



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

Unidad de Genética de la Nutrición

Instituto de Investigaciones Biomédicas

CARACTERIZACION FISIOLÓGICA DE UN NUEVO SISTEMA DE TRANSPORTE DE ENZIMAS LISOSOMALES EN FIBROBLAS- TOS HUMANOS EN CULTIVO

T E S I S

Que para obtener el título de:

**DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS
(BIOQUÍMICA)**

P r e s e n t a :

Elda María del Rocío Coutiño Rodríguez

México, D. F.

Octubre, 1988

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Pág.
I. INTRODUCCION	1
II. MATERIAL Y METODOS	
IIa. Material	25
IIb. Métodos	30
III. RESULTADOS	41
IV. DISCUSION	81
V. CONCLUSIONES	94
VI. BIBLIOGRAFIA	96

I. - INTRODUCCION

Dada la complejidad de las células eucariotes, es fácil intuir la existencia de programas genéticos que codifiquen eventos co y post-traduccionales necesarios para la transferencia de polipéptidos desde su lugar de síntesis a los sitios en que deben realizar su función, tanto intra como extracelularmente. En contrapartida, es difícil pensar en la existencia de un mecanismo simple que permita a cada uno de los polipéptidos recién sintetizados llegar a su destino, ya que en la célula hay tantos de ellos, como organelos subcelulares y compartimentos membranales existan (Marx J 1980).

En los últimos años, se ha podido demostrar la presencia de una nueva variedad de determinantes topológicos, presentes en los diversos dominios de determinadas proteínas y cuya función no sólo es la de ser parte conformacional de la misma, que poseen elementos informativos, susceptibles de ser reconocidos por receptores específicos. Estos elementos informativos forman parte de un "código postal" que determina no sólo el lugar de la síntesis, sino también la ruta de transporte, y el destino final, tanto intracelular como extracelular de una variedad de proteínas (Sabatini 1982, Kreil 1981, Walter 1984, Blobel 1979, 1982, 1984 y Marx 1980).

En este trabajo se describen resultados obtenidos en la caracterización de un nuevo sistema de transporte cuya

función es reconocer intracelularmente las hidrolasas ácidas (presentes extracelularmente), internarlas y transportarlas a los lisosomas.

A. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Los trabajos del grupo de Palade (1975) sobre la síntesis, transporte y secreción de zimógeno sirvieron como punto de partida y como modelo a trabajos subsecuentes acerca de la síntesis y el transporte intracelular de las proteínas. Jamieson y Palade (1977) propusieron un modelo para la síntesis y el transporte vectorial de las proteínas secretorias en el páncreas, el cual incluye los siguientes pasos:

- 1.- Síntesis de las proteínas en polisomas unidos al retículo endoplásmico.
- 2.- Descarga vectorial y segregación de los polipéptidos nacientes dentro de las cisternas del retículo endoplásmico.
- 3.- Transporte intracelular de las proteínas secretorias desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi mediante vesículas transportadoras.
- 4.- Segregación y empaque de las proteínas secretorias en las vesículas del aparato de Golgi.
- 5.- Almacenamiento temporal de las proteínas secretorias y por último descarga de los productos al espacio intracelular mediante la exocitosis.

El grupo de Leblond (1977) corroboró estas observaciones y mostró que la incorporación de los carbohidratos a las

glicoproteínas está acoplada a su síntesis y transporte. Así, la manosa se incorpora a los péptidos durante su síntesis en el retículo endoplásmico. La fucosa, la galactosa, la N-acetil glucosamina y el ácido siálico, se incorporan a los glicopéptidos durante su paso por el aparato de Golgi.

Aunque el transporte vectorial propuesto por Palade y cols (1977) para las proteínas secretorias, fue aceptado como válido para el transporte de las enzimas lisosomales y la formación de los lisosomas primarios en las células como los macrófagos y los polimorfonucleares (Cohn 1968 y Baiton y col 1976); varias preguntas quedaron por contestarse:

a) cuales son los mecanismos de transporte de las proteínas desde el retículo endoplásmico al Golgi.

b) cómo y dónde la célula separa las proteínas que deben ser secretadas, de aquellas que forman parte del sistema lisosomal.

c) cuál es la ruta que siguen las hidrolasas ácidas a través del aparato de Golgi para formar los lisosomas primarios.

Se han propuesto, varias hipótesis para contestar estas preguntas, algunas de ellas han ido descartándose, en base a nuevos hallazgos. Así, Novikoff (1973, 1976, 1977) en base a estudios histoquímicos y ultraestructurales sobre la distribución intracelular de la fosfatasa ácida, propuso la existencia de múltiples vías de transporte, así como múltiples sitios para la segregación de las hidrolasas

ácidas, los cuales incluyen al Golgi, al retículo endoplásmico y a los lisosomas. Esta región fue llamada GERL.

El grupo de Goldstone y Koining (1973a, 1973b) basándose en experimentos de fraccionamiento subcelular, propuso la existencia de regiones restringidas del retículo endoplásmico para la síntesis de las enzimas lisosomales, diferentes a las regiones en que se sintetizan las proteínas secretorias. Por último, el grupo de Sly y cols (1978, 1980, 1981, 1982) propuso la presencia de señales específicas, presentes en las hidrolasas ácidas, que sirven a la célula para segregarias de las proteínas secretorias, separación que ocurre en la región del Golgi.

Aunque todos los grupos habían concluido que la segregación de proteínas es intracelular, el grupo de Neufeld propuso un modelo que vino a ser una alternativa opuesta a la segregación interna; es decir, la segregación de proteínas ocurre extracelularmente (Hickman y Neufeld 1972 y Hickman y col 1974). Según este grupo, las hidrolasas ácidas son secretadas junto con los productos de secreción. Las enzimas lisosomales son recapturadas mediante un mecanismo de endocitosis adsorptiva, el cual involucra un receptor específico, que participa en su transporte a los lisosomas. Esta hipótesis conocida como de secreción-recaptura, se basó en el hecho de que los fibroblastos en cultivo, provenientes de pacientes con mucopolidosis II (MII), exhiben una severa deficiencia intracelular y un

acúmulo extracelular de múltiples enzimas hidrolíticas (Weismann y col. 1971a, 1971b). Estas enzimas son incapaces de ser endocitadas tanto por los fibroblastos humanos normales, como por los fibroblastos provenientes de pacientes con MIII, conocidos como células I. Por el contrario los fibroblastos provenientes de MIII son capaces de internalizar y retener hidrolasas ácidas secretadas por fibroblastos humanos normales (Neufeld 1971, Lagunoff 1973, Shapiro 1976, Von Figura and Kreese 1979, Vladatiu 1979.), lo que condujo a concluir que la acumulación extracelular se debe a la incapacidad de las enzimas para llegar a su destino final, dado que al ser secretadas por las células I, no son recapturadas, debido a la deficiencia de un marcador común que les permitiera ser endocitadas.

La hipótesis de "secreción-recaptura" tuvo gran importancia, ya que propuso por primera vez, la existencia de un marcador común para todas las enzimas lisosomales, el cual es necesario para su adecuada compartimentación. Por otra parte, indujo a una serie de grupos a estudiar: a) la naturaleza química del marcador común, b) el transporte intracelular de las enzimas lisosomales, c) la secreción y d) la recaptura de las mismas.

Observaciones derivadas de estos trabajos generaron otras hipótesis, que en alguna forma son modificaciones de la secreción-recaptura. Así por ejemplo, Lloyd (1977), sugirió que las hidrolasas ácidas entran a los lisosomas vía el Golgi al GERL y dado el constante reciclamiento de la

membrana, viajan desde el plasmalema a los lisosomas y viceversa; su propuesta es que el marcador de reconocimiento no es necesario para la entrada de las enzimas lisosomales, sino más bien, su presencia se requiere para la retención de las hidrolasas ácidas dentro de los lisosomas. Por otra parte, el grupo de Von Figura (Von Figura y Webber 1978, Von Figura y Voss 1979), propuso que las hidrolasas ácidas al llegar a la región de Golgi se unen a su receptor, así adsorbidas a la membrana son transportadas a la membrana plasmática para de allí ser transportadas a los lisosomas, sin disociarse de su receptor. En el caso de las células I, dado que carecen del marcador común, viajan a la superficie celular no unidas a las membranas, por lo consiguiente, serán secretadas al medio externo, sin poder ser recapturadas.

Estas hipótesis fueron descartadas años después, debido a nuevas observaciones. Así por ejemplo, los trabajos realizados por los grupos de Hickman y Neufeld (1972), Weissman y Herschkowitz (1974), Neufeld y col (1975), mostraron que no todas las enzimas lisosomales son secretadas en los fibroblastos de células I, tal es el caso de la glucosidasa I y la fosfatasa ácida. Por otro lado, el grupo de Reuser (1976) encontró que tanto la β -galactosidasa como la α -glucosidasa no son transferibles intercelularmente, al estudiar la complementación metabólica entre fibroblastos deficientes en dichas enzimas y fibroblastos normales. Otros grupos como Vladutiu y Rattazzi

(1979), Von Figura y Weber (1978), Hasalik y col (1979) y Sly y col (1978) mostraron, que los fibroblastos secretan únicamente, entre 4% y 8% del total de hexosaminidasa durante un periodo de 24 hrs; indicando, que solamente alrededor de un 15 a 20 % de la enzima que se sintetiza de novo es secretada. El grupo de Sly (González-Noriega y cols 1980) aportó la evidencia más clara en contra de la hipótesis de secreción-recaptura; al encontrar que, cuando se crecen fibroblastos humanos en presencia de un inhibidor competitivo (Manosa-6-fosfato) de la endocitosis de enzimas lisosomales, no se logra obtener una depleción intracelular de las enzimas lisosomales, ni un acúmulo extracelular, como prevee la hipótesis de secreción-recaptura. Ello sugirió, la existencia de vías intracelulares para el transporte y la compartimentación intracelular de este grupo de enzimas, así como, una segregación intracelular de las enzimas lisosomales, en donde una pequeña parte de las enzimas son secretadas y recapturadas por los mismos fibroblastos, y por otros tipos celulares (Sly 1982). Posteriormente, el grupo de Hotman y Bower (1984) encontró que una porción es transportada unida al receptor via la membrana plasmática y tal vez represente el 10% que se secreta como consecuencia del reciclamiento de la membrana.

1.- NATURALEZA DEL MARCADOR COMUN

Fueron los trabajos de Morell y Ashwell (1971), sobre la

vida media de las proteínas séricas los que dieron la primera pauta del papel que juegan los carbohidratos como señales para que las glicoproteínas sean retiradas del plasma. Este tipo de proteínas tiene una vida media, en el torrente circulatorio, que va desde horas hasta días. Sin embargo, cuando se retiran específicamente los residuos de ácido siálico, presente en la parte más distal de las cadenas glicosídicas, quedan expuestos los residuos de galactosa, entonces su vida media en plasma es sólo de minutos. Posteriormente, se encontró la presencia de un receptor en las membranas plasmáticas de las células parenquimatosas de hígado, que reconoce aquellas proteínas circulantes que contienen residuos terminales de la galactosa. Este receptor retira de la circulación a tales proteínas y las transporta a los lisosomas (Ashwell y Morell 1974, Ashwell y Harford 1982).

Estos resultados llevaron a sugerir que, posiblemente, las enzimas lisosomales sean reconocidas de una manera similar a través de un residuo glicosídico, para poder ser internadas a los fibroblastos. Hickman y col (1974), cuantificaron la capacidad endocítica y catalítica para la β -hexosaminidasa después de ser oxidada con peryodato, encontrando que la primera se reduce en un 100%, sin sufrir cambio alguno su actividad catalítica, sugiriendo que el marcador común de reconocimiento para enzimas lisosomales es un carbohidrato. Por otro lado, Glaser y col (1975) y

Nicol y col (1974), al estudiar el punto isoeléctrico para la β -glucuronidasa humana encontraron, que las formas más ácidas de la enzima se internalizan a una velocidad muy alta, en cambio las no ácidas se internalizan muy poco. La naturaleza química del componente ácido fue demostrada por Kaplan y col en (1977a,b) utilizando una serie de azúcares, como posibles inhibidores competitivos de la internación de la β -glucuronidasa, encontraron: a) que algunos de los azúcares fosforilados inhibían, en diferentes grados, la endocitosis de la enzima, b) que aquellos azúcares con mayor potencia inhibitoria eran moléculas de fosfomanana y manosa-6-fosfato (Man-6-P) sugiriendo que éste residuo, es el componente ácido anteriormente descrito y c) que al pre-tratar la enzima con la fosfatasa alcalina, se inhibe la capacidad endocítica de la β -glucuronidasa, lo cual sugiere la presencia de un enlace monoéster en el marcador de la Man-6-P. Estas observaciones, fueron corroboradas en otras enzimas lisosomales provenientes de varios tejidos (Kaplan y col, 1977b, Sando y Neufeld, 1977, Ullrich y col, 1978, Von Figura y Kellin 1979, Shapiro 1979, Sly 1981, 1982).

Posteriormente, Natowitz y col (1983), encontraron que el marcador de reconocimiento Man-6-P está en cadenas glicosídicas de alto contenido en manosa, ya que al incubar la β -glucuronidasa en presencia de la endoglicosidasa H pierde su capacidad de internación. Así pues, el marcador común que Hickman y Neufeld (1974) propusieron para la

internación de las enzimas lisosomales es un azúcar fosforilado en la posición 6 de la manosa (Man-6-P), presente en las cadenas de alto contenido en manosa. Este marcador está ausente en las enzimas provenientes de células I (Hasilik 1981, Reitman 1981, Waheed y cols 1982); de ahí la inhabilidad de este tipo de células para compartimentar adecuadamente a las enzimas lisosomales. Este marcador no sólo, es requerido en la internación de las enzimas lisosomales sino también para el transporte interno de las hidrolasas que van del Golgi a los lisosomas (González-Noriega y col 1980, Hasilik y col 1980, Sly y Fischer 1982).

2.- ENDOCITOSIS DE LAS ENZIMAS LISOSOMALES.

El grupo de Neufeld (1971, 1972, 1973 y 1977) al estudiar el proceso de recaptura de las enzimas lisosomales en fibroblastos humanos en cultivo observó que las células eran capaces de internar estas enzimas a mayor velocidad que otras proteínas, que normalmente se encuentran en torrente circulatorio como la albumina, también se encontró, que su internación se ajusta a los requisitos esperados para un proceso de pinocitosis absorptiva. Esta observación hizo pensar que un receptor podría estar involucrado en el proceso de endocitosis de estas enzimas (Steinman y col 1974, Silverstein y col 1977, Goldstein y col 1979, Prattan 1980); es decir, el sistema es mediado por un receptor, ya que: es saturable, es específico, se

inhibe competitivamente, es dependiente de temperatura, tiempo y energía. Se ha encontrado que el número de receptores en la membrana es de 15 a 30,000 sitios de unión. La K_m de internación es de 2.2×10^{-11} y la velocidad máxima de internación es aproximadamente 100 veces mayor que la reportada para moléculas que penetran por un proceso de pinocitosis fluida (15 ml/mg/hr) (Nicoll y col 1974, Von Figura y Klein 1974, Kaplan y col 1977a,b, Sando 1976, Sando y Neufeld 1976, Heibert y col 1976, , Shapiro y col 1975, y Sando y Neufeld 1977, Ullrich y col 1978, Sly y col 1978, Von Figura 1978, 1979, Rome y col 1979, González Noriega y col 1980, Fischer y col 1980). Las enzimas lisosomales unidas a su receptor son internadas, en vesículas cubiertas de clatrina (Neufeld y col 1971, Von Figura y Weber 1978, Von Figura y col 1979). Una vez dentro de las células, son transportadas a su destino final, los lisosomas. Esta observación ha sido demostrada utilizando diferentes enfoques: a) Las enzimas lisosomales, añadidas exógenamente, son capaces de degradar los mucopolisacáridos acumulados en cantidades patógenas en los fibroblastos en cultivo con diferentes tipos de mucopolisacáridosis (Neufeld 1971, y Lagunoff 1973), b) Estudios citoquímicos demuestran que las enzimas lisosomales endocitadas se encuentran en vesículas perinucleares (Lagunoff y col 1973), y c) Al fraccionar las células que han endocitado la enzima añadida exógenamente, ésta se localiza en las fracciones celulares a la misma

densidad que corresponde a los lisosomas (Achord 1977, Bach y col 1977, Sly y col 1978, Rome y col 1979).

Estudios de unión de las enzimas lisosomales a su receptor (González Noriega y cols 1980, Fischer y cols 1980a,b) han permitido observar que la máxima unión ocurre a pH 7.3; pH que corresponde al medio de cultivo así como al del medio del líquido extracelular. Por el contrario el pH de máxima disociación ocurre a pH 4.8 que corresponde a los lisosomas y a los compartimientos prelisosomales (receptosomas) (Wibo y Pool 1974, Sando y Neufeld 1977, González Noriega y cols 1980, Maxfield y col 1982). Por otra parte, las aminas secundarias como cloruro de amonio y cloroquina que tienen propiedades lisosomotróficas (De Duve 1974) causan una inhibición de la endocitosis de las enzimas lisosomales al incrementar el pH de las vesículas ácidas (Wibo y Pool 1974) y por lo tanto, alteran la disociación intracelular, del complejo ligando receptor internalizados, dependiente de pH (González Noriega y cols 1980). Esta observación permitió corroborar el destino de estos complejos dentro de la célula, así como intuir que el receptor debe ser reciclado, ya que la enzima lisosomal es transportada desde el receptosoma hasta los lisosomas, al parecer es en el receptosoma (Willingham y Pastan 1980, Pastan 1981,1983) donde se disocia el complejo ligando receptor y así el receptor retorna a la membrana plasmática (fig 1 tomada de Kornfeld 1987). De esta manera el receptosoma representa un punto de interacción entre el

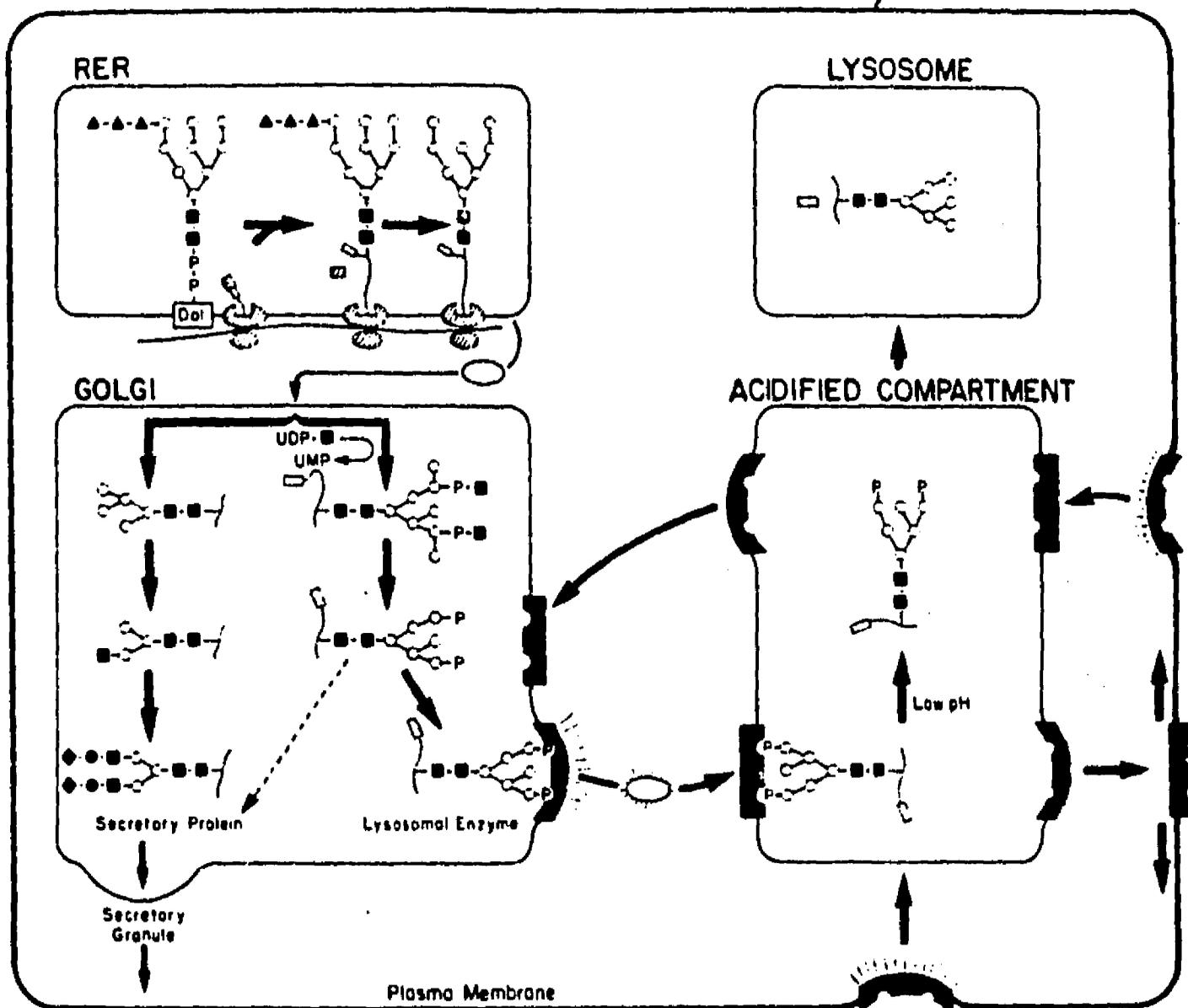


Figure 1. Schematic pathway of lysosomal enzyme targeting to lysosomes. Lysosomal enzymes and secretory proteins are synthesized in the rough endoplasmic reticulum (RER) and glycosylated by the transfer of a preformed oligosaccharide from dolichol-P-P-oligosaccharide (Dol). In the RER, the signal peptides (//////) are excised. The proteins are translocated to the Golgi where the oligosaccharides of secretory proteins are processed to complex-type units and the oligosaccharides of lysosomal enzymes are phosphorylated. Most of the lysosomal enzymes bind to mannose 6-phosphate receptors (MPRs) (—■—) and are translocated to an acidified prelysosomal compartment where the ligand dissociates. The receptors recycle back to the Golgi or to the cell surface, and the enzymes are packaged into lysosomes where cleavage of their propeptides is completed (: ...). The P₁ may also be cleaved from the mannose residues. A small number of the lysosomal enzymes fail to bind to the receptors and are secreted along with secretory proteins (---→). These enzymes may bind to surface MPRs in coated pits () and be internalized into the prelysosomal compartment. (■) N-Acetylglucosamine. (○) Mannose. (▲) Glucose. (●) Galactose. (◆) Sialic acid. Modified from ref 2.

