóbicas en presencia de calcio se explica por su habilidad para unirse a ciertos fosfolípidos de una manera dependiente de calcio, una propiedad común de todas las anexinas. AnxA6 se sabe que se une a fosfolípidos ácidos como: fosfatidilserina, fosfatidilinositol y ácido fosfatídico, además de ácidos grasos libres, tales como araquidónico, oleico y palmítico en una baja concentración de calcio.

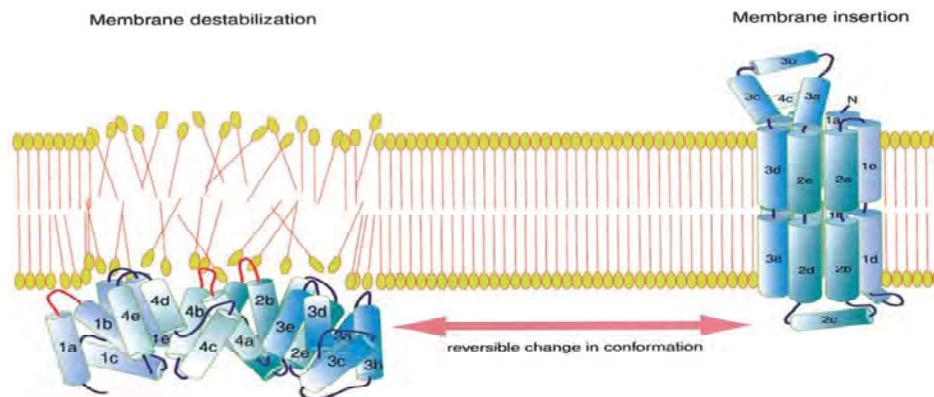


Figura 43. Modelo de unión periférica a membrana e inserción de anexina a la membrana. Dos potenciales interacciones de una molécula monomérica de anexina al lado citoplásmico de una membrana hipotética. En el lado izquierdo se muestra a Anexina unida periféricamente. Se sabe que esta interacción de anexina con la bicapa lipídica incrementa la permeabilidad de la membrana. En la parte derecha se muestra a Anexina insertada en la bicapa lipídica después de la protonación a pH ácido, la desestabilización de la estructura nativa de esta molécula la cual principalmente está plegada en estructuras α -helice las cuales se repliegan generando una configuración de siete segmentos transmembranales. Aunque la estructura propuesta está obligada a orientar los extremos NH_2 y COOH en lados opuestos de la bicapa, la orientación que se presenta en el gráfico es arbitraria. Langen, R., y cols. 1998. Figura tomada de Gerke, V., y Moss, S.E. 2002.

AnxA6 también es capaz de unirse a fosfatidiletanolamina pero no a fosfatidilinositol 4,5-bi fosfato, esfingomielinea o fosfatidilcolina en altas concentraciones

de calcio. Estas características y la inhabilidad de AnxA6 para interactuar con matrices hidrofóbicas en la presencia de calcio libre, sugiere que la proteína interactúa con la cabeza polar del fosfolípido en una manera iónica de la siguiente forma proteína-calcio-fosfolípido. Aunque esta interacción no es absoluta la cabeza polar cargada negativamente, contribuye a la especificidad de unión. Este mecanismo se puede corroborar con evidencias obtenidas por cristalografía de rayos X la cual muestra que AnxA6 forma arreglos regulares de estructura parecida a trisqueliones en la presencia de fosfolípidos.

La AnxA6 presenta dos motivos fosforilables, la Ser 13 y la Thr 356, candidatos a explicar la moderada fosforilación de la proteína inducida por factores de crecimiento (Moss, S.E., y cols. 1992). La Thr 356 se ubica en la región *linker* y al inducir la mutación T356D, que simula la fosforilación de este residuo, se han descrito tanto un incremento de la flexibilidad como cambios en las asas de unión al calcio que conllevan un incremento en la afinidad y una relajación de la estructura (Freye-Minks, C., y cols. 2003). Además, el grado de fosforilación por PKC, que en la molécula nativa es bastante bajo, se incrementa en la mutante T356D, sugiriendo la exposición de nuevos motivos fosforilables. La región *linker*, comprendida entre los residuos 325-363, es además un dominio de interacción proteína-proteína. Es a través de este dominio que la AnxA6 interacciona, entre otras, con la proteína p120GAP (Chow, A., y Gawler, D. 1999), que es una proteína reguladora (activadora de la actividad GTPasa intrínseca) de Ras p21. La actividad de esta proteína es clave para la correcta señalización a través de MAPKs, que regulan la proliferación celular. En concreto, en respuesta a un pico de calcio y a través de su dominio C2, p120GAP se transloca hacia la membrana plasmática donde contribuye a desactivar a Ras (revisado en Cullen, P.J., y Lockyer, P.J. 2002).

La interacción con p120GAP es, además, específica para la AnxA6, ya que ninguna de las otras anexinas, de un solo núcleo, posee la región *linker*. Interesantemente, los cambios conformacionales que modifican la disposición no sólo p120GAP, a través de su dominio C2, es capaz de interactuar con la región *linker* de la AnxA6. Al igual que otras anexinas, como la A1 o la A2 que además son sustratos fosforilables, la Anx6 es capaz de asociarse con isoenzimas de la familia proteína cinasa C (PKC), si bien no actúa como sustrato. Curiosamente, la interacción proteína-proteína que establece la AnxA6 en células de músculo esquelético (Schmitz-Peiffer, C., y cols. 1998), tejido en el que se expresa de

forma abundante (0.2% de la proteína total), no es específica de isoenzima pero sí de la subfamilia de las PKC convencionales, interaccionando al menos con la PKC α - β , las cuáles presentan, al igual que p120GAP, dominios C2 de unión a calcio-dependiente a membranas. (No obstante, no sólo la unión a membranas o las distintas fosforilaciones pueden afectar a la función y estructura de la AnxA6. Bandorowicz-Pikula y colaboradores han demostrado que la AnxA6 puede unirse a los nucleótidos ATP y GTP, con una estequiometría de 1:1, y que dicha unión produce un cambio conformacional sutil (con tan sólo 7-8 residuos afectados) que afecta a su función (Bandorowicz-Pikula, J., y cols. 2003). El modelado molecular sugiere que el nucleótido se une en un sitio ubicado en el centro del “core”, a través de dos motivos de unión idénticos (F-X-X-K-Y-D/EK- S-L) presentes uno en cada tándem de repeticiones (Bandorowicz-Pikula, J., y cols. 2003). Esta unión induce la actuación de la AnxA6 como canal iónico, observada en bicapas lipídicas coplanares, mediante un mecanismo que no conlleva la inserción en la membrana. Es por ello que ha sido postulada la actuación de la AnxA6 como biosensor de GTP (Kirilenko, A., y cols. 2002).

Así, la concentración del nucleótido modularía la asociación a la membrana de la Anx6 pudiendo acoplar, por ejemplo, señalizaciones a partir de GTPasas pequeñas con el metabolismo del calcio u otros iones.

Funcionalidad AnxA6 en el sistema endocítico.

La Anx6 se encuentra ampliamente expresada en tejidos de mamíferos, a excepción de los eritrocitos, aunque se expresa en mayor medida en determinados tipos celulares específicos tales como células endocrinas, hígado, ciertos epitelios ductales, corazón y músculo (Clark, D.M., y cols. 1991).

Su localización subcelular depende del sistema utilizado, aunque básicamente se encuentra en forma soluble y asociada a endosomas. Así, en hepatocitos de rata se encuentra mayormente asociada a endosomas subapicales (o pericanaliculares) positivos para Rab 5 (Ortega, D., y cols. 1998). Fracciones aisladas de este tipo celular revela un gran enriquecimiento de AnxA6 en estructuras de “sorting” (CURL), reciclaje y cuerpos multivesiculares (prelisosomas), y, en menor grado, en cisternas de Golgi, no encontrándose en los lisosomas (Pons, M., y cols. 2000). Similarmente, en células polarizadas WIF-B, utilizadas por su gran similitud con los hepatocitos diferenciados, la

AnxA6 se distribuye en dos poblaciones, una asociada a los pre-lisomas, y otra a las cisternas del aparato de Golgi (Pons, M., y cols. 2001). Mediante fraccionamiento celular de células BHK, se ha observado asociada a endosomas tempranos y tardíos. En células NRK, el patrón observado es principalmente pre-lisosomal.

La AnxA6 fue involucrada en la formación de vesículas recubiertas de clatrina en base a resultados obtenidos *in vitro* en sistemas de membranas aisladas de fibroblastos (Lin, H.C., y cols. 1992). Dicha implicación no pudo ser demostrada, sino más bien contradicha, en sistemas *in-vivo*. Así, en células A431, que carecen de AnxA6, la endocitosis mediada por vesículas de clatrina tiene lugar con normalidad y la sobreexpresión de AnxA6 no revierte la inhibición inducida por la carencia de citosol, el cual contiene otros factores necesarios que se translocan a la membrana en respuesta a un incremento de calcio intracelular (Smythe, E., y cols. 1994).

Ambos resultados, aparentemente contradictorios, fueron integrados por Anderson et al. Al describir, tanto en sistemas *in-vivo* como *in-vitro*, la formación alternativa de vesículas de clatrina a partir de microdominios que carecen de espectrina y de forma independiente de AnxA6 (Kamal, A., y cols. 1998). En cambio, la formación de vesículas de clatrina convencionales, en dominios que sí contienen espectrina, requiere de la previa disociación de este citoesqueleto cortical y es en este proceso donde la AnxA6 se revela imprescindible. Así, la anexina induce una reorganización del citoesqueleto de espectrina a través de su unión a ésta, que es entonces susceptible a la acción de la proteasa calpaina-I que disocia el complejo de membrana y citoesqueleto. No obstante, las vesículas de clatrina formadas de una manera independiente de AnxA6, y por lo tanto a partir de zonas libres de espectrina, no son capaces de transportar el ligando internalizado (en este caso las LDL) hasta el compartimento endocítico tardío, permaneciendo dispersas en la periferia de la célula. Para explicar este hecho se postula un requerimiento de espectrina recubriendo a las vesículas con el fin de permitir el acoplamiento al citoesqueleto de microtúbulos, necesarios para el transporte hacia los endosomas tardíos, a través de adaptadores como la dinactina. La AnxA6 se redistribuye hacia el compartimento endocítico tardío en paralelo a la internalización de LDL (Grewal, T., y cols. 2000) y es necesaria además para el correcto tráfico de las LDL hacia la degradación en los lisosomas. En células NRK microinyectadas con un mutante de la AnxA6 que carece de las seis últimas repeticiones las LDL son

deficientemente degradadas con respecto a las células microinyectadas con la anexina silvestre, acumulándose en endosomas tardíos aberrantes (Pons, M., y cols. 2001), e indicando la importancia del núcleo C-terminal en el proceso. Similares resultados sobre dicha degradación se obtienen en células CHO, que presentan muy bajas cantidades de anexina endógena, transfectadas con la forma silvestre o mutante de la anexina. Se ha observado, además, la asociación de espectrina y anexina en los endosomas tardíos de células NRK, y cómo el tratamiento con inhibidores de la calpaína conllevan el mismo efecto sobre la degradación de LDL.

Todo ello demuestra que el mecanismo promovido por la AnxA6, en la escisión de vesículas recubiertas de clatrina en la membrana plasmática, tiene lugar también en los endosomas tardíos, y que en este proceso la AnxA6 es así mismo necesaria. Además, explica los resultados de Kamal y colaboradores, en los que describen una deficiente degradación de las LDL internalizadas en vesículas de clatrina carentes de espectrina y de forma independiente de AnxA6.

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/yexcr

Research Article

Annexin VI is a mannose-6-phosphate-independent endocytic receptor for bovine β -glucuronidase

Alberto Ramírez-Mata^a, Colette Michalak^a, Guillermo Mendoza-Hernández^b,
Alfonso León-Del-Río^c, Alfonso González-Noriega^{a,*}

^aDepartment of Cell Biology and Physiology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, D.F. 04510, Mexico

^bDepartment of Biochemistry, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, D.F. 04510, Mexico

^cDepartment of Molecular Biology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, D.F. 04510, Mexico

ARTICLE INFORMATION

Article Chronology:

Received 29 April 2011

Revised version received 25 May 2011

Accepted 26 May 2011

Available online 6 June 2011

Keywords:

Receptor-mediated endocytosis

Annexin VI

β -glucuronidase

Mannose 6-phosphate-independent endocytosis

ABSTRACT

Endocytosis and transport of bovine liver β -glucuronidase to lysosomes in human fibroblasts are mediated by two receptors: the well-characterized cation-independent mannose 6-phosphate receptor (IGF-II/Man6PR) and an IGF-II/Man6PR-independent receptor, which recognizes a Ser-Trp^{*}-Ser sequence present on the ligand. The latter receptor was detergent extracted from bovine liver membranes and purified. LC/ESI-MS/MS analysis revealed that this endocytic receptor was annexin VI (AnxA6). Several approaches were used to confirm this finding. First, the binding of bovine β -glucuronidase to the purified receptor from bovine liver membranes and His-tagged recombinant human AnxA6 protein was confirmed using ligand-blotting assays. Second, western blot analysis using antibodies raised against IGF-II/Man6PR-independent receptor as well as commercial antibodies against AnxA6 confirmed that the receptor and AnxA6 were indeed the same protein. Third, double immunofluorescence experiments in human fibroblasts confirmed a complete colocalization of the bovine β -glucuronidase and the AnxA6 receptor on the plasma membrane. Lastly, two cell lines were stably transfected with a plasmid containing the cDNA for human AnxA6. In both transfected cell lines, an increase in cell surface AnxA6 and in mannose 6-phosphate-independent endocytosis of bovine β -glucuronidase was detected. These results indicate that AnxA6 is a novel receptor that mediates the endocytosis of the bovine β -glucuronidase.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The majority of acid hydrolases in fibroblasts from patients affected with mucopolidosis II cannot be targeted to lysosomes and are anomalously secreted into the extracellular medium. The underlying

genetic defect responsible for this lysosomal storage disease is a deficiency in N-acetyl glucosamine 1-phosphotransferase activity. As a result, specific mannose residues in acid hydrolases are not transformed into mannose 6-phosphate (Man6P), an essential recognition marker of protein trafficking to lysosomes [1,2]. In

* Corresponding author at: Department of Cell Biology and Physiology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Lab B042, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria P.O. Box 70228, Mexico, D.F., 04510. Fax: +52 55 56229198.

