

Tesis Doctoral

**Posibles roles de los receptores a
manosa-6-fosfato durante la
organogénesis.**

**Presentada al Programa de Postgrado en
Biología de la Universidad Nacional de Cuyo
(para optar al título de Doctor en Ciencias
Biológicas)**

**Patricia Silvia Romano
Bioquímico por la Universidad Juan A. Maza**

**Director: Dr. Miguel Angel Sosa
Instituto de Histología y Embriología
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Cuyo**

Mendoza

2003

***A mi esposo José
A mis hijos Camila y Agustín***

AGRADECIMIENTOS

- *A mis padres Luciano y Luisa que me enseñaron el arte de vivir y de valorar las cosas.*

- *A las instituciones que financiaron este proyecto:*

CONICET, *que me otorgo la beca*

IHEM, *que puso a mi disposición todo su equipamiento.*

FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS DE LA UNCUYO, *que me dio un lugar para realizar este trabajo.*

- *A las personas que acrecentaron mi pensamiento:*

Dr. Miguel A. Sosa, que me enseñó a ver la importancia de los procesos biológicos.... pero por sobre todas las cosas a trabajar con la calidez humana que nos da la libertad.

Dr. Luis S. Mayorga, *que me ayudo a interpretar matemáticamente mis resultados.*

Dr. Armando J. Parodi, *que me abrió las puertas de su laboratorio.*

- *A las personas que me acompañaron en el “manos a la obra”*

Mis compañeros y amigos, Silvia, Carolina, Tirso, Walter, Antonio, Matías y Lorena.

- *A mis compañeros de siempre:*

Ariel, Gerardo, Marcelo y María.

- *Y a todos mis compañeros de IHEM.*

Indice

Indice	4
RESUMEN	8
CAPITULO I	
INTRODUCCIÓN	9
1.1- La vía endocítica celular.	11
<i>1.1.1-Fagocitosis.</i>	12
<i>1.1.2- Pinocitosis.</i>	13
<i>1.1.2.1- Macropinocitosis.</i>	13
<i>1.1.2.2- Endocitosis mediada por caveolina.</i>	13
<i>1.1.2.3- Endocitosis independiente de caveolina y clatrina.</i>	14
<i>1.1.2.4- Endocitosis mediada por clatrina (EMC).</i>	14
1.2- La vía biosintética-secretora.	16
<i>1.2.1- Transporte desde el TGN a la superficie celular. Exocitosis.</i>	18
<i>1.2.2- Transporte desde el TGN a los lisosomas.</i>	19
1.3- Los receptores a manosa-6-fosfato (MPRS).	22
<i>1.3.1- Estructura y Biosíntesis del CD-MPR.</i>	22
<i>1.3.1.1- Estructura primaria, organización genómica y expresión.</i>	22
<i>1.3.1.2- Biosíntesis y modificaciones co y postraduccionales</i> <i>del CD-MPR.</i>	24
<i>1.3.1.3- Estructura cristalina y bases moleculares del</i> <i>reconocimiento del carbohidrato.</i>	25
<i>1.3.2- Estructura y Biosíntesis del CI-MPR.</i>	28
<i>1.3.2.1- Estructura primaria, organización genómica y expresión.</i>	28
<i>1.3.2.2- Biosíntesis y modificaciones co y postraduccionales.</i>	28
<i>1.3.2.3- Estructura cristalina y bases moleculares del</i> <i>reconocimiento del carbohidrato.</i>	30
<i>1.3.3- Transporte de los MPRs.</i>	31

1.3.3.1- Salida del TGN.	32
1.3.3.2- El paso por endosomas.	34
1.3.3.3- Retorno al Aparato de Golgi.	34
1.3.3.4- Transporte a la membrana plasmática(MP).	35
1.4- Funciones del CI-MPR.	36
1.4.1- El CI-MPR como regulador del crecimiento y la motilidad celular.	37
1.4.2- El CI-MPR como un probable supresor de tumores.	37
1.5- Los MPRs en el desarrollo de órganos y tejidos.	38
1.5.1- El rol del CI-MPR en la regulación del IGF-II.	39
OBJETIVOS	41
CAPITULO II	
RESULTADOS	42
A)- Los receptores a manosa-6-fosfato cation independiente y cation dependiente (CI-MPR, CD-MPR) varian diferencialmente durante el desarrollo perinatal de higado de rata.	43
2.1-Los MPRs se expresan diferencialmente durante el desarrollo perinatal de hígado de rata.	44
2.2- Los MPRs se comportan de manera diferente cuando interaccionan con ligandos fosfomanosilados durante el desarrollo perinatal de hígado de rata.	48
2.2.1- Ensayos de Acoplamiento.	51
2.2.2- Estimación de parámetros de interacción Enzima-Receptor.	53
2.3- El CI-MPR aumenta su afinidad a enzimas lisosomales durante el desarrollo perinatal.	54
2.4- CI-MPR se encuentra en mayor proporción en la membrana	

plasmática de las células de hígado fetal.	62
2.5- Variaciones de los parámetros estudiados para el CD-MPR.	64
B)- Las hidrolasas lisosomales varían en forma paralela al CD-MPR durante el desarrollo perinatal de hígado de rata.	65
2.6-Evolución de la actividad enzimática lisosomal en hígado de rata durante el desarrollo perinatal.	66
2.7- Ligandos fosfomanosilados en hígado de rata durante el desarrollo perinatal.	72
2.8- Un alto porcentaje de NAG de hígado de rata de 10 días se une al CD-MPR.	77
C)- El aparato lisosomal de cerebro de rata presenta similitudes y diferencias de las observadas para hígado de rata durante el desarrollo perinatal.	81
2.9- Expresión de los MPRs durante el desarrollo de cerebro de rata.	81
2.10- Estudio de las propiedades de los MPRs en cerebro.	83
2.11- Evolución de la actividad enzimática lisosomal durante el desarrollo perinatal en cerebro de rata.	86
CAPITULO III	
CONCLUSIONES	94
CAPITULO IV	
METODOLOGÍA	101
1- Reactivos.	102

2- Preparación de membranas de tejidos de rata de distintas edades perinatales.	102
3- Inmunodetección de los MPRs en membranas de hígado y cerebro ("western blot").	104
4- Inmunohistoquímica en secciones de tejido hepático.	104
5- Purificación de β - glucuronidasa.	105
6- Ensayo de acoplamiento de β -glucuronidasa.	107
7- Afinidad del CI-MPR de hígado de ratas de 0 y 90 días a fosfomanano.....	107
8- Preparación de membrana plasmática desde hígado de ratas de fetos y de adultos.....	108
9- Compartimentalización de enzimas de rata durante el desarrollo.	109
10- Medición de las actividades enzimáticas.	110
11- Inmunodetección de enzimas en fracción EU de hígado o cerebro ("western blot").	110
12- Purificación de los MPRs.	111
13- Separación del CI-MPR y CD-MPR.	112
14- Biotinilación del CI-MPR.	112
15- Reconocimiento de ligandos fosfomanosilados de la fracción EU por medio del CI-MPR biotinilado.	112
16- Ensayos de acoplamiento de enzimas endógenas (NAG) a membranas de tejidos.	113
17- Otros procedimientos.	114
PROYECCIONES	115
CAPITULO V	
REFERENCIAS	116

RESUMEN

Los receptores a manosa-6-fosfato (MPRs) son glicoproteínas que presentan como función principal el transporte de las hidrolasas lisosomales al lisosoma. Se conocen hasta el momento dos formas de MPRs: el receptor catión dependiente de 46 kDa (CD-MPR), que necesita iones bivalentes como Ca^{+2} , Mg^{+2} o Mn^{+2} en muy bajas concentraciones para interactuar con sus ligandos; y el receptor catión independiente de 300 kDa (CI-MPR) que actúa aún en ausencia de los iones. Estos receptores son los dos únicos miembros de la familia de lectinas de tipo P, puesto que son las únicas lectinas que reconocen los residuos de manosa fosforilada.

Como ambos MPRs coexisten en la mayoría de los tipos celulares y presentan similar distribución subcelular, aún se discute el verdadero rol de estos receptores y la razón de su coexistencia en la mayoría de las células.

En esta tesis hemos estudiado algunas propiedades de los MPRs durante el desarrollo perinatal de órganos de rata y observamos que ambos receptores poseen diferentes comportamientos en este período. El CI-MPR disminuye su expresión mientras que el número de sitios activos (B_{max}) permanece constante y la afinidad se incrementa para ligandos fosfomanosilados durante la maduración, tanto en hígado como en cerebro. Este receptor se presenta en mayor proporción en la membrana plasmática fetal comparado con adultos. Desde nuestros hallazgos postulamos que la función del CI-MPR en los primeros estadios del desarrollo podría estar orientada al crecimiento y diferenciación celular y que posteriormente su afinidad por las enzimas lisosomales aumenta debido a modificaciones en su estructura. De este modo, en los adultos funciona como transportador de enzimas lisosomales.

El CD-MPR en cambio, aumenta su expresión, su número de sitios activos y su afinidad a partir de los 10 días postnatales en hígado, estas propiedades se correlacionan con la mayor expresión de enzimas lisosomales y con una mayor interacción de las enzimas con CD-MPR en este período. Por ello postulamos que este receptor es fundamental en la biogénesis del aparato lisosomal entre los 10 y 20 días de desarrollo. En cerebro, el CD-MPR tiene algunas propiedades diferentes, mientras que la expresión es constante, el número de sitios activos disminuye y la afinidad se incrementa durante el desarrollo. Esto indicaría que en cerebro existe una maduración lisosomal diferente, iniciándose en una etapa temprana del desarrollo y terminando su desarrollo total hacia los 20 días postnatales..

CAPITULO I

INTRODUCCION

EL TRANSPORTE INTRACELULAR:

Todas las células necesitan comunicarse con su entorno. Las células eucariotas, a diferencia de las procariontes, han adquirido un complejo sistema membranoso interno que les permite captar los nutrientes por el proceso denominado **endocitosis**, y ponerlas en contacto con enzimas digestivas que se almacenan intracelularmente en los **lisosomas**. A medida que se produce la digestión, los metabolitos van saliendo directamente desde los lisosomas hacia el citosol.

Además de la vía endocítica, las células eucariotas pueden regular, por medio de la **vía biosintética-secretora**, la liberación al exterior de las proteínas y glúcidos recién sintetizados.

Las moléculas que ingresan en esta vía, pasan por una serie de compartimientos membranosos, pudiendo modificarse en forma controlada por la célula y almacenarse hasta su utilización. En ese momento, las moléculas pueden transportarse a la superficie celular y liberarse por procesos de **exocitosis**.

Ambas rutas de transporte, endocítica y biosintética-secretora comparten algunos compartimientos. El lumen de los compartimientos membranosos de estas vías son topológicamente equivalente al exterior de la célula. Además, ambas rutas emplean intermedios vesiculares para transportar y dirigir las proteínas a su ubicación específica. Estas vesículas emergen por gemación de una membrana dadora, viajan por la célula con un sentido y se fusionan específicamente con la membrana aceptora.(1)

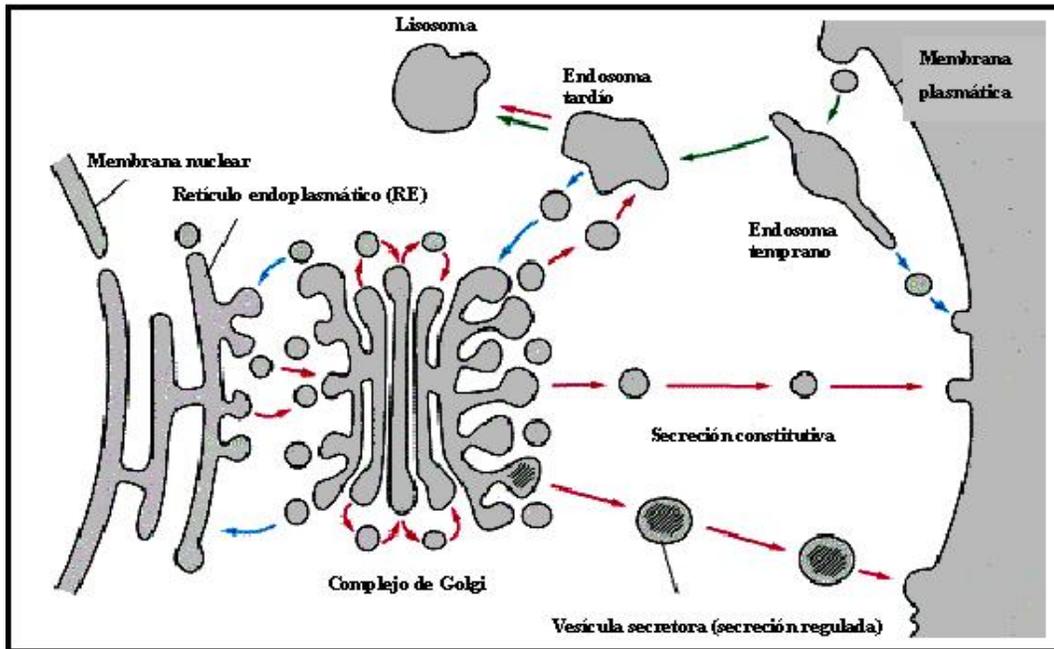


Figura 1.1: Compartimentos implicados en las vías de transporte intracelular. En la ruta biosintética-secretora (flechas rojas) las proteínas son transportadas desde RE a lisosomas (vía endosomas tardíos) ó a la membrana plasmática (secreción constitutiva o regulada). En la vía endocítica (flechas verdes) las moléculas son ingeridas mediante vesículas formadas a partir de la membrana plasmática, conducidas a los endosomas tempranos y por medio de endosomas tardíos, a los lisosomas. Esta figura fue reproducida a partir de Alberts et al (1) y modificada.

1.1- La vía endocítica celular:

La endocitosis permite la entrada de sustancias a través de vesículas que surgen por invaginación y posterior estrangulamiento de la membrana plasmática. Este proceso puede ocurrir por múltiples mecanismos que se engloban en dos categorías: **fagocitosis**, cuando la célula internaliza partículas de gran tamaño y **pinocitosis**, cuando la célula internaliza fluidos y solutos Figura 1.2.

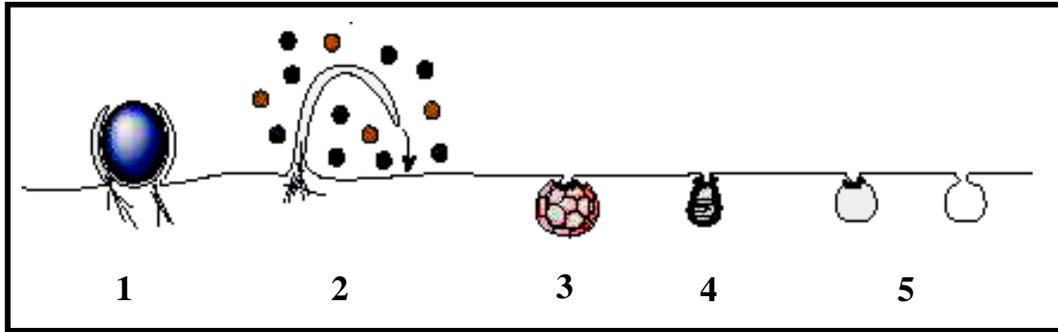


Figura 1.2: Múltiples puertas de entrada de las células de mamíferos. 1- Fagocitosis. 2- Macropinocitosis. 3- Endocitosis mediada por clatrina. 4- Endocitosis mediada por caveolina. 5- Endocitosis independiente de clatrina y caveolina. Esta figura fue reproducida a partir de S.Conner and S. Schmid (10).

1.1.1-Fagocitosis:

La fagocitosis es la ingestión de grandes partículas (microorganismos, restos celulares) formando grandes vesículas, los fagosomas, con un diámetro superior a 250 nm. Este proceso se produce en mamíferos por células especializadas como monocitos, macrófagos y neutrófilos que eliminan patógenos como bacterias o levaduras y que “limpian” restos de células muertas y depósitos arteriales de grasa (2).

Este proceso involucra la participación de receptores presentes en la superficie de los fagocitos y cascadas de señalización mediadas por proteínas de la familia de Rho GTPasas (3). Por ejemplo: el receptor para Fc en macrófagos, reconoce anticuerpos unidos a antígenos de superficie de las bacterias y desencadena una cascada de señalización involucrando la activación de Cdc 42 y Rac, que activan el ensamble de actina y la emisión de pseudópodos para englobar la bacteria recubierta por el anticuerpo (modelo de cierre relámpago).

En la fagocitosis de patógenos se desencadena una respuesta inflamatoria. La bacteria ingresa en la vía fagocítica, que culmina con la destrucción de la bacteria, por agentes ácidos, radicales libres de oxígeno o hidrolasas ácidas. Luego, los péptidos bacterianos procesados son expuestos en la superficie de macrófagos, activando la respuesta inmune.

La fagocitosis también se utiliza para destruir células muertas, de tejidos dañados o células que ya han dejado de cumplir su función durante el desarrollo embriológico. En este caso el mecanismo es similar pero se activan otras Rho GTPasas que no desencadenan una respuesta inflamatoria (4).

1.1.2- Pinocitosis:

La pinocitosis es el proceso en el cual la célula ingiere fluidos y solutos formando pequeñas vesículas (diámetro menor o igual a 150 nm). Como se observa en el esquema de la Figura 1.2 existen cuatro mecanismos básicos de pinocitosis: macropinocitosis, endocitosis mediada por caveolina, endocitosis mediada por clatrina y endocitosis independiente de caveolina y de clatrina.

1.1.2.1- Macropinocitosis:

La macropinocitosis es producida por grandes protrusiones (“ruffles”) de la membrana plasmática que se inician, en muchos tipos celulares, en respuesta a factores de crecimiento u otras señales. En este proceso también participan las GTPasas de la familia Rho que activan la polimerización de filamentos de actina para formar las extensiones de la membrana y englobar grandes volúmenes de medio extracelular. Por ejemplo: la activación de las células dendríticas presentadoras de antígenos provoca una prolongada actividad macropinocítica que permite a la célula ingresar grandes volúmenes de medio extracelular para llevar a cabo su rol en la vigilancia inmunológica (5).

1.1.2.2- Endocitosis mediada por caveolina:

Las caveolas son invaginaciones de la membrana plasmática que se observaron por primera vez en células endoteliales. Actualmente se sabe que se encuentran en muchos tipos celulares y que constituyen microdominios ricos en colesterol y esfingolípidos. La forma y organización estructural de las caveolas está dada por la proteína dimérica caveolina que se inserta en la bicapa lipídica interna, asociándose con colesterol y con ella misma para formar la cubierta de la invaginación de membrana.

El rol de las caveolas en la endocitosis no se ha elucidado totalmente. El ejemplo más estudiado es el producido en células endoteliales con la endocitosis de albúmina sérica. Uno de los mecanismos está dado por activación del receptor de albúmina,

gp60, que induce fosforilación en tyr de caveolina y otros constituyentes de las caveolas, vía activación de tirosinquinasa Src. (6,7,8) Figura 1.3.

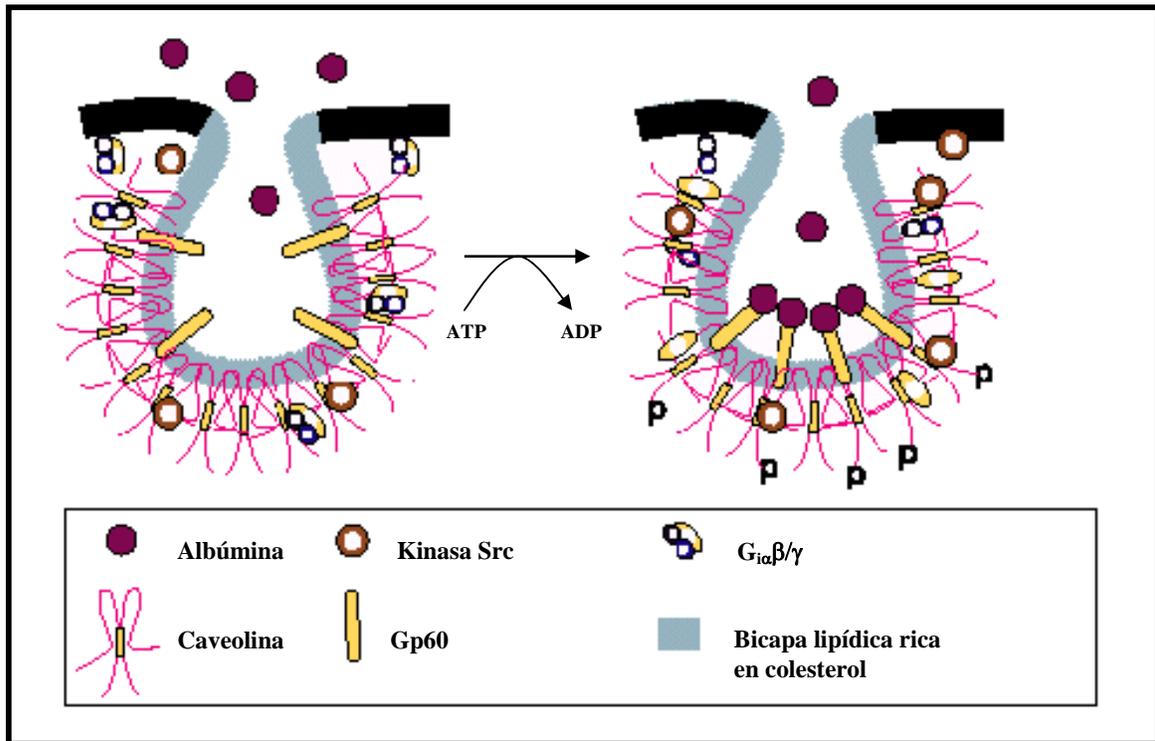


Figura 1.3: Endocitosis mediada por caveolina. La unión de albúmina a su receptor gp60 en caveolas activa G_{αβ/γ} y kinasas Src e induce su endocitosis. Esta figura fue reproducida a partir de S.Conner and S. Schmid (10).

1.1.2.3- Endocitosis independiente de caveolina y clatrina:

Esta endocitosis es producida en microdominios que en forma semejante a las caveolas son ricos en colesterol y que se denominan “rafts”. Son estructuras que circulan libremente por la superficie celular, frecuentemente pueden ser capturados e internalizados en vesículas endocíticas. Por ejemplo, la toxina shiga y la de cólera se unen a estos “rafts” y luego son endocitadas en vesículas recubiertas con clatrina (CCVs) (9,10). También existen casos de endocitosis a través de “rafts” pero independientes de clatrina o caveolina como la interleuquina 2 (11), que es reconocida por receptores de linfocitos.

1.1.2.4- Endocitosis mediada por clatrina (EMC):

La EMC es un proceso que se produce en todas las células y que tiene como principal finalidad incorporar nutrientes, como es el caso del colesterol derivado de las LDL plasmáticas a través del receptor de LDL o Fe^{2+} desde la transferrina, a través de su receptor (14,15).

Además, la EMC regula algunos mecanismos de transducción de señales mediado por receptores, porque controla los niveles de los receptores superficiales para impedir una permanente activación de ellos. También regula la homeostasis sérica a través de la internalización de bombas en la membrana que controlan el paso de iones y de pequeñas moléculas.

La EMC se inicia en zonas de concentración de receptores transmembrana y sus ligandos en “fositas recubiertas” en la membrana plasmática. Estas fositas están recubiertas por el lado interno con proteínas citosólicas de cubierta que se ensamblan formando complejos visibles por microscopía electrónica. Luego, las fositas se invaginan y dan origen (por estrangulamiento) a una vesícula endocítica recubierta con clatrina (CCV), la cual transporta una gran cantidad de complejos ligando-receptor en su interior.

La clatrina es la principal proteína de cubierta y posee una estructura con tres prolongaciones denominada “triskelion” (Figura 1.4), formada por tres cadenas pesadas (CHC) que se asocian con tres cadenas livianas (CLC) (15,16). Con bajas concentraciones de sal y elevadas concentraciones de calcio los triskelions se autoensamblan en una estructura en caja cerrada, mientras que en condiciones fisiológicas, esto ocurre en presencia de proteínas de ensamble denominadas “adaptinas” (APs). Las adaptinas, a su vez, son estructuras heterotetraméricas que se ubican entre la clatrina y la membrana de las fositas. Se conocen hasta el momento cuatro familias de estos complejos (AP1-AP4) (15,17) y cada tipo de adaptina participa en la formación de vesículas que son vehículo de distintas rutas intracelulares (18). La AP-2 es la que media la formación de CCVs en la endocitosis mediada por receptores (Figura 1.4).

Además de clatrina y adaptinas, existen otras proteínas que participan de la CME, como la dinamina, que es una proteína con actividad GTPásica que participa en la etapa final de la formación de CCVs. Forma anillos helicoidales alrededor del cuello de la fosita invaginada, permitiendo su separación de la membrana plasmática (20,21). Otras proteínas, como anfifisina, Eps 15 e intersectina funcionan para conectar la maquinaria endocítica con el citoesqueleto (22,23).

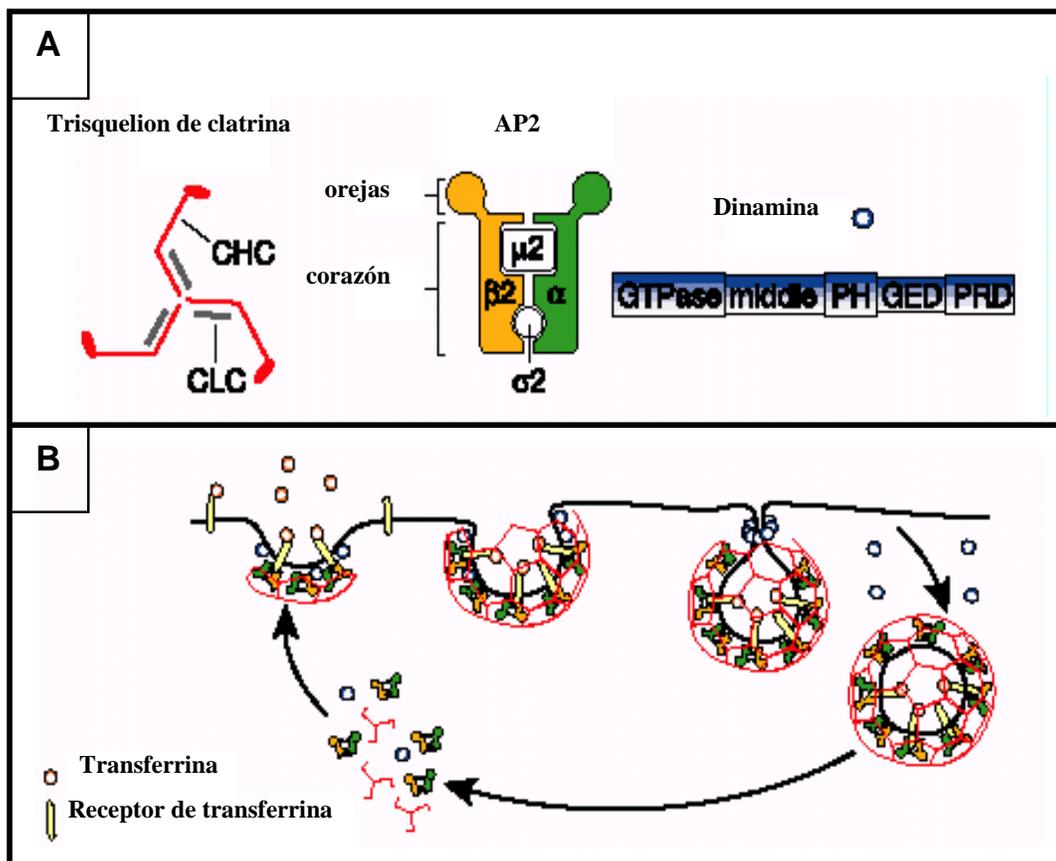


Figura 1.4: Endocitosis mediada por clatrina. A: Componentes principales de la maquinaria de EMC. Se observa la estructura de los “triskelion” de clatrina que se asocian para formar el complejo de cubierta, el complejo de la AP2 y la dinamina, una ATPasa que se ubica alrededor de la invaginación. B: Representación del proceso de endocitosis mediada por clatrina de los receptores a Transferrina. Esta figura fue reproducida a partir de S.Conner and S. Schmid (10).

1.2- La vía biosintética-secretora:

Esta vía es conocida también como transporte anterógrado. La síntesis de todas las proteínas celulares comienza en ribosomas libres en el citosol. Sólo aquellas que portan un “péptido señal” hidrofóbico son trasladadas al lumen del RER, donde se pliegan y oligomerizan. En el mismo RER, las proteínas sufren modificaciones co-traduccionales como la N-glicosilación (incorporación de carbohidratos a residuos asparagina) y la formación de puentes disulfuro (1). Posteriormente las proteínas siguen

una ruta que las llevará a la superficie celular o a cualquier otro sitio por medio de vesículas que siguen procesos de gemación y de fusión. En esta ruta pasan por el complejo de Golgi (Golgi), en donde sufren otras modificaciones y son clasificadas y seleccionadas para su destino final (1).

El complejo de Golgi es una organela formada por cisternas aplanadas limitadas por membrana, y además hay vesículas que también pertenecen al complejo y que realizan el transporte entre cisternas. El Complejo de Golgi presenta dos zonas, la de entrada de vesículas o zona *cis*, generalmente más próxima al núcleo, y la de salida o zona *trans*, las cuales muestran una apariencia de red de túbulos y vesículas llamadas red del *cis Golgi* (CGN) (o compartimiento intermedio) y red del *trans Golgi* (TGN).

Las vesículas destinadas al CGN emergen desde zonas específicas del RER libres de ribosomas. Estas vesículas de transporte no son selectivas, ya que transportan cualquier proteína desde el RER al CGN.

A veces las proteínas residentes en RER escapan en estas vesículas y llegan a CGN, pero éstas poseen una señal de retención que indica que deben ser devueltas al RER. Existen varias señales de retención aunque la más conocida es la secuencia de tetrapéptido KDEL que se une a receptores específicos en las membranas del CGN para empaquetar esas proteínas en vesículas que vuelven a RER.

Las proteínas que continúan la ruta anterógrada pueden sufrir una serie ordenada de modificaciones sobre sus residuos oligosacáridos.

Las glucoproteínas de mamíferos pueden contener dos tipos de oligosacáridos, los **oligosacáridos ricos en manosa**, que contienen dos residuos N-acetilglucosaminas y muchos residuos de manosa; y los **oligosacáridos tipo complejo**, que pueden tener más de dos N-acetilglucosaminas, manosas y otros residuos como galactosa, ácido siálico y a veces de fucosa, que son añadidos en el TGN. Una tercera forma son los híbridos que tienen una mezcla de las 2 formas anteriores. Una misma proteína puede tener varios de estos residuos. El hecho de que un oligosacárido se mantenga rico en manosa o sea procesado depende de que la configuración de la proteína permita o no el acceso de las enzimas de procesamiento del Complejo de Golgi (Figura 1.5).

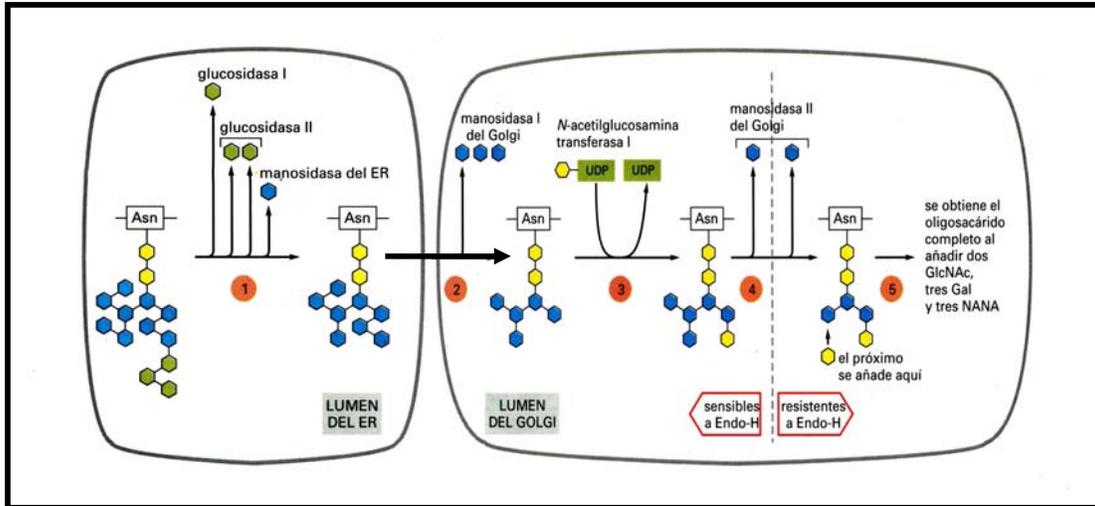


Figura 1.5: Procesamiento de los oligosacáridos en el ER y en el Complejo de Golgi. Se muestran las principales enzimas que participan en el procesamiento de los oligosacáridos de las glicoproteínas. La complejidad del proceso depende del tipo de proteína y de la localización en la proteína del residuo asparagina (Asn) al que se halla unido el oligosacárido. Clave: N-acetilglucosamina, en amarillo; Manosa, en celeste; Glucosa, en verde. Esta figura fue reproducida a partir de Alberts *et al* (1).

1.2.1- Transporte desde el TGN a la superficie celular. Exocitosis:

La fusión de vesículas de transporte con la membrana plasmática y la liberación de su contenido al medio extracelular se denomina **exocitosis**. De este modo, las proteínas y lípidos de las membranas de estas vesículas aportan nuevos componentes a la membrana plasmática. Cuando el flujo de vesículas es continuo y poco específico se denomina **ruta de secreción constitutiva**, y es la forma en que se secretan los proteoglicanos y glicoproteínas de la matriz extracelular. Esta ruta también se denomina ruta por defecto porque siguen este camino aquellas proteínas que no han sido retenidas como residentes del RE, ni del Complejo de Golgi, y que tampoco han sido seleccionadas para su retención o almacenamiento en otro compartimento.

Existe, además, una **ruta de secreción regulada** en la que las proteínas solubles son seleccionadas y almacenadas en vesículas de secreción (o gránulos) y son secretadas sólo cuando la célula recibe una señal. Este es el caso de la secreción de hormonas, neurotransmisores y enzimas digestivas. Estas vesículas son cubiertas con clatrina en su comienzo y se caracterizan por formar agregados proteicos electrodensos. Luego de

emerger del Aparato de Golgi, estas vesículas pierden su cubierta de clatrina y se concentran aún más, hasta llegar a unas 200 veces. Además de concentrarse, las proteínas de secreción también sufren procesamiento proteolítico como parte de su maduración en esta ruta, incluso su activación final puede darse en el espacio extracelular. La exocitosis de estas vesículas responde a una señal específica que es transmitida por mensajeros químicos que actúan en receptores de la superficie celular y generan señales intracelulares que incluyen a menudo incrementos transitorios del calcio libre en el citosol que activa la fusión de las vesículas de secreción con la membrana plasmática (1).

1.2.2- Transporte desde el TGN a los lisosomas:

Los lisosomas son organelas celulares que contienen enzimas hidrolíticas encargadas de la digestión controlada de macromoléculas. Contienen, en su lumen, alrededor de 40 tipos de enzimas hidrolíticas: proteasas, nucleasas, glicosidasas, lipasas, fosfolipasas, fosfatasas y sulfatasas. Se las denomina también hidrolasas ácidas porque su actividad óptima de acción ocurre a pH cercano a 5. Además, su membrana también tiene proteínas específicas de transporte de aminoácidos, azúcares y nucleótidos y otros productos finales de la digestión celular. También contienen una bomba de protones que utiliza la energía liberada de la hidrólisis del ATP, para bombear protones al interior del lisosoma manteniendo el lumen a pH ácido.

En los lisosomas convergen diferentes corrientes de tráfico vesicular, las sustancias a digerir pueden provenir del exterior celular por endocitosis o fagocitosis o del interior por autofagia. Las enzimas lisosomales llegan al lisosoma por una ruta que pasa por el RER y el Complejo de Golgi.

Los precursores de estas enzimas sufren modificaciones especiales en el aparato de Golgi ya que incorporan un residuo **manosa-6-fosfato** a los oligosacáridos. Esto surge de la acción secuencial y coordinada de dos enzimas residentes en la región *cis* del aparato de Golgi: la N-acetil-glucosaminil fosfotransferasa y la N-acetil-glucosaminafosfodiesterasa. El residuo **manosa-6-fosfato** adicionado a las hidrolasas es reconocido luego por **receptores a manosa-6-fosfato específicos**, que se localizan en las membranas de la región *trans* del aparato de Golgi (TGN). Los receptores concentran las hidrolasas ácidas a pH 7 para discriminarlas de otras proteínas y permitir su inclusión en las vesículas de transporte. Estas vesículas, que son cubiertas con clatrina, viajan y se fusionan con un compartimiento prelisosomal, donde su pH ácido (próximo a 6) permite la disociación de

los complejos enzima-receptor. Mientras las enzimas son transportadas a los lisosomas, los receptores reciclan al TGN (Figura 1.6).

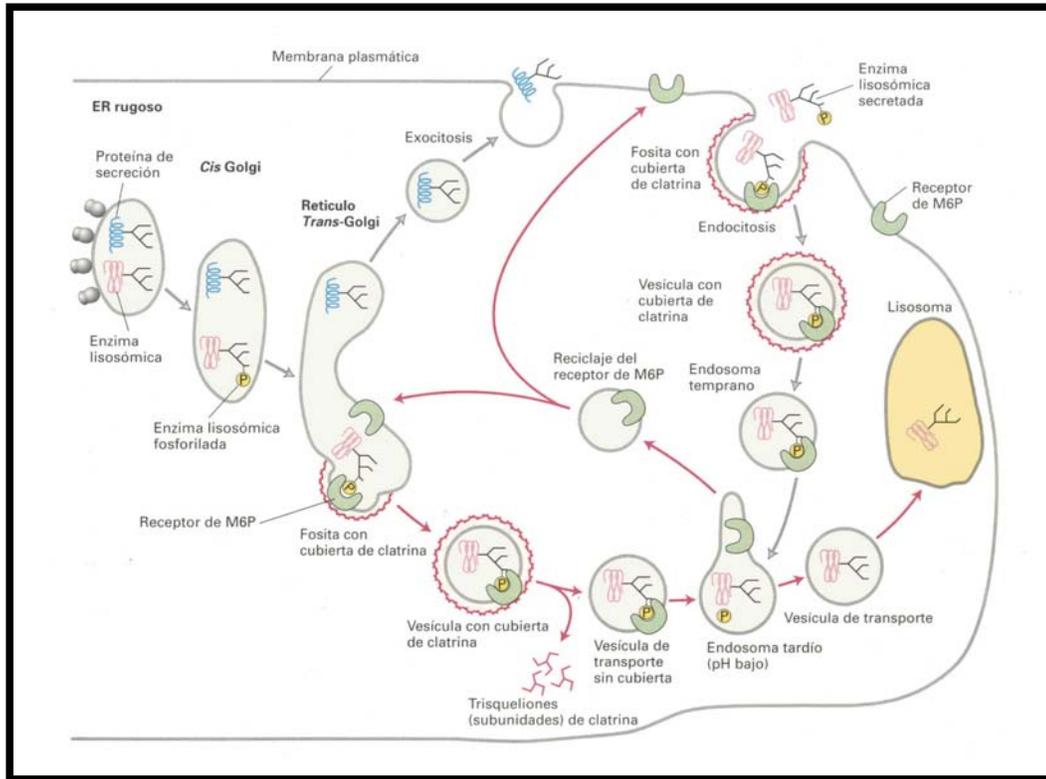


Figura 1.6: Esquema del transporte de hidrolasas ácidas sintetizadas "de novo" a los lisosomas. Los precursores de hidrolasas lisosomales se modifican por la adición de un residuo manosa-6-fosfato (M6P) en la región cis del aparato de Golgi. El receptor concentra las hidrolasas ácidas para discriminarlas de otras proteínas y permitir su inclusión en las vesículas de transporte. Las vesículas cubiertas con clatrina se desprenden del TGN y luego de liberar la cubierta se fusionan con los endosomas tardíos, donde el pH ácido de los mismos disocia el ligando del receptor. Los receptores reciclan luego al aparato de Golgi donde serán reutilizados. En los endosomas tardíos se produce la remoción del grupo fosfato de la manosa asegurando de este modo que las hidrolasas no regresarán al aparato de Golgi. Esta figura fue reproducida a partir de Lodish et al (12).

No todas las enzimas lisosomales son transportadas directamente a los lisosomas. Algunas moléculas (aproximadamente el 10 %) escapan al proceso de empaque en el *trans* Golgi y son transportadas inespecíficamente a la superficie celular, donde son secretadas al medio extracelular. La existencia de receptores a manosa-6-fosfato en la membrana plasmática permite volver a capturar las enzimas que han escapado y las devuelve a los lisosomas por un proceso endocítico (24,25,26,27,28) (Figura 1.6).

Los individuos afectados de mucopolisacaridosis tipo II o enfermedad de "I-cell", una rara enfermedad genética autosómica recesiva, carecen de la enzima N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa y no pueden fosforilar los grupos manosa de las enzimas lisosomales. En esta enfermedad, las hidrolasas no llevan manosa-6-fosfato, y al no ser reconocidas por sus receptores específicos son secretadas al medio extracelular. Esto explicaría las elevadas concentraciones de ciertas hidrolasas en la sangre de estos pacientes, con consecuencias patológicas severas (29,30,31).

Existen evidencias sobre otros mecanismos de transporte para hidrolasas ácidas.

En la misma enfermedad de "I-cell" los lisosomas de los hepatocitos contienen un complemento normal de enzimas lisosomales, sugiriendo la existencia de rutas alternativas que permitan que las hidrolasas lleguen a los lisosomas en algunos tipos celulares. Hasta el momento, se desconoce la naturaleza de esta posible vía independiente de manosa-6-fosfato.

Otro ejemplo de vía alternativa es el de las proteínas de membrana lisosomal, como la fosfatasa ácida y las glicoproteínas asociadas a membranas, lamp 1 y 2, las cuales no contienen manosa-6-fosfato en su molécula. Aún no está claro por qué la célula necesita más de un mecanismo para generar un lisosoma, aunque no es sorprendente que se utilicen diferentes vías para proteínas solubles y unidas a membrana (1).