Figura 1. Vías de transporte de hidrolasas ácidas desde el retículo endoplásmico a los lisosomas. Tomada de Kornfeld S, 1986.

camino biosintético de las enzimas lisosomales y el camino endocítico para que las enzimas converjan en los lisosomas (Brown y col 1986). Por lo que respecta a los trabajos de Fischer y cols (1980 a,b), demuestran que existe una poza de receptores internos, cuatro veces mayor que el número de receptores (sitios de unión) externos y se encuentran ocupados por enzimas endógenas, siendo fácilmente dissociables en presencia de Man-6-P, observando que los receptores localizados en la fracción lisosomal o en membranas plasmáticas se encuentran libres casi en su totalidad alrededor de un 90 %. Evidencias actuales han demostrado la ausencia de los receptores en los lisosomas (Kornfeld 1987). Otros estudios sobre las propiedades del receptor, mostraron que éste tiene una vida media de 27 hrs y su síntesis es inhibible en presencia de la cicloheximida afectando la unión y la internación de la enzima (González-Noriega y cols 1980, Creek y Sly 1983), estructuralmente el receptor es una glicoproteína transmembranal de peso molecular de 215KD, independiente de cationes divalentes, con una gran afinidad por fosfomonoésteres presentes en las cadenas de los oligosacáridos de las enzimas hidrolíticas (Von Figura 1986).

3. -TRANSPORTE INTERNO DE LAS PROTEINAS LISOSOMALES:

En los últimos años, se han encontrado diversos tipos de evidencias que confirman la existencia de un transporte vectorial para las enzimas lisosomales y la existencia de mecanismos de segregación intracelular para las proteínas transportadas hasta el Golgi (Savaedra y González Noriega 1985).

Las proteínas en general, no sólo poseen información intrínseca que determina su estructura secundaria y terciaria, sino también información que determina su topología celular, (Marx 1980). Observaciones experimentales y consideraciones teóricas que han sido resumidas e interpretadas por Blobel (1978, 1979, 1980, 1982) sugieren la existencia de una serie de señales o determinantes topológicos los cuales poseen información sobre: a) sitio de síntesis, b) transporte al lumen del retículo endoplásmico rugoso, c) glicosidación, d) compartamentación, y f) reconocimiento específico de las enzimas por los receptores.

a) Sitio de Síntesis de las Enzimas Lisosomales. Las proteínas que van a formar parte de los organelos celulares como el aparato de Golgi, los lisosomas, las mitocondrias, las membranas y las proteínas destinadas a ser secretadas se sintetizan en los polisomas unidos al retículo endoplásmico (Sabatini y col 1982, Hay R 1984, Rosenfeld y col 1982, 1987).

b) Transporte al Lúmen del Retículo Endoplásmico. Los polisomas unidos a la membrana del retículo endoplásmico, actúan como un sistema coordinado en la síntesis de las glicoproteínas (Kreil 1981, Walter 1984). Inicialmente, se pensó que en los polisomas existía una señal que permitía su unión al retículo endoplásmico. Estudios posteriores demostraron que la información se encuentra en péptidos nacientes. En general, los primeros 15 a 30 aminoácidos de los péptidos que pertenecen al sistema vesicular de la célula son de naturaleza hidrofóbica, siendo esta región conocida como "Péptido señal". Cuando esta región emerge en los ribosomas se le une a ella una nucleoproteína (5S), esta proteína y el ribosoma son reconocidos por proteínas específicas del retículo endoplásmico rugoso conocidas como las riboforinas (Sabatini y cols 1982). Estas forman canales que permiten el paso de las proteínas a través de la membrana del retículo, primero al péptido señal o señal líder y posteriormente al resto de los aminoácidos que componen la proteína. Sin embargo, esta señal líder puede encontrarse no sólo en el amino terminal sino también en medio o en su carboxilo terminal de la cadena péptidica. Dando origen a una proteína con más de una señal líder. Dependiendo de donde se localice la señal podremos obtener proteínas que pasen al lúmen del retículo o bien proteínas que sean integrantes de la membrana. (Blobel 1980, 1982, 1983).

Es difícil demostrar in vivo la presencia del péptido señal ya que inmediatamente que penetra al lúmen del

retículo es hidrolizado por una peptidasa específica. Esta peptidasa corta a la señal líder cuando se encuentra en el amino terminal (Kreil 1981).

c) Glicosidación. Una modificación que ocurre cotradicionalmente es la glicosidación de las proteínas. Se ha encontrado que las cadenas glicosídicas se unen a residuos de asparagina que están dentro de una secuencia Asp-X- Treo/Ser y que se conocen como cadenas tipo N, o bien cadenas tipo O que están unidas a serina y/o treonina (Tabas y Kornfeld 1978, Kornfeld y Tabas 1980, Hubbard y Ivatt 1981, Pollack y Atksion 1983, Merion 1982, Kornfeld 1985).

La glicosidación del residuo de asparagina se realiza en dos etapas (fig 2): 1) Síntesis enzimática de la cadena glicosídica en la cara externa de la membrana del retículo. Esta cadena glicosídica tiene como estructura común la siguiente forma glucosa³-manosa⁹-acetil glucosamina²-pp dolicol.

2) Transferencia de la cadena glicosídica de alta manosa a la cadena péptica recién sintetizada a nivel de la asparagina, la velocidad de transferencia está modulada por los tres residuos de glucosa (Lodish y Kong 1984).

3) Transporte de las glicoproteínas del retículo endoplásmico al aparato de Golgi a través de un sistema vesicular, este transporte aún no está muy bien definido, ya que durante este transcurso las glicoproteínas sufren una serie de modificaciones postraduccionales mediante la acción

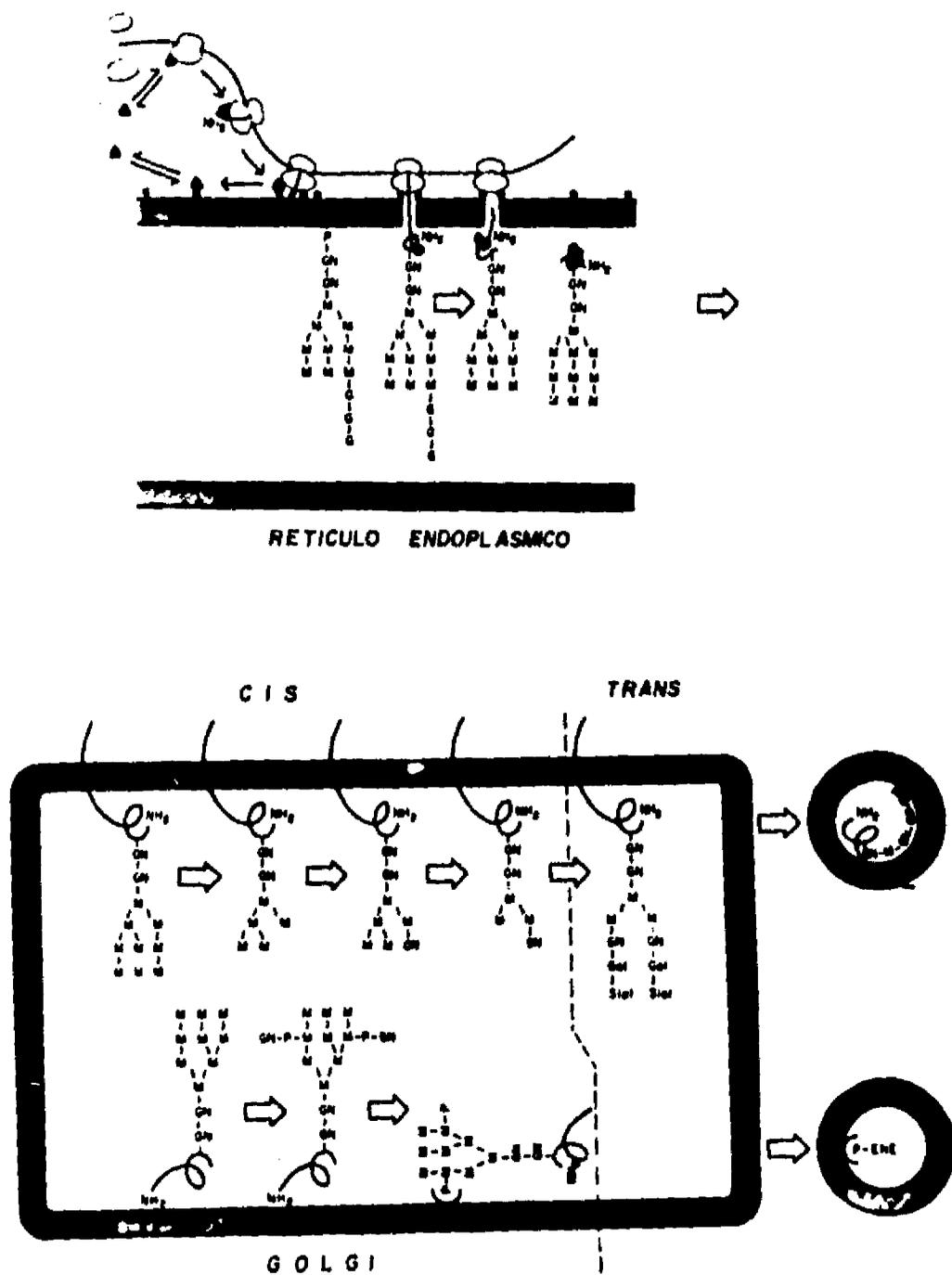


FIG. 2. Muestra las diferentes modificaciones-post-traduccionales que sufre una cadena glicosídica desde su unión a la proteína, durante su síntesis en el retículo endoplásmico en su viaje a través de las regiones cis y trans del aparato de Golgi, hasta que es encapsulada en vesículas secretorias (arriba) o lisosomas (abajo). La cadena glicosídica consta de fosfato (P), β -acetil-glucosamina (GN), manosa (M), glucosa (G), galactosa (Gal) y/o de ácido siálico (Sial). Este proceso ocurre por igual en proteínas integrales o soluble. Las enzimas lisosomales se unirían a su receptor una vez fosforilada la cadena.

de las glucosidasas I y II presentes en retículo endoplásmico, liberan la glucosa, para que la presencia de manosidasas libere una manosa quedando una secuencia central manosa β - (N-acetil glucosamina) $_2$ asparagina, la cual es común para las glicoproteínas destinadas a ser de alto contenido en manosa como serían las hidrolasas ácidas y de tipo complejo como son la mayoría de las proteínas que se secretan y parte de las proteínas de membrana.

d) Compartimentación de las proteínas lisosomales. En este momento el aparato de Golgi debe sortear el destino de las glicoproteínas que tienen la secuencia central, se especula que la formación de las cadenas complejas ocurre en la región trans de Golgi ya que es aquí donde se encuentran localizadas alrededor de varias enzimas, que posiblemente participan en su formación como son, la manosidasa I, la N-acetil glucosamina transferasa I, la manosidasa II, la N-acetil transferasa II, la galactosil transferasa y la sialil transferasa (Hubbard 1981, Lodish 1984, Dunkly y Rothman 1983,1986). Los oligosacáridos destinados a secretarse o a ser glicoproteínas de la membrana son procesados a complejos de ácido siálico. En cambio, la formación de las cadenas de alta manosa, que se encuentran presentes en las enzimas lisosomales, ocurre preferencialmente en la región Cis, donde se localizan las enzimas que los modifican y participan en la formación del marcador de Man-6-P, a través de la participación de dos enzimas, la N-acetil glucosaminil fosfotransferasa que

transfiere N-acetil glucosamina-1-P desde el nucleótido UDP-N-acetil glucosamina a residuos seleccionados de manosa sobre las enzimas hidrolíticas para darnos intermediarios fosfodiésteres, entonces la segunda enzima la N-acetil glucosamina-1-fosfodiéster α -N-acetil glucosaminidasa remueve los residuos N-acetil glucosamina resultando fosfomonoésteres que son residuos de reconocimiento por los receptores de alta afinidad para Man-6-P y que están localizados en la región Cis de Golgi (Rothman y col 1982 y Pohlmann y cols 1982, Brow 1985) de aquí la importancia que juega el Aparato de Golgi pues, es en este organelo donde se llevan a cabo las modificaciones terminales de glicosidación y donde ocurre la segregación de las proteínas secretorias y de las hidrolasas Ácidas. En la enfermedad de células I o mucopolidosis II, existe una mutación en el gene que codifica la síntesis de la enzima N-acetil glucosaminil transferasa por lo tanto las enzimas lisosomales no poseen el marcador de Man-6-P y son secretadas dado que no pueden anclarse a su receptor para dirigirse a los lisosomas; y como reflejo de una incapacidad celular para discriminar las enzimas lisosomales a lo largo de la vía secretoria son secretadas, sin poder ser recapturadas, manifestando la presencia necesaria del marcador de Man-6-P para que este evento ocurra (Reitman y Kornfeld 1981, Hasilik y col 1981, Varki y cols 1981, Wahed y cols 1982).

Resumiendo, el receptor que reconoce el residuo de Man-6-P en las hidrolasas ácidas para su recaptura por fibroblastos, es el mismo que la célula utiliza en la ruta que siguen las hidrolasas en su camino a lisosomas (Reticulo Endoplásmico-Golgi-Lisosomas). Confirmando la existencia de una ruta intracelular, así como que ambos sistemas de transporte, requieren del mismo marcador Man-6-P dado que la enzima intracelular, es disociada del receptor en presencia de este azúcar.

El hecho de que las enzimas lisosomales sean fosforiladas en la región del Golgi, confirma que el transporte, mediado por el receptor para Man-6-P, no es del reticulo a los lisosomas como se pensó originalmente (Gonzalez-Noriega y cols 1980), sino del Golgi a los lisosomas.

B. - ANTECEDENTES ESPECIFICOS

No obstante los resultados obtenidos hasta la fecha, en relación al transporte de las enzimas lisosomales, aún queda una serie de preguntas por resolver; se sospecha que el receptor de Man-6-P, no es el único responsable del acarreo de las hidrolasas ácidas a los lisosomas (Owada 1982, Tietzel 1982, Gabel 1983, 1984) ya que se ha encontrado:

a) Que las mutantes para el receptor de Man-6-P no secretan enzimas en la misma proporción que la deficiencia en el marcador de Man-6-P como ocurre con las células I (Gabel y cols 1983, 1984).

b) Otro receptor que reconoce también el residuo fosforilado de Man-6-P. Este receptor a diferencia del ya descrito, requiere iones calcio para la unión de la enzima al receptor, posee diferentes constantes de unión, y se ha demostrado su presencia en las células deficientes para el primer receptor (Hoflack and Kornfeld 1984, 1985 Stein 1987).

c) Existe una gran heterogeneidad en la distribución de las enzimas lisosomales dentro del lisosoma (Pitt 1975).

d) Existen cuando menos dos enzimas lisosomales la fosfatasa y la glucosidasa, que seguramente son transportadas por otros mecanismos diferentes al de Man-6-P, ya que no son secretadas como el resto de las enzimas lisosomales en la mucopolidosis II o células I (Weissman y cols 1971, Neufeld y cols 1977); sin embargo, estos pacientes tienen prácticamente niveles normales de las hidrolasas ácidas en los hepatocitos, las células Kupffer y los leucocitos, lo que sugiere un mecanismo distinto al de Man-6-P, ya que estas enzimas carecen del marcador de Man-6-P.

e) La β -glucuronidasa a diferencia de otras enzimas lisosomales posee doble localización ya que 30% de la enzima sintetizada de novo permanece en el retículo endoplásmico gracias a la presencia, en esta región, de un receptor específico para ella (Paigen 1975).

f) Se sabe, también, que existen otros receptores específicos para cada tipo celular que reconocen ciertos azúcares en las cadenas glicosídicas presentes en las

enzimas lisosomales y en proteínas séricas, así hepatocitos reconocen residuos de galactosa y N-acetil galactosamina (Ashwell y Morell 1971, Ashwell y Harford 1982)). Los macrófagos y las células de Kupffer reconocen residuos de N-acetil, glucosamina y manosa en las enzimas lisosomales añadidas exógenamente (Achor 1975, Stahl 1978, Tietze 1982), la fucosa y la galactosa presentes en la transferrina son reconocidas por los hepatocitos de los mamíferos (Neufeld y Ashwell 1980).

f) Por último, la existencia de una ruta alternativa para la endocitosis adsorptiva de las enzimas lisosomales ha sido sugerida por Heiber y Jourdian (1976) debido a que han encontrado que la endocitosis adsorptiva de la β -glucuronidasa bovina, no es afectada por la presencia de los azúcares fosforilados.

El objetivo de este trabajo de tesis, es caracterizar un nuevo sistema de internación para enzimas lisosomales, que fue encontrado en el laboratorio del Dr. González-Noriega y que posiblemente corresponde al descrito por Heiber y Jourdian (1976), y compararlo con el ya descrito para enzimas que contienen el marcador fosforilado de manosa, con el fin de obtener evidencias que nos indiquen si ambos sistemas son independientes y diferentes entre sí; así como para conocer cómo y cuál es su función en la células. Nuestros estudios confirman la existencia de un sistema alternativo de endocitosis de enzimas lisosomales en fibroblastos humanos. Así mismo demostramos que la

β -glucuronidasa bovina, es recapturada por dos sistemas endocíticos diferentes e independientes, uno es el ampliamente estudiado y caracterizado de Man-6-P y el otro descrito por Jourdian (1976).

II.-MATERIAL Y METODOS

IIa.- MATERIAL :

A.- Preparación de medios de cultivos:

1.-Medio de Cultivo (MEM)

Medio Mínimo Esencial Eagle's	9.8	g
Bicarbonato de Sodio	2.2	g
Piruvato de Sodio	0.1	g
Glutamina 200 mM	12.0	ml
Antibióticos 100%	20.0	ml
Suero fetal bovino inactivado (1hr a 56°C)	100.0	ml
Se afora con agua bidestilada	1000	ml

2.- Stock de Antibióticos 100%

Estreptomicina	2.0	g
Unidades de Penicilina	2x10 ⁶	U
Agua bidestilada	200	ml

3.-Solución de Versano (EDTA):

EDTA	0.402	g
Cloruro de Calcio	16.0	g
Cloruro de Potasio	0.8	g
TRIS/Base	6.08	g
Rejo Fenol al .5%	4.0	ml

Aforar a 2000 ml. con agua bidestilada y ajustado el pH 7.4 esterilizar a presión

4.-Solución de Tripsina:

A 1000 ml. de la solución de Verseno agregar 2.5 g de Tripsina, e Esterilizar a presión

5.-Medio de Internalización:

Medio Mínimo Esencial de Eagle's	9.8	g
BES	25.0	mM
Albumina bovina	1.0	m/ml

Aforar a 1000 ml con agua bidestilada ajustando el pH a 6.8 a 7.2

6.-Solución Salina de Fosfatos (PBS)

Cloruro de Sodio,	150.0	mM
Cloruro de Potasio	8.0	mM
Fosfato monobásico de Sodio	80.0	mM
Cloruro de Calcio	0.9	mM
Cloruro de Magnesio	50.0	mM
Fosfato dibásico de Potasio	1.4	mM

El cloruro de calcio y de magnesio se preparan por separado en 100 ml cada uno ya que tienden a precipitar. Se ajusta pH 6.8 a 7.2

7.0.- Medio de Cultivo libre de Metionina:

Stock de aminoácidos	2x
Stock de leucina	20x
Stock de triptofano	40x
Stock sales	4x
Glucosa y glutatión	100x
Rojo de fenol	200x
Para amino benzoico	100x
Vitaminas Gibco	100x

B.-Preparación de Sustrato (MUG)

Disolver 10 mM de 4,metil umbeliferil β -d-glucurónido (MUG) en 200 mM de acetato de sodio pH 4.8. Los residuos de 4, metil umbeliferil (MU) libre que contaminan el sustrato, posteriormente este se eliminan, por decantación y burbujeo con nitrógeno y agitación a 4°C. Para determinar si ya esta libre de MU se leen los coeficientes de extinción antes y después de la extracción con cloroformo a 317 nm y 360 nm para cuantificar la presencia de MUG Y MU respectivamente

Moles MUG = Lectura 317 x Dilución

13,600

Moles MU = Lectura x Dilución

16, 720

Una vez eliminado el cloroformo se adiciona 1 mg/ml de albumina y se guarda a 0°C en alícuotas de 10 ml.