E-mail address: gonor@biomedicas.unam.mx (A. González-Noriega).

Abbreviations: AnxA6, annexin VI; Man6P, mannose 6-phosphate; TGN, trans-Golgi network; IGF-II/Man6PR, cation-independent Man6P receptors; CD-Man6PR, cation-dependent Man6P receptors; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; MEM, minimum essential media.

normal cells, proteins possessing this marker are recognized in the Trans-Golgi network (TGN) by cation-independent Man6P receptors (IGF-II/Man6PR) and cation-dependent Man6P receptors (CD-Man6PR). These receptors mediate the segregation of lysosomal enzymes from secretory proteins and ensure their delivery to the endosomal compartment, where the receptors release their ligands and return to the Golgi apparatus [3,4].

Normal levels of acid phosphatase and β -glucocerebrosidase in mucopolidosis II fibroblasts and approximately normal levels of most acid hydrolases in hepatocytes, Kupffer cells, and leukocytes have led to the hypothesis that alternative mechanisms of lysosomal enzyme targeting must exist [5,6]. In fact, both lysosomal acid phosphatase and β -glucocerebrosidase lack the Man6P marker. This acid phosphatase is transported to lysosomes as an integral protein with the lysosomal targeting signal contained in the cytoplasmic tail [7]. β -glucocerebrosidase is transported as a membrane-associated protein, and the lysosomal integral membrane protein LIMP-2 acts as a receptor for its lysosomal targeting. This acid hydrolase binds to LIMP-2 in the endoplasmic reticulum or the Golgi apparatus, and the entire complex is transported to the lysosomal compartment [8]. Alternatively, several other lysosomal soluble proteins are targeted to lysosomes through a hybrid mechanism mediated by Man6PRs and by Man6P-independent receptors. One of these receptors, sortilin, has been described as a multifunctional receptor that cycles between the TGN and the endosomal compartment. Sortilin has been implicated in IGF-II/Man6PR-independent transport of non-enzymatic sphingolipid activator proteins, acid sphingomyelinase, neurotensin, prosaposin, and potentially cathepsin H and D [9].

We have previously described another hybrid transport system in which the endocytosis and transport of bovine liver β -glucuronidase to lysosomes in human fibroblasts is mediated by the IGF-II/Man6PR and a new Man6P-independent receptor that recognizes a Ser-Trp^{*}-Ser sequence in the enzyme (Trp^{*} is a tryptophan-substitute) [10,11]. Initially, Neufeld et al. [12] reported that receptor mediated pinocytosis of bovine β -glucuronidase is the first step for the enzyme replacement therapy in β -glucuronidase deficient fibroblasts, and subsequently, Hieber et al. reported that bovine β -glucuronidase was taken up by human fibroblasts by an adsorptive mechanism where Man6P was not required [13]. Endocytosis of β -glucuronidase by the IGF-II/Man6PR-independent receptor is not inhibited by Man6P, by antibodies against IGF-II/Man6PR, or by amines [10]. The acid hydrolase taken up by the newly proposed receptor is targeted to lysosomes through endosomes that do not contain IGF-II/Man6PR, where it is able to degrade accumulated glycosaminoglycans [10,14]. Purification of the IGF-II/Man6PR-independent receptor allowed us to show that this receptor is enriched in vesicles that are denser than lysosomes and in endosomal vesicles lacking IGF-II/Man6PR [14–16]. In this paper, LC/ESI-MS/MS analysis revealed that this Man6P-independent receptor is AnxA6. The human AnxA6 cDNA was cloned, and His-tagged recombinant human AnxA6 protein was purified. Ligand-blotting assays and immunodetection analysis using a panel of antisera against AnxA6 confirmed that the newly proposed receptor and AnxA6 are the same protein. Endocytosis and double immunofluorescence experiments in human fibroblasts and in two cell lines stably transfected with a plasmid containing the cDNA for the human AnxA6 confirmed that this protein behaves as a mannose

6-phosphate-independent endocytic receptor for bovine β -glucuronidase.

Material and methods

Reagents

The majority of reagents were obtained from Sigma Chemical Co (St Louis, Mo). Fetal calf serum was supplied by Grand Island Biological Co. (Grand Island, NY). The anti-human AnxA6 mouse monoclonal antibody (Clone 73) was purchased from BD Transduction Laboratories (San Diego, CA, USA), the anti-human AnxA6 mouse polyclonal antibody (B01) was from Abnova Corporation (Taipei, Taiwan) and the rabbit antisera against the amino terminal of AnxA6 (N19) were from Santa Cruz Biotech Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Rabbit antisera Rb421, Rb1 and Rb646 against the IGF-II/Man6PR-independent receptor of bovine β -glucuronidase, Rb164 against bovine IGF-II/Man6PR, Rb301 against mouse preputial β -glucuronidase, and Rb5 against the Ser-Trp^{*}-Ser recognition marker present in bovine β -glucuronidase were generated in the laboratory [11,14–16].

Cell culture

The human β -glucuronidase-deficient fibroblast cell line (BGH1) was generated in our laboratory, while the human epithelial A431 cell line and mouse L cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA. Cells were maintained as monolayers in α -MEM, supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 1 mM sodium pyruvate, 5 mM glutamine and 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin sulfate.

Enzyme preparation

Human β -glucuronidase was purified from HeLa cell secretions. The medium was filtered and concentrated by ultrafiltration using a YM-100 membrane filter (Amicon Corp., Scientific Systems Div., and Lexington, Mass.). The sample was precipitated with ammonium sulfate, and β -glucuronidase was adsorbed on a column of anti-rat preputial gland β -glucuronidase as previously described [10]. Bovine liver β -glucuronidase was purified by ammonium sulfate precipitation and ethanol fractionation, and then it was adsorbed on a column of anti-rat preputial gland β -glucuronidase as previously described [10]. Rat preputial gland β -glucuronidase was purified by the method described in Himeno et al. [17]. β -glucuronidase activity was determined fluorometrically using 10 mM 4-methyl-umbelliferyl-D-glucuronide as a substrate in 0.1 M acetate buffer (pH 4.8) and 1 mg/ml BSA as previously described [10].

Receptor purification from bovine liver membranes

The receptor was purified using a protocol previously described with minor modifications [15]. Bovine liver tissue (500 g) was homogenized in a buffer containing 70 mM acetic acid and 1 mM EDTA (pH 5.0). Membranes were pelleted by centrifugation (15,000 g for 30 min) and washed in 100 mM sodium carbonate (pH 8.5) to remove peripheral proteins. The washed membranes

were extracted twice with 20 mM Tris–HCl (pH 7.0)/0.4 M KCl/2% Triton X-100/0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) while being stirred overnight at 4 °C. The recovered supernatant was pooled and adjusted with 10 mM CaCl₂, MgCl₂, and MnCl₂. The sample was then adsorbed on a column of bovine β-glucuronidase-Sepharose-4B beads. After washing the beads, the bound protein was eluted with 5 mM EDTA. The eluate was adjusted to a final concentration of 10 mM divalent cations and loaded onto a column that contained the recognition marker peptide Ser-Trp*-Ser coupled to Sepharose-4B. The protein that bound was eluted with EDTA, precipitated with deoxycholate-trichloroacetic acid and then washed with acetone. The protein was solubilized with 16 mM Tris–HCl (pH 8.0) containing 0.2% SDS, concentrated and dialyzed extensively with the same buffer in a Vivaspin 2 (10,000 MWCO) centrifugal concentrator (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany).

Endocytosis measurements

Confluent cells were incubated in α-MEM (without sodium bicarbonate) containing 1 mg/ml of bovine serum albumin, 0.025 M BES (MEM-BES) (pH 6.8–7.0) and β-glucuronidase. After 2 h incubation at 37 °C, the cells were washed with PBS and lysed with 0.25% deoxycholate. The lysates were assayed for β-glucuronidase activity, and cell protein concentration was determined. The results are expressed as units of enzyme internalized per milligram of protein per hour [10]. The values shown represent the average of assays performed on triplicate 35-mm dishes of cells. The results presented here are typical of those obtained in three independent experiments.

Western blot analysis and binding assays

Samples were incubated with SDS-PAGE loading buffer under reducing conditions for 2 h at 25 °C. The same amount of protein was loaded into each gel lane. Proteins were resolved by 8% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) as previously described [14]. For receptor identification, the membranes were blocked, incubated with antibodies generated in the laboratory against the IGF-II/Man6P-independent receptor for bovine β-glucuronidase endocytosis or commercial antibodies against AnxA6, incubated with secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (Zymed Laboratories Inc. South San Francisco, Ca, USA) and finally developed with 4-chloro-1-naphthol [15]. For the β-glucuronidase binding assays, the blots were incubated with 10,000 U of human or bovine β-glucuronidase in the presence or absence of divalent cations. Bound enzyme was incubated with rabbit antiserum against preputial rat β-glucuronidase (Rb 301) and anti-rabbit IgG-HRP antibody. The blots were developed with 4-chloro-1-naphthol [16]. Protein was stained with Coomassie PhastGel™ Blue (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden).

Tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS)

Protein bands were excised from the Coomassie-stained SDS gel, de-stained, reduced, carbamidomethylated, and digested with modified porcine trypsin (Promega, Madison, WI). Peptide mass spectrometric analysis was carried out using a 3200 Q TRAP hybrid tandem mass spectrometer (Applied Biosystems/MDS Sciex,

Concord, ON, Canada), which was equipped with a nanoelectrospray ion source (NanoSpray II) and a MicroIonSpray II head as previously described in Xolalpa et al. [18]. The instrument was coupled on line to a nanoAcquity Ultra Performance LC system supplied by Waters México (Waters Corporations, Milford, MA, USA). Briefly, spectra were acquired in an automated mode using Information Dependent Acquisition (IDA). Precursor ions were selected in Q1 using enhanced MS mode (EMS) as the survey scan. After the EMS scan, an enhanced resolution scan (ER) of the three most intense ions at the low speed of 250 amu/s was performed to determine the ion charge states, and then an enhanced product ion scan (EPI) was performed. The precursor ions were fragmented by collisionally activated dissociation (CAD) in the Q2 collision cell. The fragment ions generated were captured and mass analyzed in the Q3 linear ion trap. Database searches and protein identification were performed from the MS/MS spectra using the Mascot Software (<http://www.matrixscience.com>). The searches were conducted using the mammalian subset of the National Center for Biotechnology Information non-redundant database (NCBI nr, <http://www.ncbi.nih.gov>). Trypsin was used as the specific protease, and one missed cleavage was allowed with tolerances of 0.5 Da and 0.3 Da for the precursor and for the fragment ion masses, respectively. Analyses were performed with samples from three independent receptor purifications.

Construction and preparation of AnxA6 cDNA

Full-length human AnxA6 was prepared as previously described by Takagi et al. [19]. The cDNA was obtained by RT-PCR using the sequence data [20]. Total cellular RNA was isolated from HepG2 cells using TRIzol (Invitrogen, Löhne, Germany). The first strand of cDNA was prepared using the SuperScript II Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen). A human AnxA6 PCR fragment was amplified using Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen), and the following primers were utilized: forward A6F 5' GGCGCTAGCTGCGTCCGTCGCGACCCGA G 3' (containing a *NheI* restriction site to facilitate subcloning, underlined); reverse A6R 5' CATGCGCCGCGCGTTTCTAAGCTCCACTGAAG 3' (containing a *NotI* site, underlined). The full-length cDNA was directionally inserted into the *NheI* and *NotI* sites of pIRESneo3 (Clontech Lab Inc., USA). This plasmid permits the AnxA6 gene and the selection marker to be translated from a single mRNA.

Preparation of recombinant AnxA6

Human recombinant AnxA6 was expressed as a His-fusion protein. The sequence encoding human AnxA6 was cloned into the pQE31 expression vector (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) using the following primers: forward 5'-GGCGTCGACATGGCCAAACCAGCACAGGGT-3' and reverse 5'-CGCAAGCTTCTAGCTCTCACCACCACAGAG-3'. These primers generated 5' *SalI* and 3' *HindIII* sites at the ends. His-AnxA6 was expressed in the *Escherichia coli* strain XL1-Blue. After induction with IPTG, the protein was adsorbed on a Ni-NTA agarose (Qiagen) column and eluted with 250 mM imidazole.