1.3- LOS RECEPTORES A MANOSA-6-FOSFATO (MPRs):

Hasta el momento se han identificado y caracterizado dos formas de los receptores que reconocen con alta afinidad la señal de manosa-6-fosfato; el receptor catión dependiente de 46 kDa (CD-MPR), que necesita iones bivalentes como Ca^{+2} , Mg^{+2} o Mn^{+2} en muy bajas concentraciones para interactuar con sus ligandos; y el receptor catión independiente de 300 kDa (CI-MPR) que actúa aún en ausencia de los iones (32,33,34). Estos receptores son los dos únicos miembros de la familia de lectinas de tipo P, puesto que son las únicas lectinas que reconocen los residuos de manosa fosforilada (35).

Ambos MPRs coexisten en la mayoría de los tipos celulares y presentan similar distribución subcelular (36,37). A pesar de que aún se discute el verdadero rol de estos receptores y la razón de su coexistencia en la mayoría de las células, algunas evidencias parecen ser irrefutables; el CD-MPR participa solamente en el transporte de enzimas lisosomales endógenas (38,39) y no participa en la endocitosis.

En contraste, el CI-MPR es una glicoproteína multifuncional que, además de transportar las enzimas lisosomales endógenas y exógenas (40,41,42,43,44) reconoce y transporta ligandos no glicosilados, como el factor de crecimiento similar a la insulina de tipo II (IGF-II). De allí que se lo denomine también como IGF2R ó como IGFII/MPR. Otros ligandos que también reconoce el CI-MPR son: renina, ácido retinoico, factor de crecimiento transformante (TGF- β 1), etc.

1.3.1- Estructura y Biosíntesis del CD-MPR:

1.3.1.1- Estructura primaria, organización genómica y expresión :

El CD-MPR fue descrito por primera vez cuando se estudiaba el transporte intracelular de enzimas lisosomales en células que carecían del CI-MPR (38). Su secuencia aminoacídica fue deducida y estudiada a partir de los cDNAs clonados de diferentes orígenes: bovino (44); humano (45); ratón (46,47) y rata (48) presentando alta homología entre ellas.

Es una glicoproteína transmembrana de tipo I que está compuesta por cuatro dominios estructurales: la secuencia señal amino terminal de 28 aminoácidos en el CD-MPR bovino, la región extracitoplasmática de 159 residuos, que contiene el sitio de unión a M6P, el dominio transmembrana formado por un único paso de sólo 25 aminoácidos y los 67 residuos carboxi terminal presentes en el citosol que controlan el tráfico del receptor. Una característica notable de este receptor es que el dominio extracelular posee

una única copia con las mismas particularidades de una porción que se repite 15 veces en el CI-MPR (Figura 1.7).

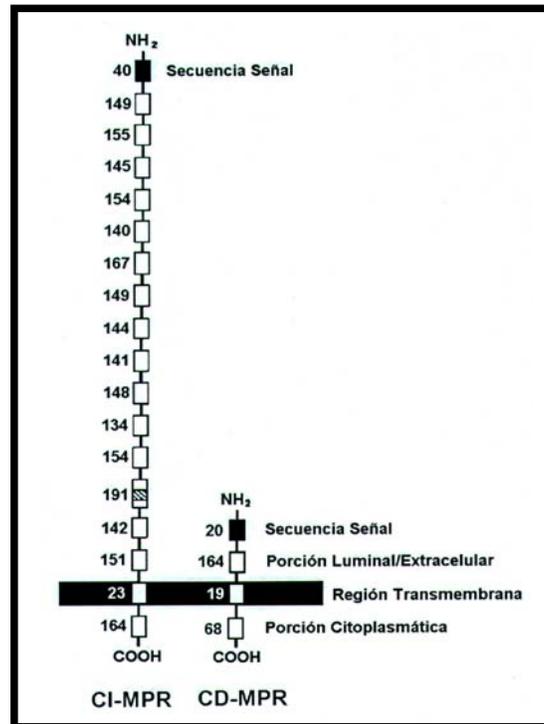


Figura 1.7: Esquema de los receptores a manosa-6-fosfato catión dependiente CD-MPR de 45 kDa y catión independiente (CI-MPR) de 300 kDa.

El gen que codifica el CD-MPR de ratón ha sido localizado en el cromosoma 6 (49) mientras que en humano se encuentra en el cromosoma 12 y consta de 7 exones que abarcan una región de 12-kb (45).

El análisis de la región promotora del gen del CD-MPR humano tiene características similares a las de los promotores de genes “housekeeping”, sugiriendo que este gen se encuentra constitutivamente expresado en tejidos humanos (50). Sin embargo, análisis cuantitativos de varios tejidos humanos y líneas celulares revela diferencias de concentración de este receptor según el tipo celular y el tejido específico. (51) Además, en ratones y pollos, se han observado diferentes niveles de RNAm durante el desarrollo y en tejidos adultos. (49,52 ,53)

1.3.1.2- Biosíntesis y modificaciones co y postraduccionales del CD-MPR:

La proteína no glicosilada tiene un peso molecular aparente de 28 kDa, indicando que una gran parte de la masa del receptor está compuesta por carbohidratos (39). Como se observa en la Figura 1.8, el polipéptido naciente sufre inserción cotraduccional en la membrana del RER y glicosilación en 4 de los 5 potenciales sitios para N-glicosilación en el dominio extracitoplasmático ó luminal (44,54,55,56). Numerosos estudios *in vitro* (38,58,60,61) e *in vivo* (55,57,59) han demostrado que estos oligosacáridos no tienen un rol directo en la interacción con el ligando. No obstante, los oligosacáridos permiten el correcto plegamiento tridimensional del CD-MPR, siendo esto un prerrequisito para la unión y el transporte de ligandos (56).

En el dominio luminal hay además 6 residuos de Cys que generan tres puentes disulfuro intramoleculares (62) que son fundamentales para el correcto plegamiento del receptor y para la adquisición de las propiedades de unión al ligando (58,59,63,64).

El CD-MPR se ensambla en formas oligoméricas no-covalentes, que son reguladas por la concentración del receptor, pH, temperatura, y la presencia de cationes divalentes y ligandos (63,65,66). En las membranas el receptor se organiza predominantemente como un homodímero, aunque también se han observado formas monoméricas, triméricas y tetraméricas (Figura 1.8) (39,63,65-73). El significado fisiológico de estas últimas formas no es claro, y algunos estudios *in vitro* han demostrado que la unión con el ligando y el pH afectan el estado oligomérico del receptor (65,66). Actualmente se acepta que la unión con el ligando provoca un cambio conformacional del receptor, existiendo una forma unida al ligando que difiere espacialmente de la forma libre del dímero (61,62,73).

Estudios *in vitro* (74) e *in vivo* (75) han demostrado que el CD-MPR de bovino se fosforila en la Serina (Ser) 57 del dominio carboxilo-terminal por la acción de la casein kinasa II, y es desfosforilado por la proteín fosfatasa 2A (74). Esta fosforilación en Ser podría regular la presencia del CD-MPR en la membrana plasmática (76) o bien la interacción del dominio citoplasmático con la proteína de cubierta AP-1 (77). Si bien se acepta que esta modificación tenga un rol en el transporte del receptor, no está claro como se produciría.

La palmitoilación del receptor sobre las Cys 30 y 34, permite un anclaje de su dominio citoplasmático a la membrana (78), y la presencia de dos residuos aromáticos Fenilalanina y Triptofano (Phe 18 y Trp 19) (79) permiten la formación de un “loop” de señalización que evita la degradación del receptor y permite el correcto transporte de enzimas lisosomales a lisosomas (79,80).

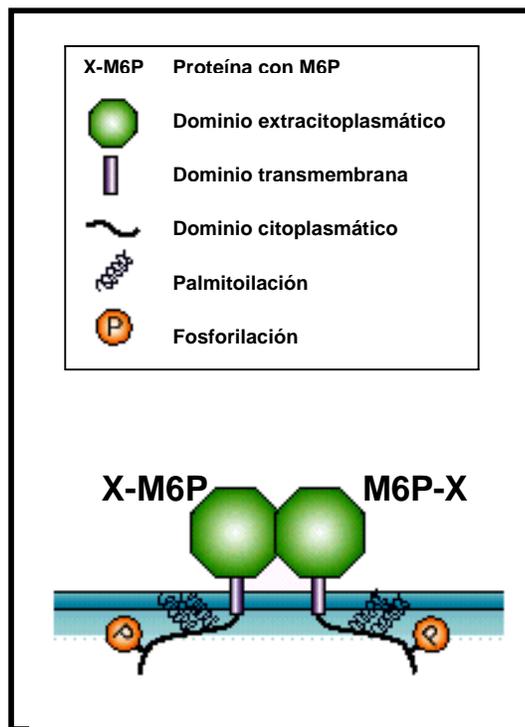


Figura 1.8: Estructura y modificaciones co y postraduccionales del CD-MPR. Este receptor existe predominantemente como dímero en las membranas, conteniendo un sitio de unión a M6P por péptido. Esta figura fue reproducida a partir de P. Ghosh et al. (13) y modificada.

1.3.1.3- Estructura cristalina y bases moleculares del reconocimiento del carbohidrato:

La primer estructura cristalina del CD-MPR se obtuvo del constructo Asn81/STOP155 que fue generado en baculovirus y expresado en células de insectos (62). El mismo contiene la secuencia señal y los aminoácidos 1-154 de la región extracitoplasmática del receptor bovino. Además, para minimizar la heterogeneidad resultante de la N-glicosilación, los residuos de Asn en las posiciones 31, 57, 68 y 87 fueron sustituidos por residuos Gln, dejando intacto un único residuo Asn en la posición 81 (57,69, 81, 82). Este constructo cristalizó como un homodímero no covalente, con un 20 % de contacto superficial entre cada monómero, y predominantemente con interacciones hidrofóbicas (62). Como se observa en la Figura 1.9, cada monómero contiene una única α -hélice cercana a su extremo N-terminal, seguida de 9 cadenas β anti-paralelas que forman dos láminas β ubicadas perpendicularmente entre sí. Debido a gran cantidad de

interacciones hidrofóbicas entre ambas láminas β se forma una estructura en barril β (Figura 1.9A).

El estudio cristalográfico de Asn81/STOP155 unido a pentamansilfosfato demostró que el sitio de unión del ligando abarca el grupo fosfato y los tres residuos de manosa terminales (61). La zona de unión del carbohidrato está localizada profundamente en el receptor, favoreciendo las interacciones iónicas y de enlaces puente H entre receptor y ligando y otorgando una afinidad tres órdenes de magnitud superior que las que ofrecen otras lectinas como las galectinas (81). El grupo fosfato también se une a una molécula de agua y a un catión Mn^{2+} (61,62), lo que explica el requerimiento de este catión en la purificación y caracterización de CD-MPR bovino (38,39,63,83,84). El receptor murino demuestra un comportamiento similar en su habilidad de unión en presencia de Mn^{2+} (47,71).

La comparación entre la estructura del receptor libre y unida al ligando muestra un dramático cambio conformacional en contraste con otras lectinas (61,62,73). La transición entre las forma libre y unida al ligando requiere que los monómeros sufran corte y plegamiento entre ellos, de tal forma que la conformación “cerrada” de la estructura libre de ligando se transforme en la conformación “abierta” típica de la forma unida al ligando (73) (Figura 1.9B).

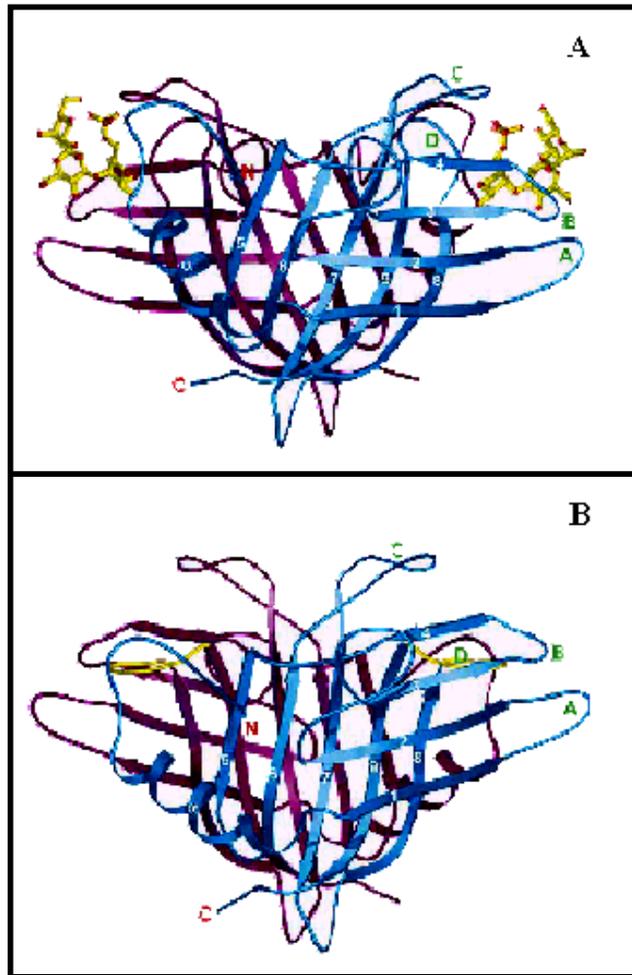


Figura 1.9: Estructura cristalina de la región extracitoplasmática del CD-MPR de bovino.

La estructura obtenida en presencia de pentamanosilfosfato (A) muestra que cada monómero (púrpura y azul) comienza con una única α -hélice (α en su extremo N-terminal, seguida de 9 láminas beta (1-9) y 4 “loops” entre ellas (A-D). En amarillo se graficó sólo el grupo fosfato y tres anillos manosa del pentamanosilfosfato. La estructura cristalina de la forma no unida (B) muestra cambios conformacionales significativos, sobre todo en los “loops” C y D. Esta figura fue reproducida a partir de N. Dahms y M. Hancock (11).

1.3.2- Estructura y Biosíntesis del CI-MPR:

1.3.2.1- Estructura primaria, organización genómica y expresión :

La secuencia primaria completa de este receptor se dedujo a partir de clones de cDNA que se obtuvieron de diversas fuentes: bovina (85,86), humana (87,88), ratón (89,90), rata (91), pollo (92), y de otras especies.

Tal como el CD-MPR, este receptor es una glicoproteína transmembrana de tipo I con una secuencia señal aminoterminal de 44 aminoácidos, una región extracitoplásmica que contiene 2269 residuos, un único dominio transmembrana de 23 residuos y un dominio citoplasmático carboxiterminal de 163 residuos.

A diferencia del CD-MPR, el CI-MPR contiene 15 dominios de tamaño similar (147 residuos en promedio) en su región extracitoplasmática, con una identidad de secuencia entre un 14 y un 38 %, y con una distribución de Cys similar entre cada dominio y al CD-MPR. La naturaleza multifuncional del CI-MPR es demostrada por la presencia de dos sitios de unión al carbohidrato (dominios 3 y 9) y uno de unión al IGF-II (dominio 11) en su región luminal/extracelular (87,91,93-96) (Figura 1.10).

Su estructura genómica completa ha sido analizada en ratón (90) y humano (97). En este último se encuentra en el cromosoma 6, tiene un tamaño aproximado de 136 kb y consiste de 48, exones de los cuales 46 corresponden a la porción extracelular (97).

El CI-MPR tiene una expresión específica de cada tejido y es regulada durante el desarrollo. (52,53,98,99). Si se comparan los niveles de expresión de ambos receptores durante el desarrollo embriológico de ratón se observa que hasta el día 15,5 de gestación existe un patrón de expresión en órganos que no se superpone (53). En el caso de la expresión en los tejidos humanos adultos se han encontrado diferencias de hasta 8 veces mayor concentración del CD-MPR con respecto al CI-MPR (52).

1.3.2.2- Biosíntesis y modificaciones co y postraduccionales:

Como se observa en la figura 1.10 el CI-MPR contiene 19 sitios potenciales para N-glicosilación en su región extracitoplásmica (85). Si bien no está claro cuántos de estos sitios son realmente glicosilados se ha demostrado que el receptor recién sintetizado adquiere oligosacáridos de alta manosa, que luego son convertidos en oligosacáridos de tipo complejo presentes en el receptor maduro (100,101). Estos oligosacáridos no son requeridos para la unión a manosa-6-fosfato ni al IGF-II (101,102).

La presencia de puentes disulfuro ha sido confirmada indirectamente en un número de estudios con el uso de agentes reductores (101-105). Estos puentes disulfuro, son

importante para el correcto plegamiento del receptor, del mismo modo que para el CD-MPR.

El CI-MPR presenta tres potenciales sitios de fosforilación en Ser en su dominio citoplasmático, dos de los cuales, Ser 85 y Ser 156, han sido demostrados por estudios *in vivo* e *in vitro* (110-112). Estudios en células de ovario de hámster chino (células CHO) correlacionaron la fosforilación en estos dos sitios con la localización del receptor en TGN y en CCV (113). Otros recientes estudios demostraron que esta fosforilación regula la velocidad de internalización del receptor (117). Además de la fosforilación, ciertos residuos ácidos adyacentes a la Ser 156 y al motivo dileucina ubicado en la zona N-terminal son componentes claves para el reconocimiento por proteínas caracterizadas, por localizarse en Golgi y por contener la subunidad γ de las adaptinas y secuencias de factores de ribosilación de ADP (ARF). Estas proteínas son las GGAs (114-116,118). Finalmente se puede concluir que la fosforilación modula la cinética del movimiento del CI-MPR en vez de ser una llave de encendido/apagado del mismo (11).

El dominio citosólico del CI-MPR es, como en el caso del CD-MPR, un sustrato para palmitoilación, aunque se desconoce su significado funcional (Figura 1.10).

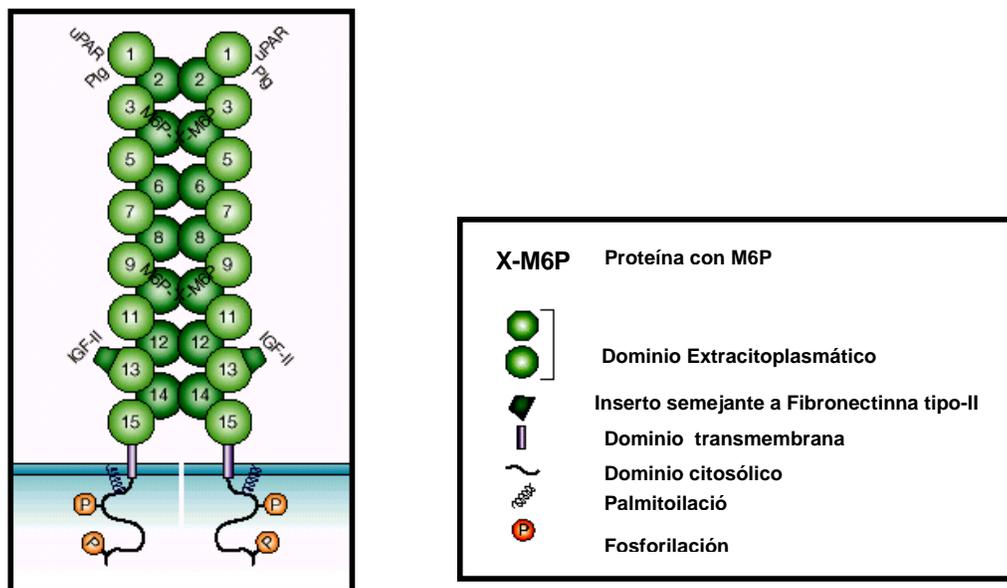


Figura 1.10: Estructura y modificaciones co y postraduccionales del CI-MPR.

Además de especies monoméricas, recientes estudios demostraron la presencia de dímeros en las membranas, que son estabilizados por unión de ligandos multivalentes. UPAR: receptor de uroquinasa. Plg: plasminógeno. IGF-II: factor de crecimiento similar a la insulina de tipo II. Esta figura fue reproducida a partir de P. Ghosh et al. (13) y modificada.

Aunque estudios previos indicaban que el CI-MPR existía principalmente como monómero en las membranas (101,103,106), otros estudios posteriores demostraron que este receptor era capaz de formar dímeros en presencia de ligandos multivalentes, como β -glucuronidasa (107-109). Además se observó que este ligando multivalente es capaz de incrementar la velocidad de internalización de IGF-II y de ella misma. Esto indicaría que la dimerización del CI-MPR provocada por la presencia de un ligando multivalente, altera la velocidad de internalización del receptor en la superficie celular (107).

1.3.2.3- Estructura cristalina y bases moleculares del reconocimiento del carbohidrato:

El estudio de la estructura cristalina del CI-MPR se realizó sobre el dominio 11 o sitio de unión al IGF-II (119) y se demostró que es similar al dominio extracitoplasmático del CD-MPR. Este dominio presenta una zona hidrofóbica conteniendo la isoleucina 1572 y otros aminoácidos hidrofóbicos. Se piensa que esta zona, (especialmente equivalente al sitio hidrofílico de unión a M6P en el CD-MPR), es la que permite la interacción con el IGF-II, lo que explica el hecho de que este dominio no se una el carbohidrato (120-121).

Es importante recordar que la capacidad del CI-MPR de unir el IGF-II, se ha observado sólo en mamíferos vivíparos (87,97,96), mientras que en marsupiales el receptor exhibe una afinidad mucho menor para esta hormona (122,123), y en los monotremos, pollos y sapos (124-126) no hay interacción. Esta incapacidad para unir al IGF-II se ha explicado por las grandes diferencias en la secuencia de la porción aminoterminal del dominio 11 entre éstas especies y los mamíferos (92,127).

Secuencias de entre 5-12 residuos de aminoácidos separan los 15 dominios extracitoplasmáticos de CI-MPR, y éstas cortas separaciones limitan los posibles ordenamientos entre dominios en el receptor intacto.

Se ha propuesto un modelo en el cual los dominios impares se orientan en una dirección y los dominios pares en la dirección opuesta (Figura 1.10). En este modelo el dominio 11 se ubica en forma adyacente al dominio 13, que es el que contiene un inserto similar a fibronectina tipo II y contribuye a incrementar la interacción entre el IGF-II y el dominio 11 (128,129).

Un estudio de estructura basado en la comparación de secuencias del dominio extracelular del CD-MPR y los dominios 3 y 9 del CI-MPR provee evidencias de que ambos receptores utilizan mecanismos similares de reconocimiento del carbohidrato (63). Esto fue confirmado por estudios de mutagénesis dirigida, que demuestran que ambos receptores utilizan los mismos aminoácidos para unir el carbohidrato (130). Sin embargo

ninguno de los dos dominios de unión de M6P contienen un residuo análogo ácido Aspártico (Asp) 103 del CD-MPR, que es el que establece un enlace coordinado con cationes bivalentes, y explica por qué estos iones no intervienen en la unión de carbohidratos al CI-MPR.

A pesar de la semejanza estructural en el sitio de unión a carbohidratos de ambos receptores, hay notables diferencias funcionales entre ellos. Una de ellas es el pH óptimo de interacción con las enzimas lisosomales; el dominio 9 del CI-MPR presenta un pH óptimo entre 6,4 y 6,5 (131), similar al rango de interacción para el CD-MPR (38,83,84,132,133). El dominio 3, en cambio, tiene un pH óptimo superior, estimado entre 6,9 y 7,0 (131). Esta capacidad del CI-MPR de actuar en un amplio rango de pH permite explicar por qué este receptor es capaz de unir ligandos en zonas de pH ligeramente alcalino, como la membrana plasmática, y a diferencia del CD-MPR (93,132-134). Otra diferencia funcional entre ambos MPRs se observa cuando se estudian las características de los oligosacáridos que pueden unir cada uno de ellos. El CI-MPR puede unir M6P-OglcNAc fosfodiéster (83,93,134), y además interactúa con manosa-6-sulfato y M6P-metiléster presentes en las enzimas lisosomales de la ameba *Dictiostelium discoideum* (*Mixobacterium*) (135,136), y con M6P fosfomonoésteres, mientras que el CD-MPR une solamente fosfomonoésteres. Estas diferencias se atribuyen a que los residuos que componen el sitio de unión del CD-MPR y CI-MPR son diferentes (130).

1.3.3- Transporte de los MPRs:

Los MPRs ciclan constitutivamente en el circuito que integran TGN, endosomas tempranos, endosomas de reciclaje, endosomas tardíos y la membrana plasmática. (Figura 1.6). Aunque los MPRs transportan selectivamente las enzimas lisosomales, no hay evidencias sobre la existencia de los receptores en lisosomas. Este tráfico es dirigido por señales de transporte que se ubican en el dominio citoplasmático de ambos receptores y que son reconocidas por proteínas citosólicas que participan en la regulación de estos procesos (Figura 1.11).

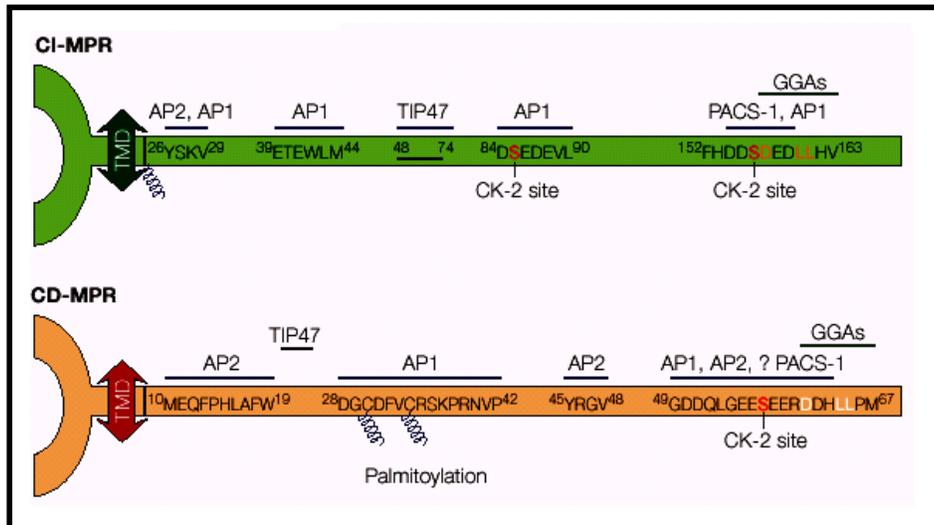


Figura 1.11: Señales de transporte de los MPRs. Se esquematizan los dominios citoplasmáticos de los MPRs con las proteínas de transporte asociadas y los aminoácidos involucrados en esa unión. Los aminoácidos se ordenan del 1 al 163 para el CI-MPR y del 1 al 67 para el CD-MPR desde el segmento transmembrana (TMD). Los sitios de actividad casein-quinasa 2 (CK-2) y de palmitoilación se marcan en el residuo correspondiente. "GGA: (Golgi-localized, γ -ear-containing, ADP-ribosylation-factor-binding protein); PACS-1: phosphofurin acidic cluster-sorting protein; TIP47: tail-interacting protein, 47 kDa". AP-1 y AP-2: Adaptinas 1 y 2 respectivamente. Esta figura fue reproducida a partir de P. Ghosh et al. (13)

1.3.3.1- Salida del TGN:

Según el modelo actual, los MPRs localizados en las membranas del TGN interactúan con las hidrolasas lisosomales recientemente sintetizadas, desde donde emergen vesículas que transportan los complejos enzima-receptor (E-R). Estudios tempranos de inmunocitoquímica, colocalizaron los MPRs con las proteínas adaptinas 1 (AP-1) en vesículas (CCV) y "buds" recubiertos con clatrina en la zona del TGN. Otros experimentos confirmaron la presencia de los complejos E-R en TGN y en CCV (137-139).

Posteriormente se descubrió una nueva familia de proteínas asociadas a clatrina denominadas GGAs (Golgi-localized, γ -ear-containing, ADP-ribosylation-factor-binding protein), por localizarse en Golgi (G) y por contener secuencias similares a la subunidad γ de las adaptinas y factores de ribosilación de ADP (ARF) (140-144). Estas proteínas multidomínios son agrupadas desde el citoplasma a las membranas del aparato de Golgi ayudadas por ARF unido a GTP (ARF-GTP) y se unen, a través de su dominio VHS, a una secuencia de la región C-terminal del dominio citoplasmático de los MPRs denominado

“cluster” ácido dileucina (AC-LL) (145-148) (Figura 1.12). Además, una región bisagra de las GGAs se une a la clatrina (149,150).

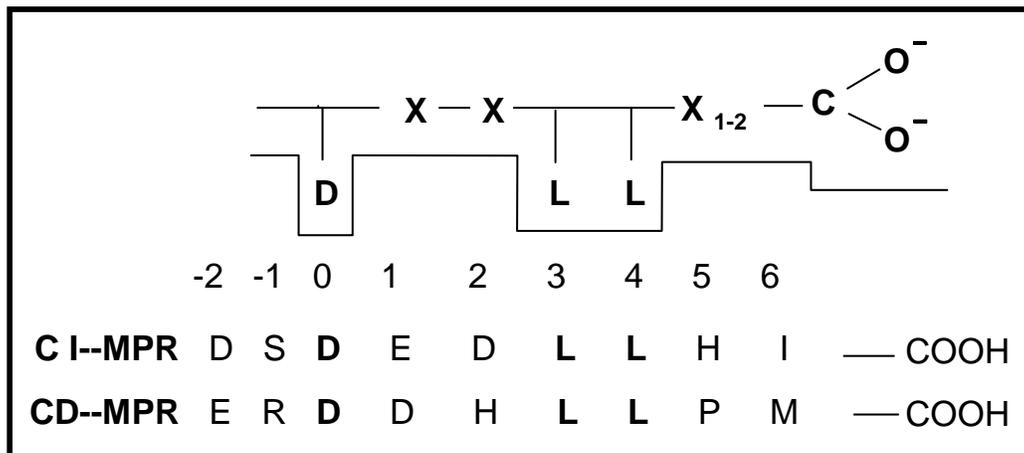


Figura 1.12: Determinantes primarios de unión del dominio VHS de GGA3 con los MPRs. El Asp de la posición 0 y las Leu de las posiciones 3 y 4 son cruciales en esta interacción. X representa cualquier aminoácido. Esta figura fue reproducida a partir de P. Ghosh et al. (13).

A diferencia de un único motivo de unión para las GGA, los MPRs tienen varios sitios de unión para adaptinas. El CD-MPR contiene dos secuencias independientes que interactúan con AP-1: los aminoácidos de posiciones 28-42 y 49-67 (146), ésta última secuencia se superpone con el motivo LL que interactúa con GGA. Por su parte, CI-MPR contiene cuatro sitios de unión para AP-1, entre los aminoácidos 26-29, el motivo interno dileucina 39-44 y dos sitios con actividad caseinquinasa 2 (CK-2) (151,152). A su vez, la interacción entre AP-1 y los dominios CK-2 es incrementada por fosforilación.

Existen dos hipótesis distintas sobre el papel de las GGA y AP-1 en el transporte de los receptores desde el Complejo de Golgi a endosomas; una de ellas es que ambas proteínas funcionan en paralelo produciendo la formación de diferentes poblaciones de vesículas de transporte, las cuales podrían destinarse a distintos compartimentos endosomales (153-155). La otra hipótesis propone que alternativamente las GGAs podrían facilitar la entrada de los MPRs a las CCVs que salen del TGN. Las últimas cisternas túbulo-vesiculares del Complejo de Golgi llevando AP-1 son las que constituyen la región trans y el TGN. Se ha observado que las CCVs emergen exclusivamente del TGN, en cambio las GGAs se encuentran asociadas a membranas no recubiertas, en las regiones anteriores a las del TGN y que tendrían como destino la membrana plasmática. Probablemente las GGAs encuentren y retengan los complejos E-R en las vesículas sin

cubierta. Luego, las GGAs se unirían a las AP-1 en las fositas recubiertas con clatrina del TGN, y se unirían también a la clatrina para fortalecer la unión con AP-1. De esta forma se produciría luego la transferencia de los MPRs a las CCV y las GGAs volverían a citoplasma (156-157). Este modelo se ve fortalecido por experimentos que muestran que una forma truncada de GGA1 que no posee su sitio de unión para AP-1, retiene los MPRs en TGN e impide su tránsito normal (147).

1.3.3.2- El paso por endosomas:

Luego de emerger del TGN, las CCVs liberan la clatrina, en un proceso que es favorecido por la proteína de golpe de calor HCS 70, en conjunto con auxilina (159,160). La AP-1, en cambio, permanece unida por un período extenso y esto podría favorecer la interacción de la vesícula con proteínas motoras, las kinesinas, para transportarlas a la periferia celular por medio de microtúbulos (161).

Numerosos estudios demuestran que las vesículas que contienen MPRs, liberan su contenido a endosomas tempranos (158,162,163). Las hidrolasas son posteriormente liberadas en endosomas tardíos de menor pH y posteriormente ingresan a los lisosomas por fusión de éstas organelas (171). Los MPRs no ingresan en los lisosomas; el CD-MPR tiene un motivo Phe-Trp en el dominio citoplasmático, que interacciona con una proteína denominada TIP 47 (172) y se piensa que ésta podría retener al receptor en un lugar de la membrana endosomal que no se involucra en el proceso de fusión/fisión con los lisosomas.

1.3.3.3- Retorno al Aparato de Golgi:

El reciclaje desde **endosomas tardíos** al Complejo de Golgi es llevado a cabo por TIP 47, y esta proteína también interacciona con el CI-MPR a través de un motivo que involucra los aminoácidos 48-74 de su dominio citoplasmático (172,173). TIP 47 además interactúa con Rab 9-GTP, incrementando su afinidad por los MPRs (174). De acuerdo con lo anterior, son necesarias ambas proteínas para el reciclaje de los endosomas tardíos a Golgi (175).

El reciclaje desde **endosomas tempranos**, en cambio, es llevado a cabo por la proteína de transporte con “cluster” ácido fosforina, PACS-1 (176-178) y por AP-1, y se cree que el efecto de PACS-1 es el de permitir la incorporación de los MPRs en las CCVs (179) de forma similar a las GGA.

1.3.3.4- Transporte a la membrana plasmática(MP):

Aún cuando el medio extracelular es ligeramente alcalino (pH=7,4), el CI-MPR es capaz de unir un grupo diverso de ligandos conteniendo M6P y de polipéptidos no glicosilados, incluyendo al IGF-II (Tabla 1.1). En cambio la función del CD-MPR en la MP es aún desconocida, aunque un estudio en células epiteliales de riñón de hámster y de células L de ratón indica que la llegada de los CD-MPRs a la superficie celular permite la liberación de enzimas lisosomales al medio extracelular (180).

Hay varios posibles caminos por los cuales los MPRs pueden alcanzar la superficie celular; por escape desde las cisternas trans del Complejo de Golgi por medio de proteínas transportadoras específicas o por reciclaje desde endosomas tempranos (181) o tardíos (175). La señal involucrada en este transporte a MP es desconocida, aunque existe una correlación entre expresión superficial de los MPRs y el estado de fosforilación de sus residuos Ser (182-185). Recientes estudios demostraron la interacción de KIF 13A, un miembro de la superfamilia de las quinesinas con endosomas que contienen MPRs, a través de AP-1 (161). Esto permite la llegada de los MPRs a la MP, mediado por microtúbulos.

Una vez en la MP, los MPRs son internalizados rápidamente. La señal de internalización del CI-MPR corresponde al motivo YSKV (186) mientras que el CD-MPR contiene tres señales separadas. Se ha visto que la subunidad $\mu 2$ de las AP-2 une igualmente estos tres motivos (146,187).

1.4- Funciones del CI-MPR:

Algunas posibles funciones del CI-MPR son resumidas en la siguiente tabla:

Tabla 1.1: Listado de ligandos reconocidos del CI-MPR

Ligandos que contienen M6P	Posible función
Enzimas lisosomales (32-34,40).	Endocitosis y transporte a lisosomas
Precursor del Factor de crecimiento transformante (TGF-β) (189-191,246).	Activación proteolítica en la superficie celular
Factor inhibidor de leucemia (261-262).	Endocitosis y degradación en lisosomas
Proliferina (263-264).	Inducción de migración celular endotelial y de angiogénesis
Tiroglobulina (265-266).	Endocitosis y activación y/o degradación en lisosomas?
Precursor de Renina (265)	Internalización y activación proteolítica y/o degradación en lisosomas
Granzima A (268, 270).	Transporte de gránulos líticos y rol en la apoptosis?
Granzima B (268, 269).	Internalización y rápida inducción de apoptosis
DNAsa I (271-274).	Transporte a lisosomas?
CD26 (275-276).	Internalización y rol en la activación de células T
Receptor de Factor de crecimiento epidérmico (277-278).	Endocitosis y degradación en lisosomas
Glicoproteína D del virus del Herpes simple (279-282)	Entrada del virus en la célula y transmisión entre células
Glicoproteína I del virus Varicella-zoster (283-286)	Entrada del virus en la célula
Ligandos que no contienen M6P	Consecuencias de la unión al CI-MPR
Factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I (IGF-II) (87,91,96, 210, 287)	Endocitosis y degradación en lisosomas
Acido Retinoico (288-290)	Inhibición del crecimiento y/o inducción de apoptosis
Receptor para el activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPAR) (191, 291, 246).	Participación en la activación del precursor de TGF-β, endocitosis y degradación en lisosomas
Plasminógeno (191).	Conversión a plasmina, la cual puede activar el precursor del TGF-β

Algunas de estas funciones han sido corroboradas y tienen gran relevancia clínica:

1.4.1- El CI-MPR como regulador del crecimiento y la motilidad celular:

Se conoce que el CI-MPR puede interactuar con el mitógeno IGF-II e internalizarlo desde la superficie celular, modulando sus niveles extracelulares (las funciones de este ligando en relación al CI-MPR, son discutidas en la sección 1.5).

El CI-MPR participa además en la activación del precursor del TGF- β 1 (pTGF- β 1), una hormona que actúa sobre el crecimiento y la diferenciación celular. Se ha visto que el pTGF- β 1 también se une al CI-MPR de la MP para activarse (189,190). El pTGF- β 1, es una glicoproteína que contiene M6P y es secretada por las células en forma latente.

En el mecanismo de activación mediado por el CI-MPR, Godar et al. (191) proponen un modelo en el cual el CI-MPR y el receptor de uroquinasa y activador del plasminógeno (uPAR) se unirían formando un complejo en la MP. La uroquinasa entonces se uniría a uPAR para convertir el plasminógeno en plasmina, que es la que produce el efecto proteolítico del pTGF- β 1 unido al CI-MPR.

Por su parte, el ácido retinoico (AR) produce un efecto de inhibición del crecimiento celular y apoptosis mediado por el CI-MPR (192). Estos efectos no fueron observados en células carentes de CI-MPR, como así tampoco fueron prevenidos por el agregado de antagonistas del receptor nuclear del ácido retinoico (RAR), corroborando que el mecanismo es llevado a cabo sólo por la interacción con el CI-MPR.

1.4.2- El CI-MPR como un probable supresor de tumores:

La habilidad del CI-MPR para disminuir los niveles plasmáticos de IGF-II, para facilitar la activación del inhibidor del crecimiento TGF- β 1 y para regular el tránsito de enzimas lisosomales, como Catepsina D, ha permitido encontrar una gran incidencia de este receptor en la supresión de tumores. Esta idea es reforzada por el hecho de que la sobreexpresión de este receptor produce inhibición del crecimiento, tanto en experimentos *in vivo* como *in vitro* (193,194).

Se ha reportado una pérdida de heterocigotidad del locus del *CI-MPR* en carcinoma hepático (195-197), de mama (198,199), pulmón (200), ovario (201) y adrenocortical (202) humano. Una gran cantidad de mutaciones puntuales se han observado en los genes que codifican los sitios de unión del IGF-II y de M6P en los alelos remanentes (195-198, 201,203), indicando que la pérdida de función del CI-MPR es un evento crucial en la carcinogénesis (204-205).

1.5- Los MPRs en el desarrollo de órganos y tejidos:

La expresión del CI-MPR es regulada en el desarrollo en rata y ratón y es variable en diferentes tejidos de una misma edad (98, 206-208). Los niveles del CI-MPR en tejidos fetales son elevados entre los 16 y 20 días de gestación y caen dramáticamente durante el período posnatal (207). El corazón fetal es el tejido más abundante en CI-MPR, alcanzando un nivel de 1,7% de las proteínas totales, a los 16 días de gestación y cayendo a un 0,07% a los 20 días posnatales (99). Los niveles de receptor en otros tejidos fetales varían entre 1% en placenta y 0,1% en cerebro y en todos ellos sus niveles decrecen entre 5 y 10 veces durante la vida posnatal (207).

Los cambios en la concentración de proteína receptora en los diferentes tejidos de rata se correlacionan con el contenido de RNAm del CI-MPR, el que también es alto en tejidos fetales y disminuye rápidamente luego del nacimiento (208,209). También existe una asociación directa entre los niveles del receptor en tejidos y la presencia de una forma soluble del receptor en plasma (CI-MPRs) (210-212). Esta forma soluble del receptor es producida por proteólisis en la superficie celular, que libera el dominio extracitoplasmático a la circulación, y conserva su habilidad para unir IGF-II y M6P. Se ha demostrado que existen altos niveles de receptor en plasma fetal y neonatal, con una caída drástica de ellos entre los días 20 y 40 de desarrollo postnatal (104).

A diferencia de rata, en humanos se demostró que existían diferencias mínimas en el contenido de CI-MPR entre tejidos fetales y neonatales (213). Trabajos posteriores determinaron que el fluido amniótico y suero humano presentaba altos niveles de CI-MPR en el período medio de gestación, disminuyendo al término del embarazo. El nivel de receptor en suero adulto es un tercio del que se presenta antes del nacimiento (214).

Respecto del CD-MPR pocos son los estudios que se han realizado con relación al desarrollo. En un estudio se detectaron los RNAm de CD-MPR en ratón en diferentes tejidos y en el desarrollo embrionario (50). En ratones adultos, la cantidad de transcritos de CD-MPR es muy elevada en órganos como hígado, riñón y bazo, mientras que es muy baja pero detectable en corazón y páncreas. Ellos también son fácilmente detectables en los primeros estadios del desarrollo embrionario de ratón pero luego decrecen durante los estadios posteriores. Esto indica que el CD-MPR es diferencialmente expresado en los tejidos de ratón durante el desarrollo.

Otro estudio en ratón, (53), demuestra que los transcritos de ambos MPRs no se superponen durante el desarrollo y tienen un patrón complementario de expresión. Hasta

los 15,5 días de gestación se observa una elevada expresión del CD-MPR en sitios de activa hemopoyesis y en timo, mientras que el CI-MPR se encuentra altamente expresado en el sistema cardiovascular. A los 17,5 días de desarrollo embrionario, una amplia variedad de tejidos expresan los receptores, aunque el patrón de expresión sigue siendo complementario.