1.- Stock 4 metil Umbeliferona 20mM

4 metil umbeliferona	10.8	g
Etanol absoluto	0.5	ml
Agua bidestilada	50.0	ml

2.- Solución Amortiguadora Glicina - Carbonato pH 10:

Glicina	0.32	M
Carbonato	0.2	M
Se ajusta a pH 10		

B.- Purificación de la β -glucuronidasa

1.-Solución Amortiguadora de Tartratos pH 6.2

Tartrato de Sodio	0.825	M
EDTA	0.25	M
Cloruro de Sodio	0.15	M
Fosfato de Sodio	0.01	M
Azida de Sodio	0.02	%
Se ajusta a pH 6.2		

2.-Solución Amortiguadora Tris- Base

Tris base	0.05	M
Fosfato de Sodio Monobásico	0.01	M
Cloruro de Sodio	0.15	M
Acido de Sodio	0.2	M

Se ajusta a pH 6.8

3.-Solución Amortiguadora Tris-Base, Libre de Fosfatos

Tris - base 0.025 M

Cloruro Sodio 0.15 M

Ajusta a pH 6.8

4.- Solución Amortiguadora de Elución

Urea 6 M en solución amortiguadora A.

Todas las soluciones se ajustaron a sus respectivos
pHs usando Acido clorhídrico o hidróxido de sodio
concentrados

Tib. - METODOS:

A. - CULTIVOS CELULARES:

La línea celular fibroblastoide S-392, fué donada generosamente por el Dr. W.S. Sly de la Universidad de Washington U.,MO. Fué iniciada a partir de una biopsia de piel de un paciente con mucopolisacáridosis VII, que se caracteriza por ser deficiente para la síntesis de la enzima lisosomal β -glucuronidasa.

Los cultivos celulares fueron crecidos en frascos T₇₅, una vez confluentes se subcultivaron de la siguiente manera: se les retira el medio de cultivo, se enjuagaron con una solución quelante de EDTA (Verseno). Para desprender las células, se les adiciona tripsina al 0.25% durante 3 min. las células se resuspendieron con una pipeta Pasteur adicionándole medio de cultivo inmediatamente, para detener la acción de la tripsina. De cada frasco T₇₅ se prepararon 4 T₂₅.

Para realizar los experimentos de unión ó de internalización las células se crecen en las cajas de Petri de 35mm. De cada T₂₅ se prepararon 20 cajas de Petri, que en un lapso de 4 días estuvieran confluentes y listas para los experimentos requeridos. Tanto a las cajas como a los frascos de cultivo se les cambia el medio de cultivo cada tercer día y se mantienen en atmósfera húmeda y 5% de CO₂ a 37°C.

B.- ENSAYOS ENZIMATICOS:

La Actividad para la β -glucuronidasa se midi6 de acuerdo al procedimiento descrito por Glaser y cols (1973). A 25 microlitros de sustrato se le agregan 100 microlitros de MUG 10 mM, despu6s de 1 hora de incubaci6n a 37°C, la reacci6n se detiene al adicionar 1.9 ml de un amortiguador de glicina-carbonatos pH10. La cantidad de 4,metil umbeliferona liberada se midi6 en un espectofot6metro Aminco a 360 nm de excitaci6n y 480 nm de emisi6n.

Una unidad de actividad, es la cantidad de enzima que cataliza la liberaci6n de una nanomola de 4,metil-umbeliferona por hora. Como estandar se utiliz6 una soluci6n de 4,metil-umbeliferona al 10 nM.

La cuantificaci6n de la proteina fue hecha espectofotom6tricamente de acuerdo con el m6todo de Lowry (1951). Se us6 albumina de suero bovino como estandars.

La actividad especifica se determin6, dividiendo la actividad enzim6tica entre los miligramos de proteinas.

C.- EXPERIMENTOS DE INTERNACION:

La internaci6n de la enzima lisosomal β -glucuronidasa a fibroblastos humanos se determin6 siguiendo el m6todo de Kaplan y cols (1977). A los fibroblastos humanos de la linea S392, crecidos en cajas Petri de 35 mm se les retir6 el medio de cultivo y se les adicion6 1 ml de medio de internalizaci6n, conteniendo la β -glucuronidasa. Despu6s de la incubaci6n a 37°C, las cajas fueron colocadas en una capa

de hielo, lavadas 5 veces con 3 ml de PBS cada vez. Se les retiró completamente la solución amortiguadora y se les adicionó a cada caja 0.5 ml de deoxicolato de sodio al 1%. Después de 20 min. a 4°C, el lisado celular que se obtuvo se recuperó con pipeta Pasteur y se transfirió a tubos previamente marcados. La cantidad de β -glucuronidasa asociada a las células, así como, la proteína celular se cuantificó tomando 25 microlitos del lisado celular.

La velocidad de internalización se expresa, como la cantidad de enzima asociada a las células por unidad de tiempo (Unidades de enzima/mg de proteína celular/hora de internación).

D.- EXPERIMENTOS DE UNIÓN A FIBROBLASTOS EN CULTIVO I

La unión de la β -glucuronidasa a fibroblastos humanos se determinó 7 a 14 días después que la capa de las células llegaron a confluencia. Los experimentos se llevaron a 4°C. Las cajas de Petri 35mm se pre-incubaron 15 min a 4°C en cuarto frío. El medio de cultivo se aspiró y las cajas fueron lavadas dos veces con 5 ml de PBS. A cada caja se le añadió 1 ml de medio de internalización conteniendo la β -glucuronidasa. Después de 2 hrs de incubación a 4°C, las cajas fueron lavadas 5 veces con 5 ml de PBS frío y drenadas completamente. La cantidad de β -glucuronidasa y de proteína asociada a las células, se cuantificó en el lisado celular obtenido al agregar 0.5 ml de deoxicolato de sodio al 1 %.

La cantidad de enzima asociada a las células se expresa en unidades de enzima por mg de proteína celular.

F.- EXPERIMENTOS DE UNIÓN A LAS MEMBRANAS DE FIBROBLASTOS:

1.- Obtención de las membranas celulares

Se obtuvieron a partir de monocapas celulares confluentes crecidas en frascos T₂₅. Los frascos fueron puestos en hielo, se les retiró el medio de cultivo y se lavaron 3 veces con 10 ml de PBS, seguidamente se les adicionó 2 ml de medio de internación. Las células se rasparon con una espátula y se resuspendieron con una pipeta Pasteur. La suspensión celular, se transfirió a un tubo, se congeló 30 min a -20°C y se homogeneizó con un homogenizador Dounce hasta lisar más del 90% de las células. El lisado celular se centrifugó 10 min a 800 g y el sobrenadante nuevamente, se centrifugó a 12500 g durante 10 min. a 4°C. De cada frasco T₂₅ se obtuvieron alrededor de 800 microgramos de la proteína membranar.

2.- Unión a las membranas

Se siguió el método descrito por Fischer y Col (1980). Cada ensayo se llevó a cabo en tubos Eppendorf en un volumen final de 250 a 300 microlitos en medio de internalización pH 6.8 ó 7.2, conteniendo 50 microgramos de la proteína de membranas y la cantidad adecuada de β -glucuronidasa. Después de la incubación los tubos se mantuvieron en hielo, se centrifugaron en un microcentrifuga (Beckman) a 10,000 g por

10 min el residuo de las membranas se lava tres veces con 300 μ l de PBS por resedimentación en la centrifuga. El precipitado se resuspendió en 0.2 ml de deoxicolato al 1 %. La actividad enzimática y la concentración proteica se determinó en 40 μ l de lisado de las membranas. La β -glucuronidasa endógena se sustrajo de todos los valores para obtener la cantidad real de la enzima unida.

F. - EFECTO DE LA CICLOHEXIMIDA EN LA SINTESIS DE PROTEINAS:

Cultivos de fibroblastos humanos fueron incubados hasta 48 horas en presencia de 0.1 mM de cicloheximida. Bajo estas condiciones la viabilidad celular no se vió afectada la incorporación de Metionina S³⁵ (1 μ C) es inhibida en más de un 90%, una hora después de la adición de 0.1 mM de cicloheximida al medio de cultivo (González Noriega y cols. 1980).

G. - PREPARACION DE COLUMNAS DE AFINIDAD:

1.- Purificación de anticuerpos contra β -glucuronidasas

Conejos de la línea White Swiss fueron inyectados subcutáneamente con 1 ml de β -glucuronidasa bovina comercial (1mg/ml) en adjuvante completo. Después de 15 días, se repitió la inyección pero con 1 ml de adjuvante incompleto conteniendo 1 mg/ml de β -glucuronidasa, después de otros 15 días se repitió esta inyección. Al cabo de 10 días se monitorio, por doble inmunodifusión, el título de anticuerpos contra la β -glucuronidasa bovina .

Las inmunoglobulinas se purificaron a partir de los sueros de los conejos con títulos más elevados, utilizando el método descrito por Fleischman (1967). A los sueros se les adicionó sulfato de amonio a una concentración final de 40% después de incubarse 1 hr a 4°C, se centrifugaron a 10,000rpm durante 30 min. El precipitado se disolvió en solución amortiguadora de fosfatos 20 mM pH 6.3 y se dializó 2 veces en esa misma solución amortiguadora. El material dializado fue clarificado por una centrifugación y cromatografiado en una columna de DEAE equilibrada con la misma solución amortiguadora.

2.- Preparación de las columnas de afinidad:

Las inmunoglobulinas purificadas se acoplaron a Sepharosa 4B, utilizando el método descrito por Cuatrecasas (1970). La proteína a acoplar se dializó toda la noche en solución amortiguadora de bicarbonatos (1M) pH 8 a 4°C. La sefarosa 4B activada se suspendió en una solución de ácido clorhídrico 1M durante 10 min, se filtró por decantación en un embudo (Buchner), se le retiró el ácido mediante lavados subsecuentes con agua destilada, se equilibró el pH 8 con solución amortiguadora de bicarbonatos 1M pH 8. Por cada 10 mg de proteína a acoplar se usó un gramo de resina. La sefarosa ya preparada y la proteína (inmunoglobulinas o β -glucuronidasa) se agitaron suavemente durante toda la noche a 4°C. Rutinariamente se absorbió un 90% de proteína, medida por absorción a 280 nm.

Para bloquear los grupos libres no acoplados de la resina, ésta se lavó con una solución amortiguadora de glicil glicina (50mM) pH 2.9, la resina se transfirió a una columna y se lavó durante toda la noche extensamente con solución amortiguadora Tris 50 mM cloruro de sodio 150 mM y fósforo de sodio 10 mM pH 6.8.

II. - DOBLE INMUNODIFUSION:

Se siguió el procedimiento descrito por Ouchterlony y Nilsson L (1978). Se prepararon cajas de Petri con geles de agar al 0.6% en solución salina de cloruro de sodio al 0.95% o en solución amortiguadora de fosfatos 40mM, cloruro de sodio al 0.95% o en solución amortiguadora de fosfatos 40mM, cloruro de sodio 150mM pH7.2. Al solidificarse se le hicieron orificios con un sacabocados haciendo una roseta (un orificio en medio y de 4 a 6 alrededor). En el orificio del centro se pone la enzima y alrededor los antisueros a las diferentes diluciones. Después de ser incubado toda la noche, el gel se lavó varias veces con PBS y agua desionizada, se secó y tiñó con azul negro naftol al 45%.

I. - PURIFICACION DE LAS ENZIMAS β -GLUCURONIDASA HUMANA Y BOVINA:

1.- Purificación de la β -glucuronidasa humana.

Fue parcialmente purificada siguiendo el método descrito por Brot y cols (1978). A cada gramo del tejido humano (biopsias de hígado o bazo) se le adicionó 5 ml. de solución

amortiguadora de tartratos, EDTA y fosfatos pH6.2. El tejido se homogenizó con un politrón a 4°C, se le añadió deoxicolato de sodio a una concentración final de 0.2%. Se agitó a 4°C por una hora, se filtró con gasa y se centrifugó a 12,000rpm durante 20 min. El sobrenadante se calentó una hora a 65°C se centrifugó a 12,000rpm durante 20 min. El sobrenadante se precipitó con 55% de sulfato de amonio dejando agitar una hora a 4°C. El residuo que se obtuvo al centrifugar a 12,000 rpm por 20 min se disolvió en solución amortiguadora de acetatos 25 mM pH 5 y se dializó 4 hrs contra la misma solución amortiguadora; después de lo cual se volvió a centrifugar 20 min a 12,000 rpm. El sobrenadante se dializó en contra de Tris 25 mM cloruro de sodio 150 mM y fosfatos de sodio 10 mM pH 6.8. Por último, se pasó a través de una columna de afinidad (de anticuerpos de conejo) anti β -glucuronidasa bovina acoplados a la sefarosa 4B. Después de lavar la columna con solución amortiguadora Tris. A el material que se adsorbió, se eluyó con la Urea 6M, se dializó en la solución amortiguadora anterior y se concentró en un Amicon.

2.- Purificación de la β -glucuronidasa bovina:

La purificación consiste básicamente de dos pasos a) Extracción y b) Adsorción.

a) Extracción: El tejido bovino se homogenizó con un politrón a 4°C en 5 ml de solución amortiguadora de tartratos 25 mM, EDTA 25mM, fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM pH 6.2, por cada gramo de tejido. Con el

fin de obtener una extracción completa el homogenado se incubó 1 hr a 4°C en presencia de 0.2% de deoxicolato de sodio. El homogenado se filtró a través de una doble gasa y se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 min. Al sobrenadante se le agregó sulfato de amonio a una concentración de 30% y se agitó 1 hr a 4°C. El precipitado obtenido se eliminó con una centrifugación a 10,000 rpm durante 30 min. El sobrenadante del 30% de sulfato de amonio se llevó a una concentración final del 45% de sulfato de amonio, se mantiene agitando 1hr a 4°C. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 10,000rpm por 30min, el precipitado se disolvió en una relación de 1/10 en solución amortiguadora Tris, cloruro de sodio, fósforo de sodio pH 6.8, se dializó dos veces contra esa solución amortiguadora para eliminar el exceso de sulfato. El homogenado se llevó a pH 5 con ácido acético y se dializó 4 hrs a 4° C en solución amortiguadora de acetatos 25 mM pH5. El precipitado ácido se eliminó por centrifugación a 10,000 rpm durante 30 min. El sobrenadante se llevó a pH 6.8 con Tris 1M, se dializó durante toda la noche, a temperatura ambiente con Tris cloruro de sodio en presencia de fosfatos o en ausencia de estos últimos según requiramos la enzima, con el componente fosforilado o con el nuevo marcador.

b) Adsorción. Para obtener la enzima semipurificada el homogenado crudo del paso anterior se adsorbió en una columna de inmunoglobulina de conejo dirigida en contra de la β -glucuronidasa bovina acoplada a la sefarosa 4B. Después

de lavar la columna con PBS, el material adsorbido se eluyó con Urea 6 M en solución amortiguadora Tris, fosfato pH 6.8. Las fracciones donde aparece la actividad de la enzima, se juntaron, se concentraron a presión en un Amicon con una membrana de poro XM 50, bajo una atmósfera de nitrógeno a 75psi. Se dializaron para eliminar la urea y se guardaron en pequeñas fracciones de 1 a 3 ml, manteniéndose congeladas a -70°C .

El grado de pureza de la enzima se determinó por la actividad específica como se muestra en la tabla 1 y por geles de acrilamida al 10 % en SDS y por una doble inmunodifusión fig 3.

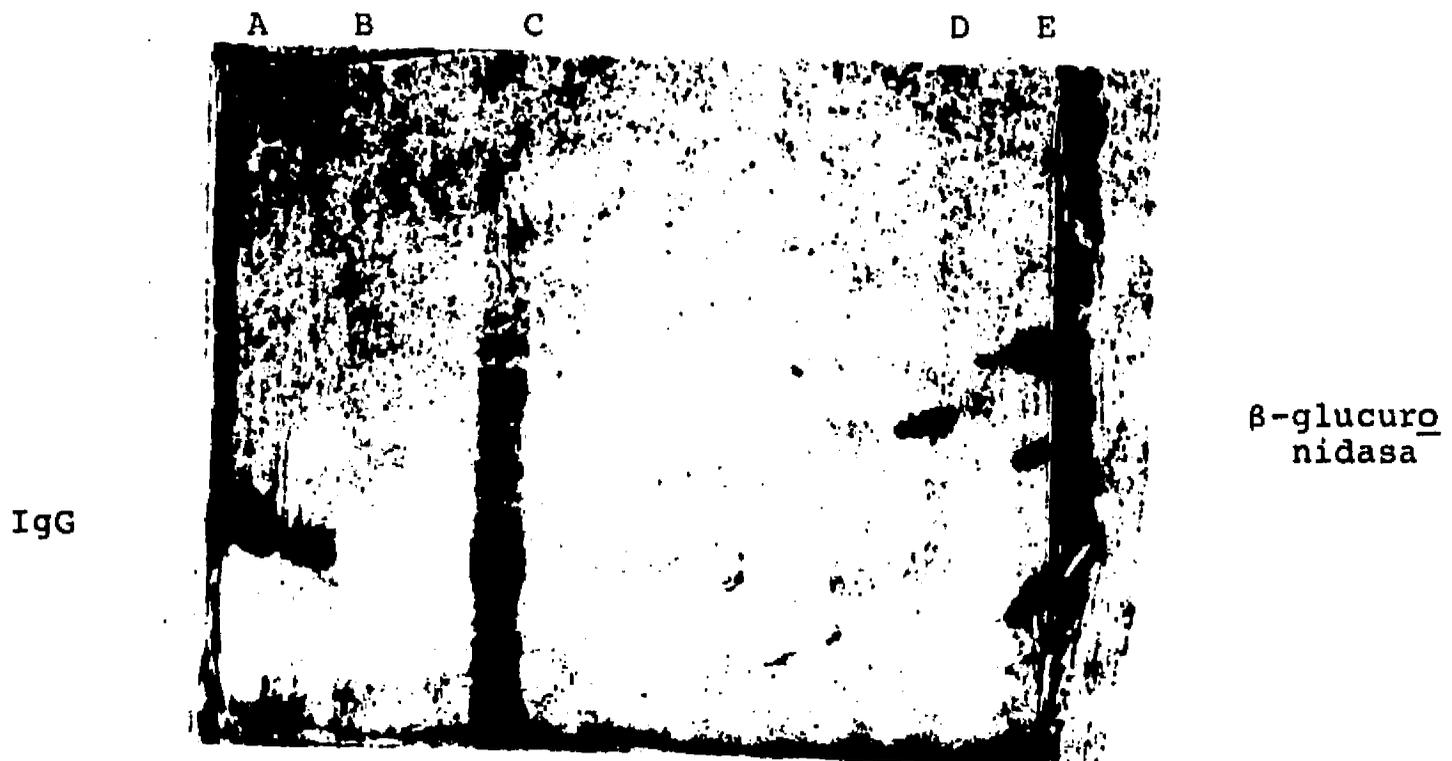


Fig. 3. a) Gel de SDS al 10%, en el que se muestra la pureza de la enzima (β -glucuronidasa) bovina, así como de los anticuerpos. En la casilla A y B se eluyeron anticuerpos de conejos purificados contra β -glucuronidasa a dos concentraciones 30 y 15 μ gr/ml. En la casilla C, se observa la elución del homogenado hepático antes de pasar por la columna de afinidad 50 gr/ml. En la casilla D es β -glucuronidasa semipurificada 10 μ gr/ml y la casilla E con 25 gr de elución del standar de proteínas.

b) Doble inmunodifusión de β -glucuronidasa semipurificada, -- contra suero de conejos inmunizados contra ella. Se observa solo una banda de identidad.

III. RESULTADOS:

A. - Purificación de la β -glucuronidasa bovina:

Se han descrito varios métodos para purificar la β -glucuronidasa de hígado bovino (Bernfeld 1953, Plapp 1966 y Himeno Masuru 1974); sin embargo, son largos y tediosos y al final se obtiene un bajo rendimiento, alrededor del 12%. En estos procedimientos se incluye una digestión de 10 días en ausencia de inhibidores de proteasas, que bien puede destruir grupos funcionales de la enzima de nuestro interés. Así mismo, esta enzima semipurificada se puede obtener comercialmente, pero dado que es una enzima inestable, su actividad varía de lote a lote. Por esta razón, nos vimos en la necesidad de modificar el protocolo descrito por Plapp y col (1966), preparando una columna de afinidad con los anticuerpos dirigidos en contra de la β -glucuronidasa (Harris 1973). Para ello, se generaron anticuerpos contra la β -glucuronidasa del hígado bovino obtenida comercialmente, como se describió en material y métodos. Las inmunoglobulinas de conejo obtenidas en contra de la enzima, se purificaron por precipitación con sulfato de amonio y una columna de intercambio iónico (DEAE), seguido de lo cual se adsorbió el anticuerpo a una columna de sefarosa acoplada a la β -glucuronidasa. Con el anticuerpo así obtenido solo se obtuvo una banda de precipitación en contra de la β -glucuronidasa bovina. Los anticuerpos así purificados se

acoplaron a sefarosa 4B según el método de Cuatrecasas (1974).

La purificación incluyó básicamente tres pasos: a) precipitación con sulfato de amonio, b) choque ácido y c) adsorción. En la tabla 1 se muestran los resultados de una purificación de la enzima.

El tejido bovino (hígado o bazo) una vez limpio se guardo en fragmentos a -20°C sin que la actividad de la enzima se pierda. En el día de la purificación, el tejido se descongeló y homogenizó en presencia de inhibidores de las proteasas y de un detergente que facilitó la extracción de la enzima. El tejido se filtro y centrifugó, bajo estas condiciones de extracción, rutinariamente se obtienen 360,000 unidades de enzima/g de tejido.

a) Precipitación con el sulfato de amonio.-

El sobrenadante de la centrifugación se llevó a 30% de sulfato de amonio, se deja equilibrar 1 hr a 4°C agitando, el precipitado formado se elimina centrifugando y el sobrenadante nuevamente se le adicionó sulfato de amonio a una concentración final del 45% se agitó 1 hr. a 4°C , el residuo formado se solubilizó y dializó en solución amortiguadora Tris pH 6.8 con dos cambios, en este paso se obtiene una recuperación del 68% y la enzima se purificó 2.75 veces.