Cell transfection and selection of transfectants

Mouse L cells and A431 cells were transfected with 10 μg of pIRESneoAnxA6 or with the parental vector pIRESneo3 by the FUGENE 6 Transfection Reagent procedure (Roche Diagnostics,

Mannheim, Germany). After 24 h, the cultures were split into 35 mm Petri dishes and maintained in media containing 400 µg/ml geneticin (Sigma, St Luis Mo, USA). After transfection, the geneticin-resistant cells were examined for expression of AnxA6 by western blotting, immunofluorescence, and endocytosis of bovine β-glucuronidase.

Indirect immunofluorescence microscopy

The cells grown on cover slips were incubated in the presence or absence of 10,000 U/ml of bovine β-glucuronidase and 1 mM Man6P in MEM-BES (pH 6.8–7.0). After 2 h incubation at 4 °C or at 37 °C, the cells were washed with 100 mM NaCl/10 mM CaCl₂/25 mM BES/25 mM maleate pH 6.8 and were fixed for 15 min with 2% paraformaldehyde. Incubation with antibodies was carried out in the presence or absence of 0.1% saponin. In the first step, cells were incubated with clone 73 and Rb301. In the second step, the cells were rinsed and incubated with Texas red-horse IgG anti-mouse (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) and FITC-donkey anti rabbit (Jackson ImmunoResearch Labs Inc., West Grove, PA, USA). The cover slips were mounted in Mowiol (Calbiochem, San Diego, CA, USA), and the slides were examined using an Olympus BX51 microscope (Tokyo, Japan) equipped for epifluorescence with an UPlanAPO 100× objective [14,16].

Results

Purification and characterization of the IGF-II/Man6PR-independent receptor for bovine β-glucuronidase endocytosis

Although the β-glucuronidase from several mammalian species are taken up by human fibroblasts by IGF-II/Man6PR and Man6P-independent receptors we have chosen as model enzyme the bovine β-glucuronidase (González-Noriega A, unpublished observations). Previously, we reported that adsorptive endocytosis of bovine β-glucuronidase by human fibroblasts is mediated by the IGF-II/Man6PR and by a Man6P-independent receptor [10]. As illustrated in Table 1, 1 mM of Man6P inhibited the endocytosis of bovine β-glucuronidase by 14% in human fibroblasts; however, the same concentration of this sugar completely impaired the endocytosis of human β-glucuronidase. In contrast, rabbit antise-

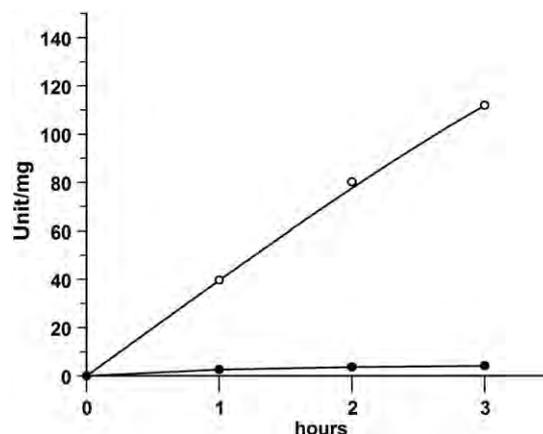


Fig. 1 – Time-course of bovine β-glucuronidase internalization. Human β-glucuronidase-deficient fibroblasts were incubated at 37 °C (○) or at 4 °C (●) with 10,000 U of bovine β-glucuronidase and 1 mM Man6P in 1 ml of MEM-BES medium. After the indicated times, dishes were chilled, rinsed, lysed, and measured for cell-associated enzyme.

rum (Rb5) raised against the Ser-Trp^{*}-Ser recognition marker present in bovine acid hydrolases was only able to inhibit endocytosis of the bovine enzyme [11]. Fig. 1 shows a time-course of the Man6P-independent association of bovine β-glucuronidase with human fibroblasts at either 4 °C (cell surface binding) or 37 °C (binding and internalization). The rate of cell assimilation was higher at 37 °C than at 4 °C and was linear for at least 3 h. Cycloheximide had no effect on the rate of endocytosis for the first 3 h (data not shown), suggesting that there is an internal pool IGF-II/Man6PR-independent receptors that can replace those that are internalized or that cell-surface receptors can be reutilized after internalization [21].

Since liver membranes were used in our initial studies demonstrating the existence of the IGF-II/Man6PR-independent receptor, the same source was employed here for receptor purification. Bovine liver was homogenized in acid conditions in the presence of EDTA, membranes were then incubated with 100 mM sodium carbonate (pH 8.5) to wash out peripheral proteins, and proteins were extracted with 2% Triton X-100. The IGF-II/Man6PR-independent endocytic receptor was purified by affinity chromatography on a bovine β-glucuronidase-sepharose column and on a Ser-Trp^{*}-Ser-sepharose column [15]. Eluted protein was concentrated by trichloroacetic acid precipitation in the presence of deoxycholate and dialyzed against 16 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 0.2% SDS. The isolated receptor was resolved into two bands by SDS-PAGE, and protein staining using Coomassie brilliant blue did not lead to the detection of any bands; however, poor staining was obtained using silver nitrate [15]. The last step was modified in that for dialysis, we used a Vivaspin2 centrifugal concentrator (10,000 MWCO) instead of cellophane bags. Extensive dialysis in the Vivaspin concentrator apparently removed material carried in the Triton X-100 micelles that was not taken away by dialysis with cellophane bags. As result, it was now possible to visualize the isolated receptor by Coomassie brilliant blue stain revealing the staining of a third band (Fig. 2A), as opposed to the two bands previously reported [15]. As shown in Fig. 2A, a major protein band migrated at an apparent molecular

Table 1 – Effect of inhibitors on the endocytosis of β-glucuronidase by human fibroblasts.^a

Antibody	Volume	Additions	β-glucuronidase endocytosis U/mg/h	
			Human	Bovine
Pre-immune	100 µl	–	52.7 ± 2.2	42.7 ± 0.1
Pre-immune	100 µl	1 mM	1.1 ± 0.2	36.9 ± 0.2
Rb5	100 µl	–	49.3 ± 1.0	22.0 ± 0.6
Rb5	150 µl	–	50.2 ± 2.3	16.8 ± 0.1

^a Confluent fibroblast monolayers were incubated for 2 h at 37 °C with 2500 EU/ml of human or bovine β-glucuronidase in the presence or absence of serum against the Ser-Trp^{*}-Ser recognition marker (Rb5) and Man6P.

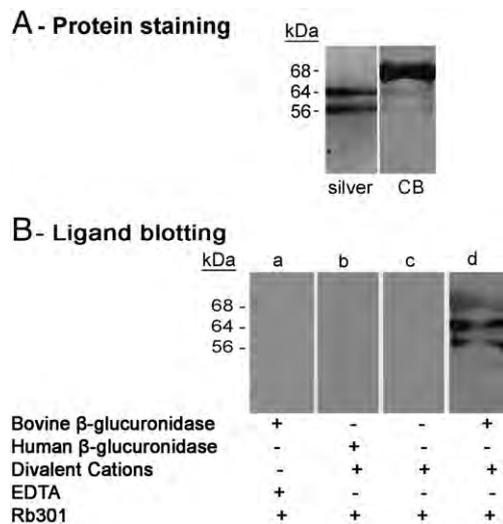


Fig. 2 – Binding of bovine β -glucuronidase to purified IGF-II/Man6PR-independent receptor from bovine liver membrane. A. Protein staining. The purified receptor (5 μ g) was analyzed by SDS-PAGE and stained by a silver stain procedure before dialysis or with Coomassie blue after dialysis in a Vivaspin concentrator. B. Ligand blotting. The purified receptor (5 μ g) after dialysis in a Vivaspin concentrator was resolved by SDS-PAGE, transferred onto a nitrocellulose membrane and incubated in the presence (+) or absence (–) of 10,000 U/ml of bovine or human β -glucuronidase and divalent cations. Bound β -glucuronidase was detected as described under experimental procedures.

weight of 68 kDa, with two fainter bands migrating at 64 and 56 kDa. To confirm that the peptides resolved by SDS-PAGE specifically recognized bovine β -glucuronidase, they were transferred to a nitrocellulose membrane and were incubated with human or bovine β -glucuronidase in the presence or absence of divalent cations. As shown in Fig. 2B, bovine β -glucuronidase preferentially bound to the 64 and 56 kDa peptides as well as the 68 kDa peptide, albeit with less intensity. As expected, the binding of bovine β -glucuronidase required the presence of divalent cations, and no interaction of the receptor with human hydrolase was detected [11]. Differences observed in this ligand-blotting assay may be due to alterations in the receptor size or due to the molecules not yet removed from the 68 kDa peptide, which may impair binding.

AnxA6 is an IGF-II/Man6PR-independent binding protein for bovine β -glucuronidase

To identify the three proteins obtained by receptor purification, each band was excised from the Coomassie-stained SDS gel, digested with a modified form of porcine trypsin, and prepared for LC/ESI-MS/MS analysis. Amino acid sequences of the peptides obtained from each one of the three bands corresponded to AnxA6. As shown in Table 2, the polypeptides analyzed covered between 35% and 42% of bovine AnxA6 and had a MOWSE score higher than 1400. These bands were apparently homogeneous, since only small amounts of keratin but not any other protein were detected. Edman degradation analysis of the three peptides was unsuccessful, suggesting that the N-terminal residues were blocked. However, internal sequences were obtained from the three trypsin-digested protein bands and the peptides that were most proximal to the N-terminus initiated at residue 16 for the 68 kDa band (DFPDFNPSQDAETLYNAMKGF) and residue 41 for the 64/56 kDa protein bands (EAILELITSR) of AnxA6.

Western blot analysis confirmed that the IGF-II/Man6PR-independent endocytic receptor is AnxA6. As shown in Fig. 3, the purified receptor was recognized by commercial antibodies against AnxA6 and antisera raised by our group against the IGF-II/Man6PR-independent endocytic receptor suggesting identity of the two antigens. Although the variation in protein size and an apparent different ligand binding ability could suggest the existence of 3 AnxA6 isoforms, it is not possible to disregard the possibility that they represent changes in the conformation of the protein triggered by detergent extraction or proteolytic products generated during protein purification. Differences in the western blotting assay imply that each antibody recognizes different epitopes in the receptor. In fact, the N-19 polyclonal antibody, raised against an amino terminal sequence, only reacted with the 68 kDa band, suggesting that the receptor may have been cleaved at the amino terminus. Consequently, this epitope was not present in the 64/56 bands. Clone 73 is a monoclonal antibody directed to the middle region of AnxA6. Rb1 and Rb421 antisera were raised against the native receptor following different immunization protocols [12–14].

Differences in the DNA sequences of bovine and human AnxA6 are less than 6%; therefore, the full-length cDNA from human HepG2 cells was cloned and used to further confirm that AnxA6 is the Man6P-independent receptor that mediates the uptake of acid hydrolases. His-tagged recombinant human AnxA6 protein was expressed in the *E. coli* XL1-Blue strain and was purified by Ni-NTA-agarose chromatography. As shown in Fig. 4A, the purified recombinant human AnxA6 migrated as a single band that was able to specifically recognize bovine β -glucuronidase in the

Table 2 – Identification of the receptor for IGF-II/Man6PR-independent endocytosis of β -glucuronidase by LC/ESI-MS/MS.

MW(kDa) observed ^a	Protein name	NCBI accession no.	Nominal mass	No. of matched peptides	MOWSE score	Sequence coverage (%)
68	Annexin A6	gi/157151716	76.202	17	1404	38
64	Annexin A6	gi/157151716	76.202	18	1461	42
56	Annexin A6	gi/157151716	76.202	17	1429	36

^a Proteins resolved in Fig. 2 were analyzed by LC/ESI-MS/MS.

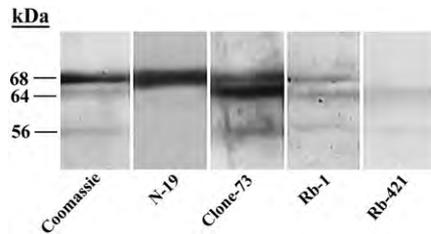
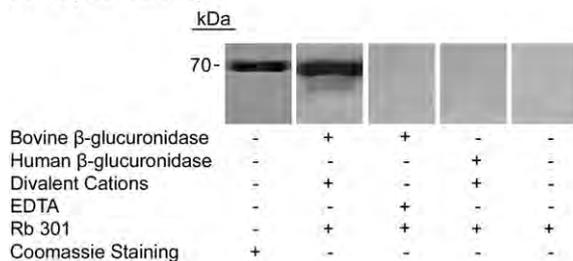


Fig. 3 – Western blot analysis of purified IGF-II/Man6P-independent receptor. After electrophoresis, the receptor (5 μ g) was transferred onto nitrocellulose membranes and incubated in the presence of anti-AnxA6 clone 73, anti-receptor Rb1, N-19, or anti-Rb421 antibodies. Bound antibodies were detected with HRP-secondary antibodies followed by chloronaphthol staining. Transferred protein was PhastGel™ Blue stained.

presence of divalent cations. In addition, the recombinant human AnxA6 was recognized by antibodies obtained in our laboratory against the endocytic receptor and by a commercial antibody against AnxA6 confirming the identity of both proteins (Fig. 4B).