1.5.1- El rol del CI-MPR en la regulación del IGF-II:

La regulación de la expresión del CI-MPR ha sido estudiada en roedores. La alta expresión del receptor en los tejidos fetales de rata se correlaciona con los altos niveles de expresión del IGF-II, el cual también declina postnatalmente (215-220) .

El patrón de expresión del IGF-II sugería la hipótesis de que este factor era fundamental para el crecimiento y desarrollo fetal. Esta hipótesis fue clarificada luego, cuando se demostró que ratones homocigotas mutantes que tenían una disrupción en el gen del IGF-II eran pequeños pero bien proporcionados (216,217,224). Si el gen disrupto lo heredaba del padre, los ratones eran fenotípicamente similares a los homocigotas mutantes, en cambio si lo heredaba de la madre, eran normales. Esta diferencia en el fenotipo es por el hecho de que el alelo paterno es activo y está ampliamente expresado en algunos embriones, mientras que el materno es silente. Esto demostró no sólo que el IGF-II era fundamental en el desarrollo embrionario, sino que su gen está sometido a “imprinting” parental.

Interesantemente, Barlow et al. (223), demostraron que el gen del CI-MPR en ratón también está sometido a “imprinting” aunque en este caso la copia materna es la que se encuentra activa. Los autores estudiaban la delección del locus *Tme* (efectos maternos asociados a una mutación típica de la cola) y observaron que si heredaban la delección de este locus de la madre, los ratones morían a los 15 días de gestación, mientras que si la heredaban del padre, la descendencia era viable (225-227). De los cuatro genes mapeados en este locus sólo el CI-MPR era el gen sometido a un “imprinting”. Se postuló que el rol del CI-MPR heredado de la madre era el de disminuir los niveles de IGF-II heredados del padre, y de esta manera evitar un sobrecrecimiento de la descendencia, asegurando su supervivencia y evitando una excesiva demanda de los recursos metabólicos maternos (228). La importancia de este mecanismo se demostró cuando los ratones deficientes del CI-MPR tuvieron elevados niveles plasmáticos de IGF-II y un incremento en el tamaño de sus órganos. Estos ratones murieron en el nacimiento o después de un tiempo por fallo cardíaco secundario a una hiperplasia cardíaca (224,229,230). La introducción de un alelo

nulo para IGF-II (ratones doble “knockout”) rescató a estos ratones de la mortalidad perinatal, lo que indica el papel fundamental del CI-MPR en el “clearance” del IGF-II (224,229).

Otro cuerpo de evidencias establece que, además de esta función, el CI-MPR puede actuar en la señalización del IGF-II (231-239). En cultivos de células musculares que sufren diferenciación terminal, los niveles de RNAm para el CI-MPR se incrementan 10 veces mientras que los del CD-MPR permanecen constantes (240). Este aumento se correlaciona con el aumento del IGF-II en la misma célula, mientras que hay un pequeño y transitorio incremento de las enzimas lisosomales durante la diferenciación muscular (241). También se demostró que la diferenciación de precursores hepáticos de megariocitos en células maduras es dependiente de IGF-II y su efecto a través de CI-MPR.

La idea de señalización vía CI-MPR es atractiva pero a la vez es controvertida puesto que los efectos del IGF-II sobre el crecimiento celular son regulados principalmente por el IGF-IR (11) y porque el CI-MPR carece de actividad quinasa en su dominio citoplasmático. Con el fin de aumentar la especificidad se han obtenido análogos del IGF-II que no se unen al IGF-IR ni a sus proteínas de unión, pero sí al CI-MPR. Con estos análogos se demostró que el IGF-II podía inducir quimiotaxis de trofoblastos (234), de células endoteliales (235) y de células de rhabdomyosarcoma (236) a través del CI-MPR indicando que este receptor podría participar en la motilidad celular.

Además, y a pesar de que existe un cuidadoso estudio que muestra evidencias en contra (242), diversos reportes han determinado que el mecanismo por medio del cual esta señalización se lleva a cabo es por medio de proteínas G acopladas a una cascada que culmina con la activación de MAPK (232,234,235,239).

En las células de los no mamíferos el CI-MPR no tiene el sitio de unión a IGF-II (124-125), y debido a esto, se estudió la presencia de este receptor en pollo (54) para ver de que manera se controlaba su expresión. En este estudio se comprobó que el pollo tenía homólogos de los MPRs, y que sus transcritos eran detectables en tejidos como epitelio, ganglio y sistema uropoietico. Del mismo modo que en mamíferos, el patrón de expresión era diferente entre los órganos por lo que se concluyó que otras diferencias funcionales no relacionadas con la unión de IGF-II al CI-MPR, son las que controlan la expresión de estos receptores en no mamíferos.

OBJETIVOS

Esta tesis se halla dentro de aquellos estudios que intentan explicar la necesidad de la existencia de dos receptores (los MPRs) con la misma función primaria. Debido a que en tejidos totalmente desarrollados como los adultos, ambos receptores funcionan (en condiciones fisiológicas) transportando las enzimas lisosomales, pensamos que la diferencia podía encontrarse durante el desarrollo de órganos.

El hecho de que el CI-MPR une IGF-II y modifica su expresión en el desarrollo en forma paralela a este factor, nos hizo plantearnos la hipótesis de la escasa participación de este receptor en el transporte de enzimas lisosomales en las primeras etapas del desarrollo. Esta idea nos condujo a pensar que el CD-MPR podía suplir al CI-MPR en este período.

Por lo tanto, el **objetivo principal** de esta tesis fue detectar los diferentes roles de los MPRs durante el desarrollo de órganos.

Objetivos específicos:

1-Determinar el patrón de comportamiento (expresión, Kd y B_{máx}) de ambos MPRs frente a enzimas lisosomales durante el desarrollo de hígado y cerebro de rata.

2-Determinar la importancia del CI-MPR en el crecimiento y la diferenciación celular en los primeros estadios de desarrollo.

3-Estudiar la expresión de enzimas lisosomales y reconocer entre ellas posibles ligandos de los receptores.

4-Determinar la importancia del CD-MPR en el transporte de enzimas en el período intermedio de 10 días y en la biogénesis lisosomal.

5-Postular un modelo de transporte de las enzimas lisosomales dependientes de los MPRs durante el desarrollo perinatal en hígado y en cerebro de rata.

CAPITULO II

RESULTADOS

A)- LOS RECEPTORES A MANOSA-6-FOSFATO CATION INDEPENDIENTE Y CATION DEPENDIENTE (CI-MPR, CD-MPR) VARIAN DIFERENCIALMENTE DURANTE EL DESARROLLO PERINATAL DE HIGADO DE RATA.

INTRODUCCIÓN:

Con excepción de algunas líneas celulares derivadas de tumores (243,244), todos los tejidos y líneas celulares de mamíferos expresan los CI-MPR y CD-MPR. La coexistencia de ambos receptores aún no ha sido concluyentemente explicada y se postula que éstos receptores tendrían, al menos parcialmente, diferentes funciones.

Existen evidencias que involucran al CI-MPR en procesos de crecimiento y diferenciación celular; como la capacidad para interactuar con el factor de crecimiento similar a la insulina de tipo II (IGF-II) (245) o para activar al precursor del factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) (189-191,246). En algunos roedores, la expresión del CI-MPR en algunos tejidos declina dramáticamente luego del nacimiento dando lugar a la idea de que estos receptores siguen un patrón de desarrollo (207). Por otra parte, los transcritos de ambos MPRs muestran un patrón de expresión no superponible en órganos durante la embriogénesis en ratón (53). Sin embargo nunca se ha hecho un estudio comparativo entre ambos receptores, ni una correlación entre la expresión y las características funcionales durante el desarrollo.

Uno de nuestros objetivos específicos fue determinar cuál es el patrón evolutivo de ambos receptores durante la organogénesis. Para ello estudiamos la expresión de ambos MPRs y el comportamiento de cada uno frente a ligandos fosfomanosilados durante el desarrollo perinatal de rata. Para este análisis elegimos hígado y cerebro, dos órganos que, además de poseer funciones muy diferentes, tienen distinta participación durante el desarrollo perinatal.

RESULTADOS:

2.1- Los MPRs se expresan diferencialmente durante el desarrollo perinatal de hígado de rata:

Ambos MPRs fueron cuantificados por “inmunoblot” a partir de membranas de hígado fetal (-2 días) y a edades perinatales (0,5,10,20,40 y 90 días).

Como se observa en la Figura 2.1A, el CD-MPR tiene una elevada expresión en hígado de fetos y disminuye progresivamente durante los primeros 5 días posnatales. A partir de allí, la inmunoreactividad se incrementa hasta alcanzar un máximo a los 10 días posnatales, y se mantiene elevada hasta la edad adulta.

En contraste, la expresión del CI-MPR disminuye progresivamente desde el tejido fetal al adulto (Figura 2.1B).

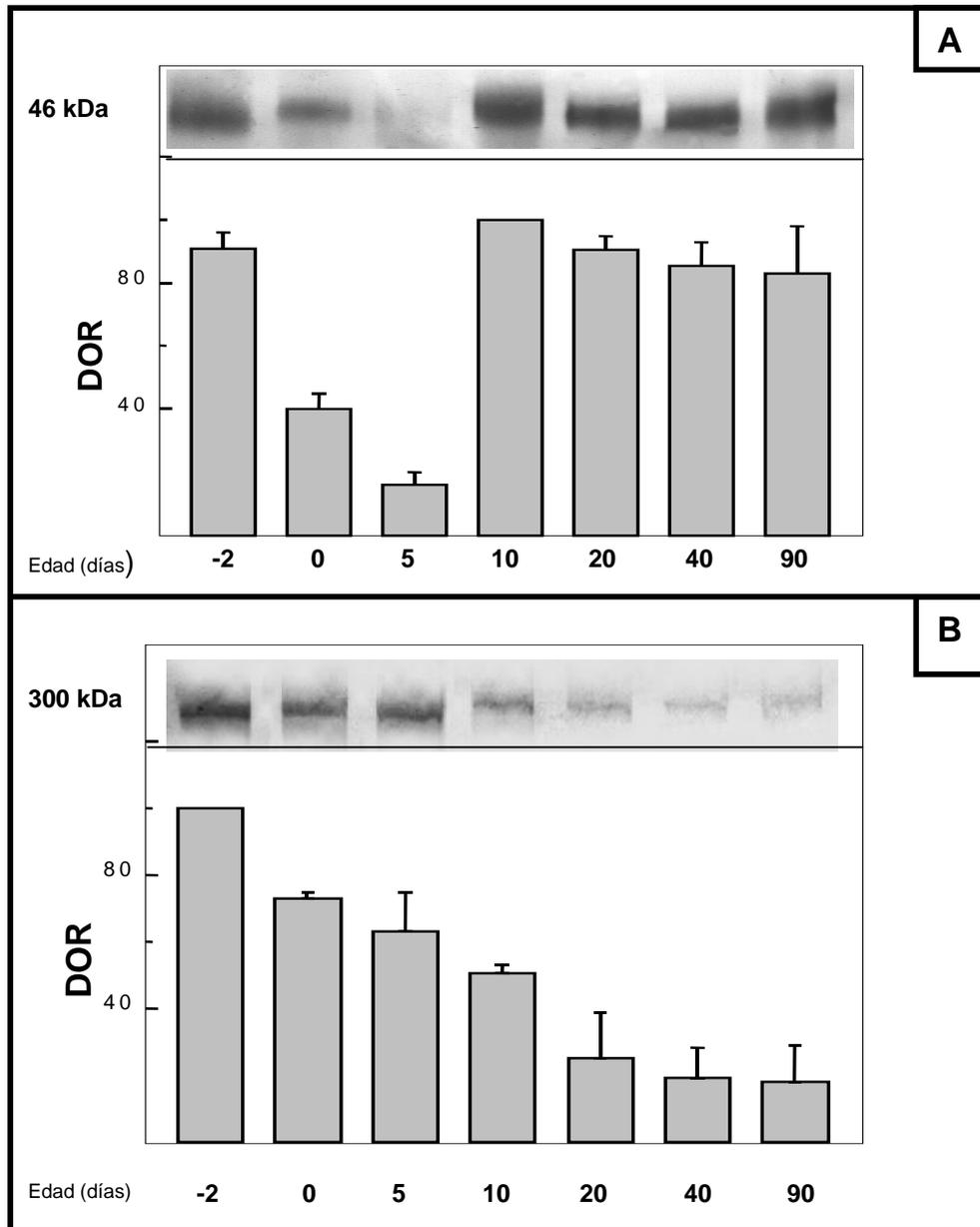


Figura 2.1: Inmunodetección de MPRs en membranas de hígado de rata a diferentes edades. Proteínas de una fracción membranosa de hígado, (preparada como se describe en materiales y métodos) fueron analizadas por electroforesis (SDS-PAGE) y electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa. Las bandas correspondientes al CD-MPR (A) ó CI-MPR (B) fueron detectadas por un método quimioluminiscente, usando los anticuerpos específicos para cada receptor.

Esta figura representa uno de cinco experimentos similares. Las bandas obtenidas fueron cuantificadas por densitometría desde los films. Se grafican las densidades ópticas relativas (DOR) promedio \pm ES, obtenidas en cada edad (en días) para cada receptor.

Las variaciones en la expresión del CI-MPR coinciden con los datos de otros autores (207). Sin embargo, esta es la primera vez, que se hace un estudio comparativo entre ambos receptores; e interesantemente la expresión del CD-MPR sigue un patrón diferente del CI-MPR.

Propusimos que la expresión alta del CD-MPR en fetos y su descenso al nacimiento podría ser causada por cambios en las poblaciones celulares; sabiendo que en los fetos el hígado es un órgano hematopoyético y que algunos tipos celulares precursores sanguíneos podrían ser los responsables del enriquecimiento observado en este estadio. Para corroborar o descartar esta posibilidad, estudiamos la reactividad celular para cada receptor en cortes de hígado de las diferentes edades por un método inmunohistoquímico. El CD-MPR fue localizado en la zona perinuclear de hepatocitos en todas las edades estudiadas (Figura 2.2), mientras que el CI-MPR fue positivo en los hepatocitos fetales y negativo en los de adultos (Figura 2.3), Ambos MPRs fueron negativos en precursores de las células sanguíneas en fetos (Figura 2.2 A y Figura 2.3 A) aunque en esta edad el CD-MPR dio fuertemente positivo en la zona perinuclear de megacariocitos mientras que el CI-MPR fue negativo en estas células.

En hígado fetal se encuentra un 54% de hepatocitos, y un 46% de células precursoras sanguíneas, dentro de las cuales hay un 2% de megacariocitos. Luego del nacimiento se incrementa el porcentaje de hepatocitos mientras que los precursores sanguíneos van desapareciendo (los megacariocitos disminuyen un 70% en el período entre los 17 días de gestación y los 6 días posnatales) (250).

Dedido a esto, la presencia de megacariocitos fuertemente positivos para el CD-MPR en hígado fetal podría explicar sólo en parte el descenso en la expresión total de este receptor luego del nacimiento. Probablemente se produce un descenso en la expresión de CD-MPR en los hepatocitos por un déficit de factores maternos, de hecho en los hepatocitos de preparados provenientes de hígado de recién nacidos se observó un patrón de tinción más disperso (granular) comparado con el de los hepatocitos fetales. En éstos últimos se observó una reacción más compacta.

CD-MPR

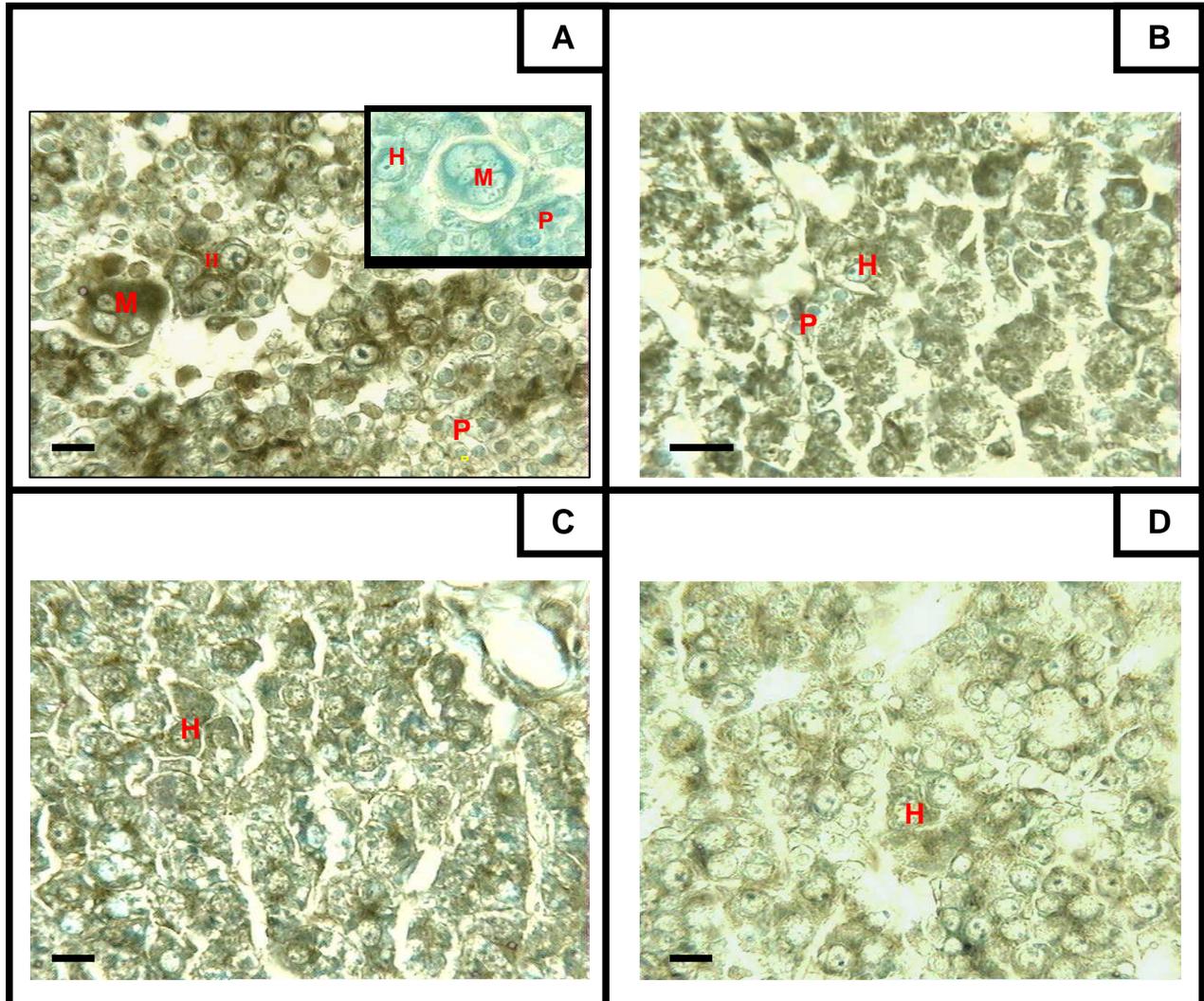


Figura 2.2: Detección por inmunohistoquímica de los CD-MPRs en hígado de rata durante el desarrollo. Secciones de tejido de Feto (A) y de Recién Nacido (B), 10 y 90 días posnatales (C y D), fueron incubadas con los anticuerpos contra CD-MPR, reaccionadas con diaminobencidina y peroxidasa (marrón), teñidas con azul de Toluidina como contraste y observadas por microscopía óptica. Los hepatocitos (H), megacariocitos (M) y los precursores de células sanguíneas (P) son indicados en la fotografía. Inserto en A: Control incubado con suero preinmune de conejo. Las barras en cada fotografía equivalen a 25 μm .

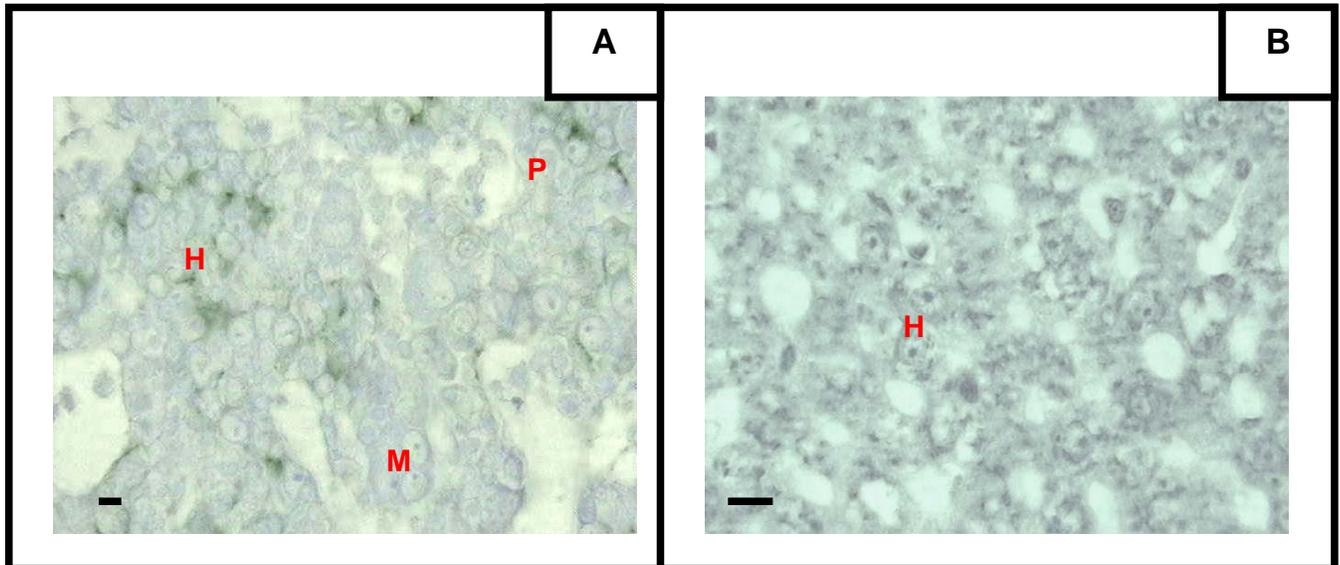


Figura 2.3: Detección por inmunohistoquímica de los CI-MPRs en hígado de rata durante el desarrollo. Secciones de tejido de Feto (A) y de 90 días posnatales (B), fueron incubadas con los anticuerpos contra CI-MPR, reaccionadas con diaminobencidina y peroxidasa (marrón), teñidas con azul de Toluidina como contraste y observadas por microscopía óptica. Los hepatocitos (H), megacariocitos (M) y los precursores de células sanguíneas (P) son indicados en la fotografía.. Las barras en cada fotografía equivalen a 25 μm .

ESTUDIOS BIOQUIMICOS DE LOS RECEPTORES:

2.2- Los MPRs se comportan de manera diferente cuando interaccionan con ligandos fosfomanosilados durante el desarrollo perinatal de hígado de rata:

Para estimar la afinidad y el número de sitios activos de cada receptor se puso a punto un ensayo de acoplamiento (“binding”), incubando las membranas de hígado de las distintas edades estudiadas con un ligando que contiene manosa-6-fosfato. Para ello se usó β -Glucuronidasa (β -Glu), una glicoproteína tetramérica purificada de glándula prepuical de rata (247) según el esquema de la Figura 2.4.

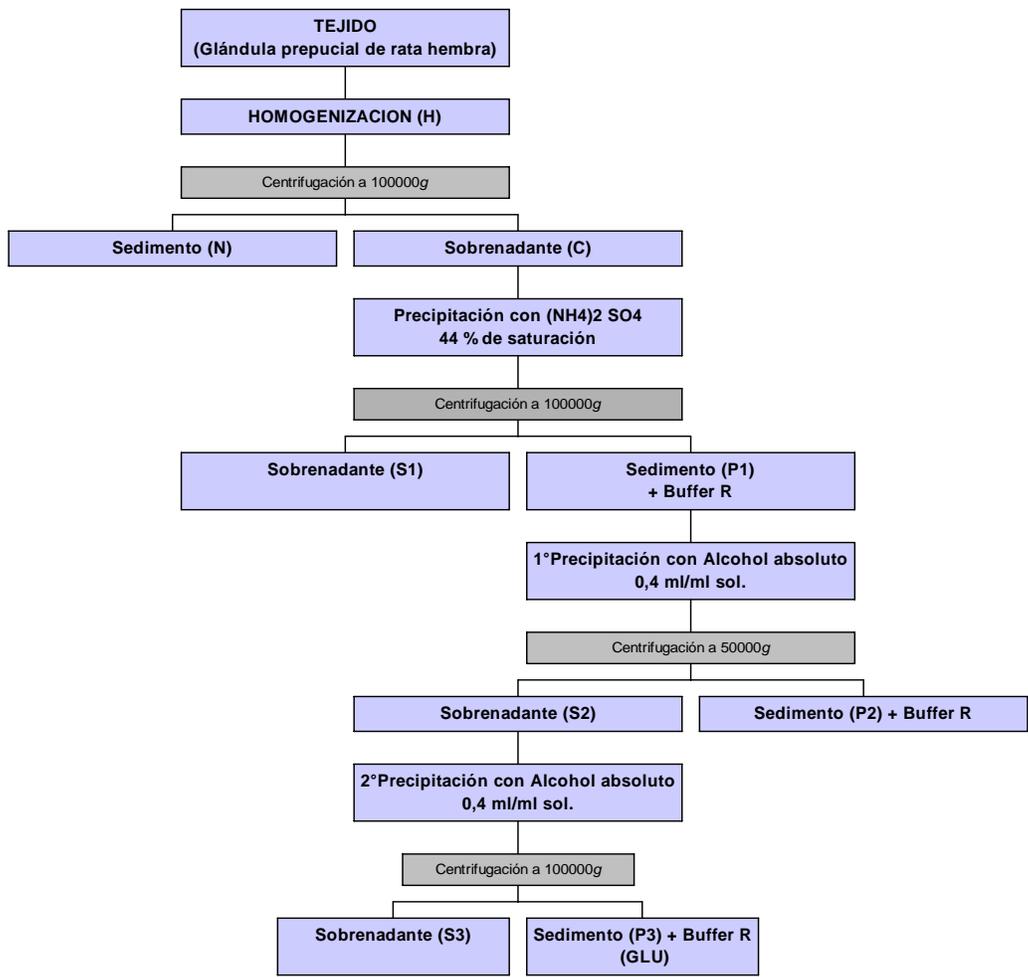


Figura 2.4: Esquema de la purificación de β - Glucuronidasa según el método de Tulsiani (247). BR: Buffer de resuspensión (Ver metodología)

La pureza de la misma fue controlada por el enriquecimiento de la actividad enzimática específica, que aumenta 36 veces en magnitud, (Tabla 2.1) y por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), se constató la presencia de una proteína mayoritaria de 68 kDa (Figura 2.5).

Fracción	U enzimáticas / mg proteína
HOMOGENATO (H)	0,42 x 10 ⁶
CITOSOL (C)	0,57 x 10 ⁶
PRECIPITACIÓN CON (NH ₄) ₂ SO ₄ (SEDIMENTO, P₁)	2 x 10 ⁶
PRIMERA PRECIPITACIÓN CON ALCOHOL ABSOLUTO (SOBRENADANTE, S₂)	3,2 x 10 ⁶
SEGUNDA PRECIPITACIÓN CON ALCOHOL ABSOLUTO (SEDIMENTO, P₃)	15 x 10 ⁶

Tabla 2.1: Actividad enzimática específica de β-Glu durante las etapas principales de su purificación: Se midió la actividad enzimática por un método fluorométrico (ver metodología) y la concentración de proteínas por método espectrofotométrico (ver metodología) en muestras de las fracciones principales de la purificación.

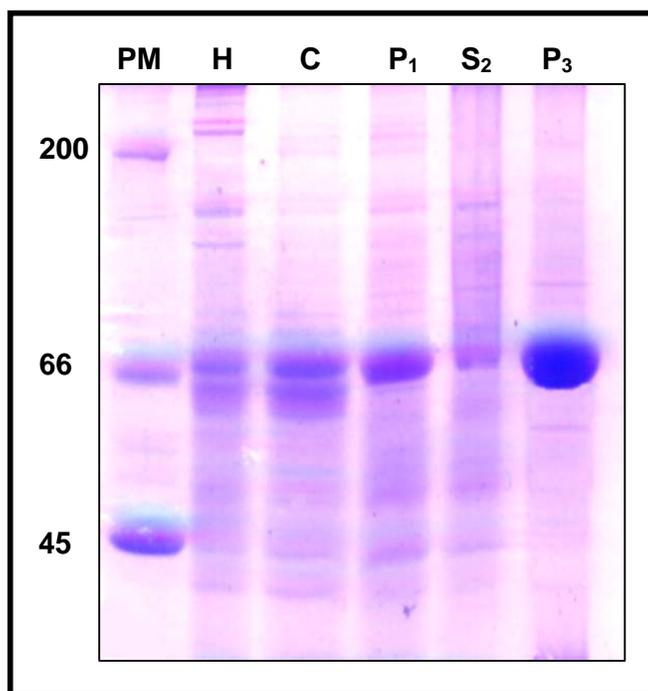


Figura 2.5: Control electroforético de la purificación de β -Glucuronidasa de glándula prepucial de rata. Una alícuota de cada fracción de la purificación de la enzima se analizó por SDS-PAGE (al 8% de poliacrilamida) seguida de una tinción con Azul de Coomasie. En el carril P₃ se observa una banda mayoritaria de peso molecular aparente de 68 kDa correspondiente al peso de cada subunidad de la enzima purificada. PM: marcador de pesos moleculares, H: homogenato, C: citosol, P₁: sedimento de la precipitación con (NH₄)₂ SO₄, S₂: sobrenadante de la primera precipitación con alcohol absoluto, P₃: sedimento de la segunda precipitación con alcohol absoluto (correspondiente a la enzima purificada).

2.2.1- Ensayos de Acoplamiento:

En las curvas de la Figura 2.6 se observa que β -Glu se une en forma específica y saturable a las membranas de hígado en cada estadio. La especificidad fue determinada por la inhibición competitiva con M6P. Las dos curvas de cada gráfica representan el acoplamiento de β -Glu a membranas en ausencia (curva inferior) o presencia (curva superior) de iones bivalentes (Ca^{+2} y Mn^{+2}).

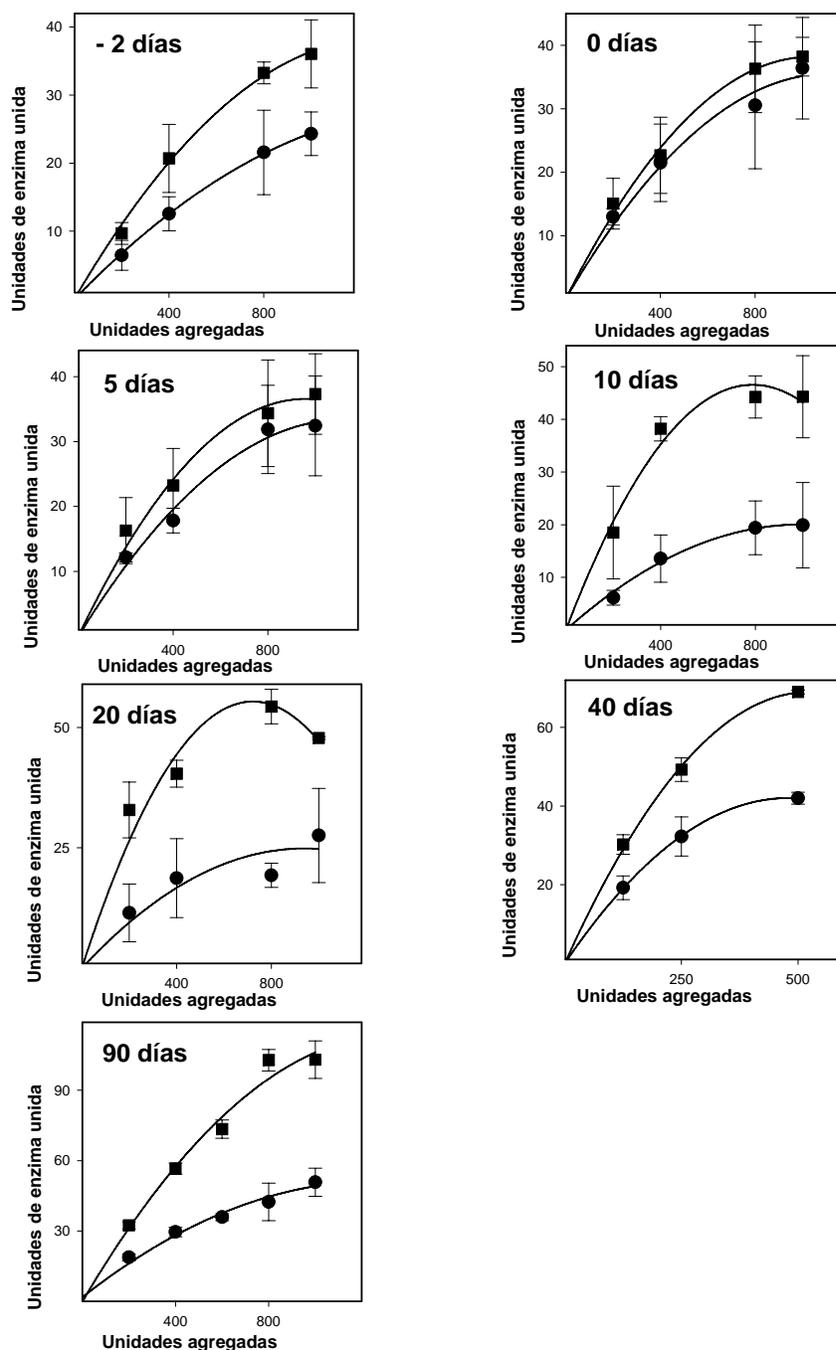


Figura 2.6: Unión de β - Glu a membranas de hígado de rata de diferentes edades.

Proteínas de membranas (15 μ g) de las edades indicadas fueron incubadas con 50-1000 U de la enzima, en ausencia (curva inferior) o presencia (curva superior) de cationes bivalentes. La enzima unida fue sedimentada por centrifugación con las membranas y su actividad se midió por un método fluorométrico. La unión inespecífica, no inhibible por M6P, fue sustraída de cada curva. Cada punto representa la media \pm DS de tres experimentos.

2.2.2- Estimación de parámetros de interacción Enzima-Receptor:

Los valores de K_D y B_{max} (que representan afinidad y número de sitios activos según la ecuación de Scatchard) para el CI-MPR fueron deducidos de cada curva en ausencia de iones bivalentes por optimización no lineal de la función hipérbola rectangular descrita para la asociación ligando-receptor. Estos parámetros fueron posteriormente usados junto con los datos obtenidos en presencia de iones bivalentes para calcular (por optimización no lineal), el K_D y el B_{max} del CD-MPR, aplicando la siguiente ecuación:

$$B = B^1 + B^2 = \frac{B^1_{max} \cdot F}{K^1_D + F} + \frac{B^2_{max} \cdot F}{K^2_D + F}$$

La actividad enzimática total asociada a ambos receptores (B), es la suma de las actividades enzimáticas parciales asociadas a cada uno de los receptores (B^1 y B^2). Cada unión parcial se calcula como el cociente del producto del número de sitios activos de ese receptor (B^1_{max}) y la actividad enzimática no asociada (F) y de la suma de la afinidad (K^1_D) de ese receptor y F .

Como se observa en la Tabla 2.2, el número estimado de sitios activos (B_{max}) para el CI-MPR, mostró un descenso significativo ($P < 0,01$) a los 10 y 20 días respecto de las otras edades, mientras que el B_{max} del CD-MPR se incrementa significativamente ($P < 0,05$) desde los 10 días y se mantiene hasta la edad adulta. Por otra parte, los valores de K_D muestran que para ambos MPRs, la afinidad se incrementa progresivamente durante el desarrollo perinatal. Este incremento se hizo significativo al comparar los valores antes y después de los 10 días ($P < 0,05$ para el CI-MPR y $P < 0,01$ para el CD-MPR)

	Edad (días)	-2	0	5	10	20	40	Adultos (90)
CD-MPR	K_D (nM)	14,0	7,5	8,0	3,7	1,2	2,6	2,7
	B_{max} (pmol/mg prot.)	2,6	1,2	1,0	5,0	6,0	4,5	6,0
CI-MPR	K_D (nM)	15,0	8,0	7,3	5,0	4,5	2,3	3,0
	B_{max} (pmol/mg prot.)	5,0	6,0	5,5	2,0	1,7	6,5	5,5

Tabla 2.2: Valores de B_{max} y K_D para CD y CI-MPR calculados a partir de los ensayos de unión de β - Glu en hígado de rata, a las edades indicadas.

2.3- El CI-MPR aumenta su afinidad a enzimas lisosomales durante el desarrollo perinatal:

Con el fin de comparar los parámetros estudiados para cada receptor se graficaron los mismos aproximando los valores a una escala arbitraria. La expresión se representó como la décima parte de la densidad óptica relativa (DOR) obtenida de la figura 2.1 y el número de sitios activos (en pmoles/mg proteína) y la afinidad (diez veces la inversa del K_D) se obtuvieron de la tabla 2.2.

$$\text{Expresión} = \frac{\text{DOR}}{10}$$

$$\text{Afinidad} = \frac{1}{K_D} \times 10$$

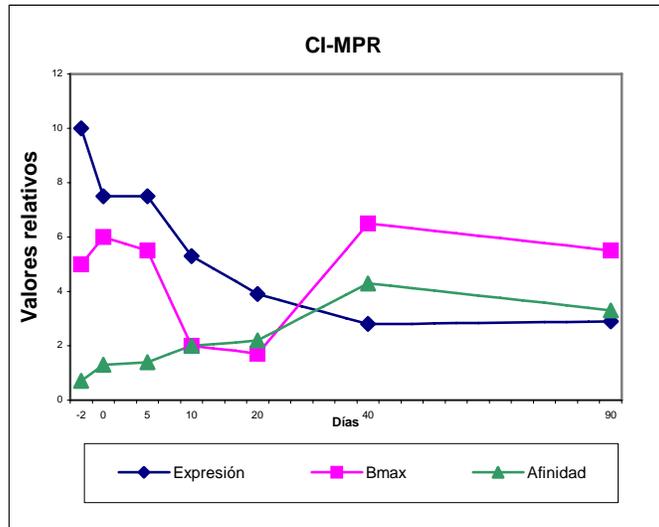


Figura 2.7: Variación en la expresión, afinidad y número de sitios activos de CI-MPR en hígado de rata durante el desarrollo perinatal.

Como se observa en la Figura 2.7, el CI-MPR presenta un punto crítico a los 10 días del nacimiento. Se observa que en las edades anteriores (fetos, recién nacidos y 5 días posnatales) la expresión de este receptor y el número de sitios activos son elevados, mientras que es baja la afinidad. Desde los 10 días en adelante, su expresión desciende hasta llegar a un valor mínimo entre los 40 y 90 días, mientras que el número de sitios activos y la afinidad se incrementan.

La baja expresión del CI-MPR en los adultos contrasta con el elevado número de sitios activos de alta afinidad en esta edad. La disminución de la expresión concuerda con otros trabajos que demuestran que en roedores, el CI-MPR sufre una regulación negativa durante el desarrollo (99,104,207). A pesar de ello, el número de sitios activos es semejante al de los primeros estadios, mientras que la afinidad es cinco veces mayor en adulto respecto de fetos.

Debido a que la afinidad del CI-MPR es uno de los parámetros que más se modifica, decidimos explorar esta diferencia. Cambios de afinidad podrían explicarse por cambios intrínsecos de la proteína receptora durante el desarrollo que generen un plegamiento diferente y le otorguen una mayor velocidad en la interacción con ligandos. También podría deberse a cambios en las proteínas de membrana que acompañan al receptor y que generen una atmósfera diferente y propicia para la interacción enzima-receptor.

Si se observan los patrones electroforéticos de las proteínas de membrana de las diferentes edades (Figura 2.8), hay semejanzas entre los tres primeros estadios estudiados (-2, 0 y 5 días), mientras que a los 10 y 20 días aparecen otras proteínas en el rango entre los 60 y 70 kDa (indicadas con asterisco) aunque el patrón de proteínas es similar a las edades menores. El mayor cambio se produce a los 90 días con la aparición de nuevas proteínas de mayor peso molecular, entre los 80 y 100 kDa (indicadas con cabezas de flecha).

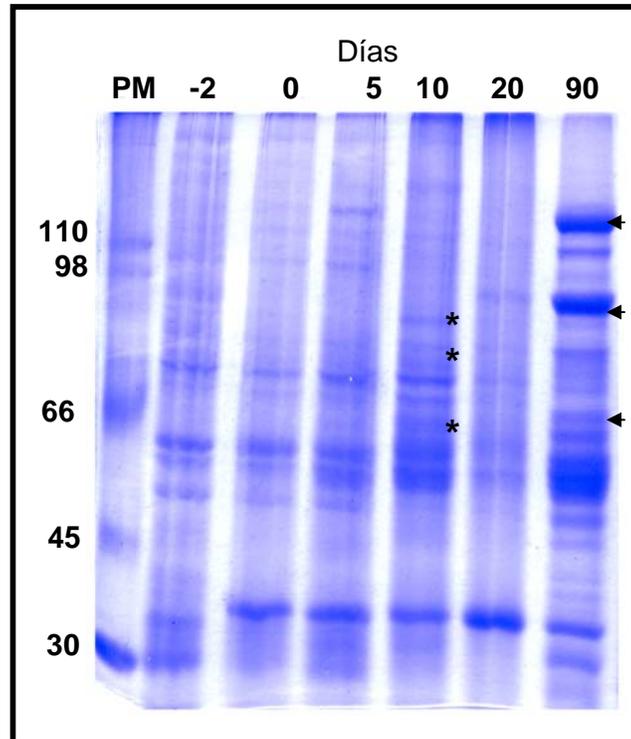


Figura 2.8: Patrones proteicos de membrana de hígado de rata . Proteínas (25 μ g) de una fracción membranosa de hígado de las edades indicadas, fueron analizadas por electroforesis (SDS-PAGE) y el gel fue teñido con Azul de Coomasie. Las proteínas fueron comparadas contra un estándar de pesos moleculares, indicados en kDa.