TABLA I

PURIFICACION DE LA B-GLUCURONIDASA DE HIGADO BOVINO

Paso de la purificación	Mgr. totales	Unidades totales $\times 10^{-3}$	*U/mgr	Porcentaje de recuperación	Veces de purificación
Extracto crudo	68,400	24.3	356	--	1
Sulfato de amonio	16,900	16.43	978	68%	2.75
Choque ácido	6,400	14.57	2,277	60	6.4
Autodigestión	5,920	13.73	2,319	56	6.5
Columna de afinidad	43.2	10.8	25,000	44	389

* U Unidades

h) Choque ácido.-

El pellet ya dializado libre de sulfatos es llevado a pH 5 con ácido acético y se dializa 4 hr a 4°C contra una solución amortiguadora de acetatos pH 5.0, el precipitado formado se eliminó con una centrifugación y el sobrenadante se lleva a pH 6.8 con Tris 1M. Hasta aquí la enzima se purificó 6.4 veces. En este paso se recuperó cerca del 90% de la enzima.

En aquellos casos en que se necesitó obtener la β -glucuronidasa libre del marcador fosforilado, la preparación enzimática se incubó 18 hrs. a 25°C, como se indicó en Material y Métodos. No se detectó disminución de la actividad enzimática, ni cambios en el grado de pureza de la enzima .

c) Adsorción.-

El homogenado crudo semipurificado se pasó a través de una columna de afinidad sefarosa IgG dirigida contra β -glucuronidasa bovina, la columna se lavó con una solución amortiguadora de Tris, pH 6.8 hasta obtener una densidad óptica a 280 nm igual a la de la solución amortiguadora. Posteriormente, la β -glucuronidasa se eluyó con 6 M Urea, las fracciones que contienen la enzima se juntaron y se concentraron en un Amicon con una membrana 50X.

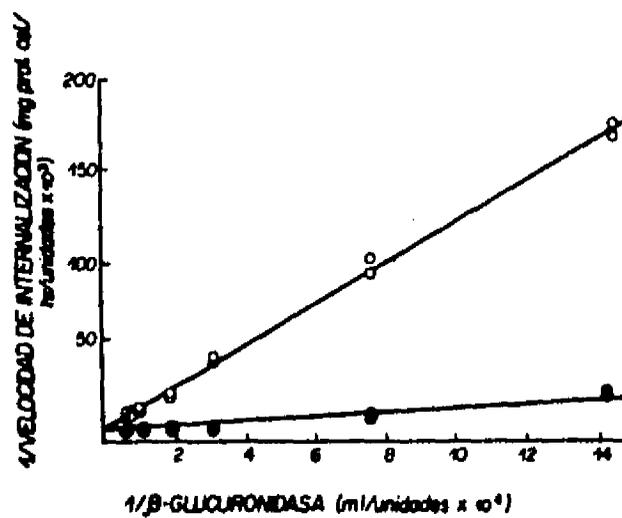
Con este procedimiento hemos purificado a la enzima alrededor de un 10% tomando como máxima actividad específica 3×10^4 con una recuperación de un 40 a 60%. Dado que los

estudios de internación de la β -glucuronidasa se determinaron por medio de la actividad enzimática no se requirió de un 100% de pureza de la enzima.

B.- Condiciones para la pérdida del residuo fosforilado (Man-6-P) en la enzima de β -glucuronidasa bovina:

La internación de enzimas lisosomales a los fibroblastos en cultivo requiere de la presencia de un residuo de Man-6-P en la enzima y de un receptor específico presente en la superficie celular. Una excepción a esta regla ha sido la internación de la β -glucuronidasa del hígado bovino, la cual es endocitada por los fibroblastos humanos en cultivo por un sistema que no requiere la presencia del marcador fosforilado (Heiber y Jourdain 1976). Sin embargo, en contraposición a lo reportado por Heiber y col., en el laboratorio (Coutiño y González-Noriega 1984), encontramos, que la internación de la β -glucuronidasa proveniente del hígado o del bazo bovino podía ser inhibida alrededor de un 30% por Man-6-P. Por otra parte, en experimentos de saturación se observó, la existencia de dos pendientes en las gráficas de doble recíprocas, una de las cuales desaparece cuando la internación de la enzima a fibroblastos es inhibida por Man-6-P (Fig 4) cuando el marcador fosforilado de la enzima es hidrolizado, con la fosfatasa o las endoglicosidasas H y la F (tabla 2). Estos resultados sugieren que la β -glucuronidasa bovina puede ser captada por fibroblastos

A.



B.

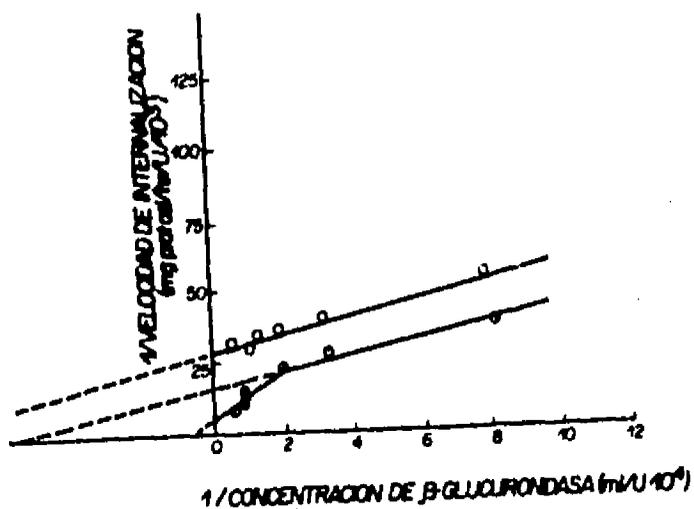


FIG. 4. DOBLE RECIPROCA DE LA INHIBICION POR MANOSA-6 P DE LA INTERNACION DE LA β -GLUCURONIDASA HUMANA Y BOVINA A FIBROBLASTOS HUMANOS.

Inhibición de la endocitosis de β -glucuronidasa de bazo humano y bovino por Manosa-6-fosfato. Fibroblastos humanos deficientes para β -glucuronidasa fueron incubados 2 hs a 37°C en presencia de concentraciones crecientes de β -glucuronidasa humana (A) o bovina (B) en presencia (O) o ausencia de ●, \emptyset) de 10 mM de Man-6P.

EFFECTO DE LAS ENDOGLICOSIDASAS (H, F y D) Y DE LA FOSFATASA EN LA INTERNACION DE LA β -GLUCURONIDASA DE BAZO BOVINA Y HUMANA EN LOS FIBROBLASTOS HUMANOS

β -glucuronidasa pre-tratamiento de la		Internación (% control)	
		- Man 6 P	+ Man 6 P
A. Bovina	sin tratamiento	100	77
	ENDO H	78	77
	ENDO F	85	79
	ENDO D	100	77
	Fosfatasa	82	78
B. Humana	sin tratamiento	100	25
	ENDO H	5	2
	ENDO F	3	9
	ENDO D	100	13
	Fosfatasa	5	2

TABLA 2. Fueron preincubadas las enzimas lisosomales con Buffers controles, con endoglicosidasa H, F y D, o con fosfatasa ácida como se describe en (González Coutiño R., Savaedra V. y Barrera, R. (in press). Cultivos de fibroblastos humanos deficientes en glucuronidasa, fueron expuestos a 5000U de la enzima lisosomal, en presencia o ausencia de 10 mM Man 6P, después de incubarse 2 hrs. a 37°C; los cultivos se lavaron con PBS 2 veces y se les adiciono 500 ul de Deoxicolato de sodio (se determino enzima asociada a las células).

humanos mediante dos sistemas: uno, el clásico que involucra el marcador fosforilado y otro no fosforilado.

Ya que nuestro interés es caracterizar este nuevo sistema de internación y con el fin de evitar curvas cinéticas heterogéneas, debido a que, la enzima puede ser endocitada por dos rutas diferentes; decidimos eliminar en la enzima bovina el marcador fosforilado. Además, se utilizó enzima humana conteniendo el marcador fosforilado para comparar las características de uno y otro sistema.

Dado que la utilización de enzimas como la fosfatasa, y la endoglicosidasa H, la endoglicosidasa C, la endoglicosidasa F resulta ser bastante costosa para eliminar el residuo fosforilado (tabla 2) se ponderó otra posibilidad, que nos permitiera obtener en forma rápida y económica enzima bovina carente del componente fosforilado. Heiber y cols (1976) utilizaron una enzima β -glucuronidasa bovina, purificada por el método de Plapp 1966, en el que incluye una digestión del homogenado crudo, en sus resultados, no encontraron la doble pendiente que nosotros observamos, ya que sólo demuestran una vía de internación que no requiere del marcador de Man-6-P. Esto nos sugirió que la falta del marcador fosforilado, que ellos no reportaron, se debía a que las fosfatasas presentes en el tejido, hidrolizan la unión monoéster del fosfato unido, a la manosa. Aprovechando esta observación decidimos incluir un paso de digestión, menos severo, con el fin de eliminar el marcador fosforilado, para lo cual era importante que nuestras

condiciones de digestión se llevarán a cabo en una solución amortiguadora libre de fosfatos.

1.) Efecto del pH en la Digestión:

Se utilizó la preparación que se obtiene después del choque ácido, en la purificación de la β -glucuronidasa bovina. Alicuotas de la preparación se incubaron a diferentes pHs, en ausencia de fosfatos, durante 18 h., al cabo de las cuales se llevaron a pH 6.3 con solución amortiguadora A Tris/fosfato. En la tabla 3 podemos observar que: la internación de la enzima es mayor cuando se preincubó a pH 6 o 6.8, y que la Man-6-P inhibió en mayor grado la internación de la enzima que ha sido digerida a pHs ácidos, sugiriendo que a pHs ácidos podría existir una actividad que hidrolice preferencialmente el nuevo marcador de internación, razón por la cual observamos un incremento en el efecto inhibitorio de la Man-6-P sobre la internación de la enzima. Por el contrario, existe otra actividad cuyo pH óptimo es cercano a 6.8 y que tiene la capacidad de degradar al marcador fosforilado.

2) Efecto del Grado de Pureza de la Enzima en la Digestión:

Se trató de determinar cual es el mejor paso durante la purificación de la enzima para llevar a cabo la digestión del marcador fosforilado. Para ello se digirió la enzima obtenida después de la precipitación con sulfato de amonio y choque ácido, o bien enzima semipurificada después de haber

CONDICIONES PARA LA PERDIDA DEL RESIDUO Man-6P EN LA β -GLUCURONIDASA

Preincubación

pH	(U/mgr de protefna celular/ h)		% de inhibición
	- Manosa 6PO ₄	+ Manosa 6PO ₄	
4.5	37	14	63
5.0	47	23.5	52
5.5	62.4	49	22
6	109	95	13
6.8	138	139	0
Control pH 6.8	183	129	31

TABLA 3. Se preincuba la β -glucuronidasa 19 hs. a 25°C en buffer - Tris 50 mM, NaCl 150 mM en relación 1 a 1 con buffer de citratos -- 100 mM y MgCl 12 mM a diferentes pHs se centrifugó para eliminar el precipitado formado.

Los fibroblastos humanos se incubaron con esta β -glucuronidasa 5,000 U/ml durante 2 hrs.

sidn pasada por la columna de afinidad . Los resultados se reportan en la tabla 4, donde se observa que no ocurre digestión del residuo fosforilado en la preparación enzimática más pura ya que la internación aún se ve inhibida un 30% en presencia de Man-6-P. Por el contrario, si la digestión se efectúa en un paso anterior de la purificación no se observa inhibición por Man-6-P, sugiriendo que el marcador fosforilado se ha hidrolizado.

Por otra parte, en la tabla 4 también, se observó una menor capacidad de internación de la enzima más cruda, posiblemente debido a la presencia de competidores endógenos de la internación, como lo sugiere el hecho de que la enzima incrementa su capacidad endocítica, después que la enzima autodigerida se adsorbe a la columna de afinidad, sin que se vea alterada la capacidad inhibitoria de la Man-6-P (resultados no presentados).

El método de digestión seleccionado para eliminar el componente fosforilado en la β -glucuronidasa bovina cumple los siguientes criterios: a) la enzima bovina no es degradada durante la digestión, es decir la actividad catalítica no se modifica al pre-incubar la enzima a los diferentes pHs, b) la internalización se reduce en la misma proporción en que la Man-6-P inhibe la internación de la enzima nativa y c) no se observan dos pendientes cuando es graficada, la velocidad de internación dependiente de la concentración de enzima como recíproca de velocidad y sustrato.

PERDIDA DEL COMPONENTE FOSFORILADO DE LA β -GLUCURONIDASA
DE HIGADO BOVINO DESPUES DE LA AUTODIGESTION

CONDICION AUTODIGESTION GRADO DE PUREZA ENZIMATICA	T°C	INTERNALIZACION*	
		Control	MAN-6-P
1. Sulfato de amonio	27°	24	24
2. Columna afinidad	27°	194	120

*(μ /mgr protefna celular/hr)

TABLA 4. La β -glucuronidasa de hígado bovino se auto digirió a pH 6.8 en buffer Tris libre de fosfatos durante 18 hrs. a 27°C bajo 2 condiciones: 1. Después del paso de sulfato de amonio y 2. Después de haber sido semipurificada por columna de afinidad. Posteriormente, se les determinó actividad endocítica por fibroblastos humanos en cultivo en presencia y ausencia de 10 mM manosa 6P se utilizaron 5,000 U/ml de la enzima.

C.-Endocitosis adsorptiva de la β -glucuronidasa bovina a fibroblastos humanos:

Una vez que se obtuvo β -glucuronidasa homogénea (libre del marcador Man-6-P), nuestro interés se enfocó a encontrar evidencias que mostrasen que efectivamente la enzima bovina conteniendo el nuevo marcador, es transportada al interior de la célula. Si el mecanismo de internación es mediado por un receptor (endocitosis adsorptiva), el proceso deberá ser: saturable, dependiente de tiempo y temperatura y específico. El estudio de las constantes de internación nos permitirá también, encontrar evidencias a favor o en contra de la existencia de receptores diferentes a los que reconocen el sistema fosforilado.

1.-Saturabilidad

Como se muestra en la fig. 4, la cantidad de la β -glucuronidasa que se asocia a fibroblastos en cultivo es proporcional a la cantidad de enzima en la que se añadió a los cultivos, obteniéndose una $K_{internacion}$ de $0.2 \times 10^{-7} M$ y una $V_{max internacion}$ de 9.25×10^{-13} Moles/mg/hr. Este sistema tiene una velocidad máxima de internación similar a la calculada para el receptor de Man-6-P, utilizado como ligando β -glucuronidasa, o α -induronidasa (8.9×10^{-13} Moles/mg/hr). Sin embargo, la K_m de internación es de un orden de magnitud menor a la reportada para la β -glucuronidasa humana que es endocitada por el receptor que

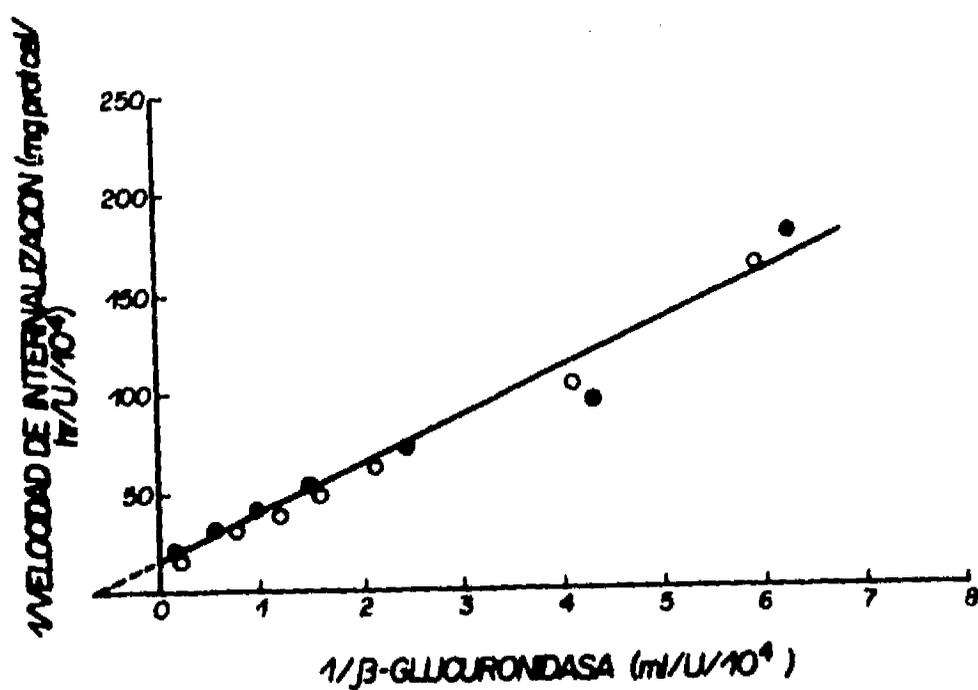


FIG. 4. DOBLE RECIPROCA DE LA INHIBICION POR LA MANOSA 6 P EN LA INTERNACION A LOS FIBROBLASTOS HUMANOS DE LA β -GLUCURONIDASA LIBRE DEL COMPONENTE FOSFORILADO.

Inhibición de la endocitosis de β -glucuronidasa bovina modificada por Manosa-6-fosfato, cultivos de fibroblastos humanos deficientes para β -glucuronidasa fueron incubados 2 hs a 37°C en presencia de cantidades crecientes de β -glucuronidasa bovina "modificada" como se describe en Material y Métodos en presencia (●) o ausencia de 10 mM de Man-6-fosfato.

reconoce al residuo de Man-6-P ($8 \times 10^{-9}M$) (Sando y Neufelf 1977, Rose y col 1979 y González N. y col 1980) pero similar a la reportada para enzimas lisosomales en las que la fracción conteniendo el marcador fosforilado ha sido enriquecida ($1-4 \times 10^{-9}M$).

2.- Tiempo y dependencia de Temperatura

Como se observa en la fig.5 la asociación de la β -glucuronidasa bovina es dependiente de temperatura. A $4^{\circ}C$ se observa un equilibrio después de 3 hrs; por el contrario, la cantidad de enzima que se asocia a las células a $37^{\circ}C$ es lineal por lo menos 5 hrs. aún en ausencia de síntesis de novo de receptores. La saturabilidad del sistema es dependiente de la cantidad del ligando así como la que se obtuvo a $4^{\circ}C$ sugiere la presencia de un número limitado de receptores en la superficie celular. Esta observación más el hecho de que la cantidad de enzima que se asoció a $37^{\circ}C$ durante 5 hrs. a la célula es 10 veces mayor que la que se asoció a $4^{\circ}C$ permitió asumir que la enzima bovina, conteniendo el nuevo marcador, es internada a la célula por un mecanismo de pinocitosis adsorptiva, en el que se puede involucrar un receptor. Es sabido que a $4^{\circ}C$ se inhibe todo proceso de endocitosis (Steinman y cols 1974, Silverstein y cols 1977, Goldstein 1979), por lo que la enzima asociada a fibroblastos debe estar unida a la membrana; a $37^{\circ}C$ la enzima asociada a la célula será la suma de la que se encuentra en la membrana más la que ha sido endocitada.

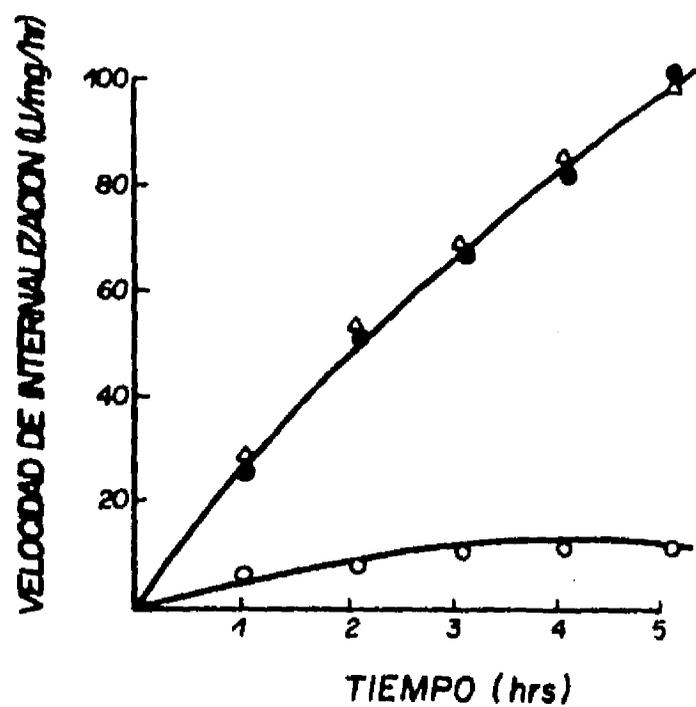


FIG. 5. CINETICA DE LA ASOCIACION DE LA β -GLUCURONIDASA BOVINA EN FUNCION DE LA TEMPERATURA A LOS FIBROBLASTOS HUMANOS.

Efecto de temperatura y cicloheximida en la cinética de asociación de β -glucuronidasa bovina a fibroblastos humanos en cultivo. Fibroblastos humanos deficientes de β -glucuronidasa se incubaron en presencia de 14,000 U de β -glucuronidasa bovina a 37°C (A, o) o a 4°C (O) en presencia (A) o ausencia (o,o) de 0.1 mM de cicloheximida.

