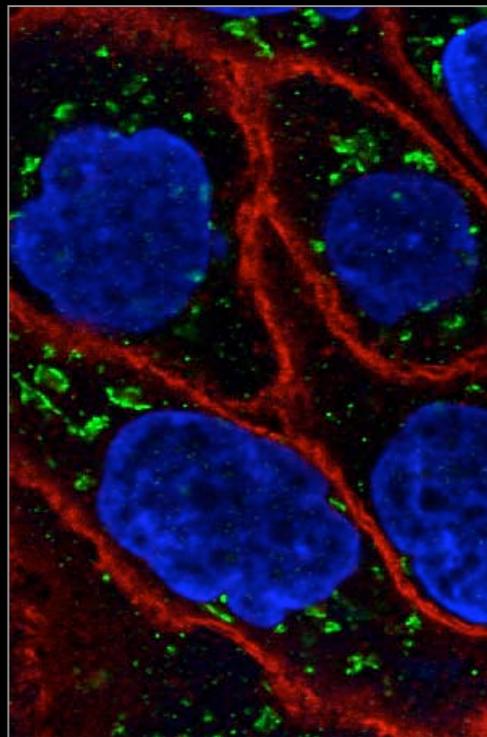
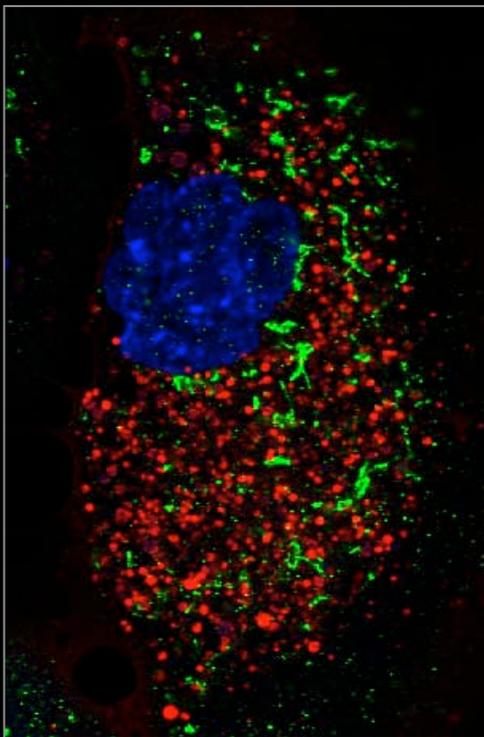


**EFFECTOS DEL INHIBIDOR DE GLICOSILACIÓN BENZIL GaINAc
SOBRE LAS RUTAS SECRETORA Y ENDOCÍTICA
DE CÉLULAS EPITELIALES**



Fausto Alexander Ulloa Darquea

Junio 2002

**EFFECTOS DEL INHIBIDOR DE GLICOSILACIÓN BENZIL
GalNAc SOBRE LAS RUTAS SECRETORA Y ENDOCÍTICA
DE CÉLULAS EPITELIALES**

Fausto Alexander Ulloa Darquea

Junio 2002

**EFFECTOS DEL INHIBIDOR DE GLICOSILACIÓN BENZIL GaINAc
SOBRE LAS RUTAS SECRETORA Y ENDOCÍTICA DE CÉLULAS
EPITELIALES**

**Memoria presentada por Fausto Alexander Ulloa Darquea para optar
al grado de Doctor en Biología**

**Universitat Autònoma de Barcelona
*Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia***

**Institut Municipal d'Investigació Mèdica
*Unitat de Biologia Cel·lular i Molecular***

Dr. Francisco X. Real Arribas

DIRECTOR

Dra. Paz Martínez Ramírez

TUTOR

Junio 2002

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Por fin, ha llegado el momento de decir "gracias". En primer lugar debo agradecer a mi suerte por el privilegio de haber estado aquí. Probablemente, y lo digo con conocimiento de causa, en otro sitio no me lo habría pasado tan bien ni me habría enriquecido tanto como persona. Dado que soy el último de mi generación, vamos, un fósil viviente, he tenido la oportunidad de conocer a muchísima gente en el laboratorio. A todos les estoy muy agradecido por lo mucho o poco que han hecho por mí y mi trabajo.

A Paco, director, productor y guionista de este trabajo, por apoyar como nadie a la formación y progreso de un sudaquilla calimero (o sea yo). Mi visión de la ciencia y de la vida no son las mismas después de ti. Queda pendiente el reconocer el vino bueno del peleón y el abandonar el feo vicio de la Fanta de naranja. Espero que en el futuro podamos en un bar de la Barceloneta solucionar estos asuntos.

A Laura por contribuir con tiempo y manos a este trabajo y por su amistad.

A Clara Francí, por permitirme usar sus impecables resultados, por su ayuda en las inmunoprecipitaciones y por su sentido común.

A Pep Lloreta, por su colaboración en la interpretación de las imágenes de microscopía electrónica y por su fino humor.

A Marta, por gastar en mi nombre numerosas horas (y cuchillas del micrótomo) para preparar los cortes semifinos y ultrafinos de los cultivos celulares.

A Arrate, por las imágenes del confocal, por compartir sus conocimientos y por tener siempre a punto una amplia sonrisa para mí.

A Carme Torns, por atender y salvar mis células cuando ellas más lo necesitaban, por darme la oportunidad de disfrutar del *Palau* y por dejarme leer la Vanguardia.

A Xavi Mayol, por cambiar el medio de mis células en vacaciones, por tantos fines de semanas compartidos, por sus consejos y por ser tan listo.

A David, por su colaboración en la microscopía óptica y electrónica. De él en mi tierra dirían que "cuando muera va derechito al cielo".

A Carme de Bolós por no dudar en proveerme de reactivos e información para la tesis.

A Guillemette Huet, Alain Zweibaum y Philippe Delannoy por sus valiosas opiniones y por su colaboración con este trabajo.

A Susanna Castell y todo el grupo de Microscopía Confocal de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona.

A todos los que han aportado materiales y reactivos para la realización de estos estudios.

A Jepi por su hombro y por cómo se pone su rostro cuando relata la crónica un *tres de deu amb folre*.

A Mercè, por sen tan queda bien, por los masajes - en el cuello - y por tener la risa más ruidosa del IMIM.

A Nour, por simplemente haberse cruzado en mi vida. Supongo que si se cuantificara el índice de citas en los agradecimientos de las tesis estarías por encima del "Cell". A mis nietos les contaré que te conocí.

A Santi, por ser mi compinche. Envidio tu flor.

A Teresa, por confiar en mí y por su aguda visión de la vida.

A Víctor Barberá, por su generosidad, su interés en mi opinión y por la paella de sus padres.

A Víctor Díaz y a Joan por su camaradería.

A Josep María, por ser tan "*buena gente*".

A Antonio, por su disposición para hablar de fútbol y por contestar preguntas del calibre de "¿y, exactamente, qué es el pH?". Ah, y eso que es del Madri.

A Montse Torá por sacarme de apuros en el RIA.

A Myriam, Rosanna, Estanis y Tim por nunca negarme su ayuda.

A la vieja guardia de precarios: Edu (providencial para protegerme en el fútbol), Elena (gracias por la F-1), Xavi Verdú, Toni, Olga, Silvia, Anna, Lluís y la siempre original María del Mont.

A la nueva y no tan nueva hornada: Alicia, Annie, Anouchka (no tuve ocasión de tratar contigo en tu primera etapa en el IMIM, así que te he ubicado aquí), Ariadna, Barbara, Cesc, Clara Mayo, Coral, Dani, Elena, Eli, Fran, Gabriel, Isa, Jose, Judit Pujal, Judit Grueso, Laia, Manel, Meritxell, María José, Maurici (vaya fotos tomas tío), Mercè Montfar, Miki, Mireia, Monica, Oriol, Pilar, Sandra Guaita, Sandra Peiró, Susana y *Susanita*. No dudo que con ustedes en el laboratorio ha habido y habrá buen rollo.

A los superficientes secretario(a)s Leo, Montse y Olga. Gracias, muchas gracias por su ayuda. Por cierto, Leo, todavía me acuerdo de aquella conexión de 10 minutos en el aeropuerto de Niza.

A la Maruja, Rossi y Anna Espinosa por preparar el material de laboratorio.

A los amigos sectarios: Sara (la nuestra ha sido una amistad que superado fronteras ¿no?), Marc, Mariá, Laia, Montse, Carles, Bea, Ferrán, Laura, Jacob, Anna María, Ernest, Genu, Climent, Eulália, Vasso, Oscar, Gloria, Rafa, Alfonso y Clelia, por convertirse en mi familia en Cataluña.

A la familia Ruiz-Nel.lo, y en especial a Marta, por su apoyo y por las comidas de domingo.

A Anna, un gracias muy especial, por haberme elegido, por su apoyo incondicional, por su infinita paciencia y por su voz.

A mi familia y en especial a mis padres, por su cariño, por sacrificarse por mí y por no dejarme renunciar cuando todo(s) me lo pedía(n).

ÍNDICE

ABREVIATURAS	v
RESUMEN	vii
INTRODUCCIÓN	1
1. GENERALIDADES DEL TRÁFICO DE MEMBRANAS	1
1.1 Tipos de vesículas de transporte	4
1.1.1 Vesículas recubiertas de clatrina	4
1.1.2 Vesículas COPI	6
1.1.3 Vesículas COPII	6
1.2 GTPasas pequeñas	7
1.3 Etapas de la vida de una vesícula	9
1.3.1 Formación de una vesícula	9
1.3.2 Transporte de vesículas	11
1.3.3 <i>Thetering</i> y <i>docking</i> de vesículas	12
1.3.4 Fusión de vesículas	12
1.4 Rafts	14
1.5 Transporte post-TGN	15
1.5.1 Secreción regulada	17
1.6 Sistema endosomal	18
1.6.1 Endosomas tempranos	19
1.6.2 Endosomas de reciclaje	20
1.6.3 Endosomas tardíos	21
1.6.4 Lisosomas	22
1.6.5 Transporte retrógrado al Golgi	22
1.7 Transporte de membranas en células polarizadas	24
1.7.1 Rutas de tráfico de membrana en células polarizadas	24
1.7.2 Sistema endosomal en células polarizadas	25
1.7.3 Señales de localización polarizada	27
1.7.3.1 Señales de localización basolateral	27
1.7.3.2 Señales de localización apical	28
1.7.4 Transporte de proteínas basolaterales	28
1.7.5 Transporte de proteínas apicales	29
1.7.6 Tráfico de proteínas en células epiteliales no polarizadas	30
1.8 <i>Sorting</i> de lípidos	30
1.8.1 Tráfico de colesterol	32
1.8.2 Tráfico de esfingolípidos	33

2. GENERALIDADES DE LA GLICOSILACIÓN	35
2.1 Glicoproteínas	35
2.1.1 Tipos de glicosilación en proteínas	35
2.2 Glicolípidos	37
2.2.1 Gangliósidos	38
2.3 Biosíntesis de los glicanos	38
2.3.1 Estructuras de elongación y terminación	40
2.3.2 Glicosiltransferasas	40
2.3.3 Biosíntesis de los <i>N</i> -glicanos	42
2.3.4 Biosíntesis de los <i>O</i> -glicanos tipo mucina	43
2.4 Funciones de los glicanos	45
2.4.1 Funciones estructurales y modulatorias	46
2.4.2 Procesos de reconocimiento a través de lectinas	46
3. ÁCIDOS SIÁLICOS	49
3.1 Sialiltransferasas	50
3.1.1 Regulación de la expresión de sialiltransferasas	53
3.2 Metabolismo del ácido siálico	54
3.3 Funciones del ácido siálico	56
3.3.1 <i>Knock-outs</i> de enzimas involucradas en la biosíntesis de ácido siálico	57
3.4 Ácido siálico y patología	58
3.4.1 Enfermedades de depósito de ácido siálico	59
4. ANTECEDENTES DEL PROYECTO	63
4.1 Mucinas	63
4.1.1 Mucinas asociadas a membrana	64
4.1.2 Mucinas secretadas	65
4.2 Modelos <i>in vitro</i> de células mucosecretoras	65
4.2.1 Las células mucosecretoras HT-29 M6	65
4.3 El benzil GalNAc como inhibidor de la <i>O</i> -glicosilación	66
4.4 Efectos del tratamiento con benzil GalNAc en células HT-29 con fenotipo mucosecretor	67
4.4.1 El tratamiento agudo con benzil GalNAc inhibe la sialilación y secreción de mucinas	67
4.4.2 El tratamiento crónico con benzil GalNAc induce la acumulación de vesículas citoplasmáticas conteniendo glicoproteínas apicales	69

OBJETIVOS	73
HIPÓTESIS DE TRABAJO	75
RESULTADOS	
1. DISTRIBUCIÓN DEL ÁCIDO SIÁLICO EN CÉLULAS EPITELIALES	77
Artículo: "Differential distribution of sialic acid in α 2,3 and α 2,6 linkages in the apical membrane of cultured epithelial cells and tissues" <i>F. Ulloa, F.X. Real, J Histochem Cytochem</i> (2001) 49:501-510.	
2. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON BENZIL GaINAc SOBRE CÉLULAS EPITELIALES EN CULTIVO	79
3. EFECTOS DEL BENZIL GaINAc SOBRE EL PROCESAMIENTO DE GLICOPROTEÍNAS EN CÉLULAS HT-29 M6	99
Artículo: "GaINAc- α -O-benzyl Inhibits Sialylation of de Novo Synthesized Apical but Not Basolateral Sialoglycoproteins and Blocks Lysosomal Enzyme Processing in a Post-trans-Golgi Network Compartment" <i>F. Ulloa, C. Francí, F.X.Real, J Biol Chem</i> (2000) 275:18785-18793.	
4. EL TRATAMIENTO CRÓNICO DE CÉLULAS HT-29 M6 E IMIM-PC-1 CON BENZIL GaINAc INDUCE DEFECTOS SIMILARES A LOS QUE OCURREN EN PATOLOGÍAS DE DEPÓSITO LISOSOMAL	105
DISCUSIÓN	119
I. La hiposialilación de glicoproteínas no explica el conjunto de efectos producidos por el tratamiento crónico con benzil GaINAc en células HT-29 M6 e IMIM-PC-1	120
<i>Reducción de la sialilación y acumulación intracelular de glicoproteínas de membrana</i>	120
<i>Reducción de la sialilación y defectos en el procesamiento de enzimas lisosomales</i>	123
II. El tratamiento crónico con benzil GaINAc origina en las células HT-29 M6 e IMIM-PC-1 un fenotipo de depósito lisosomal	124
<i>Las vesículas citoplasmáticas que se acumulan por el tratamiento con benzil GaINAc están relacionadas con endosomas tardíos</i>	124
<i>Benzil GaINAc y enfermedades de depósito</i>	125

III. ¿Es la acumulación de metabolitos derivados de benzil GalNAc responsable de sus efectos celulares?	126
<i>¿Determina el patrón de actividad de glicosiltransferasas la sensibilidad de las células al tratamiento con benzil GalNAc?</i>	129
IV. Mecanismos por los cuales la acumulación de metabolitos glicosilados derivados del benzil GalNAc podrían originar un fenotipo de depósito lisosomal	130
<i>Formación de las vesículas BG</i>	130
<i>Los lípidos ¿jugadores importantes?</i>	132
<i>Acumulación intracelular de glicoproteínas de membrana en células tratadas con benzil GalNAc</i>	132
CONCLUSIONES	137
ANEXO: MATERIALES Y MÉTODOS	139
BIBLIOGRAFÍA	147

ABREVIATURAS

APN	Aminopeptidasa N
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BG	Benzil GalNAc
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albúmina de suero bovino)
CEA	<i>Carcinoembryonic antigen</i> (antígeno carcinoembrionario)
CHO	<i>Chinese ovary hamster</i> [células]
CPE	Carboxipeptidasa E
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DPP-IV	Dipeptidil peptidasa IV
ECV	<i>Endosomal carrier vesicle</i>
EDL	Enfermedades de depósito lisosomal
EGF	<i>Epidermal Growth factor</i> (factor de crecimiento epidérmico)
EGFR	<i>Epidermal Growth factor receptor</i> (receptor del EGF)
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (suero fetal bovino)
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> (isocianato de fluoresceína)
FRT	<i>Fischer rat thyroid</i> [células]
Fuc	Fucosa
Gal	Galactosa
GalCer	Galactosilceramida
GalNAc	<i>N</i> -acetilgalactosamina
GAP	<i>GTP-ase activating protein</i> (proteína activadora de GTPasas)
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i> (factor intercambiador de nucleótidos de guanina)
Glc	Glucosa
GlcCer	Glucosilceramida
GlcN	Glucosamina
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglucosamina
GPI	Anclaje glicosil-fosfatidil inositol
GSI	Gránulos secretorios inmaduros
GSM	Gránulos secretorios maduros
ISSD	<i>Infantile sialic acid storage disease</i> (enfermedad de depósito de ácido siálico infantil)

LBPA	<i>Lysobisphosphatidic acid</i> (ácido lisobisfosfatídico)
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i> (lipoproteína de baja densidad)
LDLR	<i>Low-density lipoprotein receptor</i> (receptor de LDL)
M6P	<i>Mannose-6-phosphate</i> (manosa-6-fosfato)
M6PR	<i>M6P receptor</i> (receptor de M6P)
MAL/MAA	<i>Maackia amurensis lectin/agglutinin</i>
Man	Manosa
MBG	Metabolitos glicosilados derivados del benzil GalNAc
MDCK	<i>Madin-Darby-Canine kidney</i> [células]
Neu5Ac	Ácido 5-acetil neuramínico
NPC	Enfermedad de Niemann-Pick tipo C
PDGFR	<i>Platelet derived growth factor receptor</i> (Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas)
PFA	Paraformaldehído
p-IgR	<i>Polymeric immunoglobulin receptor</i> (receptor de inmunoglobulinas poliméricas)
PNA	<i>Peanut (Arachis hypogaea) agglutinin</i>
RE	Retículo endoplasmático
RER	Retículo endoplasmático rugoso
Sia	Ácido siálico
SNA	<i>Sambucus nigra agglutinin</i>
SNARE	<i>soluble NSF attachment protein receptor</i> (receptor de SNAP)
TCA	Ácido tricloroacético
TGN	<i>Trans-Golgi network</i> (red trans-Golgi)
TRITC	<i>Tetramethylrhodamine isothiocyanate</i> (isocianato de tetrametilrodamina)
Vesículas-BG	Vesículas electron-lúcidas que se acumulan en el citoplasma de células HT-29 M6 e IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc
VNTR	<i>Variable number of tandem repeats</i> (número variable de repeticiones en tándem)
Xil	Xilosa

RESUMEN

El benzil GalNAc fue descrito inicialmente como un inhibidor de la O-glicosilación de tipo mucina (Kuan et al., 1989). El tratamiento crónico de células mucossecretoras HT-29 M6 con este fármaco produjo una serie de efectos entre los que destacan: *i)* reducción de la proliferación, *ii)* inhibición de la secreción de mucinas, *iii)* acumulación de glicoproteínas apicales en vesículas citoplasmáticas electrónlúcidas y, *iv)* reducción de la sialilación de glicoproteínas (Huet et al., 1998; (Hennebicq-Reig et al., 1998). El benzil GalNAc también inducía estos efectos sobre la población HT-29 parental y sobre otras poblaciones celulares derivadas de ésta, independientemente de su fenotipo. El benzil GalNAc es metabolizado a benzil GalNAc-Gal, el cual a su vez inhibe competitivamente la actividad $\alpha 2,3$ sialiltransferasa de células HT-29, la actividad sialiltransferasa mayoritariamente expresada en estas células. Como resultado de esto, se sintetizan compuestos sialilados como benzil GalNAc-Gal $\alpha 2,3$ Neu5Ac (Huet et al., 1995; Delannoy et al., 1996). Por otro lado, el tratamiento con benzil GalNAc no afectaba sensiblemente a las células Caco-2, las cuales expresan fundamentalmente $\alpha 2,6$ sialiltransferasas, enzimas que no son inhibidas por los metabolitos derivados del benzil GalNAc (Huet et al., 1998).

El objetivo de este trabajo ha sido determinar el factor(es) responsable(s) del origen del fenotipo de células HT-29 tratadas crónicamente con benzil GalNAc. Más concretamente, nos interesó determinar cómo un inhibidor de glicosilación produce tantos efectos diferentes y si el efecto de este inhibidor estaba restringido o no a células derivadas de HT-29. La hipótesis que se manejó inicialmente proponía que los efectos globales del tratamiento con benzil GalNAc podrían estar causados por la hiposialilación de glicoproteínas. Esta hipótesis se basaba en el supuesto de que el ácido siálico fuese requerido para el transporte/*sorting* de glicoproteínas apicales. En ausencia de ácido siálico estas glicoproteínas se acumularían en transportadores exocíticos derivados del TGN, los cuales corresponderían a las vesículas citoplasmáticas electrónlúcidas (vesículas-BG).

De manera compatible con esta hipótesis, encontramos, mediante análisis con lectinas, que el ácido siálico ligado en posición $\alpha 2,3$ se distribuía fundamentalmente en la membrana apical de células epiteliales en cultivo y en tejidos. Notoriamente, el ácido siálico ligado en posición $\alpha 2,6$ mostraba una distribución más amplia, pudiendo localizarse tanto en la membrana apical como en la basolateral.

El estudio de los efectos del benzil GalNAc sobre un panel de líneas celulares mostró que la presencia y severidad de los mismos dependían del tipo celular pero no estaban restringidos a células HT-29. Así, en las células IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc se observaron efectos similares a los descritos en células HT-29. Notoriamente, en estas células se acumulaban intracelularmente glicoproteínas apicales, como MUC1, y basolaterales, como β 1 integrina. MUC1 y β 1 integrina colocalizan parcialmente en las mismas vesículas, sugiriendo que éstas no pueden corresponder a estructuras exocíticas, puesto que glicoproteínas apicales y basolaterales se transportan en vesículas diferentes (Keller et al., 2001).

El análisis del procesamiento de glicoproteínas en células HT-29 M6, mostró que el benzil GalNAc afectaba al procesamiento de glicoproteínas apicales y lisosomales. Así, en células tratadas con este inhibidor se inducía un retraso en la maduración de la catepsina D y un bloqueo de la maduración de la α -glucosidasa lisosomal (AAG) en un compartimento ácido post-TGN. En células tratadas con benzil GalNAc, la AAG se procesaba hacia una forma aberrante que migraba entre las formas intermedia y madura esta enzima. Análisis a diferentes concentraciones y tiempos de tratamiento con el inhibidor, mostraron que condiciones experimentales que resultaban en la inhibición de la sialilación no implicaban necesariamente el apareamiento del resto de efectos observados en estas células, indicando, contra lo inicialmente postulado, que la hiposialilación de glicoproteínas no es la causa del fenotipo global de células tratadas con benzil GalNAc.

El tratamiento con benzil GalNAc afectaba a la ruta endosomal en células IMIM-PC-1 y HT-29 M6. Así, el benzil GalNAc inducía una disminución de la endocitosis y la acumulación de material internalizado desde la membrana plasmática en células IMIM-PC-1. En células IMIM-PC-1, este material colocalizaba con las vesículas positivas para MUC1 o β 1 integrina. Marcadores de endosomas tardíos como, Rab7 y LBPA, pero no de endosomas primarios (Rab5, EEA1) y de Golgi (GRASP65, TGN46), colocalizaban con la β 1 integrina de las vesículas. El conjunto de los resultados obtenidos indica que las vesículas-BG corresponden a una población heterogénea de endosomas aberrantes, relacionados con endosomas tardíos.

Las características fenotípicas de las células tratadas con benzil GalNAc reproducen parcialmente los defectos descritos en células de algunas enfermedades de depósito lisosomal (EDL), concretamente las que se producen por la acumulación de sacáridos en compartimentos degradativos. Así, la morfología de las vesículas-BG es similar a la de las que se originan en células tratadas con sacarosa (sacarosomas) y varias EDL como la sialidosis o la *infantile sialic acid storage disease* (ISSD). Análisis del procesamiento de la AAG en fibroblastos de pacientes con ISSD mostraron defectos similares a los encontrados en células HT-29 M6 tratadas con benzil GalNAc. Además, las células tratadas con benzil GalNAc también acumulan LBPA y colesterol, hallazgos característicos de algunas EDL. Confirmando la idea de que el benzil GalNAc induce un fenotipo de depósito lisosomal, el tratamiento con sacarosa en células IMIM-PC-1 produjo cambios sobre la

morfología de las células y la acumulación intracelular de MUC1 y β 1 integrina, de manera semejante a lo observado en las células tratadas con benzil GalNAc. La sialilación de glicoproteínas en células IMIM-PC-1 tratadas con sacarosa no estaba alterada, resultado que indica que la hiposialilación no es un requisito para la acumulación intracelular de glicoproteínas de membrana.

Dado que células tratadas con benzil GalNAc acumulan una gran cantidad de oligosacáridos derivados de esta droga, situación análoga a la que ocurre en células tratadas con sacarosa y algunas EDL, proponemos que la acumulación de estos metabolitos, y no la hiposialilación de glicoproteínas, es la que origina el fenotipo global de células HT-29 M6 e IMIM-PC-1 tratadas con este fármaco.

INTRODUCCIÓN

1. GENERALIDADES DEL TRÁFICO DE MEMBRANAS

A diferencia de las células procariotas, las células eucariotas poseen orgánulos rodeados de membrana que les permiten compartimentalizar numerosos procesos. Uno de éstos es el de la síntesis, modificación y clasificación de las proteínas que serán secretadas al medio extracelular y de aquellas que formarán parte del sistema de endomembranas (ruta secretora). Por otra parte, las células internalizan compuestos del medio y los envían hacia diferentes destinos (ruta endocítica). Como se puede apreciar en la figura 1, las rutas secretora y endocítica constan de varios compartimentos entre los que existe un constante transporte de material, el cual se realiza de forma altamente específica y regulada (ver Alberts et al., 2002).

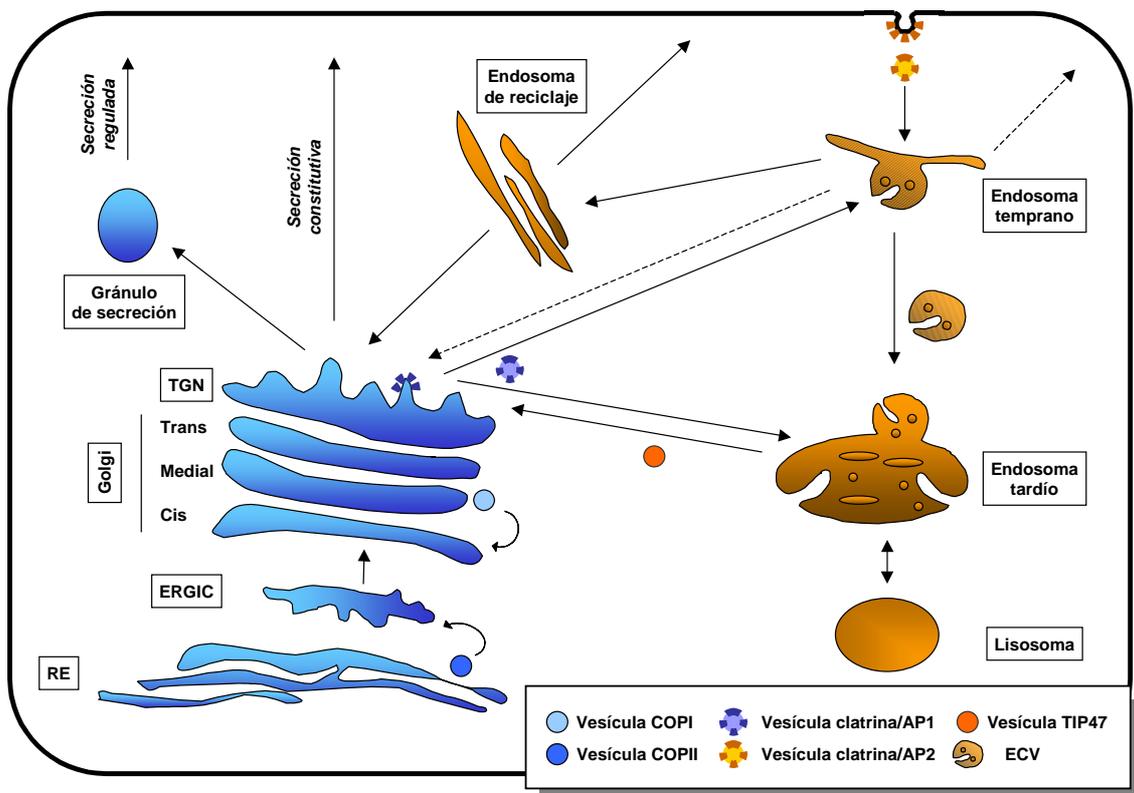


Figura 1.1 Compartimentos de la ruta secretora (azul) y endocítica (ocre) de una célula de mamífero "tipo". Las flechas indican las principales rutas de transporte de materiales que se realizan entre los diferentes compartimentos. ECV: *endosomal carrier vesicle*, RE: retículo endoplasmático, TGN: *trans-Golgi network* (adaptado de Gu y Gruenberg, 1999).

Ruta secretora: en ésta, las proteínas sintetizadas en los ribosomas adheridos al retículo endoplasmático rugoso (RER) son transportadas a través de la bicapa lipídica hacia la luz de este orgánulo. En la luz se inicia la *N*-glicosilación, la oligomerización y el plegamiento correcto de las proteínas. Mecanismos de control de calidad determinan que las proteínas que no se pliegan correctamente sean enviadas al citosol, donde se degradan rápidamente. Posteriormente, las proteínas viajan al compartimento intermediario ERGIC (*Endoplasmic Reticulum - Golgi intermediate compartment*) y a las cisternas del Golgi (*cis*, *medial* y *trans*). Aquí sufrirán modificaciones adicionales (p. ej. *N*- y *O*- glicosilación, fosforilación, proteólisis); en el *trans*-Golgi network (TGN) las proteínas serán clasificadas y enviadas hacia sus diferentes destinos: la membrana plasmática (apical y basolateral), medio extracelular, gránulos de secreción o compartimentos del sistema endosomal. Al mismo tiempo, las proteínas residentes en los compartimentos de la ruta secretora, como por ejemplo numerosas glicosiltransferasas, se transportan también en dirección retrógrada con el fin de mantener estable la composición de dichos compartimentos.

Ruta endocítica: las células internalizan sustancias del medio extracelular a través de múltiples mecanismos que implican la invaginación de la membrana plasmática. El más conocido es la internalización de ligandos a través de receptores. El material internalizado llega primero a los endosomas tempranos cuyo pH ligeramente ácido favorece el desacoplamiento de los ligandos de sus receptores. Los receptores son enviados hacia endosomas de reciclaje, desde donde serán transferidos hacia la membrana celular para proseguir con nuevas rondas de internalización. En cambio, los ligandos y el material de fluido son transportados hacia los endosomas tardíos y, posteriormente, hacia los lisosomas donde son degradados. Hasta el momento no está claro si los compartimentos endocíticos corresponden a orgánulos estables o, si por el contrario, son compartimentos que sufren un proceso de “maduración” a través del cual su composición y propiedades se modifican paulatinamente hasta convertirse en lisosomas.

Tráfico vesicular: actualmente se piensa que casi todo el transporte que se realiza en o entre las rutas secretora y endocítica, se realiza a través de estructuras rodeadas de membrana cuya morfología puede ser vesicular, tubular o túbulo-vesicular. Las principales rutas de tráfico de membranas existentes en las células y, las estructuras transportadoras que las median, están resumidas en la tabla 1.1. La vida de una vesícula de transporte se puede dividir en varias etapas, de las cuales sólo se tiene una amplia información para algunos tipos de vesículas con cubierta (sección 1.3). Inicialmente se forma la vesícula por gemación y fisión de la membrana del compartimento donador. En esta etapa la carga se incorpora específicamente a la vesícula de transporte. Las proteínas de la cubierta son las responsables tanto de deformar la membrana para originar la vesícula como de reclutar la carga. Posteriormente, la vesícula viaja a su destino, normalmente a través de su asociación con proteínas motoras del citoesqueleto, donde es reconocida por proteínas que la anclan específicamente a la membrana aceptora (*tethering* y *docking*). Finalmente, la vesícula fusiona su

membrana con la membrana aceptora y libera la carga, pasos para los que es necesario que la vesícula haya perdido previamente su cubierta.

Tabla 1.1 Principales rutas de tráfico de membranas y sus transportadores en una célula "tipo"

RUTA DE TRANSPORTE	ESTRUCTURA DE TRANSPORTE	EJEMPLO
Ruta secretora		
RE - Golgi	Vesícula COPII	Proteínas de secreción
Transporte anterógrado entre las cisternas del Golgi	- [maduración cisternal] ¿Vesícula COPI? ¿Megavesícula?	Proteínas de secreción
Transporte retrógrado entre cisternas del Golgi	Vesícula COPI	Glicosiltransferasas residentes del Golgi
Golgi - RE	Vesícula COPI	Proteínas residentes del RE
TGN - membrana plasmática	Estructuras vesiculares y tubulares	Proteínas de secreción
TGN - endosomas	Vesícula clatrina/AP1 Vesícula clatrina/GGA Vesícula AP3 ¿Vesícula AP4?	M6PRs. Proteínas lisosomales
Ruta endocítica		
Membrana plasmática - endosoma primario	Vesícula clatrina/AP2 Caveolas Otras	Material internalizado de la membrana plasmática
Endosoma primario - endosoma de reciclaje	¿Estructuras tubulares?	Material a ser reciclado hacia la membrana plasmática o el TGN
Endosoma de reciclaje- membrana plasmática	¿Estructuras tubulares?	Receptores de membrana
Endosoma primario - endosoma tardío	ECV	Material destinado a la degradación
Endosoma tardío - Lisosoma	- [fusión directa]	Material destinado a degradación. Proteínas lisosomales
Endosoma primario/endosoma de reciclaje - TGN	¿?	TGN46
Endosoma tardío - TGN	Vesícula TIP47 Otras	M6PRs, furina

El tráfico de las vesículas de transporte está regulado al menos a tres niveles: *i*) especificidad, tanto del *cargo* como de la dirección del transporte (compartimento donador-aceptor), *ii*) coordinación entre el transporte anterógrado y retrógrado para mantener la composición de los compartimentos y la homeostasis general del sistema de endomembranas y, *iii*) coordinación con otros procesos celulares. Existen numerosas moléculas involucradas en esta regulación, entre las que destacan proteínas G

heterotriméricas y miembros de GTPasas pequeñas de la superfamilia de Ras, como por ejemplo las proteínas Rab y, algunos lípidos, como por ejemplo, los fosoinositoles.

Especificidad en el tráfico de membranas: una característica fundamental del transporte de materiales en las células es su alta especificidad. Así, un hecho común en las rutas secretora y endocítica es que en determinados compartimentos, como el TGN o los endosomas, las células reconocen la identidad de los materiales transportados, segregan los unos de los otros y los envían específicamente a diferentes destinos celulares. Los mecanismos moleculares que operan en estos procesos de *sorting* y *targeting* se conocen bien para las proteínas de algunas rutas de transporte. Por el contrario, el conocimiento de los mecanismos de *sorting* de lípidos aún es incipiente. En general, la presencia de determinadas señales, las cuales son reconocidas normalmente por alguna proteína que forma parte o que puede interactuar con elementos de la cubierta de las estructuras de transporte, como por ejemplo los complejos adaptadores, determina el destino de las proteínas. Las señales de *sorting* pueden consistir en secuencias aminoacídicas, conformaciones estructurales o modificaciones postraduccionales. Para algunas proteínas se ha sugerido que su asociación con microdominios de membrana específicos estaría implicada en su *sorting*. Se ha descrito la existencia de señales para el *sorting* de proteínas en la mayoría de las rutas de tráfico vesicular. Sin embargo, para algunas de ellas, como por ejemplo la ruta de endosomas tempranos-endosomas de reciclaje-membrana plasmática, no se han encontrado evidencias de que el transporte de proteínas dependa de algún tipo de señal específica. Por otra parte, la maquinaria encargada del transporte de materiales, además de tener la capacidad de reconocer y seleccionar específicamente a la carga, debe poder llevarla a sus destinos concretos. Los mecanismos que participan en determinar la especificidad de estos procesos se conocen relativamente poco: se ha propuesto la implicación de proteínas asociadas a las membranas de los diferentes compartimentos de la ruta secretora/endocítica entre las que destacan las GTPasas pequeñas Rab y sus efectores (sección 1.2) y las proteínas SNARE (sección 1.3.4). Éstas proteínas median, el reconocimiento (*tethering* y *docking*) y fusión de las vesículas de transporte con su membrana diana, respectivamente. Hasta el momento, no se ha determinado con detalle cómo estas proteínas se distribuyen específicamente en los diferentes orgánulos.

1.1 Tipos de vesículas de transporte: existe una gran diversidad de estructuras de transporte de materiales que conectan los diferentes compartimentos celulares. De entre éstas, las mejor descritas, y a las que nos referiremos a continuación, son algunos tipos de vesículas con cubierta (revisado en Kirchhausen, 2000).

