



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

**Romano P.S., y Sosa M.A.**

**Area de Histología. Departamento de Morfofisiología. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo. Instituto de Histología y Embriología (IHEM), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).**

**Palabras clave:** transporte intracelular, lisosomas, hidrolasas lisosomales, receptores a manosa-6-fosfato.

**Key words:** intracellular transport, lysosomes, lysosomal hydrolases, manose-6-phosphate receptors.

### **Resumen**

Los receptores a manosa-6-fosfato (MPRs) regulan el transporte de enzimas lisosomales a lisosomas. La coexistencia de dos tipos de MPR (CD- y CI-MPR), en la mayoría de los tipos celulares es aún motivo de controversia. En este estudio se evaluó la expresión de ambos MPRs en hígado y cerebro de rata durante el desarrollo perinatal y se intentó establecer una relación con la maduración del aparato lisosomal.

La expresión de CD- y CI-MPR y la capacidad de ambos para interactuar con diferentes ligandos fueron estudiadas en cada órgano a diferentes edades perinatales. En ambos órganos, el CI-MPR exhibe una elevada expresión a edades tempranas del desarrollo, y luego disminuye progresivamente hasta la edad adulta. Sin embargo, el número de sitios de unión activos no cambia significativamente entre los estadios tempranos y tardíos del desarrollo, sugiriendo que el exceso de CI-MPR en etapas tempranas estaría relacionado con funciones adicionales, como la proliferación y diferenciación celular. De un modo diferente, el CD-MPR presenta una elevada expresión, alta afinidad por ligandos fosfomanosilados y aumento en el número de sitios activos recién desde el día 10 de desarrollo. Estas propiedades del CD-MPR se correlacionan con un aumento en la expresión de ligandos fosfomanosilados y en la actividad de enzimas lisosomales, que ocurren a partir del décimo día de desarrollo. Concluimos que el CD-MPR estaría más relacionado con el proceso de maduración lisosomal en ambos órganos, el cual es evidente desde el día 10 de nacimiento. El CI-MPR podría tener funciones adicionales en las etapas tempranas de desarrollo, en la regulación del IGF-II ("insulin-like growth factor") u otros factores mitógenos de crecimiento.

## **Abstract**

Mannose-6-phosphate receptors (MPRs) mediate the transport of lysosomal enzymes to lysosomes. The co-existence of two MPRs (CD- and CI-MPR) in most cell types, is still controversial. In this study, expression of the two MPRs in rat liver and brain was evaluated during perinatal development, and was attempted to establish a correlation with the maturation of the lysosomal apparatus. Thus, the expression and the binding properties of the two MPRs were measured in each organ at different perinatal ages. A high expression of CI-MPR was observed in both organs at early ages of development and it decreases progressively up to adults. However, the number of affinity sites does not change significantly between early and late ages, suggesting that the excess of CI-MPR at early stages could be related to additional functions, as cell proliferation and differentiation. In contrast, the CD-MPR exhibits high expression, high affinity to mannose-6-phosphate ligands (M6P-L) and an increase of binding sites by the day 10th after birth. These features correlate with a high expression of M6P-L and the increased lysosomal enzyme activity observed around this age. We concluded that CD-MPR plays a role in maturation of lysosomes in rat liver and brain, whereas the CI-MPR may play additional role at early stages of development, by regulating of IGF-II or other mitogenic growth factors.

## **Introducción**

Los receptores a manosa-6-fosfato (MPRs) son proteínas transmembrana que participan en el transporte de las hidrolasas lisosomales a lisosomas. El dominio luminal/extracelular de estos receptores posee los sitios que reconocen residuos manosa-6-fosfato (M6P) en aquellas glicoproteínas destinadas a lisosomas (e.g. enzimas lisosomales).

Luego de su síntesis en el Retículo endoplasmático rugoso (RER) las enzimas lisosomales adquieren el residuo M6P en la región cis del Aparato de Golgi e interactúan con los MPRs en la región trans (TGN) de este compartimiento. Los complejos enzima-receptor son segregados de otras proteínas y transportados por vesículas especiales que emergen del TGN hacia compartimientos endosomales tardíos, cuyo pH ácido permite la disociación del complejo. Finalmente los MPRs son reciclados hacia el TGN y las enzimas siguen su camino a lisosomas, donde pierden (por clivaje) el residuo M6P, transformándose en enzimas maduras (Lodish et al. Mol Cell Biol. (1999)). Este modelo se esquematiza en la Figura 1.