3.- Especificidad

Como se mostró en la tabla 4 la velocidad con que la β -glucuronidasa bovina es internalizada, después de ser adsorbida en la columna de afinidad, se ve incrementada 8 veces. Este incremento se piensa sea debido a la presencia de un "inhibidor" de la internalización el cual no es adsorbido en la columna de afinidad. Es probable que este "inhibidor" sea un conjunto de otras enzimas lisosomales, ya que el material no adsorbido contiene β -glucosidasas, β -galactosidasas, α -manosidasas, etc. pero no actividad para β -glucuronidasa.

Al añadir cantidades crecientes de este inhibidor al medio de internalización, es posible reducir hasta un 95% la unión a 4°C de la β -glucuronidasa a fibroblastos (fig 6). Esta mezcla proteica, tratada exhaustivamente con pronasa, actúa como inhibidor competitivo de la internalización de la β -glucuronidasa (fig 7). Aunque la naturaleza de este inhibidor aún se desconoce, su presencia indica una cierta especificidad del receptor.

4.- Dependencia de Iones

La presencia de Ca^{++} parece ser un requisito común para el reconocimiento de los residuos glicósidos (presentes en glicoproteínas séricas) por los receptores de la membrana; una excepción a esta regla es la unión del marcador Man-6-P a su receptor, presente en las membranas plasmáticas. Como

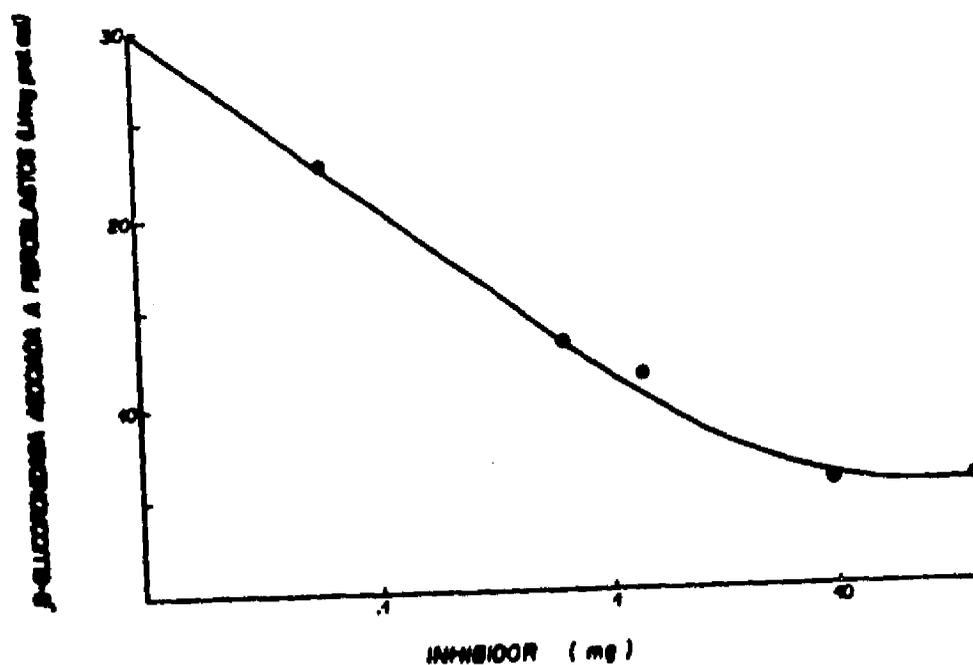


FIG. 6. UNION DE β -GLUCURONIDASA BOVINA A LOS FIBROBLASTOS HUMANOS EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE UN INHIBIDOR PROTEICO.

Inhibición de la asociación de β -glucuronidasa bovina a fibroblastos humanos en cultivo por una mezcla de glucoproteínas. Cultivos de fibroblastos humanos deficientes de β -glucuronidasa fueron incubados 2 h a 4°C en presencia de 5,000 U/ml β -glucuronidasa bovina y cantidades crecientes de una mezcla de glucoproteínas obtenida durante la purificación de la enzima bovina como se describe en la sección de Material y Métodos.

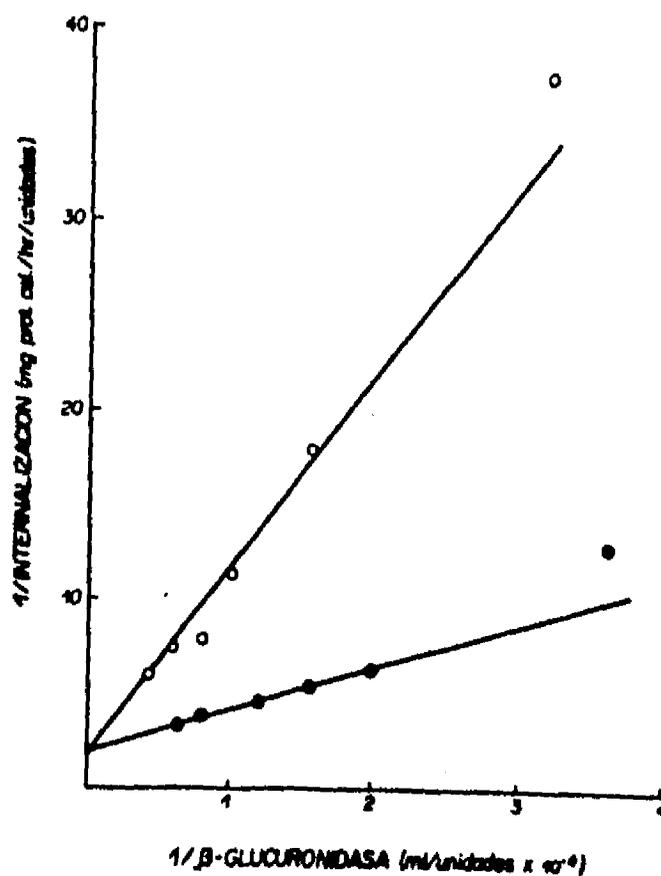


FIG. 7. EFECTO DE LOS GLICOPEPTIDOS EN LA INTERNACION DE LA β -GLUCURONIDASA BOVINA A LOS FIBROBLASTOS HUMANOS.

Los fibroblastos humanos de β -glucuronidasa bovina a diferentes concentraciones, se incubaron durante 2 h a 37°C en presencia (O) o ausencia (●) de una fracción de glicopéptidos obtenidos de la fracción inhibitoria durante la purificación.

EFFECTO DE EDTA EN LA VELOCIDAD DE INTERNACION DE LA
 β -GLUCURONIDASA HUMANA Y BOVINA A LOS
 FIBROBLASTOS HUMANOS EN CULTIVO

Porcentaje de internación		
EDTA	β -glucuronidasa bovina	β -glucuronidasa humana
	100%	100%
1 mM	45%	100%

TABLA 5. Se incubaron los fibroblastos humanos confluentes crecidos en cajas Petri de 35 m, con 5,000 U/ml de β -glucuronidasa humana o β -glucuronidasa bovina en presencia o ausencia de 1 mM de EDTA durante 2 hs. a 37°C - en medio de internación pH 6.8. Transcurrido el tiempo, se retiró el medio y se lavaron 3 veces - con PBS pH 6.8, se les adicionó 500 μ l de Deoxicolato de sodio al 1%; se determinó cantidad de - enzima asociada en las células.

EFFECTO DEL EDTA 1 mM EN LA UNION (4°C) DE LA
 β -GLUCURONIDASA BOVINA A FIBROBLASTOS

	% de la unión pH 6.8	pH 7.1
a) Fibroblasto	42%	60%
b) Membranas	50%	60%

TABLA 6. a) Los fibroblastos humanos con--
 fluentes crecidos en caja Petri de
 35 mM se preincubaron 15 min a 4°C;
 posteriormente, en presencia de 5,000 unidades
 de β -glucuronidasa bovina en 1 ml de medio de
 internación frío a pH 6.8 ó pH 7.1. Al cabo de
 2 hr. a 4°C se les retiró el medio, y se la--
 van 5 veces con PBS a pH 6.8 y pH 7.1 a 4°C. -
 La enzima asociada a fibroblastos se determinó
 en las células lisadas con 0.5 ml de DOC 1%. -
 b) 50 μ g de proteína membranar se incubó en --
 presencia de 5,000 U/ml β -glucuronidasa bovina
 a pH 6.8 ó 7.1. Al cabo de 2 hr. las membra--
 nas se lavaron dos veces con PBS, se centrfu--
 garon a 10,000 rpm. La β -glucuronidasa asocia--
 da a las membranas se determinó en el precipi--
 tado resuspendido en 250 μ l de DOC 1%.

se muestra en la tabla 5, 1mM de EDTA reduce en un 55% la internación de la enzima bovina, pero no de la humana, la cual contiene el marcador Man-6-P. Esta observación pudo ser corroborada, al estudiar la unión de la β -glucuronidasa bovina a cultivos a 4°C, o bien cuando la unión se realizó en una preparación de membranas de fibroblastos. El efecto del EDTA es ligeramente mayor cuando la unión se llevó a cabo a pHs ligeramente ácidos (tabla 6). Esta diferencia pudo deberse bien a una dependencia de pH en la unión o bien a una disociación incrementada del ligando a su receptor, o que a ese pH se favorezca el efecto quelante del EDTA sobre un ion en particular.

D.- Vida media del receptor:

Otro parámetro que es intrínseco a cada proteína es el recambio o vida media de la misma. El grupo del Dr. Sly (Creek y Sly 1982) ha medido la vida media del receptor, cuantificando la cantidad de proteína precipitable por anticuerpos en contra del receptor para el marcador de Man-6-P en extractos de células, en cultivos incubados en presencia de cicloheximida, llegando a la conclusión de que es de 27 hrs.

En nuestro caso hemos cuantificado el efecto de un inhibidor de síntesis de proteínas sobre la velocidad de la endocitosis, como un método indirecto para cuantificar la vida media de la capacidad funcional de endocitosis que el receptor posee. En la fig.8 se muestra el efecto de

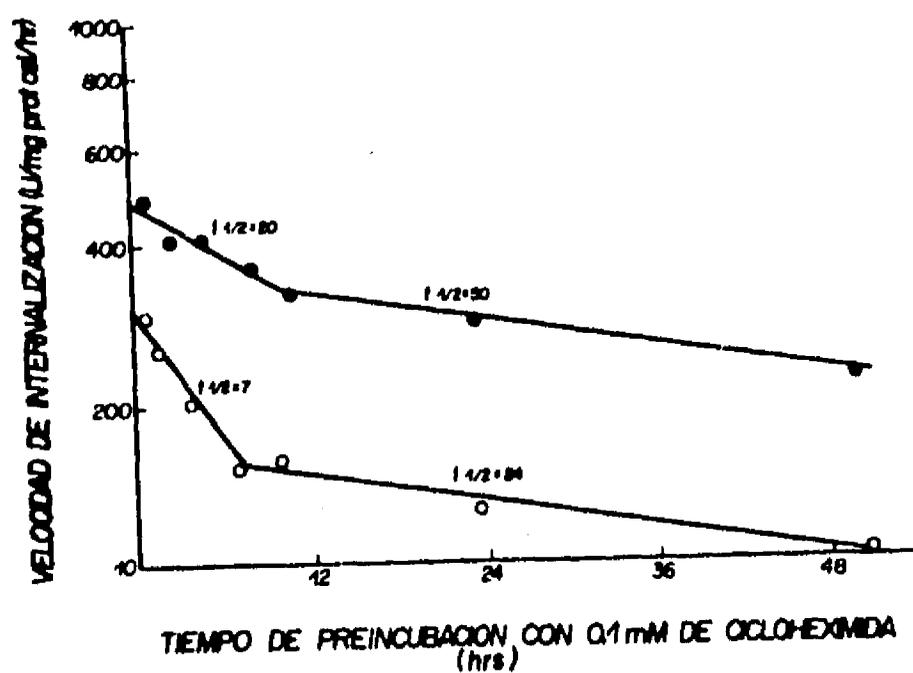


FIG. 8. VIDA MEDIA DE LOS RECEPTORES INVOLUCRADOS EN LA INTERNALIZACION DE LAS ENZIMAS LISOSOMALES HUMANA Y BOVINA.

Fueron pre-incubados los fibroblastos humanos con 0.1 mM de cicloheximida a diferentes intervalos de tiempo que van desde 0 a 50 hs. Al cabo de este tiempo, las cajas se incubaron 1 h a 37° en presencia de 14,000 U/ml de β -glucuronidasa bovina (●) o humana (○) y cicloheximida.

cicloheximida en la capacidad de internación de los receptores de nuestro interés (el de Man-6-P y el nuevo marcador) y utilizando en ambos casos concentraciones saturantes de enzima (14000 U/ml). Se encontró que en ambos casos hay una reducción de la velocidad de endocitosis y que ambos presentan dos pendientes, indicando la presencia de dos vidas medias la vida media del nuevo receptor es 2 a 3 veces más larga que para el receptor de Man-6-P (25 y 50 hrs), encontramos para el receptor de manosa dos vidas medias de 7 y 24 hrs. El hecho de encontrar dos pendientes y por consiguiente dos vidas medias y no una de 27 hrs. Posiblemente, como reporta Creek y Sly (1982) se deba a que su grupo trabajó la primera determinación después de 7 y 9 hrs., por lo que lograron ver la caída inicial.

E.-Efecto del anticuerpo contra el receptor Man-6-P en el transporte de enzimas lisosomales.

El receptor que reconoce el residuo fosforilado de Man-6-P en las hidrolasas ácidas ya ha sido purificado a partir de hígado bovino y condriosarcoma de ratón (Sahagain 1981, Steiner 1982). Han sido obtenidos anticuerpos policlonales en contra de él. Estos anticuerpos tienen la capacidad de inhibir la internación de la β -glucuronidasa humana cuando fibroblastos humanos en cultivo son preincubados en su presencia (Von Figura 1986, Creek y Sly 1982).

En la tabla 7 se observa que el anticuerpo dirigido en contra de él únicamente bloquea la internación de la enzima

INHIBICION DE LA INTERNACION DEL COMPONENTE DE LA MANOSA-6-P
CON EL ANTI RECEPTOR O LA MANOSA-6-P

	Inhibición de la internación (% del control)		
	IgG	Anti R.	Manosa 6 P
Enzima humana	72	23	22
Enzima bovina	100	108	123

TABLA 7. Los fibroblastos confluentes deficientes de β -glucuronidasa crecidos en caja Petri 35 mm fueron incubados con 2 ml. de medio de internación conteniendo IgG de conejo no inmunizado como control y IgG de conejo inmunizado contra el receptor para manosa 6P (215 MRP), durante 2 hs. a 37°C. Seguidamente, se retiró el medio, se lavaron y se les adicionó 5,000 unidades de β -glucuronidasa bovina o humana. A la mitad de las cajas de estos grupos se les adicionó simultáneamente 10 mM de manosa 6P, se incubaron a 37°C durante 2 hs., se lavaron 2 veces con PBS y se les adicionó 500 μ l de Deoxicolato de sodio al 1%, se determinó concentración de proteína y unidades enzima internalizada por hora.

humana en la misma magnitud (60%) que Man-6-P inhibe su internación. Por el contrario, ni el anticuerpo ni el azúcar fosforilado, tienen efecto alguno sobre la endocitosis de la β -glucuronidasa bovina.

Estos resultados junto, con los presentados anteriormente, sugieren que efectivamente en fibroblastos humanos hay dos tipos de receptores con diferentes propiedades involucrados en la endocitosis de hidrolasas acidas.

F.- Efecto de aminos en la velocidad de internación de la β -glucuronidasa:

Los resultados presentados sugieren fuertemente la existencia de dos sistemas diferentes para la internación de las enzimas lisosomales a fibroblastos humanos en cultivo, nuestro siguiente interés fue utilizar drogas del tipo de aminos primarias las cuales, pueden afectar o interrumpir el proceso de la pinocitosis a diversos niveles: a) alterando la internación del receptor mediante la modificación de la fluidez de la membrana como ocurre con los anestésicos locales (Maxfield 1979, Haigler y col 1979), b) retardando el tráfico interno de las vesículas mediante el uso del cloruro de amonio (Sando y Neufeld 1979, Tietze y col 1980, Maxfield 1982), o c) impidiendo el retorno de los receptores a la membrana al inhibir, intracelularmente, la disociación del complejo ligando-receptor mediante el uso de las aminos u otras drogas lisosomotróficas que incrementan el pH de las

vesículas intracelulares (Wibo y Pool 1974, González-Noriega y col 1980 Fred Van Leuven y col 1980, Merion y Sly W 1983, D'Arg Hart 1983).

De esta manera se posee un medio para averiguar si uno u otro sistema de pinocitosis se comportan de manera similar, una vez que han captado e internado la enzima lisosomal a la célula. Para estudiar el efecto de las aminos sobre la pinocitosis de la β -glucuronidasa conteniendo uno y otro marcador nos vimos obligados a incrementar el pH de 6.8 a 7.1, pH que hasta ahora habíamos utilizado en los experimentos de internación, dado que los experimentos reportados en la literatura sobre el efecto de aminos en la internación de la β -glucuronidasa humana han sido realizados a pH 7.4, que facilita la disociación y la entrada de las aminos. No se pudo utilizar ese pH a causa de la inestabilidad de la enzima bovina. En la tabla 8 se observa que el efecto inhibitorio de la cloroquina sobre la pinocitosis de β -glucuronidasa conteniendo el marcador fosforilado, se vió incrementado en función del pH, es decir, a pH 6.8 se obtuvo una inhibición de la internación cuando se añadió al cultivo celular 25 micromolar de cloroquina de 27% por el contrario, cuando el pH de internación fue de 7.1 se obtuvo un 60% de inhibición, similar a lo reportado por Gonzalez Noriega y col (1980).

Bajo estas condiciones de pH, se estudió el efecto de la concentración de cloroquina sobre la pinocitosis de la β -glucuronidasa, que es captada por la célula mediante uno y

EFFECTO DEL pH EN LA ACTIVIDAD DE LA CLOROQUINA SOBRE
LA INHIBICION DE LA INTERNACION DE LA β -GLUCURONIDASA
HUMANA Y BOVINA A LOS FIBROBLASTOS HUMANOS

β -glucuronidasa	% de Internación	
	pH 6.8	pH 7.1
Humana	76%	40%
Bovina	100%	100%

TABLA 8. Se incubaron los fibroblastos humanos con-
fluentes durante 2 hs. a 37°C con 5,000
U/ml de β -glucuronidasa bovina, o β -glu-
curonidasa humana, y en presencia de cloro-
quina 25 μ M, utilizando dos pHs en el medio de inter-
nalización pH 6.8 y pH 7.1.

otro sistema de endocitosis. En la fig.9 se puede observar que la internación de la β -glucuronidasa humana es inhibida en función de la concentración de cloroquina, alcanzándose una inhibición del 80% a 40 micromolar de cloroquina. Por el contrario, únicamente se observó un 10% de inhibición en la internación de la β -glucuronidasa bovina a concentraciones de aminas que han sido reportadas como tóxicas para la célula.

Esta diferencia en el efecto de la amina sobre uno y otro sistema de internación también se observa al variar el tiempo de exposición a la droga (fig 10). Después de 5 hrs. de exposición, la velocidad de internación de la enzima mediada por el nuevo sistema no se alteró; sin embargo, la velocidad de internación del sistema que reconoce en el residuo fosforilado disminuye considerablemente en función del tiempo de exposición a la droga (25 micromolar de cloroquina).

Casi todas las aminas utilizadas afectan la velocidad de internación de la β -glucuronidasa humana, con excepción de la espermidina (Tabla 9). Esta diferencia de actividad puede deberse a que la espermidina se comporta como base fuerte, dado que posee en su estructura varios grupos aminos, en cambio las otras aminas se comportan como bases débiles y dadas las condiciones de pH que estamos utilizando (pH 7.1) existe una baja disociación, suficiente para que sean captadas por las células y ejercer su efecto lisosomotrófico y modifiquen el pH de los lisosomas dada

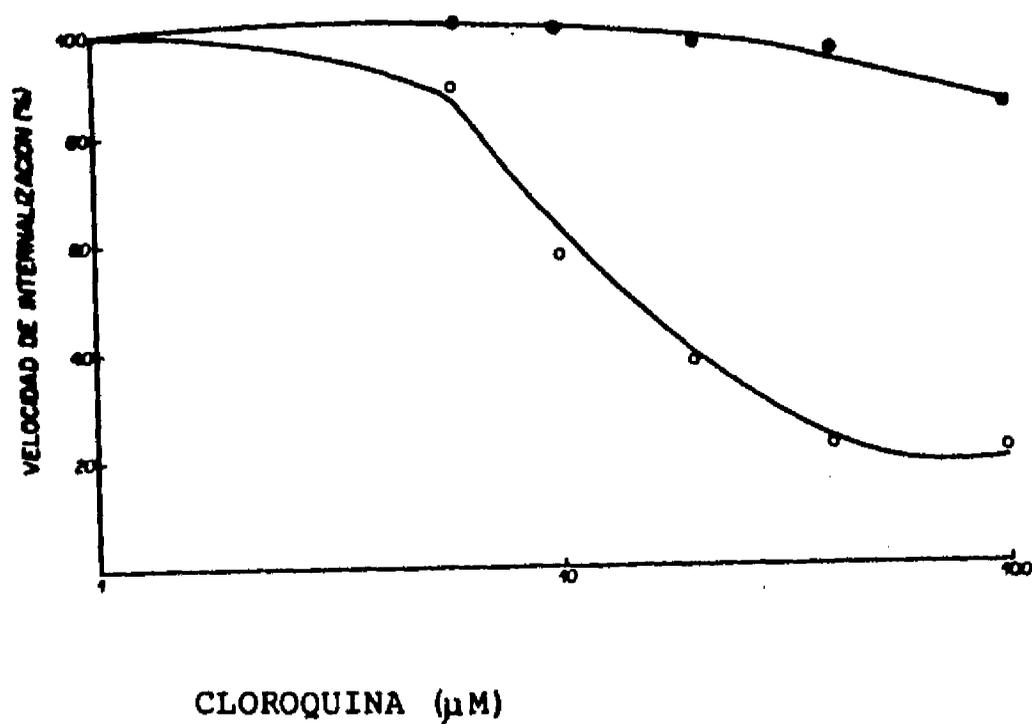


FIG. 9. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE LA CLOROQUINA EN LA INTERNACION DE β -GLUCURONIDASA HUMANA Y BOVINA A -- LOS FIBROBLASTOS HUMANOS.