A - Ligand blotting



B - Western Blot

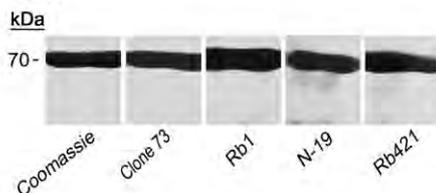


Fig. 4 – Analysis of purified His-tagged human AnxA6 recombinant protein. A. Ligand blotting. The purified receptor (1.8 μ g) was analyzed by SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. Transferred protein was stained with PhastGel™ Blue. Nitrocellulose membranes were incubated in the presence (+) or absence (-) of 10,000 U/ml of bovine or human β -glucuronidase and divalent cations. Bound β -glucuronidase was detected as described in the [Material and methods](#) section. B. Western blot analysis of AnxA6 recombinant protein. The polyacrylamide gel was stained with PhastGel™. The receptor (1.8 μ g) was detected by western blotting with anti-AnxA6 clone 73, anti-receptor Rb1, N-19, or anti-Rb421 antibodies. Bound antibodies were detected with HRP-secondary antibodies followed by chloronaphthol staining.

AnxA6 is the Man6P-independent endocytic receptor for bovine β -glucuronidase

If AnxA6 behaves as an endocytic receptor, it must meet several requirements. First, it must span the plasma membrane and consequently some of its epitopes should be accessible to antibodies added to the media. The presence of AnxA6 at the cell surface was determined by double immunofluorescence microscopy in paraformaldehyde-fixed human fibroblasts in the absence of saponin. Under these conditions, AnxA6 was observed along the surface of the human fibroblasts, and only traces of the endogenous β -glucuronidase were observed on the surface of the human fibroblasts (Fig. 5A, E). In addition, the AnxA6 that span the plasma membrane also must bind bovine β -glucuronidase added to the culture medium. To test this hypothesis, human fibroblasts were incubated in the presence of bovine acid hydrolase and Man6P at 4 $^{\circ}$ C as described in Fig. 1. The cultures were washed, and the bound enzyme was cross-linked with paraformaldehyde. Next, the cultures were incubated in the absence of saponin with antibodies against AnxA6 and β -glucuronidase. As expected, bovine β -glucuronidase was located on the cell surface associated with AnxA6, as shown by a yellow mark in the merged image (Fig. 5B and F).

Second, the overexpression of AnxA6 should increase the proposed Man6P-independent endocytosis of bovine β -glucuronidase. To address this question, the A431 epithelial cell line that does not express AnxA6 and the mouse L cells fibroblast cell line deficient in the expression of the IGF-II/Man6P were transfected with the bicistronic vector pIRESneoAnxA6 to overexpress AnxA6 [20,22,23]. Western blot analysis confirmed the absence of AnxA6 expression in the A431 cell line and the presence of the AnxA6 isoforms in the human cell line (control) as in both transfected cell lines (Fig. 6). As expected, the A431 cells were not able to endocytose bovine β -glucuronidase; however, the transfected cells acquired a modest capacity to take up the bovine enzyme (Table 3). In the case of mouse L cells, the increment in the rate of endocytosis for transfected cells was higher than those obtained for the A431 + A6. Analyzing both cells lines by immunofluorescence revealed a possible explanation for these results. Fixed cells were incubated with Clone 73 in the absence or presence of saponin to visualize the annexin on the plasma membrane or, in addition, the intracellular annexin. As shown in Fig. 7, AnxA6 was not detected in A431 in any of the conditions used. A substantial amount of the annexin was expressed in all transfected A431 cells permeabilized with saponin; however, in the absence of saponin, the immunofluorescent membrane mark was observed only in 10% of the cell surface of the transfected cells (Fig. 7). Consistent with these results, Takagi et al. previously reported that AnxA6 is present on the outer surface in only 22% of the A431 + A6 transfected cells [19]. In mouse L cells, the AnxA6 was present intracellularly and in the membranes of all cells. Although the AnxA6 levels were increased markedly when this cell line was transfected with vector pIRESneo3 AnxA6, the levels of expression were not homogeneous in all the cells. These results suggest that the expression of AnxA6 in the cell membrane may be tissue dependent. Moreover, considering that the rate of endocytosis depends on the number of binding sites present on the cell surface and on receptor turnover (recycling), these results suggest that the rate of bovine β -glucuronidase endocytosis was not dependent on the intracellular levels of AnxA6, but on the cell capacity to incorporate this cytoplasmic protein into the plasma membrane.

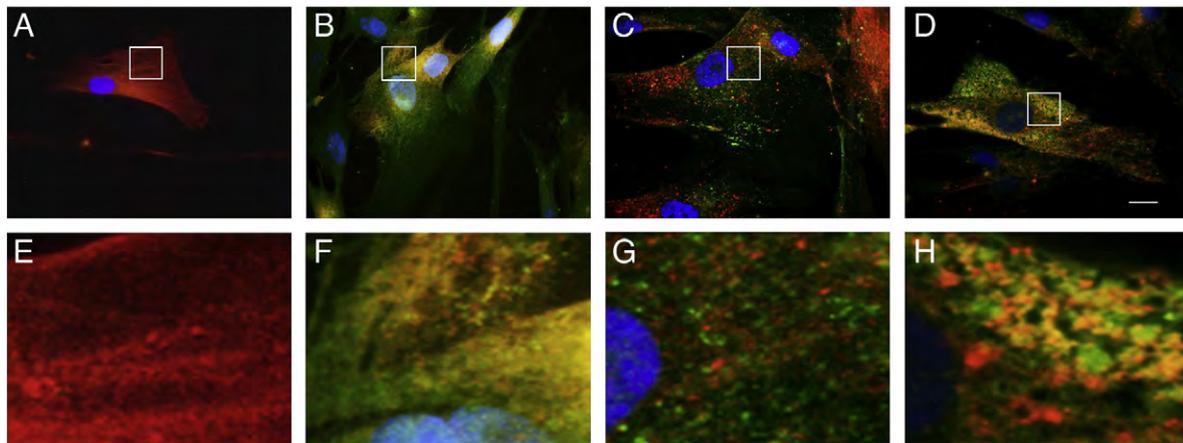


Fig. 5 – Immunofluorescent analysis of AnxA6 in human fibroblasts. The cells grown on cover slips were incubated in the presence (B, D) or the absence (A, C) of 10,000 U/ml of bovine β -glucuronidase and 1 mM Man6P in MEM-BES (pH 6.8–7.0). After 2 h of incubation at 4 °C (A, B) or at 20 °C (C, D), the cells were washed with 100 mM NaCl/10 mM CaCl₂/25 mM BES/25 mM Maleate pH 6.8 and were then fixed for 15 min with 2% paraformaldehyde. Incubation with antibodies was carried out in the presence (C, D) or absence (A, B) of 0.1% saponin. In the first step, the cells were incubated with antibodies against AnxA6 (clone 73) and β -glucuronidase Rb301. In the second step, the cells were rinsed and incubated with Texas red-horse IgG anti-mouse and FITC-donkey anti rabbit. The merged images are shown, where red corresponds to AnxA6, green to β -glucuronidase and yellow indicates colocalization. Nuclei were stained with DAPI. The framework from each picture was digitally magnified using Adobe Photoshop (E, F, G, H). Bar size equals 40 μ m.

Third, to confirm that AnxA6 indeed is a receptor for IGF-II/Man6PR-independent endocytosis of bovine β -glucuronidase in human fibroblasts, we tested the ability of antibodies raised in the laboratory against this receptor or the commercial anti-AnxA6 antibodies to inhibit the uptake of this hydrolase. Cultures were preincubated for 1 h with the antibodies before the addition of the bovine β -glucuronidase. As shown in Fig. 8, under these conditions, the polyclonal antibody against AnxA6 (B01) or of antibodies raised in the laboratory against this receptor were able to inhibit up to 65% of the endocytosis of the bovine enzyme. No inhibition was obtained when a preimmune serum, the monoclonal Clone73, or IgG's rabbit anti IGF-II/Man6PR (Rb164) were added to the cultures. Together, these results suggest antibodies against AnxA6

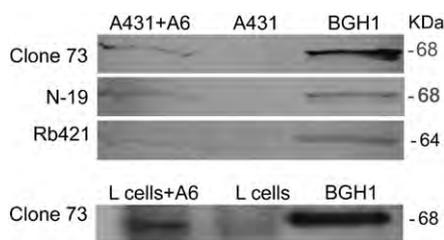


Fig. 6 – Expression of AnxA6 in a cell line stably transfected with AnxA6 cDNA. AnxA6 was examined by western blot analysis on membrane extracts from AnxA6 (A431 + A6) stably transfected cell line, the parental A431 cell line, and a human fibroblast cell line. Membrane protein preparations (70 μ g) from each cell extract were used for western blotting. Human AnxA6 was detected using commercial anti-AnxA6 antibodies (N19 and Clone 73) or with antisera obtained in the laboratory against an IGF-II/Man6PR-independent receptor (Rb 421).

bind to this protein, thereby impairing its function as an endocytic receptor. Differences observed in each antibody's ability to impair endocytosis of the bovine lysosomal enzyme imply that each antibody recognizes receptor epitopes not exposed at the cell surface or not related directly with the receptor binding site [15].

Finally, we investigated whether the bovine β -glucuronidase endocytosed by IGF-II/Man6PR-independent receptors was present in endocytic vesicles containing AnxA6. Human fibroblasts were incubated in the presence or absence of bovine β -glucuronidase and 5 mM of Man6P at 20 °C to slow the transport of the endocytosed enzyme from endosomes to lysosomes [14]. Here, fixed cells were permeabilized with saponin, and the distribution of AnxA6 and the endogenous lysosomal enzyme β -glucuronidase was analyzed by double immunofluorescence microscopy. As shown in Fig. 5C, the endogenous β -glucuronidase and AnxA6 were located in different vesicles. In fact, it was previously reported that AnxA6 is not present in lysosomal vesicles [14,24]. However, human fibroblasts incubated in the presence of bovine β -glucuronidase contained vesicles with both annexin and β -glucuronidase (Fig. 5D, H), suggesting that at least in the first steps after

Table 3 – Cell endocytosis of bovine β -glucuronidase by transfected A431 and mouse L cells.^a

Cell line	β -glucuronidase endocytosis U/mg/h	
	Control	A6 transfected
A-431	1.4 \pm 1.0	5.7 \pm 1.9
Mouse L cells	6.7 \pm 0.5	21.9 \pm 2.5

^a Confluent fibroblast monolayers were incubated for 2 h at 37 °C with 5000 U/ml of bovine β -glucuronidase in the presence of 1 mM Man6P.

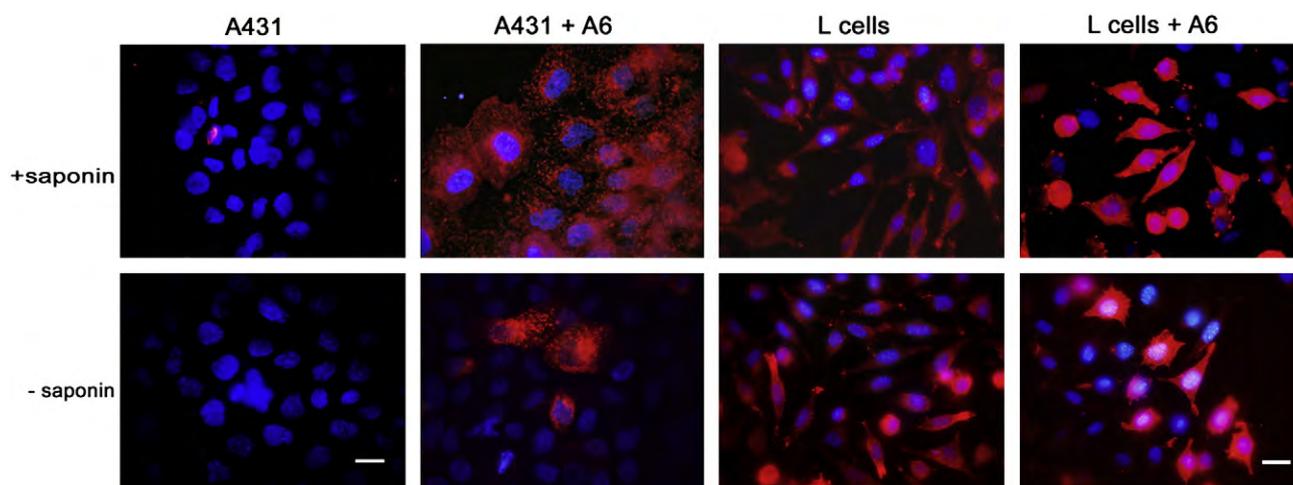


Fig. 7 – Immunofluorescent labeling of transfected A431 and mouse L cells. A431 and mouse L cells transfected with pIRESneoAnxA6 and selected for growth in geneticin (A431 + A6 and L cells + A6). To determine the presence of AnxA6 in the four cell lines, the cells were fixed with 2% paraformaldehyde and incubated with Clone 73 in the presence of 0.1% saponin. The cell surface AnxA6 was determined by adding the monoclonal antibody to the fixed cells in the absence of saponin. In the second step, the cells were rinsed and incubated with Texas red-horse IgG anti-mouse. Nuclei were stained with DAPI. Bar size equals 40 μm .

endocytosis the complex ligand–receptor is found in the same vesicles [14].