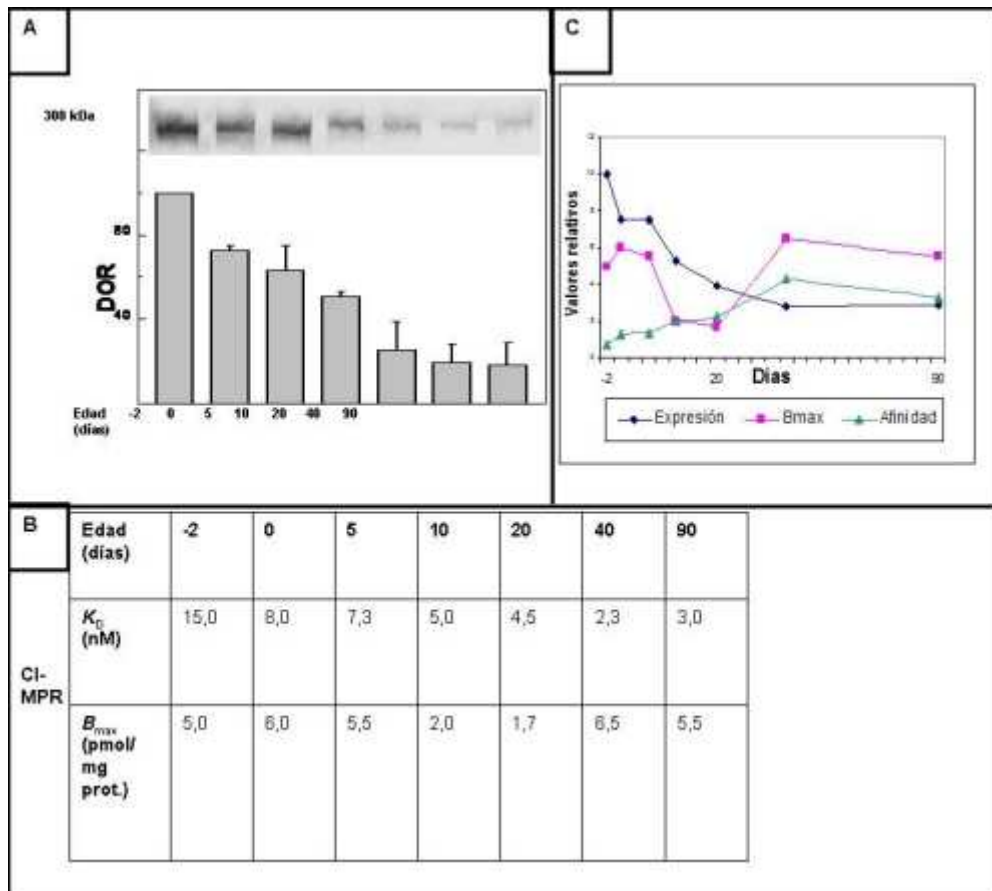


tes durante el desarrollo perinatal en órganos de mamífero, y b)- si ambos MPRs se regulan mutuamente en cuanto a su expresión y función.

## Resultados

Para ello hemos estudiado algunas propiedades de los MPRs durante el desarrollo perinatal de órganos de rata y observamos que ambos receptores manifiestan diferentes comportamientos en este período.