Se incubaron los fibroblastos humanos 2 hs a 37°C - en presencia de 3000 U/ml de β glucuronidasa humana (○) o de glucuronidasa bovina (●) y diferentes concentraciones de cloroquina de 0 a 100 μM .

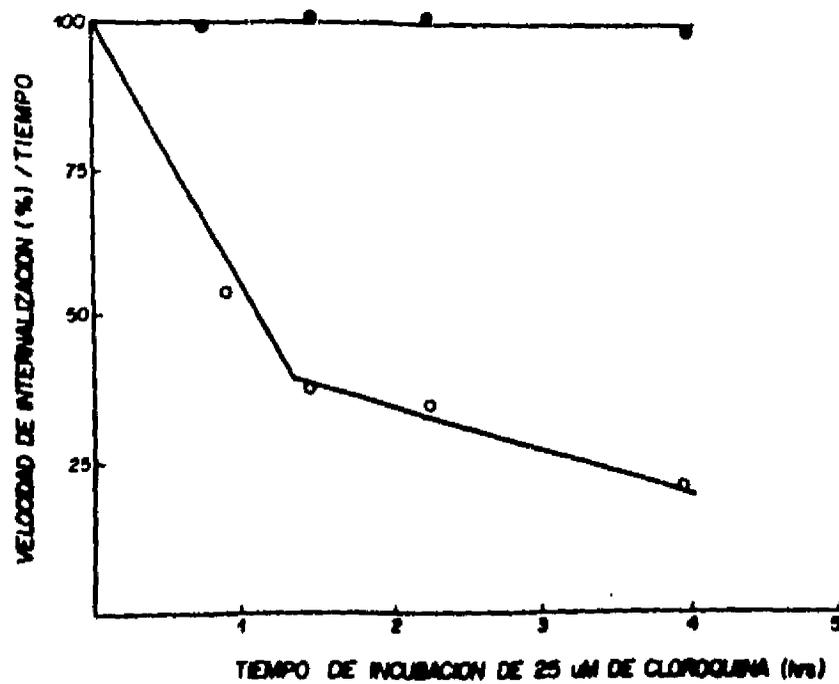


FIG. 10. EFECTO DE LA CLOROQUINA EN LA CINETICA DE INTERNA--
CION DE LA β -GLUCURONIDASA BOVINA Y HUMANA.

Se incubaron los fibroblastos humanos en presencia de 5000 U/ml de (O) β -glucuronidasa humana, (●) β -Glucuronidasa bovina y cloroquina (25 μ M), durante diferentes intervalos de tiempo a 37°C.

EFFECTO DE LAS AMINAS EN LA INTERNACION DE LA β -GLUCURONIDASA HUMANA Y BOVINA EN LOS FIBROBLASTOS HUMANOS

AMINA	REDUCCION DE LA INTERNALIZACION	
	β -glucuronidasa humana	β -glucuronidasa bovina
Cloroquina	25 μ M	70
NH ₄ Cl	10 mM	68
Espermidina	0.1 mM	36
Dansil Cadaverina	10 mM	27

TABLA 9. Se incubaron los fibroblastos humanos en presencia de 5,000 U/ml de β glucuronidasa humana ó -- bovina, y de 25 μ M de cloroquina, 10 mM de cloruro de amonio, 0.1 mM de espermidina ó 10 mM de Dansil cada-
verina durante 2 hs. a 37°C.

su tendencia a protonarse. En cambio, la internación de la β -glucuronidasa bovina no se modificó por el efecto de las aminos, sólo ligeramente por el cloruro de amonio en un 17% y por la dansil cadaverina 27%, sugiriendo un efecto a nivel de agrupamiento y transporte de receptores, y no lisosomotròfico. Este tipo de resultados sugiere que las aminos no tienen efecto en el tráfico ni en la reutilización de los receptores del nuevo componente a nivel de disociación, a causa de cambios de pH, como sucede para el transporte de la β -glucuronidasa humana.

G).-Unión y disociación de la β -glucuronidasa a membranas de fibroblastos humanos:

Al no poder contar con preparaciones de β -glucuronidasa pura, ni con un inhibidor específico que compita por la unión y que permita diferenciar la unión específica de la no específica nos vimos imposibilitados para realizar estudios relacionados con la reutilización del receptor y con la dependencia del pH en la unión. Sin embargo, la preparación de la enzima que utilizamos (10% de pureza), sí nos permitió realizar algunos estudios en relación con el efecto del pH en la disociación de la enzima unida a su receptor. La intención era comprobar si realmente la enzima no se disocia a pH ácidos y por consiguiente, la presencia de compuestos que alteran el pH intravesicular, no tiene por que afectar la internación de la enzima bovina, como es el caso de la enzima humana que contiene el marcador

EFECTO DE LA TEMPERATURA Y DEL TIEMPO EN LA
UNION DE LA β -GLUCURONIDASA (BOVINA) A LAS MEMBRANAS
DE LOS FIBROBLASTOS HUMANOS

Tiempo	Enzima asociada a membranas (U/mgr)		
	4° C	22° C	37° C
1 hr.	1892	2371	2040
2 hr.	N.D.	2290	N.D.
3 hr.	N.D.	2140	1900

TABLA 10. 50 gr de protefna de membranas de los fibroblastos humanos se incubaron en -- presencia de 3,000 U/300 μ l de β -glucuronidasa a diferentes temperaturas 4° C, 22° C y -- 37° C a pH 7.1, durante 1 a 3 hs. Inmediatamente las membranas se lavaron 2 veces con 1 ml de PBS pH 7.1 y se colectaron por recentrifugación a 10,000 g 10 min. La β -glucuronidasa asociada a las membranas se cuantificó en el precipitado resuspendido en 250 μ l de DOC 1%.

EFECTO DE LA TEMPERATURA Y DEL TIEMPO EN LA
DISOCIACION DE LA ENZIMA β -GLUCURONIDASA UNIDA
DURANTE 1 hr. A 22° C A MEMBRANAS DE LOS FIBROBLASTOS HUMANOS

Tiempo de disociación	% Enzima remanente asociada a membranas		
	Temperatura		
	4° C	22° C	37° C
0 hr.	100 %	100 %	100 %
1 hr.	70 %	89 %	70 %
2 hr.	68 %	84 %	65 %
3 hr.	--	65 %	--

TABLA 11. Se incubaron 50 ugr de proteína de las membranas en presencia de 3,000 U/ l de β -glucuronidasa bovina durante 1 hr. a 22° C; en 350 μ l de buffer de asociación a pH 7.1. Las membranas se lavaron 2 veces con PBS por recentrifugación a 10,000 g por 10 min. Seguidamente, las membranas se incubaron a diferentes temperaturas de 0 a 3 hr. en presencia del buffer de asociación. Al cabo de este tiempo las membranas se lavaron dos veces con PBS, se colectaron por centrifugación y el precipitado se disolvió con 250 μ l de DOC 1%.

fosforilado. Se llevaron a cabo algunos experimentos con el fin de obtener condiciones óptimas para la unión de la enzima bovina a membranas. Al estudiar la asociación de la enzima bovina a fibroblastos a 37° y a 4°C pudimos constatar que la unión no específica parece no ser importante, ya que no se pudo observar una diferencia notable entre la cantidad de enzima asociada a la célula a ambas temperaturas. Por otra parte, en experimentos de unión a membranas totales hemos encontrado que existen alrededor de 100 veces más sitios de unión de los que hemos podido cuantificar en la membrana plasmática en fibroblastos, lo cual sugiere, la existencia de una poza muy alta de receptores internos, (datos no reportados). Datos preliminares muestran que no hay diferencias significativas en la unión a 4°, 22° y 37°C (tabla 10). También al parecer, se llega a un equilibrio en una hora.

Al estudiar la disociación de la enzima bovina a pH 7.1 a 4°, 22° y 37°C encontramos que al cabo de una hora, únicamente se había disociado entre 15% y 30% de la enzima unida, dependiendo de la temperatura, lo que puede deberse a efectos de desnaturalización de la enzima, Esto sugiere que la unión es sumamente estable (Tabla 11). Por ello se procedió a estudiar el efecto del pH sobre la disociación. Como se puede ver en la fig. 11, se encontró que la unión es bastante estable y aparentemente no es dependiente de pH, ni del tiempo de disociación, como se demuestra en la fig.12, donde sólo en el rango de pH 6±0.5 se logró

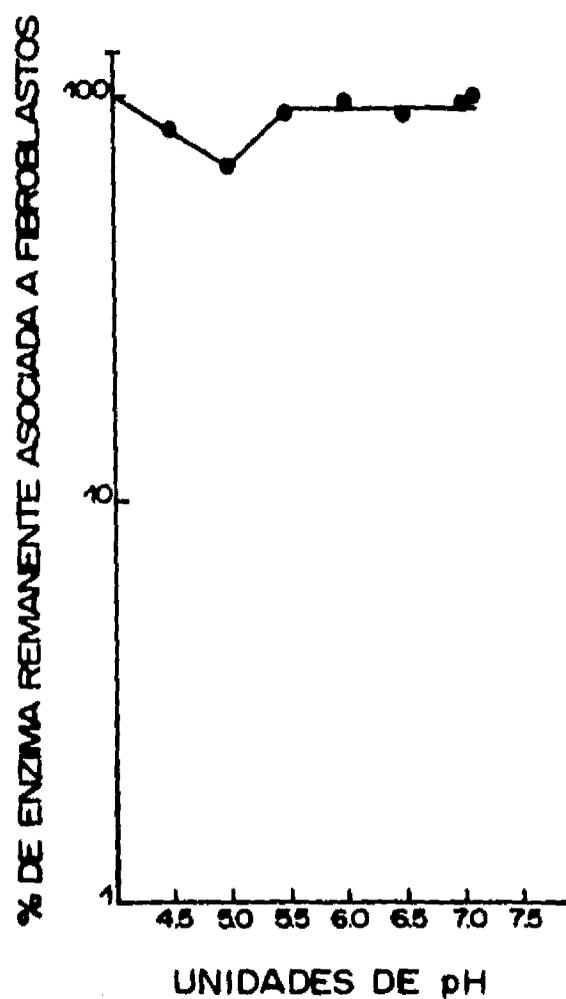


FIG. 11. EFECTO DE DIFERENTES pHs EN LA DISOCIACION DE LA ENZIMA BOVINA A LAS MEMBRANAS DE LOS FIBROBLASTOS HUMANOS EN CULTIVO

Fueron incubadas las membranas en suspensión (50 μ gr de proteína en 250 μ l de medio de internación. En presencia de β -glucuronidasa bovina (5,000 U/250 μ l a pH 7.1 durante 1 hr. a 22°C, transcurridos el tiempo, se centrifugan a 10,000 g para sedimentar las membranas, se lavaron 2 veces con PBS a pH 7.1, se suspendieron en 250 μ l de Buffer TRIS-Maleato 25 mM a justado a diferentes pH, se incubaron a 22°C durante 1 hr. Las membranas se sedimentaron a 10,000 g, se lavaron 2 veces con PBS por resedimentación, se les agregó 250 μ l de Deoxicolato al 1%, a cada tuvo se les determinó enzima remanente asociada a las membranas.

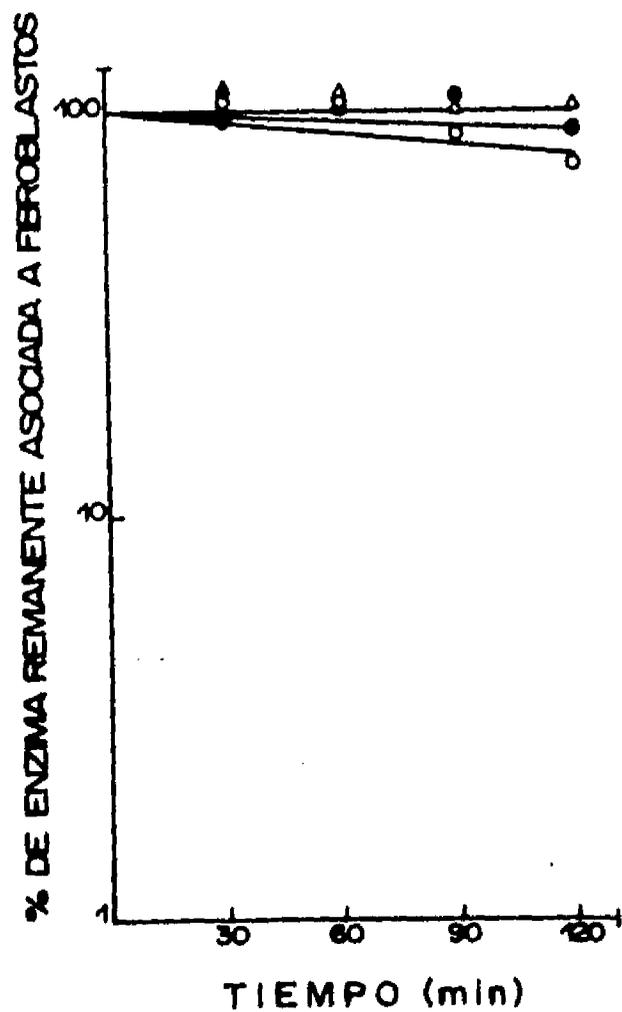


FIG. 12. CINETICA DE LA DISOCIACION DE LA ENZIMA BOVINA EN FUNCION DEL TIEMPO A DIFERENTES pHs.

Las membranas en suspensión (50 μ g protefina) fueron incubadas en presencia de 5,000 U de β -glucuronidasa en 250 μ l de medio de internación bovina en medio de internación a pH 7.1 durante 1 hr. a 22°C. Los tubos se sedimentaron a 10,000 g y se lavaron 2 veces con PBS pH 7.1 por resedimentación. El precipitado de las membranas se resuspendió en 250 μ l de Buffer Tris-maleato 25 mM ajustado a pH 5.0 (O) pH 6.8 (A) y pH 7.1 (O), se incubaron a 22°C a diferentes intervalos de tiempo 0, 30, 60, 90 y 120 min. Las membranas se lavaron 2 veces con PBS 7.1 y se sedimentaron a 10,000 g y se les adicionó 250 μ l de deoxicolato y se les determinó cantidad de enzima remanente asociada a las membranas.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

79

disociar alrededor de un 25%. Este rango de pH corresponde al de un compartimento prelisosomal, o de la región de Golgi, lo cual sugiere que la enzima internada podría ser transportada a través de este tipo de vesículas cuyo pH no es afectado por aminos.

Para finalizar, en la tabla 12 presentamos un resumen que compara las propiedades analizadas para los dos sistemas de internación; el ya conocido de Man-6-P, presente en la β -glucuronidasa humana y el que se caracterizó, en este trabajo, y que está presente en la β -glucuronidasa bovina. Estos datos confirman la presencia en fibroblastos humanos de dos sistemas de internación diferentes e independientes entre sí.

TABLA 12

PROPIEDADES DE LOS DOS SISTEMAS DE INTERNACION
PRESENTES EN LOS FIBROBLASTOS HUMANOS

PROPIEDADES	SISTEMAS	
	<u>Man 6 P</u>	<u>Nuevo</u>
A. Propiedades de la internación		
Km internación (M)	2.2×10^{-8}	2.2×10^{-9}
Vmax de (internación moles/mgr/h)	8.9×10^{-13}	9.25×10^{-13}
Vida media	7h/24h	25h/50h
Inhibidores competitivos		
Man-6-P 1 mM	95%	0%
Fructosa 16 di P 1 mM	75%	0%
Inhibición por aminas		
Cloroquina 25 μ M	36%	0%
NH ₄ Cl 20 mM	57%	0%
EDTA 1 mM	0%	48%
B. Propiedades del ligando		
Sensibilidad a fosfatasa	100%	0%
Sensibilidad a endoglico-- sidasas H	100%	0%
Sensibilidad a endoglico-- sidasas F	70%	0%
Sensibilidad a endoglico-- sidasas D	0%	0%
Sensibilidad a Periodato	100%	40%
pH autodigestión	6.8	5.50
Sensibilidad a 1 mM de EDTA	N.D.	50%
pH de disociación	4.8 (90%)	5.0 (25%)

IV. - DISCUSION

En los últimos años se ha encontrado que ciertas regiones de una proteína, pueden contener elementos informativos. Estos elementos pueden estar codificados en el gene estructural para cada proteína o bien en genes modificadores. En este caso el elemento informativo será incorporado postraduccionalmente. La función de este tipo de elementos topológicos es la de dar estabilidad a la molécula, permitir su maduración, su transporte intracelular, o su compartimentalización (Blobel 1979, Marx 1980, Sabatini y col 1982, Walter y col 1984, Tartakoff y Vassill 1983, Dunphy y Rothman J 1983, 1985). Como ya hemos señalado la existencia de determinantes topológicos como la señal líder, los péptidos glicosidables, los residuos glicosídicos y la señal de Man-6-P en las enzimas lisosomales, hacen pensar que los marcadores topológicos, conforman los diferentes dígitos de un código postal que permite a la célula conservar la estructura y la función de cada uno de los elementos que la componen.

La compartimentalización de una molécula, puede seguir dos tipos de rutas: una, en que la proteína una vez que ha sido sintetizada, se transporte directamente a su destino final, sin salir de la célula donde se sintetizó. La otra ruta, necesitaría que la molécula fuera excretada y posteriormente reconocida, por la misma o bien por otros tipos de células, endocitada y transportada a su destino

final, como sería el caso de las glicoproteínas séricas, inmunoglobulinas fetales (Rodewald 1981,1982). En ellas la presencia de residuos terminales como la galactosa, la manosa/N-acetil-glucosamina, actúan como determinantes topológicos para que sean retiradas de la circulación por los hepatocitos o las células de sistema retículo endotelial (Aswell y Morell 1971). En los mamíferos este tipo de señales permite, además, una interrelación celular (Roseman 1970).

Existen otros tipos de receptores que poseen igual función, pero su especificidad les permite identificar solamente a un número limitado de las proteínas, tal es el caso, para el receptor que reconoce residuos de la fucosa/galactosa presentes en la transferrina (Ashwell y Neufeld 1971). A ellos hay que añadir los que permiten la recaptura y el transporte transmural de las inmunoglobulinas (Rodewald 1981,1982), los que reconocen específicamente las hormonas (De Meytz 1970) etc.

En este trabajo de tesis, hemos iniciado la caracterización de un nuevo sistema de internación para las enzimas lisosomales presente en los fibroblastos humanos. Hemos hecho un estudio comparativo con el fin de encontrar semejanzas y diferencias entre éste sistema de pinocitosis (presente en la enzima bovina) y el que reconoce el residuo fosforilado de manosa (enzima humana). Pensamos que este tipo de estudios nos permitirán en el futuro, comprender que

opciones ofrece a las enzimas lisosomales, poseer dos tipos de señales para su transporte y su compartamentación.

Una de las primeras observaciones que nos llamó la atención es que la presencia de este marcador en la enzima lisosomal que estudiamos no es órgano específico, como había sido reportado por el grupo de Heiber y Jourdian (1976). Como hemos señalado, el nuevo marcador no solamente está presente en la β -glucuronidasa de hígado, sino también en la de bazo bovino.

Así también, al iniciar nuestros estudios: encontramos que la pinocitosis de ambas enzimas por los fibroblastos humanos sólo era inhibida un 30% por Man-6-P, lo cual nos sugirió, contrariamente a lo que se había reportado que la β -glucuronidasa puede ser endocitada vía dos receptores diferentes. Esto fue corroborado por las siguientes observaciones: a) la doble pendiente encontrada en las curvas de saturación expresadas en doble recíprocos y b) la desaparición de una de las pendientes, cuando la enzima es internalizada en presencia de la Man-6-P, o bien cuando la enzima es pre-incubada en presencia de las fosfatasas ácidas o alcalinas, las endoglicosidasas H₁. Previamente, ha sido reportado que el marcador de Man-6-P es sensible, no sólo a la acción de las fosfatasas y la endoglicosidasa H sino a la endoglicosidasa C₁, y no por la endoglicosidasa D. En cambio, el nuevo marcador resultó ser insensible a la acción de todas estas enzimas lo cual nos hace suponer que: a) no es un residuo fosforilado o b) no está presente en cadenas

de alta manosa, ni complejas. Por lo tanto, nos permite concluir que el ligando reconocido por uno y otro sistema de internación, se encuentra físicamente separado en la molécula, lo cual hace improbable que un mismo receptor, pueda reconocer dos ligandos diferentes en la misma región de la molécula, como ocurre para el receptor que reconoce los residuos de Manosa/N-acetil glucosamina; los cuales son contiguos en las cadenas complejas.

Con el fin de trabajar con una enzima que solo fuese captada por el nuevo sistema de internación, nos vimos precisados a quitar de la enzima el ligando para el receptor de Man-6-P. Así encontramos que una simple autodigestión a pH 6.8 destruye este grupo, posiblemente debido a la presencia de las fosfatasas en el homogenado. En las condiciones en que se realiza la autodigestión: a) la enzima no es hidrolizada, b) la velocidad de internación se reduce a la misma proporción en que la Man-6-P inhibe la β -glucuronidasa bovina conteniendo ambos marcadores, c) la Man-6-P no inhibe la internación de la enzima y por último d) al graficar la velocidad de endocitosis de la enzima a los fibroblastos en función de la concentración de la enzima únicamente se observó una sola pendiente. Lo cual nos permitió inferir que este tipo de tratamiento solo afecta al marcador fosforilado de manosa.