1.1.1 Vesículas recubiertas de clatrina: estas vesículas se pueden generar en la membrana plasmática, donde participan en la endocitosis mediada por receptores, y en el TGN, donde median el transporte de proteínas hacia los endosomas. Las vesículas de clatrina formadas en la membrana plasmática se asocian al complejo adaptador AP2 y las formadas en el TGN al AP1. Tienen una gran

complejidad estructural; aproximadamente se han descrito unas 25 proteínas diferentes asociadas a este tipo de vesículas. Se caracterizan por contener clatrina, cuya unidad básica, denominada *triskelion*, consiste en tres cadenas pesadas (HCs) de 192 kDa, cada una de las cuales está unida a una cadena ligera (LCa o LCb), de aproximadamente 30 kDa (revisado en Hirst y Robinson, 1998; Schmid, 1997). La clatrina polimeriza y da lugar a una estructura poliédrica que confiere la forma característica a este tipo de vesículas. Interactúa con una gran variedad de proteínas, entre las que se incluyen las subunidades β de los complejos adaptadores, β -arrestina, que actúa como una molécula adaptadora para los receptores acoplados a proteínas G (*G-coupled*), y anafisina, que se ha propuesto actúa en el reclutamiento de dinamina al "cuello" de las vesículas clatrina/APs (para más detalles ver Kirchhausen, 2000). Actualmente se cuenta con una detallada descripción de la estructura de la clatrina y de sus interacciones con otras proteínas gracias a estudios de cristalografía de rayos X y crioelectromicroscopía electrónica (revisado en Owen y Luzio, 2000).

Complejos adaptadores: hasta el momento se han descrito cuatro complejos adaptadores distintos (AP1-4). Cada complejo adaptador consta de 4 subunidades denominadas adaptinas; dos de entre 100-200 kDa, de las cuales una es muy conservada (β) y la otra es más variable (γ , α , δ y ε para AP1, AP2, AP3 y AP4 respectivamente), una de 50 kDa (μ) y otra de 20 kDa (σ) (ver tabla 1.2).

Tabla 1.2 Complejos adaptadores

Complejo	Localización	Sensibilidad a la BFA ¹	Función	Composición	Interacciones
AP-1	TGN endosomas	+	Targeting endosomal	γ $\beta 1$ $\mu 1A$ $\sigma 1A$?	PACS-1 Motivos dileucina, clatrina Motivos tirosina y dileucina, Nef
AP-1B	TGN	?	Targeting basolateral	$\beta 1?$ $\mu 1B$ $\sigma 1A?$ α	Motivos tirosina
AP-2	Membrana plasmática	-	Internalización	$\beta 2$ $\mu 2$ $\sigma 2$	Anafisina, Eps15, epsina, AP180 Motivos dileucina, clatrina Motivos tirosina y dileucina, Nef
AP-3	TGN, endosomas	+	Targeting endosomal/lisosomal	δ $\beta 3A/B$ (bNAP) $\mu 3$ $\sigma 3A/B$	¿Clatrina? Motivos tirosina
AP-4	TGN	+	Targeting endosomal/lisosomal (?) Targeting basolateral (?)	ε $\beta 4$ $\mu 4$ $\sigma 4$	Motivos tirosina

(1) La brefeldina A (BFA) es una toxina fúngica que inhibe las GEF de varias ARF (revisado en Chardin y McKormick, 1999) Adaptado de Rohn et al. (2000)

Las APs se expresan ubicuamente en todos los tejidos analizados. En mamíferos, existen isoformas de las subunidades $\beta 3$ y $\mu 3$ específicas de cerebro ($\beta 3A$ y $\mu 3A$) y del resto de los tejidos ($\beta 3B$ y $\mu 3B$), mientras que se ha descrito una isoforma de la subunidad $\mu 1$ específica de células epiteliales ($\mu 1B$). Por otra parte, se han identificado dos familias de proteínas monoméricas relacionadas con adaptinas conocidas como proteínas GGAs (*Golgi-localized, γ ear-containing, ARF-binding proteins*) y estoninas (*stonins*), que podrían también estar implicadas en el transporte vesicular. Así, las GGAs pueden mediar el reclutamiento de clatrina al TGN y el transporte hacia los endosomas de M6PR y sortilina (Puertollano et al., 2001a, 2001b; Nielsen et al., 2001; revisado en Robinson y Bonifacino, 2001; Boehm y Bonifacino, 2001).

La función de los complejos adaptadores se ha definido con detalle para AP1 y AP2. Éstos son los responsables de reclutar a la clatrina hacia la membrana, a otras proteínas que constituyen las vesículas y a proteínas cargo que contengan en su secuencia citoplasmática motivos basados en tirosina o dileucina. La asociación adaptinas a otras moléculas de clatrina es altamente sensible a diversos factores como por ejemplo, la fosforilación y el pH (Hirst y Robinson, 1998). AP3 y AP4 forman parte de vesículas cuya función y estructura aún están pobremente caracterizadas. AP3 participaría en el transporte de algunas proteínas desde el TGN hacia los lisosomas y orgánulos derivados de ellos, como por ejemplo los melanosomas (revisado en Lloyd et al., 1998). Aunque se piensa que AP4 también actuaría también en esta ruta, recientemente, se la ha involucrado en el transporte de proteínas basolaterales (Simmen et al., 2002). Las vesículas que contienen AP4 probablemente no están recubiertas de clatrina y, en el caso de las vesículas que contienen AP3, este es aún un hecho controversial (para detalles, ver Boehm y Bonifacino, 2001).

1.1.2 Vesículas COPI: las vesículas COPI participan en el transporte retrógrado en el Golgi y existe controversia acerca de su papel en el transporte anterógrado en el Golgi. Su cubierta está formada por siete proteínas (α , β , β' , γ , δ , ϵ y ζ) (Waters et al., 1991), las cuales forman un complejo citosólico, denominado coatómero, que se transloca a las membranas diana después que lo haya hecho el factor ARF1 (ver sección 1.3.1). El coatómero puede unirse a motivos KKXX propios de proteínas residentes del RE (Cosson y Letourneur, 1994). Componentes del sistema COPI, sin las subunidades γ y δ , han sido involucrados en la formación de ECV (*endosomal carrier vesicles*) del sistema endosomal (revisado en Gu y Gruenberg, 1999).

1.1.3 Vesículas COPII: este tipo de vesículas media el transporte anterógrado de proteínas entre el retículo endoplasmático y el Golgi. La cubierta de las vesículas COPII está formada por los complejos Sec13/31 y Sec23/24, que se unen a la membrana del RER junto a la GTPasa Sar1p (Barlowe et al., 1994; revisado en Kuehn y Schekman, 1997). Estudios en células vivas sugieren que las vesículas COPII se forman en regiones específicas del RE, las cuales están desprovistas de ribosomas (Stephens et al., 2000).

1.2 GTPasas pequeñas: comprenden un grupo de proteínas monoméricas (20 - 40 kDa) con actividad GTPasa que en su estado activo están unidas a GTP y en su estado inactivo están unidas a GDP, actuando como auténticos interruptores moleculares. El ciclo de las GTPasas está controlado por reguladores positivos y negativos. Entre los primeros destacan las proteínas GEF (*guanine nucleotide exchange factor*), las cuales estimulan la actividad intercambiadora de nucleótidos de las GTPasas y favorecen el reemplazo de GDP por GTP. Entre los reguladores negativos se encuentran las proteínas GAP (*GTP-ase activating protein*) las cuales estimulan la actividad GTPasa por lo que promueven la conversión de GTP a GDP. La actividad de estos factores reguladores, que pueden ser específicos para cada GTPasa, puede estar a su vez modulada por múltiples vías de señalización (revisado en Takai et al., 2001).

Dos familias de GTPasas pequeñas, Rab y Arf/Sar1, están íntimamente relacionadas con el tráfico vesicular. Las proteínas Rab regulan diversas etapas del tráfico vesicular, entre las que destacan el transporte de vesículas y su reconocimiento inicial por la membrana diana mientras que las proteínas Arf/Sar1 están involucradas en los procesos de formación de vesículas a partir de la membrana donadora. Otras GTPasas pequeñas, miembros de la familia Rho, regulan la dinámica del citoesqueleto de actina, por lo que también juegan un papel crucial en la regulación del tráfico de membranas (revisado en Takai et al., 2001).

Proteínas Rab: las Rab constituyen la familia más grande de las GTPasas pequeñas. Se localizan en la cara citoplasmática de diferentes compartimentos y contribuyen a determinar la dirección del transporte y fusión de las vesículas. La mayoría de las proteínas Rab están asociadas a la membrana a través de dos grupos geranil en, o cerca de, su región C-terminal. Los cambios conformacionales de las formas Rab-GDP a Rab-GTP determinan sus interacciones con otras moléculas. Solo las formas unidas a GTP están asociadas a membrana (revisado en Pfeffer, 2001; Segev, 2001; Zerial y McBride, 2001; Novick y Zerial, 1997). En el *steady state*, la mayor parte de una proteína Rab está asociada a membrana aunque entre el 10 - 50% puede ser detectado en el citosol (Schimmöller et al., 1998).

Las primeras proteínas Rab (Sec4p y Ypt1p) fueron identificadas en levaduras (Salminen y Novick, 1987; Gallwitz et al., 1983). Las proteínas Rab (*Ras genes from rat brain*) de levaduras se conocen como Ypts (*Yeast protein transport*). Actualmente se han descrito 11 Rab diferentes en *Saccharomyces cerevisiae* y alrededor de 60 en mamíferos (Pereira-Leal y Seabra, 2000; Bock et al., 2001). Esta complejidad se correlaciona con la diversidad de las rutas de transporte vesicular por lo que se considera que las proteínas Rab son claves en la determinación de la especificidad de estas rutas. De este modo, y dado que las diferentes Rab se localizan en compartimentos celulares específicos, es posible que cada tipo/evento de transporte vesicular sea dependiente de proteínas Rabs específicas (Zerial y McBride, 2001). Además, algunas Rab se expresan en determinados tipos celulares y regulan eventos de transporte que no son compartidos por todos los tipos celulares: así

por ejemplo, Rab3A está involucrada en la secreción regulada en neuronas y células neuroendocrinas (Novick y Zerial, 1997). Los mecanismos que determinan la distribución específica de las proteínas Rab en la célula no son bien conocidos, aunque se ha descrito que ésta es dependiente de secuencias hipervariables presentes en su región C-terminal (Chavrier et al., 1991; revisado en Pfeffer, 2001).

Tabla 1.3 Ejemplos de proteínas Rab

Rab	Localización principal	Función	Efectores
Rab1	RE y Golgi	Transporte RE-Golgi	p115, PRA1
Rab3	Gránulos de secreción Vesículas sinápticas (Rab3A)	Secreción regulada	Rabfilina 3, RIM1, RIM2, Calmodulina
Rab4	Endosomas de reciclaje	<i>Sorting</i> y reciclaje	Rabaptina-5, Rabaptina-5 β , Rabaptina-4
Rab5	Membrana plasmática, Vesículas de clatrina Endosomas tempranos	Captura del ligando a nivel de la membrana plasmática Fusión de endosomas Motilidad de endosomas	EEA1, p150, p110 β , Rabenosina-5, Rabaptina-5, Rabaptina-5 β
Rab6	Golgi	Transporte retrógrado en el Golgi Transporte Golgi-RE	Rabkinesina-6
Rab7	Endosomas tardíos	Transporte endosomas tempranos-endosomas tardíos Transporte endosomas tardíos-lisosomas	RILP
Rab8	Vesículas exocíticas (basolaterales en células polarizadas)	Transporte TGN-membrana plasmática	Rab8IP
Rab9	Endosomas tardíos	Transporte endosomas tardíos-Golgi	p40
Rab11	Golgi Endosomas de reciclaje	Exporte desde el Golgi via endosomas Reciclaje apical y basolateral	Rab11BP
Rab13	Uniones estrechas (en células epiteliales)	Involucrado en la formación de las uniones estrechas	δ -PDE
Rab15	Endosomas tempranos Endosomas de reciclaje	Inhibidor de la internalización endocítica	
Rab17	Endosoma de reciclaje apical (específica de células epiteliales)	Transporte a través de endosomas de reciclaje apical Trancitosis	

Adaptado de Zerial y McBride (2001)

La participación de las proteínas Rab en procesos como la gemación de vesículas, la interacción de las vesículas y orgánulos con elementos del citoesqueleto y el *tethering/docking* previos a la fusión al compartimento aceptor, ha sido ampliamente demostrada (revisado en Pfeffer, 2001). La actividad de las Rab, así como de la de las otras GTPasas, depende de su capacidad de activar proteínas efectoras específicas, las cuales también se distribuyen específicamente en los compartimentos de la ruta secretora/endocítica (para más detalles de las funciones descritas de las diferentes Rabs y sus correspondientes efectores/proteínas reguladoras ver las revisiones recientes de Zerial y McBride, 2001; Segev, 2001).

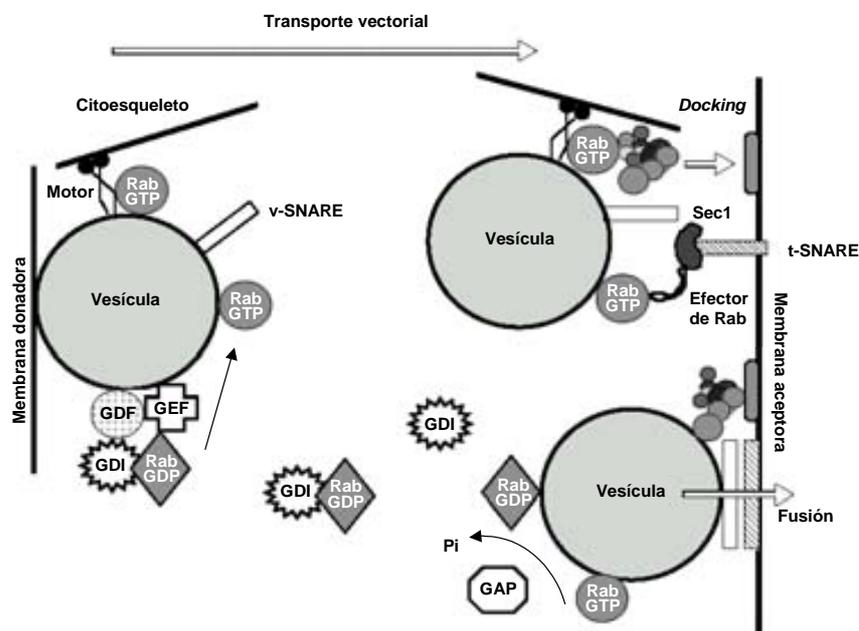


Figura 1.2 Ciclo de las proteínas Rab. El modelo tradicionalmente aceptado del ciclo de las proteínas Rab propone básicamente que estas proteínas se unen a la vesícula de transporte a nivel del compartimento donador, viajan con ella hasta el compartimento aceptor donde la vesícula de transporte se fusiona y, finalmente, reciclan hacia el compartimento donador por medio de un intermediario citosólico. Las proteínas Rab son mantenidas en el citosol en su forma inactiva, unida a GDP, por la acción de las GDI (*GDP-dissociation inhibitor*), proteínas que además tienen la habilidad de extraer de la membrana a las Rab-GDP y previenen su unión indiscriminada a las membranas. El proceso de unión de las Rab-GDP citosólicas a la membrana del compartimento donador está facilitado por proteínas GDF (*GDI-displacement factor*). Posteriormente, las GEF catalizan el intercambio de GDP por GTP dando como resultado Rab-GTP. En esta forma, las proteínas Rab activan una serie de efectores que median diversos procesos en el transporte de vesículas. Finalmente, las GAP facilitan la conversión de Rab-GTP en Rab-GDP, siendo ésta extraída de la membrana por las GDI, lo que inicia de nuevo el ciclo (tomado de Chavrier y Gould, 1999).

1.3 Etapas de la vida de una vesícula

1.3.1 Formación de una vesícula: este proceso, que está bastante bien definido para las vesículas con cubierta, responde a un patrón general, cuyos pasos están descritos con detalle en la tabla 1.4 (revisado en Kirchhausen, 2000; Springer et al., 1999). Brevemente, para formar una vesícula, las proteínas citosólicas de la cubierta se ensamblan sobre la membrana donadora y la deforman hasta originar una yema. Este ensamblaje se realiza por oligomerización secuencial de los componentes de la cubierta y es iniciado por el reclutamiento de una GTPasa pequeña de la familia Arf/Sar1 - unida a GTP - sobre la membrana donadora. Posteriormente, las proteínas cargo son redistribuidas hacia la vesícula en gemación y finalmente, ésta se separa de la membrana donadora.

Tabla 1.4 Etapas en la formación de vesículas

	COPII	COPI	CLATRINA
I. Iniciación			
Activación de la GTPasa y unión a la membrana	Sar1p-GDP es reclutado al RE por una GEF transmembrana (Sec12p) y es convertido a Sar1p-GTP	ARF1-GDP es reclutado al Golgi por GEFs solubles (Gea1p y Gea2p), probablemente se une a la membrana del Golgi y es convertido a ARF1-GTP	TGN ARF1-GTP es reclutado a la membrana del TGN mediante un mecanismo no conocido Membrana plasmática No conocido
Reclutamiento de la carga y v-SNARE	a. Sar1p-GTP recluta al complejo Sec23p-Sec24p b. Sec23p-Sec24p se une a miembros de la familia p24 -posiblemente receptores del cargo- y junto con Sar1p se une a v-SNAREs (Bet1p, Bos1p)	a. ARFGAP se une a ARF1-GTP y al receptor transmembrana KDEL b. ARF-GTP junto con las proteínas cargo que contienen motivos KKXX o KXXXX en la región C-terminal reclutan coatómeros COPI citosólicos	TGN a. ARF1-GTP recluta al adaptador AP1 a la membrana del TGN b. AP1 se une a receptores de membrana que contengan motivos YppØ y LL Membrana plasmática a. Reclutamiento de AP2 a las membranas plasmáticas y endosomales. ATP, GTP y fosfoinosítoles requeridos. Mecanismo desconocido b. AP2 une a la proteína de membrana sinaptotagmina c. AP2 une a los receptores de membrana conteniendo motivos YppØ y LL
Comienzo del ensamblaje de la cubierta	El complejo citosólico Sec13p-Sec31p se une al preunido Sec23p-Sec24p		Reclutamiento de la clatrina citosólica a los complejos AP1 o AP2 previamente unidos
II. Propagación			
Pérdida de la GTPasa	Hidrólisis de Sar1p-GTP (incrementada 30 veces por Sec23p). Se libera Sar1p-GDP el cual es usado en ciclos posteriores	Hidrólisis de ARF-GTP (incrementado 1000 veces por ARFGAP y COPI). Se libera ARF-GDP el cual es usado en ciclos posteriores. La tasa de hidrólisis depende de la secuencia del motivo C-terminal del cargo	No conocido
Continuación del reclutamiento del cargo y del ensamblaje de la cubierta	Crecimiento de la cubierta por incorporación secuencial de otros elementos de la cubierta. Proteínas cargo de membrana difunden lateralmente y son capturadas por la cubierta en formación		Membrana plasmática a. Asociación de AP2 con clatrina o fosfoinosítidos incrementa la afinidad de AP2 por motivos YppØ b. La β-arrestina recluta a la cubierta de clatrina a receptores con 7 dominios transmembrana acoplados a proteínas G c. El borde en crecimiento de la capa de clatrina contiene AP2 unido a Eps15
Deformación de la membrana		Proceso continuo que está acoplado al del crecimiento de la cubierta	
III. Gemación de la vesícula	No se requieren otras proteínas <i>in vitro</i> . La energía para la escisión de la membrana es provista por la polimerización de la cubierta		a. La anfifisina se une a la clatrina y al AP-2 y actúa como receptor de dinamina b. Reclutamiento de dinamina-GDP en el cuello de la vesícula, la cual polimeriza en un anillo. No se conoce una GEF de dinamina c. Reclutamiento de endofilina al anillo. La deformación y fisión de la membrana es facilitada por el acoplamiento de la actividad acil-transferasa de la endofilina y la constricción del cuello de la vesícula provocada por el anillo de dinamina d. La dinamina de los anillos actúa como su propia GAP-dinamina. La hidrólisis de GTP libera la dinamina para otro ciclo
IV. Desensamblaje de la cubierta	Espontáneo (?) (Seguido de la hidrólisis del GTP de Sar1p)	Espontáneo (?) (Seguido de la hidrólisis del GTP de ARF1)	Membrana plasmática a. Hsc70-ATP y auxilina se unen a la cubierta de clatrina y conducen el desensamblaje (mecanismo desconocido) b. Una fracción de AP2 puede ser disociado de las membranas por Hsc70-ATP y un factor citosólico desconocido c. La fosforilación de AP2 (subunidad β) previene su asociación con clatrina d. La Sinaptoyannina es requerida para la liberación eficiente de las cubiertas

Tomado de Kirchhausen (2000)

Las proteínas de la membrana donadora juegan un papel importante en la formación de la cubierta, puesto que pueden funcionar como receptores tanto para proteínas de la cubierta como para proteínas *cargo* solubles, conectando de este modo la formación de la vesícula de transporte con el *sorting* de proteínas. Una vez formada la yema, la vesícula se debe liberar de la membrana donadora por fisión. Este proceso puede ser aparentemente facilitado por las propias proteínas de la cubierta, como en el caso de las vesículas COP, o depender de procesos más complejos, como es el caso de las vesículas de clatrina. En éstas, la escisión de la vesícula se logra por la formación, alrededor del cuello de la vesícula, de un anillo de la GTPasa dinamina y proteínas asociadas (Sever et al., 2000).

1.3.2 Transporte de vesículas: aunque las vesículas se pueden trasladar por difusión simple, se ha visto que éstas pueden usar elementos del citoesqueleto, como filamentos de actina o microtúbulos, para viajar a sus destinos. El transporte basado en filamentos de actina es lento (aprox. $0,1 \mu\text{m/s}$) y por lo general se hace sobre distancias cortas, mientras que el movimiento a lo largo de los microtúbulos es relativamente rápido (aprox. $1 \mu\text{m/s}$) y puede ocurrir sobre distancias largas (Apodaca, 2001). El movimiento de las vesículas a lo largo de las fibras del citoesqueleto requiere de proteínas motoras que unen a las vesículas y generan un movimiento direccional acoplado a la hidrólisis de ATP (Kamal y Goldstein, 2002). Las proteínas motoras responsables del movimiento asociado a filamentos de actina son las miosinas, mientras que las de microtúbulos son las kinesinas, las cuales median el transporte hacia el extremo (+) de los microtúbulos, y las dineínas, que lo hacen hacia el extremo (-) (revisado en Goodson et al., 1997; Hirokawa et al., 1998; Lippincott-Schwartz y Cole, 1995). En células no polarizadas, el extremo (-) está localizado hacia la región central de las células, en el centro organizador de microtúbulos, mientras que el extremo (+) está dirigido hacia la periferia celular. En células polarizadas, el extremo (-) se localiza hacia la región basolateral y el (+) hacia la región apical de las células (Kamal y Goldstein, 2000).

Para la mayoría de los tipos vesiculares, el cómo se establece la direccionalidad del tráfico y el modo por el que interaccionan las vesículas con las proteínas motoras del citoesqueleto, no están del todo bien definidos. Sin embargo, se conocen algunos ejemplos de interacciones entre proteínas motoras y proteínas de la cubierta de las vesículas [p. ej. la kinesina KIF3A con AP1 (Nakagawa et al., 2000)]; proteínas *cargo* [p. ej. la cadena ligera de dineína Tctex-1 con rodopsina (Tai et al., 1999)], y otras proteínas vesiculares como proteínas Rab [p. ej. la kinesina rabkinesina-6 con Rab 6 (Echard et al., 1998), o miosina Vb con Rab 11a (Lapierre et al., 2001)], que ilustran como se podría llevar a cabo este proceso (para detalles, ver Kamal y Goldstein, 2002, 2000). Las Rab jugarían un papel muy interesante, porque permitirían conectar etapas tales como la formación de las vesículas, su transporte y la especificidad del *targeting* (Hammer y Wu, 2002). Recientemente, se han descrito eventos de transporte vesicular dependientes de actina en los que no participan proteínas motoras. En éstos la energía que conduce al movimiento se origina a partir de la polimerización de actina en un extremo de la vesícula (u orgánulo) (revisado en Taunton, 2001).

1.3.3 *Tethering* y *docking* de vesículas: la especificidad del tráfico vesicular depende, en parte, de factores de *tethering* y *docking* que unen las vesículas a las membranas diana previamente a su fusión. Por definición, los factores de *tethering* median la unión inicial de vesículas (u orgánulos) (enlaces >25 nm con respecto a la membrana) mientras que los factores de *docking* median uniones más estables (enlaces sobre distancias < 5-10 nm) (Pfeffer, 1999). Sin embargo, estos términos se usan a veces en la literatura indistintamente. Hasta el momento, se han descrito en células de mamífero los factores de *tethering/docking* involucrados solo en algunas etapas del transporte vesicular (para ejemplos ver más adelante). El reclutamiento y regulación de estos factores está determinado fundamentalmente por la actividad de proteínas Rab (Pfeffer, 1999).

Entre los factores de *tethering* mejor descritos destaca la p115, una proteína periférica asociada a las membranas del Golgi, que interviene en el transporte intra-Golgi (Waters et al., 1992). p115 forma dímeros que adoptan una estructura semejante a las miosinas, con dos cabezas globulares y una larga cola. Esta forma es adecuada para su función como factor de *tethering*, puesto que las cabezas podrían asociarse a las vesículas de transporte y su cola flexible le permitiría aproximar las vesículas a sus dianas (revisado en Guo et al., 2000). Entre los factores de *docking* mejor caracterizados están el exocisto, un complejo macromolecular identificado inicialmente en levaduras que interviene en el *tethering/docking* de vesículas basolaterales (revisado en Hsu et al., 1999) y, EEA-1 y el complejo Rabaptina-5, involucrados en la fusión homotípica de endosomas tempranos (revisado en Woodman, 2000). El hallazgo de que proteínas del complejo Sec34/Sec35, implicados en procesos de *tethering* de vesículas en el Golgi, están relacionadas con las proteínas que forman el complejo del exocisto, sugiere la existencia de una familia de complejos de *tethering/docking* que intervendrían en múltiples etapas del transporte vesicular (Whyte y Munro, 2001).

1.3.4 Fusión de vesículas: la fusión de vesículas involucra la mezcla de las bicapas lipídicas de la membrana donadora y la aceptora, la cual no se produce espontáneamente. La mayor parte de los eventos de fusión de membranas que se dan en la célula requieren de un grupo de proteínas de membrana denominadas SNARE. Estas proteínas poseen un dominio característico de unos 60 aminoácidos, conocido como motivo SNARE, que media la asociación de las SNAREs en complejos (Jahn y Südhof, 1999). Hasta el momento se han descrito en mamíferos cerca de 30 SNAREs las cuales tienden a localizarse en compartimentos específicos (revisado en Hay, 2001). El modelo SNARE, propuesto por Rothman y cols. (Rothman, 1994; Söllner et al., 1993) para describir el mecanismo y especificidad de la fusión de vesículas, supone que una SNARE de la vesícula donadora, denominada en términos generales v-SNARE (*vesicle* SNARE), sería reconocida específicamente por otra SNARE en la membrana aceptora, llamada t-SNARE (*target* SNARE). Entre las v-SNAREs identificadas destacan las proteínas de la familia VAMP (*vesicle associated membrane protein*) y, entre las t-SNAREs, las sintaxinas y la SNAP-25 (*synaptosome associated protein of 25 kDa*). Debido a que la distinción de v- y t- SNAREs puede ser ambigua en algunos casos, como por

ejemplo en las fusiones homotípicas, y a que las características estructurales de las SNARES pueden no estar correlacionadas con su localización, actualmente se tiende a clasificar a las SNARES en Q- y R- SNARES, según si el residuo central del motivo SNARE es una glutamina o una arginina respectivamente (Fasshauer et al., 1998; para detalles, ver Chen y Scheller, 2001; Jahn y Südhof, 1999).

Actualmente se sabe que el complejo SNARE consta de 4 cadenas polipeptídicas; normalmente 1 cadena es una v-SNARE y las otras tres son t-SNAREs, las cuales forman hélices entrecruzadas que se disponen paralelamente (Poirier et al., 1998). Probablemente, la energía liberada en la formación del complejo permite, al menos en parte, la fusión de las bicapas lipídicas: en sistemas modelo como liposomas, el establecimiento del complejo SNARE es suficiente para conseguir la fusión de membranas (Parlati et al., 2000). La ATPasa soluble NSF usa la energía proveniente de la hidrólisis del ATP para separar el complejo SNARE después de que la fusión de las membranas haya ocurrido (Mayer et al., 1996) permitiendo así que las proteínas SNARE estén disponibles para otras rondas de fusión. El NSF se une a los complejos SNARE y los disocia únicamente en presencia de las proteínas citosólicas α -SNAP (ver figura 1.3). En membranas solubilizadas el NSF-ATP, α -SNAP y las SNAREs forman un complejo de tamaño 20 S (Wilson et al., 1992; revisado en Chen y Scheller, 2001; Jahn y Südhof, 1999; para una descripción detallada del mecanismo de formación del complejo 20 S ver May et al., 2001).

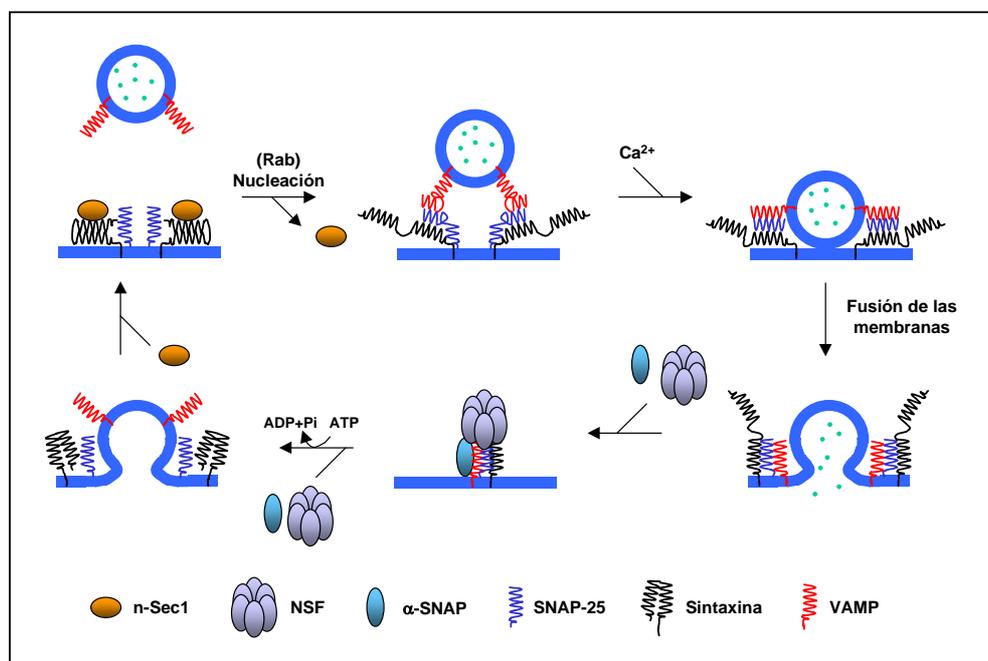


Figura 1.3 Modelo de exocitosis de vesículas. Por simplicidad, se representa solo una molécula de SNAP-25. El proceso se inicia con la disociación de n-Sec1 de la syntaxina (paso que puede estar facilitado por Rabs) lo que permite entonces la asociación de VAMP, SNAP-25 y syntaxina. Se piensa que la formación de este complejo conduciría a la fusión de las membranas. Después de la fusión, se reclutan al complejo SNARE, α -SNAP y la ATPasa NSF, cuya acción disocia el complejo y permite a las moléculas SNARE estar disponibles para otro evento de fusión (tomado de Chen y Scheller, 2001).

Aunque las diferentes SNARES forman complejos de manera específica (McNew et al., 2000), las SNARES por sí solas no son suficientes para explicar la especificidad de la fusión de vesículas; como ya se ha mencionado anteriormente, proteínas que regulan el reclutamiento de factores de *tethering/docking* que interactúan con las SNAREs, entre las que destacan las proteínas Rab, están involucrados en este proceso. Al contrario que las SNAREs, la acción de la NSF y la α -SNAP no es específica, ya que son capaces de disociar los complejos SNARE involucrados en la mayoría de, si no en todas, las vías de transporte vesicular (Jahn y Südhof, 1999).

1.4 Rafts: Se denominan de este modo a microdominios de membrana muy dinámicos enriquecidos en colesterol y esfingolípidos (Simons e Ikonen, 1997), que se encuentran en una fase (denominada l_o) más ordenada y con una mayor temperatura de fusión que la fase (denominada l_c) de las membranas enriquecidas en fosfolípidos (Brown y London, 2000). Los rafts tienen la propiedad de excluir o incorporar selectivamente determinadas proteínas, por lo cual gobiernan las interacciones proteína-proteína y lípido-proteína (Ikonen, 2001). Los principales criterios usados para determinar si una proteína está asociada a rafts han sido su insolubilidad en Tritón X-100 a 4 °C y su flotabilidad en gradientes de sacarosa. Además, la eliminación del colesterol, a través del empleo de, por ejemplo, ciclodextrinas destruye la asociación específica de las proteínas a rafts. Entre las proteínas que clásicamente se han descrito como asociadas a rafts figuran las unidas a la membrana a través de un anclaje GPI, proteínas kinasas de la familia Src y algunas proteínas transmembrana como EGFR y PDGFR (revisado en Galbiati et al., 2001).

La existencia de rafts en células vivas ha sido analizada por diferentes métodos, que incluyen, entre otros, FRET (Varma y Mayor, 1998; Kenworthy et al., 2000), entrecruzamiento de proteínas de membrana, microscopía de fuerza atómica (*photonic force microscopy*) (Pralle et al., 2000) y microscopía de moléculas únicas (*single molecule microscopy*) (Schutz et al., 2000). El tamaño estimado de los rafts varía según la técnica y molécula marcadora empleada: así, por ejemplo, Varma y Mayor (1998) (FRET, receptor de folato) han definido que el tamaño de microdominios dependientes de colesterol en células CHO y Caco-2 está en alrededor de 70 nm, mientras que Schutz et al. (2000) (*single molecule microscopy*, trazadores lipídicos) lo han estimado entre 0,2 – 2 μ m en células HASM.

Se piensa que los rafts se ensamblan en el *trans*-Golgi y están presentes fundamentalmente en la membrana plasmática y en algunos compartimentos del sistema endosomal como los endosomas de reciclaje (ver sección 1.6). Los rafts han sido implicados en numerosos procesos, tales como la clasificación de proteínas hacia el dominio apical en el TGN (Simons e Ikonen, 1997) y más recientemente a nivel endosomal (Mukherjee et al., 1999) (ver sección 1.8), así como en la transducción de señales (este aspecto no será tratado en este trabajo, para detalles ver Ikonen, 2001; Brown y London, 1998).

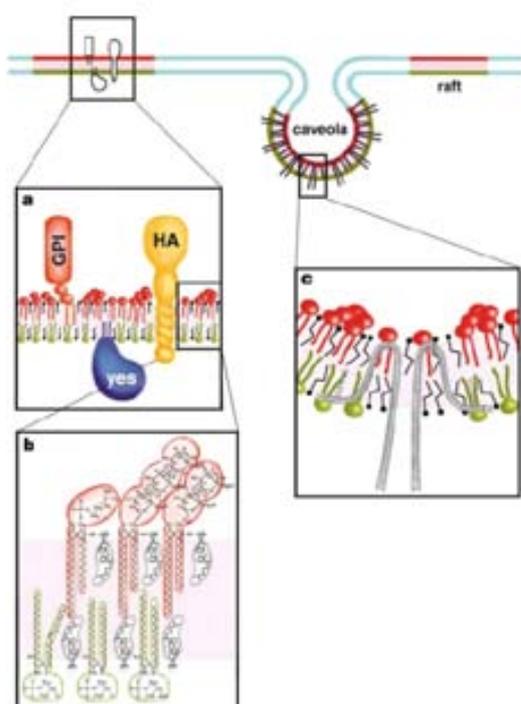


Figura 1.4 Modelo de la organización de rafts y caveolas en la membrana plasmática. Los rafts (rojo/verde) se segregan de otras regiones de la bicapa lipídica (azul). (a): algunas proteínas se asocian a los rafts través de anclajes GPI, grupos acilo (como la quinasa Yes) o sus dominios transmembrana (como la hemaglutinina [HA] del virus de la influenza). (b): Los rafts están enriquecidos en colesterol (gris) y glicolípidos (rojo). La hoja externa de la bicapa está enriquecida en glicolípidos mientras que la capa citosólica lo está en glicerolípidos tales como fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina (verde). (c) las caveolas son invaginaciones especializadas de la membrana enriquecidas en rafts. La formación de caveolas es dependiente de proteínas denominadas caveolinas (tomado de Simons e Ikonen, 1997).