Discussion

In the present study, we identified the receptor that mediates IGF-II/Man6PR-independent endocytosis of bovine β -glucuronidase by human fibroblasts. LC/ESI-MS/MS analysis of the three proteins obtained by receptor purification revealed that these proteins correspond to AnxA6, as confirmed by further analysis. First, specific binding of bovine β -glucuronidase to the receptor purified from bovine liver membranes and to the His-tagged recombinant human AnxA6 protein was confirmed using ligand-blotting assays. Second, western blot analysis using antibodies raised by our group against the IGF-II/Man6PR-independent receptor and commercial antibodies against AnxA6 indicated that both proteins share epitopes identified by the two sets of antibodies. Third, an increase in the mannose 6-phosphate-independent endocytosis of bovine β -glucuronidase was observed in two cell lines stably transfected with a plasmid containing the cDNA for the human AnxA6. Finally, antibodies against AnxA6 revealed the presence of this protein in the cell membrane as well as impaired IGF-II/Man6PR-independent endocytosis of bovine β -glucuronidase by human fibroblasts. These results indicate a novel function for AnxA6.

AnxA6 is a cytosolic protein that, while present in all mammalian tissues, is expressed in higher amounts in the liver, muscle, heart and spleen [25–27]. AnxA6 belongs to a family of highly conserved homologous proteins that bind to the cytosolic side of the plasma membrane in a Ca^{2+} -dependent manner. This binding is reversible, and removal of Ca^{2+} by EGTA leads to the liberation of annexins from the phospholipid matrix [27]. AnxA6 is associated with membrane microdomains rich in sphingolipids and cholesterol near caveolin regions [28]. Recently, Grewal et al. [29] reviewed the different roles of AnxA6 and indicated that this cytoplasmic protein may function as an organizer of membrane

domains for the formation of multifactorial signaling complexes that regulate membrane–actin interactions during endocytic transport and modulate intracellular cholesterol homeostasis.

Initially identified as intracellular molecules, AnxA1, A2, A4, A5 and A6 have been found on the outer face of the cell surface and in circulation, indicating that they might be released into the extracellular space by exosomes [30,31]. AnxA6 found on extracellular membrane surfaces interacts with several extracellular ligands, including LRP-1, fetuin-A, heparin, and chondroitin sulfate. Cell surface AnxA6 may regulate critical physiological processes linked to cell spreading, adhesion proliferation, differentiation, inflammation and cell migration [17,32–34]. Alternatively, AnxB12, Anx5 and AnxA6 reversibly may insert into lipid membranes under mildly acidic conditions. Langen et al. has postulated that after protonation, the destabilization of the native α -helical structure, refolding and formation of multimers of Anx B12 creates a transmembrane spanning configuration [35]. A similar mechanism has been proposed by the Pikula group regarding the insertion of AnxA6 into lipid bilayers. This annexin can interact with membranes in a Ca^{2+} -independent manner, behaving as a membrane integral protein, is solubilized with Triton X-100, is EGTA-resistant and is only partially solubilized with Na_2CO_3 [36–38].

If AnxA6 behaves like an endocytic receptor, it is necessary to consider that it is also an integral protein. Supporting this idea, we have demonstrated so far that the Man6P-independent endocytosis of bovine β -glucuronidase was saturable, time and temperature dependent, and specifically inhibited by the Ser-Trp^{*}-Ser recognition marker of bovine β -glucuronidase by antibodies against the Ser-Trp^{*}-Ser, the Man6P-independent receptor and AnxA6 [10,11,15]. The enzyme bound to cell surface AnxA6 that was endocytosed was located in endosomal vesicles where the AnxA6 was present. Previously, we reported that those vesicles when immunoadsorbed with Rb1 showed to contain LAMP2, but not IGF-II/Man6PR or LIMPII [16]. Finally, the bovine acid hydrolase was targeted to lysosomes of human β -glucuronidase-deficient fibroblasts, where it was able to degrade accumulated glycosaminoglycans [10,16].

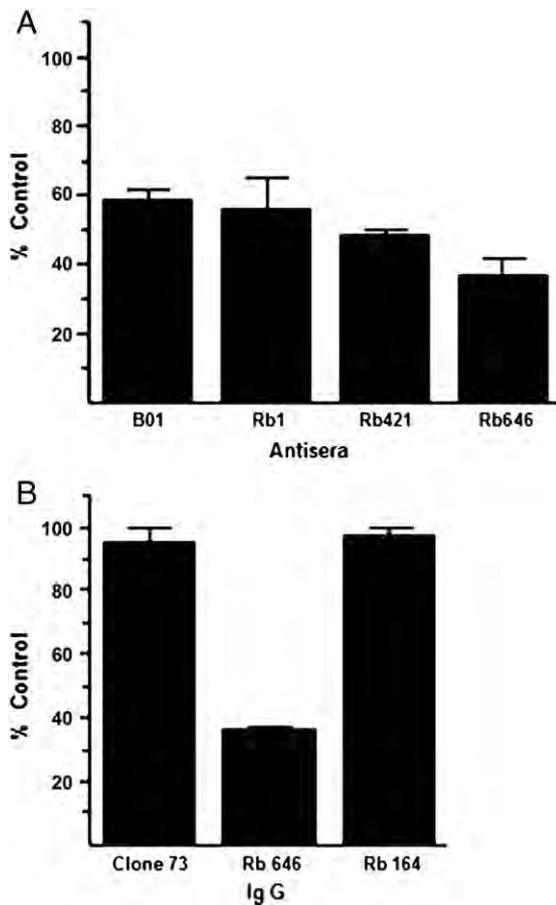


Fig. 8 – Inhibition of IGF-II/Man6PR-independent endocytosis of bovine β -glucuronidase by antibodies. A. Antisera additions. β -glucuronidase deficient fibroblasts were preincubated for 1 h at 37 °C with MEM-BES containing 24 μ l/ml of rabbit preimmune serum, 24 μ l/ml full length anti AnxA6 (B01), or anti IGF-II/Man6PR-independent receptor sera (Rb1, Rb421, Rb646) prior to the addition of 5000 U/ml of bovine β -glucuronidase and 1 mM Man6P. After 2 h at 37 °C, the cell associated β -glucuronidase was measured. Pinocytosis rates are expressed as percent of control. **B. Immunoglobulin G additions.** The same protocol as above was followed to measure the effect of immunoglobulins on the bovine β -glucuronidase endocytosis. Here, we added 40 μ g/ml of Clone 73 and 200 μ g/ml of IgG isolated from IGF-II/Man6PR-independent receptor (Rb646) or IGF-II/Man6PR (Rb 164) rabbit antiserum.

As expected from a cytoplasmic protein, the amino acid sequence of AnxA6 does not contain a signal leader sequence or hydrophobic segment that would be large enough to traverse the phospholipid bilayer. However, the presence of YXX Φ endocytic motifs located in the amino tail of the AnxA6 that interact with adaptin 2 is consistent with the endocytic receptor role proposed here [39,40]. A rate of cell assimilation that is higher at 37 °C than at 4 °C and linear for at least 3 h suggests that either there is an internal pool of AnxA6 that behaves as an IGF-II/Man6PR-independent receptor that can replace internalized receptor or that cell-surface receptors can be reutilized after internalization [21]. On the other hand, the presence of AnxA6 in the plasma membrane is consistent with previous observations indicating that the newly IGF-II/Man6PR-independent receptor

(AnxA6) upon synthesis can immediately be found associated to endoplasmic reticulum membranes. Next, AnxA6 is quickly transported to the Golgi and then to the membranes of the endosomes; from there, 15% of the receptor reaches the plasma membranes [14]. However, it is necessary to investigate the mechanism that triggers the insertion of AnxA6 to the cell membranes and the possible tenure as integral membrane protein.

Although our findings provide evidence suggesting that the IGF-II/Man6PR-independent endocytic receptor for β -glucuronidase is the cytoplasmic protein AnxA6, more work is needed to define the conditions that trigger AnxA6 insertion into the plasma membrane and the mechanisms that allows for this protein to behave as an endocytic receptor. On the other hand, the existence of alternative receptors such as LIMP2, sortilin, and now AnxA6 corroborates the existence of different mechanisms for targeting of lysosomal enzymes and may explain why all of the tissues found in patients with the mucopolipidosis II disease are not deficient in acid hydrolases.

Acknowledgments

We thank Rafael Cervantes-Roldán, Ivan Meneses-Morales, Sandra Reyes-Carmona and Aurey Galván Lobato for technical support. Alberto Ramírez Mata, student of Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (UNAM), is a recipient of doctoral scholarships from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. This work was supported in part by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología grant 56087, the European Commission grant (ICA4-CT1999-10001) and funds from the Universidad Nacional Autónoma de México.

REFERENCES

- [1] A.L. Reitman, A. Varki, S. Kornfeld, Fibroblasts from patients with I-cell disease and pseudo-Hurler polydistrophy are deficient in UDP-acetylglucosamine: glycoprotein N-acetylglucosaminyl phosphotransferase activity, *J. Clin. Invest.* 67 (1981) 1574–1579.
- [2] A. Hasilik, A. Waheed, K. von Figura, Enzymatic phosphorylation of lysosomal enzymes in the presence of UDP-N-acetylglucosamine. Absence of the activity in fibroblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98 (1981) 761–767.
- [3] K. von Figura, A. Hasilik, Lysosomal enzymes and their receptors, *Annu. Rev. Biochem.* 55 (1986) 163–167.
- [4] S. Kornfeld, I. Mellman, The biogenesis of lysosomes, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 5 (1989) 483–525.
- [5] M. Owada, E.F. Neufeld, 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.* 105 (1982) 814–820.
- [6] A. Waheed, R. Pholmann, A. Hasilik, K. von Figura, A. van Elsen, J.G. Leroy, Deficiency of UDP N-acetylglucosamine: lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase in organs of I-cells patients, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105 (1982) 1052–1058.
- [7] S. Obermüller, C. Kiecke, K. von Figura, S. Höning, The tyrosine motifs of Lamp 1 and LAP determine their direct and indirect targeting to lysosomes, *J. Cell Sci.* 115 (2002) 185–194.
- [8] D. Reczek, M. Schwake, J. Schröder, H. Hughes, J. Blanz, X. Jin, W. Brondyk, S. Van Patten, T. Edmunds, P. Saftig, LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase, *Cell* 131 (2007) 770–783.
- [9] M. Canuel, A. Korkidakis, K. Konnyu, C.R. Morales, Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373 (2008) 292–297.