Las condiciones en que se purificó la enzima pensamos, son determinantes para preservar uno u otro ligando. Así se podría explicar el por qué, el grupo de Jourdan no

observó en la β -glucuronidasa bovina, el doble sistema de internación; y también, se podría explicar por qué el nuevo marcador no ha sido detectado en la β -glucuronidasa humana. Esta enzima es normalmente purificada a pH 5.5, condición en que encontramos se puede autodigerir el nuevo ligando.

Ahora bien, la internación de la enzima bovina homogénea en términos de su internación, es decir libre del componente fosforilado, sigue las propiedades de un sistema de endocitosis mediado por un receptor, es saturable, dependiente de tiempo y temperatura y es específico.

La Velocidad máxima de internación (9.25×10^{-13} M /mg/hr) es muy semejante a la reportada para la enzima que contiene el residuo fosforilado (8.9×10^{-13} M/mg/hr). La K_m de internación de 2.2×10^{-9} M es un orden de magnitud menor a la calculada para la enzima que contiene el marcador de Man-6-P (2.2×10^{-8} M), sugiriendo mayor afinidad del nuevo marcador. Sin embargo, se calcula que el contenido de moléculas conteniendo este marcador es del 10%, por lo que al obtenerse preparaciones enriquecidas la K_m de internalización se equipara a la que calculamos para el nuevo sistema de internación (1.4×10^{-9} M). Aún desconocemos que fracción de β -glucuronidasa bovina contiene el nuevo marcador.

Utilizando concentraciones saturantes de la enzima (14,000 U/ml) observamos que la asociación a 4°C es saturable y que a 37°C, aun en ausencia de síntesis de novo de proteínas, la internación se mantiene lineal, por lo

menos 5hr. Lo cual sugiere que la internación es dependiente de la temperatura y es necesaria una reposición de los receptores para mantener constante la velocidad de internación este tiempo.

La especificidad del nuevo marcador para el sistema de internación de la enzima bovina, comparado con el de Man-6-P, resultó no ser inhibible por una serie de azúcares, que se sabe participan en el reconocimiento de otros receptores como la galactosa, la fucosa, la manosa, la N-acetil glucosamina, la N-acetil galactosamina. Los azúcares fosforilados o sulfatados, tampoco tuvieron algún efecto en la internación de la enzima (González Noriega et al. manuscrito en preparación). Sin embargo, encontramos que la internación de la enzima puede ser inhibida competitivamente, por una fracción proteica, libre de la β -glucuronidasa. Esta fracción obtenida al adsorber la enzima en una columna de afinidad, durante su purificación, contiene diversas enzimas lisosomales lo cual nos indica, que la presencia de este marcador, no es exclusiva para la β -glucuronidasa. La capacidad inhibitoria, de esta fracción, se conserva en los glicopéptidos obtenidos al tratar esta fracción exhaustivamente con pronasa. En el Lab. del Dr. González han purificado el inhibidor a partir de esta fracción, y han encontrado que es una base parecida a una pirimidina (tiene 3 grupos aminos y un grupo ceto).

Este tipo de resultados nos sugirieron, que efectivamente en los fibroblastos humanos, existen dos

receptores diferentes para endocitar las enzimas lisosomales, por lo cual, estudiamos y comparamos otros tipos de parámetros con el fin de confirmar esta hipótesis:

a) Antigenicidad.- Al utilizar un anticuerpo contra el receptor de la Man-6-P (MRM 215k), la internación de la β -glucuronidasa humana es reducida en la misma proporción que la Man-6-P inhibe la internación de esta enzima. En cambio, la internación de la β -glucuronidasa bovina, no se vió alterada por la presencia del anticuerpo, ni por la Man-6-P. Lo cual sugiere que ambos receptores no contienen epítopes similares, por lo cual podemos suponer que ambas proteínas son diferentes.

b) Vida media.- Los dos receptores tanto el de Man-6-P como del nuevo marcador, presentaron dos vidas medias, para el primero fueron de 7.5 y 24 hrs, esta última es similar a la reportada por Dr Creek y Sly (1983) de 27 hrs; tal vez la primera no lograron determinarla debido a que sus primeras determinaciones fueron a las 7 y 9 hrs. En cambio, la vida media del receptor para el nuevo marcador fue de 25 y 30 hrs ,es decir, 2 y 3 veces más larga.

c) Dependencia de iones.- La unión del nuevo receptor a su ligando parece ser dependiente de iones, debido a que tanto la unión en los fibroblastos como en las membranas y la internación se vió inhibida alrededor de un 50% en presencia de EDTA 1mM. Esta inhibición fue más acentuada a pH 6.8 que a 7.1, debido quizá a que a ese pH 6.8, el EDTA

ejerza un poder quelante preferencialmente para un tipo de ión (Ca^{++} , Mg^{++} o Mn^{++}).

d) Efecto de las aminas.- Varios grupos han reportado que tanto las bases débiles (aminas primarias) como los ionóforos tienen un efecto inhibitorio sobre la velocidad de endocitosis mediada por receptores (Maxfiel 1979, Basu y col 1980, Van Leusen 1980). Este efecto se manifiesta a dos niveles diferentes: a) através de la inhibición del agrupamiento de receptores, debido a que algunas aminas actúan como los anestésicos locales a nivel de las membranas, alterando su fluidez, y por tanto el agrupamiento de los receptores (Maxfiel 1979, Davies y col 1980). A este respecto se ha especulado acerca del papel que juega la transglutaminasa (enzima sensible a las aminas) sobre el agrupamiento de los receptores (Davies y col. 1980, Levitzk y col 1980). b) inhibiendo el transporte interno, a este respecto se ha postulado que las aminas interfieren en la movilización de las vesículas endocíticas y en la función de estas vesículas con los lisosomas (Geisow 1982, Withe y col 1981, D'Arg Hart 1975, 1979, 1983, Merion y Sly 1983), o bien, al incrementar el pH intravesicular inhibiendo la disociación del complejo receptor ligando (Wibo y Poole 1974, Okumma 1978, González N y col 1980, Tietze Ch 1982). De una manera u otra el efecto neto de las aminas y de los ionóforos, sería retardar la reaparición de receptores libres a nivel de la membrana plasmática .

d) Efecto del pH en la disociación de la enzima bovina.- Los resultados presentados, aunque preliminares sugieren que la disociación de la β -glucuronidasa conteniendo el nuevo marcador no es dependiente de pH. Ello contrasta con las observaciones publicadas por González-Noriega y col (1980) y Fischer y col (1980). Donde muestran que la disociación de las enzimas lisosomales conteniendo el marcador fosforilado, es fuertemente dependiente de pH, siendo prácticamente nula a pH's neutros y rápida al pH de los lisosomas (pH 5), cerca del 90% se disocia.

Esta observación concuerda con los datos obtenidos del efecto de las aminos en el sistema de la enzima humana, pero no con el nuevo sistema de internación. Las aminos incrementan el pH de las vesículas acidicas desde 4.8 hasta 6.5 por lo tanto inhiben la disociación del complejo receptor-ligando (Wibo y Pool 1974). El receptor, al no poder quedar libre no puede regresar a la membrana plásmatica. Aparentemente este no es el caso para el nuevo sistema de internación. Por lo cual debemos asumir que la enzima endocitada por este nuevo sistema : a) viaja a través de vesículas prelisosomales acidicas, pero la disociación no es dependiente de pH, b) viaja a través de vesículas altamente resistentes al efecto de las aminos o c) no es necesario que haya una disociación del complejo receptor ligando, y por tanto no es necesario un reciclamiento del mismo puesto que existe una poza intracelular de los receptores, lo suficientemente grande para mantener la

velocidad de internalización de la enzima durante, por lo menos 5hrs en presencia de aminos o en ausencia de síntesis de novo de receptores. Por un lado, la vida media tan alta de 25 y 50 hrs. apoya en parte estos resultados, así como, los estudios preliminares que sugieren la existencia de una poza muy grande de receptores internos, (100 veces más que el número de receptores externos, datos no concluyentes ya que se ha trabajado con la enzima semipurificada y no contamos con un inhibidor específico). Sin embargo, aunque exista una poza muy grande de receptores, si el ligando no logra disociarse del receptor llegaría un momento que la velocidad de internación se vería modificada. En el laboratorio del Dr. Heibert (1976) se encontró linealidad en la velocidad de endocitosis hasta las 34 hrs. Lo cual sugiere, que de alguna manera debe haber reciclamiento y reposición de receptores, para que esto ocurra el ligando debe disociarse de su receptor. Nosotros encontramos, alrededor de un 25 % de disociación a pH lisosomal y es precisamente, en ese rango de pH donde también observamos que nuestro ligando es degradado, de alguna manera a ese pH la enzima sufre una modificación que le permite disociarse y poder reponerse los receptores.

La β -glucuronidasa bovina endocitada eventualmente es transportada a lisosomas secundarios en donde es capaz de degradar mucopolisacáridos acumulados. Lo cual nos permitió concluir que el nuevo sistema de internación es un sistema funcional, ya que no solamente reconoce en las enzimas

lisosomales un marcador específico, sino que la enzima unida a su receptor es endocitada y posteriormente transportada a los lisosomas en donde es catalíticamente activa (González-Noriega y cols sometido a publicación).

Por el momento, debemos concluir que efectivamente existe un nuevo sistema de transporte de las enzimas lisosomales, específico e independiente del de Man-6-P, que es capaz de compartimentalizar las enzimas a los lisosomas y que tal vez participa en su tráfico desde el retículo endoplásmico al Golgi. A futuro, será necesario determinar las repercusiones fisiológicas de la célula de contar varios sistemas de transporte para las enzimas lisosomales, así como determinar si este receptor participa en el transporte de la enzima sintetizada de novo. La existencia de dos señales diferentes cuya función, es compartimentar enzimas lisosomales, hace pensar que la célula posee sistemas redundantes pero independientes con el fin de asegurar que dicha función se lleve a cabo. Sin embargo, posiblemente no haya duplicidad de funciones, sino que cada señal actúa secuencialmente para transportar de un compartimento a otro a las enzimas lisosomales. Sea una u otra la función de los receptores durante el transporte de enzimas lisosomales, debemos tomar en cuenta que no todas las enzimas lisosomales están presentes en cada vesícula lisosomal, por lo que la presencia de diferentes señales explicaría esta heterogenicidad en la distribución de las hidrolasas ácidas en el sistema lisosomal.

Aparentemente, los mecanismos que la célula posee son más complejos que lo que se pensaba. Así por ejemplo, recientemente se ha caracterizado un segundo receptor que también reconoce el residuo de Man-6-P en las enzimas lisosomales, su peso molecular es menor (45K), al que nosotros hemos estudiado aquí (215 K). Su función, es transportar enzimas lisosomales, desde el Golgi hasta los lisosomas. Sin embargo, no juega ningún papel en la endocitosis o la recaptura de las enzimas lisosomales. El grupo de Von Figura (1986) ha propuesto varios modelos, similares a los que hemos descrito; así también, que en algunos tipos celulares las enzimas lisosomales son transportadas a través de compartimientos independientes del pH ácido característico de compartimientos prelisosomales y lisosomales, lo que sugiere que podría existir aún otro sistema de transporte (Braulke y col 1987).

Así pues, como ya hemos mencionado, el que una molécula llegue a su destino final, se debe básicamente, a una serie de señales que la molécula posee y que pueden estar codificadas en el péptido o pueden ser adquiridas por las modificaciones cotraduccionales o postraduccionales. Estas modificaciones determinan su velocidad de transporte intracelular y su compartimentalización (Rosenfeld 1982, Rucker y Wold 1988).

Las repercusiones de este tipo de conocimientos, son de gran relevancia, no solo porque nos permitirá comprender los mecanismos a nivel molecular sobre la biogénesis de los

organèlos celulares, sino tambièn està permitiendo el desarrollo de una metodologia que permitirà que se puedan reemplazar enzimas defectuosas en pacientes con errores innatos del metabolismo de macromolèculas que deben ser degradas en lisosomas (Achord 1975, Desnick 1976).

V.- CONCLUSIONES

1.- La internación de las enzimas lisosomales a los fibroblastos humanos ocurre a través de dos marcadores, uno de ellos ampliamente caracterizado de Man-6-P, y otro que ha sido encontrado en el laboratorio y ha sido el objetivo de este trabajo

2.- La presencia del nuevo marcador no es específico de un sólo órgano, ya que se encontró tanto en la β -glucuronidasa bovina procedente de hígado como de bazo.

3.- Podemos eliminar específicamente el marcador fosforilado o el nuevo marcador en la β -glucuronidasa bovina a través de una autodigestión, el primero a pH 6.8 y el nuevo a pH 5.

4.- La presencia de este marcador no es exclusivo de la β -glucuronidasa bovina, sino que también parece estar presente en otras enzimas lisosomales de hígado bovino.

5.- El nuevo marcador se encuentra en un dominio diferente al que está el marcador de Man-6-P.

6.- Este marcador no se encuentra ni en cadenas complejas ni en cadenas de alta mannososa, es decir en cadenas glicosídicas formadas en el residuo de asparagina, pudiera ser que se encuentre en cadenas glicosídicas presentes sobre los residuos Serina y /Treonina.

7.- El nuevo marcador presenta mayor afinidad por su receptor que el marcador de Man-6-P; sin embargo, la velocidad de internarse es igual para ambos.

8.- Su asociación es mayor a 37°C que a 4°C indicando que debe de haber una reposición de receptores.

9.- La unión del ligando por el receptor del nuevo marcador parece ser dependiente de iones.

10.- La vida media del nuevo receptor es mayor que la del receptor para Man-6-P.

11.- Existe un efecto diferencial de aminos sobre ambos sistemas de endocitosis.

12.- El mecanismo de transporte intracelular para la enzima endocitada por uno u otro sistema de transporte parece ser diferente.

VI. - BIBLIOGRAFIA

- Achord, D. F., Franke, H., Glaser, J., Brot, F., and Sly, W. (1975). Enzyme therapy: Rat model for β -glucuronidase replacement studies. *Amer J Hum Genet* 27: 10A
- Achord, D., Brot, F., Gonzalez, N. A., Sly, W., and Stahl, P. (1977). Human β -glucuronidase II fate of infused human placental β -glucuronidase in rat. *Pediat Res* 11: 822-916
- Ashwell, G., and Morell, A. (1977). Membrane glycoprotein and recognition phenomena. *TIBS* 7: 78
- Ashwell, G., Harford, J. (1982). Carbohydrate specific receptors of the liver. *Ann Revv Biochem* 51: 531-554.
- Baiton, D. F., Nichols, B., and Farguhar, M., (1976). In: Dingle, J. T. and Fell. H. B. (eds) *Lysosomes in Biology and Pathology*. North Holland Publishing Co Amsterdam Vol 1 pp 43-63
- Basu, S.K., Glasten, Anderson and Brown, M.S. (1981). Monensin interrupts the recycling low density glycoproteins in human fibroblasts. *Cell* 24: 493-502.
- Bennette, G., Leblond, C. P., and Haddad, A. (1974). Migration of glycoprotein from the Golgi Apparatus to the Surface of various cell type as shown by radioautography after labeled fucose. *J Cell Biol* 60: 258-281

- Blobel, G (1977). Synthesis and segregation of secretory proteins :The signal hypothesis. In International Cell Biology ,Brinkley, B., and Porter K.R (eds), Rockefeller University Press New York pp 318-325.
- Blobel, G., and Lingappa, V. R. (1978). Transfer of protein across intracellular membranes In: Transport of macromolecules in cellular systems S C Silverstein E D Dahlem konferenzen Berlin pp 289-298
- Blobel, G. (1979). Determinants in Protein Topology Gene to Proteins: Transformation transfer in Normal and Abnormal. Cell pp 347 -358
- Blobel, G. (1980). Synthesis and segregation of secretory proteins: The Signal Hypotesis In: Endoplasmic Reticulum-Golgi Apparatus and cell Secretion
- Blobel, G. (1982). Regulation of Intracellular Protein Traffic . Cold Spring Harbor Symposium Biol Quant Biol 46:7.
- Braulke, T., Beuze, H., Slot, J., Hasiur, A., and Figura, K. (1987). On the effects of weak bases and monensin on sorting and processing of lysosomal enzymes in human cells. European J Cell Biol 43: 316-321.
- Brot, F., Glasser, J., Oazen, K. J., Sly, W. and Stahl, (1974). In vitro correction of deficient human fibroblasts by β -glucuronidase from deficient human sources. Biochem and Biophysical Res. Comm. 57:1-8

- Brot, F. E., Bell, E., and Sly, W. (1978). Purification and properties of β -glucuronidase from human placenta. *Biochemistry* 17: 385-391.
- Brown, W. J., Constantinesca E., Farquhar M.G. (1982). Redistribution of mannose-6-phosphate receptors induced by Tunicamycin and cloroquine. *J Cell Biol.* 99: 320-326.
- Brown, W.J., Farquhar, M.G. (1984). The Manose 6 phosphate receptor is concentrated in cis golgi cisternae. *Cell* 36: 295-309.
- Brown, W. J., Goodhouse, J., and Farquhar, G. (1986). Mannose-6-phosphate receptor for lysosomal enzyme cycle between the Golgi complex and endosomes. *J Cell Biol* 103: 1235-1247.
- Cohn, N. Z. (1968). *Experta Medica Internation Congress Series # 16,6.*
- Coutiño, R.R., y González, N.A. (1984). Existencia de dos mecanismos independientes para la pinocitosis de enzimas lisosomales a fibroblastos humanos en cultivo. XV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Morelia Michoacan Mex.p 16
- Creek, K.E., and Sly, S.W. (1982). Adsorptive pinocytosis of phosphorylated oligosaccharides by human fibroblasts. *J Biol Chem* 257: 9931-9937.
- Creek, K. E., and Sly, W. (1983). Biosynthesis and turnover of the phosphomannosyl receptor in human fibroblasts. *Biochem J* 214: 353-360.

- Cuatrecasas, P. (1970). Protein purification by affinity chromatography. *J. Bio Chem* 245: 3059-3065.
- D'Arcy Hart, and Young, M.R. (1979). The effect of inhibitors and enhancers of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages on the phagosome membranes of ingested yeast. *Exp Cell Res* 118: 365-375.
- D'Duve, C., D'Barry, B., Poole, A. (1974). Lisosomotropic agents. *Biochem Pharmacol* 23: 2495-2531.
- Davies, P., Davies, D. R., Levitzki, A., Maxfield, F. R., Milhaud, P., Willingham, M. C. and Pastan, I. (1980). Transglutaminase is essential in receptor mediated endocytosis of α_2 -macroglobulin a polypeptide hormone. *Nature* 283: 162-164.
- Desnick, R. J., Thorpe, S. R. Fiddler, M. B. (1976). Toward enzyme therapy for lysosomal storage diseases. *Physiol Rev.* 56: 57-99.
- Distler, J. V., Heiber, G., Sahagain, R., Scheid, G. M., Jourdan, G., W. (1979). Identification of mannosyl-6-phosphate in glycoprotein that inhibited assimilation of β -galactosidase by fibroblasts. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* 76: 4235-4239.
- Dunphy, W. and Rothman, E. (1983). Compartmentation of asparagine linked oligosaccharide processing in the Golgi apparatus. *J Cell Biol.* 97: 270-275.
- Farquhar, M. G. (1983). Multiple pathways of exocytosis endocytosis and membrane recycling validation of a Golgi route. *Fed Proceed.* 42: 2407-2413

- Fischer, H. D., González, N. A. and Sly, W. S. (1980a). β -glucuronidase binding to human fibroblast membrane receptors from human and rat sources. *J Biol Chem* 255: 5069-5074.
- Fischer, D., González, N. A., Sly, W. S. and Morrè, D. J. (1980b). Phosphomannosyl-enzyme receptors in rat liver; subcellular distribution and role in the intracellular transport of lysosomal enzymes. *J Cell Chem* 255: 9608-9615
- Fischer, H. D., Natowicz, M., Sly, W. S., Bretthauer, R. F. (1980c). Fibroblasts receptors for lysosomal enzymes mediated pinocytosis of multivalent phosphomannan fragments. *J Cell Biol* 84: 77-86.
- Fleischman, J. B. (1967). Synthesis of the γ G heavy chain in rabbit lymph node cells. *Biochemistry* 6: 1311-1312.
- Fred Van Leuven, J. C., Cassimin, C., and Berghe Van den H (1980). Primary amines inhibit recycling of α - μ M receptors in fibroblasts. *Cell* 20: 37-43.
- Gabel, C., Goldberg, D., and Kornfeld, S. (1981). Lysosomal enzyme oligosaccharides phosphorylation in mouse lymphoma cells. Specificity and kinetics of binding to the mannosyl-6-phosphate receptor in vivo. *J Cell Biol* 95: 536-538.
- Gabel, C. A., Goldberg, D., and Kornfeld, S. (1983). Identification and characterization of cells deficient in the mannose-6-phosphate receptors; evidence for

- and alternative pathway for lysosomal enzyme targeting. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 80: 775-779.
- Gabel, C. A., Goldberg, D. E., and Kornfeld, S. (1984). Evidence for mannose-6-phosphate independent pathway for lysosomal enzyme targeting. In: Molecular basis of lysosomal storage disorders. Sly y col (eds) Academic Press Inc. pp175-193.
 - Geisow, M..J. (1982). Intracellular membrane traffic. Nature 95:649-650
 - Glaser, J. H., Roosen, K. J., Brot, F., and Sly, W. S. (1975). Multiple isoelectric and recognition forms of human β -glucuronidase activity. Arch Biochem Biophys 166: 536-542.
 - Glaser, M.J. (1982). β -glucuronidase deficiency mucopolysaccharidosis methods for enzymatic diagnosis. J Lab Clin Med 82: 969-977.
 - Goldstein, D. L. R., Anderson, B. W., and Brown, M. S. (1979). Coated pits coated vesicles and receptor mediated endocytosis. Nature (Lond) 279: 679-685.
 - Goldstone, A., Koenig, H., Nayyar, R., Hughes, C., and Lu C. Y. (1973a). Isolation and characterization of a rough microsomal fraction from rat kidney that is enriched in lysosomal enzymes. Biochem 132: 259-266.
 - Goldstone, A., and Koenig, H. (1973b). Physicochemical modifications of lysosomal hydrolases during intracellular transport. Biochem J 132: 267-282.