1.5 Transporte post-TGN: el TGN constituye una de las principales estaciones de *sorting* de proteínas y lípidos. Como se puede observar en la figura 1, a partir del TGN se distribuye material hacia la membrana plasmática, los gránulos de secreción o los endosomas (revisado en Gu et al., 2001; Ikonen y Simons, 1998). Se piensa que, por defecto, las proteínas que salen del TGN son transportadas hacia la membrana plasmática, a menos que contengan una señal que determine su transporte a otros destinos. En células polarizadas, en las cuales existen dos dominios bien definidos, la localización de las proteínas está determinada por señales específicas, algunas de las cuales, en el caso de algunas proteínas apicales, involucran la asociación de las moléculas a rafts. Las señales que determinan el direccionamiento de proteínas a gránulos de secreción están mal definidas. Para algunas proteínas la presencia de un asa N-terminal es importante para su segregación hacia gránulos de secreción (el *sorting* de proteínas hacia la membrana plasmática de células polarizadas se refiere con más detalle en la sección 1.7 y el de la secreción regulada en la sección 1.5.1). Por el contrario, el envío de proteínas hacia el sistema endosomal utiliza señales específicas bien estudiadas. Así, las hidrolasas lisosomales solubles contienen Man6P, que constituye una señal reconocida por un receptor específico (M6PR) a nivel del TGN. Proteínas de membrana con destino a los endosomas - como el M6PR - y a los lisosomas - como lamp-1 - presentan motivos basados en tirosina o dileucina en sus regiones citoplasmáticas (tabla 1.5).

Tabla 1.5 Señales de localización de proteínas transportadas a partir del TGN

Membrana diana	Señal	Localización	Ejemplo
<u>Apical</u>			
	Anclaje GPI	Luminal	PLAP, CEA
	N-glicosilación	Luminal	gp-80, Eritropoyetina
	O-glicosilación	Luminal	Receptor de neurotrofina Sucrosa Isomaltasa
	Dominio transmembrana	Membrana	Neuraminidasa del virus de la influenza Hemaglutinina del virus de la influenza
<u>Basolateral</u>			
	YXXØ	Citosol	LDLR Receptor de asialoglicoproteínas
	LL/IL	Citosol	Receptor FcRII-B2
	Otros	Citosol	TfR pIg-R
<u>Ensomomas tardíos/lisomas</u>			
	Manosa-6-fosfato	Luminal	Catepsina D, Catepsina B y otras enzimas solubles lisosomales
	GYXXØ	Citoplasmática	lamp-1, lamp-2, CD63
<u>Gránulos de secreción</u>			
	Asa N-terminal		Cromogranina B Pro-opiomelacortina

Tomado de Keller y Simons (1997)

La naturaleza de las estructuras de transporte derivadas del TGN hacia la membrana plasmática (GPC: *Golgi-to-plasma membrane carrier*) no está bien definida. Estudios de microscopía óptica empleando construcciones para expresar la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSG) fusionada con GFP, muestran que los GPC pueden corresponder a vesículas (<250 nm) y, fundamentalmente, a estructuras pleiomórficas tubulares (>1,5 µm de largo) (Toomre et al., 1999). En estudios hechos por microscopía óptica-electrónica correlativa en células COS-7, se ha determinado que estas estructuras sáculo-tubulares pueden llegar a tener una longitud de hasta la mitad de la de una cisterna del Golgi (Polishchuk et al., 2000). En células CHO, los GPC geman del TGN como dominios enteros y sufren cambios morfológicos a medida que se mueven hacia la membrana plasmática (Hirschberg et al., 1998a). Las evidencias indican que el movimiento de estos transportadores, que en células PtK₂ se hace a una velocidad media de 0,7 µm/s, se realiza a lo largo de microtúbulos y es dependiente de kinesinas (Toomre et al., 1999; Kreitzer et al., 2000). Los GPC se fusionan directamente con la membrana plasmática, en ocasiones algunos minutos después de su *tethering/docking* al sitio de fusión, de forma similar a los gránulos de secreción. Sorprendentemente, muchos GPC que se anclan a la membrana se separan de ella sin fusionarse, indicando que los

procesos de *docking* son reversibles (Polishchuk et al., 2000; Toomre et al., 2000). En el caso de las células polarizadas, los GPC son diferentes para las proteínas apicales y para las basolaterales (ver sección 1.7.4). La estructura de los GPC es muy diferente a la clásicamente definida para las vesículas con cubierta por lo que el mecanismo de su formación plantea cuestiones interesantes que aún no han sido resueltas. De momento, se piensa que los GPC se pueden originar a partir de un progresivo fraccionamiento del TGN y no de la fusión de numerosas vesículas de transporte (Polishchuk et al., 2000). La forma tubular de los GPC podría ser el resultado de una adaptación para el transporte masivo de material hacia la membrana plasmática (Hirschberg et al., 1998a). La fisión de los GPC depende de dinamina (Kreitzer et al., 2000) y de la proteína quinasa D (PKD) (Liljedahl et al., 2001; Maeda et al., 2001). Recientemente, se ha demostrado que el diacilglicerol es necesario para el reclutamiento de la PKD al TGN (Baron y Malhotra, 2002).

En cuanto a las estructuras de transporte derivadas del TGN hacia componentes del sistema endosomal, hasta el momento se conoce con más detalle el mecanismo de formación de las vesículas de clatrina/AP1 (ver tabla 1.4) que el de otros tipos de vesículas (como por ejemplo, vesículas AP3 o AP4).

1.5.1 Secreción regulada: se denomina secreción regulada al proceso por el cual productos de secreción, almacenados en gránulos de secreción especializados, son excitados en respuesta a un estímulo. Los gránulos de secreción son orgánulos especializados derivados del TGN exclusivos de las células secretoras que almacenan proteínas a altas concentraciones. Los productos de secreción son clasificados inicialmente en gránulos secretorios inmaduros (GSI), los cuales sufren modificaciones en su forma, tamaño y contenido hasta transformarse en gránulos de secreción maduros (GSM) (revisado en Tooze et al., 2001). El modelo que describe la formación de los GSM consta de 4 pasos básicos: *i*) agregación y *sorting* de las proteínas de secreción regulada (PSR) en el TGN, *ii*) formación de los GSI por gemación a partir del TGN, *iii*) fusión homotípica de los GSI y, *iv*) modificación del contenido y de la membrana de los GSI. Estos procesos, que han sido definidos principalmente sobre la base de estudios efectuados en células endocrinas y neuroendocrinas, pueden variar dependiendo del tipo de célula y material a secretar (revisado en Tooze et al., 2001; Arvan y Castle, 1998).

Agregación y sorting en el TGN: las PSR muestran una propensión a coagregarse en condiciones ligeramente ácidas y altas en Ca^{2+} , como las que se encuentran en el TGN (Rindler, 1998); esta propiedad sería importante para permitir su *sorting* a nivel del TGN. La presencia de un asa en la región N-terminal de algunas PSRs, como el de graninas, es esencial para su *sorting* en GSI (Krömer et al., 1996). Este asa interviene en la agregación de PSR, si bien otras regiones de las proteínas también facilitarían este proceso. En el proceso de *sorting* posiblemente intervendrían receptores que reconocerían señales como la asa N-terminal. Sorprendentemente, se ha propuesto que una enzima que cataliza el procesamiento de prohormonas, la carboxipeptidasa E (CPE), sería uno de estos

receptores, aunque este hecho ha sido fuente de controversia, puesto que la CPE forma agregados con proteínas que no contienen asas, como la prolactina o la insulina, y posiblemente se encuentre agregada con las PSRs de un modo similar al de algunas otras proteínas con poca relación con procesos de *sorting*. Un trabajo reciente, basado en análisis de modelaje molecular, han identificado en la CPE una región putativa de reconocimiento del asa N-terminal de la pro-opiomelanocortina, diferente al del dominio de unión al sustrato (Zhang et al., 1999). Recientemente, se ha sugerido un papel activo de rafts en el *sorting* de las PSR (Blazquez et al., 2000; Dhanvantari y Loh, 2000; Wang et al., 2000). Así, en células AtT20 la reducción de los niveles de colesterol inhibe la formación GSI conteniendo pro-opiomelanocortina y la granina cromogranina B (Wang et al., 2000).

Maduración de los gránulos secretorios inmaduros: los procesos de gemación que darían lugar a los GSI al parecer no son diferentes de los que intervienen en el origen de las vesículas de secreción constitutiva (revisado en Tooze et al., 2001). Inicialmente, los GSI pueden incorporar además de las PSR, SNAREs y otras moléculas no destinadas a ser secretadas, como por ejemplo, furinas, M6PR o proteínas que intervendrán en el posterior procesamiento de las PSR. Como se ha mencionado anteriormente, en el proceso de maduración a GSM, los GSI sufren una serie de fusiones homotípicas, mediadas por SNAREs como la sintaxina 6 (Tooze et al., 2001), y además, una pérdida en el contenido neto de membrana. Esto se consigue a través de la acción de vesículas recubiertas de AP1/clatrina (Dittié et al., 1996; Kuliawat et al., 1997) que extraen de la membrana SNAREs y proteínas no destinadas a formar parte de los GSM. La formación de estas vesículas es dependiente de ARF1 (Dittié et al., 1996) y de caseína quinasa II (Eng et al., 1999; Dittié et al., 1999; 1997).

1.6 Sistema endosomal: el sistema endosomal es el responsable del reciclaje y degradación de los componentes de la célula y del material extracelular. Además, juega un papel crucial en la transducción de señales. La endocitosis es un conjunto de procesos usados por la célula para internalizar partículas y fluido extracelular así como regiones especializadas de la membrana plasmática. Los tipos de endocitosis descritos incluyen: *i*) vía vesículas recubiertas de clatrina, *ii*) vía caveolas, *iii*) vías independientes de clatrina o caveolas (revisado en Mukherjee et al., 1997). El proceso de internalización de componentes de membrana mejor conocido es el de la endocitosis mediada por receptor, el cual utiliza vesículas recubiertas de clatrina/AP2 (para detalles ver tabla 1.4). Los receptores difunden en la membrana y se acumulan en regiones denominadas *coated pits*, donde existe un recubrimiento parcial de la membrana por clatrina. Posteriormente, las vesículas se liberan de la membrana, pierden la cubierta y se fusionan con los endosomas tempranos. Algunos receptores, como el LDLR, no requieren la unión del ligando para ser internalizados; otros, en cambio, se asocian a elementos de la cubierta de las vesículas de clatrina sólo cuando se han unido al ligando y se ha producido un cambio conformacional (revisado en Mukherjee et al., 1997). Las señales utilizadas para la internalización de receptores a través de esta vía están contenidas en su dominio citoplasmático; las mejor caracterizadas son los motivos basados en tirosina o en dileucina, las cuales pueden ser reconocidos por AP2 (revisado en Bonifacino y Dell'Angelica, 1999).

El sistema endosomal es extremadamente pleiomórfico, lo que dificultado su caracterización. No obstante, existe un consenso acerca de sus principales compartimentos: endosomas tempranos, endosomas de reciclaje, endosomas tardíos y lisosomas (figura 1.5).

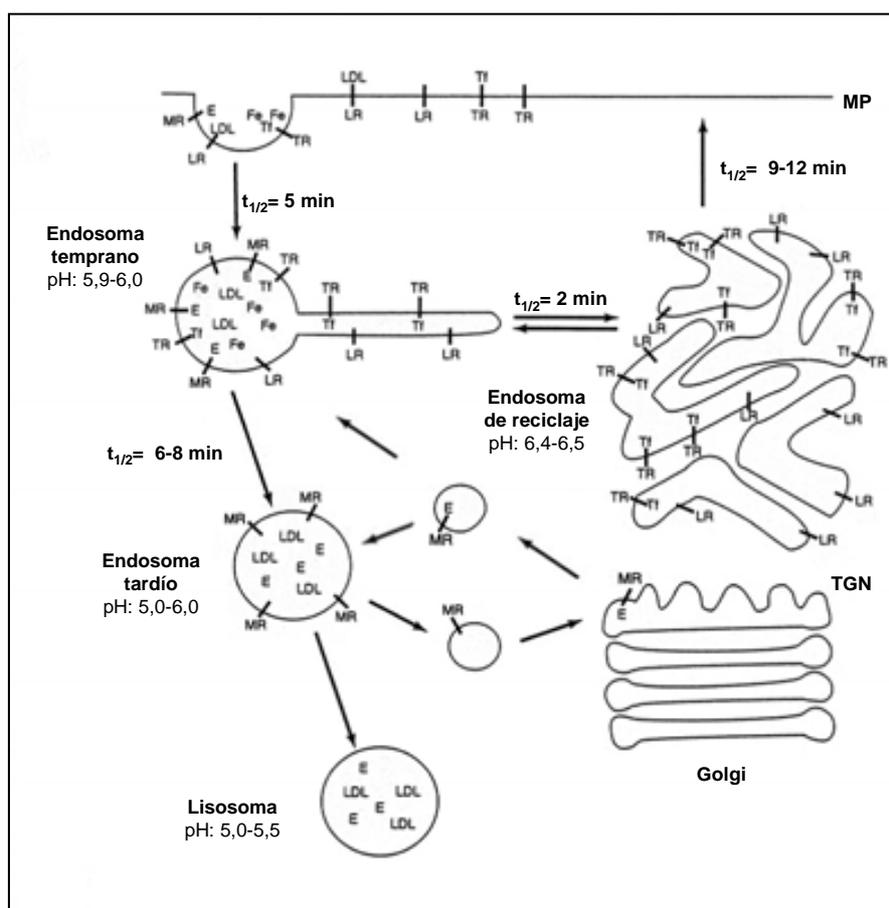


Figura 1.5 Representación esquemática del itinerario seguido por algunas proteínas a través de los compartimentos endosomales de células CHO. E: enzima lisosomal, LDL: lipoproteína de baja densidad, LR: Receptor del LDL, MR: Receptor de Man6P, Tl: Transferrina, TR: Receptor de Tf (adaptado de Mukherjee et al., 1997).

1.6.1 Endosomas tempranos: también llamados endosomas de *sorting*, deben esta denominación a que constituyen una estación de *sorting* comparable al TGN. Desde ellos, los distintos materiales pueden ser enviados a la membrana plasmática, directamente o a través de los endosomas de reciclaje (p. ej. receptores de membrana, proteínas en transcitosis), o bien a los endosomas tardíos/lisosomas (p ej. material destinado a la degradación) o al Golgi (p ej. TGN38/TGN46).

Los endosomas tempranos constituyen compartimentos altamente dinámicos que muestran una alta capacidad de fusionarse homotípicamente. Están situados normalmente en la periferia celular y presentan una estructura túbulo-vesicular, con cisternas de las que emanan prolongaciones tubulares (de alrededor de 60 nm de diámetro y hasta 4 μm de largo) y vesículas grandes (de 300 – 400 nm de diámetro). Se ha sugerido que la región cisternal central sería la cara *cis*, por donde se recibe material, mientras que la región de los túbulos y vesículas constituiría la cara *trans* del orgánulo (revisado en Gruenberg, 2001). La composición lipídica de la membrana de los endosomas tempranos es similar a la de la membrana plasmática (Evans y Hardison, 1985). Rab5 y EEA1 se reconocen como marcadores específicos de este compartimento, si bien Rab5 se puede localizar también en la membrana plasmática y en los endosomas de reciclaje. EEA1 reconoce fosfatidil inositol-3-fosfato (PtdIns(3)P) a través de un dominio FYVE (Gaulhier et al., 1998) y es un efector citosólico de Rab5 involucrado en el *tethering* y la fusión endosoma-endosoma (Christoforidis et al., 1999), proceso en el que también intervienen otros efectores de Rab5 y la t-SNARE sintaxina 13 (para detalles ver Woodman, 2000). Otra proteína asociada con los endosomas tempranos es la anexina II, la cual también se halla presente en la membrana plasmática. Las anexinas son una familia de proteínas que se unen a lípidos y a Ca^{2+} , con capacidad de translocar del citosol a membranas en respuesta a incrementos en la concentración intracelular de calcio. Todavía se desconoce cómo estas proteínas realizan su función después de su unión a las membranas (revisado en Lecat y Lafont, 1999). La anexina II está involucrada tanto en la vía exocítica (Creutz, 1992) como en la endocítica (Emans et al., 1993). La función exacta de esta proteína no se conoce, aunque parece que actúa regulando la dinámica de las membranas de los endosomas tempranos a través de la interacción con proteínas del citoesqueleto de actina cortical (Harder et al., 1997).

1.6.2 Endosomas de reciclaje: presentan una forma tubular y probablemente se originan a partir de prolongaciones tubulares de los endosomas tempranos. En varios tipos celulares, como las células CHO, se localizan pericentriolarmente. Por lo general, no contienen ni receptores destinados a ser degradados ni ligandos. Una excepción la constituye la transferrina, la cual no se separa de su receptor a pesar del pH ácido de los endosomas tempranos (revisado en Gruenberg, 2001). Son compartimentos menos ácidos que los endosomas tempranos porque carecen de una ATPasa vacuolar funcional (Gagescu et al., 2000). Los endosomas de reciclaje están enriquecidos en lípidos de rafts, como el colesterol y la esfingomiélin, además de proteínas asociadas a rafts, como la caveolina-1 y la flotilina-1 (Gagescu et al., 2000). Además, en los endosomas de reciclaje se pueden detectar la v-SNARE celubrevina, la t-SNARE sintaxina 13 (Gagescu et al., 2000; Prekeris et al., 1998) y proteínas Rab como Rab4, Rab5 y Rab11, las cuales *in vivo* se distribuyen en microdominios distintos aunque parcialmente solapados (Sonnichsen et al., 2000). A diferencia de los endosomas tempranos, los endosomas de reciclaje no poseen ni EEA1 y ni anexina II (Gagescu et al., 2000).

1.6.3 Endosomas tardíos: al igual que los endosomas tempranos, los endosomas tardíos son compartimentos altamente pleomórficos y dinámicos. Son grandes estructuras de unos 500 nm de diámetro las cuales contienen cisternas y regiones tubulares y vesiculares con numerosas invaginaciones de membrana que le pueden conferir a veces una apariencia multivesicular o multilamelar. Los endosomas tardíos se localizan normalmente más cerca del centro de la célula que los endosomas tempranos (revisado en Mukherjee et al., 1997).

De manera similar a los otros endosomas, poseen M6PR; sin embargo, carecen de componentes de reciclaje como la transferrina. Dado que el M6PR no alcanza los lisosomas, su presencia se usa como criterio para diferenciar los endosomas tardíos de los lisosomas. En los primeros se encuentran numerosas proteínas en ruta hacia los lisosomas (p. ej. Igps e hidrolasas solubles). Frecuentemente, Rab7 y Rab9 son utilizados como marcadores de este orgánulo, los cuales, al igual que ocurre con las Rabs de endosomas de reciclaje, no se distribuyen de forma uniforme en toda su membrana (Barbero et al., 2002). La distribución de proteínas no es homogénea en los endosomas tardíos: mientras que por ejemplo, lamp-1, lamp-2 y MLN64 están restringidas a la membrana que limita con el citosol, las membranas internas contienen M6PR, proteínas tetraspaninas como lamp-3/CD63, MHC clase II en las células presentadoras de antígeno y receptores de membrana destinados a la degradación, como por ejemplo EGFR. (revisado en Gruenberg, 2001)

En contraste con los endosomas tempranos y la membrana plasmática, los endosomas tardíos no contienen cantidades significativas de colesterol, fosfatidilserina y esfingomiélin, en cambio, contienen una alta proporción de lípidos neutros, como triglicéridos y ésteres de colesterol, y un conjunto restringido de fosfolípidos entre los que destaca el ácido lisofosfatídico (LBPA) (Kobayashi et al., 2001a, 1998a; revisado en Kobayashi et al., 2001b, 1998b). En eucariotes superiores, las membranas internas de los endosomas tardíos - pero no la que limita con el citosol - acumulan una considerable cantidad de LBPA, el cual puede representar hasta el 15% del total de los fosfolípidos de los endosomas tardíos de células BHK (Kobayashi et al., 1998a). El LBPA es presumiblemente sintetizado *in situ* (Amidon et al., 1996) y se acumula en los endosomas tardíos debido a que es un mal sustrato de las fosfolipasas. Su carga y su forma - en cono invertido - facilitarían la formación de las invaginaciones que originan los elementos multivesiculares de los endosomas tardíos (revisado en Kobayashi et al., 2001b, 1998b). Estudios hechos con la proteína NPC-1, cuya deficiencia origina la enfermedad de Niemann-Pick tipo C (ver sección 1.8.1), indican que los endosomas tardíos positivos para la proteína NPC-1 funcionan como compartimentos de *sorting* de glicolípidos (Zhang et al., 2001).

El transporte desde los endosomas tempranos hasta los endosomas tardíos involucra intermediarios denominados vesículas endosómicas de transporte (ECV: *endosomal carrier vesicles*) o cuerpos multivesiculares (multivesicular bodies) de aproximadamente 300 - 400 nm de diámetro que, al igual que los endosomas tardíos, muestran numerosas invaginaciones de la membrana que le

confieren su característico aspecto multivesicular. En mamíferos, los cuerpos multivesiculares constituyen un compartimento distinto de los endosomas tardíos y tempranos propiamente dichos puesto que no contienen las proteínas específicas de estos orgánulos. Mientras que el fosfatidil inositol 3 fosfato (PI(3)P) es abundante en la membrana interna de los ECV, el LBPA prácticamente no se detecta (Gillooly et al., 2000). La wortmanina, una droga inhibidora de la PI(3)K, inhibe la formación de los ECV (Fernandez-Borja et al., 1999).

1.6.4 Lisosomas: son orgánulos de alrededor 0,5 μm de diámetro cuya morfología es muy heterogénea. Al igual que los endosomas tardíos, su pH interno es muy ácido y contienen enzimas hidrolíticas que muestran una actividad óptima a pH ácido. Los lisosomas se pueden distinguir de los endosomas tardíos por su sedimentación en gradientes de densidad, porque carecen de M6PR y de receptores de reciclaje de la superficie celular y, por su característico aspecto electrón-denso (revisado en Luzio et al., 2000). Tradicionalmente se han considerado como los compartimentos de degradación terminal de la vía endocítica (Kornfeld y Mellman, 1989) y juegan un importante papel en la proteólisis de proteínas citosólicas transportadas a través de su membrana (Cuervo et al., 1997; Cuervo y Dice, 1996; Chiang y Dice, 1988), en la degradación de material fagocitado y en procesos autofágicos (revisado en Luzio et al., 2000). La transferencia de material desde los endosomas tardíos hacia los lisosomas se realiza por fusión directa, lo que conduce a la formación transitoria de un orgánulo híbrida (Bright et al., 1997; Mullock et al., 1998). Las células del linaje hematopoyético usan los lisosomas para almacenar y liberar al exterior sus productos de secreción (Stinchcombe y Griffiths, 1999), mecanismo que usan también otros tipos celulares (revisado en Andrews, 2000; Denzer et al., 2000).

El proceso de transporte de las hidrolasas solubles a los lisosomas ha sido descrito con detalle. Éstas adquieren M6P en el *cis*-Golgi, modificación que es reconocida por el M6PR al nivel del TGN o de la membrana plasmática. El complejo hidrolasa-receptor viaja entonces a los endosomas, donde las hidrolasas se separan del receptor y continúan su trayecto hasta los lisosomas, mientras que los M6PR reciclan al TGN al nivel de los endosomas tardíos. En cambio, los mecanismos de transporte de proteínas lisosomales de membrana a estos orgánulos son peor comprendidos. Estas proteínas pueden ser primero enviadas desde el TGN hacia la membrana plasmática, de donde serán internalizadas hacia los endosomas (p. ej. fosfatasa ácida lisosomal), o directamente hacia los endosomas/lisosomas (p. ej. lamp-1) (revisado en Luzio et al., 2000).

1.6.5 Transporte retrógrado al Golgi: varias proteínas ciclan entre el Golgi y el sistema endosomal, como por ejemplo M6PRs, furina y TGN38 (revisado en Gu et al., 2001) (ver figura 1.6). Mientras que M6PRs y furina retornan al Golgi desde los endosomas tardíos, TGN38 se piensa que lo hace además desde los endosomas tempranos y de reciclaje (Mallet y Maxfield, 1999). Se conocen pocos detalles acerca de los transportadores y los mecanismos moleculares que implicados en estas rutas.

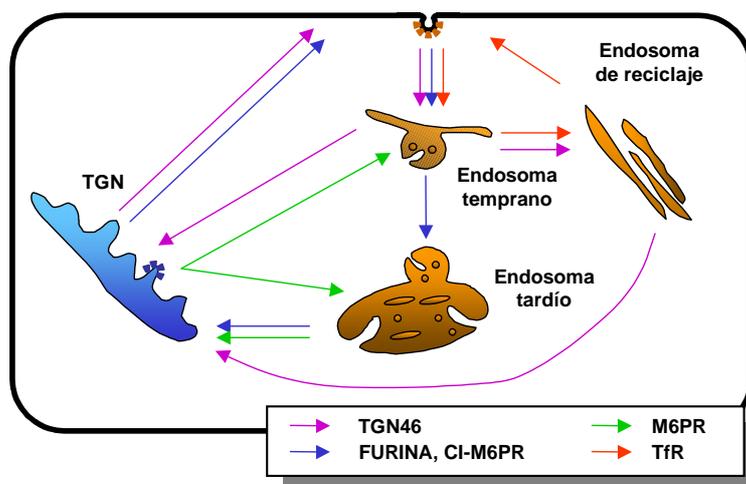


Figura 1.6 Rutas de tráfico de proteínas que ciclan entre el TGN y compartimentos endosomales.

El transporte de M6PRs al Golgi es dependiente de rab9 (Lombardi et al., 1993), p40 - un efector de Rab9 - (Diaz et al., 1997), TIP47 (Diaz and Pfeffer, 1998; Carroll et al., 2001) y mapmodulina (Itin et al., 1999). Recientemente, se ha descrito la visualización del transporte endosomas tardíos-Golgi dependiente de Rab9 en células vivas (Barbero et al., 2002); este estudio indica que este transporte se hace por medio de vesículas - más que por estructuras túbulovesiculares - que se fusionan directamente con el TGN. Aunque se ha sugerido la participación de complejos AP1 en el reciclaje de M6PRs (Meyer et al., 2000), se ha encontrado que la clatrina no es necesaria para este proceso (Draper et al., 1990). Así, se ha propuesto que TIP47 podría cumplir las funciones de clatrina ya que puede unir proteínas cargo y funcionar como una proteína de cubierta. TIP47 puede interactuar con el dominio citosólico de M6PR pero no con el de otras proteínas que reciclan al Golgi desde endosomas, como por ejemplo, furina, carboxipeptidasa D (CPD), TGN38 y la proteína Nef del HIV (Krise et al., 2000), lo que sugiere que la acción de TIP47 podría ser específica para M6PRs (revisado en Gu et al., 2001). Esta proteína puede unirse directa y simultáneamente con Rab9 y MPRs a través de dominios físicamente distintos (Carroll et al., 2001).

Otra proteína involucrada en el tráfico endosomas-Golgi es PACS-1. Se trata de una proteína que puede interactuar específicamente con la forma fosforilada - por la caseína quinasa 2 - del dominio citosólico de furina (Wan et al., 1998). PACS-1 funciona como un conector que forma complejos ternarios con furina y AP1, permitiendo la incorporación de la furina fosforilada en las vesículas AP1/clatrina (Crump et al., 2001). Además, PACS-1 reconoce motivos acídicos (*cluster-sorting motifs*) en otras proteínas como CI-MPR, CPD, PC6B (Xiang et al., 2000; revisado en Gu et al., 2001; Molloy et al., 1999), y algunas proteínas virales, tales como la glicoproteína B del citomegalovirus humano y la proteína Nef del HIV (Piguet et al., 2000; revisado en Gu et al., 2001).

1.7 Transporte de membranas en células polarizadas: la polarización es una característica de las células epiteliales y neuronales aunque, en un sentido amplio, la mayor parte de los tipos celulares se polarizan transitoriamente en algún momento: así, células que se consideran no polarizadas pueden establecer regiones especializadas de citosol y membrana en numerosas situaciones, como por ejemplo cuando se mueven o responden a determinados estímulos. Las células intestinales representan un paradigma de célula polarizada. En ellas se pueden distinguir dos dominios de membrana claramente definidos, el apical, orientado hacia la luz intestinal y, el basolateral, que está en contacto con la membrana basal y con las células adyacentes. Ambos dominios difieren tanto en su composición - al nivel proteico y lipídico - como en su organización estructural. En el organismo existen muchos otros arquetipos de células polarizadas en las que se distinguen dominios de membrana que varían en su composición. Las células han establecido una serie de mecanismos para desarrollar y mantener estas diferencias (revisado en Yeaman et al., 1999; Aroeti et al., 1998). En las primeras etapas de la polarización celular juega un papel esencial la organización del citoesqueleto y de los complejos de adhesión celular. En el mantenimiento de la polaridad participan, principalmente, dos procesos. Por una parte, la célula envía hacia la membrana apical y basolateral las proteínas/lípidos de una manera selectiva. Los compartimentos de la célula donde se realiza ese *sorting* son el TGN y los compartimentos del sistema endosomal (revisado en Mostov et al., 2000). Actualmente se sabe que el *sorting* de proteínas/lípidos no es suficiente para mantener y menos originar un fenotipo polarizado, puesto que este proceso ocurre también en células no polarizadas como fibroblastos (Müsch et al., 1996; Yoshimori et al., 1996; para detalles de los mecanismos y proteínas involucradas en el desarrollo del fenotipo polarizado, ver Yeaman et al., 1999). Por otra parte, las uniones estrechas (*tight junctions*) juegan un papel de barrera, evitando que las proteínas y lípidos de un dominio de membrana se mezclen con los del otro.

Para estudiar los procesos de tráfico de membranas en células epiteliales se han usado como modelos principalmente líneas celulares derivadas del epitelio renal, colónico y hepático, entre las que destacan las células MDCK (*Madin-Darby-Canine kidney*), derivadas del túbulo proximal de riñón de perro (Leighton et al., 1969), y Caco-2, establecidas a partir de un adenocarcinoma de colon humano (Fogh y Trempe, 1975).

1.7.1 Rutas de tráfico de membrana en células polarizadas: existen dos rutas principales por las cuales las proteínas llegan a su correspondiente dominio de membrana. En la ruta directa, las proteínas que salen del TGN son enviadas en estructuras de transporte que se dirigen hacia la membrana apical o basolateral. En la segunda o indirecta, denominada también transcitosis, las proteínas son enviadas primero hacia un dominio - generalmente el basolateral - desde donde son endocitadas y llevadas después hacia el dominio opuesto (figura 1.7). El uso de las rutas directa o indirecta para transportar las proteínas a los dominios apical o basolateral es dependiente de la proteína y del tipo celular. Las células MDCK envían la mayoría de proteínas apicales por la vía directa; sin embargo, algunas proteínas, como por ejemplo el receptor de inmunoglobulinas

poliméricas (p-IgR), llegan a su destino final por trancitosis. En las células Caco-2, las rutas directa e indirecta coexisten; así por ejemplo, las glicoproteínas apicales sucrasa-isomaltasa y fosfatasa alcalina utilizan la ruta directa mientras que la aminopeptidasa N (APN) y la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) utilizan a la vez las dos rutas (Le Bivic et al., 1990; Matter et al., 1990). En el caso de los hepatocitos, prácticamente la totalidad de sus proteínas apicales es enviada por trancitosis. En la ruta directa, el *sorting* de proteínas tiene lugar en el TGN mientras que en la indirecta, se producen en el sistema endosomal (revisado en Mostov et al., 2000).

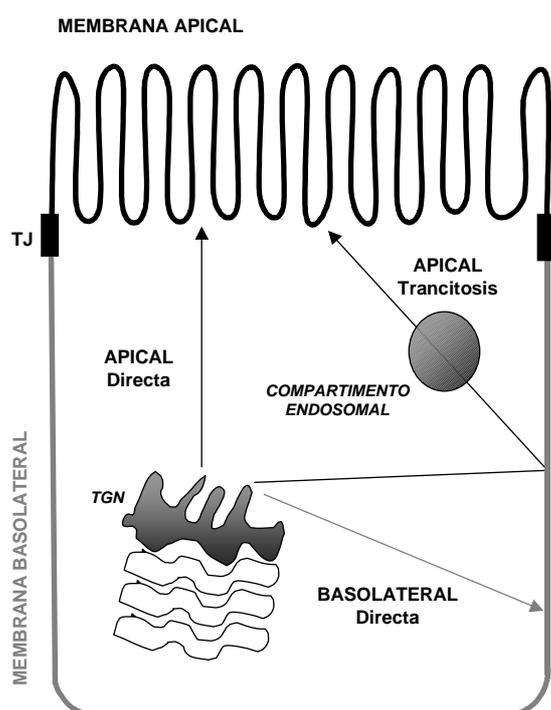


Figura 1.7 Rutas de tráfico de proteínas de membrana en células polarizadas (para detalles, ver texto). TJ: uniones estrechas

1.7.2 Sistema endosomal en células polarizadas: la complejidad del sistema endosomal es mayor en las células polarizadas, puesto que en ellas la internalización se puede hacer tanto a través de la membrana apical o de la basolateral. El sistema endosomal mejor conocido en células polarizadas es el de células MDCK. En este tipo celular, las moléculas endocitadas se acumulan en diferentes poblaciones de endosomas tempranos (positivos para Rab5/EEA1) según se internalicen a través de la membrana apical o la membrana basolateral. Los endosomas tempranos apicales (AEE: apical early endosome), que se localizan entre la membrana plasmática y el Golgi, presentan asociados algunas proteínas como la endotubina (Gokay y Wilson, 2000) y la sintenina (Fialka et al., 1999) y, en ensayos *in vitro*, no se fusionan con los endosomas tempranos basolaterales (BEE: basolateral early endosome) (Bucci et al., 1994). El material destinado a degradación es enviado desde ambos tipos de endosomas tempranos hacia los endosomas tardíos y lisosomas. En cambio, una cantidad

significativa de las moléculas que son sometidas a reciclaje o a transcitosis se mezclan en compartimentos especializados, localizados hacia el polo apical de la célula, denominados endosomas comunes (CE: common endosome) (Knight et al., 1995; Odorizzi et al., 1996) y endosomas de reciclaje apical (ARE: apical recycling endosome) (Apodaca et al., 1994; revisado en Mostov et al., 2000) (figura 1.8).

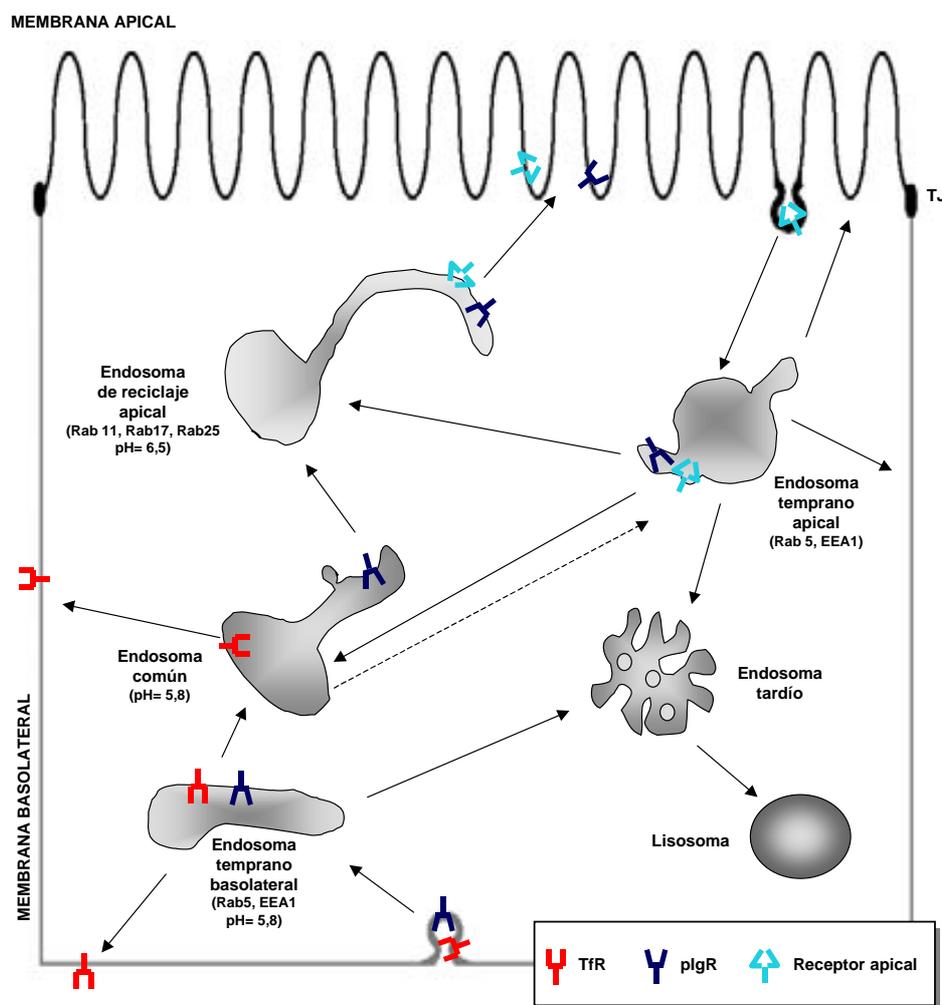


Figura 1.8 Sistema endosomal en células polarizadas. TJ: Uniones estrechas (adaptado de Mostov et al., 2000 y de Leung et al., 2000).