- [10] A. González-Noriega, R. Coutiño, V.M. Saavedra, R. Barrera, Adsorptive endocytosis of lysosomal enzymes by human fibroblasts: presence of two different functional systems to deliver an acid hydrolase to lysosomes, *Arch. Biochem. Biophys.* 268 (1989) 649–658.
- [11] A. González-Noriega, C. Michalak, J.R. Cruz-Pérez, F. Masso, Mannose 6-phosphate-independent endocytosis of β -glucuronidase by human fibroblasts: I. Evidence for the existence of a membrane-binding activity, *Biochim. Biophys. Acta* 1538 (2001) 141–151.
- [12] C.W. Hall, M. Cantz, E.F. Neufeld, A β -glucuronidase deficiency mucopolysaccharidosis: studies in cultured fibroblasts, *Arch. Biochem. Biophys.* 15 (1973) 32–38.
- [13] V. Hieber, J. Distler, R. Myerowitz, R.D. Schmickel, G.W. Jourdian, Selective, noncompetitive assimilation of bovine testicular L-galactosidase and bovine liver L-glucuronidase by generalized gangliosidosis fibroblasts, *J. Clin. Invest.* 65 (1980) 879–884.
- [14] A. González-Noriega, D.D. Ortega Cuellar, C. Michalak, 78 kDa receptor for Man6P-independent lysosomal enzyme targeting: biosynthetic transport from endoplasmic reticulum to “high-density vesicles”, *Exp. Cell. Res.* 312 (2006) 1065–1078.
- [15] A. González-Noriega, C. Michalak, Mannose 6-phosphate-independent endocytosis of β -glucuronidase by human fibroblasts: II. Purification of a cation-dependent receptor from bovine liver, *Biochim. Biophys. Acta* 1538 (2001) 152–161.
- [16] A. González-Noriega, C. Michalak, J.A. Sosa-Melegarejo, Cation-independent mannose 6-phosphate and 78 kDa receptors for lysosomal enzyme targeting are located in different cell compartments, *Biochim. Biophys. Acta* 1745 (2005) 7–19.
- [17] M. Himeno, H. Ohara, Y. Arakawa, Beta-glucuronidase of rat preputial gland. Crystallization, properties, carbohydrate composition, and subunits, *J. Biochem.* 77 (1975) 427–438.
- [18] W. Xolalpa, A.J. Vallecillo, M. Lara, G. Mendoza-Hernandez, M. Comini, R. Spallek, M. Singh, C. Espitia, Identification of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human pathogen, *Mycobacterium Tuberculosis Proteomics* 18 (2007) 3332–3341.
- [19] H. Takagi, Y. Asano, N. Yamakawa, I. Matsumoto, K. Kimata, Annexin 6 is a putative cell surface receptor for chondroitin sulfate chains, *J. Cell Sci.* 115 (2002) 3309–3318.
- [20] M.R. Crompton, R.J. Owens, N.F. Totty, S.E. Moss, M.D. Waterfield, M.J. Crumpton, Primary structure of the human, membrane-associated Ca^{2+} -binding protein p68 a novel member of a protein family, *EMBO J.* 7 (1988) 21–27.
- [21] A. González-Noriega, J.H. Grubb, V. Talkad, W.S. Sly, Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling, *J. Cell Biol.* 85 (1980) 830–852.
- [22] C.M. Nolan, J.W. Kyle, H. Watanabe, W.S. Sly, Binding of insulin-like growth factor 11 (IGF-II) by human cation-independent mannose 6-phosphate receptor/IGF-II receptor expressed in receptor-deficient mouse L cells, *Cell Regul.* 1 (1990) 197–213.
- [23] E. Smythe, P.D. Smith, S.M. Jacob, J. Theobald, S.E. Moss, Endocytosis occurs independently of annexin VI in human A431 cells, *J. Cell Biol.* 124 (1994) 301–306.
- [24] M. Pons, G. Ihrke, S. Koch, M. Biermer, A. Pol, T. Grewal, S. Jäckle, C. Enrich, Late endocytic compartments are major sites of annexin VI localization in NRK fibroblasts and polarized WIF-B hepatoma cells, *Exp. Cell Res.* 257.
- [25] M.A. Kaetzel, G. Pula, B. Campos, P. Uhrin, N. Horseman, J.R. Dedman, Annexin VI isoforms are differentially expressed in mammalian tissues, *Biochim. Biophys. Acta* 1223 (1994) 368–374.
- [26] H.C. Edwards, S.E. Moss, Functional and genetic analysis of annexin VI, *Mol. Cell. Biochem.* 149/150 (1995) 293–299.
- [27] V. Gerke, S.E. Moss, Annexins: from structure to function, *Physiol. Rev.* 82 (2002) 331–337.
- [28] E.B. Babiychuk, A. Drager, Biochemical characterization of detergent-resistant membranes: a systematic approach, *Biochem. J.* 397 (2006) 407–416.
- [29] T. Grewal, M. Koese, C. Rentero, C. Enrich, Molecules in focus: annexin A6 – regulator of the GFR/Ras signalling pathway and cholesterol homeostasis, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42 (2010) 580–584.
- [30] A.M. Sakwe, R. Koumangoye, B. Guillory, J. Ochieng, Annexin A6 contributes to the invasiveness of breast carcinoma cells by influencing the organization and localization of functional focal adhesions, *Exp. Cell. Res.* 317 (2011) 823–837.
- [31] H.O. van Genderen, H. Kenis, L. Hofstra, J. Narula, C.P. Reutelingsperger, Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization, *Biochim. Biophys. Acta.* 1783 (2008) 953–963.
- [32] R.J. Tressler, T. Yetman, G.L. Nicolson, Extracellular annexin VI expression is associated with divalent cation-dependent endothelial cell adhesion of metastatic RAW117 large-cell lymphoma cells, *Exp. Cell Res.* 215 (1994) 395–40027.
- [33] R. Ishitsuka, K. Kojima, H. Utsumi, H. Ogawa, I. Matsumoto, Glycosaminoglycan binding properties of annexin IV, V, and VI, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 9935–9941.
- [34] M.N. Kundranda, S. Ray, M. Saria, D. Friedman, L.M. Matrisian, P. Lukyanov, J. Ochieng, Annexins expressed on the cell surface serve as receptors for adhesion to immobilized fetuin-A, *Bi. Bi. Acta* 1693 (2004) 111–123.
- [35] R. Langen, J.M. Isas, W.L. Hubbel, H.T. Haigler, A transmembrane form of annexin XII detected by site-directed spin labeling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 14060–14065.
- [36] R. Bianchi, I. Giambanco, P. Ceccarelli, G. Pula, R. Donato, Membrane-bound annexin V isoforms (CaBP33 and CaBP37) and annexin VI in bovine tissues behave like integral membrane proteins, *FEBS Lett.* 296 (1992) 158–162.
- [37] M. Golczak, A. Kirilenko, J. Bandorowicz-Pikula, S. Pikula, Conformational states of annexin VI in solution induced by acidic pH, *FEBS Lett.* 496 (2001) 49–54.
- [38] M. Golczak, A. Kicinska, J. Bandorowicz-Pikula, R. Buchet, A. Szewczyk, S. Pikula, Acidic pH-induced folding of annexin VI is a prerequisite for its insertion into lipid bilayers and formation of ion channels by the protein molecules, *FASEB J.* 15 (2001) 1083–1085.
- [39] C.E. Creutz, S.L. Snyder, Interactions of annexins with the mu subunits of the clathrin assembly proteins, *Biochem* 44 (2005) 13795–13806.
- [40] E. Turpin, F. Russo-Marie, T. Dubois, C. de Paillerets, A. Alfsen, M. Bomsel, In adrenocortical tissue, annexins II and VI are attached to clathrin coated vesicles in a calcium-independent manner, *Bi. Bi. Acta* 1402 (1998) 115–130.

Bibliografía

10. Bibliografía

1. **Aboulaich, N., Vainonen, J.P., Stralfors, P. A., Vener, V.** (2004) Vectorial proteomics reveal targeting, phosphorylation and specific fragmentation of polymerase I and transcript release factor (PTRF) at the surface of caveolae in human adipocytes, *Biochem. J.* 383 237–248.
2. **Amara, J.F. Cheng, S.H. & Smith, A.E.** (1992) Intracellular protein trafficking defects in human diseases. *Trends Cel. Biology*, 2: 145-149.
3. **Aridor, M. and Hannan, L.A.** (2002) Traffic Jams II: An update of diseases of intracellular transport. *Traffic*. 3(11): 781-790.
4. **Arterburn, L. M., Earles, B. J. and August, J. T.** (1990). The disulfide structure of mouse lysosomes-associated membrane protein 1. *J.Biol. Chem.* 265, 7419-7423.
5. **Bandorowicz-Pikula, J., Kirilenko, A., van Deursen, R., Golczak, M., Kuhnel, M., Lancelin, J.M., Pikula, S., and Buchet, R.** (2003). A putative consensus sequence for the nucleotide-binding site of annexin A6. *Biochemistry* 42: 9137-46.
6. **Bao, M., Booth, J.L., Elmendorf, B.J., Candfield, W.M.** (1996) Bovine UDP-N acetylglucosamine:lysosomal-enzymeN-acetylglucosamine-1-phosphotransferase.
7. **Baranski, T. J., Faust, P. L., Kornfeld, S.** (1992) 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.* 267 (32): 23342-8.
8. **Baranski, T.J., Faust, P. L., Kornfeld, S.** (1990) Generation of a lysosomal enzyme targeting signal in the secretory protein pepsinogen. *Cell.* 63(2): 281-91.
9. **Blobel, G. & Dobberstein, B.** (1975). Transfer of proteins accross membranes. *J. Cell. Biol.*, 67: 835-51.
10. **Bonifacino, J. S.** (2004) Insights into the biogenesis of lysosome-related organelles from the study of the Hermansky–Pudlak syndrome. *Ann. NY Acad. Sci.* 1038: 103–114.
11. **Brisson, A., Mosser, G., Huber, R.,** (1991). Structure of soluble and membrane-bound human annexin V. *J. Mol.Biol.* 220, 199-203.
12. **Burger, A., Berendes, R., Liemann, S., Benz, J., Hofmann, A., Gottig, P., Huber, R., Gerke, V., Thiel, C., Romisch, J., Weber, K.** The crystal structure and ion channel activity of human annexin II, a peripheral membrane protein. (1996) *J. Mol. Biol.* 257, 839–847.

13. **Calvo, M., and Enrich, C.** (2000) Biochemical analysis of a caveolae-enriched plasma membrane fraction from rat liver, *Electrophoresis* 21:3386–3395.
14. **Canuel, M., Korkidakis, A., Konnyu, K., Morales, C.R.**(2008) Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373: 292-297.
15. **Carlsson, S. R. and Fukuda, M.** (1989). Structure of human lysosomal membrane glycoprotein 1: assignment of disulfide bonds and visualization of its domain arrangement, *J. Biol. Chem.* 264, 20526-20531. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York.
16. **Chow, A., and Gawler, D.** (1999). Mapping the site of interaction between annexin VI and the p120GAP C2 domain. *FEBS Lett* 460: 166-72.
17. **Clark, D.M., Moss, S.E., Wright, N.A., and Crumpton, M.J.** (1991). Expression of annexin VI (p68, 67 kDa-cathepsin) in normal human tissues: evidence for developmental regulation in B205 and T-lymphocytes. *Histochemistry* 96: 405-12.
18. **Conus, S. & Simon, H. U.** (2008) Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses. *Biochem.Pharmacol.* 76, 1374–1382.
19. **Creutz CE.** (1981). Cis-unsaturated fatty acids induce diffusion of chromaffin granules aggregated by synexin. *J. Cell.Biol.* 91:247.
20. **Creutz, C. E.** (1992). The annexins and exocytosis. *Science* **258**, 924–931.
21. **Creutz, C.E., Snyder, S.L.** (2005). Interactions of annexins with mu subunits of the clathrin assembly proteins. *Biochem.* 44:13795-13806.
22. **Cullen, P.J., y Lockyer, P.J.** (2002). Integration of calcium and Ras signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:339-48.
23. **Cuozzo, J. W. y Sahagian, G. G.** (1994) Lysine is a common determinant for mannose phosphorylation of lysosomal proteins. *J Biol Chem.* 269(20): 14490-6.
24. **Cuozzo, J. W., Tao, K., Cygler, M., Mort, J. S., Sahagian, G.G.** (1998) Lysine-based structure responsible for selective mannose phosphorylation of cathepsin D targeting. *J Biol Chem.* 273(33): 21067 -76.
25. **Da Costa, S.A., Schumaker, L. M., Ellis, M.J.** (2000) Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor, a bona fide tumor suppressor gene or just a promising candidate?. *J. Mammary Gland Biol Neoplasia.* 5:85-94.

26. **Dahms, N.M., Lobel, P., Breitmeyer, J., Chirwin, J.M., Kornfeld, S.** (1987) 46 kDa mannose 6-phosphate receptor: cloning, expression and homology to the 215 kDa mannose 6-phosphate receptor. *Cell*, 50:181-192.
27. **Dahms, N.M., Lobel, P., Kornfeld, S.** (1989). Mannose 6 phosphate receptors and lysosomal enzymes targeting. *J. Biol. Chem.* 264:12115-12118.
28. **De Duve, C y Wattiaux, R.** (1966) Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol.* 28:435-92.
29. **De Duve, C.** (1983). Lysosomes revisited. *Eur. J. Biochem.* 137,391-397.
30. **Dell'Angelica, E. C.** (2004) The building BLOC(k)s of lysosomes and related organelles. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 458–464.
31. **Dell'Angelica, E. C., Mullis, C., Caplan, S., Bonifacio, J. S.** (2000) Lysosome-related organelles. *FASEB J.* 14(10): 1265-78.
32. **Dennis, P.A., Rifkin, D.B.** (1991). Cellular activation of latent transforming growth factor β requires binding to the cation independent mannose 6-phosphate/insulin like growth factor type II receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:580-584.
33. **Dittmer, F., Ulbrich, E., Hafner, A., Schmahl, W., Meister, T., Pohlmann, R., von Figura, K.** (1999) Alternative mechanisms for trafficking of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient mice are cell type-specific, *J. Cell Sci.* 112:1591–1597.
34. **Dvir, H. Harel, M., McCarthy A.A., Toker, L., Silman, I., Futerman, A. H., Sussman, J.L.** (2003) X-ray structure of human acid- β -glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO Rep.* 4, 704–709.
35. **Edwards, H.C., Crumpton, M.J.,** (1991). Ca^{2+} -dependent phospholipid and arachidonic acid binding by the placental annexins VI and IV. *Eur. J. Biochem.* 198, 121-129.
36. **Ellis, M.J., Leav, B.A., Yang, Z., Rasmussen, A., Pearce, A., Zweibel, J.A., Lippman, M.E., Cullen, K.J.** (1996). Affinity for the insulin-like growth factor II (IGF-II) receptor inhibits autocrine IGF-II activity in MCF-7 breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 1:286-297.
37. **Emans, N., Gorvel, J. P., Walter, C., Gerke, V., Kellner, R., Griffiths, G., Gruenberg, J.** (1993) Annexin II is a major component of fusogenic endosomal vesicles. *J. Cell Biol.* 120, 1357–1369.