- González, N. A., Grubb, J. H., Talkad, V., and Sly, W. S. (1980). Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhance lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling. *J Cell Biol* 85: 839-852.
- González, N. A., Coutiño, R., Savaedra, V. y Barrera, R. (1988). Adsorptive endocytosis of lysosomal enzymes by human fibroblasts: presence of two differing functional systems to deliver an acidic hidrolase to lysosomes. (*Arch Biochem Biophys.*, sometido a publicación)
- Gorden, A. H., D'Arcey, H., and Young, M. R. (1980). Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature* 286: 79-81.
- Haigler, H. T., Maxfield, F. R., Willingham, M. C., Pastan, I. (1979). Danyl cadaverine inhibits internalization of 1125 epidermal grow factor in BALB 3T3 cells. *J Biol Chem* 255: 1239-1241.
- Harris, R. C., Roway, S., and Pand, W. (1973). Affinity chromatography of β -glucuronidase. *FEBS Letters* 29: 187-191.
- Hasilik, L. N., Rose, N. and Neufeld, E. (1979). Processing of lysosomal enzyme in human skin fibroblasts. *Fed Proc.* 38: 467-470.
- Hasilik, A., and Neufeld, E. (1980a). Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts synthesis as precursors of higher molecular weight. *J Biol Chem* 255: 4937-4945.

- Hasilik, A., and Neufeld, E. (1980b). Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. *J Biol Chem* 255: 4946-4950.
- Hasilik, A., Wahud, A., and Von Figura, K. (1981). Enzymatic phosphorylation of lysosomal enzymes in the presence of UDN-N-Acetyl glucosamine, absence of activity in I cells fibroblasts. *Biochem Biophys Res Comm* 98: 761-767.
- Hay, R., Bohn, P., and Gasser, S. (1984). How mitochondria import proteins. *Biochem Biophys Acta* 7: 65-79.
- Heiber, U., Distler, J., Myerowitz, R., Schwickel, R. D., Jourdain, G.W. (1976). The role of glycosidically bound mannose in the assimilation of β -glucuronidase by generalized gangliosidosis fibroblasts. *Biochem Biophys Res Comm* 73: 710-717.
- Hickman, S., and Neufeld, E. (1972). Hypothesis for I cell disease defective hydrolases that do not enter lysosomes. *Biochem Biophysics Res Comm* 49: 992-999.
- Hickman, S., and Shapiro, L. (1974). Recognition marker required for uptake of a lysosomal enzyme by cultured fibroblasts. *Biochem Biophys Res Comm* 57: 55-61.
- Hienno, M., Hashiguchi, K., and Kato, K. (1974). β -glucuronidase of bovine liver: purification, properties, carbohydrates composition. *J Biochem* 76: 1243-1252.

- Hoflack, B., and Kornfeld, S. (1985b). J Clin Chem 260: 12008-12014.
- Hoflack, B., and Kornfeld, S. (1985a). Proc. Natl Acad Sci U.S.A. 82: 4428-4432.
- Hohen, T., and Bower, B. (1984). Hydrolase secretion is a consequence of membrane recycling. J Cell Biol 98: 246-252.
- Hubbard, S. C., and Ivatt, R. J. (1981). Synthesis and processing of asparagine linked oligosaccharides. Ann Rev Biochem 50: 555-558
- Jamieson and Palade (1977) In: Brinkley R.R. and Porter R R (eds) International Cell Biology The Rockefeller University Press N. York, pp 308-317
- Jourdan, B., Sahagain, B., and Distler (1981). The role of carbohydrates in the recognition and uptake of glycoproteins by mammalian cells. Biochem Soc Transaction 9: 512-151.
- Kaplan, A., Achord, D., and Sly, W. (1977a). Phosphohexosyl components of a lysosomal enzyme are recognized by pinocytosis receptors on fibroblasts human. Proc. Natl Acad Sci U.S.A. 74: 2026-2030.
- Kaplan, A., Fischer, D., Achord, D., and Sly, W. (1977b). Phosphohexosyl recognition is a general characteristic of a pinocytosis of lysosomal glycosidases by human fibroblast. J Clin Invest 60: 1088-1093.

- Kolodny, M., E. (1984). Lysosomal storage diseases. *Currents Concepts in Genetics* 70: 82.
- Kornfeld, S., and Tabas, I. (1980). The synthesis of complex type oligosaccharides. *J Biol Chem* 253: 7771-7778.
- Kornfeld, D., and Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine Linked oligosaccharides. *Ann Rev Biochem* 54: 664.
- Kornfeld, S. (1987). Trafficking of lysosomal enzymes. *FASEB* 1: 462-468.
- Kreil, G., (1981). Transfer of proteins across membranes. *Ann Rev Biochem* 50: 317.
- Kress, B., and Miller, A. (1978). Altered serum mannosidase activity in mucopolidosis II y mucopolidosis III. *Biochem Biophys Res Comm* 81: 756-769.
- Lagunoff, D., Nicol, D. N., and Pritze, P. (1973). Uptake, of β -glucuronidase by deficient human fibroblasts. *Lab Invest* 29: 449-453.
- Leblond, C.P., and Bennette, B. (1977). Role of the Golgi Apparatus in Terminal Glycosylation. In: *Endoplasmic reticulum and Golgi Apparatus and Cell secretion* IBID 326-336.
- Levitzik, A., Willingham, M., and Pastan, I. (1980). Evidence for participation of transglutaminase in receptor mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 77: 2706-2710.

- Lloyd, J.B. (1977). Cellular transport of lysosomal enzymes. *Biochem J* 164: 281-282.
- Lodish, H. F., and Kong, N. (1984). Glucosyl removal from N-linked oligosaccharides is required for efficient maturation of certain secretory glycoproteins from the rough endoplasmic reticulum to the Golgi Complex. *J Cell Biol* 98: 1720.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Marx, J. (1980). Newly made proteins zip through the cells. *Science* 207: 164-167.
- Maxfield, F. R. (1982). Weak bases and ionophores rapidly and reversibly raise the pH of endocytic vesicles in cultures mouse fibroblasts. *J Cell Biol* 95: 676-681.
- Maxfield, F. R., Willingham, M., Davies, P., and Pastan, I. (1979). Amines inhibit the clustering of α_2 macroglobulin and EBF on the fibroblast cell surface. *Nature* 277: 661-663.
- Merion, M., and Sly, W. (1983). The role of intermediate vesicles in the adsorptive endocytosis and transport of ligand to lysosomes by human fibroblasts. *J Cell Biol* 97: 692-703.
- Morell, A.G., Gregariades, G., Schienberg, I. H., Hickman, J., and Ashwell, B. (1971). The role of sialic acid in determining the survival of

- glycoproteins in the circulation. *J Biol Chem* **246**: 1461-1467.
- Morrè, D. J., Keenan, T. W., and Huary, C. M. (1974). In: Ceccarelli B Clement F and Meldoles (eds) *Advances in Cytopharmacology* Raven Inc (editorial) New York 2: pp 107-127.
 - Narasimhan, S. (1982). Control of glycoprotein synthesis. *J Cell Biol Chem* **257**: 10235-10245.
 - Natowicz, M.R, Chi, M., Lowry, W., and Sly, W. (1979). Enzymatic identification of manosa-6-phosphate on the recognition marker for receptor mediated pinocytosis of β -glucuronidase by human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **76**:4322-4326
 - Natowicz, M. R., Hallett, D., Frier, .,C., Chi, M., Schlesinger, P., and Baenzinger, J. (1983). Recognition and receptor mediated uptake of phosphorylated high mannose type oligosaccharide by cultured human fibroblast. *J Cell Biol* **96**: 915-919.
 - Neufeld, E., and Cantz (1971). Corrective factors for inborn errors of mucopolisaccharide metabolism. *Ann N y Acad Sci* **179**: 578-587.
 - Neufeld, E., Lin, T. W., and Sapiro, L. J. (1975). Inherited disorders of lysosomal metabolism. *Ann Rev Biochem* **44**: 357-376.
 - Neufeld, E., Sando, G., Garvin, A., and Rome, L. (1977). The transport of lysosomal enzymes. *J Supramol Struct* **6**: 95-101.

- Neufeld, E., and Ashwell, G. (1980). Carbohydrate recognition systems for receptor mediated pinocytosis In: Lennarz W. J. (ed) The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans Plenum Press New York editorial pp 241-266.
- Nicol, D., Lagunoff, D., and Fritz, P. (1974). Differential uptake of human β -glucuronidase isoenzymes from spleen by deficient fibroblasts. *Biochem Biophys Res Comm* 59: 941-946.
- Novikoff, A. B. (1973). In: Hero, H. G., and Van Hoof, F. (ed) Lysosomes and storage diseases Acad Press New York pp 1-41.
- Novikoff, A. B. (1976). The endoplasmic reticulum: A cytochemistry view (A review). *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 73: 2781-2787.
- Novikoff, A. B., and Novikoff, M. (1977). Cytochemical contributions to differentiating GERL from the Golgi Apparatus. *Hist Chem J* 9: 525-531.
- Ohkuma, and Poole, B. (1978). Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc Natl Acad Sci U. S.A.* 75: 3327-3331.
- Duchterlony, G., Nilssen, L. A. (1978). Immunodiffusion and immunoelectrophoresis In: Handbook of experimental Immunology Weer D M (editor) chapter 19. Blochwell Scientific Publication Oxford.

- Owada, M., and Neufeld, E. (1982). Is There a mechanism for introducing acid hydrolases into liver lysosomes that is independent of mannose-6-phosphate recognition evidence from I cells disease. *Biochem Biophys Res Comm* 105:814-820.
- Owens, J., Gannon, K. L., and Stahal, P. (1975). Multiple forms of β -glucuronidase in rat liver lysosome. *Arch Biochem Biophys* 166: 258-272.
- Paigen, K., Swank, R., Tomino, Sh., and Ganschow, E. (1975). The molecular Genetics of Mammalian glucuronidase. *J Cell Physiol* 85: 379-392.
- Palade, G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189: 347-358.
- Pastan, I., Willingham, M. C. (1983). Receptor mediated endocytosis coated pits receptosomes and the Golgi. *Trends Biochem Sci* 7: 250-254.
- Pastan, I., Willingham, C. (1981). Journey to the center of the cell role of the receptosome. *Science* 214: 504-509.
- Pierre de Mayts (1976). Insulin and Growth hormone receptors in human cultured lymphocytes and peripheral blood monocytes. In: *Methods in Receptor Research*, Blecher (ed); Marcel, Dekker Inc, New York. Chapter 11: pp301-383.
- Pitt, D. (1975). *Lysosomes and cell function*. Longman Indana and New York. pp 1-23.

- Plapp, B., and Cole, R. D. (1966). Purification and characterization of bovine liver β -glucuronidase. *Arch Biochem Biophys* 116: 193-206.
- Pohlmann, R., Waheed, A., Hasilik, A., and Von Figura, K. (1982). Synthesis of phosphorylation recognition marker in lysosomal enzymes is located in the cis part of Golgi apparatus. *J Biol Chem* 257: 5323-5323.
- Pollack, T., and Atkinson, P. (1983). Correlation of glycoxylation forms with position in amino acid sequence. *J Cell Biol* 92: 293-300.
- Prattan, K. M., Duncan, K., and Lloyd, B. (1980). Adsorptive and passive pinocytosis uptake In: Lennarz W.S (ed) *The Biochemistry of Glycoproteins and proteoglycans*, Plenum Press New York pp 179-218.
- Reitan, M., and Kornfeld, S. (1981a). *J Biol Chem* 256: 4275-4281.
- Reitan, M., and Kornfeld, S. (1981b). Lysosomal enzyme targeting N-acetyl glucosaminyl phosphotransferase selectively phosphorylates native lysosomal enzymes. *J Biol Chem* 256: 11977-11980.
- Reuser, A., and Halley, D. (1976). *Biochem Biophys Res Commun* 69: 311-317.
- Rodewald, R. (1981a). Receptor mediated transport of IgG across the intestinal epithelium of neonatal rat. In: *Membrane relay clieb pitean Books Ltd. London*, pp 209-232.

- Rodewald, R., and Abrahamson, D. (1981b). Evidence of the sorting of endocytic vesicle contents during the receptor mediated transport of IgG across the newborn rat intestine. *J Cell Biol* 91: 270-280.
- Rome, L.H., Weismann, B. and Neufeld, E. (1979). Direct demonstration of binding of lysosomal enzyme hialuronidase to receptors on cultured fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 76: 2331-2334.
- Roseman, S. (1970). *Chem Phys Lipid* 5: 270
- Rosenfeld (1982). Biosynthesis of lysosomal hydrolases: Their synthesis in bound polysomes and the role of Co and post translational processing in determining their subcellular distribution. *J Cell Biol* 93: 135-143.
- Rothman, J. E., Miller, R. L., and Urbani, L. J. (1982). Intercompartmental transport in the Golgi complex is a dissociative process facile transfer of membrane protein between two Golgi populations. *J Cell Biol* 99: 260-265.
- Rothman, J.E., Fries, E.D., Dunphy, W.B., and Urbani, J.L. (1986). The golgi apparatus coated vesicles and the sorting problem. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 46: 797.
- Rothman, J.E., and Fine, (1980). Coated vesicles transport newly synthesized membrane glycoprotein from endoplasmic reticulum to plasma membrane in vivo successive. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 780-784.

- Rothman, J.E., and Lodish, J. (1977). Synchronised transmembranes insertion and glycosylation of a nascent membrane protein. *Nature* 269: 775-778.
- Ruedolf, T., and Reutter, W. (1983). Intramolecular heterogeneity of degradation in plasma membrane glycoproteins evidence for a general characteristic. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 80: 4026-4029.
- Sabatini, D., Kreibich, G., Morimoto, T., and Adenisk, M. (1982). Mechanism for the incorporation of proteins in membrane and organelles. *J Cell Biol* 92:
- Sahagain, B., Distler, J., and Jourdain, G. (1979). Characterization of a membrane associated receptor from bovine liver that phosphomannosyl residues of bovine testicular β -galactosidase. *Proc Natl Acad Sci* 78: 4289-4293.
- Sando, G., and Neufeld, E. (1977). Recognition receptor mediated uptake of a lysosomal enzyme hialuronidase by cultured fibroblasts. *Cell* 12: 619-627.
- Sando, G., Titus Dillo, P., Hall, C., and Neufeld, E. (1979). Inhibition of receptor mediated uptake of lysosomal enzyme into fibroblast by chloroquine, procaine and ammonia. *Exp Cell Res* 119: 359-364.
- Sando, C., and Titus Dillon P (1977). Recognition of iduronidase by cultured fibroblasts. *Cell* 12: 610-6624.
- Saavedra, A. V., and Gonzalez, N. A. (1988). Transporte intracelular de proteinas *En: Mensaje Bioquimico*

- Alvarez H, Saldaña y col (eds) UNAM editorial Vol. VII pp.189-228.
- Schneider, Y. T., Tulkens, C., Duve, C., and Trout, A. (1979). Fate of plasma membrane during endocytosis. *J Cell Biol* 92: 449-465.
 - Shapiro, G., Distler, V., Heiber, R., Schimik, R., and Jourdain, G. W. (1979). Role of mannose-6-phosphate in β -galactosidase assimilation. *Fed Proc* 38: 467
 - Shapiro, L., Hall, C., Leder, I., and Neufeld, E. (1975). The relationship of α -L-iduronidase and Hunter corrective factor. *Arch Biochem Biophys* 172: 156-161.
 - Silverstein, S., Cohn, C., and Steinman, I. (1977). Endocytosis. *Am Rev Biochem* 46: 669-772
 - Sly, W., and Sathal, P. (1978). Receptor mediated uptake of lysosomal enzymes In: Silverstein (ed) *Transport of macromolecules in cellular systems life science research Dahlem Konferenz Berlin* pp 229-245
 - Sly, W., Fischer, H. D., Gonzalez, N. A., Gruff, H. and Natowicz, M. (1981). Role of the 6 phosphomannosyl enzyme receptor In: *intracellular transport and adsorptive pinocytosis of lysosomal enzymes. Methods in Cell Biology Chapter 13* pp 191-214.
 - Sly, W., Glaser, J., Roozen, K., Brot, F., and Stahal, P. (1975). Enzyme Therapy in Lysosomal Storage Disease In: Tager J M, Hoogheickel G and Decens W (eds) . North Holland Publishing Co Amsterdam. pp 288-291.

- Sly, W., and Fischer, H. (1982). The phosphomannosyl recognition system for intracellular and intercellular transport of lysosomal enzymes. *J Cell Biochemistry* 18: 67-85.
- Stein, M., Zijderhand, F., Geuze, H., Hasilik, and Von Figura, K. (1987). Mr 46,000 mannose-6-phosphate specific receptor: its role in targeting of lysosomal enzymes. *Embo J* 6: 2677-2681.
- Steiner, A., and Rose, H. (1982). Assay and purification of a solubilized membrane receptor that binds the lysosomal enzyme α -L-iduronidase. *Arch Biochem* 214: 681-687
- Steinman, R., Mellan, I., Mozle, (1983), Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J Cell Biol* 1: 27.
- Steinman, R., Silver, J., and Cohn, Z. (1974). Pinocytosis in fibroblasts. *J Cell Biol* 63: 949-969.
- Tabas, T., and Kornfeld, S. (1978). The synthesis of complex type oligosaccharids. *J Biol Chem* 253: 7779-7786.
- Talkad, V., and Sly, W. (1983). Human β -glucuronidase pinocytosis and binding to the immobilized phosphomannosyl receptor. *J Biol Chem* 258: 7345-7351.
- Tarkoff, and Vassalli, (1983). Lectin-binding systems markers of Golgi subcompartments Proximal to distal maturation of oligosaccharids. *J Cell Biol* 97: 1243-1248.

- Tietze C., Schlesinger, P., and Stahl, P. (1982). Mannose specific endocytosis receptor of alveolar macrophages demonstration of two functionally distinct intracellular pool of receptor and their roles in receptor recycling. *J Cell Biol* 92: 417-424.
- Ullrich, K., Mersmann, G., Weber, E., Von Figura, K. (1978). Evidence for lysosomal enzyme recognition by human fibroblast via phosphorylated carbohydrate moiety. *Biochem J* 170: 643-650.
- Varki, A., Reisman, A., and Kornfeld, S. (1981). Identification of variant of mucopolysaccharidosis III a catalytically active N-acetyl glucosaminidase that fails to phosphorylate lysosomal enzyme. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 78: 7773-7777.
- Vladatiu, G., and Ratazzi, M. (1979). Excretion-uptake route of hexosaminidase in normal and I cells cultured fibroblasts. *J Clin Invest* 63: 595-601.
- Von Figura, K., and Hasilik, A. (1986). Lysosomal enzymes and their receptors. *Ann Rev Biochem* 55: 167-173.
- Von Figura, K., and Kolin, U. (1979a). Isolation and characterization of phosphorylated oligosaccharides from N-acetyl glucosaminidase that are recognized by cell surface receptor. *Eur J biochem* 94: 347-357.
- Von Figura, K., and Kreese, H. (1979b). Quantitative aspects of pinocytosis and the intracellular fate of N

- acetyl 1-glucosaminidase in San Filippo B fibroblast. *J Clin Invest* 53: 85-90.
- Von Figura, K., and Voss, B. (1979c). Cell surface-associated lysosomal enzymes in cultured human skin fibroblasts. *Exp Cell Res* 121: 267-676.
 - Von Figura, K., and Neber, I. (1978). An alternative hypothesis of cellular transport of lysosomal enzymes in fibroblasts. *J Clin Invest* 63: 595-601.
 - Maheed, A., Pohlmann, R., Hasilik, A., Von Figura, K., Elsa, A., and Leray, J. G. (1982). Deficiency of UDP/N/Acetyl glucosamine lysosomal enzyme N-Acetyl glucosamine phosphotransferase in organs of I cell patients. *Biochem Biophys Res Comm* 105: 1052-1058.
 - Walter, P., Gilmore, R., and Blobel, G. (1984). Protein translocation accross the endoplasmic reticulum. *Cell* 38:5.
 - Weisman, U., and Herschkovitz, N. (1974). *Ped Res* 9: 865-873.
 - Weisman, U., Di Donato, and Herschkovitz, N. (1975). Effect of chloroquine on cultured fibroblast: Reuse of lysosomal hidrolisis and inhibition of their uptake. *Biochem Biophys Res Comm* 66: 1338-1343.
 - Weisman, U., Lightbody, L., Vosella, F., and Herschkovitz, N. (1971). *N Eng J Med*. 284: 109.
 - Weisman, U., Vosella, F., and Herschkovitz, N. (1978). I cell disease leakage of lysosomal enzymes into extracellular fluids. *New England J Med* 285:1090.

- Wibo, M., and Poole, B. (1974). Protein degradation in cultured cells. *J Cell Biol* 63: 430-440.
- Willingham, C., and Pastan, I. (1980). The receptosome; an intermediate organelle of receptor-mediated endocytosis in cell cultured fibroblasts. *Cell* 21: 67-79.