Los CE están deplecionados de marcadores de fase fluida o de material destinado a la degradación (p. ej. LDL y EGF) y presentan proteínas de reciclaje (p. ej. transferrina y su receptor en el caso de los BEE) y de transcitosis (p. ej. IgA y su receptor p-IgR) provenientes de los AEE y de los BEE. Mientras que la mayoría del TfR es reciclado hacia la membrana directamente desde este compartimento, el p-IgR es enviado a los ARE para luego ser dirigido hacia la membrana apical. Los procesos de *sorting* de proteínas y lípidos que ocurren en los CE son importantes para el mantenimiento de la localización polarizada de varias moléculas en las células. Así por ejemplo, la

brefeldina A induce una distribución no polarizada del TfR en células MDCK debido a que afecta su *sorting* a nivel de los CE (Wang et al., 2001).

Los ARE constan de elementos túbulo vesiculares y en “forma de C” (Gibson et al., 1998) que regulan el tráfico endocítico dirigido específicamente hacia el dominio apical de la célula (Leung et al., 2000). Rab11, Rab17 y Rab25 están asociados a los ARE y, al igual que los CE, presentan p-IgR y carecen de marcadores de fase fluida y de material destinado a la degradación; sin embargo, y a diferencia de los CE, no están enriquecidos en TfR (Leung et al., 2000).

1.7.3 Señales de localización polarizada: las células utilizan como señales de localización polarizada secuencias aminoácidas específicas de la proteína, modificaciones post-traduccionales como la glicosilación o incluso - según se ha hipotetizado recientemente - conformaciones especiales de la proteína determinadas por su glicosilación (Rodríguez-Boulan y Gonzalez, 1999). Una proteína puede contener múltiples señales de localización tanto apicales como basolaterales (Alonso et al., 1997; revisado en Ikonen y Simons, 1998). Al parecer, las señales de localización basolateral son cis-dominantes sobre las señales apicales. Sin embargo, se han descrito proteínas, como la endolina, en las que las señales apicales dominan sobre las basolaterales (Ihrke et al., 2001).

1.7.3.1 Señales de localización basolateral: se asemejan a aquellas responsables de la endocitosis y el *sorting* de proteínas hacia diversos compartimentos celulares, como por ejemplo, endosomas tempranos y tardíos, lisosomas, TGN y orgánulos especializadas, como los fagosomas y el compartimento de procesamiento de antígenos de linfocitos B (revisado en Mostov et al., 2000; Matter y Mellman, 1994). Las señales de *sorting* basolateral se localizan en el dominio citoplasmático de las proteínas y, frecuentemente, contienen un residuo crítico de tirosina dentro de la secuencia NPXY o YXXØ (donde X es cualquier aminoácido y Ø es un aminoácido con un grupo hidrofóbico voluminoso (Trowbridge et al., 1993). En algunas ocasiones se ha predicho que estos motivos forman una estructura conocida como “*tight β -turn*” (Eberle et al., 1991; Collawn et al., 1990). Aunque las señales basadas en tirosina median el *sorting* a múltiples compartimentos celulares (ver tabla 1.5), su especificidad está determinada por otros factores, entre los cuales destacan la secuencia aminoácida del entorno (Matter et al., 1994; Höning y Hunziker, 1995), la fosforilación (Boll et al., 1996; Marks et al., 1996) y la proximidad del la dominio transmembrana (Rohrer et al., 1996). En otros casos, como en el del receptor Fc, un motivo dihidrofóbico sirve como señal de localización basolateral (ver tabla 1.5). Existen también algunas señales que poseen muy poca o ninguna similitud con las indicadas anteriormente. Se ha sugerido que varias de estas señales forman una estructura que contiene un “*tight β -turn*” y que por esto se pueden parecer a las señales basadas en tirosina. Sin embargo, no se conoce si estas estructuras están presentes en el contexto de la proteína nativa (revisado en Yeaman et al., 1999).

1.7.3.2 Señales de localización apical: se han sugerido múltiples señales de localización apical localizadas en los dominios citoplasmático, extracelular y/o transmembrana de las cadenas polipeptídicas; sin embargo, su identidad es todavía fuente de controversia (para revisión ver Ikonen y Simons, 1998; Mostov et al., 2000). Algunas de estas señales consisten en modificaciones post-traduccionales efectuadas en el dominio extracelular de las proteínas. Así, el anclaje GPI (Lisanti et al., 1989), y los *N*- (p. ej. Scheiffele et al., 1995; Hobert et al., 1997; Benting et al., 1999; Ihrke et al., 2001) y *O*-glicanos (p. ej. Yeaman et al., 1997; Alfalah et al., 1999; Zheng et al., 1999), actuarían como señales de localización apical. Se ha identificado también que algunas proteínas usan como señales apicales secuencias proteicas localizadas en sus dominios citoplasmático (p. ej. Chuang y Sung, 1998; Muth et al., 1998; Gokay et al., 2001), extracelular y transmembrana (Kundu, et al., 1996; Tugizov et al., 1998; Jacob et al., 1999). Hasta el momento, no se ha encontrado ninguna señal que tenga carácter universal; así por ejemplo, las células FRT envían sus proteínas GPI al dominio basolateral.

1.7.4 Transporte de proteínas basolaterales: desde hace algún tiempo las evidencias indicaban que las proteínas basolaterales y apicales se transportan en estructuras exocíticas diferentes hacia la membrana plasmática (Mostov et al., 2000). Recientemente, esto se ha confirmado en células vivas mediante el empleo de proteínas apicales (un constructo que contenía un anclaje GPI y un dominio *N*-glicosilado) y basolaterales (una forma modificada de la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular) fusionadas a proteínas fluorescentes (Keller et al., 2001). Debido a que las señales de localización basolateral son similares a aquellas que pueden interactuar con los complejos clatrina-proteínas adaptadoras, se hipotetizó que este tipo de complejos podrían mediar el transporte de proteínas al dominio basolateral (para revisión ver Gu et al., 2001; Mostov et al., 2000). Esta hipótesis ha sido corroborada con el hallazgo de una forma alternativa de la subunidad $\mu 1$ de AP1, denominada $\mu 1B$, que se expresa únicamente en células epiteliales y que media el transporte basolateral de algunas proteínas (Roush et al., 1998; Folsch et al., 1999). Notoriamente, proteínas que en células MDCK son basolaterales, como el LDLR y el TfR, son enviadas hacia el dominio apical en células LLCPK1, las cuales carecen de $\mu 1B$. La expresión exógena de la subunidad $\mu 1B$ en estas células es suficiente para cambiar la distribución del LDLR y TfR hacia la membrana basolateral (Folsch et al., 1999). Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual $\mu 1B$ actuaría se desconoce, y tampoco es obvia la participación de las vesículas recubiertas de clatrina en el tráfico TGN - membrana basolateral. Recientemente, se ha encontrado que AP4 participa en el transporte de proteínas basolaterales ya que en células MDCK deplecionadas de $\mu 4$, algunas proteínas basolaterales son erróneamente dirigidas hacia la membrana apical (Simmen et al., 2002).

Un factor de *docking* basolateral es el complejo Sec6/Sec8 (denominado también exocisto), el cual está constituido por 8 proteínas, tanto en levaduras como en mamíferos (Hsu et al., 1996; revisado en Hsu et al., 1999). En células MDCK, anticuerpos dirigidos contra subunidades del

exocisto inhiben el transporte de proteínas desde el TGN hacia el dominio basolateral, pero no al dominio apical (Grindstaff et al., 1998).

1.7.5 Transporte de proteínas apicales: inicialmente se sugirió que las proteínas apicales se dirigirían hacia su correspondiente dominio de membrana en estructuras de transporte enriquecidas en rafts (Simons e Ikonen, 1997). Según este modelo, las proteínas apicales se segregarían específicamente en rafts en los compartimentos en que se produce el *sorting* (p. ej. TGN), proceso que sería facilitado por la presencia de anclajes GPI, *N*- u *O*- glicanos, o por las propiedades físicas de sus dominios transmembrana (Schieffele et al., 1995; Simons e Ikonen, 1997). Numerosas evidencias apoyan este modelo (revisado en Ikonen y Simons, 1998); así por ejemplo, en células MDCK, la hemaglutinina del virus de la influenza (HA) se incorpora a rafts durante su transporte a la membrana apical (Skibbens et al., 1989) y la extracción de colesterol, que altera la integridad de los rafts, afecta su transporte apical (Keller and Simons, 1998). Sin embargo, el transporte hacia el dominio apical de algunas proteínas es claramente independiente de rafts (p. ej. Zheng et al., 1999), lo que sugiere la existencia de mecanismos alternativos. Así, se ha descrito que el transporte hacia la membrana apical de la sacarosa-isomaltasa, proteína asociada a rafts, y de la lactasa-florizina hidrolasa, proteína no asociada a rafts, se realiza a través de estructuras exocíticas distintas (Jacob y Naim, 2001).

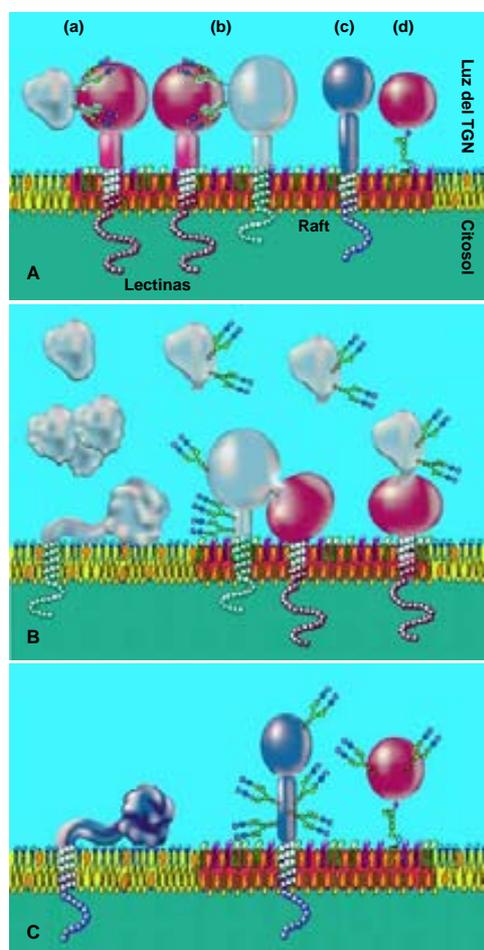


Figura 1.9 Modelos que representan la posible participación de los *N*-glicanos en el *sorting* apical. A: El *sorting* de proteínas apicales estaría mediado por lectinas que se asociarían a rafts y que reconocerían los glicanos de proteínas solubles (a) o de membrana (b). Una vez asociadas a rafts, estas proteínas serían dirigidas hacia la membrana apical. Cabe destacar que otras proteínas se pueden asociar a rafts a través de sus dominios transmembrana (c) o anclajes GPI (d). B y C: los *N*-glicanos modificarían las propiedades biofísicas de las proteínas apicales, de modo que podrían facilitar el reconocimiento de éstas por un hipotético receptor de *sorting* (B) o su incorporación a rafts (C) (tomado de Rodríguez-Boulan y Gonzalez, 1999).

El primer componente cuyo papel en el transporte apical ha sido claramente demostrado es la proteína MAL. Se trata de una proteína con 4 dominios transmembrana de 17 kDa, no glicosilada y asociada a rafts (Martín-Belmonte et al., 1998; Zchetti et al., 1995). Esta proteína se expresa en células formadoras de mielina de rata (Kim et al., 1995) y en vesículas apicales y el dominio apical de células epiteliales polarizadas (Millán et al., 1997; Zchetti et al., 1995). En células MDCK y FRT, esta proteína es necesaria para el transporte apical de proteínas ya sea en asociación, o no, a rafts (Cheong et al., 1999; Puertollano et al., 1999; Martín-Belmonte et al., 2000; Martín-Belmonte et al., 2001).

Otra factor que ha sido implicado en el proceso de transporte apical es la anexina XIIIb, una proteína asociada a rafts específica de células epiteliales (Fiedler et al., 1995). La anexina XIIIb se localiza en el TGN, en vesículas de transporte y en la membrana apical de células MDCK; en estas células, anticuerpos específicos inhiben la formación de vesículas de transporte apical a partir del TGN (Lafont et al., 1998).

1.7.6 Tráfico de proteínas en células epiteliales no polarizadas: la existencia de procesos de *sorting* de proteínas apicales y basolaterales ha sido demostrada incluso en células no polarizadas como fibroblastos. En estas células, las proteínas apicales y basolaterales utilizan rutas distintas para llegar a la membrana plasmática (Müsch et al., 1996; Yoshimori et al., 1996). Algunos tipos de células epiteliales pueden perder su polaridad, temporal o permanentemente, en condiciones fisiológicas y patológicas, como es el caso del cáncer. Normalmente, para estudiar el tráfico de proteínas de membrana en células epiteliales que han perdido su polaridad, se han usado como modelos células como las MDCK o Caco-2 cultivadas en condiciones en las que no están polarizadas, comúnmente en preconfluencia o en un medio con baja concentración de Ca^{2+} . En células MDCK y Caco-2, el *sorting* de proteínas de membrana se mantiene en estas condiciones; sin embargo, éstas son redireccionadas hacia compartimentos intracelulares asociados al citoesqueleto de actina diferentes de los compartimentos endosomales clásicos (Low et al., 2000). Asimismo, SNAREs apicales, como la sintaxina 3, se localizan en el denominado “compartimento vacuolar apical” (*apical vacuolar compartment*, AVC), mientras que SNAREs basolaterales, como la sintaxina 4, se ubican en un componente que constituiría el equivalente basolateral del AVC (Low et al., 2000). Compartimentos similares al AVC, término usado para designar los compartimentos vacuolares que se forman en células MDCK cultivadas en un medio con bajas concentraciones de calcio (Vegas-Salas et al., 1987), han sido descritos en una gran variedad de carcinomas (Remy, 1986; Kern et al., 1987; Vega-Salas et al., 1993).

1.8 Sorting de lípidos: la composición lipídica de las membranas biológicas es variable según el compartimento celular (para ejemplos ver sección 1.6). En las células polarizadas existe un nivel adicional de complejidad puesto que, al igual que ocurre con las proteínas, la composición lipídica de las membranas apical y basolateral es distinta: mientras que la primera está enriquecida en

glicoesfingolípidos, la segunda contiene una alta concentración de fosfatidil colina y esfingomieline (Simons y van Meer, 1988). Estas diferencias se originan por procesos de *sorting*/retención específicos, que pese a los avances recientes, aún están peor caracterizados que los implicados en el caso de las proteínas (revisado en Hoekstra y van IJendoorn, 2000). Una de las diferencias del transporte de lípidos con respecto al de proteínas es que una cantidad significativa de lípidos se pueden transportar por vías no vesiculares (Liscum y Munn, 1999). En principio, el *sorting* de lípidos puede tener lugar en cualquier compartimento en que se origine el tráfico vesicular, incluso en la membrana plasmática. Así, usando esfingomieline marcada con BODIPY, se ha podido visualizar diferentes poblaciones de vesículas endocíticas a los 7 segundos después de la internalización, las cuales contenían diferentes concentraciones de lípidos y receptores de superficie (Chen et al., 1997). En el caso de los lípidos, su *sorting* depende de parámetros que afectan su partición en dominios de diferente fluidez. Éstos incluyen su estructura e identidad físico-química (p. ej. hidrofobicidad, longitud de las cadenas) y la interacción con proteínas. Así por ejemplo, la longitud o el grado de insaturación de las cadenas acilo de los análogos de lípidos Dil (dialquilindocarbocianina) regulan su tráfico en los endosomas tempranos (Mukherjee et al., 1999).

Entre los lípidos cuyas rutas de transporte están mejor caracterizadas cabe destacar los que forman parte de rafts: colesterol y esfingolípidos. Estas rutas están representadas en la figura 1.10 y serán descritas con más detalle en las secciones siguientes.

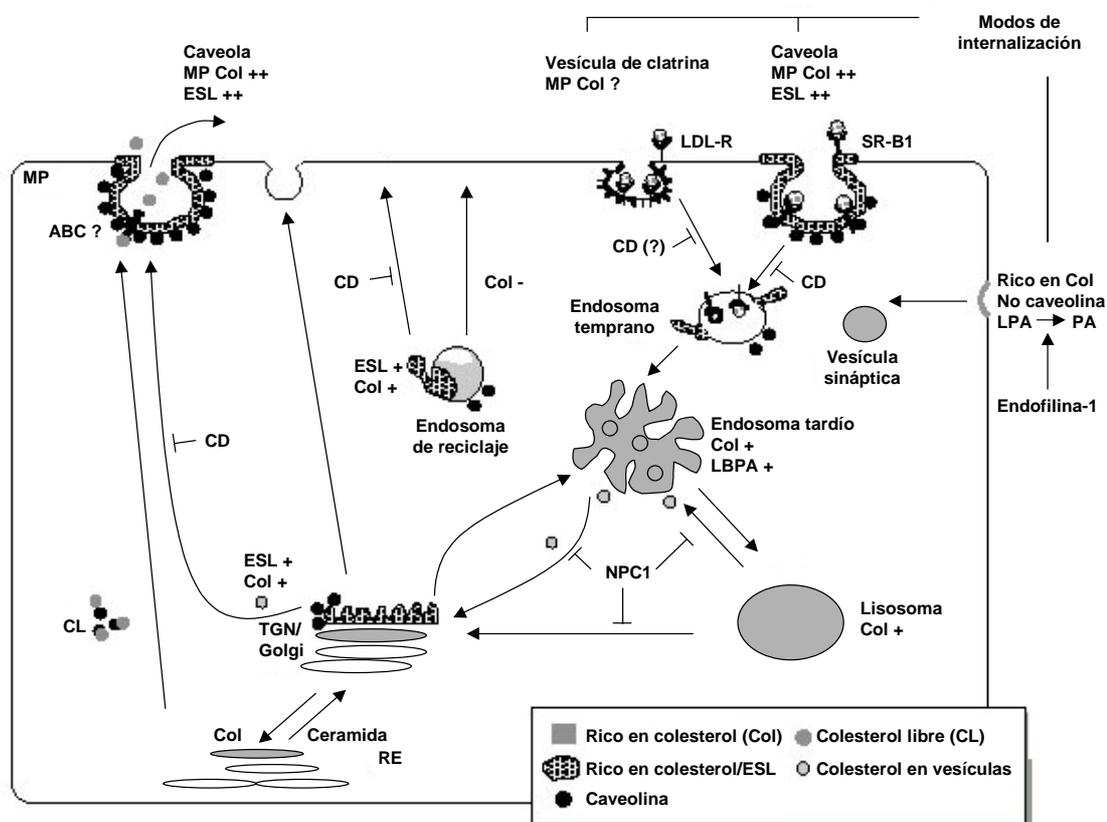


Figura 1.10 Tráfico de colesterol y esfingolípidos (tomado de Hoekstra y van IJendoorn, 2000).

1.8.1 Tráfico de colesterol: la mayor parte del colesterol celular (alrededor de un 80%) está localizado en la membrana plasmática, donde puede incorporarse por procesos de biosíntesis *de novo* o por aporte exógeno, comúnmente a través de la internalización de LDL. El colesterol se sintetiza en el RE, desde donde puede ser transportado hacia la membrana plasmática a través del tráfico vesicular y por un complejo proteico que incluye caveolinas, HSP56 y ciclofilinas (Uittenbogaard, 1998). La internalización de las LDL se efectúa a través de un receptor específico (para ser finalmente degradado en los endosomas tardíos/lisosomas). El colesterol libre producido puede entonces ser transportado hacia la membrana plasmática, quizás vía Golgi. La salida del colesterol de los endosomas tardíos/lisosomas puede ser bloqueada por drogas denominadas aminas hidrofóbicas como U18666A, imipramina, esfinganina y estearilamina, que producen un fenotipo similar al descrito en células de pacientes con la enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC). En esta patología se acumula una notable cantidad de colesterol y glicoesfingolípidos en compartimentos que inicialmente se pensó eran lisosomas (Blanchette-Mackie et al., 1988; revisado en Liscum y Klansek, 1998), pero que recientemente se han identificado como endosomas tardíos (Zhang et al., 2001; Kobayashi et al., 1999). Esta acumulación conduce en el cerebro a una severa degeneración neuronal (Ong et al., 2001; Patel et al., 1999). La NPC es una patología autosómica recesiva (revisado en Patterson et al., 2001) consecuencia de mutaciones en los genes *NPC1* (en aproximadamente un 90% de los casos) y *HE1/NPC2* (Naureckiene et al., 2000). *NPC1* es una glicoproteína de 1278 aa con 13 dominios transmembrana de los que un grupo de 5 es homólogo al dominio sensor de esterol (*sterol-sensing*) de proteínas involucradas en la homeostasis del colesterol celular, como por ejemplo la 3-hidroxi-3 metil glutaril-coenzima A reductasa (HMG-R) (Davies y Ioannou, 2000; revisado en Ioannou, 2000). Esta es una proteína residente de una subpoblación de endosomas tardíos y se puede localizar transitoriamente en el TGN y en los lisosomas (Ko et al., 2001; Zhang et al., 2001; Higgins et al., 1999; Kobayashi et al., 1999). Su función no está del todo bien determinada; sin embargo, puede actuar como una permeasa que transporta ácidos grasos a través de membranas. De hecho, *NPC1* está relacionada con la familia de permeasas procarióticas RND (resistance-nodulation-division). Sin embargo, *NPC1* no transporta colesterol (Davies et al., 2000), no conociéndose a través de qué mecanismos las mutaciones en esta proteína resultan en la acumulación de colesterol. Cruz et al. (2000) han sugerido que *NPC1* está involucrada en la endocitosis de colesterol posterior a su transporte a la membrana plasmática, más que en su salida desde los endosomas tardíos/lisosomas. Los análisis hechos en células NPC, muestran que el colesterol juega un papel clave en la regulación del tráfico de varios lípidos como, por ejemplo, los esfingolípidos (ver siguiente sección). Por otra parte, anticuerpos anti-LBPA endocitados *in vivo* se acumulan en los endosomas tardíos e inducen una acumulación de colesterol semejante a la observada en células NPC (Kobayashi et al., 1999), lo que sugiere que el LBPA está involucrado en la regulación del transporte de colesterol (revisado en Kobayashi et al., 2001b).

1.8.2 Tráfico de esfingolípidos: los esfingolípidos - glicosfingolípidos y esfingomielina - son sintetizados a partir de la ceramida en el Golgi, de donde pueden ser transportados hacia la membrana plasmática a través de distintas vías (p. ej. como parte de rafts). Una vez ahí, pueden ser internalizados y dirigidos a varios orgánulos (p. ej. Golgi, endosomas) o reciclados a la membrana. Estas rutas han sido documentadas usando análogos lipídicos o toxinas marcadas que se unen específicamente a ciertos glicolípidos (Pagano et al., 2000). Recientemente se ha descrito que, en fibroblastos de piel, dos análogos de glicosfingolípidos son internalizados a través de una vía dependiente de clatrina mientras que un análogo de esfingomielina lo es a través de vías dependientes e independientes de clatrina (Puri et al., 2001). De manera similar a lo que ocurre con las proteínas, los eventos de *sorting* de esfingolípidos tienen lugar fundamentalmente a nivel del TGN y del sistema endosomal. En células hepáticas, se ha implicado al compartimento subapical, un equivalente a los endosomas comunes de células MDCK, en el *sorting* polarizado de esfingolípidos (van IJzendoorn y Hoekstra, 2000, 1999, 1998; revisado en Maier et al., 2001). Análogos de glicosfingolípidos que difieren en la estructura de su grupo carbohidratado (Glc-ceramida vs. Gal-ceramida) son enviados, en células HepG2, del compartimento subapical hacia los dominios apical y basolateral respectivamente (van IJzendoorn y Hoekstra, 1998). El tráfico y *sorting* de esfingolípidos está alterado en células provenientes de pacientes con enfermedades de depósito lisosomal (EDL). Éstas, comprenden un grupo de cerca de 40 patologías distintas causadas, generalmente, por mutaciones en una proteína lisosomal que incluyen hidrolasas, proteínas activadoras y proteínas transportadoras. Las deficiencias en estas proteínas acarrearán la acumulación de diferentes sustancias en los lisosomas que, según su naturaleza, han sido usadas para clasificar a las EDL (p. ej. esfingolipidosis, glicogenosis, oligosacaridosis). Los tejidos donde se produce esta acumulación varían según las diferentes patologías. Un análogo fluorescente del glicosfingolípidido lactosil-ceramida (BODIPY-LacCer), que se internaliza de la membrana plasmática hacia el Golgi en fibroblastos de piel normal, se acumula en los endosomas y lisosomas en fibroblastos de 10 tipos diferentes de esfingolipidosis (Chen et al., 1999; Puri et al., 1999). Esta situación se puede reproducir en fibroblastos normales cultivados en la presencia de elevadas concentraciones de LDL, lo que eleva el contenido de colesterol intracelular (Puri et al., 1999). Las células de esfingolipidosis muestran una distribución alterada de colesterol y/o NPC1. La depleción de colesterol en estos fibroblastos restaura la clasificación normal del BODIPY LacCer hacia el Golgi (Puri et al., 1999). El conjunto de estas observaciones demuestra que el colesterol juega un papel importante en la regulación del tráfico de los esfingolípidos (Pagano et al., 2000). Recientemente, se ha encontrado que el incremento del contenido de colesterol perturba solamente el direccionamiento de los esfingolípidos internalizados a través de mecanismos independientes de clatrina, lo que sugiere la existencia de múltiples rutas de transporte de esfingolípidos desde la membrana plasmática hacia el Golgi (Puri et al., 2001).

2. GENERALIDADES DE LA GLICOSILACIÓN

La adición de glúcidos a proteínas y lípidos constituye una de las principales modificaciones en su biosíntesis en células eucarióticas. La proporción en peso que corresponde a la parte glicosídica de las glicoproteínas es extremadamente variable, desde el 1% en la ovoalbúmina hasta el 80% en el caso de las mucinas. La importancia de los glúcidos en la función de los glicoconjugados - glicolípidos o glicoproteínas - puede ser desde aparentemente irrelevante hasta crucial (Varki, 1993).

Las estructuras formadas por los carbohidratos de los glicolípidos y glicoproteínas son muy diversas. Al igual que las proteínas y los ácidos nucleicos, pueden formar polímeros. En el caso de los glúcidos las subunidades básicas son los monosacáridos; los 6 tipos principales son: pentosas, hexosas, hexosaminas, desoxihexosas, ácidos urónicos y ácidos siálicos (revisado en Varki et al., 1999). A diferencia de lo que ocurre con las proteínas y los ácidos nucleicos, los carbohidratos pueden formar moléculas ramificadas y existe más de una manera en que los monosacáridos se pueden enlazar entre sí; esto hace que los glúcidos presenten una extraordinaria diversidad estructural.

2.1 Glicoproteínas: son proteínas que poseen enlazadas una o más cadenas de carbohidratos. Aunque las estructuras glicosídicas que se pueden encontrar en glicoproteínas son extremadamente diversas, se unen al péptido a través de un número limitado de tipos de enlaces. De acuerdo con esto, se definen los "tipos de glicosilación", los cuales serán resumidos a continuación (ver figura 2.1).

2.1.1 Tipos de glicosilación en glicoproteínas: los principales modos de unión de los carbohidratos al esqueleto peptídico son los enlaces *N*- y *O*- glicosídicos y los anclajes GPI (Figura 2.1). Estos tipos de glicanos pueden coexistir en una misma proteína (revisado en Fukuda, 2000; Varki et al., 1999). Así, los términos "*O*-glicoproteína" o "*N*-glicoproteína" reflejan los tipos de cadenas de carbohidratos predominantes, que no exclusivos.

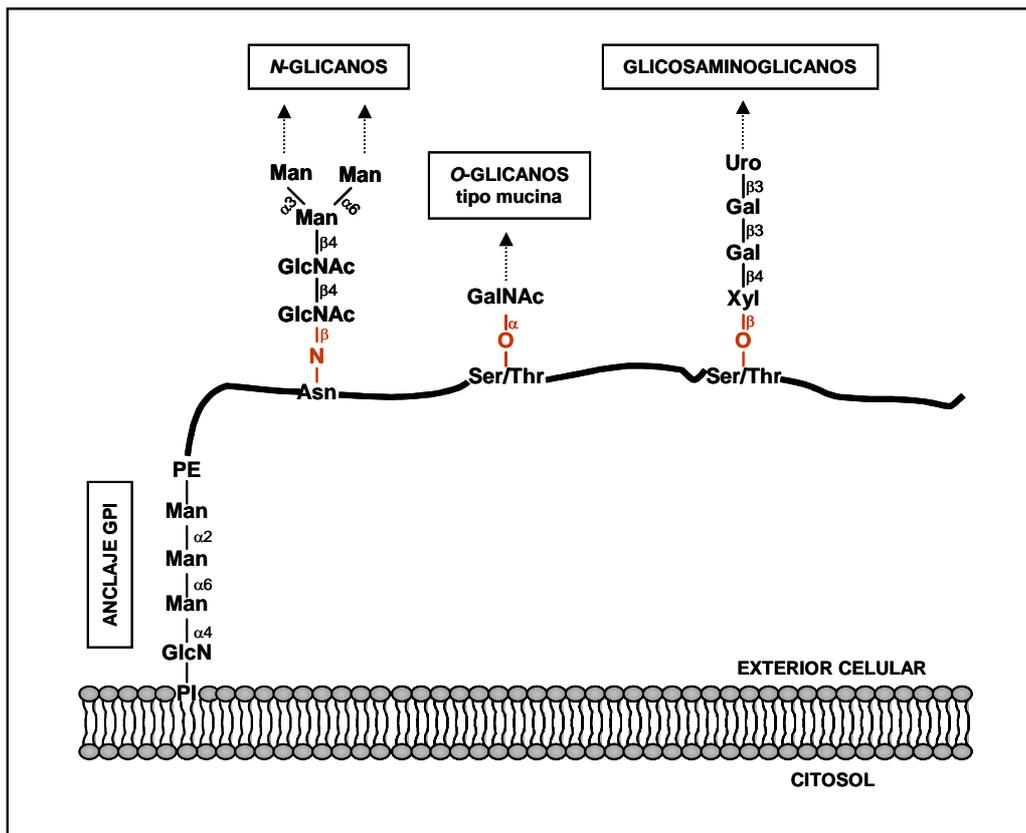


Figura 2.1 Estructuras comunes de inicio de la glicosilación en las glicoproteínas de la ruta secretora (adaptado de Varki et al., 1999).

N-glicosilación: el enlace glicosídico se establece entre GlcNAc y el grupo amino de la cadena lateral de un residuo de Asn. La secuencia consenso para la *N*-glicosilación es Asn-X-Ser/Thr donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro. Generalmente se los agrupa en tres clases: ricos en manosa, complejos e híbridos (ver sección 2.3.3).

O-glicosilación: los carbohidratos forman enlaces con grupos hidroxilo de aminoácidos. Se conocen varios tipos: (revisado en Fukuda, 2000; van den Steen et al., 1998; Varki et al., 1999)

- *O*-GalNAc (*O*-glicosilación tipo mucina): el enlace glicosídico se establece entre GalNAc y el OH de la cadena lateral de un residuo de Ser o Thr. Este es el tipo de glicosilación más abundante en mucinas pero no es exclusivo de ellas. De hecho, la mayoría de las *O*-glicoproteínas de la ruta secretora presentan una glicosilación de tipo mucina.

- *O*-Xil: este enlace se establece entre una xilosa y el OH de Ser o Thr; es típico de las cadenas de glicosaminoglicanos presentes en los proteoglicanos.

- O-GlcNAc: en este enlace, la GlcNAc se une al OH de la Ser o Thr. Las O-glicoproteínas de tipo O-GlcNAc son proteínas citosólicas o proteínas nucleares que se encuentran en el nucleoplasma, por ejemplo factores de transcripción o componentes de los poros nucleares.

- Otros: en el colágeno, Gal se une a la hidroxilisina. En algunas proteínas que contienen dominios de tipo EGF, como por ejemplo Notch, se pueden hallar moléculas de Glc o Fuc unidas a través de enlaces O-glicosídicos a residuos de Ser o Thr. En plantas, se puede hallar a la arabinosa unida a residuos de hidroxiprolina o a Gal enlazada con Ser.

Anclaje glicosil-fosfatidil inositol (GPI): es un "puente" de azúcares que une a un grupo fosfatidilinositol, insertado en una bicapa lipídica, con una fosfoetanolamina, la cual está ligada al extremo carboxilo de una proteína a través de un enlace amida. Este "puente" permite a la proteína anclarse a las membranas biológicas. La estructura de la porción glicosídica en los anclajes GPI es diversa, aunque generalmente se trata de un núcleo formado por 3 Man y una glucosamina (GlcN). Se han descrito numerosas proteínas que usan anclajes GPI para unirse a la membrana, sin embargo, no parece haber ninguna relación estructural ni funcional entre ellas (revisado en Nosjean et al., 1997).

2.2 Glicolípidos: están formados por, al menos, un monosacárido unido a una molécula del esfingolípidos ceramida. Habitualmente los términos glicoesfingolípidos y glicolípidos se usan como sinónimos, aunque no se refieren exactamente a lo mismo. Así por ejemplo, cuando se habla de glicolípidos no se incluye a los anclajes GPI, aunque éstos lo sean en sentido estricto.

En animales superiores, el núcleo de la parte glicosídica está constituido fundamentalmente por Glc y/o Gal. La inmensa diversidad de los glicoesfingolípidos (en eucariotes han sido descritos más de 200 diferentes) radica en tanto el componente glicosídico como el lipídico. Usualmente se los clasifica en neutros, si no contienen ácido siálico, y gangliósidos, si lo contienen (Varki et al., 1999).

Los glicoesfingolípidos se encuentran mayoritariamente en la hoja externa de las membranas biológicas y los azúcares siempre están orientados hacia la región extracelular. Los glicoesfingolípidos están enriquecidos en microdominios denominados rafts (para más detalles ver sección 1.4). La proporción que representan con respecto a los otros lípidos de membrana varía según el tipo celular, así por ejemplo, en eritrocitos es menor al 5% mientras que en neuronas, donde son los lípidos mayoritarios, es de alrededor el 30% (revisado en Varki et al., 1999; Kopitz, 1997).

El patrón de expresión de los glicoesfingolípidos puede ser específico de tejido y puede variar de acuerdo al crecimiento celular, diferenciación, transformación viral y oncogénesis (Hakomori, 1981). A los glicoesfingolípidos de la superficie celular se los ha involucrado en procesos de adhesión celular específicos. Pueden interactuar con toxinas, virus y bacterias (Karlsson, 1989), así como

con receptores de membrana y enzimas (Schnaar, 1991). Por otra parte, los productos lipofílicos del metabolismo de los glicoesfingolípidos, tales como la ceramida y la esfingosina-1-fosfato, están involucrados en eventos de transducción de señales (Spiegel et al., 1996).

La biosíntesis de los glicoesfingolípidos comienza en la membrana interna RE y Golgi, a partir de la L-Ser y el palmitoil-coenzima A (van Echten y Sandhoff, 1993), los cuales darán lugar a ceramida. Posteriormente, la ceramida se puede galactosilar o glucosilar, para formar Gal-ceramida o Glc-ceramida, respectivamente. Mientras que la Gal-ceramida es sintetizada luminalmente en el RE, la síntesis de la Glc-ceramida se efectúa en la membrana citosólica del Golgi; luego, ésta es translocada nuevamente hacia la luz del Golgi, sitio en el que es usada como precursora para la síntesis de todos los glicoesfingolípidos complejos (un modelo que describe la organización de la biosíntesis de los esfingolípidos en la ruta secretora se discute en Lannert et al., 1998). Los glicoesfingolípidos son finalmente transportados a la membrana plasmática, de donde son internalizados por endocitosis para ulteriormente ser degradados en los lisosomas. Mientras que la Gal-ceramida se expresa en ciertos tejidos, fundamentalmente en la mielina en el sistema nervioso, la expresión de la Glc-ceramida es ubicua (revisado en Hirabayashi e Ichikawa, 2000).

2.2.1 Gangliósidos: son glicoesfingolípidos que poseen una o varias moléculas de ácido siálico. (revisado en Nagai y Iwamori, 1995; Lloyd y Furukawa, 1998; Sonnino y Chigorno, 2000). Muchas de las funciones reconocidas para los glicoesfingolípidos pueden ser atribuidas a los gangliósidos (Kolter y Sandhoff, 1998) como, por ejemplo, su rol en la embriogénesis, diferenciación neuronal y leucocitaria, adhesión celular y transducción de señales (para revisión ver Zeller y Marchase, 1992). Aunque son particularmente abundantes en el cerebro y otros tejidos nerviosos, los gangliósidos están presentes en la totalidad de los tejidos del organismo. Su biosíntesis se realiza en el *trans*-Golgi/TGN a partir de Lac-ceramida donde pueden ensamblarse junto con el colesterol en rafts (Lloyd y Furukawa, 1998; Sonnino y Chigorno, 2000).

2.3 Biosíntesis de los glicanos: la glicosilación de proteínas tiene lugar a lo largo de la vía secretora (*N*-glicosilación, *O*-glicosilación de tipo mucina y adición de anclajes GPI) o en el citosol (glicosilación del tipo *O*-GlcNac). En este trabajo nos referiremos solamente a la glicosilación que ocurre en la ruta secretora.