38. **Enrich, C., Rentero, C., Vilá de Muga, S., Reverter, M., Mulay, V., Wood, P., Koese, M., Grewal, T.** (2011) Annexin A6-linking Ca²⁺ signaling with cholesterol transport. *Biochim. Biophys. Acta.* 1813: 935-947.
39. **Eskelinen, E. L., Tanaka, Y., and Safting, P.** (2003). At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrana proteins. *Trends Cell Biol.* 13(3): 137-45.
40. **Fambrough, D. M., Takeyasu, K., Lippincott-Schwartz, J., Spiegel, N. R. and Somerville, D.** (1988). Structure of LEP100, a glycoprotein that shuttles between lysosomes and the plasma membrane, deduced from the nucleotide sequence of the encoding cDNA. *J. Cell Biol.* 106, 61-67.
41. **Fischer, H. D., Creek, K.E., and Sly, W.S.** (1982). Binding of phosphorylated oligosaccharides to immobilized phosphomannosyl receptors. *J Biol. Chem.* 257(17): 9938-43.
42. **Fischer, H. D., Gonzalez Noriega, A. Sly, W. S.** (1980a) β -glucuronidase binding to human fibroblasts membrana receptors. *J Biol Chem.* 255(11):5069-74.
43. **Fisher, H.D. Gonzalez Noriega A., Sly W.S., Morré, D.J.** (1980b) Phosphomannosyl-enzyme receptors in rat liver. Subcellular distribution and role in intracellular transport of lysosomal enzymes. *J.Biol. Chem.* 255 (20): 9608-96015.
44. **Foster, L.J., De Hoog, C.L., Mann, M** (2003). Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 5813–5818.
45. **Freye-Minks, C., Kretsinger, R.H., and Creutz, C.E.** (2003). Structural and dynamic changes in human annexin VI induced by a phosphorylationmimicking mutation, T356D. *Biochemistry* 42: 620-30.
46. **Fujita, H., Ezaki, J., Nogouchi, Y., Kono, A., Himeno, M. and Kato, K.** (1991). Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding 85 kDa sialoglycoprotein in rat liver lysosomal membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178,444-452.
47. **Fukuda, M.** (1991) Lysosomal membrana glycoproteins. Structure, biosíntesis, and intracellular trafiking. *J Biol. Chem.* 266(32): 21327-30.
48. **Funakoshi T, Heimark RL, Hendrickson LE, McMullen BA, Fujikawa K.** (1987). Humanp lacental anticoagulant protein: isolation and characterization. *Biochemistry* 26:5572.
49. **Gieselmann, V.** (1995) Lysosomal storage diseases. *Biochim Biophys Acta.* 1270(2-3): 103-36.

50. **González Noriega A, Daniel D. Ortega Cuellar, Colette, Michalak.** (2006) 78 kDa receptor for Man6P-independent lysosomal enzyme targeting: biosynthetic transport from endoplasmic reticulum to "high-density vesicles". *Exp Cell Res.* 312(7):1065-78.
51. **González Noriega A. and Colette, Michalak.** (2001) Mannose 6-phosphate independent endocytosis of β -glucuronidase II. Purification of a cation dependent receptor from bovine liver. *Biochimica et Biophysica Acta* 1538: 152-161.
52. **González Noriega A. Colette, Michalak, José Raymundo Cruz Pérez, Felipe Masso.** (2001) Mannose 6-phosphate independent endocytosis of β -glucuronidase by human fibroblasts I. Evidence for the existence of a membrane binding activity. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1538:141-151.
53. **González Noriega A. Colette, Michalak.** (2005) Cation-independent mannose 6-phosphate and 78 kDa receptors for lysosomal enzyme targeting are located in different cell compartments. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1745: 7-19.
54. **Gonzalez Noriega, A., Grubb, J, H., Talkad, V., Sly, W.S.** (1980) Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling. *J. Cell Biol.* 85(3): 839-52.
55. **González-Noriega A, Coutiño R, Saavedra VM, Barrera R.** (1989) Adsorptive endocytosis of lysosomal enzymes by human fibroblasts: presence of two different functional systems that deliver an acid hydrolase to lysosomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 268(2):649-58.
56. **Gough, N. R., Hatem, C. L. and Fambrough, D. M.** (1995). The family of LAMP-2 proteins arises by alternative splicing from a single gene: characterization of the avian LAMP-2 gene and identification of mammalian homologs of LAMP-2b and LAMP-2c. *Dev. Cell Biol.* 14,863-867.
57. **Granger, B. L., Green, S. A., Gabel, C. A., Howe, C. L., Mellman, I. and Helenius, A.** (1990). Characterization and cloning of Igpl10, a lysosomal membrane glycoprotein from mouse and rat cells. *J. Biol. Chem.* 265, 12036-12043.
58. **Grewal, T., Heeren, J., Mewawala, D., Schnitgerhans, T., Salomon, G., Enrich, C., Beisiegel, U., and Jäckle, S.** (2000). Annexin VI stimulates endocytosis and is involved in the trafficking of low density lipoprotein to the prelysosomal compartment. *J. Biol. Chem.* 275, 33806–33813.

59. **Guarnieri, F. G., Arterburn, L. M., Penno, M. B., Cha, Y., August, J.T.** (1993) The motif Tyr- X-X- hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein 1. *J Biol. Chem.* 268 (3): 1941-6.
60. **Hajjar, K. A., Krishnan, S.** (1999) Annexin II: a mediator of the plasmin/ plasminogen activator system. *Trends Cardiovasc. Med.* **9**, 128–138.
61. **Hatem, C. L., Gough, N. R. and Fambrough, D. M.** (1995). Multiple mRNAs encode the avian lysosomal membrane protein LAMP-2, resulting in alternative transmembrane and cytoplasmic domains. *J. Cell Sci.* 108,2093-2100.
62. **Hichman, S., Shapiro, L. J. y Neufeld, E. F.** (1974) A recognition marker required for uptake of a lysosomal enzyme by cultured fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 57(1): 55-61.
63. **Hieber, V., Distler, J., Myerowitz, R., Schmickel, R. D., Jourdain, G. W.** (1976) The role of glycosidically bound mannose in the assimilation of beta galactosidase by generalized gangliosidosis fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 73 (3): 710-7.
64. **Himeno, M., Ohhara, H., Arakawa, Y., Kato, K.** (1975) β -Glucuronidase of rat preputial gland. *J. Biochem.* 77(2):427-438.
65. **Hoflack, B. y Kornfeld, S.** (1985) 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 USA.* 82(13): 4428-32.
66. **Hoflack, B. y Kornfeld, S.** (1985). Purification and characterization of a cation-dependent mannose 6-phosphate receptor from murine P388D1 macrophages and bovine liver. *J Biol. Chem.* 260(22): 12008-14.
67. **Honing, S. and Hunziker, W.** (1995). Cytoplasmic determinants involved in direct lysosomal sorting, endocytosis, and basolateral targeting of rat Igp120 (lamp-I) in MDCK cells. *J. Cell Biol.* 128:321-332.
68. **Huber, R., Berendes, R., Burger, A., Schneider, M., Karshikov, A., Luecke, H., Romisch, J., Paques, E.,** (1992). Crystal and molecular structure of human Annexin V after refinement. *J. Mol. Biol.* 223, 683-704.
69. **Hunziker, W. y Geuze, H. J.** (1996) Intracellular trafficking of lysosomal membrana proteins. *Bioessays.* 18(5): 379-89.
70. **Ikebuchi NW, Waisman., D M.** (1 990). Calcium-dependenret gulation of actin illament bundling by lipocortin-85. *J. Biol. Chem.* 265:3392.

71. **Janvier, K. & Bonifacino, J. S.** (2005) Role of the endocytic machinery in the sorting of lysosome-associated membrane proteins. *Mol. Biol. Cell* 16, 4231–4242.
72. **Jiménez, L.F., Merchant, H.** (2003) *Biología celular y Molecular*. Pag.477-490. Prentice Hall.
73. **Jost, M., Zeuschner, D., Seemann, J., Weber, K., Gerke, V.** (1997) identification and characterization of novel type of annexin-membrane interaction: Ca^{2+} is not required for the association of annexin II with early endosomes. *J. Cell Sci.* **110**, 221–228.
74. **Kamal, A., Ying, Y., Anderson, R.G.** (1998). Annexin VI-mediated loss of spectrin during coated pit budding is coupled to delivery of LDL to lysosomes. *J Cell Biol* 142(4): 937-47.
75. **Kaplan, A., Achord, D. T. and Sly, W.S.** (1977) Phosphohexosyl components of a fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74(5): 2026-30.
76. **Kiess, W., Greenstein, I.A., Lee, L., Thomas, C., Nissley, S. P.** (1991) 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.* 5(2): 281-91.
77. **Kiess,W., Greenstein, L.A., White, RM., Lee, L., Rechler, M,M., Nissley, S. O.** (1987) Type II insulin-like growth factor receptor is present in rat serum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84(21): 7720-4.
78. **Kirilenko, A., Golczak, M., Pikula, S., Buchet, ,R and Bandorowicz-Pikula, J.** (2002). GTP-induced membrane binding and ion channel activity of annexin VI: is annexin VI a GTP biosensor? *Biophys J* 82: 2737-45.
79. **Kornfeld, S.** (1987) Trafficking of lysosomal enzymes *FASEB J.* 1(6): p. 462-8.
80. **Kornfeld, S.** (1992). Structure and function of mannose 6-phosphate/like growth factor II receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 61:307-330.
81. **Kyle, JW., Nolan, C. M., Sly, W.S.** (1988) Expression of human cation-independent mannose 6-phosphate receptor cDNA in receptor-negative mouse P388D1 cells following gene transfer. *J Biol. Chem.* 263(31): 1630-5.
82. **Laemmli, U.K.** (1979) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
83. **Langen R, Isas JM, Luecke H, Haigler HT, AND Hubbel WL.**(1998b) Membrane-mediated assembly of annexins studied by site-directed spin labeling. *J Biol Chem* 273: 22453–22458.

84. **Langen R, Isas, JM, Hubbel, WL, AND Haigler, HT.** (1998 a) A transmembrane form of annexin XII detected by site-directed spin labeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14060–14065.
85. **Lehmann, L. E. et al.** (1 992). The internalization signal in the cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase consists of the hexapeptide PGYRHV. *EMBO J.* 11:4391-4399.
86. **Lewis, V., Green, S., Marsh, M., Vihko, P., Helenius, A. and Mellman, I.** (1985). Glycoproteins of the lysosomal membrane. *J. Cell Biol.* 100,1839- 1847.
87. **Lin, H.C., Sudhof, T.C., Anderson, R.G.** (1992). Annexin VI is required for budding of clathrin-coated pits. *Cell* 70(2): 283-91.
88. **Lloyd, J. B.** (1986) Disulphide reduction in lysosomes. *Biochem J.* 237(1): 271-2.
89. **Lloyd, J. B.** (1996) The taxonomy of lysosomes. *Subcell Biochem.* 27: 1-13.
90. **Lobel, P., Dahms, N. M., Breitmeyer, j., Chirgwin, J. m., Kornfeld, S.** (1987) Cloning of the bovine 215-kDa cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84(8): 2233-7.
91. **Lübke, T., Lobel, P. & Sleat, D. E.** (2009) Proteomics of the lysosome. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 625–635.
92. **Luzio, J.P., Pryor, P. R., Bright, N.A.** (2007) Lysosomes: fusion and function. *Nature.* 8:622-632.
93. **Mai, J., Waisman, D. M., and Sloane, B. F.** (2000) Cell surface complex of cathepsin B/annexin II tetramer in malignant progression. *Biochim. Biophys. Acta* **1477**, 215–230.
94. **Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J.** (1982) Molecular cloning: a laboratory manual.
95. **Mathews, P. M., Martinie, J. B. and Fambrough, D. M.** (1992). The pathway and targeting signal for delivery of the integral membrane glycoprotein LEPIOO to lysosomes. *J. Cell Biol.* 118:1027-1040.
96. **McBurney, M.W., Yang, X., Jardine,K.** (2003) Enhanced transgene expression in embryonal carcinoma stem cells: transcription through introns and exons increases gene copy numbers and forestalls silencing. *Exp. Cell Res.* 288: 313-323.
97. **Mellman, I., Fuchs, R. & Helenius, A.** (1986) Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 663–700.

98. **Metzelaar, M. J. et al.** (1991). CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* 266, 3239-3245.
99. **Miyamoto, H., Homma, M. and Hotta, H.** (1994). Molecular cloning of the murine homologue of CD63/ME491 and detection of its strong expression in the kidney and activated macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 121,312-316.
100. **Moss, S.E., Jacob S.M., Davies, A.A., and Crumpton, M.J.** (1992). A growthdependent post-translational modification of annexin VI. *BiochimBiophys Acta 1160: 120-6 Nat Cell Biol 3: 368-75.*
101. **Mullis, C. y Bonifacio, J. S.** (2001)The molecular machinery for lysosome biogénesis. *Bioessays.* 23(4): 333-43.
102. **Mullock, B. M., Bright, N. A., Fearon, C. W., Gray, S. R. and Luzio, J. P.,** (1998). Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. *Journal of Cell Biology.* 140, 591- 601.
103. **Natowics, M.R., Chi, M.Y., Lowry, O.H., Sly, W.S.** (1979) Enzymatic identification of mannose 6-phosphate on the recognition marker for receptor/mediated pinocytosis of β -glucuronidase by human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4322-4326.
104. **Neufeld, E. F., Sando, G. N., Garvin, A. J., Rome, L.H.,** (1977) The transport of lysosomal enzymes. *J Supramol Struct.* 6 (1): 95-101.
105. **Neufeld, E.F. y Muenzer I.** The mucopolysaccharidoses. En Scriber CR, Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* Octava edición. New York McGraw-Hill Inc, Vol. 3. 2001, 3421-3452.
106. **Nishikata, H., Oliver, C., Mergenhagen, S. E. and Siraganian, R. P.** (1992). The rat mast cell antigen AD1 (homologue to human CD63 or melanoma antigen ME491) is expressed in other cells in culture. *J. Immunol.* 149,862-870.
107. **Nobrega, F.G. y Ozols, J.** (1971) *J. Biol. Chem.* 246: 1706.
108. **Nolan, C. M., Sly W,S.** (1987) Intracellular traffic of the mannose 6-phosphate receptor and its ligands. *Adv. Exp. Med. Biol.* 225:199-212.
109. **Novikoff, A.B., Beaunfay, H., de Duve, C.** (1956) Electron microscopy of lysosome rich fractions from rat liver. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2:179-184.
110. **Ortega, D., Pol, A., Biermer, M., Jäckle, S., and Enrich, C.** (1998). Annexin VI defines an apical endocytic compartment in rat liver hepatocytes. *J. Cell Sci.* 111, 261–269.