Otro aspecto interesante es suponer cambios en la conformación del CI-MPR, que le confieran una mayor capacidad para unir los ligandos. Estos cambios podrían incluir ruptura y formación de nuevos puentes disulfuro intramoleculares que permiten un plegamiento diferente en la proteína (58,248), resultando en una mayor afinidad del receptor por los ligandos en membranas de 90 días con respecto a las de fetos o recién nacidos.

La presencia de puentes disulfuro fue corroborada por medio de los cambios en la movilidad electroforética del CI-MPR luego de un tratamiento con el agente reductor ditioneitol, DTT (Figura 2.9). Este tratamiento afectó tanto a los receptores tempranos como a los tardíos.

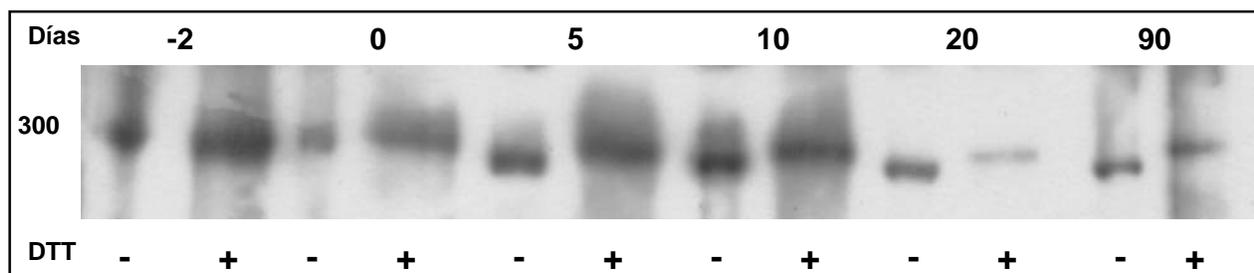


Figura 2.9: Cambios en las movilidades electroforéticas del CI-MPR por tratamiento con DTT. Alícuotas de una fracción membranosa de hígado (25 μ g) de cada edad indicada, se trataron con buffer de Laemmli en ausencia o presencia de 10 mM de DTT. Luego fueron analizadas por electroforesis (SDS-PAGE) y electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa. Las bandas del CI-MPR fueron detectadas por un método quimioluminiscente, usando el anticuerpo específico.

Para comprobar si la ruptura de los puentes disulfuro del CI-MPR provocados por el tratamiento con DTT afectaban su capacidad de unir ligandos fosfomanosilados, se realizaron cromatografías de muestras paralelas en presencia y ausencia de DTT en fosfomanano-agarosa.

Se realizaron extracciones de las proteínas de membrana de hígado de animales recién nacidos (0 días) y de animales adultos (90 días). Las proteínas extraídas se dividieron en alícuotas iguales y a una de ellas se la trató con DTT. Posteriormente se realizaron cromatografías en paralelo en dos columnas de fosfomanano (ver metodología). La figura 2.10 muestra el resultado de las cromatografías de recién nacido (A y C) y de 90 días (B y D). Se puede observar que en recién nacidos tanto en presencia como en ausencia de DTT el receptor es capaz de unirse al fosfomanano para luego ser eluído específicamente por M6P. En adultos, en cambio, en ausencia de DTT se puede observar la banda del receptor en las fracciones eluídas, mientras que en presencia de DTT no se encuentra dicha banda. El mismo resultado obtenido en adultos también fue observado en una cromatografía realizada a partir de membranas de 10 días.

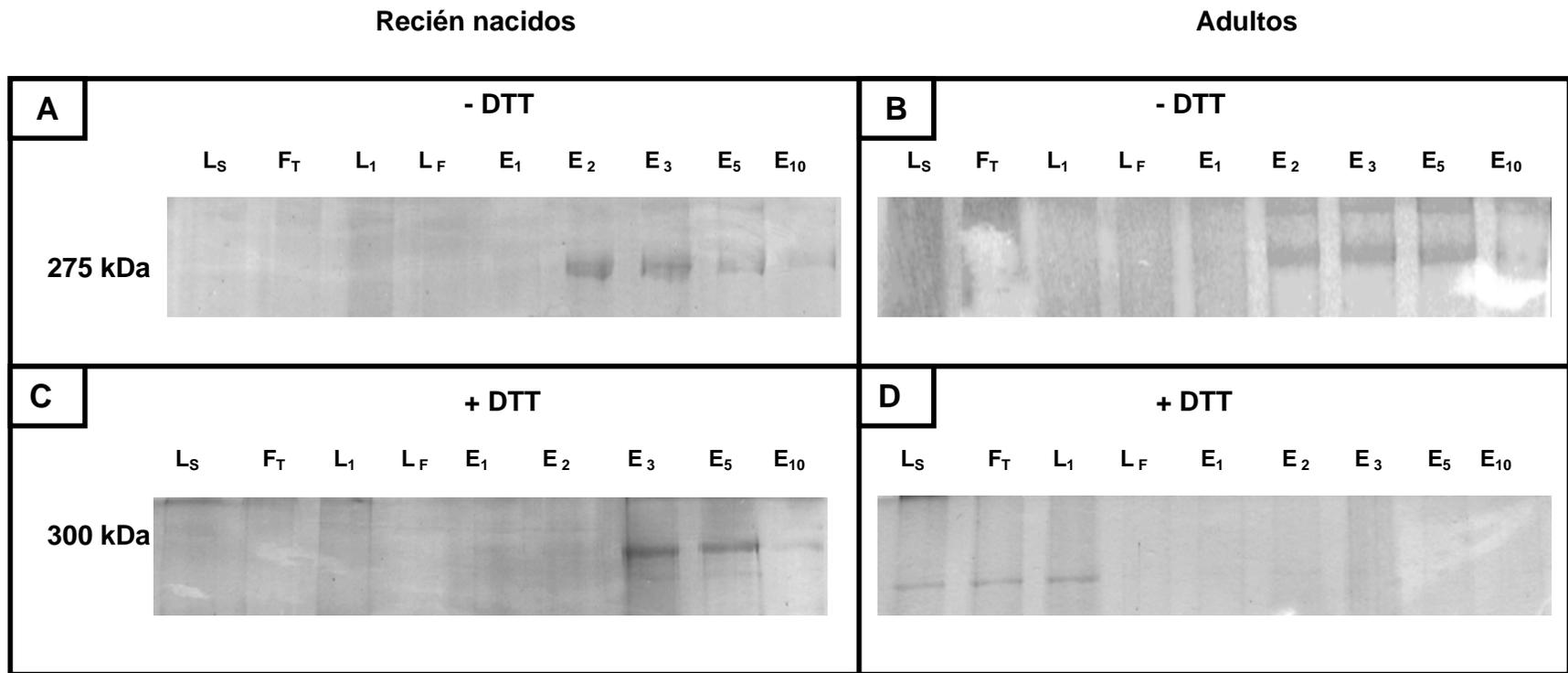


Figura 2.10: Cromatografía de afinidad del CI-MPR de hígado de rata en ausencia o presencia de agentes reductores. Proteínas de membrana de hígado de animales recién nacidos o adultos fueron solubilizadas y resueltas en una matriz de Fosfomanano, en ausencia (A y B) o presencia (C y D) de DTT. En cada caso se observan los carriles correspondientes al líquido de siembra (L_S), eluato directo (F_T), los lavados inicial y final (L₁ y L_F) y las eluciones con M6P (E₁, E₂, E₃, E₅ y E₁₀).

Otra alícuota de las muestras de esta cromatografía fue analizada por “western blot” para detectar el CI-MPR con un anticuerpo específico. Por este método se confirmó la ausencia de receptor en los dos eluatos directos (F_T +/- DTT) de las muestras de recién nacidos y la presencia de receptor en el eluato directo de adulto con DTT (+DTT) como cabía esperar según el resultado anterior (Figura 2.11 A y B).

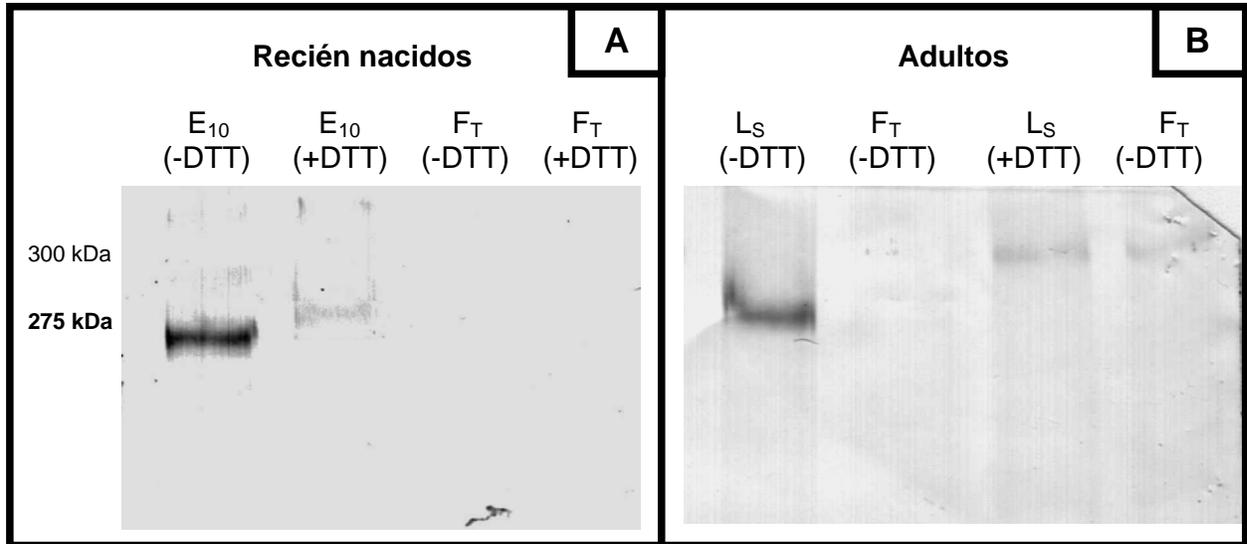


Figura 2.11: Inmunodetección de CI-MPR en muestras de la cromatografía de afinidad con Fosfomano-Agarosa: Una alícuota de las muestras de la cromatografía correspondientes a las eluciones 10 (E₁₀) y a los eluatos directos (F_T) con y sin DTT (+/- DTT) de recién nacidos (A) y correspondientes a los líquidos de siembra (L_s) y a los eluatos directos (F_T) con y sin DTT (+/- DTT) de adultos (B), fueron analizadas por SDS-PAGE y electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa. Las bandas correspondientes al CI-MPR fueron detectadas por un método quimioluminiscente usando los anticuerpos específicos.

Como se había demostrado previamente, este receptor incrementa su afinidad a ligandos fosfomanosilados durante el desarrollo, llegando a un valor máximo en la edad adulta. Proponemos dos posibles hipótesis para explicar este cambio de afinidad (actualmente las mismas están siendo evaluadas con otros métodos experimentales):

1- El receptor de fetos y recién nacidos posee un patrón de puentes S-S diferente del que posee en adultos generando diferentes plegamientos y diferentes patrones de glicosilación. Debido a ello, el receptor de fetos presentaría una estructura de alta afinidad para la unión a IGF-II y de baja afinidad para la unión de ligandos fosfomanosilados. En adultos, sucedería lo contrario (Figura 2.12 A).

2-En la segunda hipótesis hemos tenido en cuenta la existencia de dímeros de CI-MPR. Se conoce que estos tienen mayor afinidad por ligandos fosfomanosilados, mientras que los monómeros interactúan principalmente con IGF-II (108,109).

En las cromatografías realizadas en ausencia de DTT, se observó una banda de peso molecular superior en los eluatos de recién nacidos y adultos (esta banda fue luego reconocida como el dímero del CI-MPR, siendo detectada con el anticuerpo específico). Según lo que se pudo observar la cantidad de dímeros en recién nacidos fue menor que la de adultos (34% frente a 50 %). De esta manera podríamos considerar que el cambio de afinidad podría deberse a las variaciones en las proporciones de dímeros durante el desarrollo, que serían más elevadas en adultos.

Se sabe que la interacción de los monómeros para formar el dímero es de tipo hidrofóbica (108), sin embargo, en presencia de DTT estos dímeros desaparecen, lo que podría indicar que los puentes S-S intramoleculares del monómero son necesarios para estabilizar la estructura dimérica. Durante el desarrollo se produciría un cambio conformacional en los monómeros que favorecería la interacción entre ellos para formar dímeros. Este cambio conformacional podría ocultar momentáneamente los sitios receptores activos del monómero, hasta la dimerización y formación de nuevos sitios activos (Figura 2.12 B).

2.4- CI-MPR se encuentra en mayor proporción en la membrana plasmática de las células de hígado fetal:

En este punto, tratamos de justificar la elevada expresión de los CI-MPR en las membranas fetales y de recién nacidos. Varios antecedentes indican que esto se debería a la capacidad de este receptor para unir e internalizar el IGF-II y permitir el “clearance” sérico del mismo. De este modo se evita un exceso en la respuesta anabólica hacia este factor de crecimiento. Otros autores en cambio, piensan que el IGF-II al unirse al CI-MPR podría activar una cascada de señalización e inducir una respuesta celular similar a la inducida por este factor sobre el receptor de IGF-I (IGF-IR).

Ambas explicaciones concuerdan en una interacción entre IGF-II y CI-MPR en estadios tempranos del desarrollo. Esta función en la regulación de los niveles de IGF-II u otros factores de crecimiento (Tabla 1.1) podría justificar la baja afinidad del CI-MPR por hidrolasas lisosomales en los estadios tempranos del desarrollo.

De lo anterior se puede deducir que la localización del receptor en este período tendría que ser principalmente en la membrana plasmática, puesto que es allí dónde se produciría dicha interacción.

Para evaluar la localización subcelular del receptor se realizó una separación diferencial de membranas de hígado fetal y de adulto en un pequeño gradiente bifásico de sacarosa (ver metodología), concentrándose la membrana plasmática en la interfase. De este gradiente se obtuvieron dos fracciones, una de densidad inferior a 1,18 g/ml correspondiente a membrana plasmática (MP) y la otra fue una fracción membranosa de densidad superior a 1,18 g/ml (MD) que representa una pequeña fracción de las membranas celulares internas (endomembranas). Estas fracciones fueron analizadas posteriormente por “western blot” para detectar la presencia de CI-MPR.

Como se observa en la figura 2.13 A, el CI-MPR no es detectado en la fracciones de membrana plasmática ni en las membranas de mayor densidad de hígado adulto (MP_A y MD_A). En fetos, en cambio, se detecta en la membrana plasmática (MP_F) pero no se encuentra en las membranas densas (MD_F). Teniendo en cuenta los valores de densidad óptica obtenidos y considerando que la expresión total de CI-MPR en adultos desciende a una quinta parte de la expresión total presente en fetos (Figura 2.1), la cantidad de CI-MPR presentes en la MP de fetos es el doble de la presente en adultos.

Si bien hemos seguido un protocolo estándar (249), corroboramos el fraccionamiento por medición de la actividad de N-acetil-β-D-Glucosaminidasa (NAG), que es una enzima lisosomal que preferentemente se concentra en las fracciones

internas de las células y no se presenta en membrana plasmática. (Figura 2.13 B) y por detección de CD-MPR con un anticuerpo específico (Figura 2.13 C). Este último se encuentra presente en las membranas densas tanto en fetos como en adultos, coincidiendo con la mayor actividad de NAG. Este resultado indica que en fetos, el CD-MPR se compartimentaliza en membranas diferentes de las que se ubica el CI-MPR.

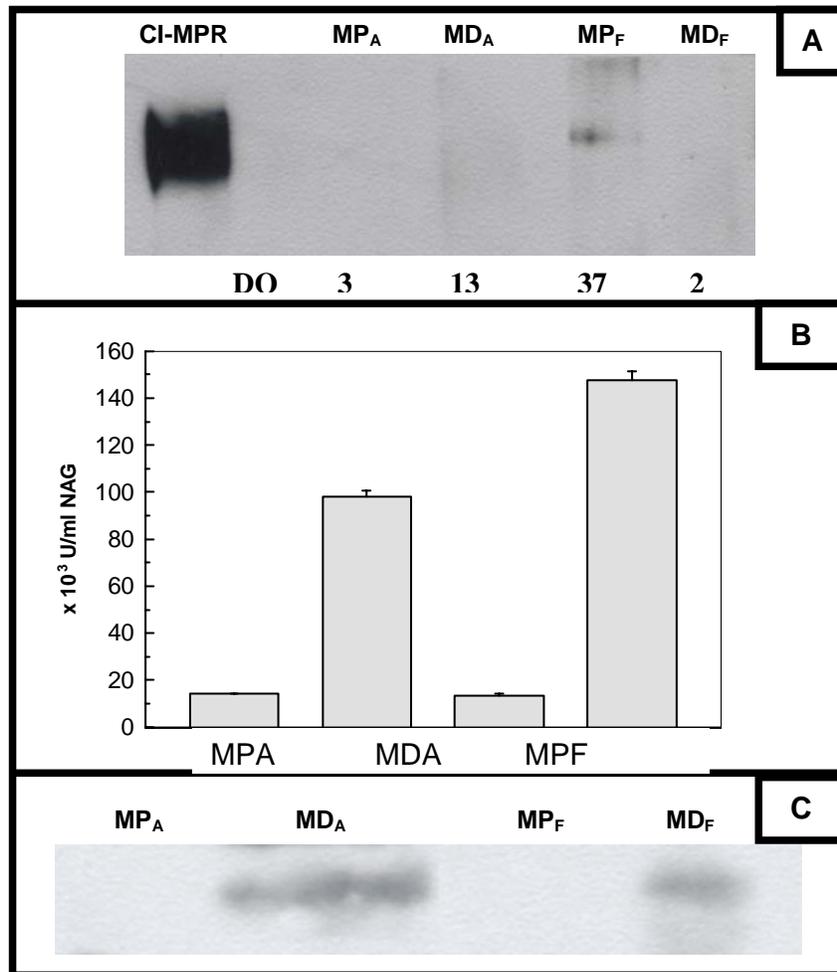


Figura 2.13: Detección de CI-MPR en fracciones membranas subcelulares: Proteínas de una fracción membrana enriquecida en membrana plasmática (25 µg) de hígado adulto (MP_A) y de fetos (MP_F) y de una fracción membrana de mayor densidad (MD_A y MD_F), preparada como se describe en la metodología, fueron analizadas por electroforesis (SDS-PAGE) y electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa. Las bandas correspondientes al CI-MPR (A) o al CD-MPR (C) fueron detectadas por un método quimioluminiscente usando los anticuerpos específicos. Una muestra de receptor bovino purificado (CI-MPR) fue usada como estándar (en A), En B se midieron las actividades de NAG en cada fracción por un método espectrofluorométrico.

La elevada expresión de CI-MPR en hígado de fetos y su localización en la membrana plasmática indicarían que este receptor necesitaría estar expuesto para interactuar con ligandos externos como el IGF-II, que presenta altos niveles en este período. Sería muy interesante en el futuro, evaluar las características de la interacción de IGF-II y de otros factores de crecimiento con CI-MPR durante el desarrollo en rata.

LOS CD-MPR DURANTE EL DESARROLLO:

2.5- Variaciones de los parámetros estudiados para el CD-MPR:

Como se observa en la figura 2.1 y en la tabla 2.2, el CD-MPR muestra una elevada expresión, afinidad y número de sitios activos desde los 10 días en adelante. Estas variaciones son resumidas en la Figura 2.14.

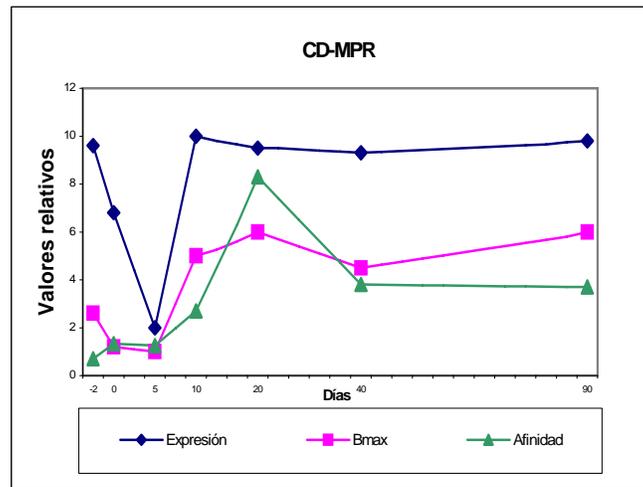


Figura 2.14: Variación de expresión, afinidad y número de sitios activos (B_{max}) de CD-MPR en edades perinatales de hígado de rata.

Estos cambios en la expresión y la actividad del CD-MPR se correlacionan con las variaciones de los niveles de enzimas lisosomales en hígado de rata y ratón durante el desarrollo perinatal (251-253) y con la fracción de N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) unida a membranas a cada edad (254). Basados en estas observaciones, sugerimos que el CD-MPR está funcionalmente relacionado con el desarrollo del aparato lisosomal. Además, como se demostró anteriormente, en el preciso momento en que hay un bajo número de sitios activos del CI-MPR entre los 10 y 20 días postnatales, la actividad del CD-MPR llega a un valor máximo. Desde estos resultados, propusimos que este último tiene mayor importancia en este período, pudiendo compensar la escasa participación del CI-MPR.

Para comprobarlo, se buscó establecer una correlación entre la expresión de los MPRs y la actividad enzimática lisosomal presente en muestras provenientes de un fraccionamiento subcelular de hígado de rata de las edades perinatales en estudio. Se cuantificó la presencia de M6P en proteínas de la fracción asociada a la membrana endosomal y se hicieron ensayos de unión con hidrolasas de esta fracción.

B)- LAS HIDROLASAS LISOSOMALES VARIAN EN FORMA PARALELA AL CD-MPR DURANTE EL DESARROLLO PERINATAL DE HIGADO DE RATA.

INTRODUCCION:

Aunque el CI-MPR sea capaz de interactuar con diversos tipos de ligandos, tengan o no M6P (Tabla 1.1), son las hidrolasas ácidas los ligandos mejor descritos para ambos receptores. Estas son concentradas como proenzimas en TGN, y luego son volcadas en vesículas de transporte que finalmente se fusionan con endosomas tardíos. El pH ácido de este compartimiento permite la transformación de la proenzima en enzima lisosomal madura. Entre estas hidrolasas podemos citar algunas proteasas como Catapsina D y L, también lipasas y glicosidasas como N-acetil- β -D-Glucosaminidasa o β -Hexosaminidasa (NAG), β -Glucuronidasa (GLU), α -Manosidasa (MAN), β -Manosidasa (β -MAN) y β -Galactosidasa (GAL) y nucleasas como DNAsa y RNAsa ácida. La mayoría de estas enzimas presenta residuos M6P en su oligosacárido que les permite unirse a los MPRs localizados en TGN y desde allí transportarse hacia endosomas tardíos y posteriormente a lisosomas (Figura 1.5).

2.6-Evolución de la actividad enzimática lisosomal en hígado de rata durante el desarrollo perinatal:

Con el fin de determinar si las enzimas siguen un patrón evolutivo durante el desarrollo perinatal, se midió la actividad de cuatro glicosidasas, NAG, GLU, GAL y MAN por métodos espectrofluorométricos en muestras provenientes de un fraccionamiento subcelular de hígado de rata en fetos y en edades perinatales (0, 5, 10, 20, 60 y 90 días).

Como actividad enzimática total por mg de tejido se designó la suma de las actividades de cada fracción; nuclear, citosólica, endosomal soluble (ES), endosomal asociada a membranas (EU) y el remanente membranoso. La fracción ES se obtuvo por tratamiento de las membranas endosomales con un buffer conteniendo saponina y la fracción EU se obtuvo en forma consecutiva a la anterior tratando las membranas endosomales con un buffer conteniendo saponina y KCl 0,6M para liberar las proteínas periféricas (ver metodología).

En la figura 2.15 se grafica la evolución de la actividad total de cada una de estas enzimas en función de la edad. Se puede observar que las enzimas principales en hígado son NAG y GLU, mientras que GAL y MAN registran actividades 4 a 10 veces menores.

NAG y GLU presentan un pico máximo de actividad entre 10 y 20 días después del nacimiento. GAL aumenta sobre todo a los 10 días, mientras que MAN se mantiene constante durante todo el período estudiado. También se grafican los mg de proteínas totales/ g de tejido, demostrando que no hay variaciones significativas en este parámetro durante el desarrollo.

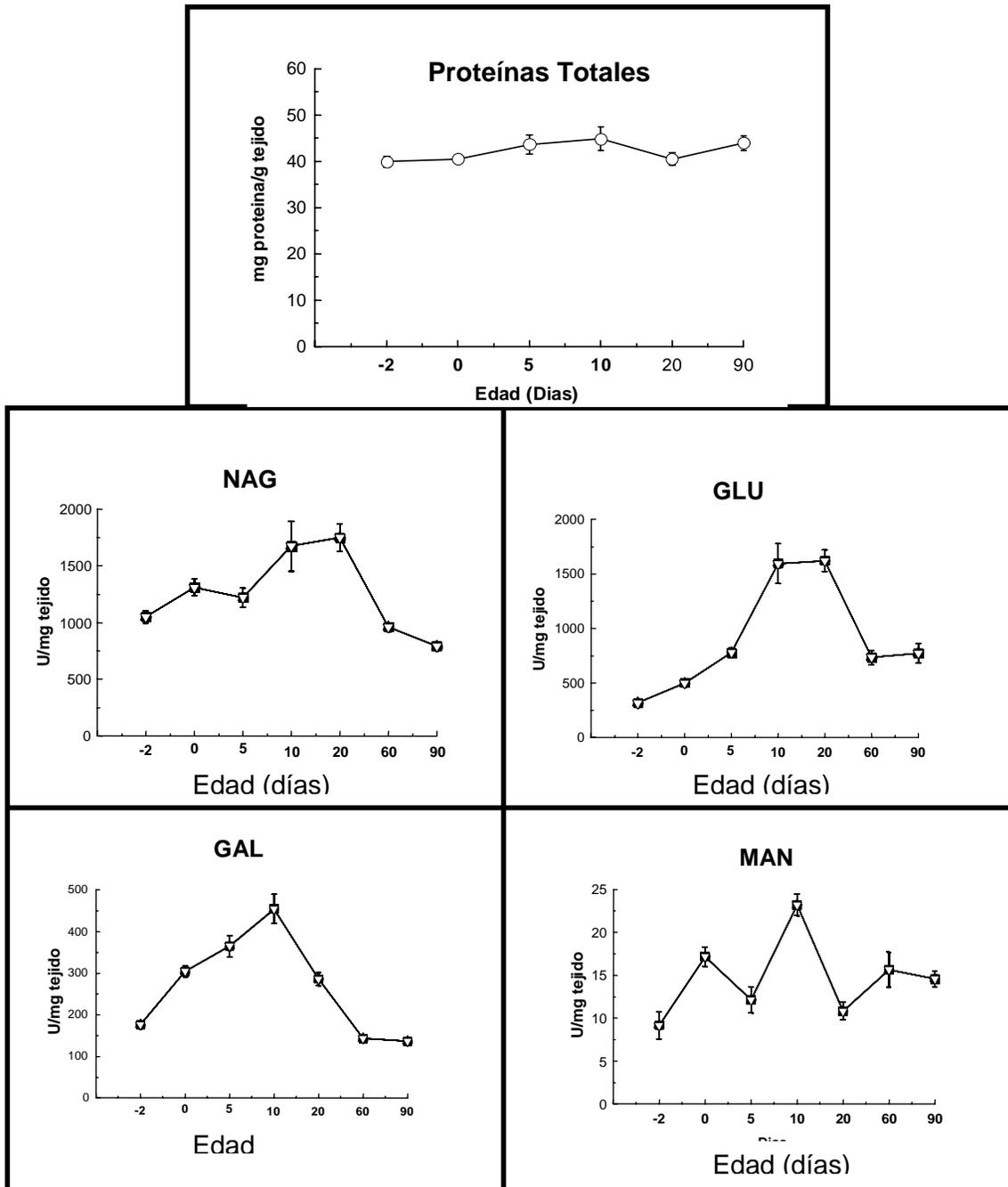


Figura 2.15: Actividades enzimáticas de glicosidasas ácidas en hígado de rata durante el desarrollo perinatal: Se realizó un fraccionamiento subcelular de hígado en las edades indicadas y se midieron las proteínas totales por métodos espectrofotométricos y las actividades de NAG (β -Hexosaminidasa), GLU (β -Glucuronidasa), GAL (β -Galactosidasa) y MAN (α -Manosidasa) en todas las fracciones por métodos espectrofluorométricos.

Las actividades medidas en la fracción EU representa a las enzimas que se encontraban asociadas a membranas (y que fueron extraídas con alta fuerza iónica). Esta fracción nos interesa porque nos da un indicio de las enzimas que podrían estar unidas a los MPRs en esas membranas.

La actividad enzimática asociada a las membranas de hígado representa, en la mayoría de los casos, a una décima parte de la actividad total medida. Las enzimas asociadas en mayor grado fueron NAG y GLU, entre 5 y 6 veces más que GAL y MAN, como cabía esperar por las mediciones totales. La cantidad de enzima unida a membranas durante el desarrollo fue proporcional a la actividad total, alcanzando un pico de mayor actividad entre los 10 y los 20 días para NAG, GLU y GAL (Figura 2.16). En cambio, la actividad de MAN asociada a membranas fue decreciendo progresivamente desde fetos hasta llegar a un 60% del valor inicial en adultos (Figura 2.16). También en esta fracción no hay diferencias significativas en el contenido de proteínas por gramo de tejido durante el desarrollo.

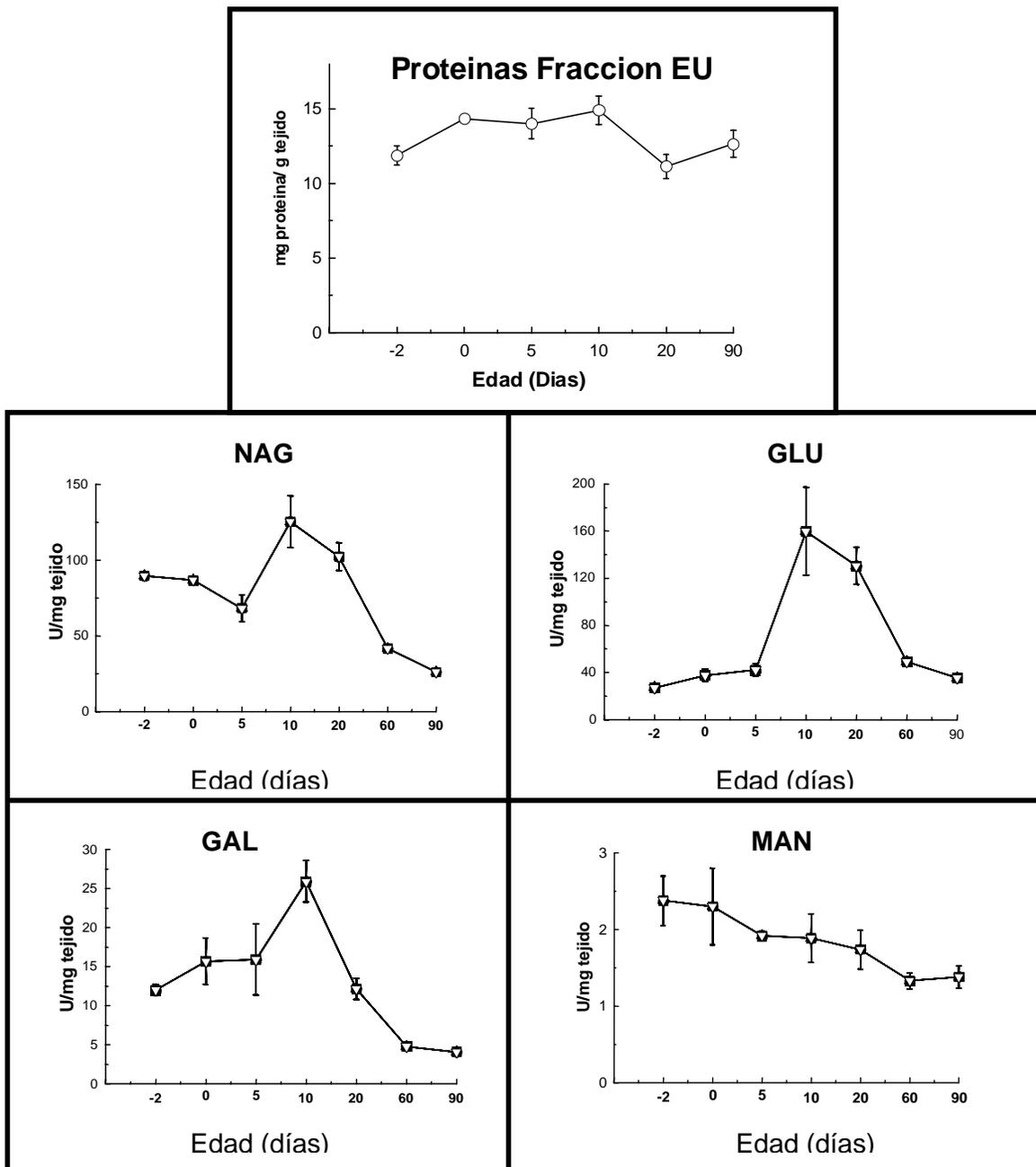


Figura 2.16: Actividades de glicosidasas ácidas en la fracción asociada a membranas en hígado de rata durante el desarrollo perinatal. Se midieron las proteínas por métodos espectrofotométricos (expresadas en mg/g tejido) y las actividades de NAG (β -Hexosaminidasa), GLU (β -Glucuronidasa), GAL (β -Galactosidasa) y MAN (α -Manosidasa) asociadas a membranas (fracción EU) por métodos espectrofluorométricos. Se expresaron las actividades en unidades por mg de tejido.

Alternativamente se estudió la tendencia en la expresión de dos de las enzimas de la fracción EU, NAG y MAN, por análisis de “western blot” y se observó una concordancia con los valores medidos de actividad.

En la figura 2.17 A se muestran los resultados del “inmunoblot” para la enzima NAG. Se puede observar una doble banda con un peso molecular aparente de 58 kDa y de 66 kDa que correspondería a subunidades de las dos isoformas A y B de NAG. Como cabía esperar por las actividades de NAG de la fracción EU, esta enzima se presenta en mayor proporción entre los 10 y 20 días posnatales.

En cuanto a la cuantificación de MAN se observaron tres bandas que corresponderían a la forma precursora, (de 110 kDa), y a las subunidades de 65 kDa y 45 kDa generadas por el procesamiento proteolítico del precursor (Figura 2.17 B) (255). Se puede ver que a cada edad existen distintas proporciones de cada forma de MAN, predominando la forma precursora y la subunidad de 65 kDa en los recién nacidos y hasta los 10 días postnatales mientras que predominan las subunidades de 65 y 45 kDa entre los 20 y los 90 días. La suma de las densidades ópticas relativas (DOR) de cada una de las formas de MAN en cada estadio confirma que no existen diferencias significativas en la cantidad de la enzima asociada a membranas durante el desarrollo perinatal.

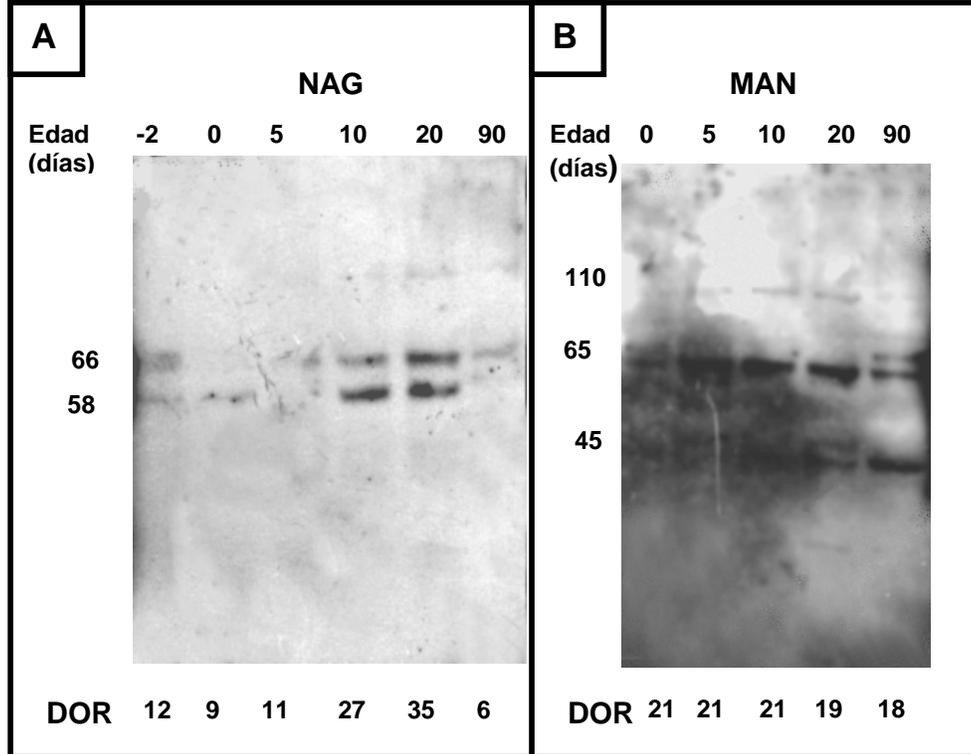


Figura 2.17: La expresión de enzimas en hígado de rata durante el desarrollo perinatal. Proteínas de la fracción EU a las edades indicadas, fueron analizadas por electroforesis (SDS-PAGE) y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Las bandas correspondientes a NAG (A) ó MAN (B) fueron detectadas por un método quimioluminiscente usando los anticuerpos específicos para cada enzima. Las bandas pertenecientes a las diferentes formas de cada enzima, fueron cuantificadas por densitometría desde los films y los números inferiores representan la suma de las densidades ópticas relativas (DOR).

Hasta aquí podemos decir que existen dos tendencias en variación de la actividad enzimática de las glicosidasas durante el desarrollo; las enzimas que hacen un pico entre los 10 y 20 días (NAG, GLU y GAL) y aquella que no varía significativamente en todo ese período (MAN).

La evolución de la actividad enzimática de NAG y MAN asociadas a membranas son proporcionales a la variación en la actividad enzimática total durante el desarrollo. Esta correlación podría deberse a una respuesta de los MPRs al aumento de la actividad total de enzimas que se produce entre los 10 y 20 días. Para conocer si alguna de las proteínas de la fracción asociada a membranas son reconocidas específicamente por los MPRs se realizaron ensayos “binding” que permitieron la detección de proteínas que son ligandos para los receptores en estudio.

2.7- Ligandos fosfomanosilados en hígado de rata durante el desarrollo perinatal:

Se realizó una adaptación del método de Valenzano et al. (256). Las proteínas solubles de la fracción EU fueron analizadas por SDS-PAGE, transferidas a membranas de nitrocelulosa e incubadas con CI-MPR bovino biotilado, en presencia ó ausencia de M6P.

Este receptor fue purificado por cromatografía de afinidad en fosfomanano-agarosa a partir de un polvo de acetona de hígado bovino según el método de Sahagian et al (257) (ver metodología). En la figura 2.18 A se puede observar una única proteína de 300 kDa retenida por la columna y eluída con M6P (carriles E₁-E₆). Esta corresponde al CI-MPR.

La proteína purificada y concentrada fue biotilada según el procedimiento estándar con reactivo Sulfo-NHS-biotina en medio alcalino. El resultado de la misma fue analizado por SDS-PAGE, transferido a membranas de nitrocelulosa y detectado por método quimioluminiscente, (Figura 2.18 B).

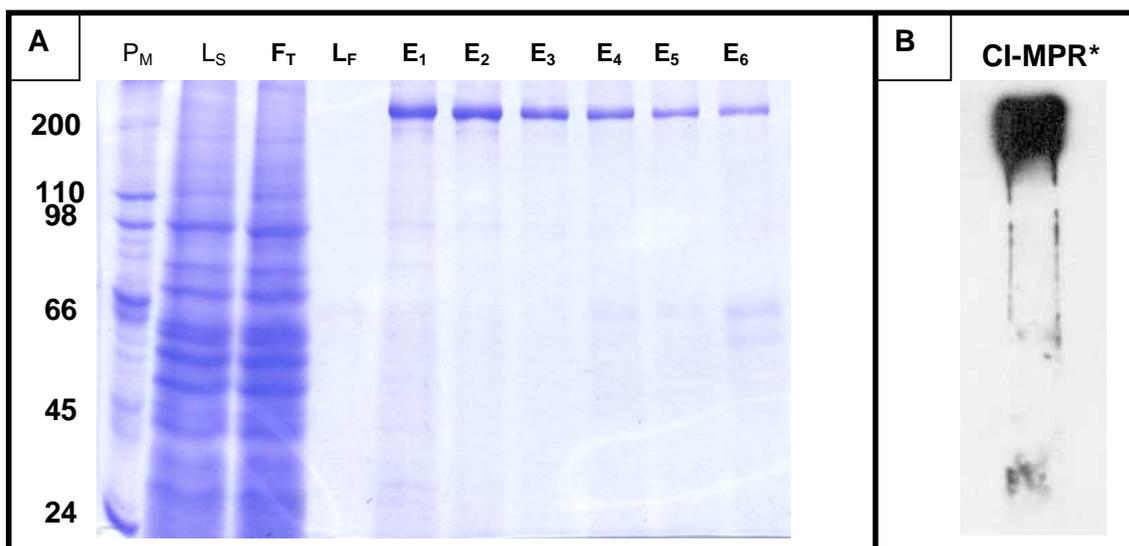


Figura 2.18: Purificación y biotinylation del CI-MPR: Las proteínas de membrana de hígado bovino fueron extraídas con detergentes (ver metodología) y cromatografiadas en Fosfomanano-agarosa. A: muestras del líquido de siembra (L_S), eluato directo (F_T), lavados inicial y final (L₁ y L_F) y de las fracciones eluídas con M6P (E₁-E₆) se analizaron por SDS-PAGE junto a un estándar de pesos moleculares (P_M) y los geles fueron teñidos con Azul de Coomassie. Una banda de 300 kDa fue eluída con M6P y corresponde al CI-MPR. B: Control del estado de biotinylation del CI-MPR. El receptor biotinylation fue analizado por SDS-PAGE, transferido a membranas de nitrocelulosa y detectado por un método quimioluminiscente.