En la glicosilación de una proteína o lípido se requieren moléculas donadoras de azúcares y glicosiltransferasas. La molécula donadora es normalmente un monosacárido activado en forma de lípido o de nucleótido. Los monosacáridos se activan de forma específica y comúnmente están unidos a UDP, GDP o CMP (figura 2.2). La síntesis de los donadores se realiza principalmente en el citosol, desde donde son transportados específicamente hacia la luz de los orgánulos de la ruta secretora por la acción de transportadores localizados en el RE y en el Golgi (Hirschberg et al., 1998b). Una vez

ahí, pueden ser usadas por las glicosiltransferasas para añadir las moléculas de carbohidratos a los aceptores específicos.

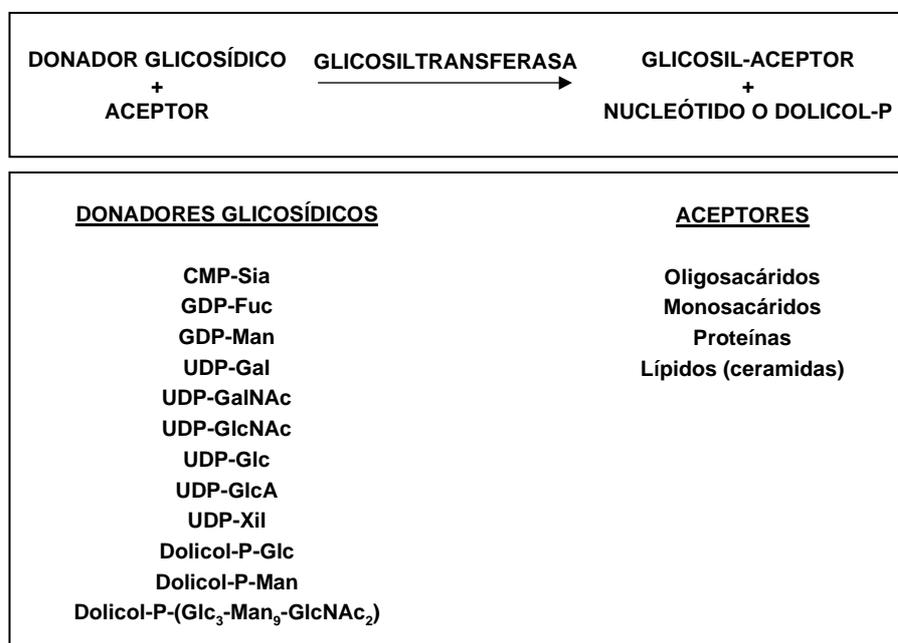


Figura 2.2 Reacción genérica de glicosilación. Se indican los principales donadores glicosídicos descritos (tomado de Varki et al., 1999).

Por lo general, la glicosilación es un proceso secuencial en el que se agregan tres tipos de estructuras: de iniciación (ligadas a las proteínas o lípidos), intermedias (elongación/ramificación) y de terminación (cuando se añaden no permiten la elongación posterior de la cadena). Las glicosiltransferasas encargadas de la adición de estas estructuras tienden a estar distribuidas separadamente - aunque con cierto grado de solapamiento - a lo largo de la vía secretora: mientras que las enzimas encargadas de la iniciación de la glicosilación están presentes al principio de la ruta, las de la terminación lo están hacia el final. De este modo, tradicionalmente se ha comparado a la glicosilación a un proceso similar al de una línea o cadena de ensamblaje, en la cual el producto de una reacción de glicosilación es el sustrato de la siguiente. Otras enzimas que participan en el proceso de glicosilación son las sulfotransferasas, las cuales transfieren grupos sulfato y, quinasas que fosforilan residuos de azúcares específicos. En el procesamiento de los glicanos también intervienen glicosidasas, las cuales eliminan residuos específicos de las cadenas de oligosacáridos. El resultado final de la glicosilación de una proteína/lípido depende de muchos factores, entre ellos, la secuencia de la molécula, la expresión y distribución de las glicosiltransferasas y la disponibilidad espacio-temporal de los donadores y las cadenasceptoras. Cabe destacar que la glicosilación es un proceso en el que numerosas glicosiltransferasas compiten por el mismo aceptor (revisado en Varki et al., 1999; Varki, 1998).

2.3.1 Estructuras de elongación y terminación: las estructuras usadas para la ramificación, elongamiento y terminación de las cadenas de glicanos son usualmente comunes para *N*- y *O*-glicanos de tipo mucina e incluso glicolípidos. Las estructuras de elongación más comúnmente encontradas en *N*- y *O*-glicanos son repeticiones de unidades de neolactosamina (GlcNAc β 1,3Gal) y de lactosamina (GlcNAc β 1,4Gal). Las cadenas de neolactosamina son conocidas como cadenas de tipo I y las de lactosamina como cadenas de tipo II. La estructura de ramificación más común es GlcNAc β 1,6Gal. Las moléculas que normalmente se encuentran al final de los oligosacáridos de glicoconjugados son el ácido siálico, la fucosa y grupos sulfato. Es posible encontrar, sin embargo, cadenas de sacáridos que terminen en Gal o GalNAc como en el caso de los grupos sanguíneos. Las estructuras de terminación mejor conocidas son las correspondientes a los grupos sanguíneos ABO y Lewis. Las cadenas de glicosaminoglicanos contienen repeticiones de disacáridos, normalmente una hexosamina (GlcNAc o GalNAc) y un ácido urónico (Ido A y GlcA) o una hexosa (Gal) que son específicos de este tipo de glicanos (para más detalles de las estructuras usadas en la elongación, ramificación y terminación de las cadenas glicosídicas ver Varki et al., 1999).

2.3.2 Glicosiltransferasas: son las enzimas encargadas de la biosíntesis de los oligosacáridos. Catalizan la transferencia de, por lo general, un monosacárido desde un donador de alta energía a un aceptor que puede ser una proteína, un lípido u otro carbohidrato (oligo o monosacárido) (figura 2.2). Son altamente específicas, no solo para el donador y el aceptor, sino también para la topología del enlace. Su actividad es dependiente, en general, de cationes divalentes (típicamente Mg²⁺ o Mn²⁺) y es óptima en un rango de pH de entre 5,0 y 7,0. *In vitro*, la Km determinada para varias glicosiltransferasas varía entre 10⁻³ y 10⁻⁶ M. Sin embargo, dado que los sustratos sintéticos normalmente usados para efectuar los ensayos cinéticos no reflejan necesariamente la afinidad de las enzimas por sus sustratos naturales, y debido a que es difícil determinar la naturaleza del microambiente en que actúan las glicosiltransferasas, los datos provenientes de los estudios *in vitro* se deben tomar con precaución, puesto que podrían no reflejar necesariamente lo que ocurre *in vivo* (revisado en Varki et al., 1999).

Una idea que tradicionalmente se ha manejado es que a un tipo de enlace le corresponde una glicosiltransferasa. De este modo, se ha estimado que se requieren algo más de 100 enzimas para sintetizar todas las estructuras que los carbohidratos forman en los glicoconjugados (Paulson y Colley, 1989). Sin embargo, el número de glicosiltransferasas existentes seguramente es muy superior, puesto que para numerosas estructuras glicosídicas se ha identificado más de una especie enzimática capaz de sintetizarlas. Los aspectos funcionales de esta redundancia no son del todo bien conocidos. Análisis detallados han mostrado que el entorno proteico y glicosídico influye de manera distinta en la afinidad de enzimas con la misma actividad catalítica. Además, muchas de ellas se expresan diferencialmente según el tejido, diferenciación o desarrollo (p. ej. ver ST3Gal I y ST3Gal II en sección 3.1 de Introducción). Por otra parte, algunas glicosiltransferasas pueden transferir azúcares a más de una molécula aceptora (p. ej. ST3Gal II) y/o a través de más de un tipo de enlace

(p ej. FUTIII) (revisado en Varki et al., 1999). El criterio para agrupar a las glicosiltransferasas en familias se ha basado comúnmente en el tipo de azúcares que transfieren (p. ej. sialiltransferasas, fucosiltransferasas, galactosiltransferasas) (revisado en Breton et al., 2001). En base a análisis de secuencia y a la estereoquímica de la actividad catalítica sobre el sustrato/producto, se ha clasificado a las glicosiltransferasas en, hasta el momento, 57 familias diferentes (Campbell et al., 1997; ver Carbohydrate-Active Enzymes server en URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/index.html>, Coutinho y Henrissat, 1999).

Las glicosiltransferasas de la ruta secretora presentan una estructura secundaria similar. Son glicoproteínas de membrana de tipo II, con una región citosólica N-terminal muy pequeña, un dominio transmembrana de alrededor 20 aminoácidos y una región C-terminal luminal con dos dominios: uno, generalmente pequeño y sensible a proteasas, denominado "tallo" y otro mayor, globular, que es el responsable de la actividad catalítica. Algunas glicosiltransferasas pueden ser proteolizadas generalmente en el dominio de "tallo", lo cual las convierte en formas solubles, y por lo tanto, secretables al exterior celular, sin que su tasa de actividad se vea afectada (Weinstein et al., 1987; revisado en Varki, 1999) (figura 2.3).

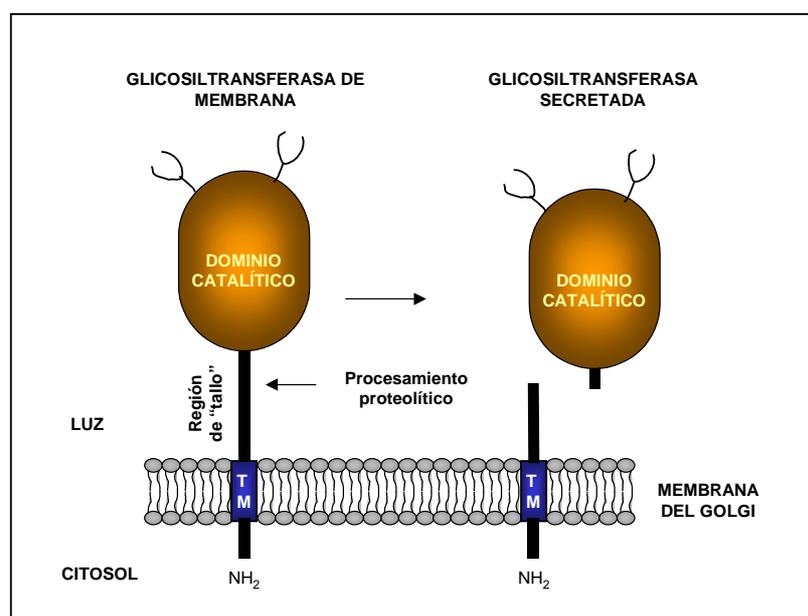


Figura 2.3 Representación esquemática de la topología y procesamiento de las glicosiltransferasas de la ruta secretora en vertebrados. TM: dominio transmembrana (adaptado de Varki et al., 1999).

Como se ha mencionado anteriormente las diferentes glicosiltransferasas muestran - en general - un patrón de distribución compartimentalizado a lo largo de la ruta secretora, de acuerdo

con su posición relativa durante la síntesis de las cadenas glicosícas (Rabouille et al., 1995; Roth, 1987). Análisis detallados han mostrado que su distribución es dependiente del tipo celular y puede variar en ciertas patologías como el cáncer (Egea et al., 1993; revisado en Colley, 1997). Estos cambios podrían, en parte, ser responsables de las modificaciones de la glicosilación descritas en estas patologías. En algunos tipos celulares, como por ejemplo espermatozoides y fibroblastos, se ha demostrado la presencia de Gal T en la superficie celular, donde se ha postulado que puede actuar como un receptor tipo lectina involucrado en la adhesión célula-célula y célula-matriz y en la transducción de señales (revisado en Shur et al., 1998). La manera en que las glicosiltransferasas se retienen en compartimentos específicos no está del todo bien elucidada. Los requerimientos estructurales que determinan la localización de las enzimas ST6Gal I, Gal TI y Gn TI en el Golgi se han estudiado con detalle, y se han identificado señales de retención en la región transmembrana y en los aminoácidos adyacentes a ella (revisado en Colley, 1997). Se han propuesto dos modelos principales para explicar la retención de las glicosiltransferasas en las cisternas del Golgi: *i)* a través del reconocimiento y oligomerización de enzimas similares (*oligomerization/kin recognition model*) y *ii)* dependiente del grosor de la bicapa lipídica (*bilayer thickness model*). El primer modelo afirma que glicosiltransferasas relacionadas formarían homo o hetero oligómeros de gran tamaño imposibles de ser transportados en las vesículas de secreción. El segundo se basa en el hecho de que la región transmembrana de las glicosiltransferasas es menor a la de otras proteínas de membrana y, en que el grosor de la bicapa lipídica aumenta a lo largo de la ruta secretora debido, fundamentalmente, al incremento en el contenido de colesterol. Este modelo propone que las glicosiltransferasas se retendrían en el Golgi debido a que sus dominios transmembrana no favorecerían su inclusión en las membranas de las vesículas de secreción. De momento, se han aportado evidencias que confirman ambos modelos (revisado en Munro, 1998; Colley, 1997).

2.3.3 Biosíntesis de los N-glicanos: la N-glicosilación comienza en la luz del RE con la adición de un oligosacárido preformado (constituido por 3 Gluc, 9 Man y 2 GlcNAc) desde un lípido donador, el dolicol pirofosfato, al residuo Asn del polipéptido. Esta reacción es catalizada por una única transferasa y se realiza de manera cotraduccional. Aproximadamente un 90% de las secuencias consenso (Asn-X-Ser/Thr) son glicosiladas (Gavel y von Heijne, 1990). Posteriormente, se eliminan enzimáticamente 3 glucosas y 1 manosa en la luz del RE. La estructura resultante se denomina "rica en manosa". A continuación, se eliminan más manosas de las cadenas glicosídicas en el Golgi y, adicionalmente, éstas se pueden elongar y/o ramificar por la adición secuencial de otros azúcares, como por ejemplo, cadenas de lactosamina, fucosa o ácido siálico (figura 2.4) para dar como resultado N-glicanos del tipo complejo. Las cadenas de N-glicanos de tipo híbrido presentan 3 manosas y moléculas de lactosamina, resultado del procesamiento parcial de las estructuras "ricas en manosa" (revisado en Fukuda, 2000; Kukuruzinska y Lennon, 1998). En el cáncer, los N-glicanos están altamente ramificados y sialilados (revisado en Brockhausen et al., 1998).

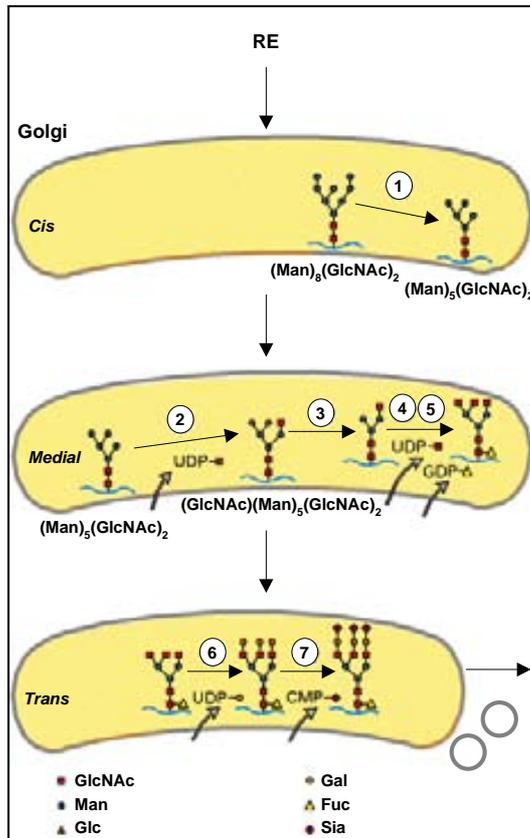


Figura 2.4 Distribución de glicosiltransferasas y glicosidasas y procesamiento de *N*-glicanos en las cisternas del Golgi. La topología de adición de azúcares es similar para los *O*-glicanos (adaptado de Lodish et al., 1999. Figura original en Kornfeld y Kornfeld, 1985).

Glicosiltransferasas y glicosidasas:

- cis Golgi:* 1) Manosidasa I.
- medial Golgi:* 2) Gn TI
3) Manosidasa II
4) Gn TII
5) Fuc T
- trans Golgi:* 6) Gal T
7) Sia T.

2.3.4 Biosíntesis de los *O*-glicanos tipo mucina: a diferencia de la *N*-glicosilación, la adición de GalNAc a residuos de Ser o Thr es un proceso post-traducciona. Además, debido a que la *O*-glicosilación es un evento posterior al plegamiento de la proteína, solamente los residuos expuestos de Ser y Thr serán glicosilados. Esta reacción es catalizada por una familia de polipéptido α -GalNAc transferasas (GalNAc T), de las que se han descrito al menos 8 miembros, los cuales muestran especificidades ligeramente diferentes en cuanto a la secuencia proteica aceptora (Wandall et al., 1997; Bennett et al., 1998; revisado en Clausen y Bennett, 1996). Debido a esto, no se ha encontrado una secuencia consenso general de *O*-glicosilación; sin embargo, parece que la *O*-glicosilación tipo mucina ocurre mayormente en regiones de la proteína con estructuras de hoja β y con una conformación extendida (zonas repetitivas ricas en Ser, Thr y Pro). Los residuos Thr parecen ser glicosilados más eficientemente que los Ser. Frecuentemente, Ser, Thr, Pro y Val están presentes en las 8 posiciones anteriores y las 3 posteriores a una Thr glicosilada (de hecho, Pro es a menudo encontrado en las posiciones -1 y +3). La presencia de residuos con carga en las posiciones -1 y +3 no favorece la glicosilación (revisado en van de Steen et al., 1998). Recientemente se han desarrollado algunos algoritmos que permiten predecir los sitios en que una secuencia se puede *O*-glicosilar (NetOGlyc 2.0 Prediction Server, Center for Biological Sequence Analysis, en el URL: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>; Hansen et al., 1998, 1997, 1995). Mientras que la GalNAc

T1 parece tener una distribución ubicua, los otros miembros de la familia muestran un patrón de expresión específico de tejido (revisado en Clausen y Bennett, 1996). Así, por ejemplo, la GalNAc T2 es la que principalmente se expresa en hígado y riñón mientras que la GalNAc T3 está fundamentalmente expresada en páncreas, testículos y, en menor grado, en placenta, riñón, colon e intestino (Bennett et al, 1996). El lugar de inicio de la O-glicosilación ha sido y es fuente de controversias, debido sobre todo a que éste puede ser distinto según el tipo celular (Varki et al., 1999). Por lo general, se trata de un evento post-RE. La localización de las polipéptido GalNAc T, indicadoras de la iniciación de la biosíntesis de los O-glicanos, varía según el tipo celular y el estado de diferenciación. Así, se ha descrito que pueden encontrarse en el RE, en el ERGIC o en el Golgi (Roth, 1995; Roth et al., 1994; Pérez-Vilar, 1991).

La síntesis de las cadenas de O-glicanos de tipo mucina comienza con la adición de GalNAc a una Ser o Thr de la cadena polipeptídica. A la estructura resultante (Ser/Thr-O- α -GalNAc) se le denomina antígeno Tn. Posteriormente, se pueden añadir a la cadena uno o dos azúcares que dan lugar a estructuras denominadas “núcleos de elongación” (*core*). Hasta la fecha se ha identificado 8 diferentes núcleos de elongación (ver tabla 2.1), pero los más comunes son los del tipo 1 al 4 (Brockhausen, 1999; van de Steen et al., 1998). La estructura formada por el núcleo de elongación de tipo 1 (Ser/Thr-O-GalNAc β 1-3Gal) se denomina antígeno T. Al igual que los N-glicanos, las cadenas de O-glicanos se pueden elongar y ramificar de diversas maneras, procesos que terminan con la adición de ácido siálico, fucosa o grupos sulfato (ver sección 2.3.1 y figura 2.5). La longitud de las cadenas de O-glicanos es muy variable pudiendo ser de hasta 20 residuos. En el cáncer se ha descrito un acortamiento de las cadenas, las cuales pueden ser prematuramente sialiladas. En estas patologías hay un considerable aumento de las estructuras Tn y T o de sus versiones sialiladas (p. ej. Sia α 2,6 Tn; Sia α 2,3 T) (para una revisión detallada de la biosíntesis de los O-glicanos ver Brockhausen, 1999).

Tabla 2.1 Núcleos de elongación de O-glicanos tipo mucina

Designación	Estructura
Núcleo 1	Gal β 1,3 GalNAc
Núcleo 2	GlcNAc β 1,6 [Gal β 1,3] GalNAc
Núcleo 3	GlcNAc β 1,3 GalNAc
Núcleo 4	GlcNAc β 1,6 [GlcNAc β 1,3] GalNAc
Núcleo 5	GalNAc α 1,3 GalNAc
Núcleo 6	GlcNAc β 1,6 GalNAc
Núcleo 7	GalNAc α 1,6 GalNAc
Núcleo 8	Gal α 1,6 GalNAc

Tomado de Brockhausen (1999)

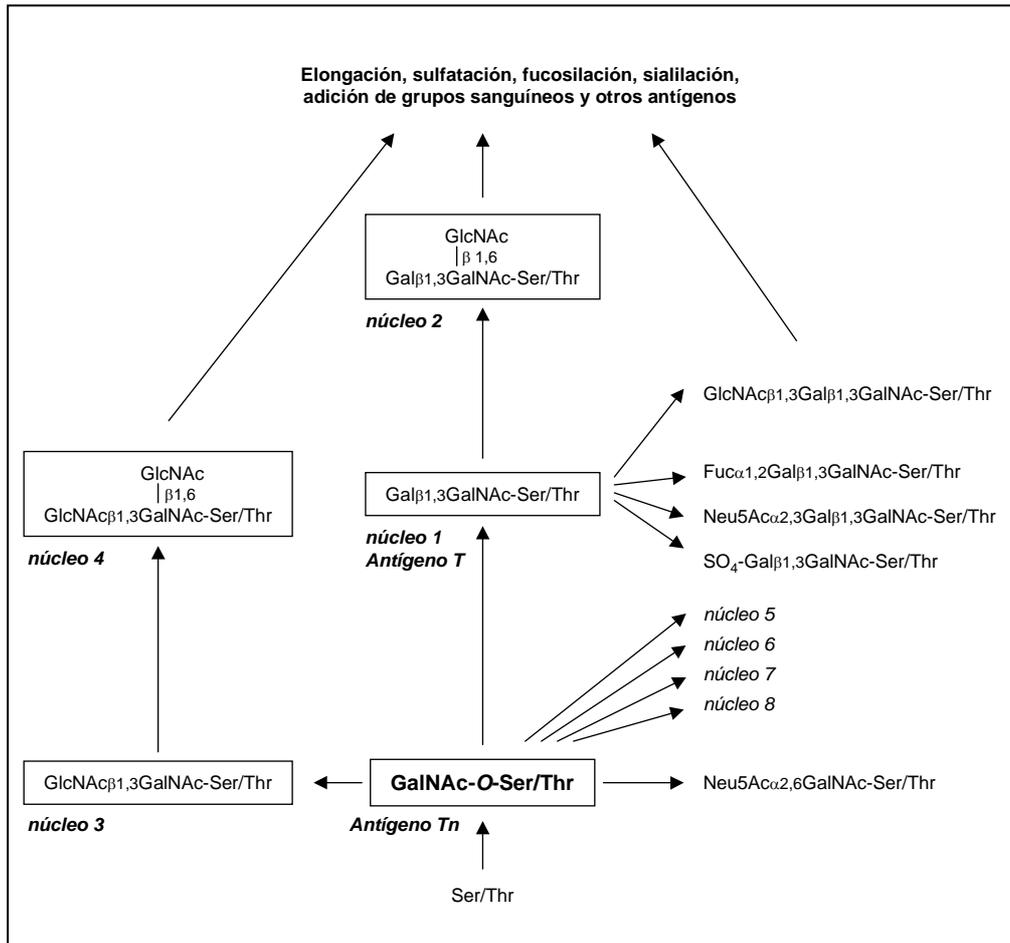


Figura 2.5 Rutas de biosíntesis de los O-glicanos (tomado de Brockhausen et al., 1998).

2.4 Funciones de los glicanos: la pregunta “¿cuál es la función de los glicanos?” merece una respuesta tan amplia como la pregunta “¿cuál es la función de las proteínas?”. Como se ha mencionado anteriormente, los glicanos presentan una gran diversidad estructural y han sido implicados en numerosos procesos biológicos (para detalles, ver Varki, 1993). Las estrategias más usadas para determinar los procesos en los que están implicados los glicanos han sido el uso de fármacos inhibidores de glicosilación, modelos celulares deficientes en tipos de glicosilación concretos y, más recientemente, el desarrollo de ratones deficientes en los genes que codifican glicosiltransferasas. Tal y como era previsto, los fenotipos de estos ratones son muy variables, desde la aparente normalidad hasta la letalidad (Furukawa et al., 2001; Muramatsu, 2000).

Las funciones reconocidas de los glicanos pueden ser agrupadas en dos categorías generales: *i)* funciones estructurales y modulatorias, que involucran a los mismos glicanos o a las

moléculas a las cuales están ligados y *ii*) procesos de reconocimiento a través de lectinas (proteínas que se unen a carbohidratos) tanto exógenas como endógenas (Varki et al., 1999).

2.4.1 Funciones estructurales y modulatorias: en muchas glicoproteínas la glicosilación es un requisito indispensable para su correcto plegamiento/conformación, oligomerización y solubilidad (Imperiali y O'Connor, 1999; Wormald y Dwek, 1999). Los glicanos constituyen una barrera física que sirve como protección a la degradación ya sea a nivel de moléculas, como proteínas, o de estructuras, como las membrana plasmática o lisosomal.

Se conocen numerosos ejemplos en los que la glicosilación influye en las propiedades biológicas del péptido. En algunos casos, la glicosilación es crítica para su actividad, como por ejemplo en la β -glucosidasa lisosomal (Grace y Grabowski, 1990 en Varki, 1993). En otros, la glicosilación modula la función de la proteína, como en las cadenas de ácido polisiálico (APS) de la N-CAM, un receptor que media uniones homotípicas entre neuronas. La longitud del APS es variable y cuanto más largas son las cadenas, menor es la afinidad homotípica de la N-CAM. En situaciones de "plasticidad neuronal", como en el desarrollo embrionario, el APS forma cadenas largas (revisado en Brusés y Rutishauser, 2000). Otro ejemplo, recientemente descrito, es la regulación que la proteína Fringe ejerce sobre la actividad de Notch en el desarrollo embrionario, la cual depende de su actividad glicosiltransferasa. Fringe transfiere grupos GlcNAc a la estructura Fuc-O-Ser/Thr presente en los dominios EGF de Notch (Moloney et al., 2000; Brückner et al., 2000). La acción de Fringe produce un incremento en la afinidad de Notch hacia Delta, uno de sus ligandos (Brückner et al., 2000).

2.4.2 Procesos de reconocimiento a través de lectinas: los glicanos pueden servir como ligandos de lectinas de origen exógeno o endógeno. Muchas bacterias y virus patógenos reconocen epítomos glicosilados en la superficie de las células (ejemplos de los que reconocen epítomos sialilados son citados en la sección 3.3).

Se han descrito numerosas lectinas endógenas en células de mamíferos, las cuales han sido clasificadas en distintas familias sobre la base de su secuencia aminoacídica. Entre éstas, destacan las lectinas de tipo C (dependientes de Ca^{+2}), I (inmuglobulina-*like*) (Powell y Varki, 1995), P (que reconocen Man6P) y las galectinas (Varki et al., 1999). Asimismo, existen otras lectinas no relacionadas con estas familias. Las lectinas de mamíferos pueden ser monoméricas o formar complejos constituidos por varios polipéptidos y pueden reconocer los epítomos glicosilados a través de un único o múltiples dominios CRD (*carbohydrate recognition domain*). En algunos procesos celulares, como la adhesión célula-célula y célula-matriz y el tráfico de glicoproteínas, participan mecanismos de reconocimiento a través de lectinas endógenas. Son normalmente proteínas de membrana que tienen, en algunos casos, la capacidad de transducir señales (para detalles, ver Hebert, 2000). Las lectinas endógenas implicadas en procesos de adhesión célula-célula mejor caracterizadas son las selectinas, lectinas de tipo C que participan, entre otros procesos, en el

"rolling" de leucocitos sobre células endoteliales (ver sección 3.3). Otras lectinas implicadas en procesos de adhesión celular y que reconocen epítomos sialilados se citan en la sección 3.3. Los receptores de ácido hialurónico, como CD44, constituyen las lectinas que median el reconocimiento a componentes de la matriz extracelular más estudiadas. Éstas están implicadas en procesos tales como la motilidad celular, proliferación, reparación de heridas, morfogénesis y metástasis (revisado en Varki et al., 1999).

Lectinas y tráfico de proteínas: La tabla 2.2 describe las lectinas residentes a lo largo la ruta secretora descritas hasta el momento. La calnexina y calreticulina, localizadas en el RE, están implicadas tanto en el plegamiento de proteínas recién sintetizadas como en el transporte hacia el citosol de las que no se han plegado correctamente, para su posterior degradación (revisado en Helenius y Aebi, 2001). Por otra parte, las lectinas homólogas ERGIC53 y VIP36, las cuales reconocen *N*-glicanos tipo "rico en manosa" (Itin et al., 1996; Hara-Kuge et al., 1999), han sido implicadas en el reconocimiento y transporte de glicoproteínas entre el RE y el Golgi (revisado en Helenius y Aebi, 2001; Hauri et al., 2000). Algunas estructuras de glicanos son usadas como señales de localización (*targeting*) de glicoproteínas. Así por ejemplo, los residuos Man6P son utilizados como señal de localización lisosomal (ver sección 1.5) y los *N* y *O* glicanos han sido involucrados en la localización apical (ver sección 1.7.3). A diferencia de los receptores para la Man6P, los cuales han sido identificados, las lectinas que pudieran mediar la localización apical de glicoproteínas están aún por descubrir.

Tabla 2.2 Lectinas de la ruta secretora

Lectina	Localización mayoritaria	Especificidad	Dependencia de Ca ²⁺	Función
Canelxina	RE	Glc+Man	+	Plegamiento y degradación
Calreticulina	RE	Glc+Man	+	Plegamiento y degradación
No identificada	RE	Man ₈	?	Degradación
ERGIC-53	ERGIC	Man	+	Transporte RE-ERGIC
VIP36	cis-Golgi/ERGIC	Man ₆₋₉	-	Transporte RE-ERGIC ¿recaptación de proteínas hacia el RE?
IGF-II/CI-MPR	Endosomas tardíos	Man-6-P	-	Transporte Golgi - endosomas y membrana plasmática - endosomas
CD-MPR	Endosomas tardíos	Man-6-P	+	Transporte Golgi - endosomas
Existencia presumida	TGN (?)	<i>N</i> - y <i>O</i> - glicanos	?	Transporte Golgi - membrana apical

Adaptado de Hauri et al. (2000)

3. ÁCIDOS SIÁLICOS

Los ácidos siálicos (Sias) comprenden una familia de alrededor 40 miembros derivados del ácido neuramínico (Neu) (para una revisión detallada de la biología de los ácidos siálicos ver Schauer et al., 1995; Schauer y Kamerling, 1997; Travin y Schauer, 1998). El ácido neuramínico es un azúcar de 9 carbonos con un grupo amino en posición 5 y un grupo carboxilo en posición 1 (figura 3.1), el cual confiere a la molécula carga negativa en condiciones fisiológicas (pK 2,2). En la naturaleza el ácido neuramínico siempre se encuentra modificado; usualmente, el grupo amino se acetila formándose el ácido *N*-acetil neuramínico (Neu5Ac) que es el ácido siálico más común (Traving y Schaeur, 1998). El sustituyente en posición 5 puede ser también un glicolil o un grupo hidroxilo definiendo así los otros dos tipos principales de ácidos siálicos: el ácido *N*-glicolil neuramínico (Neu5Gc) y el ácido cetodeoxinonulosónico (Kdn) (Klein y Roussel, 1998). La diversidad de ácidos siálicos se origina en sustituciones con grupos metil, acetil, lactil, sulfato o fosfato en las posiciones 4, 7, 8 y 9 del ácido neuramínico (Varki, 1992; Klein y Roussel, 1998).

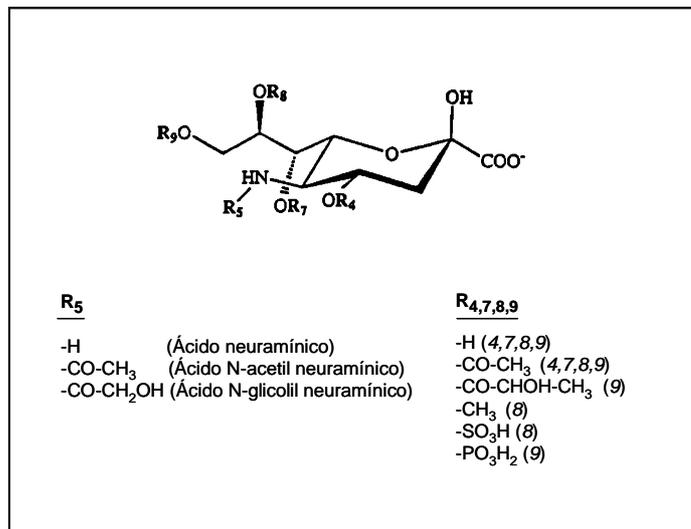


Figura 3.1 Estructura química de los ácidos neuramínicos o ácidos siálicos (tomado de Reutter et al., 1997). En la naturaleza, el ácido neuramínico puede presentar sustituciones en las posiciones 4,5,7,8,9. Para detalles, ver el texto.

Los ácidos siálicos se encuentran fundamentalmente en animales deuterostomados, desde equinodermos hasta humanos. Sin embargo, también se ha descrito su presencia en algunos protozoos, bacterias y virus, mientras que en larvas de *Drosophila* se ha detectado ácido polisialico

(Traving y Schauer, 1998). El Neu5Gc es común en muchas especies de mamíferos, si bien no se expresa en tejidos humanos normales. El Kdn se ha detectado fundamentalmente en el esperma y los huevos de peces teleósteos (Nadano et al., 1986; Traving y Schauer, 1998) y en otros animales, incluyendo mamíferos (Ziak et al., 1996).

Normalmente los ácidos siálicos se encuentran en posición terminal en las cadenas de oligosacáridos de glicoproteínas y glicolípidos, comúnmente a través de enlaces α 2,6 (a Gal, GalNAc y GlcNAc) y α 2,3 (a Gal). El ácido siálico puede también formar polímeros, uniéndose entre sí a través de enlaces α 2,8; las cadenas poliméricas de α 2,8 se inician normalmente con un ácido siálico unido en posición α 2,3. Su distribución está restringida a ciertos tejidos y moléculas como la N-CAM y gangliósidos (Traving y Schauer, 1998). El ácido siálico ligado en posición α 2,3 se encuentra en prácticamente todas las células. Por el contrario, no todas las células presentan ácido siálico ligado en posición α 2,6 (Varki et al., 1999). Como ocurre con muchos otros glicanos, la expresión y las modificaciones del ácido siálico son tejido-específicas y se regulan durante el desarrollo embrionario. Una herramienta importante en el análisis de la expresión de los ácidos siálicos han sido lectinas que reconocen específicamente ácido siálico o epítomos sialilados. Entre ellas destacan la LFA (*Limux flavus agglutinin*) [que se une al ácido siálico indistintamente del tipo de enlace por el que esté ligado (Miller et al., 1982)], MAL (*Maackia amurensis lectin*) [la cual detecta el ácido siálico unido a través de un enlace α 2,3 (Wang y Cummings, 1988)] y SNA (*Sambucus nigra agglutinin*) [que reconoce al ácido siálico ligado en posición α 2,6. (Shibuya et al., 1987)].

3.1 Sialiltransferasas: estas glicosiltransferasas transfieren el ácido siálico a partir de CMP-Neu5Ac a las posiciones terminales de las cadenas glicosídicas de glicoproteínas y glicolípidos según la reacción $\text{CMP-Neu5Ac} + \text{R} \rightarrow \text{Neu5Ac-R} + \text{CMP}$ (para revisión ver Harduin-Lepers et al., 2001; Tsuji, 1996). Al menos 10 - 12 sialiltransferasas son requeridas para sintetizar todos los sialooligosacáridos conocidos (Paulson y Colley, 1989). Sin embargo, al igual que lo que ocurre con el resto de glicosiltransferasas, se han identificado más enzimas de las esperadas. Actualmente se conocen ≥ 15 sialiltransferasas humanas (Tabla 3.1): 6 ST3Gal, 1 ST6Gal, 3 ST6GalNAc y 5 ST8Sia¹. Recientemente se ha descrito que la ST3Gal II puede transferir ácido siálico en posición α 2,3 a GalNAc, lo que la convierte en el único miembro conocido de la familia con capacidad de transferir ácido siálico a dos tipos de monosacáridos diferentes (Toivonen et al., 2001). Todavía no se ha clonado la(s) enzima(s) que transfiere(n) ácido siálico en posición α 2,6 a GlcNAc responsable de la síntesis de la estructura Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4[Neu5Ac α 2,6]GlcNAc.