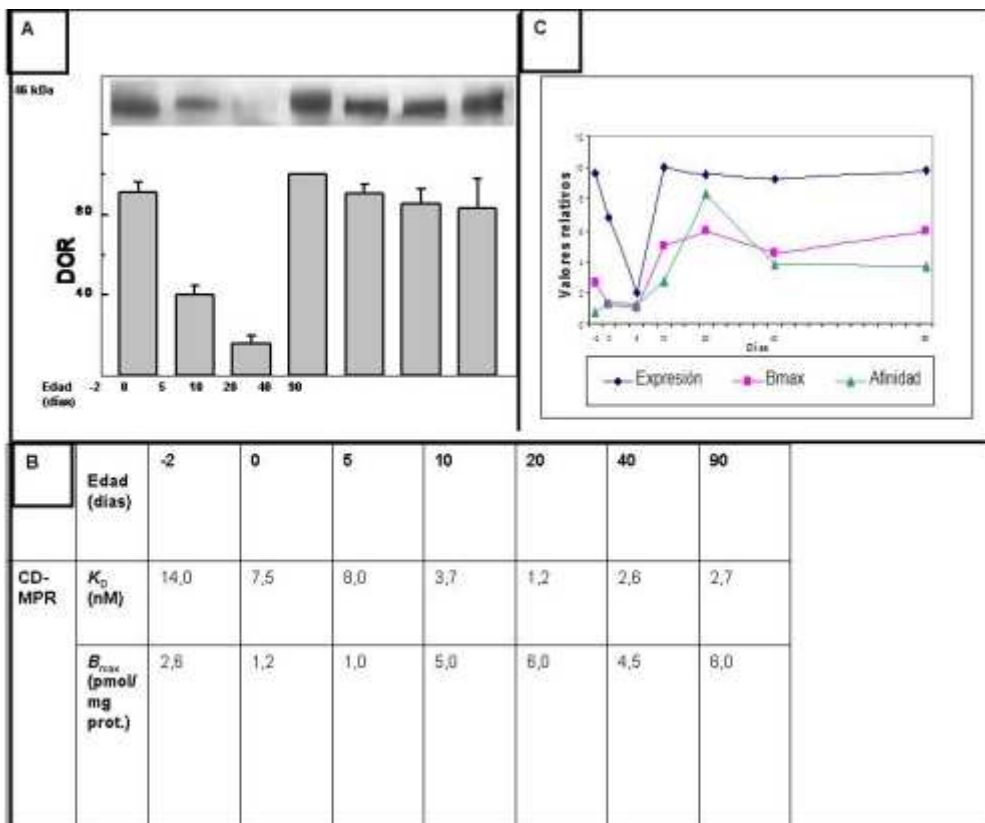
La expresión del CI-MPR en hígado y cerebro disminuye progresivamente desde fetos de 18 días a animales adultos (Figura 2A). Curiosamente la cantidad de sitios activos que reconocen ligandos con M6P por gramo de proteína (representado por Bmax en la Figura 2B y C) no varía entre estadios tempranos y adultos, indicando que en estadios tempranos el excedente en la expresión del CI-MPR podría representar una población de los mismos con baja afinidad por ligandos con M6P. Esto fortalece la idea de que ese excedente está ocupado por otra clase de ligandos (IGF-II?). Además, a medida que el órgano evoluciona, los CI-MPR "mejoran" su afinidad por ligandos con M6P (representada por KD en la Figura 2C), (Romano et al (2002); Romano et al (2005).



**Figura 2:** Características del CI-MPR durante el desarrollo perinatal: Detección por "western blot" y cuantificación del CI-MPR en las membranas de hígado en las edades indicadas (A). La afinidad (inversa del KD) y el número de sitios activos ( $B_{max}$ ) también se modifican diferencialmente (B). Un resumen de la variación de estas propiedades durante el desarrollo se muestra en C.

El CD-MPR en cambio, aumenta su expresión, su número de sitios activos y su afinidad a partir de los 10 días postnatales (Romano et al. (2002) (Figura 3).

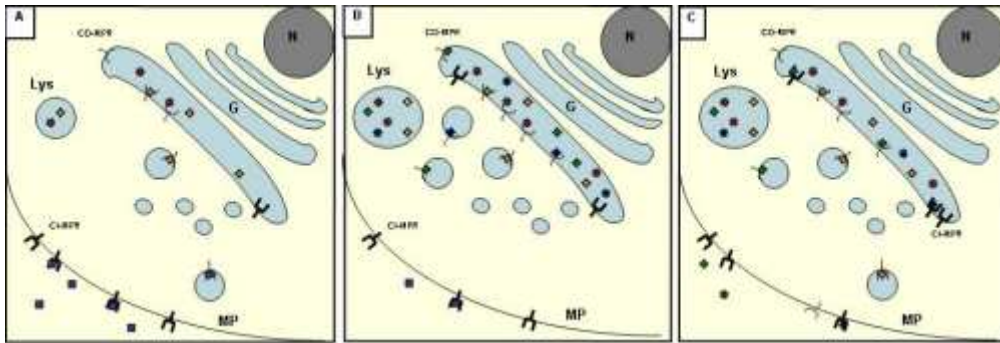
Estas propiedades del CD-MPR se correlacionan con la mayor actividad de algunas enzimas lisosomales y con una mayor interacción de estas enzimas con el CD-MPR en este período tanto en hígado (Romano et al. (2006)) como en cerebro (Romano et al, (2005)).