El receptor biotinilado fue usado posteriormente como sonda para detectar glicoproteínas con residuos M6P de la fracción soluble EU de hígado de las edades estudiadas. Este ensayo es utilizado ampliamente para detectar las proteínas fosfomanosiladas de diferentes muestras, (257, 258-260).

Del patrón original de proteínas totales, (Figura 2.19 A), varias proteínas tuvieron afinidad por el receptor biotinilado, predominando las de mediano y bajo peso molecular (del orden de los 70 kDa hacia abajo). La interacción del receptor con estas proteínas fue inhibida entre un 50 y un 100 % por M6P, demostrándose la especificidad de la misma. (Figura 2.19 B)

Aunque el patrón de proteínas fosfomanosiladas fue cualitativamente similar, la cantidad total de esas proteínas fue diferente entre las edades estudiadas.

La cantidad total de bandas proteicas que interactúa con el CI-MPR aumentó de 8 en los primeros estadios a 20 desde los 10 días en adelante. La intensidad del marcado de estas bandas fue aumentando hasta alcanzar un pico máximo entre los 10 días y 20 días (20 y 23 % respectivamente de la intensidad total calculada por densitometría óptica) (Figura 2.19 B).

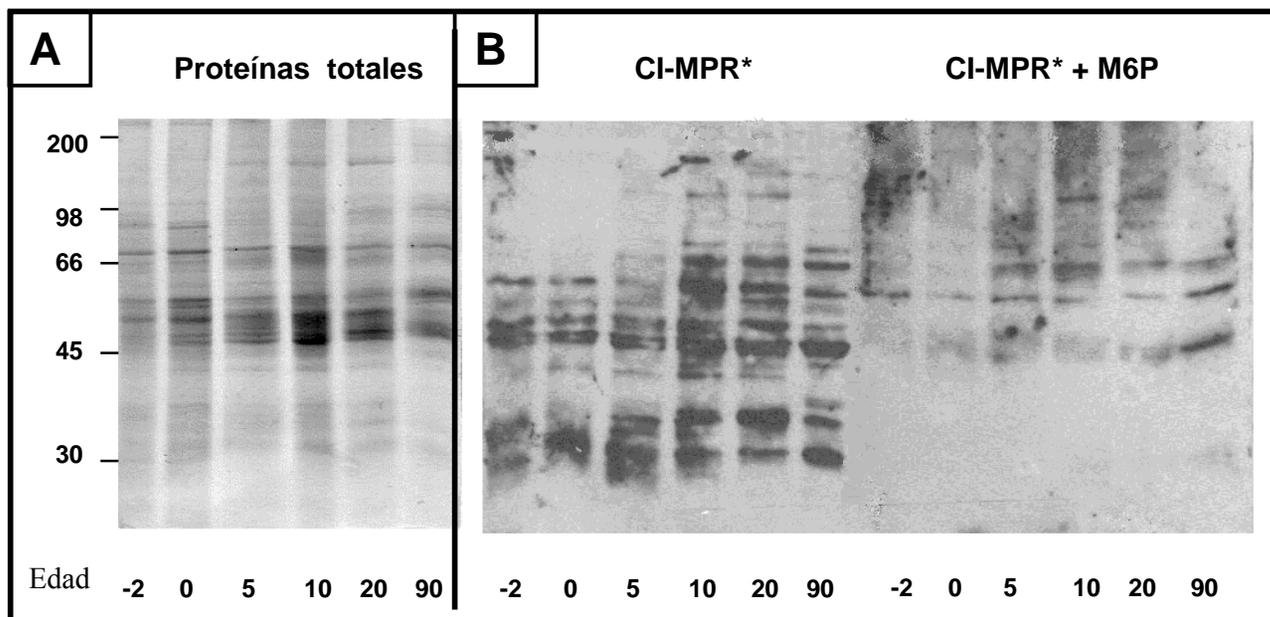


Figura 2.19: Ligandos fosfomanosilados de la fracción EU de hígado de rata de diferentes edades. Proteínas (50 μ g) de la fracción EU de las edades indicadas, fueron separadas por SDS-PAGE y teñidas con Azul de Coomasie (A) o transferidas a membranas de nitrocelulosa e incubadas con CI-MPR biotinilado (CI-MPR*) en presencia o ausencia de 10 mM de M6P (B). Las bandas que unieron el receptor fueron luego detectadas con avidina-peroxidasa y por un método quimioluminiscente. Los números sobre el eje vertical indican los pesos moleculares en kDa del estándar utilizado (se aplica tanto en la figura A como en la B). Esta figura es representativa de cinco experimentos similares.

Se compararon los patrones electroforéticos de las subunidades de glicosidasas NAG ó MAN detectadas con los anticuerpos específicos con las proteínas detectadas por el receptor biotinilado, demostrándose que las bandas correspondientes a estas hidrolasas ácidas se superponen con algunas bandas que unen al receptor.

En la figura 2.20 se puede ver la doble banda detectada por el anticuerpo anti-NAG con pesos moleculares aparentes en el orden de los 58 y 66 kDa respectivamente y las detectadas por el receptor. Las subunidades de 45 y 65 kDa de MAN también fueron detectadas en forma específica por el receptor, esta última se ubica en posición intermedia entre la doble banda de NAG. Desde estas coincidencias, consideramos que al menos estas dos enzimas son ligandos fosfomanosilados.

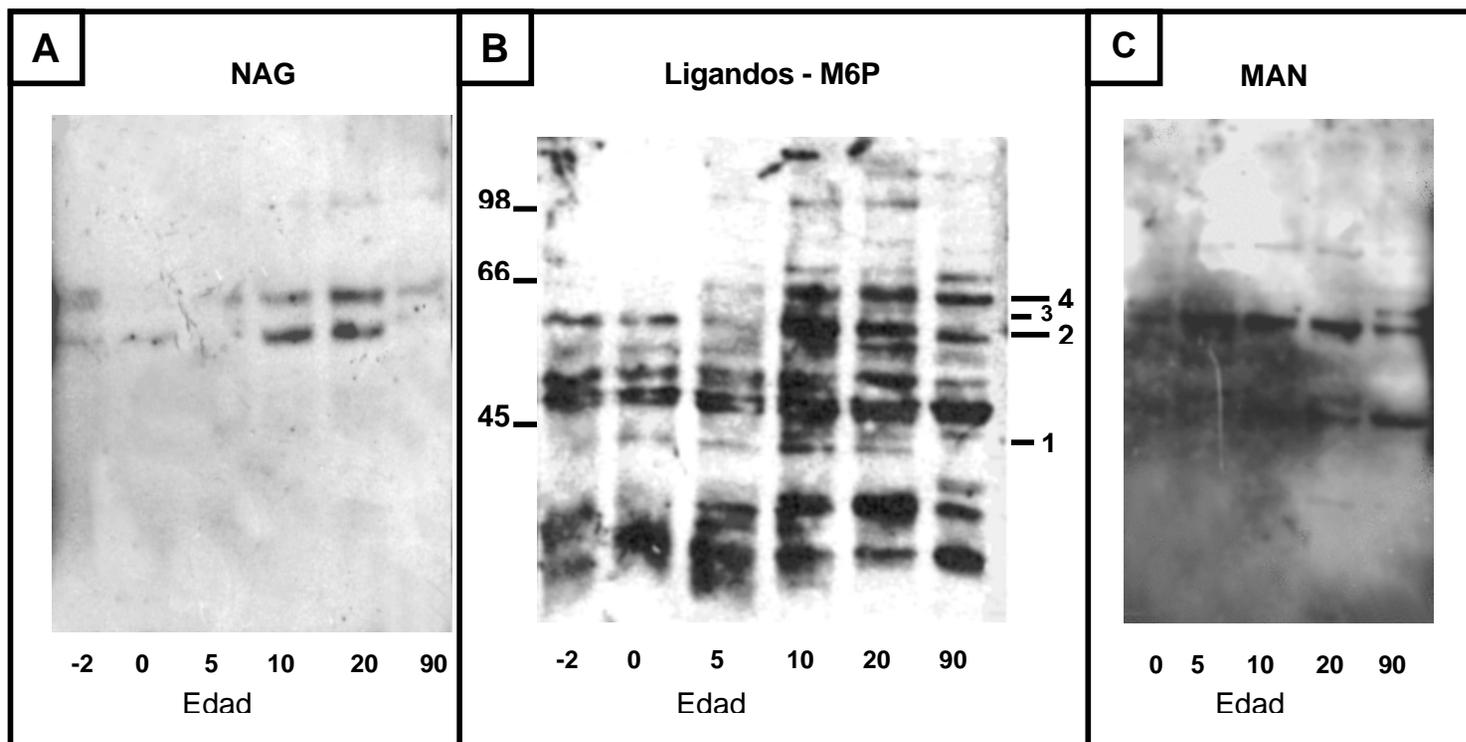


Figura 2.20: Algunos de los ligandos detectados por el CI-MPR biotinilado podrían corresponder a hidrolasas ácidas. Proteínas (50 μ g) de la fracción EU de las edades indicadas fueron separadas por electroforesis (SDS-PAGE) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Sobre ellas se detectó NAG (A), o MAN (C), usando sus anticuerpos específicos o se incubó con el receptor biotinilado (B) revelando las bandas por un método quimioluminiscente. En el panel B se indican además las bandas de 58 y 66 kDa correspondientes a NAG (2 y 4 respectivamente), las subunidades de 45 y 65 kDa de MAN (1 y 3) y en el lado izquierdo se señalan los pesos moleculares aparentes en kDa.

Hasta aquí hemos demostrado que existen glucosidasas como NAG, GLU y GAL que tienen máxima actividad total y asociada a membranas en hígado entre los 10 y 20 días. Estos valores coinciden con una mayor cantidad de ligandos fosfomanosilados (incluyendo NAG) y con elevada expresión a esas edades. Teniendo en cuenta estos resultados y comparando con el comportamiento de los receptores visto previamente, podemos sugerir que hay una mayor participación del CD-MPR en la evolución del aparato lisosomal entre los 10 y 20 días del desarrollo de hígado. Para comprobarlo se realizaron ensayos de unión de enzimas endógenas con membranas de hígado correspondientes a la misma edad y se discriminó la unión específica a cada uno de los receptores.

2.8- Un alto porcentaje de NAG de hígado de rata de 10 días se une al CD-MPR:

A partir de los altos niveles de NAG unidos a membranas a los 10 días (Figura 2.16) nos preguntamos si esa unión era mediada por los MPRs y cual era la incidencia del CD-MPR y del CI-MPR. Realizamos ensayos de acoplamiento de la enzima NAG propia (fracción EU) con las membranas de su correspondiente edad. Se eligió NAG porque presenta una elevada actividad total y asociada a membranas en hígado, haciendo un pico a los 10 días, y porque además, contiene residuos M6P en su oligosacárido, como se demostró en la sección anterior.

Se determinaron las unidades de NAG de 10 y 90 días que se asocian a cada receptor en las membranas de hígado de las edades correspondientes. Como inhibidores del “binding” específico se usaron M6P o anticuerpos que reconocen cada uno de los receptores. Como se observa en la Figura 2.21 la incidencia del CD-MPR en la unión de NAG a membranas es mayor que la del CI-MPR en hígado de 10 días, mientras que en adulto esta proporción cambia.

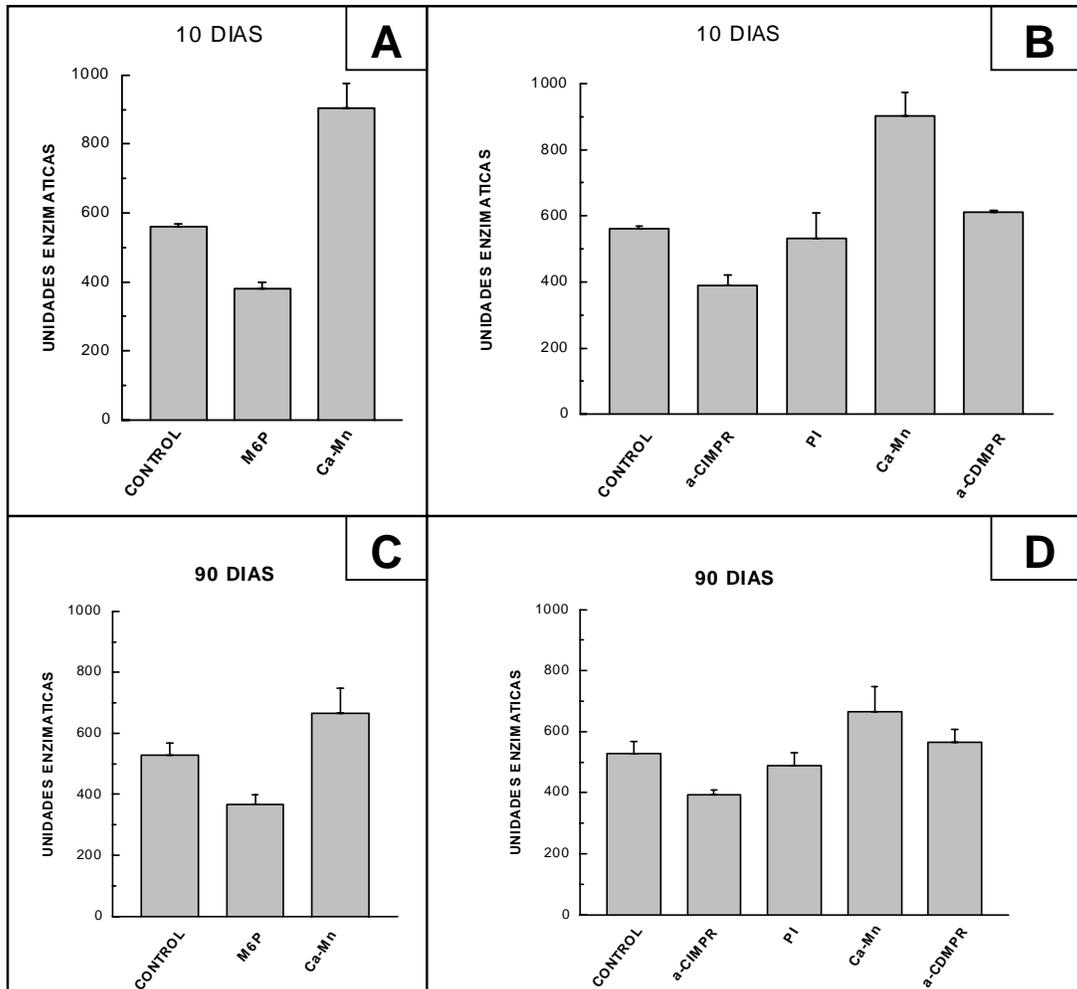


Figura 2.21: Unión de NAG de hígado de 10 o 90 días a membranas de las mismas edades. Proteínas de membranas (100 μ g) de 10 y 90 días fueron incubadas con 1500 U de NAG de las edades correspondientes en condiciones control (Control) o en presencia de (M6P) o de iones bivalentes (Ca-Mn) (Figura 2.21 A y B). También se hicieron ensayos en presencia de anticuerpos específicos (α -CI-MPR y α -CD-MPR) y de suero preinmune (PI) (ver metodología) (Figura 2.21 C y D). La enzima unida fue sedimentada con las membranas y su actividad medida por método fluorométrico. Se muestran los valores medios \pm ES correspondiente a cinco experimentos.

Estos ensayos nos permiten determinar las proporciones de receptores (CD-MPR o CI-MPR) activos para el reconocimiento de las propias enzimas a cada edad estudiada. Se observa que a los 10 días, la cantidad de NAG que se une a membranas en presencia de iones bivalentes (CaCL₂ y MnCl₂) es alta con respecto al control. Cuando se usa M6P como inhibidor del “binding” específico, los valores son similares a aquellos donde se usan anticuerpos (Figura 2.21 y Tabla 2.3). La inhibición en presencia de M6P y de iones bivalentes no es factible en la práctica por interacciones entre el catión calcio y el fosfato.

	Edad			
	10 días		90 días	
	Modos de estimación			
	A	B	A	B
Enzima UNIDA AL CD-MPR (U)	343,50	278,66	135,26	98,43
Enzima UNIDA AL CI-MPR (U)	178,93	170,36	162,94	135,59
Enzima Unida dependiente de M6P	522,43	449,02	298,20	234,02
Enzima Unida independiente de M6P	380,84	389,41	366,36	393,71

Tabla 2.3: Unidades enzimáticas de NAG unidas al CD-MPR y CI-MPR. Estos valores fueron calculados a partir de la unión de la enzima en presencia y ausencia de M6P y en presencia y ausencia de iones bivalentes (cálculo A) ó a partir de la enzima unida en presencia y ausencia de los anticuerpos específicos de cada uno de los receptores (cálculo B). La suma de las unidades acopladas a cada receptor representa la unión dependiente de M6P, También se muestran las unidades de NAG asociadas en forma independiente de M6P.

En primer lugar observamos que la cantidad total de enzima que se une a los receptores es 2 veces mayor a los 10 días que en adultos, en cierta concordancia con la cantidad asociada a membranas (Figura 2.16),

También observamos que a los 10 días es mayor la incidencia del CD-MPR en el reconocimiento de NAG propia (62-66 %), mientras que en los adultos sorprendentemente la incidencia del CI-MPR es mayor (52-58%). También se realizaron ensayos cruzados, utilizando NAG de 90 días sobre membranas de 10 días y viceversa. En estos se observó que los porcentajes de incidencia de uno y otro receptor tenían la misma tendencia que los realizados con las enzimas propias, indicando que la diferencia está en los receptores presentes en uno y otro estadio y no en la enzima.

Desde varios enfoques experimentales podemos afirmar que en la etapa crítica del desarrollo de hígado (10 días posnatales) los CD-MPR tienen la mayor incidencia en el transporte de hidrolasas lisosomales a lisosomas. Esto se demostró por acoplamiento de enzimas exógenas, acoplamiento de enzimas endógenas, y es además el momento en que la expresión del CD-MPR hace un pico de valores máximos. Se podría inferir que la expresión del CD-MPR es estimulada por el aumento de la expresión de las enzimas lisosomales o de ligandos fosfomanosilados que ocurre a esa edad.

La incidencia del CI-MPR en el acoplamiento de NAG en adultos es un poco controvertida, ya que la expresión de este receptor a esa edad es mínima (comparada con el CD-MPR). Sin embargo, demostramos aquí que a pesar de su baja expresión, el CI-MPR tiene una afinidad más alta por las enzimas a esa edad. El significado biológico de esta inversión en adultos no es muy claro.

A los 10 días podemos decir que el desarrollo lisosomal alcanza su punto máximo, indicado por la expresión de enzimas, y que el CD-MPR cumple un rol crucial en esta etapa, reemplazando funcionalmente al CI-MPR.

C)- EL APARATO LISOSOMAL DE CEREBRO DE RATA PRESENTA SIMILITUDES Y DIFERENCIAS DE LAS OBSERVADAS PARA HÍGADO DE RATA DURANTE EL DESARROLLO PERINATAL:

INTRODUCCIÓN:

Los ligandos fosfomanosilados, que son transportados por los MPRs, al llegar a endosomas tardíos se disocian de sus receptores debido al pH ácido de este compartimiento y luego reciclan al TGN, mientras que las enzimas son llevadas finalmente a lisosomas (Figura 1.6). En todos los órganos, excepto en cerebro, se hidroliza el grupo fosfato de la M6P, como una etapa obligatoria en la transformación de pro-enzima a la enzima activa. A pesar de que la actividad de una manosa-6-fosfatasa ha sido detectada, aún no ha podido ser purificada y no se sabe a ciencia cierta donde se encuentra compartimentalizada.

En cerebro, sin embargo, los ligandos para los MPRs permanecen fosfomanosilados aún después de haber sido liberados en el lumen de endosomas tardíos, siendo esta una característica única de este órgano (258). El significado biológico de esta diferencia no ha podido ser explicado aún, pero se conoce que estas enzimas tienen actividad normal en un aparato lisosomal muy activo, cuyas diferencias son el origen de algunas enfermedades. Por lo tanto nos decidimos continuar el estudio de los MPRs durante el desarrollo de este órgano marcando las diferencias y similitudes con los estudios hechos en hígado.

RESULTADOS:

2.9- Expresión de los MPRs durante el desarrollo de cerebro de rata:

Una fracción membranosa de cerebro de las edades estudiadas fue analizada por SDS-PAGE y posterior "western blot". Se observó que la expresión del CI-MPR disminuye progresivamente desde fetos a adultos de manera similar a lo que ocurre con hígado (Figura 2.22 A).

Sin embargo, a diferencia de lo observado en hígado, el CD-MPR presenta una elevada expresión en cerebro en todos los estadios, alcanzando un pico máximo a los 20 días posnatales (Figura 2.22 B, comparar con Figura 2.1). En los estadios más tempranos (entre los -2,0 y 5 días) la cantidad de receptor presente es constante y representa aproximadamente el 65% del valor máximo (desde los 10 días). Después de

los 10 días la expresión se incrementa y permanece elevada hasta la edad adulta (90 días). En la figura también se puede observar que la movilidad electroforética del CD-MPR en cerebro es ligeramente mayor que la de hígado, indicando que existen diferencias en la estructura proteica del receptor entre ambos tejidos.

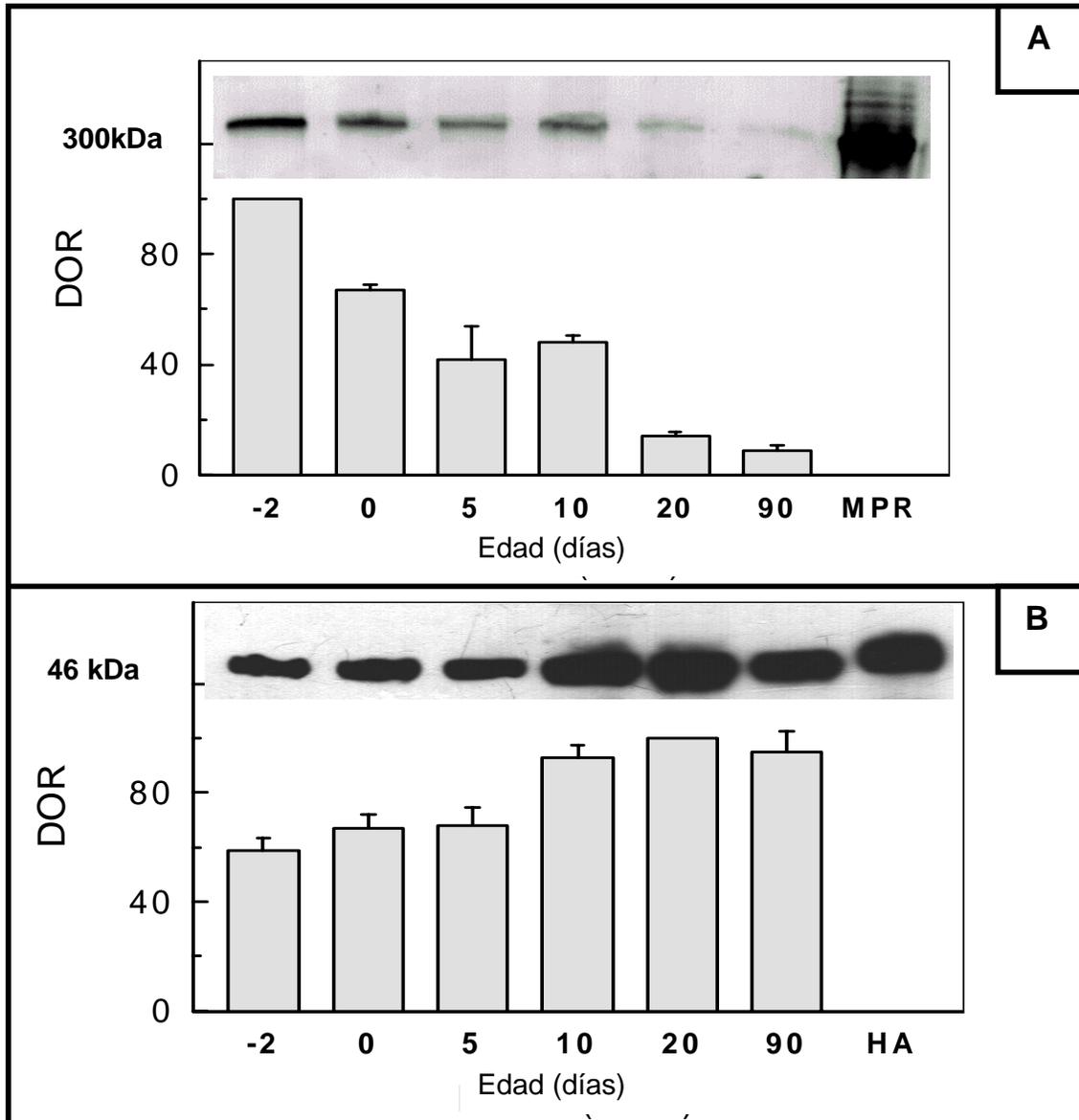


Figura 2.22: Inmunodetección de MPRs en membranas de cerebro de rata a diferentes edades. Proteínas de una fracción membranosa de cerebro de las edades indicadas fueron separadas por electroforesis (SDS-PAGE), transferidas a membranas de nitrocelulosa y detectadas con anticuerpos específicos contra CI-MPR (A) ó CD-MPR (B). Como controles se usaron CI-MPR bovino purificado (MPR) y proteínas de membrana de hígado adulto (HA). Las bandas específicas fueron detectadas por quimioluminiscencia y cuantificadas por densitometría. Las barras representan las densidades ópticas relativas (DOR) +/- ES de tres experimentos similares.

2.10- Estudio de las propiedades de los MPRs en cerebro:

Se realizaron ensayos “binding” de β -Glu a las membranas de cerebro de los distintos estadios con el fin de caracterizar a los MPRs. Las curvas resultantes muestran que la enzima se une en forma específica (inhibible por M6P) y saturable indicando que hay un número limitado de sitios de afinidad (Figura 2.23). El número de sitios activos resultó ser diez veces menor al estudiado en hígado.

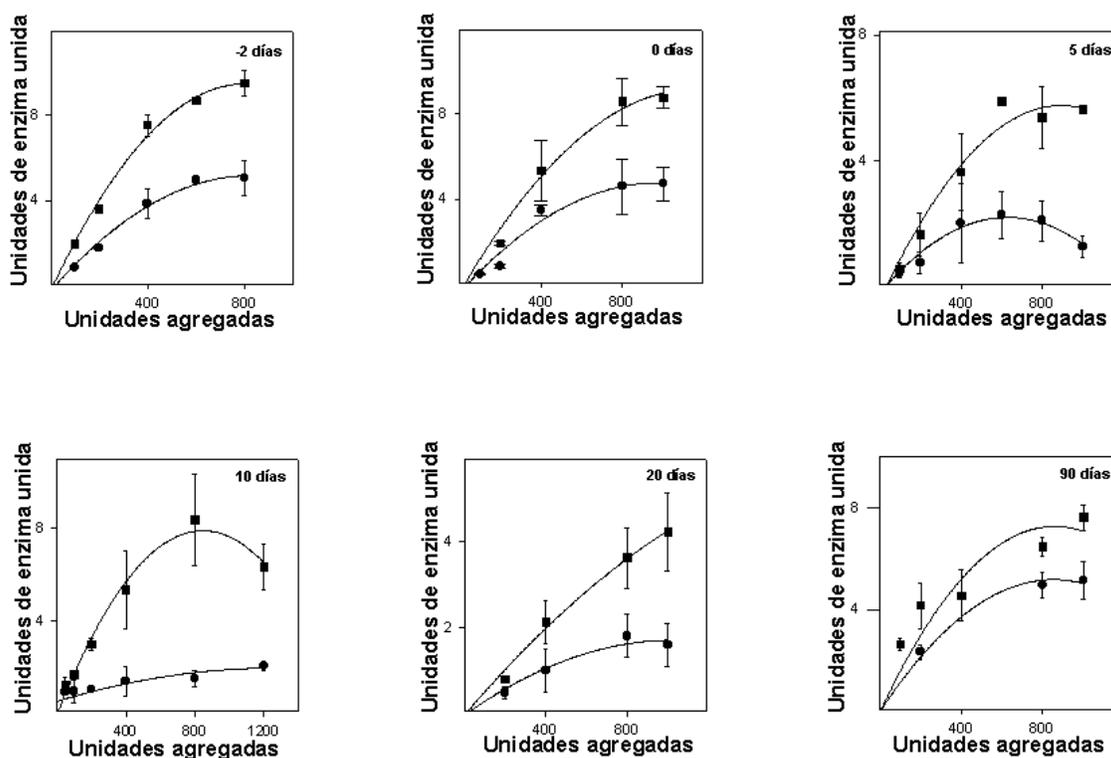


Figura 2.23: Unión de β Glu a membranas de cerebro de rata de diferentes edades. Proteínas de membranas de las edades indicadas fueron incubadas con 50-1000 U de la enzima, en ausencia (curva inferior) o presencia (curva superior) de cationes bivalentes. La enzima unida fue sedimentada por centrifugación con las membranas y cuantificada por espectrofluorometría. La unión inespecífica (no inhibida por M6P) fue sustraída de cada curva. Cada punto representa la media +/- DS de tres experimentos.

A partir de estas curvas y aplicando las mismas fórmulas de aproximación matemática usadas para hígado, se determinaron los valores de B_{\max} y K_D (Tabla 2.4).

En la tabla 2.4 se observa que el CI-MPR tiene un elevado número de sitios activos, pero de baja afinidad en los primeros estadios (-2, 0 y 5 días) (B_{\max} y K_D

elevados). A los 10 días el número de sitios activos presenta un descenso significativo ($P < 0,01$), luego aumenta progresivamente hacia la edad adulta.

A diferencia de lo que ocurre con hígado, el CD-MPR muestra un descenso progresivo en el número de sitios activos, que se hace significativo ($P < 0,05$) cuando comparamos los tres primeros estadíos (-2, 0, 5 días) con los tres últimos (10, 20 y 90 días).

La afinidad para ambos MPRs se incrementa significativamente ($P < 0,01$ para el CI-MPR) y ($P < 0,05$ para el CD-MPR) a partir de los 5 días, del mismo modo que ocurre en hígado (Tabla 2.2).

	Edad(días)	-2	0	5	10	20	90
CD-MPR	K_D (nM)	18.6	20.6	6.8	4.5	2.8	1.8
	B_{max} (pmol/mg protein)	1.93	1.63	0.92	0.77	0.61	0.50
CI-MPR	K_D (nM)	9.1	10.2	3.4	2.1	1.2	3.0
	B_{max} (pmol/mg protein)	1.17	1.13	1.13	0.25	0.46	0.71

Tabla 2.4: Valores de B_{max} y K_D para CD y CI-MPR calculados a partir de los ensayos de unión de β - Glu en cerebro de rata durante el desarrollo perinatal.

Para comparar la progresión de estos parámetros entre sí, los valores fueron aproximados a una escala arbitraria para ser insertos en una misma gráfica. La expresión de los receptores se representó como la centésima parte de la DOR obtenida de la figura 2.22, mientras que el número de sitios activos (en pmoles por mg de proteína) y la afinidad (cociente inverso del K_D) para cada receptor se obtuvieron de la tabla 2.4:

$$\text{Expresión} = \frac{\text{DOR}}{100}$$

$$\text{Afinidad} = \frac{1}{K_D}$$

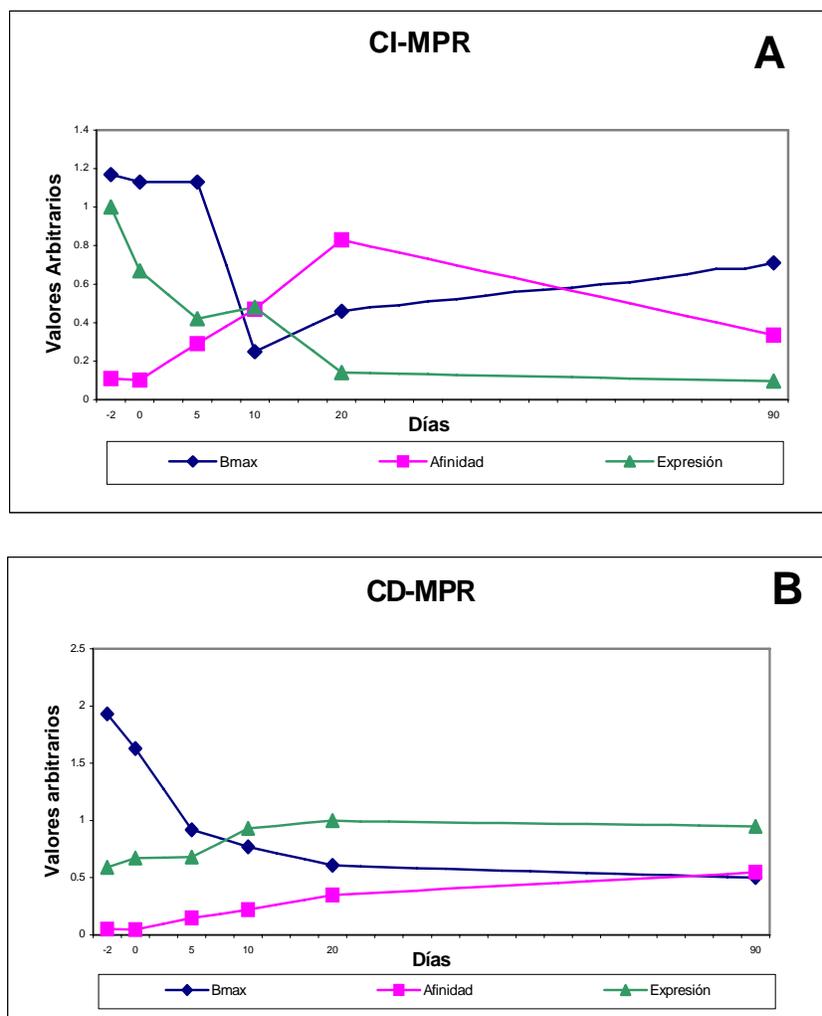


Figura 2.24: Variación en la expresión, afinidad y número de sitios de afinidad del CI-MPR (A) y del CD-MPR (B) en cerebro de rata a las edades perinatales.

Aunque los valores de B_{\max} fueron diez veces menores que los de hígado (Figura 2.24 A) la tendencia de las variaciones entre los parámetros estudiados para el CI-MPR fue similar entre ambos tejidos. Así, en este órgano la afinidad y el número de sitios activos son altos en los adultos, aún cuando la expresión del receptor está reducida a un valor mínimo en esta edad. Se podría decir entonces, que los mismos mecanismos que gobiernan el comportamiento de este receptor en hígado son válidos para cerebro.

El CD-MPR, en cambio, no tiene las mismas variaciones entre cerebro a las edades estudiadas (Figura 2.24 B). Como habíamos observado, el B_{\max} y la afinidad aumentan en hígado desde los 10 días en adelante, mientras que en cerebro sólo la afinidad se

incrementa hacia la edad adulta, pero el B_{\max} desciende progresivamente hacia esa edad. También es diferente el modo en que varía la expresión del CD-MPR entre esos tejidos. En hígado, la expresión desciende a un mínimo en los tres primeros estadios (fetos, recién nacidos y 5 días), y luego hace un pico a los 10 días y se mantiene en esos niveles hasta la edad adulta. En cerebro, en cambio, la expresión no desciende en los tres primeros estadios y presenta valores de un 65 % del valor máximo (a los 20 días).

Como se demostró en las secciones anteriores, las actividades de algunas de las hidrolasas lisosomales hepáticas se modificaban durante el desarrollo en forma paralela a los parámetros estudiados en el CD-MPR. Se pudo demostrar que una de las enzimas hepáticas (NAG) se une mayoritariamente al CD-MPR precisamente en el momento en que ese receptor manifiesta su máxima actividad (10 días) y esa misma enzima se une preferentemente al CI-MPR a los 90 días.

Intentamos ver si esa parcial correlación existía en el tejido cerebral durante el desarrollo.

2.11- Evolución de la actividad enzimática lisosomal durante el desarrollo perinatal en cerebro de rata:

Luego de un fraccionamiento subcelular de cerebro de rata de las diferentes edades estudiadas se midió la actividad enzimática de cuatro glicosidasas (NAG, GLU, GAL y MAN) en todas las fracciones, de manera similar a lo que se hizo con hígado. Se determinaron los valores de actividad enzimática total por mg de tejido y de actividad asociada a membranas por mg de tejido (EU) de cada enzima.

Las actividades totales:

La actividad enzimática total en este tejido, fue aproximadamente 10 veces menor que la observada en hígado. La mayor actividad correspondió a NAG, y luego GAL y MAN, con actividades similares entre sí, y finalmente GLU, que está expresada en niveles muy bajos en este tejido. La actividad de NAG hace un pico muy pronunciado a los 20 días, como se puede observar en la figura 2.25. Aunque GAL, MAN y GLU también tienen su máxima actividad a los 20 días, el incremento no es pronunciado como en el caso de NAG. El contenido de proteínas por g de tejido no se modificó sustancialmente durante el desarrollo.

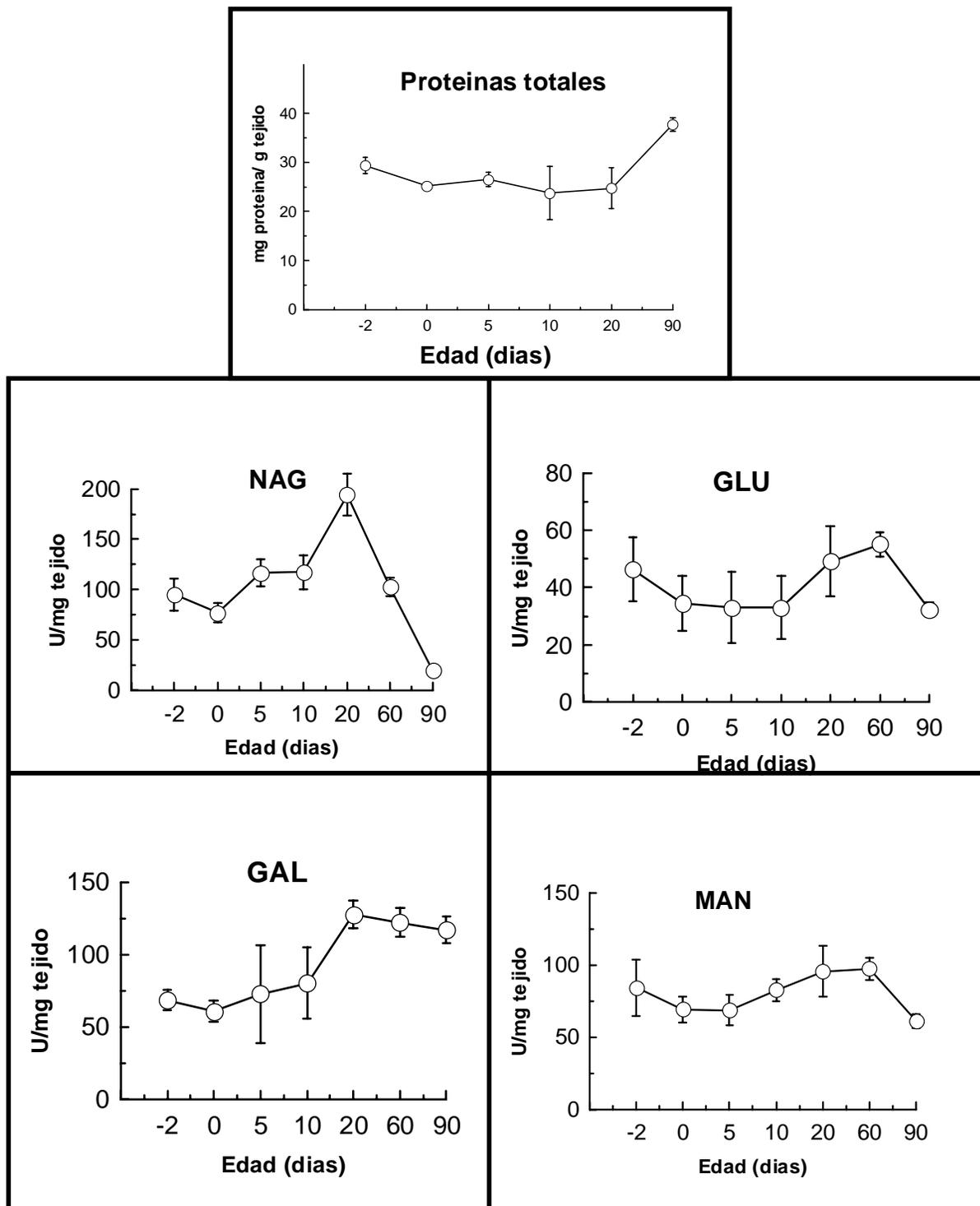


Figura 2.25: Actividades enzimáticas totales de glicosidasas en membranas durante el desarrollo perinatal de cerebro de rata: Luego de un fraccionamiento subcelular en cerebro de rata a las edades indicadas, (ver metodología), se midió la concentración proteica y las actividades de NAG (β -Hexosaminidasa), GLU (β -Glucuronidasa), GAL (β -Galactosidasa) y MAN (α -Manosidasa) en todas las fracciones por un método espectrofluorométrico. La actividad total es expresada en unidades por mg de tejido.

Las actividades asociadas a membranas:

De manera similar a lo que ocurre con hígado, la actividad de tres enzimas (NAG, GAL y GLU) asociadas a las membranas de cerebro (EU), representa una décima parte de su respectiva actividad total.

En cambio, y sorprendentemente, un mayor porcentaje de la actividad de MAN se encuentra asociada a membranas (entre 20 y 45 %) y no presenta mayor correlación con las variaciones de la actividad total (comparar Figura 2.25 y 2.26). Además, si comparamos la variación durante el desarrollo, la actividad de MAN se mantiene elevada desde la edad fetal hasta los 20 días y luego desciende a los 90 días, mientras que las demás enzimas, GAL, NAG y GLU aumentan en las edades intermedias (10y 20 días) pero este aumento no parece ser significativo. (Figura 2.26).