¹ En este trabajo se sigue la nomenclatura de las sialiltransferasas propuesta por Tsuji et al. (1996). De acuerdo a ésta, cada gen de sialiltransferasa se designa de la forma ST,x,y,z donde ST significa sialiltransferasa, x indica el átomo de carbono al cual es transferido el ácido siálico (3, 6, 8), y indica la molécula a la que el ácido siálico es transferido (Gal, galactosa; GalNAc, N-acetilgalactosamina; Sia, ácido siálico) y z es un número romano asignado cronológicamente a cada gen de cada subgrupo.

Tabla 3.1 cDNAs humanos que codifican sialiltransferasas

Enlace Formado	Nombre	Aceptor ¹	Referencia
Neu5Acα2,3Gal	ST3Gal I	Gal β 1,3GalNAc	Kitagawa y Paulson, 1994a Chang et al., 1995
	ST3Gal II	Gal β 1,3GalNAc GalNAc β 1,3Gal	Giordanengo et al., 1997 Kim et al., 1996
	ST3Gal III	Gal β 1,3(4)GlcNAc	Kitagawa y Paulson, 1993
	ST3Gal IV	Gal β 1,3GalNAc Gal β 1,4(3)GlcNAc	Kitagawa y Paulson, 1994b Sasaki et al., 1993 Kitagawa et al., 1996
	ST3Gal V	Gal β 1,4(3)Glc-Cer [GM3]	Ishii et al., 1998
	ST3Gal VI	Gal β 1,4GlcNAc	Okakima et al., 1999
Neu5Acα2,6Gal	ST6Gal I	Gal β 1,4GlcNAc	Grundmann et al., 1990 Stamenkovic et al., 1990 Bast et al., 1992
Neu5Acα2,6GalNAc	ST6GalNAc I	GalNAc	Ikehara et al., 1999
	ST6GalNAc II	Gal β 1,3 GalNAc	Samyn-Petit et al., 2000
	ST6GalNAc III	Neu5Acα2,3Gal β 1,3 GalNAc	cDNA / gen humano todavía no clonado
	ST6GalNAc IV	Neu5Acα2,3Gal β 1,3 GalNAc	Harduin-Lepers et al., 2000
	ST6GalNAc V	Neu5Acα2,3Gal β 1,3 GalNAc [GD1] (?)	cDNA / gen humano todavía no clonado
	ST6GalNAc VI	GD1, GT1, GQ1	cDNA / gen humano todavía no clonado
Neu5Acα2,8Neu5Ac	ST8Sia I	Neu5Acα2,3Gal β 1,4Glc-Cer [GM3] Neu5Acα2,8Neu5Acα2,3Gal β 1,4Glc -Cer [GD3]	Nara et al., 1994 Sasaki et al., 1994 Nakayama et al., 1996
	ST8Sia II	(Neu5Ac)_n-N-glicano	Scheidegger et al., 1995
	ST8Sia III	Neu5Acα2,3Gal β 1,4GlcNAc	Lee et al., 1998
	ST8Sia IV	(Neu5Acα2,8)_nNeu5Acα2,3Gal	Nakayama et al., 1995
	ST8Sia V	Neu5Acα2,3Gal β 1,3GalNAc β 1,4 (Neu5Acα2,3Gal β 1,4Glc-Cer [GD1a]) Neu5Acα2,3Gal β 1,3GalNAc β 1,4 (Neu5Acα2,8Neu5Acα2,3Gal β 1,4 Glc-Cer [GT1b]) Neu5Acα2,8Neu5Acα2,3Gal β 1,4Glc -Cer [GD3]	Kim et al., 1997

¹ La molécula a la que el ácido siálico es transferido está indicada en negrita
Adaptado de Tsuji et al. (1996)

Los genes que codifican sialiltransferasas están organizados en múltiples exones (Harduin-Lepers et al., 2001) y solo presentan homología en tres regiones, altamente conservadas, que han recibido el nombre de motivos sialil (*sialyl motifs*) L (*large*), S (*small*) y VS (*very small*) (Harduin-Lepers et al., 2001; Datta y Paulson, 1997; Geremia et al., 1997) (ver figura 3.2).

Las sialiltransferasas poseen una topología similar a la del resto de glicosiltransferasas: son proteínas transmembrana de tipo II con un dominio N-terminal citoplasmático muy pequeño (3-11 aa), un dominio transmembrana (13-18 aa) y una región C-terminal que contiene una región de "tallo" (30-200 aa), susceptible de proteólisis, y un dominio globular (300-350 aa) en el que se halla el centro catalítico (Tsuji, 1996) (ver figura 3.2).

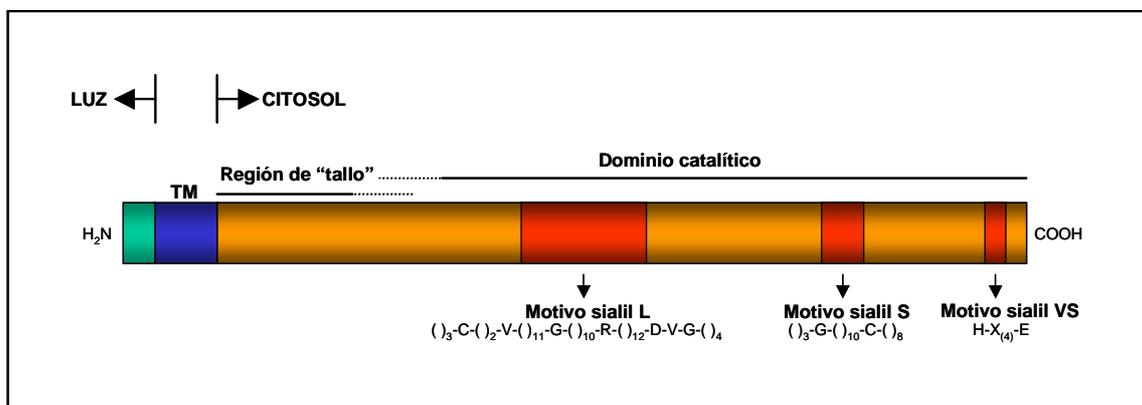


Figura 3.2 Estructura esquemática de una sialiltransferasa "tipo" (adaptado de Varki et al., 1999).

La sialiltransferasa más estudiada es la ST6Gal I. Análisis por mutagénesis del gen ST6Gal I de rata han mostrado que el motivo sialil L contiene aminoácidos requeridos para la unión del donador CMP-Neu5Ac (Datta y Paulson, 1995) mientras que el motivo sialil S está involucrado en la unión tanto de las moléculas donadoras como de las del sustrato (Datta et al., 1998). Se ha encontrado que la ST6Gal I presenta un puente disulfuro imprescindible para la actividad enzimática, establecido entre dos residuos cisteínas altamente conservados, localizados en el motivo sialil L y el motivo sialil S, respectivamente (Datta et al., 2001). Una situación similar también ha sido demostrada para la ST8Sia IV (Angata et al., 2001). La ST6Gal I puede formar dímeros a través de puentes disulfuro, los cuales se establecen en el retículo endoplasmático (Qian et al., 2001). En el hígado, de un 20 a un 30% de la enzima forma dímeros cuya actividad catalítica está reducida debido a una baja afinidad por el donador CMP-Neu5Ac, aunque mantienen la capacidad de unirse a las cadenas aceptoras (Ma y Colley, 1996). Se ha descrito la existencia de dos isoformas de ST6Gal I que difieren tan solo en un aminoácido del dominio catalítico y son generadas por un evento de edición de RNA ($A \rightarrow G$, $123^{\text{Tyr}} \rightarrow 123^{\text{Cys}}$) (Ma et al., 1997). La isoforma ST6Gal I^{Tyr} se localiza temporalmente en el Golgi y, tras proteólisis en un compartimento post Golgi, es secretada. En cambio, la isoforma ST6Gal I^{Cys} se localiza establemente en el Golgi (Chen et al., 2000). Ambas isoformas son catalíticamente

activas cuando se transfectan en células CHO y son capaces de formar dímeros (Chen et al., 2000). Otro mecanismo que posiblemente utilizan las células para regular la actividad de la ST6Gal I es la fosforilación de residuos Ser y Thr del dominio catalítico, la cual que ocurre en el Golgi o en compartimentos post Golgi (Ma et al., 1999).

Se ha considerado tradicionalmente a las sialiltransferasas como residentes del *trans*-Golgi y TGN, sobre la base de estudios de distribución de la ST6Gal I (Roth et al., 1985; Berger y Hesford, 1985). Sin embargo, como ocurre con las otras glicosiltransferasas, la localización de las sialiltransferasas podría ser menos restringida de lo previamente estimado, propia de cada sialiltransferasa y dependiente del tipo celular. Así, la ST3Gal III y la ST6Gal I colocalizan en el Golgi pero su distribución en compartimentos post-Golgi es distinta (Burger et al., 1998). La ST3Gal I transfectada en células de cáncer de mama T47D se localiza tanto en el *trans*-Golgi como en el *medial*-Golgi (Whitehouse et al., 1997).

3.1.1 Regulación de la expresión de sialiltransferasas: la expresión de sialiltransferasas condiciona el patrón de sialilación en una célula. Análisis de la presencia de transcritos de sialiltransferasas, llevados a cabo mediante *northern blot* o RT-PCR, han mostrado que estas enzimas muestran un patrón de expresión específico de tejido y, en algunas ocasiones, regulado durante el desarrollo y la diferenciación celular (revisado en Harduin-Lepers et al., 2001; Tsuji, 1996). Como ya se ha mencionado anteriormente, diversas sialiltransferasas comparten la misma actividad catalítica en ensayos *in vitro*. La razón funcional de esta redundancia está lejos de ser bien comprendida. De momento, se ha encontrado que varias de estas enzimas muestran diferencias en cuanto a su preferencia sobre los sustratos y a la regulación de su patrón de expresión. Un buen ejemplo lo constituyen las enzimas ST3Gal I y ST3Gal II, que transfieren ácido siálico ligado en posición α 2,3 a la Gal de la estructura Gal-GalNAc-R (ver Tabla 3.1). Notoriamente, la ST3Gal I actúa preferentemente sobre glicoproteínas, fundamentalmente O-glicoproteínas, mientras que la ST3Gal II lo hace sobre glicolípidos (Kojima et al., 1994). La ST3Gal I se expresa a niveles muy altos en las glándulas submaxilares, moderadamente altos en el riñón, bazo e hígado, y a niveles muy bajos en el cerebro (Lee et al., 1993). Por el contrario, el nivel de expresión de la ST3Gal II es alto en cerebro, donde hay un elevado contenido de gangliósidos, bazo, hígado fetal y riñón y corazón de neonatos, mientras que es bajo en el hígado adulto, corazón, riñón, colon, timo, glándulas submaxilares y testículo (Kono et al., 1997; Lee et al., 1994). Cambios en la expresión de sialiltransferasas han sido ampliamente descritos en algunas condiciones fisiológicas y patológicas, p. ej. la sobreexpresión de la ST6Gal I en los leucocitos durante procesos inflamatorios (Kaplan et al., 1983; revisado en Dall'Olio, 2000) o la sobreexpresión de la ST3Gal I en el cáncer de colon (Kudo et al., 1998). Sin embargo, son pocos los estudios que describen con detalle al nivel molecular los mecanismos (p. ej. factores de transcripción, rutas de activación) involucrados en la regulación de la expresión de las sialiltransferasas. Actualmente existen descripciones funcionales de los promotores de la ST6Gal I y la ST3Gal IV. Estas regiones no contienen ni cajas TATA ni CAAT típicas y se ha detectado en ellas

el uso de múltiples sitios de inicio de transcripción (Harduin-Lepers et al., 2001). Para el gen de ST6Gal I se ha identificado la expresión de tres transcritos de diferente longitud generados por procesamiento alternativo y por el uso variable de promotores que se encuentran en regiones físicamente distintas (O'Hanlon et al., 1989; Paulson et al., 1989; revisado en Dall'Olio, 2000). Estas isoformas varían en su región 5' UTR, la cual contiene exones no traducidos, mientras que la región codificante es similar (figura 3.3). La forma más pequeña o 1 tiene un 5'UTR pequeño, carece de exones no codificantes en posición 5' y es mayoritaria en el hígado (Aas-Eng et al., 1995). La forma intermedia o 2, que contiene un exón no codificante X, ha sido identificada en linfocitos B maduros y en líneas derivadas de linfoblastomas de células B (Wang et al., 1993). La forma más grande o 3 contiene los exones Y + Z y ha sido detectada en varios tipos celulares (Harduin-Lepers et al., 2001). Isoformas de RNA generadas por la combinación de procesamiento alternativo y uso de distintos promotores también han sido descritas para la ST3Gal IV (5 isoformas) (Kitagawa y Paulson, 1996) y la ST3Gal VI (2 isoformas) (Taniguchi et al., 2001).

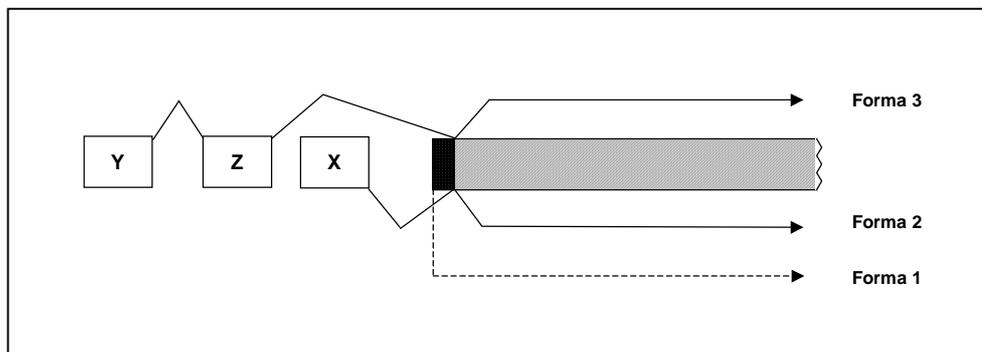


Figura 3.3 Representación esquemática de los principales transcritos de ST6Gal I humana. Estos difieren en su composición de exones no codificantes en su región 5' UTR. La formación de transcritos de diferente longitud, con regiones 5' UTR distintas, ha sido descrita para varias sialiltransferasas (adaptado de Dall'Olio, 2000).

3.2 Metabolismo del ácido siálico: actualmente se cree que todos los ácidos siálicos son derivados del Neu5Ac y del KDN (Varki et al., 1999). El ácido siálico libre es sintetizado en el citosol por la condensación de fosfoenolpiruvato con ManNAc-6-P para el Neu5Ac o con M6P para el KDN. Las reacciones de síntesis y degradación del ácido siálico están distribuidas en varios compartimentos de la célula (Traving y Schaeur, 1998) (ver figura 3.4). En el citoplasma se llevan a cabo las reacciones que sintetizan Neu5Ac a partir de la *N*-acetilmanosamina. Esta molécula es activada en el núcleo por medio de la transferencia de un residuo citidina monofosfato (CMP) a partir de CTP dando como resultado la formación del CMP-Neu5Ac. El CMP-Neu5Ac viaja entonces hacia el citoplasma, donde es transportado hacia la luz del Golgi por una proteína transportadora específica. Una vez ahí, puede ser usado por las sialiltransferasas para sialilar proteínas o lípidos. El ácido siálico unido a glicoconjugados puede ser modificado por *O*-acetilación u *O*-metilación antes del transporte del

glicoconjugado a la superficie de la célula. La única modificación que ocurre antes de la transferencia del ácido siálico al glicoconjugado es la hidroxilación del grupo *N*-acetil del CMP-Neu5Ac, lo que conduce a la formación de CMP-Neu5Gc en el citosol (para una revisión detallada del metabolismo del ácido siálico ver Schaeur et al., 1995). Análisis de la vida media de glicoproteínas han demostrado que el recambio del ácido siálico terminal es significativamente mayor que el de los glicanos subyacentes o el de la cadena polipeptídica, sugiriendo que se produce una resialilación durante el reciclaje de las glicoproteínas (Tauber et al., 1988). La resialilación de algunas glicoproteínas durante su reciclaje ha sido demostrada por varios autores (Litvinov y Hilkens, 1993; Duncan y Kornfeld, 1988; Snider y Rogers, 1985). La degradación de los sialoglicoconjugados ocurre en los lisosomas donde, por la acción de la sialidasa lisosomal, los residuos de ácido siálico son eliminados. El ácido siálico libre así generado es transportado hacia el citosol donde puede ser reutilizado o degradado por la *N*-acetilneuraminato liasa (Kolis y Hervagault, 1986).

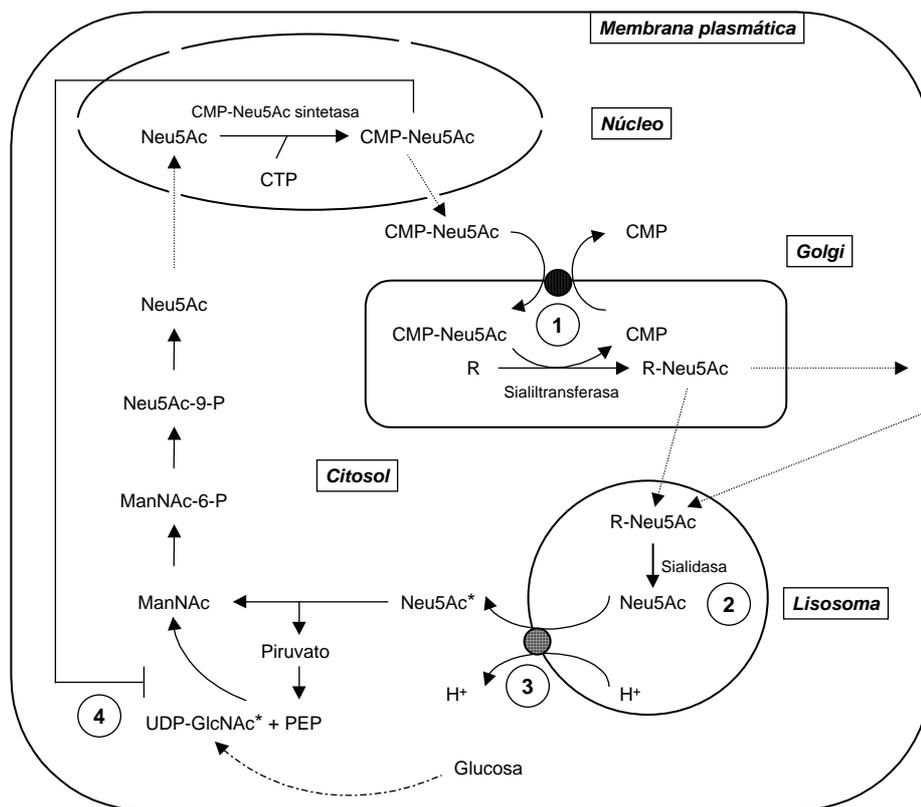


Figura 3.4 Metabolismo del ácido siálico (adaptado de Aula y Gahl, 2001). Los asteriscos indican las fuentes mayoritarias de ácido siálico en las células. Los números indican:

- 1) Transportador de CMP-Neu5Ac. Deficiente en los mutantes CHO Lec2.
- 2) Sialidasa (α -neuraminidasa) lisosomal. Deficiente en la sialidosis.
- 3) Transportador de Neu5Ac. Deficiente en la enfermedad de Salla e ISSD.
- 4) Inhibición de la UDP-GlcNAc 2-epimerasa por CMP-Neu5Ac. Deficiente en la sialuria.

3.3 Funciones del ácido siálico: el ácido siálico es fundamental en el desarrollo embrionario, dado que la deficiencia de una enzima clave en su biosíntesis, la UDP-GlcNAc 2-epimerasa, es letal en ratones (Schwarzkopf et al., 2002). La ausencia de ácido siálico en muchos organismos plantea cuestiones acerca de la función o funciones que se originaron cuando éste apareció en el proceso evolutivo. Es posible, sin embargo, que otras moléculas cumplan en otros organismos las funciones del ácido siálico en animales superiores.

Dada su carga negativa, el ácido siálico cumple un papel importante en la conformación y estabilidad de las glicoproteínas. Además, es crucial para algunos procesos biológicos como la adhesión celular y la transducción de señales. Está involucrado en interacciones célula-célula, la activación de linfocitos T y B y la diferenciación de células hematopoyéticas.

El papel del ácido siálico en las interacciones célula-célula está relacionado fundamentalmente con la capacidad que tienen ciertas proteínas de reconocerlo como ligando. Algunos agentes patogénicos como toxinas (ej. toxina colérica), virus (ej. virus de la influenza), bacterias (p. ej. *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*) y protozoos (p.ej. *Trypanosoma cruzi*), se unen a las células huésped a través de lectinas que reconocen epítomos sialilados (Varki, 1997; Reutter et al., 1997; Kelm y Schauer, 1997).

También en mamíferos se han encontrado lectinas endógenas que reconocen epítomos que contienen ácido siálico y cuyas funciones son diversas. Pertenecen a dos grupos de proteínas: las selectinas y las siglecs. Las selectinas (P, E y L-selectinas) son proteínas transmembrana de tipo I que reconocen en sus contrareceptores una variedad de ligandos sialilados y fucosilados, como por ejemplo sialil Lewis^x y sialil Lewis^a, de una manera dependiente de calcio (lectinas de tipo C) (Foxall et al., 1992; revisado en Kansas, 1996). Las selectinas poseen un dominio responsable del reconocimiento carbohidratos (CRD, *carbohydrate recognition domain*) localizado en su extremo N-terminal, seguido por un dominio EGF-like y un número variable de repeticiones reguladoras del complemento (*complement regulatory repeat*). En el proceso de reconocimiento a través de selectinas, grupos sulfato pueden substituir al ácido siálico (Green et al., 1992). Las selectinas P y E se expresan en plaquetas y células endoteliales y median, entre otros procesos, la migración de leucocitos a los sitios de inflamación/infección. El contrareceptor mejor caracterizado de la selectina P es la glicoproteína PSGL-1, la cual también puede ser reconocida por la selectina E (revisado en Varki et al., 1999). Otros ligandos descritos para la selectina E incluyen varios glicolípidos y la glicoproteína ESL-1 (Steegmaier et al., 1995; revisado en Varki et al., 1999). La selectina L se expresa en leucocitos y está involucrada en el "rolling" previo a su migración a través de las vénulas endoteliales altas (*high endothelial venules*, HEV) (Gallatin et al., 1983). Se han descrito varios ligandos de L-selectina en células de HEV, entre los que destacan las glicoproteínas PSGL-1, GlyCAM-1, CD34 y MadCAM-1, las cuáles son proteínas extensamente O-glicosiladas (revisado en Rainer, 2002; para una descripción detallada de la biología de las selectinas ver Homeister y Lowe,

2000). Las siglecs (de *sialic acid-binding Ig-superfamily lectins*) (Crocker et al., 1998) constituyen una subfamilia de proteínas transmembrana de tipo I pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas (lectinas tipo I) con alrededor de 7 miembros (1-4a, 4b-7). Al igual que las selectinas, poseen un dominio CRD responsable del reconocimiento de los epítomos sialilados en su extremo N terminal, pero en estas proteínas, a diferencia de las selectinas, el ácido siálico es clave en el reconocimiento. Las siglecs muestran un patrón de expresión altamente regulado y específico del tipo celular. Se las ha involucrado en procesos como el desarrollo de las células mieloides (Siglec-1 o sialoahesina), en las interacciones de los linfocitos B con otras células (Siglec-2 o CD22, a través del reconocimiento de CD45) y en el mantenimiento e integridad de la mielina (Siglec-4a o MAG) (revisado en Crocker y Varki, 2001). Hasta el momento, no se han descrito lectinas implicadas en procesos de tráfico de membranas que reconozcan epítomos sialilados.

El ácido siálico también puede enmascarar el reconocimiento de proteínas hacia otros ligandos. Un buen ejemplo de un proceso en que participa este fenómeno es el control de la vida media de los eritrocitos, que en condiciones normales es de alrededor de 120 días. Durante este período, las moléculas de ácido siálico, que son abundantes en sus glicoproteínas de superficie, son eliminadas por las sialidasas del suero y por hidrólisis química, dejando expuesto un residuo de Gal. Éste es una señal para degradación reconocida por una lectina específica: los macrófagos reconocen a los eritrocitos y los fagocitan. El mismo mecanismo participa en el catabolismo y eliminación de trombocitos, leucocitos y varias glicoproteínas del suero (Kelm y Schauer, 1997).

3.3.1 Knock-outs de enzimas involucradas en la biosíntesis de ácido siálico: hasta el momento se han descrito ratones *knock-out* para algunas de estas enzimas, de los cuales se citan algunos ejemplos relevantes en la tabla 3.2.

Tabla 3.2 Ejemplos de ratones deficientes en enzimas implicadas en la biosíntesis de compuestos sialilados

Enzima	Fenotipo	Referencia
UDP-GlcNAc 2-epimerasa	Letal entre E8.5 y E9.5	Schwarzkopf et al., 2002
ST6Gal I	Inmunodeficiencia. Anormalidades en la función de linfocitos B	Hennet et al., 1998
ST3Gal I	Deficiencia de linfocitos T CD8 ⁺ (mueren por apoptosis)	Priatel et al., 2000
ST3Gal IV	Anemia moderada, trombocitopenia, incremento en el tamaño de plaquetas	Ellies et al., 1999
ST8Sia I ¹	Alta susceptibilidad a agresiones acústicas. Marcada tendencia a morir súbitamente	Kawai et al., 2001

(1) Ratón también deficiente de una GalNAcT

La deficiencia de UDP-GlcNAc 2-epimerasa, que conduce a una importante reducción de los niveles globales de ácido siálico, provoca la muerte en ratones durante los primeros días de su desarrollo (Schwarzkopf et al., 2002). Por contraste, la deficiencia de sialiltransferasas, que causa carencias de únicamente epítomos sialilados concretos, no resulta letal. El fenotipo de los ratones *knock-out* de sialiltransferasas es variable. En general, presentan alteraciones en componentes del sistema inmune o nervioso, lo que revela la importancia de la síntesis de epítomos sialilados en la fisiología de estos sistemas. El papel del ácido siálico, al nivel de la biosíntesis y tráfico de glicoproteínas, no se ha analizado en células de estos animales.

3.4 Ácido siálico y patología: el estudio de alteraciones en la glicosilación, además de crucial para el desarrollo de terapias, provee una valiosa información sobre la función que los glicanos podrían cumplir en diversos procesos biológicos. No conocemos la existencia de patologías donde exista una deficiencia total de ácido siálico. En las denominadas CDGS (CDGS, *carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes*) se ha descrito una sialilación aberrante, por lo general minoritaria, de *N*-glicanos. Las CDGS constituyen un conjunto de varias entidades patológicas distintas que muestran como característica común importantes defectos en el ensamblaje, transporte y procesamiento de *N*-glicanos. Las deficiencias genéticas que las originan son múltiples e involucran enzimas que catalizan pasos esenciales en la biosíntesis del dolicol-PP o la elongación inicial de las cadenas de *N*-glicanos. Los rasgos clínicos de este grupo de enfermedades son variados y, por lo general, abarcan complicaciones y anomalías multisistémicas que van desde fallos en el crecimiento, disfunción hepática e hipersusceptibilidad a las infecciones, hasta alteraciones neurológicas graves como un severo retardo psicomotor y atrofia cerebral y óptica. La contribución de la sialilación anormal a las manifestaciones de estas patologías no está establecida (revisado en Jaeken y Matthijs, 2001; Freeze, 2001).

Los niveles de ácido siálico pueden incrementarse ligera o dramáticamente en varias condiciones patológicas. Así, en el cáncer, diabetes, deficiencia renal crónica, glomerulonefritis crónica y en el abuso de alcohol se ha descrito un aumento del contenido de ácido siálico en glicoproteínas y glicolípidos. Las causas de estas variaciones son múltiples y pueden o no correlacionar con las manifestaciones clínicas de estas patologías (revisado en Sillanaukee et al., 1999). La sialilación aberrante de glicoproteínas en células neoplásicas ha sido implicada en la invasión y metástasis, aunque su mecanismo de acción no se conoce completamente (Fukuda, 1996). Así por ejemplo, la pérdida de ácido siálico conduce a un descenso de la capacidad metastásica de las células tumorales MDAY-D2 (Takano et al., 1994). Además, modificaciones de la expresión de sialiltransferasas/ácido siálico están asociadas con la pérdida de diferenciación y con un peor pronóstico. Tal es el caso de la sobreexpresión de ST3Gal III y ST6 Gal I detectada en el cáncer de mama (Recchi et al., 1998a) y el de ST6GalNAc II en el cáncer de colon (Schneider et al., 2001). El aumento de ácido siálico es especialmente notable en las enfermedades de depósito de ácido siálico (ver sección 3.4.1), en las cuales los niveles de ácido siálico libre o ligado a oligosacáridos -

dependiendo del tipo de patología - pueden incrementarse hasta cerca de 100 veces más de lo normal.

3.4.1 Enfermedades de depósito de ácido siálico: las patologías de depósito en las cuales está implicado el ácido siálico pertenecen a dos categorías generales. En la primera, que incluye la sialidosis, se acumula ácido siálico ligado a oligosacáridos mientras que en la segunda, que incluye la enfermedad de Salla (*Salla disease*), la enfermedad de depósito de ácido siálico infantil (*infantile sialic acid storage disease*, ISSD) y la sialuria, se acumula ácido siálico libre.

Sialidosis: se origina por una deficiencia de la actividad α -neuraminidasa lisosomal que conduce a la acumulación de oligosacáridos sialilados en los compartimentos degradativos. Éstos también pueden ser identificados en la orina y otros fluidos biológicos. Su diagnóstico se basa en la determinación del incremento de la excreción de oligosacáridos/glicopéptidos sialilados en la orina y de la disminución de la actividad neuraminidasa lisosomal en fibroblastos en cultivo (revisado en Thomas, 2001).

A diferencia de otras neuraminidasas, la actividad de la neuraminidasa lisosomal depende de su asociación a un complejo multienzimático que está formado además por la catpsina A o proteína protectora, la β -galactosidasa y la *N*-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (Pshezhetsky y Potier, 1986; d'Azzo et al., 1982). Este complejo protege a la neuraminidasa y a la β -galactosidasa de una rápida proteólisis y contribuye al establecimiento de su conformación catalíticamente activa (Vinogradova et al., 1998; Hoogeveen et al., 1983). De hecho, deficiencias de la β -galactosidasa o la proteína protectora pueden originar la acumulación intracelular de oligosacáridos sialilados (revisado en Thomas, 2001). El gen de la α -neuraminidasa lisosomal se halla en la región cromosómica 6p21.3 y, recientemente, se han sido descrito mutaciones en este gen en pacientes con sialidosis (Pshezhetsky et al., 1997). Algunas de estas mutaciones no comprometen al dominio catalítico sino más bien al dominio de unión al complejo multienzimático, por lo que la enzima se degrada rápidamente en los lisosomas (Lukong et al., 2001, 2000) (figura 3.5).

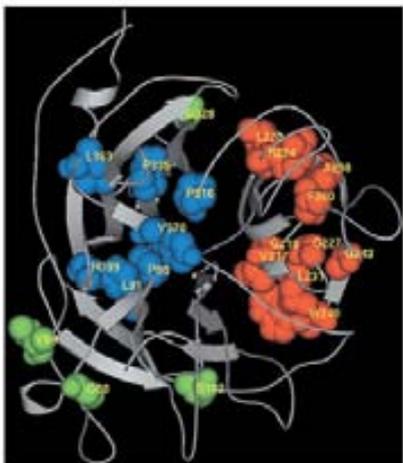


Figura 3.5 Modelo esquemático de la estructura de la α -neuraminidasa lisosomal, que indica las mutaciones identificadas en pacientes de sialidosis. En rojo se indican las mutaciones localizadas en el sitio putativo de unión a la catpsina A, en azul las que afectan al sitio activo y, en verde, las que no causan cambios estructurales obvios (tomado de Lukong et al., 2001).

Según la gravedad de las manifestaciones clínicas se ha dividido a la sialidosis en tipos I y II. La sialidosis de tipo I es una forma leve y los pacientes son aparentemente normales durante los 20-30 primeros años de vida. Posteriormente, desarrollan manchas oculares de color "rojo-cereza" - asociadas a defectos en la visión del color y/o ceguera nocturna - y mioclonias generalizadas. Por el contrario, la sialidosis de tipo II se distingue porque los pacientes desarrollan precozmente un fenotipo similar al de las mucopolisacaridosis con visceromegalia, disóstosis múltiple y retardo mental. Se han descrito casos con signos clínicos intermedios, que en conjunto correlacionan con la de actividad neuraminidasa residual. En análisis de biopsias se puede determinar la acumulación de vacuolas en las células de varios tejidos, lo cual es un hallazgo más frecuente en la sialidosis de tipo II que en la de tipo I (revisado en Thomas, 2001).

Enfermedad de Salla e ISSD: Estas patologías son desórdenes genéticos autosómicos recesivos que se originan por deficiencias en el transportador lisosomal de ácido siálico, lo que conduce a una acumulación de ácido siálico libre en los lisosomas. Los pacientes con la enfermedad de Salla acumulan en sus tejidos alrededor de 10 veces más ácido siálico libre que los individuos normales, mientras que en los de ISSD son unas 100 veces más altos de lo normal (revisado en Aula y Gahl, 2001). Además, se ha detectado en los tejidos de estos pacientes un incremento de ácido siálico ligado a oligosacáridos (Baumköter et al., 1985) y la acumulación de ácido glucurónico, lo que puede adicionalmente contribuir a la patogenia de estas enfermedades. El diagnóstico se basa en la demostración de una excreción elevada de ácido siálico en la orina (10 - 100 veces más de normal) y de la acumulación de ácido siálico y de lisosomas agrandados, conteniendo material fibrilgranular, en los fibroblastos de pacientes (revisado en Aula y Gahl, 2001).

La enfermedad de Salla, que debe su nombre a la región finlandesa de donde provienen los primeros pacientes descritos (Aula et al., 1979), se caracteriza por manifestaciones clínicas moderadas. Aunque los pacientes no tienen mayores afectaciones en el momento del nacimiento, en el curso de la enfermedad, que puede durar décadas, se desarrolla un severo retraso mental y psicomotor. Su esperanza de vida es ligeramente inferior a la normal. Por el contrario, la ISSD, descrita por primera vez en 1982 (Tondeur et al., 1982; Hancock et al., 1982), es una forma muy severa y los pacientes no sobreviven más allá del primer año de vida. Muestran un severo retraso mental y un precoz retraso psicomotor. Presentan visceromegalia con afectación cardíaca, renal, ósea y deficiencias graves en el crecimiento. Además, el cuadro clínico se puede complicar con hidrops fetal e hidrocefalia (revisado en Aula y Gahl, 2001).

El gen del transportador lisosomal de ácido siálico ha sido clonado recientemente y codifica para una proteína, denominada sialina, perteneciente a la familia de transportadores ACS (*anion/cation symporters*). Mutaciones que afectan diferentes regiones de este gen han sido caracterizadas. Aproximadamente un 95% de pacientes con enfermedad de Salla son homocigotos para la mutación R39C. En cambio, los pacientes de ISSD presentan una variedad de mutaciones en

el gen de la sialina, las cuales incluyen deleciones, inserciones y mutaciones de cambio de sentido (Verheijen et al., 1999).

Los mecanismos por los cuales la acumulación de ácido siálico conduce a la patología aún no han sido elucidados. Se ha descrito que el procesamiento de enzimas lisosomales, como la catepsina D, está alterado en fibroblastos en cultivo provenientes de pacientes con ISSD. Además, en estas células se afecta la maduración de lisosomas, los cuales presentan menor densidad y mayor pH que en células normales. Estas características sugieren un bloqueo de la formación de lisosomas a partir de estructuras prelisosomales (Schmid et al., 1999).

Sialuria: Es una enfermedad autosómica dominante causada por una deficiencia de la inhibición de la UDP-GlcNAc 2-epimerasa por CMP-Neu5Ac, que conduce a la acumulación citosólica de ácido siálico libre. El diagnóstico se basa en el hallazgo de cantidades elevadas de ácido siálico en la orina y la acumulación de ácido siálico libre en el citoplasma de fibroblastos cultivados. A diferencia de las otras enfermedades de depósito de ácido siálico, las células de los pacientes no muestran vacuolación intracelular. Los pacientes con sialuria muestran hepatoesplenomegalia, rasgos faciales groseros y varios grados de retardo mental (revisado en Aula y Gahl, 2001).