**Figura 3:** Propiedades del CD-MPR: Detección por "western blot" y cuantificación del CD-MPR en las membranas de hígado en las edades indicadas (A). La afinidad (inversa del KD) y el número de sitios activos ( $B_{max}$ ) también se modifican diferencialmente (B). Un resumen de la variación de estas propiedades durante el desarrollo se muestra en C.

## Conclusiones

A partir de nuestros hallazgos postulamos que aunque ambos receptores tengan la misma función primaria en el transporte de enzimas lisosomales, su papel durante el desarrollo perinatal podría ser diferente. Por lo tanto propusimos el siguiente modelo (Romano et al. (2006)):



**Figura 4:** Funciones de los MPRs en el desarrollo perinatal de órganos de rata, en las edades iniciales (A), a los 10 días postnatales (B) y en la edad adulta (C). G: Aparato de Golgi, N: núcleo, MP: membrana plasmática, Lys: lisosomas.

En las edades iniciales (fetos de 18 días de gestación y animales recién nacidos y de 5 días) el CI-MPR participa fundamentalmente en el control de la proliferación celular. Esta es seguramente la principal función de este receptor durante el desarrollo embriológico. En este período las enzimas lisosomales se encuentran poco activas y el CD-MPR podría cumplir el papel primordial en el transporte de estas enzimas, en el proceso de maduración lisosomal.

Todo parece indicar que a partir de los 10 días se activa la biogénesis del aparato lisosomal, representado por un aumento en la actividad de enzimas lisosomales y de ligandos fosfomanosilados. Esto induce cambios en las propiedades específicas del CI-MPR, que ahora se prepara para reconocer y unir las enzimas lisosomales que comienzan a sintetizarse y que deben ser transportadas. Pero esta capacidad del CI-MPR se termina de adquirir a partir de los 40 días, existiendo un período de escasa actividad de este receptor. A partir de allí, probablemente el comportamiento de ambos receptores se superpone y sus funciones en el transporte son redundantes.

La mayor incidencia del CD-MPR en la maduración lisosomal es avallada por el hecho de que este receptor sólo reconoce ligandos fosfomanosilados.

Desde nuestros datos y el modelo planteado podríamos considerar que la "posta" que hacen ambos receptores en el proceso de maduración lisosomal implicaría una regulación mutua entre ambas proteínas, fundamentalmente en etapas tempranas del desarrollo.

## **Bibliografía**

1. Lodish, H; Berk, A; Zipursky, SL; Matsudaira, P; Baltimore, D; Darnell, JE. *Molecular Cell Biology* New York: W. H. Freeman & Co.; c1999.
2. Hoflack B and Kornfeld S (1985a) Lysosomal enzyme binding to mouse P388D1 macrophage membranes lacking the 215-kDa mannose 6-phosphate receptor: evidence for the existence of a second mannose 6-phosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:4428-4432.
3. Hoflack B and Kornfeld S (1985b) Purification and characterization of a cation-dependent mannose 6-phosphate receptor from murine P388D1 macrophages and bovine liver. *J Biol Chem* 260:12008-12014.
4. Sahagian GG, Distler J, Jourdian GW (1981) Characterization of a membrane-associated receptor from bovine liver that binds phosphomannosyl residues of bovine testicular beta-galactosidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:4289-4293.
5. Tong PY, Tollefsen SE, Kornfeld S (1988) The cation-independent mannose 6-phosphate receptor binds insulin-like growth factor II. *J Biol Chem.* 25;263(6):2585-2588.
6. Romano PS, López AC, Mariani ML, Sartor T, Belmonte SA, Sosa MA (2002) Expression and binding properties of the two mannose-6-phosphate receptors differ during perinatal development in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 295:1000-1006.
7. Romano PS, Carvelli L, López AC, Jofré G, Sartor T, Sosa MA (2005) Developmental differences between cation-independent and cation-dependent mannose-6-phosphate receptors in rat brain at perinatal stages. *Brain Res Dev Brain Res.* 158:23-30.
8. Romano PS, Jofré G, Carvelli L, López AC, Sartor T, Sosa MA (2006) Changes in phosphomannosyl ligands correlate with cation-dependent mannose-6-phosphate receptors in rat liver during perinatal development. *Biochem Biophys Res Commun.* 344: 605-611.