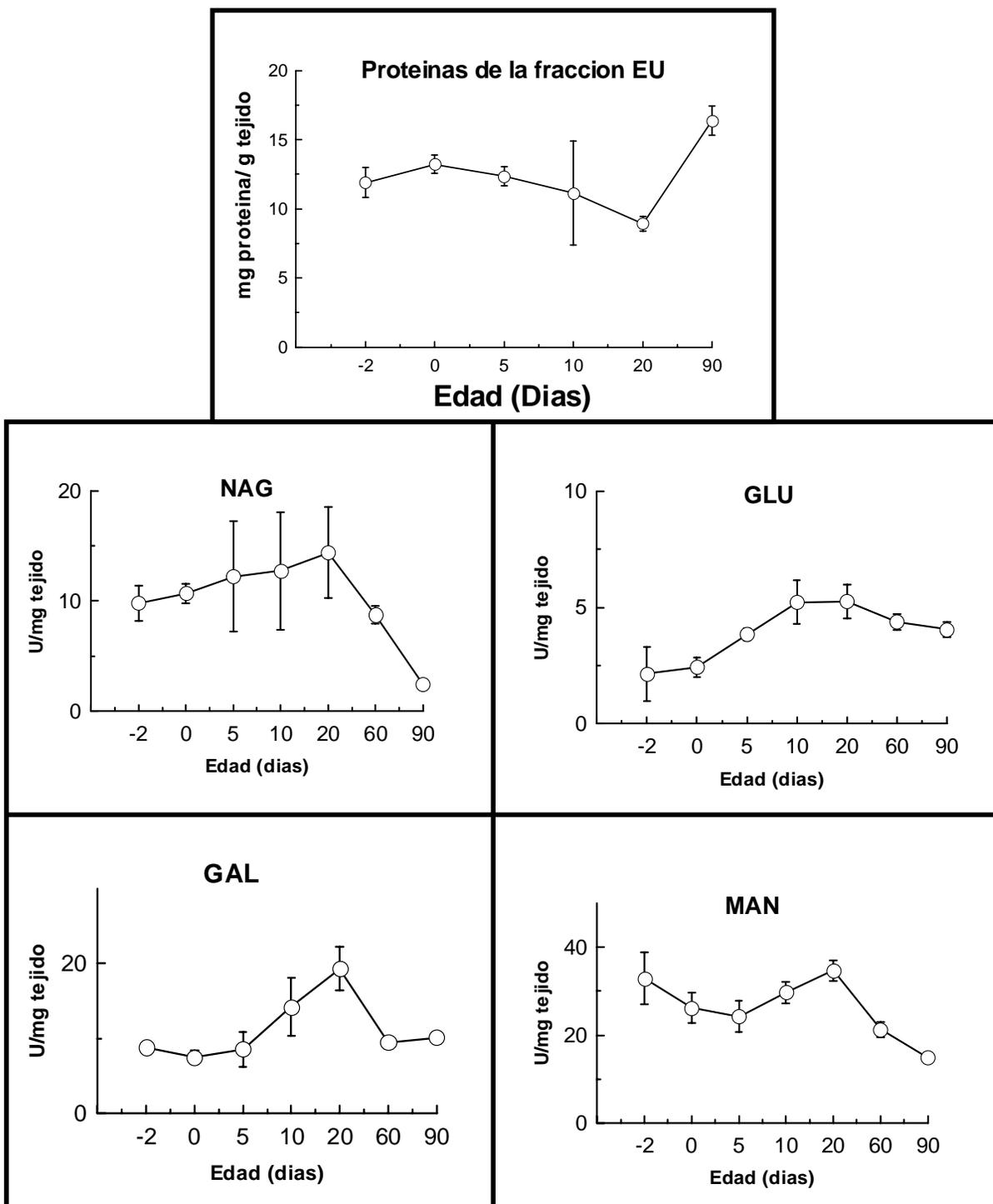


Figura 2.26: Actividad de cuatro glicosidasas en la fracción asociada a membranas durante el desarrollo perinatal de cerebro de rata. La concentración de proteínas y las actividades de NAG (β -Hexosaminidasa), GLU (β -Glucuronidasa), GAL (β -Galactosidasa) y MAN (α -Manosidasa) se midieron en la fracción EU por un método espectrofluorométrico y se expresaron en unidades por mg de tejido.

De acuerdo a estos resultados, MAN es la enzima que presenta mayor grado de asociación a las membranas cerebrales y la siguiente etapa fue tratar de determinar si los MPRs son los responsables de esa asociación.

Debido a que la actividad de MAN en cerebro es muy baja no nos permitía realizar ensayos “binding” para resolver el interrogante.

Por ello, tratamos de identificar MAN entre los ligandos fosfomanosilados que hay en cerebro, los cuales fueron reconocidos por el CI-MPR biotinilado, en un ensayo similar al de la figura 2.19 en hígado. Los ligandos fosfomanosilados de la fracción EU no son muchos de acuerdo a nuestros resultados (Figura 2.27).

Observamos interesantes cambios en la calidad y cantidad de los ligandos fosfomanosilados entre las edades estudiadas y una vez más demostramos que los 20 días es una edad crítica, en donde actividades enzimáticas totales, unidas a membranas, y expresión del CD-MPR se modifican sustancialmente con respecto a las otras edades.

Aparentemente uno de esos ligandos tiene una superposición con el PM de una de las subunidades (65 kDa) de MAN (Figura 2.26, comparar A con B).

Si comparamos este método con las medidas de actividad total y de actividad unida (Figura 2.25 y 2.26) observamos que hay cierta correlación y que por lo tanto MAN podría ser la mayor enzima fosfomanosilada reconocida por los MPRs en fetos y a los 20 días de edad. Sin embargo, este método no nos permite determinar a cual de los MPRs se une a esa edad.

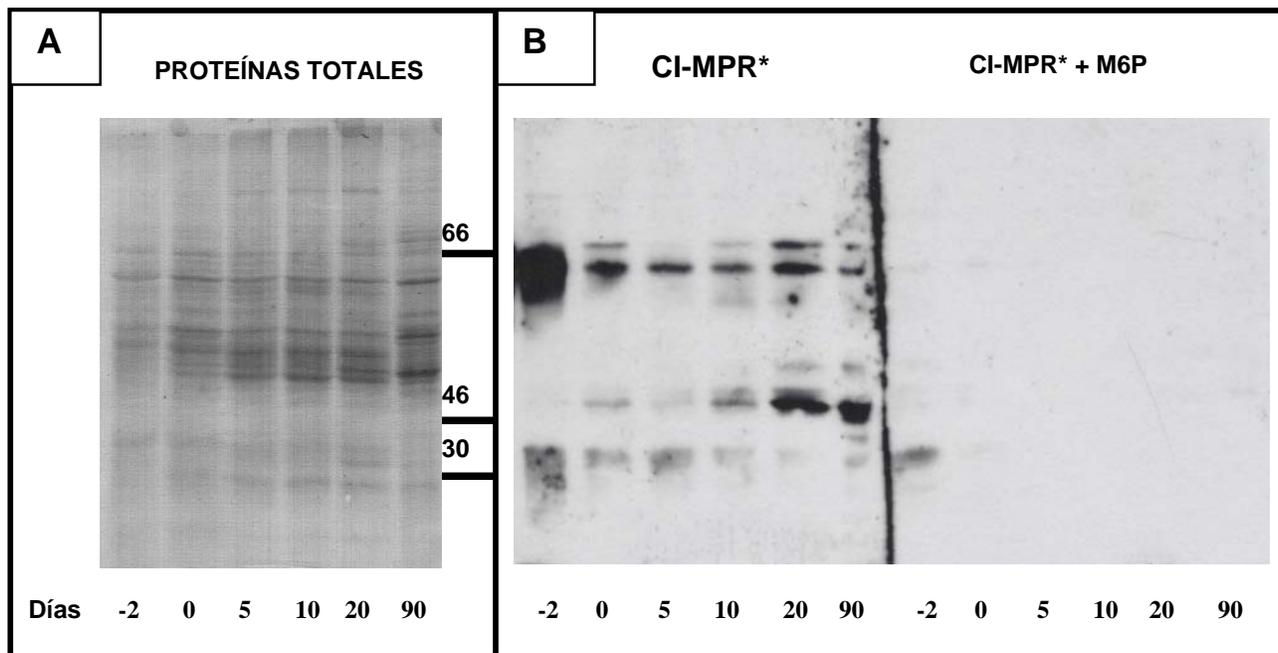


Figura 2.27: Ligandos fosfomanosilados de la fracción EU de cerebro de rata de diferentes edades. Proteínas de la fracción EU (50 μ g) de las edades indicadas fueron analizadas por SDS-PAGE y los geles teñidos con Azul de Coomassie (A) o las proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa e incubadas con CI-MPR biotinilado, en presencia o ausencia de 10 mM de M6P (B). Las bandas reconocidas por el receptor fueron luego detectadas por un método quimioluminiscente. Se indican (en kDa) las posiciones de un estándar de pesos moleculares (válido para la Figura A y B). Esta figura es representativa de tres experimentos similares.

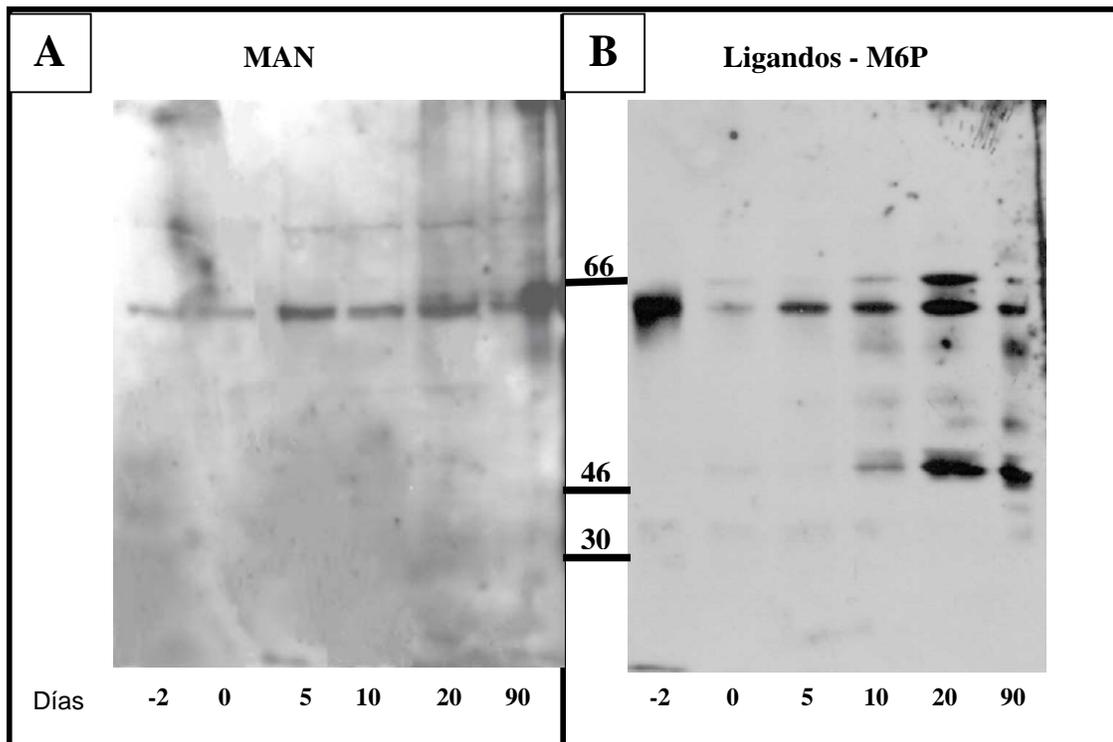


Figura 2.28: Algunos de los ligandos detectados por el CI-MPR biotinilado corresponden a enzimas lisosomales. Proteínas de la fracción EU (50 μ g) de las edades indicadas fueron analizadas por electroforesis (SDS-PAGE) y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Sobre ellas se detectaron MAN (A) y proteínas con residuos M6P (B) Se indican los pesos moleculares aparentes en kDa.

Estos resultados permiten demostrar que MAN presenta residuos M6P en todas las edades estudiadas. Aún cuando su expresión se mantiene relativamente constante durante el desarrollo, con el receptor biotinilado, existen dos picos de alta detección, en fetos y a los 20 días, coincidiendo con los picos de mayor actividad enzimática.

En la primera sección de cerebro, se observó que el CD-MPR tenía una expresión relativamente alta (65 % de valor total) en los tres primeros estadíos (-2, 0 y 5 días) y que luego el pico de expresión máxima se encontraba a los 20 días. Además, el número de sitios activos para este receptor es máximo en fetos y luego desciende hacia la edad adulta, a medida que se incrementa la afinidad.

Si bien para cerebro, hay que reunir más pruebas, es importante observar la alta correlación entre la actividad de MAN asociada a membranas y la expresión y número de sitios activos del CD-MPR. Además la enzima es detectada por CI-MPR biotinilado, presentando residuos M6P. Esta detección es máxima en fetos y a los 20 días, sugiriendo que en esas edades se une a los MPRs de cerebro, pudiendo participar tanto el CI como el CD-MPR.

Todas estas observaciones parecen indicar que el aparato lisosomal de cerebro de rata, se desarrolla de una manera diferente del de hígado. Pareciera que en cerebro la actividad lisosomal se inicia en una etapa temprana del desarrollo y llega a su maduración total a partir de los 20 días.

CAPITULO III

CONCLUSIONES

La función primaria de los MPRs es el transporte selectivo de hidrolasas ácidas a lisosomas. Sin embargo, el significado de la coexistencia de dos formas del receptor, CI y CD-MPR en la mayoría de los tipos celulares y tejidos, es aún poco clara. También existe la controversia si estos receptores pueden o no reconocer y transportar diferentes sets de ligandos. Debido a que el CI-MPR puede acoplar ligandos que no son hidrolasas ácidas, es posible pensar que estos receptores tienen diferentes roles, y de este modo pueden prevalecer unos sobre otros, de acuerdo a la función de la célula.

El objetivo principal de esta tesis fue reconocer posibles diferencias en las funciones de los MPRs por medio del estudio de su evolución durante la maduración de órganos de mamíferos, en este caso en rata.

Para ello se evaluaron las propiedades de los MPRs en el desarrollo y se trataron de explicar algunas de las diferencias observadas.

La expresión del CI-MPR disminuye progresivamente de fetos a adultos:

Se ha demostrado que la elevada expresión del CI-MPR está directamente relacionada con los altos niveles del mitógeno IGF-II en los pasos tempranos del desarrollo en hígado, el cual es reconocido por este receptor y está altamente expresado durante la embriogénesis. Se postula que la interacción entre CI-MPR y el IGF-II sería fundamental durante el desarrollo embriológico ya que permitiría controlar los niveles séricos de este factor de crecimiento, y evitaría un sobrecrecimiento embrionario e incluso la muerte en el período perinatal (que es lo que ocurre en ratones “knock out” del gen de este receptor (*Igf2R*)). En este trabajo demostramos que en hígado fetal estos receptores se encuentran en mayor proporción en membrana plasmática comparado con hígado adulto, lo que refuerza la idea de que este receptor es fundamental en el “clearance” sérico de IGF-II en la edad fetal.

Además, la existencia de un ligando para el CI-MPR, que es diferente de las hidrolasas lisosomales, concuerda con la baja afinidad por β -Glu que presenta este receptor en los fetos. Esto indicaría que **el CI-MPR está fundamentalmente relacionado con el control de la proliferación durante la embriogénesis.**

La afinidad del CI-MPR se incrementa desde fetos a adultos:

La afinidad de este receptor por ligandos fosfomanosilados se incrementa notablemente desde los 10 días del desarrollo, y probablemente la mayor expresión de hidrolasas lisosomales (que a esta edad es máxima) induzca cambios estructurales del CI-MPR en respuesta a ellas.

En este trabajo demostramos que los CI-MPR de hígado de ratas recién nacidas y adultas responden de un modo diferente al tratamiento con un agente reductor (DTT) en cuanto a su afinidad por fosfomanano. Pensamos que esas respuestas diferentes se deben a cambios conformacionales que producen diferentes combinaciones en la formación de los puentes disulfuro. Esto puede, al igual que el CD-MPR, generar patrones de glicosilación diferentes que podrían explicar el incremento en la afinidad de los receptores de adultos. Además, los puentes S-S podrían permitir la formación de mayor cantidad de dímeros de CI-MPR en adultos, los que presentan mayor afinidad a ligandos fosfomanosilados.

Podemos decir, por lo tanto, que **el CI-MPR podría sufrir cambios conformacionales durante el desarrollo que tienden a incrementar su afinidad por hidrolasas lisosomales, llegando a la máxima eficiencia en la edad adulta.**

El CD-MPR en los primeros estadios del desarrollo hepático:

Debido a que en el hígado de fetos la expresión del CD-MPR es alta (Figura 2.1) en contraste con el número de sitios activos y con la afinidad (la relación E/B es alta, la expresión supera al $B_{max.}$) pensamos que en este período existe una gran cantidad de receptores inactivos, al menos para el ligando usado en nuestro estudio.

Un trabajo del año 1992 (50) muestra que los transcritos de CD-MPR en hígado de ratón descienden desde los 7 a los 19 días prenatales. Según nuestro estudio, este descenso en la expresión de CD-MPR continua luego del nacimiento y se mantiene hasta los 10 días posnatales, momento en el cual se produce un pico máximo de expresión. Desconocemos el significado de la presencia de este receptor en estadios tan tempranos del desarrollo. Probablemente esta expresión embrionaria del CD-MPR este gobernada por factores maternos. Sería interesante en un futuro buscar que ligandos podrían acoplarse a este receptor en etapas embrionarias.

El CD-MPR presenta elevada expresión, afinidad y número de sitios activos a partir de los 10 días en hígado:

Como se mencionó antes, en las edades tempranas, un alto porcentaje del CD-MPR podría estar inactivo. Postulamos que este receptor comienza a funcionar en hígado a partir de los 10 días posnatales, coincidiendo con el aumento en la expresión de las enzimas lisosomales en esos días.

Demostramos que en el hígado existe una fuerte correlación entre la actividad enzimática expresada y la actividad que se asocia a las membranas (EU) de las enzimas lisosomales (NAG, GLU, GAL y MAN), y que ambas son máximas a los 10 días. Aún así, estas enzimas podrían asociarse a las membranas por otros mecanismos independientes de los MPRs. Como un aporte para dilucidar esto, demostramos que **hay un aumento en el número de proteínas fosfomanosiladas, reconocibles por el CI-MPR purificado (biotinilado) en esta edad, y que NAG y MAN, al menos, forman parte de esas proteínas fosfomanosiladas.**

Debido a que el aumento de la actividad enzimática total de hígado se correlaciona con la actividad asociada a membranas y con la presencia de ligandos fosfomanosilados en esta fracción podemos deducir que existe una respuesta de los MPRs hacia el aumento de la expresión de estas enzimas observado entre los 10 y 20 días. Dado que el CI-MPR presenta escasa actividad en estas edades, **es el CD-MPR el que tiene mayor incidencia entre los 10 y 20 días en el transporte de estas hidrolasas.** Corroborando esta idea demostramos que el mayor porcentaje de NAG endógena se une al CD-MPR a los 10 días de edad, mientras que en adulto se invierte esta relación (Figura 2.21).



Recapitulando las ideas anteriores referidas al comportamiento de los MPRs y de sus ligandos en el desarrollo de hígado proponemos el siguiente modelo:

En las edades iniciales (fetos de 18 días de gestación y animales recién nacidos y de 5 días) el CI-MPR participa fundamentalmente en el control de la proliferación celular. Esta es seguramente la principal función de este receptor durante el desarrollo embriológico. En este período las enzimas lisosomales se encuentran poco expresadas y el CD-MPR, aunque se expresa, podría estar inactivo.

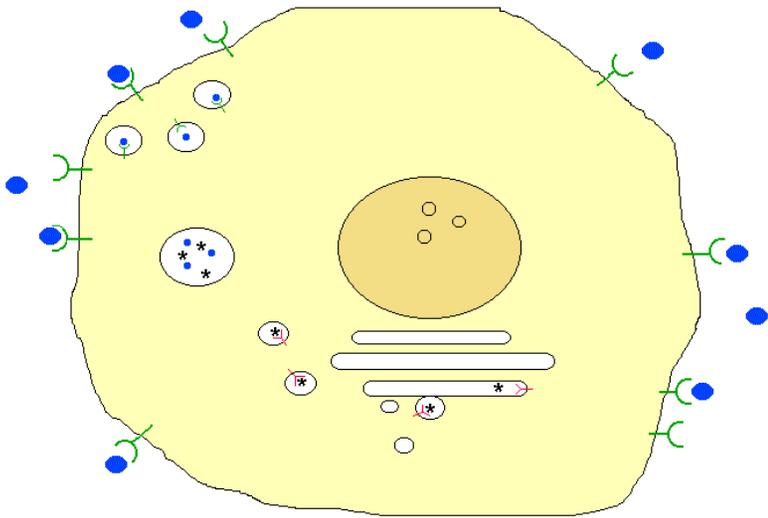
Todo parece indicar que a partir de los 10 días se activa la biogénesis del aparato lisosomal hepático, indicado por un aumento en la expresión de enzimas lisosomales y de ligandos fosfomanosilados. Esto induce cambios en las propiedades específicas del CI-

MPR, que ahora se prepara para reconocer y unir las enzimas lisosomales que comienzan a sintetizarse y que deben ser transportadas. Pero esta capacidad del CI-MPR se termina de adquirir a partir de los 40 días, existiendo un período de escasa actividad de este receptor. A partir de allí, probablemente la función de ambos receptores se superpone y son indistintos en el transporte.

Paralelamente al aumento en la expresión de las hidrolasas lisosomales, se incrementa no sólo la expresión, sino el número de sitios activos y la afinidad del CD-MPR de hígado. Este receptor, a diferencia del CI-MPR, no posee otra función específica conocida que la de unir y transportar las enzimas lisosomales. Debido a ello se encuentra listo para responder a la biogénesis incipiente del lisosoma, reemplazando al CI-MPR. Incluso uniendo hidrolasas que luego en edades mayores van a ser acopladas mayoritariamente por el CI-MPR.

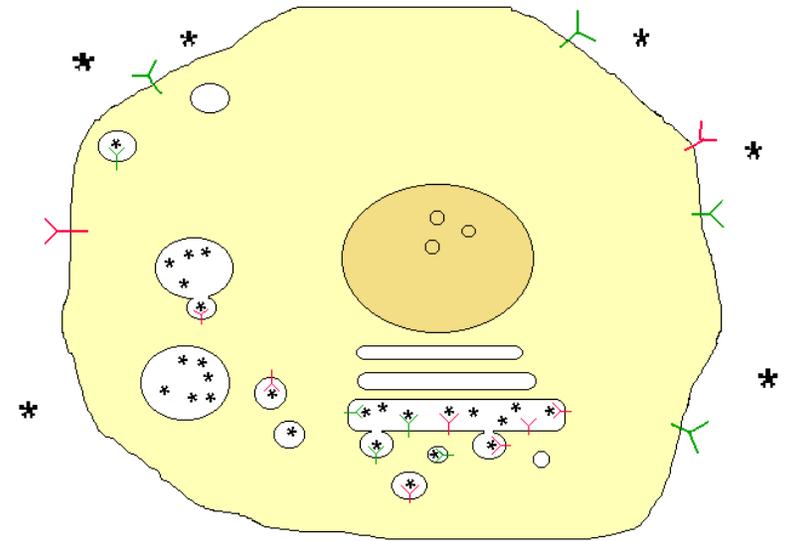
En concordancia con otros autores que demostraron que se necesitan ambos receptores para unir y transportar eficientemente todas las hidrolasas al lisosoma, en nuestro estudio demostramos que los MPRs de hígado tienen la capacidad para reconocer y unir las mismas hidrolasas lisosomales en la edad adulta.

Los MPRs durante la organogénesis hepática

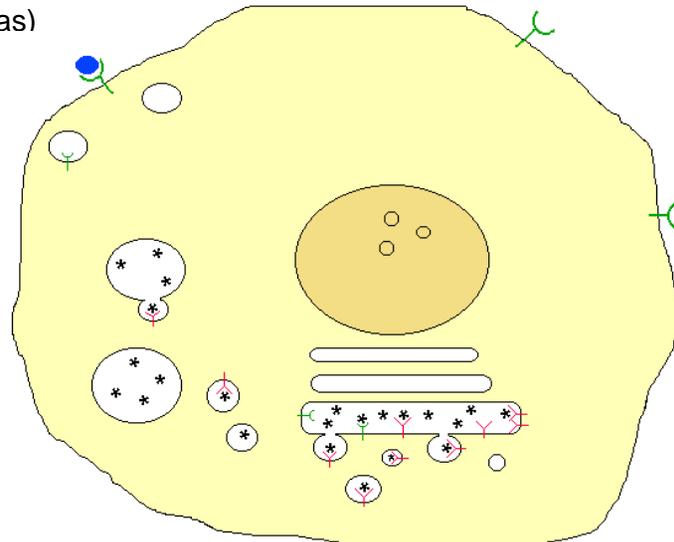


Etapa Temprana (desde fetos hasta 5 días)

Etapa media (10 y 20 días)



Etapa Tardía (desde los 40 días)



 IGF-II

 CI-MPR

 CD-MPR

 Enzimas Fosfomanosiladas

El CI-MPR de cerebro:

En cerebro, la expresión de CI-MPR disminuye durante el desarrollo, de manera similar a hígado. El número de sitios activos en cerebro cae a un valor mínimo a los 10 días y luego comienza a incrementarse, mientras que la afinidad se eleva hacia la edad adulta. Estos parámetros se modifican de la misma manera que en hígado, se puede concluir que **el comportamiento del CI-MPR en cerebro esta dirigido por los mismos mecanismos que gobiernan el comportamiento del CI-MPR en hígado.**

Las enzimas lisosomales y el CD-MPR de cerebro:

El estudio de las enzimas lisosomales en cerebro de rata presenta diferencias de las observadas en hígado. El pico de máxima actividad enzimática total y asociada a membranas es a los 20 días, para tres de las glucosidasas estudiadas (NAG, GLU y GAL). MAN en cambio, presenta dos picos principales de actividad asociada (fracción EU), en la edad fetal y a los 20 días. Esta actividad asociada, además, es cercana al 40 % de la actividad total mientras que de las otras enzimas sólo se asocia un 10 % de la cantidad total.

En otros experimentos se observó que existía un ligando fosfomanosilado con un peso molecular aparente semejante a una de las subunidades de MAN y con una curva de detección similar a la curva de actividad asociada a membranas de MAN. Estas evidencias permiten suponer que MAN se une a los MPRs desde estadios tempranos del desarrollo cerebral, con mayor afinidad que las otras enzimas estudiadas.

En concordancia con esto se observa que existe una elevada expresión del CD-MPR desde la edad fetal, produciendo un pico a los 20 días. Además, y a diferencia de hígado, este receptor presenta un elevado número de sitios activos en las tres primeras edades estudiadas, y luego descende.

Si bien todavía falta dilucidar otras características del comportamiento del CD-MPR cerebral, podemos decir que **algunas enzimas cerebrales se encuentran asociadas fuertemente a membranas desde etapas tempranas del desarrollo y en respuesta a ello el comportamiento de los receptores, sobre todo el CD-MPR varía de lo observado previamente en hígado.**

CAPITULO IV

METODOLOGIA

1- REACTIVOS

Se utilizaron los siguientes reactivos provistos por Sigma Chemical Co.: sustratos 4-metilumbeliferona acoplados a carbohidratos, Tritón X-100, poliacrilamida, dodecilsulfato de sodio (SDS), avidina conjugada con peroxidasa, ditioneitol (DTT) y Manosa-6-fosfato.

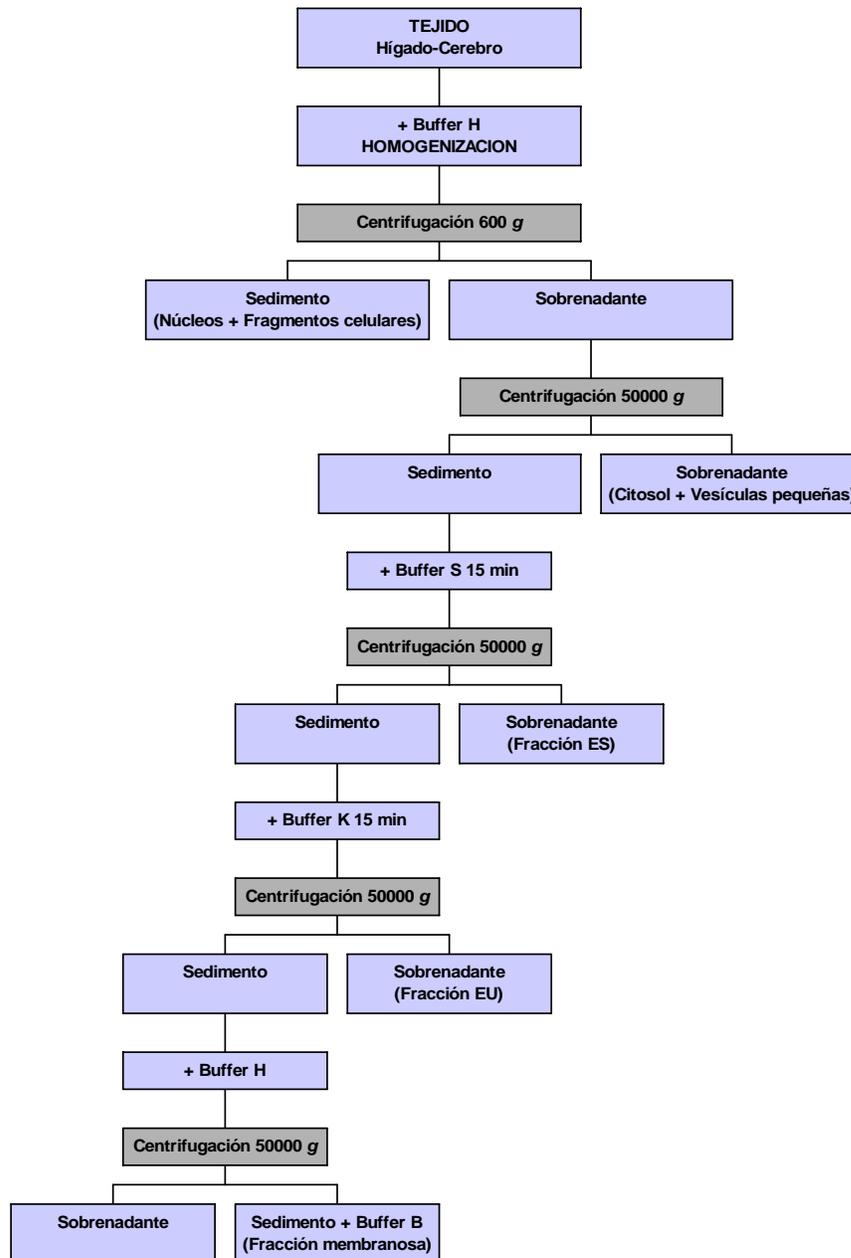
Los anticuerpos policlonales contra CI-MPR fueron desarrollados en conejo y provistos por el Dr. S. Kornfeld (Washington University, USA), los anticuerpos policlonales contra CD-MPR humano fueron desarrollados en conejo y provistos por la Dra. A. Hille-Rehfeld (Zentrum Für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Göttingen, Germany).

Los anticuerpos policlonales contra NAG fueron desarrollados en conejo y provistos por la Dra. P. Miranda (Inst. de Biología y Medicina Experimental, CONICET) y los anticuerpos contra MAN fueron desarrollados en conejo y provistos por el Dr. T. Berg. (University Hospital of Tromsø, Norway) La biotina, las membranas de nitrocelulosa (0,2 µm de tamaño de poro) y el reactivo de biotilación (sulfo-NHS-biotina) fueron provistas por Pierce, IL (USA) y el Luminol por Amersham (Alemania).

2- PREPARACION DE MEMBRANAS DE TEJIDOS DE RATA DE DISTINTAS EDADES PERINATALES:

Ratas Sprague-Dawley de las siguientes edades perinatales: fetos a los 18 días de gestación (-2 días), animales recién nacidos (0 días), de 5, 10, 20, 40 y 90 días posnatales (animal adulto) fueron sacrificadas siguiendo las reglas del Instituto Nacional de Salud (NIH) de USA (Guía de Cuidado y Manejo de Animales de Laboratorio). Los órganos (hígado y cerebro) de cada rata fueron extraídos y homogenizados (en proporción 1:5 p/v) en buffer Tris/Acetato 10 mM (pH= 7,2) conteniendo Sacarosa 0,25 M, EDTA 0,1% y PMSF 1m M (buffer H) con un homogenizador con pistón de teflón. El material homogenizado fue centrifugado a 600g durante 5 min, y el sobrenadante postnuclear fue centrifugado a 50000g durante 20 min. El nuevo sedimento fue resuspendido (1:5 p/v) en buffer Tris/ HCl 0.05 M (pH= 7,2) conteniendo saponina 0,5 %, EDTA 50 mM y PMSF 1 mM (buffer S) y sonicados durante 5 s. Luego de incubar en hielo durante 15 min. la suspensión fue centrifugada a 50000g por 20 min. y lavada una vez en buffer S. El sedimento fue resuspendido (1:5 p/v) en el mismo buffer S conteniendo KCl 0,6 M (buffer K), procesados como antes y nuevamente centrifugados a 50000g durante 20 min.

Luego de un lavado con buffer K, los sedimentos membranosos finales fueron resuspendidos en un volumen de buffer NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 10mM (pH= 6,8) conteniendo PMSF 1mM, inhibidor de tripsina 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, leupeptina 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y NaN_3 0,02% (buffer B). Todas las centrifugaciones fueron realizadas en frío, en centrifugas refrigeradas. Las membranas fueron almacenadas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta 2 meses. En el siguiente esquema se representa el fraccionamiento realizado.



3- INMUNODETECCION DE LOS MPRs EN MEMBRANAS DE HIGADO Y CEREBRO (“WESTERN BLOT”):

Las proteínas de la fracción membranosa de hígado (25 µg) y cerebro (50 µg) de cada grupo, fueron solubilizadas y preparadas para SDS-PAGE según el método de Laemmli (20P). La electroforesis se llevó a cabo a 25 mA en un minigel al 6 % ó al 8 % de poliacrilamida para la detección del CI-MPR o CD-MPR respectivamente.

Las proteínas analizadas fueron electrotransferidas desde los geles a membranas de nitrocelulosa, como fue descrito por Burnette (292). Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas a 37 °C durante 30 min. en buffer fosfato salino conteniendo Tween 20 0,05% (PBS-T). Los pasos siguientes fueron realizados a temperatura ambiente. Luego del bloqueo, las membranas fueron lavadas tres veces con PBS-T e incubadas por 2h con anti-MPR300 (1:4000) o con anti-MPR46 (1:250) desarrollados en conejo, ambos diluídos en PBS-T. Posteriormente las membranas fueron lavadas de la siguiente manera: una vez durante 5 min. con PBS-T, dos veces durante 10 min. con solución A (NaCl 0,5 M, Tritón X-100 0,5% y SDS 0,05%) y una vez más de 5 min. con PBS-T. Luego fueron incubadas con suero anti-IgG de conejo producido en cabra y conjugado con biotina (1:10.000) en PBS-T durante 2 h. Luego de un lavado con PBS-T y Solución A igual al anterior, las membranas fueron incubadas con estravidina conjugada con peroxidasa (1: 3.000) en PBS-T durante 1 h y lavadas de la misma manera que antes.

La detección fue potenciada por un método quimioluminiscente (ECL) llevado a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante, usando placas radiográficas Kodak X-Omat.

La cuantificación se llevó a cabo por densitometría desde las placas usando el programa Scion Image.

4- INMUNOHISTOQUIMICA EN SECCIONES DE TEJIDO HEPATICO:

Los hígados de rata de cada grupo fueron fijados en solución Bouin (50% de solución saturada de ácido pícrico, 10 % formaldehído y 5% de ácido acético en agua destilada), deshidratados en diferentes graduaciones de alcohol etílico y xilol e incluídos en parafina. Las secciones (5 µm) fueron montadas en portaobjetos con 2% Silane (Sigma) desparafinadas y lavados con buffer Tris/HCl 50 mM (pH= 7,6) conteniendo 0,9% NaCl (solución de lavado).

La peroxidasa endógena fue bloqueada por incubación con 0,3% H₂O₂ en metanol durante 15 min. El procedimiento fue realizado usando un sistema de detección biotina-avidina/peroxidasa. Luego de incubar con 10% de suero de cabra en solución de bloqueo (buffer Tris/HCl 50 mM (pH= 7,6) conteniendo 0,1% de Tritón X-100, 1% de suero de cabra y 1% de albúmina sérica bovina), las secciones fueron incubadas con anticuerpo policlonal de conejo contra CD-MPR (1:50) ó contra CI-MPR (1:500) en solución de bloqueo (anticuerpo primario) durante 48 h en cámara húmeda a 4°C. Luego del lavado, las secciones fueron incubadas con suero anti-IgG de conejo producido en cabra y conjugado con biotina (1:100) en solución de bloqueo durante 40 min. en cámara húmeda y a temperatura ambiente.

Las secciones fueron lavadas e incubadas durante 40 min. con extravidina-peroxidasa (Sigma, 1:100) en solución de bloqueo. Luego fueron teñidas en solución de diaminobencidina 1 mg/ml y 15 µl H₂O₂ (50% v/v) en buffer Tris/HCl 50 mM (pH= 7,6) durante 15 min. en la oscuridad y a temperatura ambiente. Luego de un lavado, las secciones fueron teñidas con 1% de azul de toluidina como colorante de contraste durante 30 s, deshidratados en alcohol etílico de diferentes graduaciones y xilol y finalmente montados para observación en microscopio óptico.

5- PURIFICACION DE β-GLUCURONIDASA:

Esta enzima fue purificada a partir de la glándula prepucial de rata hembra según el método de Tulsiani. (247)

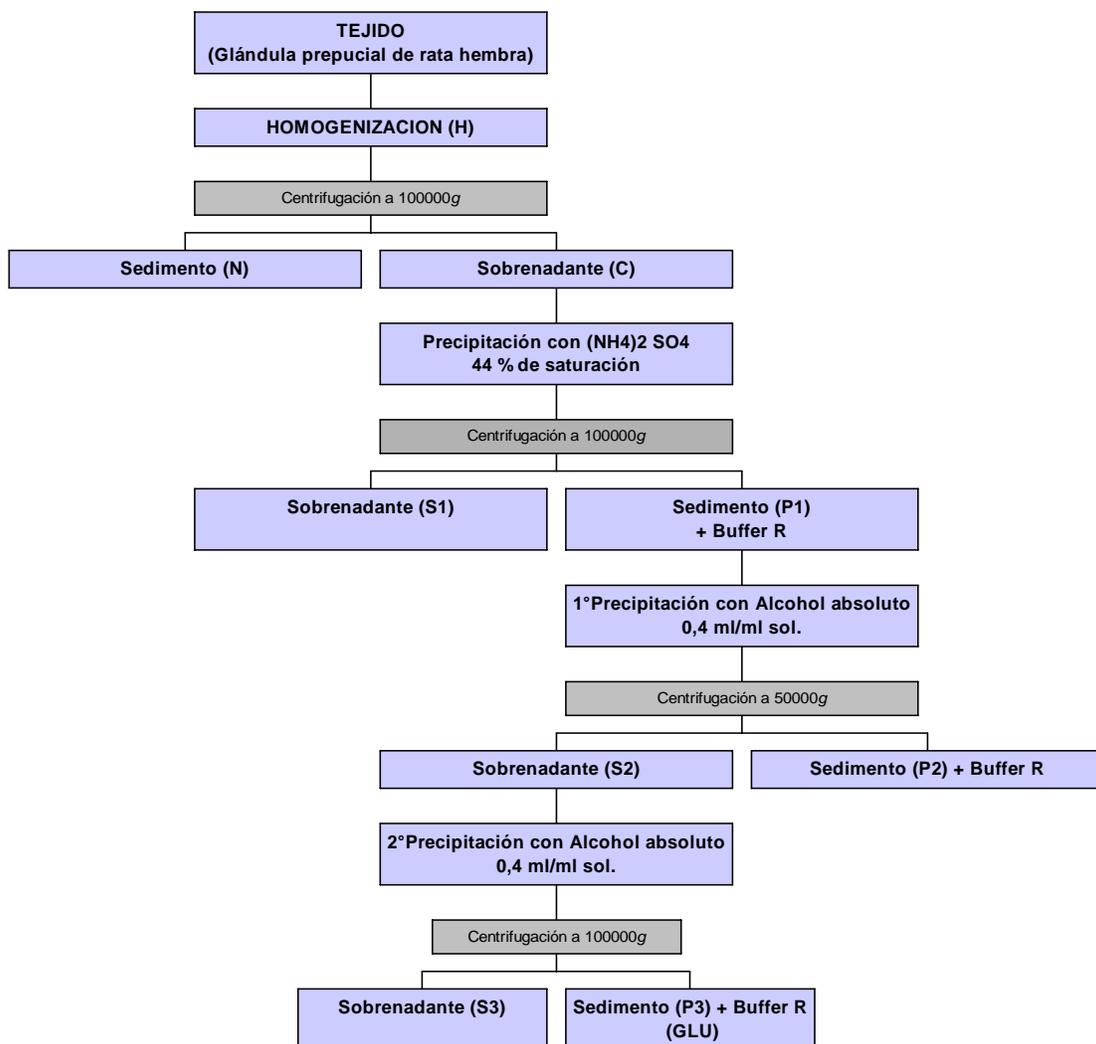
La glándula fue homogenizada en buffer Tris/Acetato 0,1 M (2ml c/150 mg de glándula) y centrifugada a 100000g durante 45 min. El sobrenadante fue tratado con (NH₄)₂SO₄ sólido hasta llegar al 44% de saturación que fue agregado lentamente, en frío y agitando permanentemente.

Luego de centrifugar a 100000g durante 20 min. el sobrenadante fue almacenado como fracción S₁ (proteínas que no precipitan con (NH₄)₂SO₄). El sedimento (P1), fue resuspendido en buffer Tris/Acetato 0,02 M (pH= 7,8) (2ml c/150 mg de glándula) (bufferR) y a esta suspensión se le agregaron 0,4 ml de etanol absoluto (enfriado a -20°C) por cada ml de solución. Esta operación se realizó lentamente, en frío y agitando permanentemente.

Luego de incubar durante 10 min. en hielo, se centrifugó a 50000g durante 20 min. y el sedimento se resuspendió en 0,2 ml de buffer R, formando la fracción P2 (proteínas precipitadas en el primer tratamiento con alcohol).

Al sobrenadante (S2) se le agregó 0,4 ml de etanol absoluto/ml de solución, se incubó durante 10 min. y se centrifugó a 100000g durante 20 min. El nuevo sobrenadante constituyó la fracción S3 (proteínas que no precipitan con alcohol) y el sedimento fue resuspendido en 0,2 ml de BR constituyendo la fracción P3 (fracción enriquecida en β -Glucuronidasa). Esta última fue fraccionada en alícuotas y congelada a -20°C .