4. ANTECEDENTES DEL PROYECTO

4.1 Mucinas: las mucinas constituyen una familia de proteínas, fundamentalmente epiteliales, que se caracterizan por presentar numerosas repeticiones en tándem ricas en Ser, Thr y Pro y por estar altamente O-glicosiladas. La O-glicosilación puede representar típicamente hasta el 80% del peso de la proteína madura. En la actualidad se han identificado alrededor de 15 genes de mucinas epiteliales (MUC1-2, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6-8, MUC11-13) cuyo patrón de expresión es específico a nivel celular y tisular (Fowler et al., 2001; Moniaux et al., 2001). MUC9, más comúnmente conocida como oviductina, una glicoproteína secretada que se expresa principalmente en las células secretoras del epitelio del oviducto, ha sido designada como OVGPI. El término *Muc10* ha sido reservado para un gen de mucina que ha sido clonado en ratón (referencia del Gen bank: 20005630 y 6678961) pero cuyo homólogo humano todavía no ha sido descrito (Fowler et al., 2001). También se han descrito otras proteínas cuyas características son similares a las de mucinas, pero cuya expresión no se produce predominantemente en células epiteliales, como por ejemplo las sialomucinas, que se expresan sobre todo en células hematopoyéticas y endoteliales (Fukuda y Tsuboi, 1999; Simmons et al., 2001). A las mucinas epiteliales se les ha asignado tradicionalmente funciones de lubricación y protección física, química y microbiológica de los epitelios. Actualmente, también se les ha involucrado en procesos tales como el desarrollo, la diferenciación, la carcinogénesis y metástasis. La expresión de mucinas y su glicosilación presentan alteraciones importantes en varios estados patológicos como la fibrosis quística y el cáncer; en algunos casos, estos cambios están altamente asociados con la severidad de la patología (Moniaux et al., 2001).

La secuencia aminoacídica de las repeticiones en tándem es propia de cada mucina. Swallow et al. (1987) detectaron la existencia de múltiples alelos de MUC1 que diferían en el número de repeticiones en tándem. Este tipo de variación genética, referida como polimorfismo de tipo VNTR (*variable number of tandem repeats*), ha sido descrito también en otros genes de mucinas (Vinall et al., 1998; Fowler et al., 2001).

De acuerdo con su distribución subcelular y propiedades, las mucinas se pueden agrupar en: *i*) de membrana: (MUC1 MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC11-13) y *ii*) secretadas, entre las cuales cabe destacar las que forman geles de moco (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6) y aquellas que no tienen esta capacidad (MUC7) (Moniaux et al., 2001).

4.1.1 Mucinas asociadas a membrana: la más estudiada es MUC1, la cual es una proteína transmembrana de tipo I de 1000 a 2200 aa que usualmente se localiza en el dominio apical de células epiteliales polarizadas, aunque también se la ha encontrado en células hematopoyéticas (revisado en Gendler, 2001; Hanisch y Müller, 2000). El tamaño de MUC1 puede variar entre 250 KDa y 1000 kDa dependiendo del tejido en cuestión (Lan et al., 1987 y Shimizu y Yamauchi, 1982 en Moniaux et al., 2001). La mayor parte del polipéptido corresponde a su región extracelular, la cual contiene la región de tamaño variable rica en Ser y Thr (ver figura 4.1); el dominio transmembrana es de 31 aa y la región intracelular carboxiterminal es de 72 aa. Esta contiene sitios de unión a actina (Parry et al., 1990) y β -catenina (Yamamoto et al., 1997) así como sitios potenciales de fosforilación (Zrihan-Licht et al., 1994). La proteína puede ser proteolizada en el RE entre los 71 y 53 aminoácidos corriente arriba del dominio transmembrana. Por tanto, MUC1 puede hallarse en la membrana en forma de heterodímero (Ligtenberg et al., 1992), estructura que podría favorecer su *shedding* al medio extracelular (Gendler, 2001) y que también es compartida por MUC4 (Sheng et al., 1990). Se han descrito otras formas de MUC1 (MUC1/SEC, MUC1/Y, MUC1/X) originadas por procesamiento alternativo del RNAm (revisado en Gendler, 2001; Hanisch y Müller, 2000).

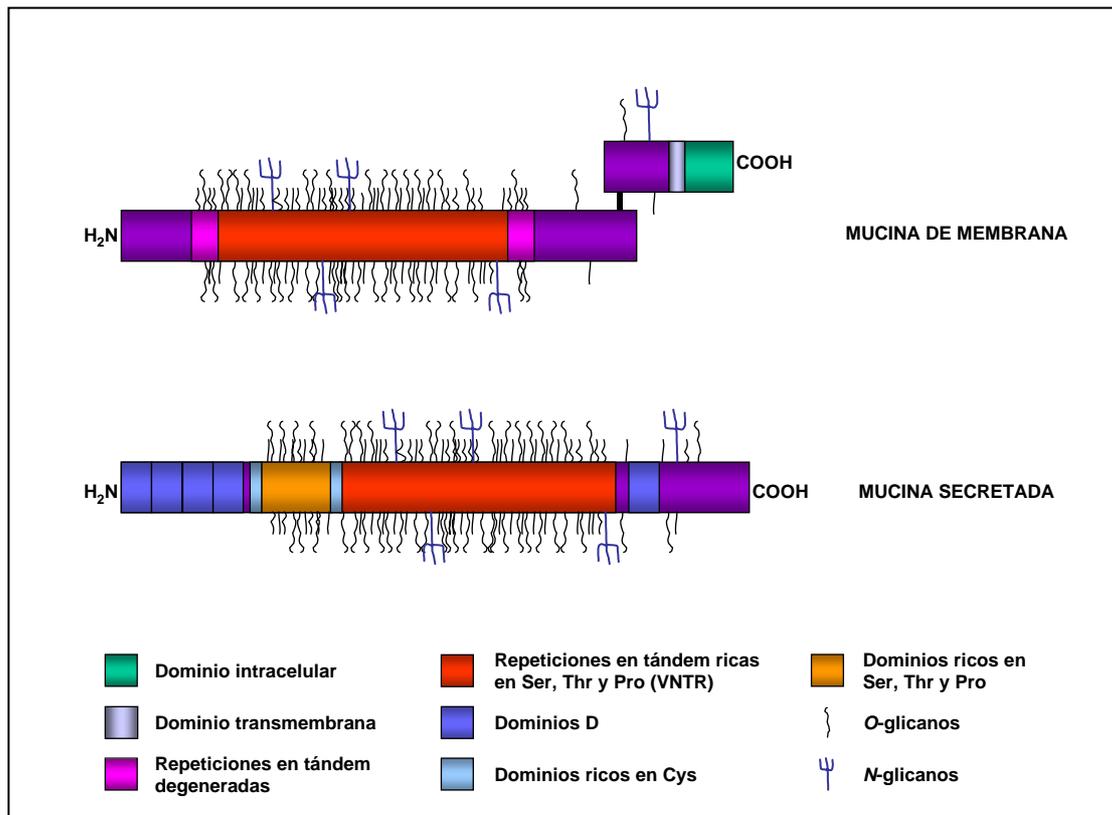


Figura 4.1 Estructura esquemática de una mucina de membrana, MUC1, y una mucina secretada, MUC2 (adaptado de Hanisch y Müller, 2000; Toribara et al., 1991).

4.1.2 Mucinas secretadas: son las glicoproteínas más abundantes del moco. Con la excepción de MUC7, la cual es una molécula pequeña, las mucinas secretadas son glicoproteínas de alto peso molecular (aprox. > 2000 kDa). Interesantemente, los genes de las mucinas formadoras de moco están localizados en un clúster de aproximadamente 400 Kb en la región cromosómica 11p15.5 (Pigny et al., 1996) y posiblemente se originaron - junto con el factor de von Willebrand - a partir de eventos de duplicación de un gen ancestral común (Desseyn et al., 2000, 1998). En la figura 4.1 se esquematiza la estructura de MUC2, la primera mucina formadora de moco identificada (Gum et al., 1994; 1992; 1989). Las mucinas formadoras de geles de moco (MUC2, MUC5AC, MUC5B y MUC6) deben esta propiedad a su capacidad de formar oligómeros a través de puentes disulfuros establecidos entre regiones ricas en Cys, localizadas en sus extremos N y C terminales. Las secuencias que se hallan entre estas regiones son homólogas a dominios D y CK del pro factor de von Willebrand, una proteína que interviene en la coagulación sanguínea y que también tiene la capacidad de oligomerizar (revisado en Moniaux et al., 2001). La oligomerización se inicia en el RE y las moléculas glicosiladas se acumulan en gránulos de secreción donde se almacenan para ser secretadas a través del polo apical (van Klinken et al., 1998). Por el momento, no existe una descripción detallada del transporte de las mucinas desde su sitio de síntesis hasta su almacenamiento en vesículas de secreción.

4.2 Modelos *in vitro* de células mucosecretoras: a pesar de que las células mucosecretoras constituyen una proporción importante de varios epitelios, en particular del colónico normal, y de los tumores colorectales, muy pocas líneas derivadas de éstos - o de otros tumores - mantienen *in vitro* el fenotipo mucosecretor diferenciado. Entre éstas destacan las células mucosecretoras HT-29 M6 derivadas de la población de células indiferenciadas HT-29.

4.2.1 Las células mucosecretoras HT-29 M6: la línea celular HT-29 fue establecida por Fogh y Trempe (1975) a partir de un carcinoma de sigma. Las células de esta línea constituyen una población heterogénea que, en post-confluencia, forman una multicapa de células mayoritariamente indiferenciadas. En este estadio, es posible detectar en aproximadamente un 5% de ellas la expresión de diferentes marcadores de diferenciación característicos del epitelio intestinal (Lesuffleur et al., 1990). Cuando las células HT-29 son sometidas a condiciones de estrés es posible obtener subpoblaciones que, en contraste con la población original, muestran fenotipos diferenciados. Así, por selección en concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) se obtuvieron poblaciones de células mucosecretoras (a 10^{-6} y 10^{-5} M de MTX) (Lesuffleur et al., 1991, 1990) y enterocíticas (a 10^{-3} M de MTX) (Lesuffleur et al., 1991). El fenotipo diferenciado de estas poblaciones se mantiene de forma estable cuando las células son cultivadas en ausencia de la droga.

Las células seleccionadas a 10^{-6} M de MTX, denominadas HT-29 M6, constituyen un modelo celular ampliamente usado en nuestro laboratorio. Estas células forman, en post-confluencia, una monocapa de células mucosecretoras polarizadas, con el núcleo basal, numerosas vacuolas de moco

acumuladas en el citoplasma de la región apical de las células y algunas microvellosidades apicales. La principal mucina secretada que se expresa en estas células es MUC5AC, aunque también es posible detectar MUC5B y MUC2 (Lesuffleur et al., 1995, 1993). Las células HT-29 M6 presentan, al nivel de las microvellosidades, hidrolasas, como la dipeptidilpeptidasa IV (DPP-IV) y la aminopeptidasa N y, otras glicoproteínas típicas del borde en cepillo intestinal, como MUC1 y el antígeno carcinoembrionario (CEA). El fenotipo de las células HT-29 M6 recuerda al de las células de colon fetal (Lesuffleur et al., 1991). Las características de las células HT-29 seleccionadas a 10^{-5} M de MTX (HT-29 M5) son similares a las de las células HT-29 M6 (Lesuffleur et al., 1990).

La secreción de altos niveles de moco al medio de cultivo ha facilitado el análisis de las mucoproteínas producidas por estas células. Los oligosacáridos asociados a las mucinas de HT-29 M6 son básicamente del tipo NeuAc α 2,3Gal β 1-3GalNAc (sialil-T) (Lesuffleur et al., 1993; Huet et al., 1995). En estudios más detallados se ha encontrado que la mayoría de los oligosacáridos de mucinas de células HT-29 M5 tenían entre de 2 a 7 monosacáridos. Las cadenas de elongación estaban constituidas por Gal β 1-3GlcNAc (cadenas de tipo I) o Gal β 1-4GlcNAc (cadenas de tipo II). El ácido siálico se hallaba fundamentalmente ligado en posición α 2,3 a residuos terminales de Gal; no obstante, también se identificó ácido siálico asociado a GalNAc en posición α 2,6. Los glicanos presentaban, predominantemente, núcleos de tipo 1 (57,5%) y tipo 2 (20,5%), aunque también se detectaron los tipos 3 y 4. El núcleo de tipo 1 estaba representado fundamentalmente por la estructura NeuAc α 2,3Gal β 1-3GalNAc (41%) y el de tipo 2 por NeuAc α 2,3-Gal β 1-4GlcNAc β 1-6 [NeuAc α 2-3Gal β 1-3] GalNAc (17%) (Hennebicq-Reig et al., 1998).

4.3 El benzil GalNAc como inhibidor de la O-glicosilación: los inhibidores de la glicosilación han sido herramientas muy útiles para definir la función de la parte glicosídica de los glicoconjugados. En el estudio de la N-glicosilación se han usado ampliamente diversas moléculas (p. ej. tunicamicina, deoxinojirimicina, deoximanojirimicina, castanospermine, swainsonina) capaces de inhibir etapas específicas de la biosíntesis de los N-glicanos (revisado en Varki et al., 1999). Por el contrario, apenas se dispone de inhibidores de la O-glicosilación. Hasta el momento, se conoce un grupo de aril y alquil O- β -D-xilósidos, usados como inhibidores competitivos de la elongación de la O-xilosa en proteoglicanos (Sobue et al., 1987) y un grupo de aril-derivados de GalNAc que han sido descritos como inhibidores de la O-glicosilación de mucinas en células mucosecretoras LS174T (Kuan et al., 1989).

Kuan et al. (1989) sugirieron que los aril-derivados de GalNAc bloquearían la elongación de los O-glicanos porque actuarían como inhibidores competitivos de la enzima necesaria para la síntesis del núcleo de elongación de tipo 1, la UDP-Gal:GalNAc β 1,3 galactosil transferasa (Gal T). De hecho, los derivados de GalNAc habían sido usados con éxito como sustratos de la Gal T (Brockhausen et al., 1983). Así, describieron que los derivados benzil-, fenil- y *p*-nitrofenil- de la N-acetil- α -galactosamina (GalNAc) inhibían la síntesis de mucinas completamente glicosiladas de una

manera dosis dependiente; de los análogos estudiados destacó el benzil GalNAc por su permeabilidad celular, sus niveles de inhibición y su baja toxicidad (Kuan et al., 1989).

4.4 Efectos del tratamiento con benzil GalNAc en células HT-29 con fenotipo mucosecretor:

dado que uno de los intereses del grupo era estudiar la importancia de la glicosilación en la biología de las mucinas, se analizó el efecto que tenía el benzil GalNAc sobre la glicosilación y las propiedades de las mucinas en células mucosecretoras derivadas de HT-29 (Huet et al., 1995). Los resultados de estos estudios se resumen a continuación.

4.4.1 El tratamiento agudo con benzil GalNAc inhibe la sialilación y secreción de mucinas:

según lo descrito por Kuan et al. (1989) el tratamiento con benzil GalNAc debería producir en las mucinas una acumulación de antígeno Tn (GalNAc-O-Ser/Thr), lo que por consecuencia produciría en ellas una notable disminución del contenido de Gal. Aunque los análisis de la glicosilación de las mucinas de las células tratadas con 5 mM benzil GalNAc durante 24 h (denominado de aquí en adelante tratamiento agudo) mostraron un incremento en la cantidad de antígeno Tn, el cambio más importante detectado fue un aumento de los niveles de antígeno T (Gal-GalNAc-O-Ser/Thr). Contrariamente a lo esperado, la cantidad de Gal y GlcNAc presente en las mucinas se afectó poco por el tratamiento con benzil GalNAc, mientras que se produjo una reducción de aproximadamente 13 veces en su contenido de ácido siálico (ver tabla 4.1 y figura 4.2). En resumen, mientras que en células control la estructura glicosídica más frecuente presente en las mucinas era α 2,3Neu5Ac-Gal-GalNAc-O-Ser/Thr, en células tratadas con benzil GalNAc lo era Gal-GalNAc-O-Ser/Thr. Al mismo tiempo, experimentos de marcaje metabólico con [³H] treonina mostraron que el tratamiento agudo con benzil GalNAc inhibía en un 51% la secreción de mucinas en células HT-29 M5 (Huet et al., 1995). *Estas observaciones demostraron que el benzil GalNAc inhibía fundamentalmente la sialilación de mucinas en células HT-29 mucosecretoras.*

Tabla 4.1 Efecto del tratamiento agudo con benzil GalNAc sobre la composición de carbohidratos y contenido de sulfato de las mucinas de células HT-29

	Control	Benzil GalNAc
GalNAc	= 1	= 1
Gal	1,4	1,4
GlcNAc	0,6	0,5
Sia	1,3	0,1
Sulfato	0,1	0,2

Valores expresados en *ratios* molares con respecto a GalNAc
Tomado de Huet et al. (1995)

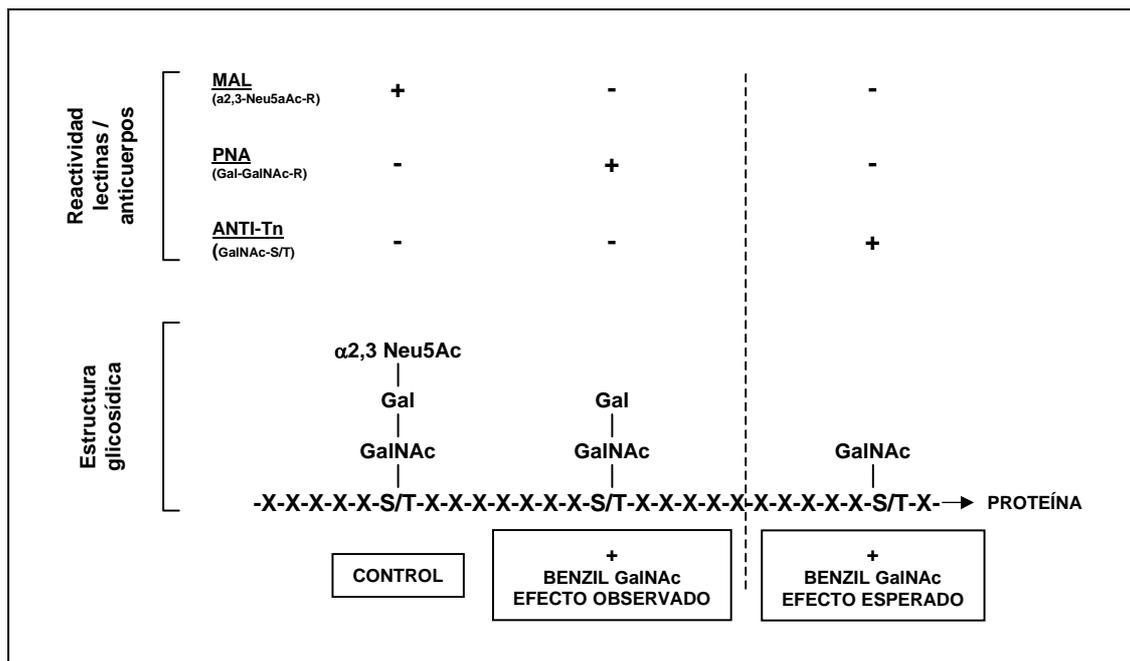


Figura 4.2 El tratamiento con benzil GalNAc inhibe la sialilación de proteínas en células HT-29 mucosecretoras. La principal estructura glicosídica asociada a las mucinas de HT-29 es GalNAc-Gal- $\alpha 2,3$ Neu5Ac, reactiva a la lectina MAL. Contrariamente a lo esperado, el tratamiento con benzil GalNAc no induce la acumulación de estructuras Ser/Thr-GalNAc, reactivas a un anticuerpo anti-Tn, sino que inhibe la sialilación de las cadenas glicosídicas, que se hacen reactivas a la lectina PNA.

Estudios más recientes indican que el benzil GalNAc produce efectos similares sobre la sialilación de mucinas en las células de cáncer de colon LS174T y las de cáncer de estómago KATO III (Byrd et al., 1995). Asimismo, Dilulio y Bhavanandan (1995) encontraron que el tratamiento por 48 h con fenil GalNAc en células H.Ep.2 reducía el contenido de cadenas largas de sacáridos y de ácido siálico de MUC1. En células de melanoma B16BL6 tratadas con benzil GalNAc 2 mM durante 4 días se indujo una hiposialilación de la O-glicoproteína CD44 (Nakano et al., 1996). *Estos resultados sugerían que el benzil GalNAc podía inhibir la sialilación de mucinas y de otras O-glicoproteínas en tipos celulares distintos a las células HT-29 mucosecretoras.*

El mecanismo por el cual el benzil GalNAc - un putativo inhibidor de la O-glicosilación - resulta en la inhibición de la sialilación de O-glicoproteínas se ha descrito con detalle en células HT-29 mucosecretoras (Huet et al., 1995; Delannoy et al., 1996). En estas células, el benzil GalNAc se metaboliza a benzil GalNAc-Gal, el cual a su vez actúa como un potente inhibidor competitivo de $\alpha 2,3$ sialiltransferasas, la principal actividad sialiltransferasa expresada en estas células (Majuri et al., 1995; Delannoy et al., 1996), al tiempo que se produce la síntesis de metabolitos sialilados como el benzil GalNAc-Gal- $\alpha 2,3$ NeuAc (Delannoy et al., 1996) (figura 4.3). Entre las $\alpha 2,3$ sialiltransferasas que pueden usar el metabolito benzil GalNAc-Gal como aceptor, cabe destacar a la ST3Gal I, ST3Gal II y ST3Gal IV. Además, otras glicosiltransferasas, como algunas fucosiltransferasas

(Brockhausen, 1995) y *N*-acetil-glucosaminiltransferasas (Huang et al., 1992; Delannoy et al., 1996) pueden utilizar el benzil GalNAc-Gal como molécula aceptora (para revisión ver Gouyer et al., 2001a).

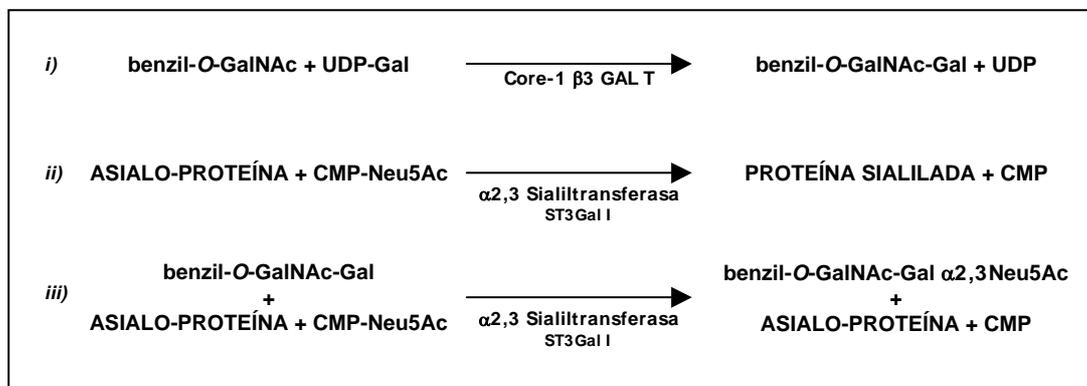


Figura 4.3 Mecanismo de inhibición de la sialilación de glicoproteínas en células HT-29 tratadas con benzil GalNAc. El benzil GalNAc es metabolizado a benzil GalNAc-Gal (i), el cual inhibe competitivamente $\alpha 2,3$ sialiltransferasas. Esto trae como consecuencia que, a diferencia de las células control en las que se sialilan normalmente las glicoproteínas (ii), se produzca una dramática reducción de la sialilación de las glicoproteínas celulares y la síntesis de compuestos sialilados derivados del benzil GalNAc (iii).

4.4.2 El tratamiento crónico con benzil GalNAc induce la acumulación de vesículas citoplasmáticas conteniendo glicoproteínas apicales: debido a que la *O*-glicosilación puede ser parte del procesamiento de un amplio rango de proteínas y que los cambios bioquímicos observados después de las 24 horas de tratamiento podrían no reflejar la completa actividad del benzil GalNAc, Huet et al., (1998) analizaron los efectos del tratamiento con benzil GalNAc por períodos más largos de tiempo (denominado de ahora en adelante tratamiento crónico). En este trabajo, células HT-29 M6 fueron cultivadas en presencia de BG 2 mM por 21 días, un espacio de tiempo establecido previamente como suficiente para permitir que las células se diferenciases completamente y formasen una monocapa uniforme de células mucosecretoras. El tratamiento con benzil GalNAc produjo, de forma reversible, un gran número de efectos (ver figura 4.4):

- Disminución de la proliferación: el benzil GalNAc redujo la proliferación de las células incluso a partir de una concentración de 0,5 mM, sin afectar la viabilidad celular. Las células cultivadas en presencia de 2mM benzil GalNAc fueron incapaces de alcanzar la confluencia en la placa de cultivo.
- Cambios morfológicos: las células tratadas con benzil GalNAc mostraban un aumento considerable de su tamaño; sin embargo, el tratamiento con benzil GalNAc no tenía efectos aparentes sobre su polarización.
- Inhibición de la secreción de mucinas: al igual que en el tratamiento agudo, las células cultivadas de forma crónica en presencia de benzil GalNAc no secretaban mucinas al medio extracelular. El gel de moco que característicamente se forma sobre los cultivos post-confluyentes de las células HT-29 M6 era prácticamente inexistente en los cultivos de células tratadas con benzil GalNAc. La

localización de mucinas, determinada por inmunofluorescencia mediante anticuerpos anti-mucinas gástricas sobre cortes criostáticos de rollos celulares, era citoplasmática supranuclear en las células control y citoplasmática difusa en las células tratadas con benzil GalNAc. Asimismo, el benzil GalNAc inhibía la secreción tanto constitutiva como estimulada de MUC5AC en células HT-29 M5 (Hennebicq-Reig et al., 1998).

- Acumulación de vesículas en el citoplasma: el aspecto de estas vesículas, de tamaño variable, era electrolúcido y, aparentemente, carecían de cubierta. A diferencia de las células control, en las células tratadas con benzil GalNAc no se detectaban gránulos de secreción de moco maduros.
- Acumulación de glicoproteínas apicales en el citoplasma: los análisis por inmunofluorescencia sobre cortes criostáticos de rollos celulares mostraron que la distribución de proteínas como MUC1, DPP-IV y CEA, era apical en las células control y difusa citoplasmática en las células tratadas con benzil GalNAc. Por el contrario, el tratamiento con benzil GalNAc no afectaba la distribución de glicoproteínas basolaterales, como la gp120, o la de proteínas apicales no glicosiladas asociadas al citoesqueleto, como vilina o ZO-1. La acumulación de glicoproteínas apicales fue confirmada por microscopía electrónica: DPP-IV, MUC1 y CEA se localizaban en las vesículas que se acumulaban en el citoplasma de células tratadas con benzil GalNAc.
- Inhibición de la sialilación de glicoproteínas: al igual que sucedía con las mucinas, el benzil GalNAc inhibió la sialilación en $\alpha 2,3$ de otras glicoproteínas, tanto O- como N- glicoproteínas. Mediante el empleo de lectinas se determinó que en estas células el ácido siálico se añade fundamentalmente en posición $\alpha 2,3$, siendo la estructura Neu5Ac $\alpha 2,3$ GalGalNAc-R frecuente no solo en mucinas sino también en otras glicoproteínas como la DPP-IV. Así, las células HT-29 mucosecretoras control son altamente reactivas a la lectina MAL, que detecta ácido siálico en posición $\alpha 2,3$, mientras que son débilmente reactivas a la lectina PNA, que detecta la estructura GalGalNAc-R. En cambio, las células tratadas con benzil GalNAc son débilmente reactivas a MAL y fuertemente reactivas a PNA. El tratamiento de extractos de proteínas de células control con la sialidasa de *Clostridium perfringens* (la cual elimina el ácido siálico) tenía el mismo efecto sobre la reactividad de lectinas que el tratamiento con benzil GalNAc.

En resumen, el tratamiento crónico de células HT-29 M6 con 2 mM benzil GalNAc producía la inhibición de la secreción de mucinas y la acumulación de glicoproteínas apicales en vesículas que llenaban el citoplasma. Los efectos del tratamiento con benzil GalNAc eran reversibles y se producían también en otras células derivadas de células HT-29, tanto con fenotipo mucosecretor como enterocítico (Hennebicq-Reig et al., 1998; Huet et al., 1998). En todas estas células, los efectos del benzil GalNAc estaban asociados a una drástica reducción en la sialilación, debida fundamentalmente a la inhibición de la actividad $\alpha 2,3$ sialiltransferasa por parte de los metabolitos derivados del benzil GalNAc. Notoriamente, la distribución del ácido siálico en células HT-29 M6 y en otras células HT-29 polarizadas era fundamentalmente apical (Huet et al., 1998). En células Caco-2 tratadas crónicamente con benzil GalNAc no se apreciaban los efectos descritos en las células HT-29 (Huet et

al., 1998; de Bolós y cols., resultados no publicados). En estas células, a diferencia de las células HT-29, la actividad sialiltransferasa predominante es $\alpha 2,6$ (fundamentalmente ST6Gal I) (Dall'Olio et al., 1992) la cual no es inhibida por el benzil GalNAc. El conjunto de estas observaciones sugería que el ácido siálico podría estar involucrado en el transporte/sorting de glicoproteínas hacia la membrana apical en células HT-29 M6.

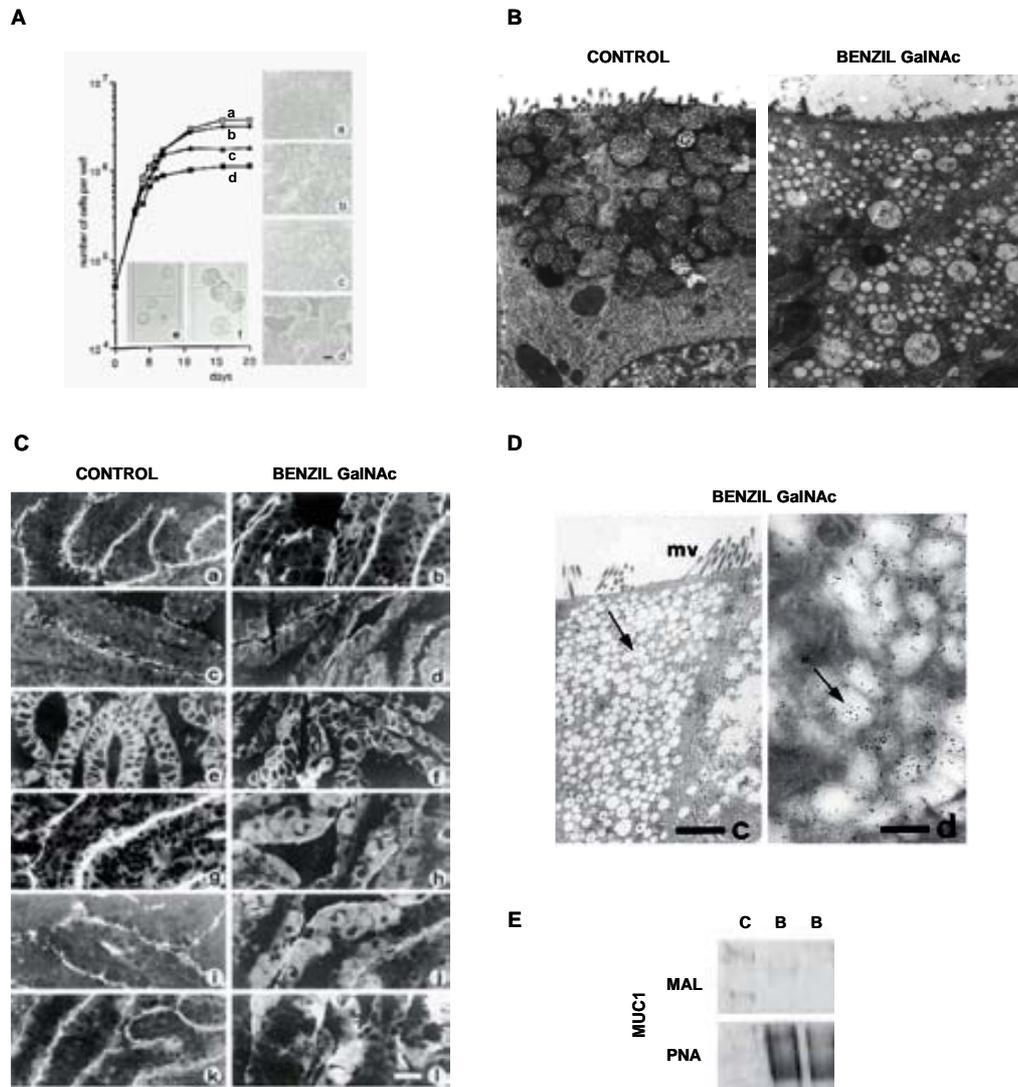


Figura 4.4 Efectos del tratamiento crónico con benzil GalNAc sobre células HT-29 M6. **A.** Curvas de proliferación y morfología por contraste de fases de células cultivadas en ausencia (a, e) o presencia de benzil GalNAc a 0,5 mM (b), 1 mM (c) o 2 mM (d,f). Las células cultivadas con benzil GalNAc a 2 mM muestran una reducción dramática de la proliferación y un considerable aumento de su tamaño. **B.** Microscopía electrónica. El citoplasma de células tratadas con benzil GalNAc muestra una severa acumulación de vesículas electrónlúcidas. **C.** Inmunofluorescencia sobre cortes criostáticos de rollos celulares. El tratamiento induce la distribución citoplasmática de glicoproteínas apicales de membrana como DPP-IV (g,h), MUC1 (i,j) y CEA (k,l), pero no afecta a la distribución de las proteínas apicales asociadas al citoesqueleto como vilina (a,b) y ZO-1 (c,d) o de la glicoproteína basolateral gp120 (e,f). **D.** Inmunomicroscopía electrónica. Las glicoproteínas apicales, como DPP-IV, se acumulan en las vesículas electrónlúcidas. **E.** Blotting de lectinas de inmunoprecipitados de MUC1. El tratamiento inhibe la sialilación de glicoproteínas lo que se evidencia por una reducción de su reactividad a la lectina MAL y un aumento de la reactividad a la lectina PNA. C: Control, B: benzil GalNAc (tomado de Huet et al., 1998).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los estudios realizados en este trabajo responden al **objetivo general** de determinar el factor o factores reponsables del desarrollo del fenotipo descrito en células HT-29 M6 tratadas crónicamente con benzil GalNAc.

En particular, las preguntas que quisimos responder en este trabajo fueron:

- ¿cómo un inhibidor de glicosilación como el benzil GalNAc produce tantos efectos diferentes?
- ¿cuál es el espectro de efectos del benzil GalNAc en diferentes tipos celulares?

Los **objetivos específicos** de este trabajo fueron:

- i)* Determinar, mediante lectinas, la distribución de epítomos sialilados en un panel de células epiteliales en cultivo y en tejidos.
- ii)* Describir los efectos del tratamiento crónico con benzil GalNAc en varios tipos celulares epiteliales.
- iii)* Determinar el efecto del tratamiento crónico con benzil GalNAc sobre la maduración de glicoproteínas apicales, basolaterales y lisosomales en células HT-29 M6.
- iv)* Determinar la identidad de las vesículas citoplasmáticas que se acumulan en células tratadas con benzil GalNAc y definir la relación entre la inhibición de la sialilación de proteínas y su acumulación en vesículas.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La hipótesis que se manejó al inicio de este estudio postulaba que la inhibición de la sialilación de glicoproteínas causaría el fenotipo descrito en células HT-29 M6 tratadas con benzil GalNAc. Ésta se basaba en la posibilidad de que el ácido siálico pudiera ser requerido para el transporte/*sorting* de glicoproteínas apicales (Huet et al., 1998; Hennebicq-Reig et al., 1998). Un modelo que representa esta hipótesis está esquematizado en la figura 1.

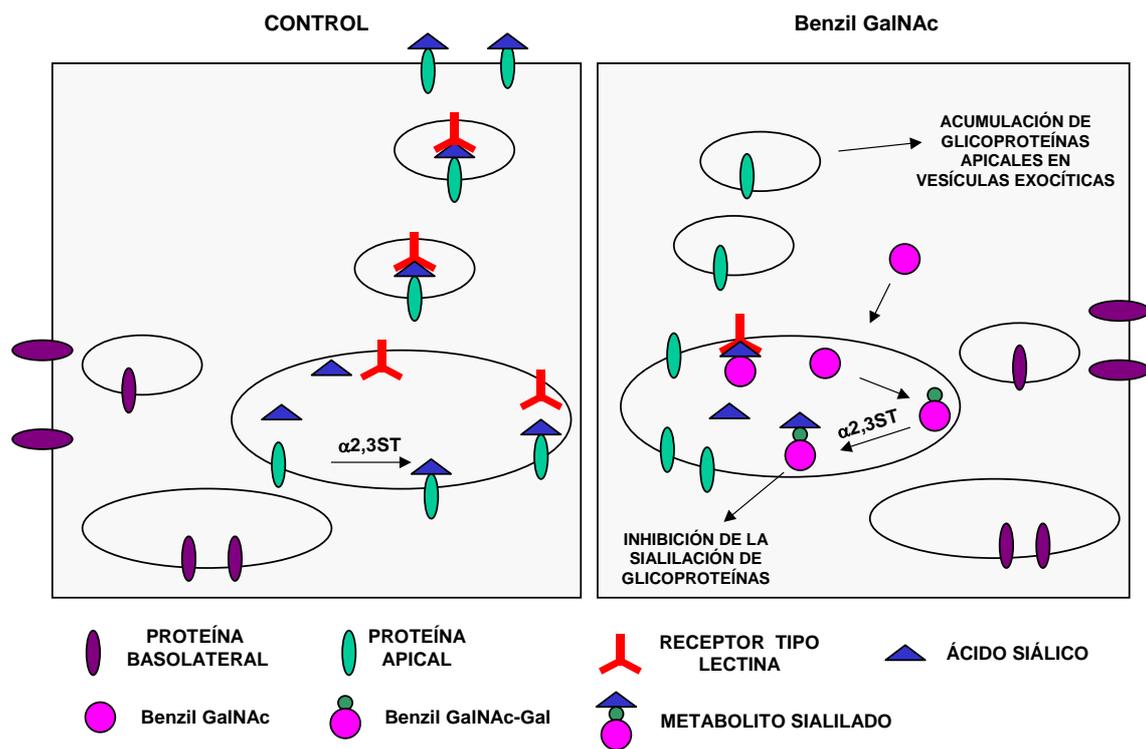


Figura 1. Modelo hipotético que describe el posible origen de los efectos descritos en células HT-29 M6 tratadas con benzil GalNAc. El ácido siálico de las glicoproteínas apicales sería reconocido específicamente por una putativa lectina que mediaría el transporte de éstas hacia la membrana apical. En células tratadas con benzil GalNAc, en las cuales la sialilación está severamente reducida, las glicoproteínas apicales se acumularían en vesículas exocíticas derivadas del TGN debido a que carecerían de la señal - el ácido siálico - que les permitiría ser transportadas hacia la membrana. Además, los metabolitos sialilados derivados del benzil GalNAc podrían competir por el sitio de reconocimiento de la lectina. Por el contrario, las glicoproteínas basolaterales no estarían afectadas puesto que para su transporte/*sorting* no es requerido el ácido siálico.