111. **Palade GE.** (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*. 189: 347-358.
112. **Pelham, H.R.** (1989). Control of protein exit from endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Cell. Biol.*, 5: 1-23.
113. **Peters, C. et al.** (1990). Targeting of a lysosomal membrane glycoprotein: a tyrosine containing endocytosis signal in the cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase is necessary and sufficient for targeting to lysosomes. *EMBO J.* 9:3497-3506.
114. **Pohlmann, R. et al.** (1988). Human lysosomal acid phosphatase: cloning, expression and chromosomal assignment. *EMBO J.* 7,2343-50.
115. **Pol, A., Ortega, C., Enrich, C.** (1997) Identification of cytoskeleton-associated proteins in isolated rat liver endosomes, *Biochem. J.* 327 741–746.
116. **Pollard HB, Guy HR, Arispe N, de la Fuente M, Lee G, et al.** (1992) Calcium channel and membrane fusion activity of synexin and other members of the annexin gene family. *Biophys. J.* 62:15.
117. **Pollard, H.B., y Rojas, E.,** (1988). Ca²⁺-activated synexin forms highly selective, voltage-gated Ca²⁺- channels in phosphatidylserine bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2974-2978.
118. **Pons, M., Grewal, T., Rius, E., Schnitgerhans, T., Jäckle, S., Enrich, C.** (2001). Evidence for the involvement of annexin 6 in the trafficking between the endocytic compartment and lysosomes. *Exp Cell Res* 269: 13-22.
119. **Pons, M., Ihrke, G., Koch, S., Biermer, M., Pol, A., Grewal, T., Jäckle, S., and Enrich, C.** (2000). Late endocytic compartments are major sites of annexin VI localization in NRK fibroblasts and polarized WIF-B hepatoma cells. *Exp Cell Res* 257:33-47.
120. **Poole, A. R., Tiltman, K. J., Recklies, A. D., and Stoker, T. A.** (1978) Differences in secretion of the proteinase cathepsin B at the edges of human breast carcinomas and fibroadenomas. *Nature* **273**, 545–547.
121. **Portnoy, D. A.** (1992) Innate immunity to a facultative intracellular bacterial pathogen. *Curr Opin Immunol.* 4(1): 20-4. I. Purification and subunit structure. *J Biol Chem.* 271(49): 31437-45.
122. **Quistgaard, E. M. Madsen, P., Groftehauge, M.K., Nissen, P., Petersen, C.M., Thirup, S.S.** (2009). Ligands bind to Sortilin in the tunnel of a ten-bladed β -propeller domain. *Nature Struct. Mol. Biol.* **16**, 96–98.

123. **Raposo, G., Marks, M.S., Cutler, D.F.** (2007) Lysosome-Related Organelles: Driving post-Golgi compartments into specialization. *Curr Opin Cell Biol.* 19(4):394-401.
124. **Recklies, A. D., Tiltman, K. J., Stoker, T. A., and Poole, A. R.** (1980). Secretion of proteinases from malignant and nonmalignant human breast tissue. *Cancer Res.* **3**, 550–556.
125. **Reczek, D., Schwake, M., Schröder, J., Hughes, H., Blanz, J., Jin, X., Brondyk, W., Van Patten, S., Edmunds, T., Saftig, P.** (2007) LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose 6 phosphate independent targeting of β -glucocerebrosidase. *Cell*, 131: 770-783.
126. **Reggio, H., Bainton, D., Harms, E., Coudrier, E. and Louvard, D.** (1984). Antibodies against lysosomal membranes reveal a 100,000-mol-wt protein that cross-reacts with purified H⁺, K⁺ ATPase from gastric mucosa. *J. Cell Biol.* 99, 151 1-1526.
127. **Reitman, M. L. y Kornfeld, S.** (1981) Lysosomal enzyme targeting N-acetylglucosamylphosphotransferase selectively phosphorylates native lysosomal enzymes. *J Biol Chem.* 256(23): 11977-80.
128. **Reitman, M. L. y Kornfeld, S.** (1981) 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.* 255(9): 4275-81.
129. **Rojas, E., Pollard, H.B., Haigler, H.T., Parra, C., Burns, A.L.,**(1990). Calcium-activated endonexin II forms calcium channels across acidic phospholipid bilayer membranes. *J. Biol. Chem.* 265, 21,207-21,215.
130. **Rome, L.H., Weissmann, B. y Neufeld, E. F.** (1979) Direct demonstration of binding fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76(5): 2331-4.
131. **Rothman, J.E.**(1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*, 372: 55-63.
132. **Russo-Marie F.** 1992. Annexins, phospholipase A2 and the glucocorticoids. Moss SE, ed. 1992. *The Annexins*. London: Portland.
133. **Sahagian, G. G., Distler, J., Jourdian, G. W.** (1981) Characterization of a membrane-associated receptor from bovine liver that binds phosphomannosyl residues of bovine testicular β -galactosidase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78(7): 4289-93.

134. **Sandoval, I. V., Arredondo, J. J., Alcalde, J., González Noriega, A., Vandekerckhove, J., Jiménez, M.A., Rico, M.** (1994). 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.* 269(9): 6622-31.
135. **Schmitz-Peiffer, C., Browne, C.L., Walker, J.H., and Biden, T.J.** (1998). Activated protein kinase C α associates with annexin VI from skeletal muscle. *Biochem J* 330:675-81.
136. **Seabra, M.C., Mules, E.H., Hume, A.N.** (2002) Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trends Mol. Med.* 8(1):23-30.
137. **Siever, D. A., and Erickson, H. P.** (1997) Extracellular annexin II *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 1219–1223.
138. **Sly, W. S., Fisher, H. D., Gonzalez Noriega, A., Grubb, J. H., Natowicz, M.** (1981) Role of the 6 phosphomannosyl enzyme receptor in intracellular transport and adsorptive pinocytosis of lysosomal enzymes. *Methods Cell Biol.* 23: 191-214.
139. **Smart, E.J., De Rose, R.A., Farber, S.A.** (2004) Annexin 2-caveolin 1 complex is a target of ezetimibe and regulates intestinal cholesterol transport, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 3450–3455.
140. **Smith, P.D., Moss, S.E.,** (1994). Structural evolution of the annexin supergene family. *TIG.* 10, 241-246.
141. **Smythe, E., Smith, P.D., Jacob, S.M., Theobald, J. Moss, S.E.** (1994) Endocytosis occurs independently of annexin VI in human A431 cells. *J. Cell Biol.* 124: 301-306.
142. **Sprenger, R.R., Speijer, D., Back, J.W., De Koster, C.G., Pannekoek, H., Horrevoets, A.J.** (2004) Comparative proteomics of human endothelial cell caveolae and rafts using two dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry, *Electrophoresis* 25 156–172.
143. **Storrie B, Desjardins M.** (1996) The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process? *Bioessays.* 18:895-903.
144. **Sudhof, T.C.** (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature,* 375: 645-53.
145. **Swanson, J., Brushnell, A., Silverstein, S.C.** (1987) Tubular lysosome morphology and distribution within macrophages depend on the integrity of cytoplasmic microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:1921-1925.

146. **Takagi, H., Asano, Y., Yamakawa, N., Matsumoto, I., Kimata., K.** (2002) Annexin 6 is a putative cell surface receptor for chondroitin sulfate chains. *J. Cell Sci.* 115: 3309-3318.
147. **Tardy, C., Codogno, P., Autefage, H., Levade, T., Andrieu-Abadie, N.** (2006) Lysosomes and lysosomal protein in cancer cell death (new players of an old struggle) *Biochemica et Biophysica Acta.* 1765: 101-125.
148. **Teasdale, R.D. & Jackson, M.R.** (1996). Signal mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 12: 27-54.
149. **Thorin, B., Gache, G., Dubois, T., Grataroli, R., Domingo, N., Russo-Marie, F., Lafont, H.** (1991) Annexin VI is secreted in human bile. *Biochem. Bioph. Res. Comm.* 209:1039-1045.
150. **Tong, P. y., Gregory, W., y Kornfeld, S.** (1989). Ligand interactions of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. The stoichiometry of mannose 6-phosphate binding. *J Biol. Chem.* 264(14):7962-9.
151. **Tressler, R. J., Updyke, T. V., Yeatman, T., and Nicolson, G. L.** (1993) Extracellular annexin II is associated with divalent cation-dependet tumor cell-endothelial cell adhesion of metastatic RAW117 large cell lymphomacells *J. Cell. Biochem.* **53**, 265–276.
152. **Uittenbogaard, A., Everson, W.V., Matveev, S.V., Smart, E.J.** (2002) Cholesteryl ester is transported from caveolae to internal membranes as part of a caveolin-annexin II lipid-protein complex, *J. Biol. Chem.* 277 4925–4931.
153. **Varki, A. P., Reitman, M.L., Kornfeld, S.** (1981) Identification of a variant of mucopolisodisis III (pseudo-Hurler poydystrophy): a catalytically active N-acetylglucosaminylphosphotransferase that fails to phosphorylate lysosomal enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78(12): 773-7.
154. **Varki, A. y Kornfeld, S.** (1980) Structural studies of phosphorylated high mannose type oligosaccharides. *J Biol Chem.* 255(22): 10847-58.
155. **Vega, M. A. et al.** (1991). Cloning, sequencing and expression of a cDNA encoding rat limp II, a novel 74 kDa lysosomal membrane protein related to the surface adhesion protein CD36. *J. Biol. Chem.* 266, 16818-16824.
156. **Vega, M. A., Rodríguez, F., Segui, B., Cales, C., Alcalde, J. and Sandoval, I. V.** (1991). Targeting of lysosomal integral membrane protein LIMP II. *J. Biol. Chern.* 266:16269-16272.

157. **Viitala, J., Carlsson, S. R., Siebert, P. D. and Fukuda, M.** (1988). Molecular cloning of cDNAs encoding lamp A, a human lysosomal membrane glycoprotein with apparent Mr=120.000. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85,3743-3747.
158. **Voges, D., Berendes, R., Burger, A., Demange, P., Baumeister, W., Huber, R.,** (1994). Three-dimensional structure of membrane-bound annexin V. *J. Mol. Biol.* 238, 199-213.
159. **von Figura, K. y Weber, E.** (1978) An alternative hipóthesis of cellular transport of endocytosis in fibroblasts of inhibitors of lysosomal enzyme encyctosis on intra and extra cellular lysosomal enzyme activities. *Biochem J.* 176(3): 943-50.
160. **von Figura, K., Hasilik, A.** (1986) Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 55 163–167.
161. **Waheed, A. et al.** (1988). Human lysosomal acid phosphatase is transported as a transmembrane protein to lysosomes in transfected baby hamster kidney cells. *EMBOJ.* 7,2351-2358.
162. **Waheed, A., Pohlmann, R., Hasilik, A., von Figura, K., van Essen, A., Leroy, J. G.,** (1982) Deficiency of UDP-N-acetylglucosamine: lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phodphotransferase in organs of I-cell patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105(3): 1052-8.
163. **Watanabe, H., Grubb, J.H., and Sly, W. S.** (1990). The overexpressed human 46 kDa mannose 6-phosphate receptor mediates endocytosis and sorting of beta-glucuronidase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87(20): 8036-40.
164. **Wendland, M., Waheed, A., Schmidt, B., Hille, A., Nagel, G., von Figura, K., Pohlmann, R.** (1991) Glycosylation of the Mr 46,000 Mannose 6-phosphate receptor effect in ligand binding, stability, and conformation. *J. Biol. Chem.* 7(5): 4596-4604.
165. **Westcott, K. R. y Rome, L. H.** (1988) Cation-independent mannose 6-phosphate receptor contains covalently bound fatty acid. *J Cell Biochem.* 38(1): 23-33.
166. **Williams, M. A. and Fukuda, M.** (1990). Accumulation of lysosomal membrane glycoproteins in lysosomes requires a tyrosine residue at a particular position in the cytoplasmic tail. *J. Cell Biol.* 111:955-966.
167. **Xolalpa, W., Vallecillo, A.J., Lara, M., Mendoza-Hernandez, G., Comini, M., Spallek, R., Singh, M., Espitia, C.** (2007) Identification of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human pathogen, *Mycobacterium Tuberculosis*. *Proteomics* 18: 3332-3341.

168. **Zang, Y., Beard, R.L., Chandraratna, R.S., Kang, J.X.**, (2001) Evidence of a lysosomal pathway for apoptosis induced by the synthetic retinoid CD437 in human leukemia HL-60 cells. *Cell Death Diff.* 8:477-485.
169. **Zhao, W.Q., Chen, G.H., Chen, H., Pascale, A., Ravindranath, L., Quon, M. J., Alkon, D.L.** (2003) Secretion of Annexin II via Activation of Insulin Receptor and Insulin-like Growth Factor Receptor. *J. Biol. Chem.* 278 (6): 4205-4215.