El siguiente diagrama muestra un esquema de la purificación esta enzima:



6- ENSAYO DE ACOPLAMIENTO DE β -GLUCURONIDASA:

Proteínas de membrana (25 μ g) de hígado ó cerebro de diferentes edades, fueron incubadas con cantidades crecientes (50 a 1000 unidades) de la β -glucuronidasa purificada, en buffer NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 10mM (pH= 6,8) (buffer B) en presencia o ausencia de CaCl_2 0,5mM y de MnCl_2 0,5 mM y en presencia o ausencia manosa-6-fosfato (M6P) 25 mM en un volumen final de 0,25 ml.

Luego de 1h de incubación en hielo, se agregó 0,75 ml de buffer B a todos los tubos y se centrifugó a 13000g durante 30 min. El sobrenadante fue descartado y los pellets fueron lavados con 1 ml de buffer B.

Luego de una centrifugación igual a la anterior, los pellets finales fueron resuspendidos en 25 μ l de buffer B conteniendo Tritón X-100 0.1% y la actividad de β -Glucuronidasa fue medida espectrofluorométricamente usando como sustrato 4-metil-umbelliferil- β -D-glucurónido, según la técnica de Barret y Health (294). Una unidad de actividad enzimática corresponde a 1nmol de sustrato digerido por hora de incubación. La actividad molecular fue deducida desde la actividad específica de β -Glucuronidasa purificada por nosotros y del peso molecular aparente (M_r) de 68000 Da previamente estimado por Tulsiani (247). De acuerdo a nuestra estimación una unidad de actividad enzimática corresponde a 0,38 fmol de β -Glucuronidasa.

7- AFINIDAD DEL CI-MPR DE HIGADO DE RATAS DE 0 Y 90 DIAS A FOSFOMANANO:

El uso de la columna de fosfomanano fue similar al descrito por Sahagian (257) para la purificación de CI-MPR desde hígado bovino (257) con ciertas modificaciones.

Ratas Sprague-Dawley de animales recién nacidos (0 días) y de 90 días (animal adulto) fueron sacrificadas de acuerdo con la Guía de Cuidado y Manejo de Animales de Laboratorio, adoptada por el Instituto Nacional de Salud (NIH) de USA. Los hígados fueron extraídos (1g de cada uno), homogenizados en buffer Tris/Acetato 10 mM (pH= 7,2) conteniendo Sacarosa 0,25 M, EDTA 0,1% y PMSF 1m M (buffer H) (1:5 p/v) con un homogenizador con pistón de teflón y centrifugados a 600g durante 5 min.

El sobrenadante postnuclear se centrifugó a 50000g durante 20 min. El sedimento membranoso fue resuspendido en (1:5 p/v) buffer Tris/ HCl 0.05 M (pH= 7,2) conteniendo saponina 0,5 %, EDTA 50 mM, PMSF 1 mM y KCl 0,6 M (buffer SI), sonicados por 5 s e incubados en hielo durante 15 min. La suspensión fue centrifugada a

50000g durante 20 min., y el sedimento nuevamente tratado con buffer SI y centrifugado. El nuevo sedimento fue resuspendido en buffer E (imidazol/HCl 50mM (pH=7) conteniendo NaCl 0,15M, glicerofosfato 5mM, 1% de Tritón X-100, 0,1 % de desoxicolato de sodio y 0,005% PMSF) en proporción 1:10, e incubado durante 16 horas a 4°C con agitación.

Luego de centrifugar a 20000g durante 30 min., se agregó al sobrenadante EDTA 1 mM y se centrifugó nuevamente a 60000g durante 30 min. El nuevo sobrenadante de esta centrifugación (líquido de siembra, LS) fue dividido en dos y a una alícuota se le agregó DTT 10 mM. Cada alícuota fue analizada cromatográficamente en dos idénticas columnas de Fosfomanano acoplado a una matriz de agarosa, la cual fue previamente equilibrada con un buffer de corrida (buffer C) (imidazol/HCl 50 mM (pH=7) conteniendo NaCl 0,15 M, glicerofosfato 5 mM y 0,05% de Tritón X-100). Posteriormente las columnas fueron lavadas con el mismo buffer (10 veces el volumen de cama de las columnas) y finalmente fueron eluidas con 5 ml de M6P 5mM preparada en el mismo buffer de corrida. Fracciones de proteínas no unidas, o unidas (eludías con M6P) a las columnas fueron preparadas para ser analizadas por SDS-PAGE. Las muestras cromatografiadas en presencia de DTT fueron procesadas en buffer de Laemmli (293) a 50°C durante 10 min.

8- PREPARACION DE MEMBRANA PLASMATICA DESDE HIGADO DE RATAS DE 18 DIAS DE GESTACIÓN (FETOS) Y DESDE HIGADO ADULTO:

El método de aislamiento de membrana plasmática de hígado de rata fue similar al descrito por Hubbard (249).

Los hígados de rata fueron lavados con NaCl 0,15M y luego homogeneizados con 5 volúmenes de buffer STM 0,25 M (Tris/HCl 5 mM (pH= 7,2), sacarosa 0,25 M, MgCl₂ 1mM, $\delta= 1,03$ g/ml). El homogenato fue luego ajustado a un 20% p/v, centrifugado a 280g durante 5 min. El sobrenadante fue guardado y el sedimento resuspendido y homogenizado en la mitad del volumen inicial de STM 0,25M. Luego de centrifugar nuevamente a 280g, el primer y segundo sobrenadante fueron centrifugados a 1500g durante 10 min. El sedimento fue resuspendido en 1,5 ml de buffer STM 0,25 M/g de hígado y ajustado a una densidad final de $\delta=1,18$ g/ml con STM 2M (Tris/HCl 5 mM (pH= 7,2), sacarosa 2 M, MgCl₂ 1mM, $\delta= 1,25$ g/ml).

Luego se agregó buffer STM 1,42M (Tris/HCl 5 mM (pH= 7,2),

sacarosa 1,42 M, MgCl₂ 1mM, $\delta= 1,18$ g/ml) hasta alcanzar un volumen de dos veces el del homogenato original. Estos volúmenes se transfirieron a tubos de centrifuga de rotor de ángulo móvil y sobre ellos se agregó un 10% del volumen total de buffer STM 0,25. La muestra fue centrifugadas a 82000g en rotor de ángulo móvil (SW) durante 1 h. Según este protocolo la fracción rica en membrana plasmática corresponde a la interfase mientras que el sedimento denso corresponde a una parte de endomembranas. La interfase se resuspendió en buffer STM 0,25 M y se centrifugó a 1500g durante 10 min, obteniéndose en el sedimento la fracción rica en membrana plasmática.

9- COMPARTIMENTALIZACION DE ENZIMAS DE RATA DURANTE EL DESARROLLO:

Se utilizó un protocolo similar al de preparación de membranas descrito anteriormente, aplicando algunas modificaciones utilizadas en el método de Sleat et al (258).

Ratas Sprague-Dawley de diferentes edades perinatales: fetos de 18 días de gestación (-2 días), animales recién nacidos (0 días), de 5, 10, 20, 40 y 90 días (animal adulto) fueron sacrificadas de acuerdo con la Guía de Cuidado y Manejo de Animales de Laboratorio, adoptada por el Instituto Nacional de Salud (NIH) de USA.

En cada edad se obtuvieron muestras de 1g de tejido (hígado o cerebro) de diferentes animales. Estas fueron homogenizadas (1:10 p/v) en buffer Tris/Acetato 10 mM (pH= 7,2) conteniendo Sacarosa 0,25 M, EDTA 0,1% y PMSF 1m M (buffer h) en proporción con un homogenizador con pistón de teflón, y centrifugadas a 1500g durante 10 min. El pellet fue rehomogenizado en volúmenes iguales del mismo buffer h y nuevamente centrifugado a 1500g durante 10 min. Los sobrenadantes postnucleares fueron mezclados y centrifugados a 100000g durante 30 min.

Los pellets fueron resuspendidos en un buffer Tris/ HCl 0.05 M (pH= 7,2) conteniendo saponina 0,5 %, EDTA 50 mM y PMSF 1 mM (buffer S), sonicados 3 veces (10 s), cada una, incubados en hielo durante 15 min y centrifugados a 100000g por 30 min. El sobrenadante fue almacenado a -20 °C hasta su uso dentro de los 2 meses siguientes (**Fracción ES**).

Los pellets fueron resuspendidos en el mismo buffer S conteniendo KCl 0,6 M, procesados como antes y nuevamente centrifugados a 100000g por 30 min. El sobrenadante (conteniendo los ligandos endógenos, **Fracción EU**) y los pellets de membrana remanente fueron almacenados a -20 °C hasta 2 meses.

Todas las centrifugaciones fueron realizadas en frío, en centrífugas refrigeradas.

10-MEDICION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS:

Se midieron las actividades enzimáticas de β -Glucuronidasa, α -Manosidasa, N-acetil- β -D-Glucosaminidasa y β -Galactosidasa en alícuotas de las muestras obtenidas del fraccionamiento subcelular de hígado o cerebro.

Se utilizó el método espectrofluorométrico descrito previamente por Barret y Heath (294) usando los correspondientes sustratos acoplados con 4-metilumbelliferona en una concentración de 0,8 mM en buffer citrato 0,25 M (pH 4,5). Luego de una incubación de 20 minutos a 37 °C, se agregó 1 ml de buffer glicina 0,4 M (pH 10,4) para detener la reacción. La fluorescencia fue medida en un espectrofluorómetro Aminco-Bowman a una longitud de onda de 360 nm de excitación y 448 nm de emisión. Una unidad de actividad enzimática representa la cantidad de enzima que cataliza la liberación de un nmol de 4-metilumbelliferona/h. Las actividades de cada enzima fueron luego expresadas por mg de tejido.

11- INMUNODETECCION DE ENZIMAS EN FRACCION EU DE HIGADO O CEREBRO (“WESTERN BLOT”):

Alícuotas correspondientes a la fracción de proteínas asociadas a membranas (EU) de hígado o cerebro (50 μ g) de cada grupo, fueron solubilizadas y preparadas para SDS-PAGE según el método de Laemmli (293). La electroforesis se llevó a cabo a 25 mA en un minigel al 8 % de poliacrilamida para la detección de NAG o MAN.

Las proteínas analizadas fueron electrotransferidas desde los geles a membranas de nitrocelulosa, de acuerdo a Burnette (292). Las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas con anti- β -hexosaminidasa (1:500) o anti- α -manosidasa (1:500) desarrollados en conejo como anticuerpos primarios, siguiendo un protocolo similar al utilizado para MPRs. La detección fue realizada por el método quimioluminiscente (ECL) mencionado anteriormente. La cuantificación se llevó a cabo por densitometría (idem al ítem 3 de este capítulo).

12- PURIFICACION DE LOS MPRs:

Ambos receptores fueron purificados a partir de hígado bovino según los métodos descritos por Sahagian (257) y Hoflack (39). Inicialmente se preparó un polvo de acetona a partir de 200g de hígado bovino fresco.

El polvo de acetona (5g) fue suspendido y agitado con 150 ml de buffer A (acetato de sodio/ $\text{CH}_3\text{-COOH}$ 50 mM (pH= 4,6) conteniendo NaCl 0,3 M, CaCl_2 0,5 mM PMSF 0,005% y Azida sódica 0,02%). Luego de agitar durante 1h a 4 °C, se centrifugó a 20000g durante 20 min. El sobrenadante fue descartado y el sedimento fue lavado con 50 ml del mismo buffer A y luego con 50 ml de buffer L (imidazol/HCl 50 mM (pH=7) conteniendo NaCl 0,3 M, EDTA 1mM, PMSF 0,005% y Azida sódica 0,02%).

Las proteínas de membrana fueron solubilizadas desde este último sedimento por incubación con buffer E (imidazol/HCl 50mM (pH=7) conteniendo NaCl 0,15M, glicerofosfato 5mM, 1% de Tritón X-100, 0,1 % de desoxicolato de sodio y 0,005% PMSF) a 4°C durante 16 horas.

Luego de centrifugar a 20000g durante 30 min, se agregó MnCl_2 (10 mM de concentración final) al sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 60000g durante 30 min. El sobrenadante de esta última centrifugación (líquido de siembra, LS) fue sembrado en una columna de Fosfomanano acoplado a una matriz de agarosa, la cual fue equilibrada previamente con un buffer de corrida (buffer C) compuesto por imidazol/HCl 50 mM (pH=7) conteniendo NaCl 0,15 M, glicerofosfato 5 mM y 0,05% de Tritón X-100, y MnCl_2 10 mM.

Posteriormente la columna fue lavada con 100 ml del buffer de corrida con 10mM de MnCl_2 y finalmente se eluyó con 5mM de M6P en el mismo buffer con 10 mM de MnCl_2 . El líquido de siembra, el eluato directo (flow trough, FT), la fracción final del lavado y las fracciones eluidas con M6P fueron preparadas para ser analizadas por SDS-PAGE.

Un protocolo semejante, en presencia de EDTA 1mM y en ausencia de MnCl_2 10mM en el líquido de siembra (LS) se utilizó para purificar CI-MPR bovino, en ausencia de CD-MPR.

13- SEPARACION DEL CI-MPR Y CD-MPR:

La separación de ambos receptores se basa en la diferente capacidad de los MPRs para unir enzimas lisosomales de *Dictiostelium discoideum*. Estas enzimas presentan grupos manosa-6-sulfato y manosa-6-fosfato metiléster que acoplan al CI-MPR pero no al CD-MPR.

Las fracciones correspondientes a las tres primeras eluciones de la cromatografía en fosfomanano (3 ml) fueron llevadas a 3 mM de EDTA (para secuestrar los iones Mn^{+2}) y fueron sembradas en una columna conteniendo enzimas lisosomales de *Dictiostelium discoideum* acopladas a una matriz de agarosa. Esta columna fue equilibrada previamente con 50 ml de BC conteniendo además 2mM de EDTA (buffer BCE). Luego de recoger el eluato directo (FT), la columna fue lavada con 50 ml de buffer BCE. Finalmente se eluyó con 5mM de M6P en buffer BCE. Alícuotas de las fracciones más representativas fueron analizadas por SDS-PAGE.

14- BIOTINILACION DEL CI-MPR:

Una alícuota de la elución de la cromatografía de afinidad en fosfomanano, conteniendo el CI-MPR bovino purificado (25 μ g), fue biotinilada con el reactivo de biotinilación Sulfo-NHS-Biotina (PIERCE) en 5mg/ml en DMSO en una solución alcalina de $NaCO_3H$ 0,02 M. Luego de incubar a 25°C durante 1h en agitación, se eliminó el exceso de reactivo por filtración en una columna de Sephadex G25.

El control del acoplamiento fue llevado a cabo con avidina-peroxidasa (1:3000), sobre membranas de nitrocelulosa, luego de electrotransferir las proteínas desde un gel de SDS-PAGE. La detección fue por quimioluminiscencia de un modo similar al ítem 3.

La conjugación con biotina fue suficientemente eficiente como para ser utilizada en los ensayos de acoplamiento.

15-RECONOCIMIENTO DE LIGANDOS FOSFOMANOCILADOS DE LA FRACCION EU POR MEDIO DEL CI-MPR BIOTINILADO:

Se realizó una modificación del método de Valenzano (256) utilizado para reconocer glicoproteínas que contienen residuos M6P.

Aquellas proteínas (50 μ g) con alta afinidad por membranas de la fracción EU (hígado y cerebro de rata) de cada grupo, fueron analizadas por SDS-PAGE y electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa.

La membrana fue bloqueada con buffer NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 10mM (pH= 7,4) conteniendo NaCl 0,15M (PBS) y 0,2% de Tween 20, albúmina sérica bovina (fracción V) 10 mg/ml y glicerofosfato de sodio 5 mM (buffer B) durante 1 hora. Luego de 3 lavados con PBS (5 min. cada uno) conteniendo 0,2% de Tween 20 (solución A) se incubó durante 3h a temperatura ambiente con 3 nM del CI-MPR bovino biotinilado (en buffer B), en presencia ó ausencia de 10mM de M6P. Luego de realizar 3 lavados (10 min. cada uno) con solución A, las membranas fueron incubadas con avidina peroxidasa (1:3000) durante 1h a temperatura ambiente. Los ligandos reconocidos por el receptor fueron detectados por el método quimioluminiscente (ECL) como se explicó antes.

16- ENSAYOS DE ACOPLAMIENTO DE ENZIMAS ENDOGENAS (NAG) A MEMBRANAS DE TEJIDOS:

Proteínas de membrana de hígado (100 μg) de 10 y de 90 días fueron incubadas con 1500 U de NAG (N-acetil- β -D-glucosaminidasa) correspondientes a cada edad en las siguientes condiciones: Control (en buffer), adicionado de M6P (25 mM), CaCl_2 y MnCl_2 (0,5mM de cada uno) y anticuerpos anti-CIMPR (50 μg), anti-CD-MPR (50 μg) o suero preinmune (100 μg).

El ensayo fue realizado en un volumen final de 0,25ml en buffer NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 10mM (pH= 6,8) (buffer B).

Luego de 1h de incubación en hielo, se agregó 0,75 ml de BB a todos los tubos y se centrifugó a 13000g durante 15 min. El sobrenadante fue descartado y los pellets lavados con 1 ml de buffer B.

Luego de una centrifugación igual a la anterior, los pellets finales fueron resuspendidos en 50 μl de BB conteniendo 0.1% Tritón X-100 y analizados espectrofluorométricamente por medición de la actividad de NAG usando como sustrato 4-metilumbelliferil-N-acetil- β -D-glucosaminido según la técnica de Barret y Health (294). 1 unidad de actividad enzimática corresponde a 1nmol de sustrato digerido por hora de incubación.

Los resultados se expresaron como Unidades enzimáticas (U/ml) que se acoplan a las membranas en las diferentes condiciones estudiadas. La diferencia entre los controles y en presencia de M6P (alternativa A) y entre el control y el tratamiento con a-CI-MPR (alternativa B) en cada edad, permitieron calcular las unidades enzimáticas acopladas al CI-MPR. En cambio, las unidades enzimáticas que se acoplaron específicamente al CD-MPR se calcularon por la diferencia entre la condición control y

en presencia de iones bivalentes (alternativa A) por la diferencia entre este último con la presencia del a-CD-MPR (alternativa B).

17- OTROS PROCEDIMIENTOS:

La concentración proteica de todas las muestras estudiadas, fue medida según el método de Lowry (295).

Las muestras para electroforesis se prepararon de acuerdo al método de Laemmli (293).

PROYECCIONES DE ESTA TESIS

La lista creciente de ligandos (Tabla 1.1) que se unen al CI-MPR involucran a esta proteína multifuncional en una variedad de procesos celulares, incluyendo, además del transporte de enzimas lisosomales, apoptosis, entrada y trasmisión intercelular de virus y activación proteolítica de enzimas y factores de crecimiento. La incumbencia de este receptor como supresor de tumores es quizás, el área de mayor interés. La gran variedad de mutaciones encontradas en el receptor en diversos tipos de cánceres humanos refuerzan la idea de que este receptor es un potente inhibidor del crecimiento y que la pérdida de su función se asocia con la carcinogénesis.

Para aclarar el rol del CI-MPR en cáncer, es de fundamental importancia estudiar las propiedades de este receptor como inhibidor del crecimiento. En esta tesis hemos postulado que el receptor podría tener diferentes estructuras en determinados periodos del desarrollo de órganos de rata y que éstas posiblemente se relacionan con cambios en la función del receptor. Desde nuestro punto de vista el desarrollo de una línea de investigación que se focalice alrededor de esta hipótesis y de las propiedades adquiridas por este receptor en función de su conformación podría servir para aclarar su rol antimitógeno.

Si bien pareciera que el CD-MPR tiene un papel secundario en estos procesos, recientes hallazgos demuestran una elevada expresión de este receptor en la enfermedad de Alzheimer esporádica, otorgándole un rol en la patogénesis de esta enfermedad. Aparentemente este receptor modificaría el transporte de Catepsina D, una enzima encargada del procesamiento de la proteína precursora β -amiloide (APP). El resultado es una mayor secreción y acumulación de APP en el espacio intercelular, característica principal de esta patología.

En esta tesis hemos detectado diferencias importantes en la expresión y en el comportamiento del CD-MPR de cerebro durante el desarrollo, en comparación con el hígado. En contraste, no se observan grandes diferencias entre los CI-MPR cerebrales y hepáticos. Pensamos que el sistema de los CD-MPR y algunas enzimas lisosomales tienen un rol crucial en el tejido nervioso. Por ello nos parece importante continuar estos estudios y profundizarlos.

CAPITULO V

REFERENCIAS

- (1) **B. Alberts et al**, *Biología molecular de la célula* (tercera edición), Ediciones Omega, 1994.
- (2) **A. Aderem and D.M.Underhill**, Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17 (1999) 593-623.
- (3) **A. Hall and C.D.Nobes**, Rho GTPases: Molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B355 (2000) 965-970.
- (4) **V. A. Fadok and G. Chimini**, The phagocytosis of apoptotic cells, *Semin. Immunol.* 13 (2001) 365-372.
- (5) **I. Mellman and R. M. Steinman**, Dendritic cells: Specialized and regulated antigen processing machines, *Cell* 106 (2001) 255-258.
- (6) **L. Pelkmans and A. Helenius**, Endocytosis via caveolae, *Traffic* 3 (2002) 311-320.
- (7) **R. G. Parton et al**, Regulated internalization of caveolae, *J. Cell Biol.* 127 (1994) 1199-1215.
- (8) **R. D. Minshall et al**, Endothelial cell-surface gp60 activates vesicle formation and trafficking via Gi-coupled Src kinase signaling pathway, *J. Cell Biol.* 150 (2000) 1057-1070.
- (9) **P. Thomsen et al**, Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking, *Mol. Biol. Cell* 13 (2002) 238-250.
- (10) **S.Conner and S. Schmid**, Regulated portals of entry into the cell, *Nature* 422 (2003) 37-44.
- (11) **N. Dahms and M. Hancock**, P-type lectins, *Biochim. Biophys. Acta* 1572 (2002) 317-340.
- (12) **Lodish H., Berc A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.**, *Biología molecular de la Célula*, 4º Ed. (2002) Ed. Médica Panamericana.
- (13) **P. Ghosh et al**, Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale, *Nature Mol. Cell Biol.* 4 (2003) 202-212.
- (14) **S. Schmid**, Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: An integrated process, *Annu. Rev. Biochem.* 66 (1997) 511–548.
- (15) **F. Brodsky et al**, Biological basket weaving: Formation and function of clathrin-coated vesicles, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17 (2001) 517–568.
- (16) **T. Kirchhausen**, Clathrin, *Annu. Rev. Biochem.* 69 (2000) 699–727.

- (17) **T. Kirchhausen**,. Adaptors for clathrin-mediated traffic, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15 (1999) 705–732.
- (18) **M. Robinson and J. Bonifacino**, Adaptor-related proteins, *Curr. Opin. Cell Biol.* 13 (2001) 444–453.
- (19) **B. Collins et al**, Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex, *Cell* 109 (2002) 523–535.
- (20) **J. Hinshaw and S. Schmid**, Dynamin self assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding, *Nature* 374 (1995) 190–192.
- (21) **S. Sweitzer and J. Hinshaw**, Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation, *Cell* 93 (1998) 1021–1029.
- (22) **P. Wigge and H. McMahon**, The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse, *Trends Neurosci.* 21(1998) 339–344.
- (23) **A. Benmerah et al**, Inhibition of clathrin-coated pit assembly by an Eps15 mutant, *J. Cell Sci.* 112 (1999), 1303–1311.
- (24) **S. Hickman and E. Neufeld**, A hypothesis for I-Cell disease defective hydrolases that do not enter lysosomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49 (1972) 992.
- (25) **A. Hasilik y E. Neufeld**, Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Phosphorilation of mannose residues, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 4946.
- (26) **A. Waheed et al**, Processing of the phosphorylated recognition marker in lysosomal enzymes, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 4150.
- (27) **J. Goldstein et al**, Receptor mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1 (1985) 1.
- (28) **H. Chao et al**, Mannose-6-phosphate receptor dependent secretion of lysosomal enzymes, *EMBO Journal* 11 (1990) 3507-3513.
- (29) **E. Neufeld et al**, Inherited disorders of lysosomal metabolism, *Annu. Rev. Biochem.* 44 (1975) 357.
- (30) **A. Hasilik et al**, Enzymatic phosphorylation of lysosomal enzymes in the presence of UDP-N-acetylglucosamine, absence of the activity in the I-Cell fibroblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98 (1981) 761.
- (31) **A. Miller et al**, Properties of N-acetyl- β -D-hexosaminidase from isolated normal and I-Cell lysosomes, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 9352.
- (32) **S. Kornfeld**, Structure and function of the mannose-6-phosphate/ insulinlike growth factor II receptors, *Annu. Rev. Biochem* 61 (1992) 307-330.

- (33) **A. Hille-Rehefeld**, Mannose-6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes, *Biochim. Biophys. Acta* 1241 (1995) 177-194.
- (34) **R. Le Borgne and B. Hoflack**, *Biochim. Biophys. Acta* 1404 (1998) 195-209.
- (35) **K. Drickamer and M. Taylor**, *Biology of animal lectins*, *Annu. Rev. Cell Biol.* 9 (1993) 237-264.
- (36) **G. Ashwell y R. Anderson**, Carbohydrate specific receptors of the liver, *Ann. Rev. Biochem.* 51 (1982) 531.
- (37) **K. Von Figura et al.** Mannose-6-phosphate specific receptor is a transmembrane protein with a C-terminal extension oriented toward the cytosol, *Biochem. J.* 225 (1985) 543.
- (38) **B. Hoflack and S. Kornfeld**, 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 (1985a) 4428.
- (39) **B. Hoflack y S. Kornfeld**, Purification and characterization of a cation-dependent mannose 6-phosphate receptor from murine P388D1 macrophages and bovine liver, *J. Biol. Chem.* 260 (1985b) 12008– 12014.
- (40) **K. Von Figura y A. Hasilik**, Lysosomal enzymes and their receptors. *Ann. Rev. Biochem.* 4 (1986) 193.
- (41) **H. Geuze, Slot JW, Strous GJ, Hasilik A, Von Figura K.**, Ultrastructural localization of mannose-6-phosphate receptor in rat liver, *J. Cell Biol.* 98 (1984) 2047.
- (42) **G. Sahagian, Distler JJ, Jourdian GW.**, Characterization of a membrane-associated receptor from bovine liver that binds phosphomannosyl residues from bovine testicular β -galactosidase, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78 (1982) 4289.
- (43) **A. Steiner and L. Rome**, Assay and purification of a solubilized membrane receptor that binds the lysosome enzyme α -L-iduronidase, *Arch. Biochem. Biophys.* 244 (1982) 681.
- (44) **A. Hasilik and K. Von Figura**, Lysosomal enzymes and the Golgi apparatus. *En Cellular y mollecular events in spermatogenesis*. Hamilton and Waites Eds. Cambridge University Press. New York and Cambridge, (1987) pp. 59-76.
- (45) **N. Dahms, Lobel P, Breitmeyer J, Chirgwin JM, Kornfeld S.**, 46kd mannose 6-phosphate receptor: cloning, expression, and homology to the 215 kd mannose 6-phosphate receptor, *Cell* 50 (1987) 181-192.

- (46) **R. Pohlmann, Nagel G, Schmidt B, Stein M, Lorkowski G, Krentler C, Cully J, Meyer HE, Grzeschik KH, Mersmann G**, Cloning of a cDNA encoding the human cation-dependent mannose 6-phosphate-specific receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (1987) 5575-5579.
- (47) **Z. M. Ma, Grubb JH, Sly WS.**, Cloning, sequencing, and functional characterization of the murine 46-kDa mannose 6-phosphate receptor, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 10589-10595.
- (48) **A. Koster, Nagel G, von Figura K, Pohlmann R.**, Molecular cloning of the mouse 46-kDa mannose 6-phosphate receptor (MPR 46), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 372 (1991) 297-300.
- (49) **S. Kanamori, Waguri S, Shibata M, Isahara K, Ohsawa Y, Konishi A, Kametaka S, Watanabe T, Ebisu S, Kominami E, Uchiyama Y.**, Overexpression of cation-dependent mannose 6-phosphate receptor prevents cell death induced by serum deprivation in PC12 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251 (1998) 204-208.
- (50) **T. Ludwig, Ruther U, Metzger R, Copeland NG, Jenkins NA, Lobel P, Hoflack B.**, Gene and pseudogene of the mouse cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. Genomic organization, expression, and chromosomal localization, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 12211-12219
- (51) **H. Klier, von Figura K, Pohlmann R.**, Isolation and analysis of the human 46-kDa mannose 6-phosphate receptor gene, *Eur. J. Biochem.* 198 (1991) 23-28.
- (52) **J. Wenk, Hille A, von Figura K.**, Quantitation of Mr 46000 and Mr 300000 mannose 6-phosphate receptors in human cells and tissues, *Biochem. Int.* (1991) 723-731.
- (53) **U. Matzner, von Figura K, Pohlmann R.**, Expression of the two mannose 6-phosphate receptors is spatially and temporally different during mouse embryogenesis, *Development* 114 (1992) 965-972.
- (54) **U. Matzner, Hille-Rehfeld A, von Figura K, Pohlmann R.**, Expression of mannose 6-phosphate receptors in chicken, *Dev. Dyn.* 207 (1996) 11-24.
- (55) **M. Wendland, Waheed A, Schmidt B, Hille A, Nagel G, von Figura K, Pohlmann R.**, Glycosylation of the Mr 46,000 mannose 6-phosphate receptor. Effect on ligand binding, stability, and conformation, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 4598-4604.

- (56) **M. Li and G. Jourdian**, Isolation and characterization of the two glycosylation isoforms of low molecular weight mannose 6-phosphate receptor from bovine testis. Effect of carbohydrate components on ligand binding, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 17621– 17630.
- (57) **Y. Zhang and N. Dahms**, Site-directed removal of N-glycosylation sites in the bovine cation-dependent mannose 6-phosphate receptor: effects on ligand binding, intracellular targetting and association with binding immunoglobulin protein, *Biochem. J.* 295 (1993) 841– 848.
- (58) **A. Hille, A. Waheed, K. von Figura**, The ligand-binding conformation of Mr 46,000 mannose 6-phosphate-specific receptor. Acquisition of binding activity during in vitro synthesis, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 13460–13467.
- (59) **A. Hille, A. Waheed, K. von Figura**, Assembly of the ligand-binding conformation of Mr 46,000 mannose 6-phosphate-specific receptor takes place before reaching the Golgi complex, *J. Cell Biol.* 110 (1990) 963– 972.
- (60) **D. Roberts, Weix DJ, Dahms NM, Kim JJ.**, Molecular basis of lysosomal enzyme recognition: three-dimensional structure of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor, *Cell* 93 (1998) 639–648.
- (61) **L. Olson J. Zhang, YC Lee, N Dahms, JJ Kim**, Structural basis for recognition of phosphorylated high mannose oligosaccharides by the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor., *J. Biol.Chem.* 274 (1999) 29889– 29896.
- (62) **D. Roberts, D.J. Weix, N.M. Dahms, J.J. Kim**, Molecular basis of lysosomal enzyme recognition: three-dimensional structure of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor, *Cell* 93 (1998) 639–648.
- (63) **M. Li, J.J. Distler, G.W. Jourdian**, The aggregation and dissociationm properties of a low molecular weight mannose 6-phosphate receptor from bovine testis, *Arch. Biochem. Biophys.* 283 (1990) 150– 157.
- (64) **M. Wendland, K. von Figura, R. Pohlmann**, Mutational analysis of disulfide bridges in the Mr 46,000 mannose 6-phosphate receptor. Localization and role for ligand binding, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 7132–7136.
- (65) **A. Waheed, A. Hille, U. Junghans, K. von Figura**, Quaternary structure of the Mr 46,000 mannose 6-phosphate specific receptor: effect of ligand, pH, and receptor concentration on the equilibrium between dimeric and tetrameric receptor forms, *Biochemistry* 29 (1990) 2449–2455.

- (66) **A. Waheed, K. von Figura**, Rapid equilibrium between monomeric, dimeric and tetrameric forms of the 46-kDa mannose 6-phosphate receptor at 37 degrees C. Possible relation to the function of the receptor, *Eur. J. Biochem.* 193 (1990) 47– 54.
- (67) **M. Stein, T. Braulke, C. Krentler, A. Hasilik, K. von Figura**, 46-kDa mannose 6-phosphate-specific receptor: biosynthesis, processing, subcellular location and topology, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 368 (1987) 937– 947.
- (68) **M. Stein, H.E. Meyer, A. Hasilik, K. von Figura**, 46-kDa mannose 6-phosphate-specific receptor: purification, subunit composition, chemical modification, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 368 (1987) 927– 936.
- (69) **N.M. Dahms, S. Kornfeld**, The cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. Structural requirements for mannose 6-phosphate binding and oligomerization, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 11458– 11467.
- (70) **M. Wendland, A. Hille, G. Nagel, A. Waheed, K. von Figura, R. Pohlmann**, Synthesis of a truncated Mr 46,000 mannose 6-phosphate receptor that is secreted and retains ligand binding, *Biochem. J.* 260 (1989) 201– 206.
- (71) **Z. Ma, J.H. Grubb, W.S. Sly**, Divalent cation-dependent stimulation of ligand binding to the 46-kDa mannose 6-phosphate receptor correlates with divalent cation-dependent tetramerization, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 19017–19022.
- (72) **E.L. Punnonen, T. Wilke, K. von Figura, A. Hille-Rehfeld**, The oligomeric state of 46-kDa mannose 6-phosphate receptor does not change upon intracellular recycling and binding of ligands, *Eur. J. Biochem.* 237 (1996) 809– 818.
- (73) **L.J. Olson, J. Zhang, N.M. Dahms, J.-J.P. Kim**, Twists and turns of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor: ligand-bound versus ligand-free receptor, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 10156– 10161.
- (74) **C. Korner, A. Herzog, B. Weber, O. Rosorius, F. Hemer, B. Schmidt, T. Braulke**, In vitro phosphorylation of the 46-kDa mannose 6-phosphatereceptor by casein kinase: II. Structural requirements for efficient phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 16529– 16532.
- (75) **F. Hemer, C. Korner, T. Braulke**, Phosphorylation of the human 46-kDa mannose 6-phosphate receptor in the cytoplasmic domain at serine 56, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 17108– 17113.
- (76) **P. Breuer, C. Korner, C. Boker, A. Herzog, R. Pohlmann, T. Braulke**, Serine phosphorylation site of the 46-kDa mannose 6-phosphate receptor is required

- for transport to the plasma membrane in Madin–Darby canine kidney and mouse fibroblast cells, *Mol. Biol. Cell* 8 (1997) 567–576.
- (77) **F. Mauxion, R. Le Borgne, H. Munier-Lehmann, B. Hoflack**, A casein kinase II phosphorylation site in the cytoplasmic domain of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor determines the high affinity interaction of the AP-1 Golgi assembly proteins with membranes, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 2171–2178.
- (78) **A. Schweizer, S. Kornfeld, J. Rohrer**, Cysteine³⁴ of the cytoplasmic tail of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor is reversibly palmitoylated and required for normal trafficking and lysosomal enzyme sorting, *J. Cell Biol.* 132 (1996) 577–584.
- (79) **A. Schweizer, S. Kornfeld, J. Rohrer**, Proper sorting of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor in endosomes depends on a pair of aromatic amino acids in its cytoplasmic tail, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 14471–14476.
- (80) **P. Breuer, T. Braulke**, Stabilization of mutant 46-kDa mannose 6-phosphate receptors by proteosomal inhibitor lactacystin, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 33254–33258.
- (81) **P.G. Marron-Terada, K.E. Bollinger, N.M. Dahms**, Characterization of truncated and glycosylation-deficient forms of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor expressed in baculovirus-infected insect cells, *Biochemistry* 37 (1998) 17223–17229.
- (82) **N.M. Dahms, M.A. Brzycki-Wessell**, Expression and characterization of functional bovine cation-dependent mannose 6-phosphate receptors in baculovirus-infected insect cells, *Arch. Biochem. Bio-phys.* 317 (1995) 497–503.
- (83) **P.Y. Tong, S. Kornfeld**, Ligand interactions of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. Comparison with the cation-independent mannose 6-phosphate receptor, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 7970–7975.
- (84) **J.J. Distler, R. Patel, G.W. Jourdian**, Immobilization and assay of low-molecular-weight phosphomannosyl receptor in multiwell plates, *Anal. Biochem.* 166 (1987) 65–71.
- (85) **P. Lobel, N.M. Dahms, J. Breitmeyer, J.M. Chirgwin, S. Kornfeld**, Cloning of the bovine 215-kDa cation-independent mannose 6-phosphate receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84 (1987) 2233–2237.

- (86) **P. Lobel, N.M. Dahms, S. Kornfeld**, Cloning and sequence analysis of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 2563–2570.
- (87) **D.O. Morgan, J.C. Edman, D.N. Standring, V.A. Fried, M.C. Smith, R.A. Roth, W.J. Rutter**, Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein, *Nature* 329 (1987) 301–307.
- (88) **A. Oshima, C.M. Nolan, J.W. Kyle, J.H. Grubb, W.S. Sly**, The human cation-independent mannose 6-phosphate receptor. Cloning and sequence of the full-length cDNA and expression of functional receptor in COS cells, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 2553–2562.
- (89) **T. Ludwig, K. Tenscher, J. Remmler, B. Hoflack, P. Lobel**, Cloning and sequencing of cDNAs encoding the full-length mouse mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor, *Gene* 142 (1994) 311 – 312.
- (90) **G. Szebenyi, P. Rotwein**, The mouse insulin-like growth factor II/ cation-independent mannose 6-phosphate (IGF-II/MPR) receptor gene: molecular cloning and genomic organization, *Genomics* 19 (1994) 120– 129.
- (91) **R.G. MacDonald, S.R. Pfeffer, L. Coussens, M.A. Tepper, C.M. Brocklebank, J.E. Mole, J.K. Anderson, E. Chen, M.P. Czech, A. Ullrich**, A single receptor binds both insulin-like growth factor II and mannose-6-phosphate, *Science* 239 (1988) 1134–1137.
- (92) **M. Zhou, Z. Ma, W.S. Sly**, Cloning and expression of the cDNA of chicken cation-independent mannose-6-phosphate receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 9762–9766.
- (93) **P.Y. Tong, W. Gregory, S. Kornfeld**, Ligand interactions of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. The stoichiometry of mannose 6-phosphate binding, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 7962– 7969.
- (94) **B. Westlund, N.M. Dahms, S. Kornfeld**, The bovine mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. Localization of mannose 6-phosphate binding sites to domains 1– 3 and 7 – 11 of the extracytoplasmic region, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 23233–23239.
- (95) **N.M. Dahms, P.A. Rose, J.D. Molkentin, Y. Zhang, M.A. Brzycki**, The bovine mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. The role of arginine residues in mannose 6-phosphate binding, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 5457–5463.

- (96) **P.Y. Tong, S.E. Tollefsen, S. Kornfeld**, The cation-independent mannose 6-phosphate receptor binds insulin-like growth factor II, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 2585– 2588.
- (97) **J.K. Killian, R.L. Jirtle**, Genomic structure of the human M6P/IGF2 receptor, *Mamm. Genome* 10 (1999) 74– 77.
- (98) **T. Alexandrides, A.C. Moses, R.J. Smith**, Developmental expression of receptors for insulin, insulin-like growth factor I (IGF-I), and IGF-II in rat skeletal muscle, *Endocrinology* 124 (1989) 1064– 1076.
- (99) **P. Nissley, W. Kiess, M. Sklar**, Developmental expression of the IGF-II/mannose 6-phosphate receptor, *Mol. Reprod. Dev.* 35 (1993) 408– 413.
- (100) **D.E. Goldberg, C.A. Gabel, S. Kornfeld**, Studies of the biosynthesis of the mannose 6-phosphate receptor in receptor-positive and -deficient cell lines, *J. Cell Biol.* 97 (1983) 1700– 1706.
- (101) **G.G. Sahagian, E.F. Neufeld**, Biosynthesis and turnover of the mannose 6-phosphate receptor in cultured Chinese hamster ovary cells, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 7121– 7128.
- (102) **W. Kiess, L.A. Greenstein, L. Lee, C. Thomas, S.P. Nissley**, 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 (1991) 281– 291.
- (103) **C. Thibault, J.K. Chan, J.F. Perdue, W.H. Daughaday**, Insulin-like growth factor II receptors. Molecular radius and molecular weight determination using quantitative polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 3361– 3367.
- (104) **W. Kiess, L.A. Greenstein, R.M. White, L. Lee, M.M. Rechler, S.P. Nissley**, Type II insulin-like growth factor receptor is present in rat serum, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84 (1987) 7720– 7724.
- (105) **B. Schmidt, C. Kiecke-Siemsen, A. Waheed, T. Bräulke, K. Von Figura**, Localization of the insulin-like growth factor II binding site to amino acids 1508– 1566 in repeat 11 of the mannose 6-phosphate/ insulin-like growth factor II receptor, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 14975– 14982.
- (106) **J.F. Perdue, J.K. Chan, C. Thibault, P. Radaj, B. Mills, W.H. Daughaday**, The biochemical characterization of detergent-solubilized insulin-like growth factor II receptors from rat placenta, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 7800– 7811.

- (107) **S.J. York, L.S. Arneson, W.T. Gregory, N.M. Dahms, S. Kornfeld**, The rate of internalization of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is enhanced by multivalent ligand binding, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 1164– 1171.
- (108) **J.C. Byrd, J.H. Park, B.S. Schaffer, F. Garmroudi, R.G. MacDonald**, Dimerization of the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 18647– 18656.
- (109) **J.C. Byrd, R.G. MacDonald**, Mechanisms for high affinity mannose 6-phosphate ligand binding to the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor. Negative cooperativity and receptor oligomerization, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 18638– 18646.
- (110) **S. Corvera, P.J. Roach, A.A. DePaoli-Roach, M.P. Czech**, Insulin action inhibits insulin-like growth factor-II (IGF-II) receptor phosphorylation in H-35 hepatoma cells. IGF-II receptors isolated from insulin-treated cells exhibit enhanced in vitro phosphorylation by casein kinase II, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 3116–3122.
- (111) **S. Meresse, T. Ludwig, R. Frank, B. Hoflack**, Phosphorylation of the cytoplasmic domain of the bovine cation-independent mannose 6-phosphate receptor. Serines 2421 and 2492 are the targets of a casein kinase II associated to the Golgi-derived HAI adaptor complex, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 18833–18842.
- (112) **O. Rosorius, G. Mieskes, O.G. Issinger, C. Korner, B. Schmidt, K. von Figura, T. Braulke**, Characterization of phosphorylation sites in the cytoplasmic domain of the 300 kDa mannose-6-phosphate receptor, *Biochem. J.* 292 (1993) 833–838.
- (113) **S. Meresse, B. Hoflack**, Phosphorylation of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor is closely associated with its exit from the trans-Golgi network, *J. Cell Biol.* 120 (1993) 67– 75.
- (114) **R. Puertollano, R.C. Aguilar, I. Gorshkova, R.J. Crouch, J.S. Bonifacino**, Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs, *Science* 292 (2001) 1712– 1716.
- (115) **Y. Zhu, B. Doray, A. Poussu, V.P. Lehto, S. Kornfeld**, Binding of GGA2 to the lysosomal enzyme sorting motif of the mannose 6-phosphate receptor, *Science* 292 (2001) 1716– 1718.
- (116) **H. Takatsu, Y. Katoh, Y. Shiba, K. Nakayama**, Golgi-localizing, gamma-adaptin ear homology domain, ADP-ribosylation factor-binding (GGA) proteins interact with acidic dileucine sequences within the cytoplasmic domains of sorting

- receptors through their Vps27p/Hrs/STAM (VHS) domains, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 28541–28545.
- (117) **Q. Liu, J.H. Grubb, S.S. Huang, W.S. Sly, J.S. Huang**, The mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor is a substrate of type V transforming growth factor-beta receptor, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 20002– 20010.
- (118) **H.J. Chen, J. Yuan, P. Lobel**, Systematic mutational analysis of the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor cytoplasmic domain. An acidic cluster containing a key aspartate is important for function in lysosomal enzyme sorting, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 7003– 7012.
- (119) **J. Brown et al**, Structure of a functional IGF2R fragment determined from the anomalous scattering of sulfur, *EMBO J.* 21 (2002) 1054–1062.
- (120) **F. Garmroudi, G. Devi, D. H. Slentz, B. S. Schaffer and R. G. MacDonald**, Truncated forms of the insulin-like growth factor II (IGF-II)/mannose 6-phosphate receptor encompassing the IGF-II binding site: characterization of a point mutation that abolishes IGF-II binding, *Mol. Endocrinol.* 10 (1996) 642–651.
- (121) **W. Zeslawski, et al**. The interaction of insulin-like growth factor-I with the N-terminal domain of IGFBP-5, *EMBO J.* 20 (2001)3638–3644.
- (122) **C.A. Yandell, A.J. Dunbar, J.F. Wheldrake, Z. Upton**, The kangaroo cation-independent mannose 6-phosphate receptor binds insulin-like growth factor II with low affinity, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 27076– 27082.
- (123) **N.M. Dahms, M.A. Brzycki-Wessell, K.S. Ramanujam, B. Seetharam**, Characterization of mannose 6-phosphate receptors (MPRs) from opossum liver: opossum cation-independent MPR binds insulin-like growth factor-II, *Endocrinology* 133 (1993) 440– 446.
- (124) **W.M. Canfield, S. Kornfeld**, The chicken liver cation-independent mannose 6-phosphate receptor lacks the high affinity binding site for insulin-like growth factor II, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 7100– 7103.
- (125) **K.B. Clairmont, M.P. Czech**, Chicken and *Xenopus* mannose 6-phosphate receptors fail to bind insulin-like growth factor II, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 16390– 16392.
- (126) **Y.W. Yang, A.R. Robbins, S.P. Nissley, M.M. Rechler**, The chick embryo fibroblast cation-independent mannose 6-phosphate receptor is functional and immunologically related to the mammalian insulin-like growth factor-II (IGF-

- II)/man 6-P receptor but does not bind IGF-II, *Endocrinology* 128 (1991) 1177–1189.
- (127) **J.K. Killian, J.C. Byrd, J.V. Jirtle, B.L. Munday, M.K. Stoskopf, R.G. MacDonald, R.L. Jirtle**, M6P/IGF2R imprinting evolution in mammals, *Mol. Cell* 5 (2000) 707–716.
- (128) **G. R. Devi, J. C. Byrd, D. H. Slentz and R. G. MacDonald**, An insulin-like growth factor II (IGF-II) affinity-enhancing domain localized within extracytoplasmic repeat 13 of the IGF-II/mannose 6-phosphate receptor. *Mol. Endocrinol.* 12, (1998) 1661–1672.
- (129) **J. Linnell, G. Groeger and A. B. Hassan**, Real time kinetics of insulin-like growth factor II (IGF-II) interaction with the IGF-II/mannose 6-phosphate receptor: the effects of domain 13 and pH. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 23986–23991.
- (130) **M.K. Hancock, D. J. Haskins, G. Sun and N. M. Dahms**, Identification of residues essential for carbohydrate recognition by the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 11255–11264.
- (131) **P.G. Marron-Terada, M.K. Hancock, D.J. Haskins, N.M. Dahms**, Recognition of *Dictyostelium discoideum* lysosomal enzymes is conferred by the amino-terminal carbohydrate binding site of the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor, *Biochemistry* 39 (2000) 2243–2253.
- (132) **H. Watanabe, J.H. Grubb, W.S. Sly**, The overexpressed human 46-kDa mannose 6-phosphate receptor mediates endocytosis and sorting of beta-glucuronidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 8036–8040.
- (133) **B. Hoflack, K. Fujimoto, S. Kornfeld**, The interaction of phosphorylated oligosaccharides and lysosomal enzymes with bovine liver cation-dependent mannose 6-phosphate receptor, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 123–129.
- (134) **J.J. Distler, J.F. Guo, G.W. Jourdian, O.P. Srivastava, O. Hindsgaul**, The binding specificity of high and low molecular weight phosphomannosyl receptors from bovine testes. Inhibition studies with chemically synthesized 6-O-phosphorylated oligomannosides, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 21687–21692.
- (135) **C.A. Gabel, C.E. Costello, V.N. Reinhold, L. Kurz, S. Kornfeld**, Identification of methylphosphomannosyl residues as components of the high mannose oligosaccharides of *Dictyostelium discoideum* glycoproteins, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 13762–13769.

- (136) **H.H. Freeze, D. Wolgast**, Structural analysis of N-linked oligosaccharides from glycoproteins secreted by *Dictyostelium discoideum*. Identification of mannose 6 sulfate, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 127–134.
- (137) **J. Klumperman et al**, Differences in the endosomal distributions of the two mannose 6-phosphate receptors. *J. Cell Biol.* 121 (1993) 997–1010.
- (138) **C. H. Campbell and L. H. Rome**, Coated vesicles from rat liver and calf brain contain lysosomal enzymes bound to mannose 6-phosphate receptors. *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 13347–13352.
- (139) **E. Schulze-Lohoff, A. Hasilik and K. von Figura**, Cathepsin D precursors in clathrin-coated organelles from human fibroblasts, *J. Cell Biol.* 101 (1985) 824–829.
- (140) **A. Poussu, O. Lohi and V. P. Lehto**, Vear, a novel Golgi-associated protein with VHS and γ -adaptin ‘ear’ domains, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 7176–7183.
- (141) **J. Hirst et al**, A family of proteins with γ -adaptin and VHS domains that facilitate trafficking between the trans-Golgi network and the vacuole/lysosome, *J. Cell Biol.* 149 (2000) 67–80.
- (142) **E. C. Dell’Angelica et al**, GGAs: A family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex, *J. Cell Biol.* 149 (2000) 81–94.
- (143) **A. L. Boman, C. Zhang, X. Zhu and R. A. Kahn**, A family of ADP-ribosylation factor effectors that can alter membrane transport through the trans-Golgi. *Mol. Biol. Cell* 11 (2000) 1241–1255.
- (144) **H. Takatsu, K. Yoshino and K. Nakayama**, Adaptor γ -ear homology domain conserved in γ -adaptin and GGA proteins that interact with γ -synergim, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271 (2000) 719–725.
- (145) **F. Mauxion, R. Le Borgne, H. Munier-Lehmann and B. Hoflack**, A casein kinase II phosphorylation site in the cytoplasmic domain of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor determines the high affinity interaction of the AP-1 Golgi assembly proteins with membranes, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 2171–2178.
- (146) **S. Honing, M. Sosa, A. Hille-Rehfeld and K. von Figura**, The 46-kDa mannose 6-phosphate receptor contains multiple binding sites for clathrin adaptors, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 19884–19890.

- (147) **R. Puertollano, R. C. Aguilar, I. Gorshkova, R. J. Crouch and J. S. Bonifacio**, Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs, *Science* 292 (2001) 1712–1716.
- (148) **H. Takatsu, Y. Katoh, Y. Shiba and K. Nakayama**, Golgi-localizing, γ -adaptin ear homology domain, ADP-ribosylation factor-binding (GGA) proteins interact with acidic dileucine sequences within the cytoplasmic domains of sorting receptors through their Vps27p/Hrs/STAM (VHS) domains, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 28541–28545.
- (149) **Y. Zhu, B. Doray, A. Poussu, V. P. Lehto and S. Kornfeld**, Binding of GGA2 to the lysosomal enzyme sorting motif of the mannose 6-phosphate receptor, *Science* 292 (2001) 1716–1718.
- (150) **R. Puertollano, P. A. Randazzo, J. F. Presley, L. M. Hartnell and J. S. Bonifacio**, The GGAs promote ARF-dependent recruitment of clathrin to the TGN, *Cell* 105 (2001) 93–102.
- (151) **A. S. Dittie, L. Thomas, G. Thomas and S. A. Tooze**, Interaction of furin in immature secretory granules from neuroendocrine cells with the AP-1 adaptor complex is modulated by casein kinase II phosphorylation, *EMBO J.* 16 (1997) 4859–4870.
- (152) **R. Le Borgne, A. Schmidt, F. Mauxion, G. Griffiths and B. Hoflack**, Binding of AP-1 Golgi adaptors to membranes requires phosphorylated cytoplasmic domains of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *J. Biol. Chem.* 268, (1993) 22552–22556.
- (153) **M.W. Black and H. R. Pelham**, A selective transport route from Golgi to late endosomes that requires the yeast GGA proteins, *J. Cell Biol.* 151 (2000) 587–600.
- (154) **G. Costaguta, C. J. Stefan, E. S. Bensen, S. D. Emr and G. S. Payne**, Yeast GGA coat proteins function with clathrin in Golgi to endosome transport. *Mol. Biol. Cell* 12 (2001) 1885–1896.
- (155) **J. Hirst, M.R. Lindsay and M.S. Robinson**, GGAs: Roles of the different domains and comparison with AP-1 and clathrin. *Mol. Biol. Cell* 12 (2001) 3573–3588.
- (156) **B. Doray, P. Ghosh, J. Griffith, H. Geuze and S. Kornfeld**, Cooperation of GGAs and AP-1 in packaging MPRs at the *trans*-Golgi network, *Science*, 297 (2002) 1700–1703.

- (157) **B. Doray, K. Bruns, P. Ghosh and S. A. Kornfeld**, Autoinhibition of the ligand-binding site of GGA1/3 VHS domains by an internal acidic cluster-dileucine motif. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99 (2002) 8072–8077.
- (158) **S. Waguri et al**, Visualization of TGN to endosomes trafficking through fluorescently labeled MPR and AP-1 in living cells, *Mol. Biol. Cell* 14 (2003) 142–155.
- (159) **A. Umeda, A. Meyerholz and E. Ungewickell**, Identification of the universal cofactor (auxilin 2) in clathrin coat dissociation. *Eur. J. Cell Biol.* 79 (2000) 336–342.
- (160) **T. Greener, X. Zhao, H. Nojima, E. Eisenberg and L. E. Greene**, Role of cyclin G-associated kinase in uncoating clathrin-coated vesicles from non-neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 1365–1370.
- (161) **T. Nakagawa, M. Setou, D. Seog, K. Ogasawara, N. Dohmae, K. Takio, N. Hirokawa**, A novel motor, KIF13A, transports mannose 6-phosphate receptor to plasma membrane through direct interaction with AP-1 complex, *Cell* 103 (2000) 569–581.
- (162) **T. Ludwig, G. Griffiths and B. Hoflack**, Distribution of newly synthesized lysosomal enzymes in the endocytic pathway of normal rat kidney cells, *J. Cell Biol.* 115 (1991) 1561–1572.
- (163) **B. Press, Y. Feng, B. Hoflack and A. Wandingerneß**, Mutant rab7 causes the accumulation of cathepsin D and cation-independent mannose 6-phosphate receptor in an early endocytic compartment, *J. Cell Biol.* 140 (1998) 1075–1089.
- (164) **Y. Shiba, H. Takatsu, H. W. Shin and K. Nakayama**, γ -adaptin interacts directly with rabaptin-5 through its ear domain, *J. Biochem.* 131 (2002) 327–336.
- (165) **H. Stenmark, G. Vitale, O. Ullrich and M. Zerial**, Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion, *Cell* 83 (1995) 423–432.
- (166) **J. B. Bock, J. Klumperman, S. Davanger and R. H. Scheller**, Syntaxin 6 functions in *trans*-Golgi network vesicle trafficking, *Mol. Biol. Cell* 8 (1997) 1261–1271.
- (167) **R. Prekeris, J. Klumperman, Y. A. Chen and R. H. Scheller**, Syntaxin 13 mediates cycling of plasma membrane proteins via tubulovesicular recycling endosomes, *J. Cell Biol.* 143 (1998) 957–971.

- (168) **M. Steegmaier, J. Klumperman, D. L. Foletti, J. S. Yoo and R. H. Scheller**, Vesicle-associated membrane protein 4 is implicated in *trans*-Golgi network vesicle trafficking, *Mol. Biol. Cell* 10 (1999) 1957–1972.
- (169) **J. Klumperman, R. Kuliawat, J.M. Griffith, H. J. Geuze and P. Arvan**, Mannose 6-phosphate receptors are sorted from immature secretory granules via adaptor protein AP-1, clathrin, and syntaxin 6-positive vesicles, *J. Cell Biol.* 141 (1998) 359–371.
- (170) **A. Simonsen, J. M. Gaullier, A. D’Arrigo and H. Stenmark**, The Rab5 effector EEA1 interacts directly with syntaxin-6, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 28857–28860.
- (171) **B. Storrie and M. Desjardins**, The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process? *Bioessays* 18 (1996) 895–903.
- (172) **E. Diaz and S. R. Pfeffer**, TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking. *Cell* 93 (1998) 433–443.
- (173) **J. G. Orsel, P. M. Sincock, J. P. Krise and S. R. Pfeffer**, Recognition of the 300-kDa mannose 6-phosphate receptor cytoplasmic domain by 47-kDa tail-interacting protein, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97 (2000) 9047–9051.
- (174) **K. S. Carroll, Hanna J, Simon I, Krise J, Barbero P, Pfeffer SR.**, Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47, *Science* 292 (2001) 1373–1376.
- (175) **M.A. Riederer, T. Soldati, A. D. Shapiro, J. Lin and Pfeffer, S. R.** Lysosome biogenesis requires Rab9 function and receptor recycling from endosomes to the *trans*-Golgi network. *J. Cell Biol.* 125 (1994) 573–582.
- (176) **C. Meyer, Zizioli D, Lausmann S, Eskelinen EL, Hamann J, Saftig P, von Figura K, Schu P.**, μ 1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors, *EMBO J.* 19 (2000) 2193–2203.
- (177) **C. Meyer, E. L. Eskelinen, M.R. Guruprasad, K. von Figura and P. Schu**, μ 1A deficiency induces a profound increase in MPR300/IGF-II receptor internalization rate, *J. Cell Sci.* 114 (2001) 4469–4476.
- (178) **L. Wan, Molloy SS, Thomas L, Liu G, Xiang Y, Rybak SL, Thomas G.**, PACS-1 defines a novel gene family of cytosolic sorting proteins required for *trans*-Golgi network localization, *Cell* 94 (1998) 205–216.

- (179) **C. M. Crump, Xiang Y, Thomas L, Gu F, Austin C, Tooze SA, Thomas G.,** PACS-1 binding to adaptors is required for acidic cluster motif-mediated protein traffic, *EMBO J.* 20 (2001) 2191–2201.
- (180) **H.H. Chao, A. Waheed, R. Pohlmann, A. Hille, K. von Figura,** Mannose 6-phosphate receptor dependent secretion of lysosomal enzymes, *EMBO J.* 9 (1990) 3507–3513.
- (181) **R. Tikkanen, et al.** The dileucine motif within the tail of the MPR46 is required for sorting of the receptor in endosomes, *Traffic* 1 (2000) 631–640.
- (182) **R. Le Borgne and B. Hoflack,** Mannose 6-phosphate receptors regulate the formation of clathrin-coated vesicles in the TGN, *J. Cell Biol.* 137 (1997) 335–345.
- (183) **G. R.Devi, A. T. DeSouza, J. C. Byrd, R. L. Jirtle and R. G. MacDonald,** Altered ligand binding by insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptors bearing missense mutations in human cancers. *Cancer Res.* 59 (1999) 4314–4319.
- (184) **B. M. Collins, A. J.McCoy, H. M. Kent, P. R. Evans and D. J. Owen,** Molecular architecture and functional model of the endocytic AP 2 complex, *Cell* 109 (2002) 523–535.
- (185) **D. Ricotta, S. D.Conner , S. L. Schmid, K. von Figura and S. Honing,** Phosphorylation of the AP2 μ -subunit by AAK1 mediates high affinity binding to membrane protein sorting signals. *J. Cell Biol.* 156, (2002) 791–795.
- (186) **M.Jadot, W. M., Canfield, W. Gregory and S. Kornfeld,** Characterization of the signal for rapid internalization of the bovine mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 11069–11077.
- (187) **S. Storch and T. Braulke,** Multiple C-terminal motifs of the 46-kDa mannose 6-phosphate receptor tail contribute to efficient binding of medium chains of AP-2 and AP-3, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 4298–4303.
- (188) **S. E. Crawford, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N.** Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- β 1 *in vivo*, *Cell* 93 (1998) 1159–1170.
- (189) **P. A. Dennis and D. B. Rifkin,** 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 (1991) 580–584.

- (190) **A. Chen, B. H. Davis, M. D. Sitrin, T. A. Brasitus and M. Bissonnette**, Transforming growth factor- β -1 signaling contributes to Caco cell growth inhibition induced by 1,25(OH) $_2$ D $_3$, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283 (2002) G864–G874.
- (191) **S. Godar, V. Horejsi, U.H. Weidle, B.R. Binder, C. Hansmann, H. Stockinger**, M6P/IGFII-receptor complexes urokinase receptor and plasminogen for activation of transforming growth factor- β 1, *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 1004–1013.
- (192) **J. X.Kang, J. Bell, R. L. Beard and R. A. Chandraratna**, Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor mediates the growth-inhibitory effects of retinoids, *Cell Growth Differ.* 10 (1999) 591–600.
- (193) **S. Zaina and S. Squire**, The soluble type 2 insulin-like growth factor (IGF-II) receptor reduces organ size by IGF-II-mediated and IGF-II-independent mechanisms, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 28610–28616.
- (194) **D. B. O’Gorman, J. Weiss, A. Hettiaratchi, S. M. Firth and C. D. Scott**, Insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor overexpression reduces growth of choriocarcinoma cells *in vitro* and *in vivo*, *Endocrinology* 143 (2002) 4287–4294.
- (195) **A. T. DeSouza, G. R. Hankins, M. K. Washington, T. C. Orton and R. L. Jirtle**, *M6P/IGF2R* gene is mutated in human hepatocellular carcinomas with loss of heterozygosity, *Nature Genet.* 11 (1995) 447–449.
- (196) **T. Yamada, A. T. DeSouza, S. Finkelstein and R. L. Jirtle**, Loss of the gene encoding mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is an early event in liver carcinogenesis, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94, (1997) 10351–10355.
- (197) **Y. Oka, Waterland RA, Killian JK, Nolan CM, Jang HS, Tohara K, Sakaguchi S, Yao T, Iwashita A, Yata Y, Takahara T, Sato S, Suzuki K, Masuda T, Jirtle RL.**, M6P/IGF2R tumor suppressor gene mutated in hepatocellular carcinomas in Japan, *Hepatology* 35 (2002) 1153–1163.
- (198) **G. R. Hankins, De Souza AT, Bentley RC, Patel MR, Marks JR, Iglehart JD, Jirtle RL.**, M6P/IGF2 receptor: a candidate breast tumor suppressor gene. *Oncogene* 12 (1996) 2003–2009.
- (199) **S. A. Chappell, T Walsh, R. A Walker, and J. A. Shaw**, Loss of heterozygosity at the mannose 6-phosphate insulin-like growth factor 2 receptor

- gene correlates with poor differentiation in early breast carcinomas, *Br. J. Cancer* 76 (1997) 1558–1561.
- (200) **F. M. Kong, M. S. Anscher, M. K. Washington, J. K. Killian and R. L. Jirtle**, M6P/IGF2R is mutated in squamous cell carcinoma of the lung, *Oncogene* 19 (2000) 1572–1578.
- (201) **J. M. Rey, C. Theillet, J. P. Brouillet and H. Rochefort**, Stable amino-acid sequence of the mannose-6-phosphate/insulin-like growth-factor-II receptor in ovarian carcinomas with loss of heterozygosity and in breast-cancer cell lines. *Int. J. Cancer* 85 (2000) 466–473.
- (202) **S. Leboulleux, V. Gaston, N. Boulle, Y. LeBouc and C. Gicquel**, Loss of heterozygosity at the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor receptor locus: a frequent but late event in adrenocortical tumorigenesis, *Eur. J. Endocrinol.* 144 (2001) 163–168.
- (203) **A. Gemma, Hosoya Y, Uematsu K, Seike M, Kurimoto F, Yoshimura A, Shibuya M, Kudoh S.**, Mutation analysis of the gene encoding the human mannose 6 phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R) in human cell lines resistant to growth inhibition by transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), *Lung Cancer* 30 (2000) 91–98.
- (204) **J. C. Byrd, G. R. Devi, A. T. DeSouza, R. L. Jirtle and R. G. MacDonald**, Disruption of ligand binding to the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor by cancer-associated missense mutations, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 24408–24416.
- (205) **G. R. Devi, A. T. DeSouza, J. C. Byrd, R. L. Jirtle and R. G. MacDonald**, Altered ligand binding by insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptors bearing missense mutations in human cancers, *Cancer Res.* 59 (1999) 4314–4319.
- (206) **S. J. Lee, D. Nathans**, Proliferin secreted by cultured cells binds to mannose 6-phosphate receptors, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 3521–3527.
- (207) **M.M. Sklar, W. Kiess, C. L. Thomas and S.P. Nissley**, Developmental expression of the tissue insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor in the rat. Measurement by quantitative immunoblotting, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 16733–16738.

- (208) **P. V. Senior, S. Byrne, W. J. Brammar, F. Beck**, Expression of the IGF-II/mannose-6-phosphate receptor mRNA and protein in the developing rat, *Development* 109 (1990) 67-73.
- (209) **M. Ballesteros, C. D. Scott, R. C. Baxter**, Developmental regulation of insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor mRNA in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172 (1990) 775-779.
- (210) **R. G. MacDonald, M.A. Tepper, K. B. Clairmont, S.B. Perregaux, M.P. Czech**, Serum form of the rat insulin-like growth factor II/ mannose 6-phosphate receptor is truncated in the carboxyl-terminal domain, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 3256– 3261.
- (211) **C. Causin, A. Waheed, T. Braulke, U. Junghans, P. Maly et al**, Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II-binding proteins in human serum and urine. Their relation to the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor *Biochem J.* 252 (1988) 795-799.
- (212) **K. B. Clairmont, M.P. Czech**, Extracellular release as the major degradative pathway of the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 12131-12134.
- (213) **B. Funk, U. Kessler, W. Eisenmenger, A. Hansmann, H.J. Kolb, W. Kiess**, Expression of the insulin-like growth factor-II/manose 6-phosphate receptor in multiple human tissues during fetal life and early infancy, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75 (1992) 424-431.
- (214) **Y. Xu, A. Papageorgiou and C. Polychronakos**, Developmental regulation of the soluble form of Insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor in human serum and amniotic fluid, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (1998) 437-442.
- (215) **A.C. Moses, S. P. Nissley, P. A. Short, M. M. Rechler, R. M. White, Knight AB, Higa OZ.**, Increased levels of multiplication-stimulating activity, an insulin-like growth factor, in fetal rat serum, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 3649-3653.
- (216) **S. O. Adams, S. P. Nissley, S. Hanwerger, M.M. Rechler**, Developmental patterns of insulin-like growth factor-I and -II synthesis and regulation in rat fibroblasts. *Nature* 302 (1983) 150-153.
- (217) **P.K. Lund, B. M. Moats-Staats, B. M. Hynes, J. G. Simmons, M. Jansen et al**, Somatomedin-C/insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II mRNAs in rat fetal and adult tissues. *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 14539-14544.

- (218) **A. L. Brown, D.E. Graham, S. P. Nissley, D. J. Hill, A. J. Strain et al**, Developmental regulation of insulin-like growth factor II mRNA in different rat tissues. *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 13144-13150.
- (219) **F. Beck, N. J. Samani, J. D. Penschow, B. Thorley, G. W. Tregear et al**, Histochemical localization of IGF-I and -II mRNA in the developing rat embryo *Development* 101 (1987) 175-184.
- (220) **J. A. Romanus, Y. Yang, S.O. Adams, A. N. Sofair, L. Tseng, Nissley SP, Rechler MM.**, Synthesis of insulin-like growth factor II (IGF-II) in fetal rat tissues: translation of IGF-II ribonucleic acid and processing of pre-pro-IGF-II. *Endocrinology* 122 (1988) 709-716.
- (221) **T. M. DeChiara, A. Efstratiadis, E. J. Robertson**, A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting, *Nature* 345 (1990) 78-80.
- (222) **T. M. DeChiara, E. J. Robertson, A. Efstratiadis**, Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene, *Cell* 64 (1991) 849-859.
- (223) **D. P. Barlow, R. Stronger, B. G. Hermann, K. Saito, N. Schweifer**, The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus, *Nature* 349 (1991) 84-87.
- (224) **T. Ludwig et al**, Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in IGF2 and IGF1R null backgrounds, *Dev. Biol.* 177 (1996) 517-535.
- (225) **D. R. Johnson**, Hairpin-tail: a case of post-reductional gene action in the mouse egg, *Genetics* 76 (1974) 795-805.
- (226) **D. R. Johnson**, Further observations on the haipin-tail (Thp) mutation in the mouse, *Genet. Res.* 24 (1975) 207-213.
- (227) **J. MacGrath, D. Solter**, Maternal Thp lethality in the mouse is a nuclear, not cytoplasmic, defect, *Nature* 308 (1984) 550-551.
- (228) **D. Haig, C. Graham**, Genomic imprinting and the strange case of the insulin-like growth factor II receptor *Cell* 64 (1991) 1045-1046.
- (229) **Z. Q. Wang, M. R. Fung, D. P. Barlow and E. F. Wagner**, Regulation of embryonic growth and lysosomal targeting by the imprinted *IGF2/MPR* gene, *Nature* 372 (1994) 464-467.

- (230) **M. M Lau, et al**, Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality, *Genes Dev.* 8 (1994) 2953–2963.
- (231) **S. Kornfeld**, Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulin like growth factor II receptors, *Annu. Rev. Biochem.* 61 (1992) 307–330.
- (232) **T. Ikezu, T. Okamoto, U. Giambarella, T. Yokota and I. Nishimoto**, *In vivo* coupling of insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor to heteromeric G proteins. Distinct roles of cytoplasmic domains and signal sequestration by the receptor, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 29224–29228.
- (233) **Q. Zhang et al**, Insulin-like growth factor II signaling through the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor promotes exocytosis in insulin-secreting cells, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94 (1997) 6232–6237.
- (234) **T. McKinnon, C. Chakraborty, L. M. Gleeson, P. Chidiac and P. K. Lala**, Stimulation of human extravillous trophoblast migration by IGF-II is mediated by IGF type 2 receptor involving inhibitory G protein(s) and phosphorylation of MAPK *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (2001) 3665–3674.
- (235) **J. C. Groskopf, L. J. Syu, A. R. Saltiel and D. I. Linzer**, Proliferin induces endothelial cell chemotaxis through a G protein-coupled, mitogen-activated protein kinase-dependent pathway, *Endocrinology* 138 (1997) 2835–2840.
- (236) **C. P. Minniti et al**, The insulin-like growth factor II (IGF-II)/mannose 6-phosphate receptor mediates IGF-II-induced motility in human rhabdomyosarcoma cells, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 9000–9004.
- (237) **J. K. Tsuruta, E. M. Eddy and D. A. O'Brien**, Insulin-like growth factor-II/cation-independent mannose 6-phosphate receptor mediates paracrine interactions during spermatogonial development, *Biol. Reprod.* 63 (2000) 1006–1013.
- (238) **H. Ikushima et al**, Internalization of CD26 by mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor contributes to T cell activation, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97 (2000) 8439–8444.
- (239) **I. Nishimoto**, The IGF-II receptor system: a G protein-linked mechanism, *Mol. Reprod. Dev.* 35 (1993) 398–406.
- (240) **G. Szebenyi, P. Rotwein**, Differential regulation of mannose 6-phosphate receptors and their ligands during the myogenic development of C2 cells, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 5534–5539.

- (241) **S. E. Tollefsen, J. L. Sadow, P. Rotwein**, Coordinate expression of insulin-like growth factor II and its receptor during muscle differentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 (1989) 1543-1547.
- (242) **C. Korner, B. Nurnberg, M. Uhde and T. Braulke**, Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor fails to interact with G-proteins. Analysis of mutant cytoplasmic receptor domains, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 287–295.
- (243) **CA Gabel, DE Goldberg, S. Kornfeld**, Identification and characterization of cells deficient in the mannose 6-phosphate receptor: evidence for an alternate pathway for lysosomal enzyme targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80 (1983) 775-9.
- (244) **F Mainferme, R Wattiaux, K. von Figura**, Synthesis, transport and processing of cathepsin C in Morris hepatoma 7777 cells and rat hepatocytes. *Eur J Biochem.* 153 (1985) 211-6.
- (245) **Kiess W, Blickenstaff GD, Sklar MM, Thomas CL, Nissley SP, Sahagian GG**. Biochemical evidence that the type II insulin-like growth factor receptor is identical to the cation-independent mannose 6-phosphate receptor, *J Biol Chem.* 263 (1988) 9339-44.
- (246) **I. Nunes, R.L. Shapiro, D.B. Rifkin**, Characterization of latent TGF-beta activation by murine peritoneal macrophages, *J. Immunol.* 155 (1995) 1450– 1459.
- (247) **Tulsiani D. Keller RK, Touster O.**, The preparation and chemical composition of the multiple forms of beta-glucuronidase from the female rat preputial gland, *J. Biol. Chem* 250 (1975) 4770-4776.
- (248) **T.S. Olson, M.D. Lane**, A common mechanism for posttranslational activation of plasma membrane receptors? *FASEB J.*3 (1989) 1618 –1624.
- (249) **A. L. Hubbard, D. A. Wall and A. Ma**, Isolation of rat hepatocyte plasma membranes. II. Identification of membrane-associated cytoskeletal proteins, *J. Cell. Biol.* 96 (1983) 217
- (250) **D.E. Bockman and A.K. Gulati**, Localization of fibronectin in megacaryocytes of fetal liver, *Anat. Rec.* (1989) 223: 90-4.
- (251) **R. Van Manen, W. De Priester and D. L. Knook**, Lysosomal activity in ageing rat liver: I Variation in enzyme activity within the liver lobule, *Mech. Ageing Dev.* 22 (1983) 159-165.

- (252) **J. Mertens-Strijthagen, C. De Schrijver, S. Wattiaux-De Coninck and R. Wattiaux**, Rat liver lysosomes of rats at different ages, *Biochem. Soc. Trans.* 5 (1977) 1170-1171.
- (253) **F. Bertini, L. Mayorga and M. G. De Veca**, Developmental aspects of the lysosomal apparatus of mouse liver, *Micr. Electr. Biol. Cel.* 10 (1986) 125-132.
- (254) **M. A. Sosa and F. Bertini**, Developmental aspects of the lysosomal apparatus. Membrane affinity of N-acetyl- β -D-glucosaminidase in developing rat liver, *Mech. Ageing Dev.* 40 (1987) 149-156.
- (255) **Pohlmann R, Hasilik A, Cheng S, Pemble S, Winchester B, von Figura K.** Synthesis of lysosomal alpha-mannosidase in normal and mannosidosis fibroblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115 (1983) 1083-1089.
- (256) **K.J. Valenzano, L.M. Kallay and P. Lobel**, An assay to detect glycoproteins that contain mannose 6-phosphate, *Anal. Biochem.* 209 (1993) 156-62.
- (257) **G. Sahagian, J. Distler, and G. Jourdian**, *Methods Enzymol.* 83 (1982) 392-396.
- (258) **Sleat et al**, Rat brain contains higher M6P glycoproteins, included palmitoyl protein thioesterase, a enzyme implicated in neuronal infantil ceroid lipofucsinosis. *J.Biol. Chem.* 271 (1996) 19191-19198.
- (259) **D. E. Sleat, S. R. Kraus, I. Sohar, H. Lackland and P. Lobel**, α -Glucosidase and N-acetylglucosamine-6-sulphatase are the major mannose-6-phosphate glycoproteins in human urine, *Biochem. J.* 324 (1997) 33-39.
- (260) **D. E. Sleat, T-L. Chen, K. Raska and P. Lobel**, Increased levels of glycoproteins containing Mannose-6-Phosphate in human breast carcinomas, *J. Cancer Research* 55 (1995) 3424-3430.
- (261) **F. Blanchard, L. Raher, L. Duplomb, P. Vusio, V. Pitard, J. L. Taupin, J. Moreau, B. Hoflack, S. Minvielle, Y. Jacques, A. Godard**, The mannose 6-phosphate/insulin like growth factor II receptor is a nanomolar affinity receptor for glycosilated human leukemia inhibitory factor, *J. Biol. Chem.* 273 (1999) 20886-20893.
- (262) **F. Blanchard, L. Duplomb, L. Raher, P. Vusio, Moreau, B. Hoflack, A. Godard**, Mannose 6-phosphate/insulin like growth factor II receptor mediates the internalization and degradation of leukemia inhibitory factor but not signal transduction, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 24685-24693.

- (263) **S. Lee, D. Nathans**, Proliferin secreted by cultured cells binds to mannose 6-phosphate receptors, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 3521-3527.
- (264) **D. Jackson, D. Linzer**, Proliferin transport and binding in the mouse fetus, *Endocrinology* 138 (1997) 2835-2840.
- (265) **G. Scheel, V. Herzog**, Mannose 6-phosphate receptor in porcine thyroid follicle cells. Localization and possible implications for the intracellular transport of thyroglobulin, *Eur. J. Cell. Biol.* 49 (1989) 140-148.
- (266) **V. Herzog, W. Neumuller, B. Holzmann**, Thyroglobulin, the major and obligatory exportable protein of thyroid follicle cells, carries the lysosomal recognition marker mannose 6-phosphate, *EMBO J.* 6 (1987) 555-560.
- (267) **P. Faust, J. Chirwin, S. Kornfeld**, Renin, a secretory glycoprotein, acquires phosphomannosyl residues, *J. Cell Biol.* 105 (1987) 1947-1955.
- (268) **G.M. Griffiths, S. Isaaz**, Granzymes A and B are targeted to the lytic granules of lymphocytes by the mannose-6-phosphate receptor, *J. Cell Biol.* 120 (1993) 885–896.
- (269) **B. Motyka, G. Korbitt, M.J. Pinkoski, J.A. Heibin, A. Caputo, M. Hobman, M. Barry, I. Shostak, T. Sawchuk, C.F. Holmes, J. Gauldie, R.C. Bleackley**, Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis, *Cell* 103 (2000) 491–500.
- (270) **J.K. Burkhardt, S. Hester, Y. Argon**, Two proteins targeted to the same lytic granule compartment undergo very different posttranslational processing, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86 (1989) 7128–7132.
- (271) **J. Frenz, C.P. Quan, J. Cacia, C. Democko, R. Bridenbaugh, T. McNeerney**, Protein sorting by high performance liquid chromatography: 2. Separation of isophosphorylates of recombinant human DNase I on a polyethylenimine column, *Anal. Chem.* 66 (1994) 335–340.
- (272) **A. Nishikawa, W. Gregory, J. Frenz, J. Cacia, S. Kornfeld**, The phosphorylation of bovine DNase I Asn-linked oligosaccharides is dependent on specific lysine and arginine residues, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 19408–19412.
- (273) **J. Cacia, C.P. Quan, R. Pai, J. Frenz**, Human DNase I contains mannose 6 phosphate and binds the cation-independent mannose 6-phosphate receptor, *Biochemistry* 37 (1998) 15154–15161.
- (274) **A. Nishikawa, A. Nanda, W. Gregory, J. Frenz, S. Kornfeld**, Identification of

- amino acids that modulate mannose phosphorylation of mouse DNase I, a secretory glycoprotein, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 19309– 19315.
- (275) **H. Ikushima, Y. Munakata, T. Ishii, S. Iwata, M. Terashima, H. Tanaka, S.F. Schlossman, C. Morimoto**, Internalization of CD26 by mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor con-tributes to T cell activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 8439– 8444.
- (276) **K. Ohnuma, Y. Munakata, T. Ishii, S. Iwata, S. Kobayashi, O. Hosono, H. Kawasaki, N.H. Dang, C. Morimoto**, Soluble CD26/di-peptidyl peptidase IV induces T cell proliferation through CD86 up-regulation on APCs, *J. Immunol.* 167 (2001) 6745–6755. N.M. Dahms, M.K. Hancock / *Biochimica et Biophysica Acta* 1572 (2002) 317–340 339.
- (277) **G. Todderud, G. Carpenter**, Presence of mannose phosphate on the epidermal growth factor receptor in A-431 cells, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 17893– 17896.
- (278) **M. Babst, G. Odorizzi, E.J. Estepa, S.D. Emr**, Mammalian tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and the yeast homologue, Vps23p, both function in late endosomal trafficking, *Traffic* 1 (2000) 248–258.
- (279) **C.R. Brunetti, R.L. Burke, S. Kornfeld, W. Gregory, F.R. Masiarz, K.S. Dingwell, D.C. Johnson**, Herpes simplex virus glycoprotein D acquires mannose 6-phosphate residues and binds to mannose 6-phosphate receptors, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 17067–17074.
- (280) **C.R. Brunetti, R.L. Burke, B. Hoflack, T. Ludwig, K.S. Dingwell, D.C. Johnson**, Role of mannose-6-phosphate receptors in herpes simplex virus entry into cells and cell-to-cell transmission, *J. Virol.* 69 (1995) 3517– 3528.
- (281) **K.S. Topp, A.L. Rothman, J.H. Lavail**, Herpes virus infection of RPE and MDCK cells: polarity of infection, *Exp. Eye Res.* 64 (1997) 343– 354.
- (282) **C.R. Brunetti, K.S. Dingwell, C. Wale, F.L. Graham, D.C. Johnson**, Herpes simplex virus gD and virions accumulate in endosomes by mannose 6-phosphate-dependent and -independent mechanisms, *J. Virol.* 72 (1998) 3330–3339.
- (283) **C.A. Gabel, L. Dubey, S.P. Steinberg, D. Sherman, M.D. Gershon, A.A. Gershon**, Varicella-zoster virus glycoprotein oligosaccharides are phosphorylated during posttranslational maturation, *J. Virol.* 63 (1989) 4264– 4276.
- (284) **Z. Zhu, M.D. Gershon, R. Ambron, C. Gabel, A.A. Gershon**, Infection of cells by varicella zoster virus: inhibition of viral entry by mannose 6-phosphate and heparin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 3546– 3550.

- (285) **A. Alconada, U. Bauer, B. Hoflack**, A tyrosine-based motif and a casein kinase II phosphorylation site regulate the intracellular traf-ficking of the varicella-zoster virus glycoprotein I, a protein localized in the trans-Golgi network, *EMBO J.* 15 (1996) 6096– 6110.
- (286) **Z.H. Wang, M.D. Gershon, O. Lungu, Z. Zhu, A.A. Gershon**, Traf-ficking of varicella-zoster virus glycoprotein gI: T(338)-dependent retention in the trans-Golgi network, secretion, and mannose 6-phosphate- inhibitable uptake of the ectodomain, *J. Virol.* 74 (2000) 6600– 6613.
- (287) **S.D. O’Dell, I.N. Day**, Insulin-like growth factor II (IGF-II), *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30 (1998) 767– 771.
- (288) **J.X. Kang, Y. Li, A. Leaf**, Mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor is a receptor for retinoic acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 13671–13676.
- (289) **J.X. Kang, J. Bell, A. Leaf, R.L. Beard, R.A. Chandraratna**, Retinoic acid alters the intracellular trafficking of the mannose-6-phosphate/ insulin-like growth factor II receptor and lysosomal enzymes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 13687–13691.
- (290) **J.X. Kang, J. Bell, R.L. Beard, R.A. Chandraratna**, Mannose 6-phos-phate/ insulin-like growth factor II receptor mediates the growth-in-hibitory effects of retinoids, *Cell Growth Differ.* 10 (1999) 591– 600.
- (291) **A. Nykjaer, E.I. Christensen, H. Vorum, H. Hager, C.M. Petersen, H. Roigaard, H.Y. Min, F. Vilhardt, L.B. Moller, S. Kornfeld, J. Gliemann**, Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor targets the urokinase receptor to lysosomes via a novel binding in-teraction, *J. Cell Biol.* 141 (1998) 815– 828.
- (292) **W. Burnette**, “western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmofified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A, *Anal. Biochem.* 112 (1981) 195-203.
- (293) **U. Laemmli**, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680-685.
- (294) **A. Barret and M Health**, Lysosomal enzymes, in J. Dingle (Ed) *Lysosomes: A Laboratory Handbook*, Elsevier/North-Holland and Biomedical Press, Amsterdam, 1977- pp 118-120.

(295) **O. Lowry, N. Rosebrough, A. Farr, R. Randall**, Protein measurment with the Folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 193 (1951) 265-275.