Aunque en la figura 1 se presume que el ácido siálico es una señal de localización apical y que existiría una lectina que reconoce ácido siálico y que mediaría el transporte hacia la membrana apical, ésta es una de las múltiples explicaciones que se podrían dar para justificar el requerimiento de ácido siálico en el transporte/*sorting* apical.

RESULTADOS

1. DISTRIBUCIÓN DEL ÁCIDO SIÁLICO EN CÉLULAS EPITELIALES

INTRODUCCIÓN

Previamente se había descrito que, en células HT-29 M6 y HT-29 M3, el ácido siálico se distribuía fundamentalmente en la membrana apical (Huet et al., 1998), resultado que es compatible con la idea de que éste pudiera funcionar como una señal de transporte/*sorting* de glicoproteínas apicales. Sin embargo, dado que no se ha caracterizado la distribución del ácido siálico en otras células epiteliales, no se puede descartar que este hallazgo sea particular a las células HT-29. Los resultados descritos en esta sección responden al objetivo de determinar, mediante lectinas, la distribución de epítomos sialilados en un panel de células epiteliales en cultivo y en tejidos.

Artículo: "Differential distribution of sialic acid in α 2,3 and α 2,6 linkages in the apical membrane of cultured epithelial cells and tissues"

Fausto Ulloa and Francisco X. Real

Journal of Histochemistry & Cytochemistry (2001) 49:501-510

ARTICLE

Differential Distribution of Sialic Acid in α 2,3 and α 2,6 Linkages in the Apical Membrane of Cultured Epithelial Cells and Tissues

Fausto Ulloa and Francisco X. Real

Unitat de Biologia Cel·lular i Molecular, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

SUMMARY We used lectin cytochemistry and confocal microscopy to examine the distribution of sialic acid in epithelial cells. *Maackia amurensis* lectin and *Sambucus nigra* agglutinin were used to detect α 2,3 and α 2,6 sialic acid, respectively. In Caco-2, HT-29 5M12, and MCF-7 cells, which express sialic acid mainly in one type of linkage, the majority of the signal was observed in the apical membrane. In cells that bound both lectins, α 2,3 sialic acid was distributed apically, whereas α 2,6 sialic acid showed a broader distribution. In IMIM-PC-1 cultures, α 2,3 sialic acid was detected mainly in the apical membrane, whereas α 2,6 sialic acid was more abundant in the basolateral domain of polarized cells. In these cells, treatment with GalNAc-O-benzyl led to reduced α 2,3 levels and to an increase and redistribution of α 2,6 to the apical domain. Similarly, sialic acid was predominantly expressed apically in all epithelial tissues examined. In conclusion, (a) sialic acid is mainly distributed to the apical membrane of epithelial cells, (b) there is a hierarchy in the distribution of sialic acids in polarized epithelial cells, i.e., α 2,3 is preferred to α 2,6 in the apical membrane, and (c) IMIM-PC-1 cells are a good model in which to study the regulation of the levels and distribution of sialic acids. (J Histochem Cytochem 49:501–509, 2001)

KEY WORDS

lectin cytochemistry
confocal microscopy
sialic acid
epithelial cells

SIALIC ACIDS are a diverse group of monosaccharides present at the outermost end of N-linked and O-linked carbohydrate chains and in lipid-associated glycoconjugates. Sialic acids are found in glycoconjugates of some bacteria and fungi and in animals of the deuterostome lineage (Schauer 1982). In mammalian cells, the most common sialic acids are N-acetylneuraminic acid and N-glycolylneuraminic acid, although only the former is present in human cells (Chou et al. 1998). The structural diversity of sialic acids arises not only from the nature of the monosaccharide but also from its linkage to other sugars, which occurs in three main configurations: α 2,3, α 2,6, and α 2,8. The latter form generally exists as homopolymers in a few glycoproteins expressed in neural tissue, such as N-CAM, and in gangliosides (for a

review of the chemistry and biology of sialic acids see Schauer 1982; Reutter et al. 1997).

Despite extensive knowledge about the structural features of sialic acids, relatively little is known about their biological role (Varki 1993). The extended nature of oligosaccharide chains, and possibly their negative charge, plays an important role in cell–cell and cell–matrix interactions (reviewed in Kelm and Schauer 1997). The best physiological evidence supporting such a contention comes from the demonstration that sialyl-Le^x and sialyl-Le^a are ligands for selectins and play a major role in the early steps of leukocyte rolling on endothelial cells (reviewed in Tedder et al. 1995).

Sialyltransferases constitute a family of more than 15 enzymes that transfer sialic acid from CMP-sialic acid to glycoconjugates. They exhibit a notable specificity for both linkage and acceptor substrates. Like other glycosyltransferases, they are Type II glycoproteins residing in *trans*-Golgi cisternae and the *trans*-Golgi network. Their expression is highly tissue-specific and is finely regulated during embryonic development and cell differentiation (Tsuji 1996).

Correspondence to: Francisco X. Real, Unitat de Biologia Cel·lular i Molecular, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Carrer del Dr. Aiguader, 80, 08003 Barcelona, Spain. E-mail: preal@imim.es
(Received for publication August 24, 2000; accepted November 15, 2000 (0A5331)).

In the course of studies on the biosynthesis of mucin glycoproteins by mucous-secreting HT-29 colon cancer cells, we observed that the major effect of short-term treatment with the sugar analogue GalNAc-O-benzyl was not an inhibition of O-glycosylation, as previously reported, but a profound inhibition of sialylation of de novo-synthesized mucin glycoproteins (Huet et al. 1995). This effect resulted from a competitive inhibition of α 2,3 sialyltransferases by GalNAc-O-benzyl metabolites produced by the cells (Huet et al. 1995; Delannoy et al. 1996; Zanetta et al. 2000). Indeed, the main sialyltransferase activity detected in HT-29 cells is of the α 2,3 type (Dall'Olio et al. 1993; Huet et al. 1995,1998). A more thorough analysis of the effects of prolonged treatment with GalNAc-O-benzyl on these cells disclosed several interesting effects. First, in polarized monolayers of mucus-producing HT-29 cells, sialic acid was predominantly distributed to the apical membrane. Second, inhibition of sialylation induced by GalNAc-O-benzyl was associated with an increase in the levels of ST3 Gal I mRNA and activity. Finally, apical glycoproteins were mislocalized in intracellular vesicles accumulating in treated cells (Hennebicq-Reig et al. 1998; Huet et al. 1998). These observations led to the proposal that sialic acid may constitute an apical targeting signal for glycoproteins. We have recently reported that both apical and basolateral glycoproteins are sialylated in HT-29 cells. Nevertheless, GalNAc-O-benzyl selectively inhibits the sialylation of apical and lysosomal glycoproteins but it does not affect the two basolateral glycoproteins analyzed (Ulloa et al. 2000). These findings raise important questions about the biosynthesis and intracellular trafficking of membrane sialoglycoproteins as well as the regulation of sialylation.

In this study, we analyzed the distribution of sialic acid in a panel of human cultured cells and examined the effects of treatment with GalNAc-O-benzyl on sialoglycoconjugates in a pancreatic cancer cell line, designated IMIM-PC-1, displaying high levels of ST3Gal I. This work is the basis for a more in-depth analysis of the putative role of sialic acid in glycoprotein targeting in epithelial cells and provides novel cell models in which to analyze the regulation of sialylation.

Materials and Methods

Reagents, Antibodies, and Lectins

Dulbecco's modified minimal essential medium (MEM) and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Gibco Life Technologies (Glasgow, UK). GalNAc-O-benzyl, polyvinylpyrrolidone, and *Clostridium perfringens* neuraminidase were from Sigma Chemical (St Louis, MO). Streptavidin-rhodamine and streptavidin-peroxidase were from Pierce Chemical (Rockford, IL) and Zymed (South San Francisco,

CA), respectively. A mouse monoclonal antibody (MAb) TS2/16 against an extracellular epitope of the β 1 integrin subunit (Arroyo et al. 1992) was obtained from F. Sánchez-Madrid (Hospital de la Princesa; Madrid, Spain). Mouse MAb A9 detecting an extracellular epitope of the β 4 integrin subunit (Kimmel and Carey 1986; Van Waes et al. 1991) was a gift from T. Carey (University of Michigan; Ann Arbor, MI). Mouse MAb 36, detecting the cytoplasmic domain of human and dog E-cadherin, was purchased from Transduction Laboratories (Lexington, KY). Biotinylated *Maackia amurensis* lectin (MAL) and *Sambucus nigra* agglutinin (SNA), recognizing the oligosaccharide species NeucAc α 2,3Gal-R and NeucAc α 2,6Gal/GalNAc-R, respectively, were from Vector Labs (Burlingame, CA). The specificity of these lectins and their selectivity for sialic acid linkage has been extensively demonstrated in the past (Shibuya et al. 1987; Wang and Cummings 1988).

Cell Culture

A clone derived from HT-29 colon cancer cells and designated HT-29 5M12 was selected because it responds to GalNAc-O-benzyl in a manner similar to that of the unselected parental population, but cells display a polarized absorptive phenotype in postconfluence (Lesuffleur et al. 1998), thus facilitating the analysis of apical membrane glycoproteins without interference from mucus. Caco-2 colon cancer cells display an enterocytic phenotype. Both lines were provided by T. Lesuffleur (INSERM U505; Paris, France). MDCK I cells were provided by B. Alarcón (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa; Madrid, Spain), MDCK II cells were provided by K. Matter (University of Geneva; Geneva, Switzerland), MZPC-1 pancreatic cancer cells were obtained from A. Knuth (Nordwestern Krankenhaus; Frankfurt, Germany), MCF-7 breast cancer cells were from the ATCC (Manassas, VA), and IMIM-PC-1 and IMIM-PC-2 pancreatic cancer cells were established in our laboratory (Vilá et al. 1995). Cells were seeded at the following densities: HT-29 5M12, HRT-18, and MCF-7, 2×10^4 cells/cm²; Caco-2, 1×10^4 cells/cm²; MZPC-1, IMIM-PC-1, and IMIM-PC-2, 5×10^3 cells/cm²; and MDCK I and MDCK II, 1×10^3 cells/cm². Culture medium (DMEM supplemented with 10% FBS) was changed daily and cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 2 weeks until a polarized monolayer was achieved, except for HT-29 5M12 cells, which were grown for 21 days to obtain a better-polarized monolayer.

Fluorescence Microscopy

Cells grown on coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature (RT), incubated with 50 mM of NH₄Cl for 30 min, and permeabilized with 0.1% saponin in PBS-1% BSA for 30 min. Primary antibody was incubated for 1 hr followed by FITC-conjugated goat anti-mouse Ig. MAL or SNA (20 μ g/ml in 0.1% saponin in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 15 mM KCl, 5 mM MgCl₂) was added for 1 hr, followed by streptavidin-rhodamine (4 μ g/ml). Confocal microscopic analysis was performed using a Leica TCS-D instrument. To determine the degree of colocalization of sialic acid-specific lectins and the basolateral marker, >15 random vertical sections of cells were captured

at $\times 630$ magnification and co-localization analysis was carried out using Metamorph 4.0 (Universal Imaging; Westchester, PA) software.

Lectin Histochemical Staining

Paraffin blocks from normal and neoplastic human tissues were obtained from the Department of Pathology, Hospital del Mar, Barcelona. Sections were deparaffinized and rehydrated, boiled in 0.1 M sodium citrate, pH 6, for 10 min, and fixed with cold acetone for 20 min. Endogenous peroxidase was blocked with 4% H_2O_2 for 10 min and nonspecific binding sites were blocked with 2% polyvinyl-pyrrolidone in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 15 mM KCl, 5 mM MgCl_2 . Sections were then incubated with lectins (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in blocking solution) for 1 hr at RT and streptavidin-peroxidase (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added for 30 min. Reactions were developed with H_2O_2 /diaminobenzidine (DAB). Enzymatic desialylation was performed by incubating tissue sections with neuraminidase from *C. perfringens* (50 mU/ml in 50 mM citrate, pH 6.0, 0.9% NaCl, 0.1% CaCl_2) for 16 hr at 37C.

Results

Membrane Distribution of Sialic Acid in Cultured Epithelial Cells

We used lectin immunofluorescence to determine the distribution of sialic acid in polarized epithelial cells. The levels and types of sialic acids were analyzed using a panel of cell lines and the lectins MAL and SNA. Representative results obtained with selected lines are shown here. MAbs TS2/16 and A9, detecting $\beta 1$ and $\beta 4$ integrins, and clone 36, detecting dog E-cadherin, were used as a control of polarization and accessibility to the basolateral domain. HT-29 and Caco-2 cells were used as reference cells, because it has previously been shown that they express mainly $\alpha 2,3$ and $\alpha 2,6$ sialic acid, respectively, with a predominant apical distribution (Huet et al. 1998; Slimane et al. 2000).

Figure 1 shows vertical sections obtained by confocal microscopy of representative examples of cell lines reactive exclusively, or predominantly, with one of the lectins used. HT-29 5M12, MCF-7, and HRT-18 bound MAL, whereas Caco-2 bound SNA. In all cases, the signal was much stronger in the apical membrane than in the basolateral membrane and there was essentially no co-localization of sialic acid and basolateral integrins. In some cases, especially in MCF-7 cells, cytoplasmic reactivity was also observed. Similar results were obtained when cells were cultured on plastic, glass coverslips, or permeable filters. When cells were fixed with methanol to remove membrane lipids, a predominant apical distribution of sialic acid was also observed, indicating that the above-mentioned findings are not due to the higher levels of glycosphingolipids present in the apical membrane (data not shown). Quantitative analysis of confocal microscopic images showed that, in paraformaldehyde-fixed HT-29

5M12 cells, 79.9% (± 14.2) of the MAL signal was excluded from the signal obtained with the antibody detecting $\beta 4$ integrin. These results indicate that the selective distribution of sialic acid cannot be accounted for by lack of accessibility of this molecule to the basolateral membrane.

A second category of cells, including the three pancreatic cancer lines examined and MDCK cells, showed labeling with both MAL and SNA. In MZPC-1 cells, MAL bound mainly to the apical membrane, although weak binding to basolateral membrane could also be detected. In these cells, reactivity with SNA was distributed to all membrane domains as well as in the cytoplasm. IMIM-PC-1 cells are a mosaic of polarized and non-polarized cells. The distribution of sialic acid in polarized cells was similar to that observed in MZPC-1 cells, although the SNA signal was fainter (Figure 2). In non-polarized cells, sialic acid showed a uniform distribution along the cell membrane. In MDCK I cells, MAL and SNA signals were located in the apical membrane domain (data not shown). In MDCK II cells, MAL signal was mainly distributed in the apical domain and was not found intracellularly, whereas SNA signal was present in all membrane domains, with basolateral reinforcement, and in the cytoplasm. In a small proportion of MDCK II cells, predominantly apical distribution of SNA reactivity was found. Quantitative analysis of confocal microscopic images revealed that, in these cells, $\alpha 2,3$ sialic acid and E-cadherin showed an almost mutually exclusive distribution: 15.8% (± 9.6) of MAL signal co-localized with E-cadherin and 18.6% (± 13.4) of E-cadherin signal co-localized with MAL. By contrast, $\alpha 2,6$ sialic acid and E-cadherin showed much greater overlap in their distribution: 49.4% (± 14.5) of SNA signal co-localized with E-cadherin and 70.2% (± 20.9) of the E-cadherin signal co-labeled with SNA.

In summary, sialic acid was predominantly found in the apical membrane and there appears to be a hierarchy in its distribution. When present in both $\alpha 2,3$ and $\alpha 2,6$ linkages, the $\alpha 2,3$ configuration is preferentially found in the apical domain.

Membrane Distribution of Sialic Acid in Epithelial Tissues

Many studies have previously analyzed the reactivity of sialic acid-reactive lectins with a wide variety of tissues (Roth 1993). We have reassessed such findings using lectin histochemistry in a selected panel of normal tissues, paying particular attention to its subcellular distribution in epithelial cells. Cell types containing mucous droplets were not considered because it was not possible to appropriately assess basolateral membrane reactivity. A remarkable finding was that, in all tissues analyzed, sialic acid showed a predominant

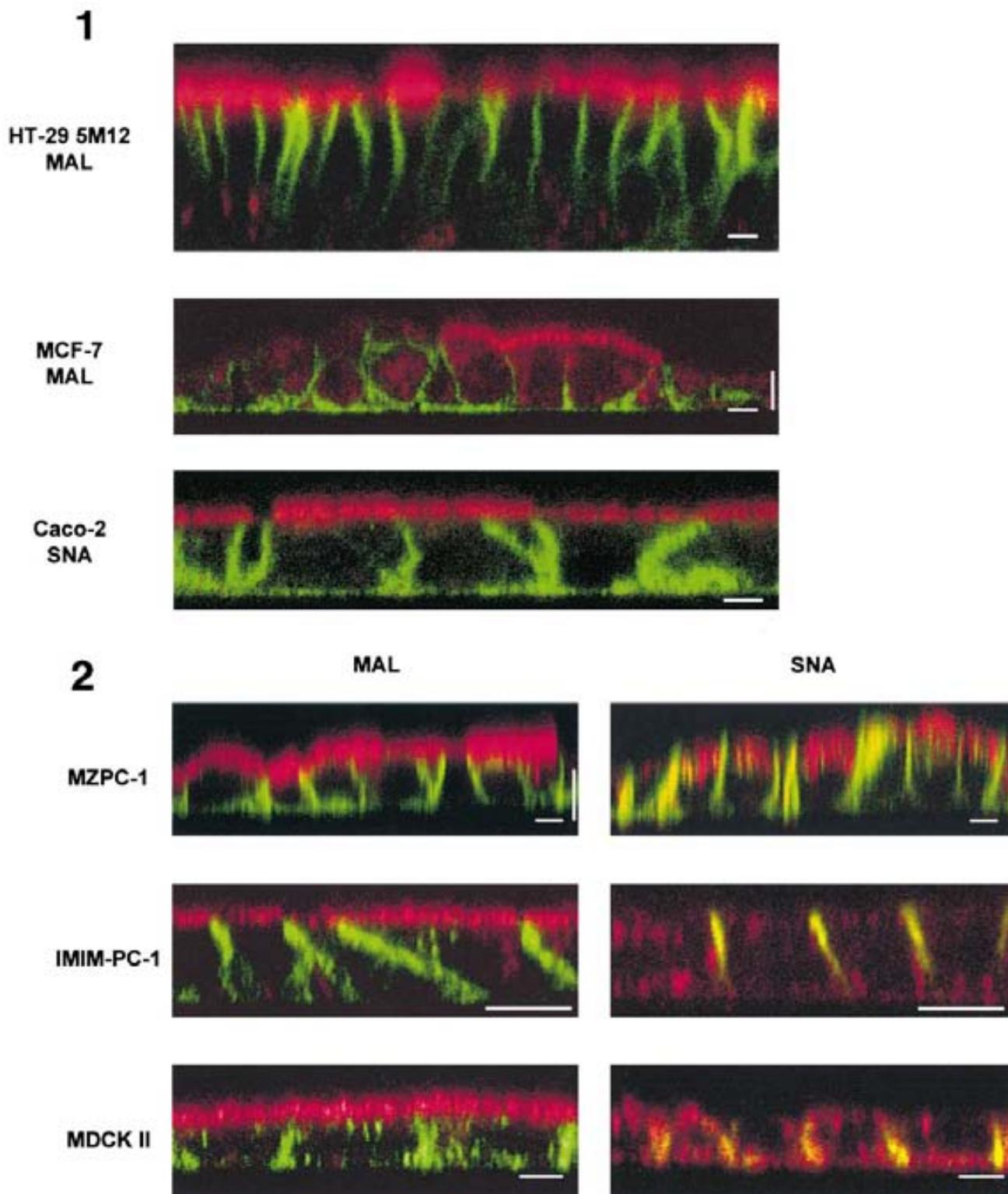


Figure 1 Sialic acid distributes preferentially to the apical domain of cultured epithelial cells expressing sialic acid predominantly in either α 2,3 or α 2,6 linkage. Cells were grown on coverslips until polarized, fixed with 4% paraformaldehyde, and permeabilized with 0.1% saponin in 1% BSA/PBS. Double staining was performed with a sialic acid-specific lectin (rhodamine) and an antibody detecting a basolateral marker (β 4 integrin for HT-29 5M12 cells and β 1 integrin for MCF-7 and Caco-2 cells) (fluorescein), and was visualized by confocal microscopy. Vertical sections of polarized HT-29 5M12, MCF-7, and Caco-2 cells. The lectin signal is strong in the apical domain and weak in the basolateral membrane. In MCF-7 cells, cytoplasmic signal is also observed. Bars = 5 μ m.

apical distribution. MAL labeled the apical membrane of pancreatic and mammary ducts, bile ducts, and Henle's loop epithelium. In hepatocytes, labeling was concentrated in the biliary canaliculi, which correspond to the apical membrane domain in these cells. In kidney proximal and distal tubules, MAL showed a predominant apical reactivity as well as weak cytoplasmic labeling, with only exceptional basolateral reactivity (Figure 3). Similar findings were made with SNA although cytoplasmic reactivity was generally greater than with MAL in all tissues examined (Figure 3).

GalNAc-O-benzyl Induces a Redistribution of Sialic Acid in IMIM-PC-1 Cells

As shown above, IMIM-PC-1 cells express both α 2,3 and α 2,6 sialic acid. GalNAc-O-benzyl has been shown to decrease sialylation in a few cell types (Byrd et al. 1995; Huet et al. 1995,1998) due to inhibition of α 2,3-sialyltransferase activity. IMIM-PC-1 cells express high levels of ST3Gal I mRNA and ST3 Gal activity (data not shown). Cells were treated for 15 days with 2 mM GalNAc-O-benzyl and the distribution of sialic acid was analyzed by confocal microscopy. In control cultures, >90% of cells showed strong apical MAL reactivity; by contrast, <5% of cells were reactive in treated cells. In control cultures, approximately 35% of cells were reactive with SNA and the signal was found in the apical and basolateral membrane as well as intracellularly. By contrast, in treated cells, SNA-binding sites showed a predominant apical distribution in 60% of cells (Figure 4). These findings indicate that inhibition of α 2,3 sialylation is accompanied by an increase in the levels of and a redistribution of α 2,6 sialic acid.

Discussion

In this study we have analyzed by lectin staining and confocal microscopy the distribution of sialic acid in the membrane of polarized cultures of epithelial cells and in normal epithelial tissues. The three main findings of the study are as follows: (a) sialic acid showed a predominant apical membrane distribution in all cultured cells examined, regardless of their origin; (b) when sialic acid was present both in α 2,3 and α 2,6 linkages, molecules with an α 2,3 linkage were preferentially distributed to the apical membrane; and (c) inhibition of α 2,3 sialylation induced by treatment of

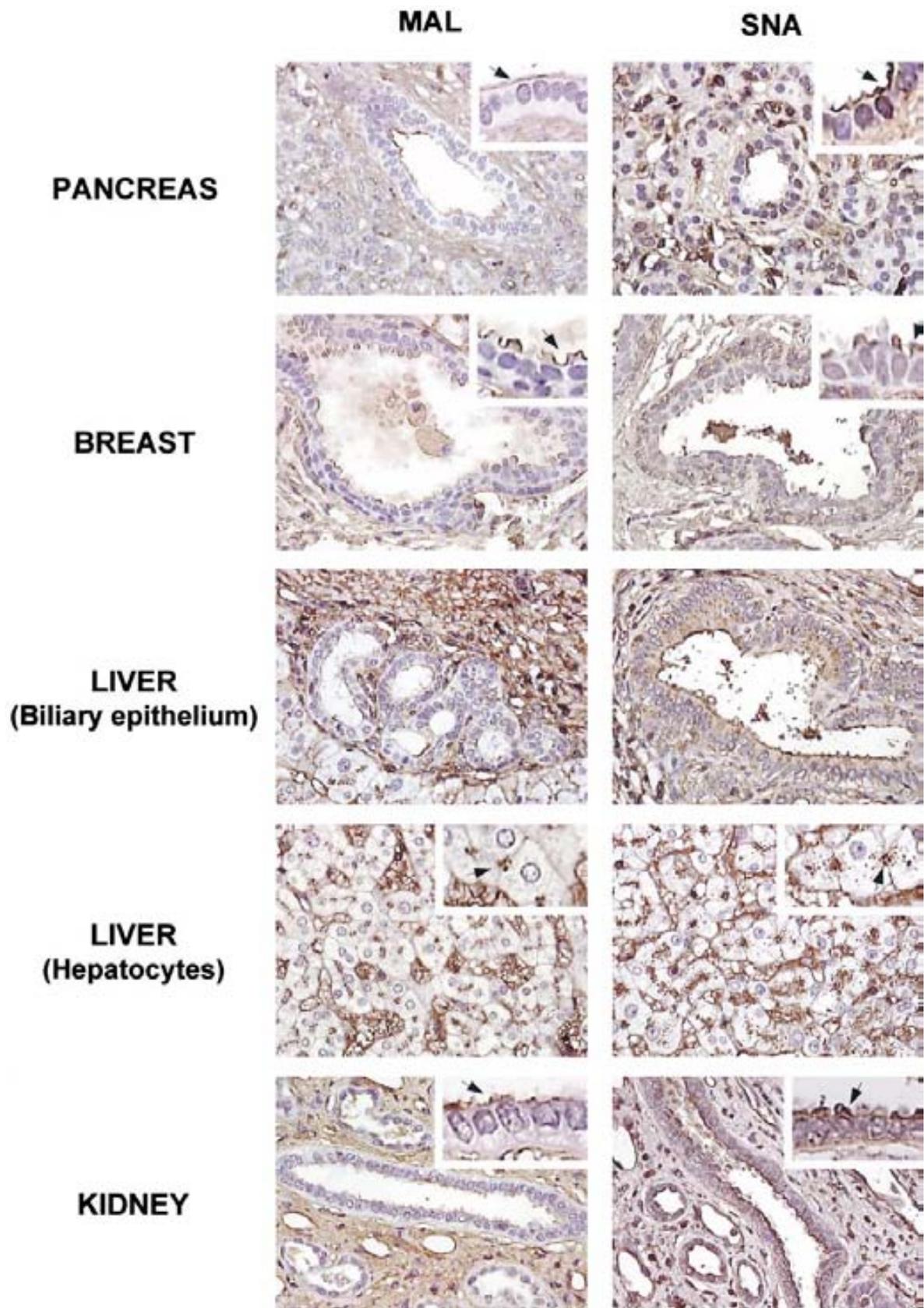
IMIM-PC-1 pancreatic cancer cells with GalNAc-O-benzyl was associated with an increase in the levels and the relative apical distribution of α 2,6 sialic acid.

The predominantly apical distribution of sialic acid supports the idea that this molecule plays a role in the interaction between the host and a wide variety of microorganisms in the lumen of epithelia. Many pathogenic bacteria and viruses produce neuraminidases, and it has been proposed that the genes coding for them have their origin in higher animals (Roggentin et al. 1993; Traving and Schauer 1998). Sialic acid can also be used as a co-receptor for binding and infectivity of some pathogenic viruses (Varki 1993; Barton et al. in press). In addition, a *trans*-sialidase is released by *Trypanosoma cruzi* and can induce apoptosis in lymphocytes (Leguizamón et al. 1999). Sialic acid at the luminal surface of epithelial cells may facilitate loss of tissue integrity, invasion, and/or colonization. It has been proposed that glycoconjugate structure may have evolved to elude invasion by pathogens, with sialic acid acquisition and modification (i.e., 9-O-acetylation) being part of such a process (Varki 1993).

Sialic acid has also been proposed to play an important role in cell-cell interactions. It is expressed at the luminal surface of endothelial cells, and binding of selectins to sialyl-Le^a or sialyl-Le^x plays a crucial role in the extravasation of leukocytes at inflammatory sites (Tedder et al. 1995). It has also been proposed that sialylated ligands on tumor cells may contribute to the transendothelial migration occurring in the metastatic process (Kannagi 1997). Increased levels of sialic acid commonly found in tumors, and possibly selected during clonal evolution, and the loss of polarity found in many neoplastic cells may contribute to enhance such interactions.

In the past few years, a growing number of membrane-bound mucins expressed by epithelial (i.e., MUC1, MUC3, MUC4), hematopoietic (i.e., CD43), and/or endothelial cells (i.e., Gly-CAM, MadCAM) have been identified (reviewed in Varki 1997; Fukuda and Tsuboi 1999; Carraway et al. 2000). These molecules contain Ser- and Thr-rich domains that are extensively O-glycosylated and sialylated, and it has been proposed that they play an important role in cell-cell interactions. CD43 is a cell surface glycoprotein expressed by hematopoietic cells. Its sialylation plays an essential role in diminishing the susceptibility of target cells to T-lymphocyte-mediated cytotoxicity.

Figure 2 Distribution of sialic acid in cultured epithelial cells expressing sialic acid in both α 2,3 and α 2,6 linkages. Cells were processed as indicated in Figure 1, double stained with sialic acid-specific lectins and an antibody detecting a basolateral marker (β 1 integrin for pancreas cancer cells and E-cadherin for MDCK II cells), and visualized by confocal microscopy. Vertical sections of polarized MZPC-1, IMIM-PC-1, and MDCK II cells. Note the preferential apical distribution of MAL signal in the three lines and the overlap between SNA signal and the basolateral marker. In some cases, intracellular binding of lectin is also observed. Bars = 5 μ m.



50 μm

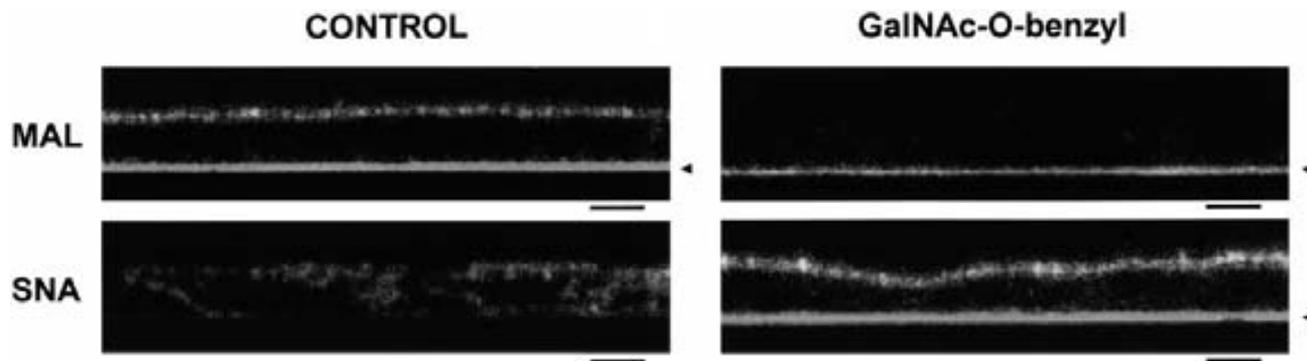


Figure 4 GalNAc-O-benzyl induces a redistribution of sialic acid in IMIM-PC-1 cells. In control cells, MAL labels the apical membrane, whereas SNA does not show a preferential apical labeling. In GalNAc-O-benzyl-treated cells, MAL reactivity is markedly decreased, whereas SNA shows increased labeling and α 2,6 sialic acid is detected in the apical membrane of polarized cells. Arrowheads point to the surface of the coverslip, identified by reflection. Bars = 5 μ m.

(Manjunath et al. 1995; McFarland et al. 1995). T3AH rat mammary carcinoma cells express high levels of the sialoglycoprotein epiglycanin. On deglycosylation, cell–cell and cell–matrix adhesion is stimulated, and epiglycanin sialylation can overcome E-cadherin-mediated homotypic adhesion (Kemperman et al. 1994). Similarly, ectopic MUC1 expression in melanoma cells induced an inhibition of cell aggregation which was due, in part, to sialylation (Ligtenberg et al. 1992), and MUC1 interferes with the binding of non-polarized cells to the matrix mediated by integrins (Wesseling et al. 1995).

Regarding the mechanisms leading to the preferential distribution of α 2,3 vs α 2,6 sialic acid in the apical membrane, several hypotheses can be postulated, although as yet there is no substantial evidence favoring any of them. First, it is possible that the enzymes involved in the synthesis of both types of linkages reside in different compartments of the secretory pathway. Despite the fact that little is known about the specific subcellular distribution of sialyltransferases and that cell-to-cell variability is likely to occur (Velasco et al. 1993), ST3Gal III and ST6Gal I have been shown to co-localize in the Golgi yet to be differentially distributed in a post-Golgi compartment (Burger et al. 1998). Alternatively, a sorting mechanism mediated by a lectin may be responsible for the preferential distribution of α 2,3 to the apical domain. Such putative lectins might selectively recruit sialic acid-containing glycoproteins to the apical vs the basolateral domain or might favor the transport of sialylated vs unsialylated cargo. It should be emphasized that the findings

described here probably reflect quantitative rather than qualitative differences and that the presence of sialic acid in basolateral glycoproteins has been demonstrated in the past. The existence of saturable glycan-independent mechanisms for apical delivery has recently been proposed (Marmorstein et al. 2000).

With regard to the mechanisms operating in glycoprotein selection and sorting in cultured cells, two points should be made: the fact that we used tumor cells and the possibility that glycoprotein sorting mechanisms might be altered in cultured cells. Against the possibility that our findings are artifactual is the observation that a similar degree of selectivity in sialic acid distribution was present in normal tissues. Although the data reported here on the expression of sialic acids in tissues are not novel, they substantiate available evidence on the distribution of sialic acids in the apical membrane using lectin–ultrastructural techniques (selected references: Sata et al. 1989,1991; Roth 1993; Kaneko et al. 1995; Babal and Gardner 1996). For example, it has been reported that in human colon, using MAL lectin–ultrastructural cytochemistry, the “luminal surface of absorptive enterocytes was intensely stained along the entire length of the crypts and in the surface epithelium of both right and left colon” (Sata et al. 1991). In rat intestine, sialic acid is present in both apical and basolateral membranes of undifferentiated cells, whereas it is restricted to the apical domain in the surface epithelium (Taatjes and Roth 1988). We have failed to find reports of an exclusive or preferential basolateral distribution of sialic acid (Roth 1993).

Figure 3 Lectin staining of sections of normal human epithelial tissues. Sections of paraffin-embedded tissues were allowed to react with biotinylated MAL or SNA and the reactions were developed with streptavidin–peroxidase and DAB; sections were counterstained with hematoxylin. Note the predominant apical distribution of the lectin signal in pancreatic and mammary gland ducts, biliary epithelium, biliary canaliculi, and renal epithelial cells (arrows).

We have examined the reactivity of MAL and SNA with a small panel of tumor tissues from prostate, colon, and pancreas. In areas where cells were polarized, predominant apical distribution of sialic acid was also observed (not shown), as has been described by other investigators. Interestingly, in prostate cancers α 2,3 sialic acid showed mainly a supranuclear distribution, whereas α 2,6 sialic acid was found in the apical membrane, supporting the notion that the differential subcellular distribution of sialic acids is tightly regulated.

In HT-29 cells, we have previously described that inhibition of α 2,3 sialylation associated with culture in the presence of GalNAc-O-benzyl is accompanied by concomitant upregulation (threefold) of the levels of ST3 Gal I mRNA and activity (Huet et al. 1998). These findings strongly support the notion that sialylation levels are finely tuned in cells, suggesting the existence of sensor mechanisms that monitor the degree, and perhaps the type, of sialylation of membrane glycoproteins. It is tempting to speculate that lectin-like molecules may participate in this process. In the past few years, several intracellular lectins have been implicated in the secretory pathway (Fiedler and Simons 1994,1996), although none of them appears to recognize sialic acids. A family of sialic acid-binding cell surface lectins (siglecs) has recently been described, but its members appear to participate mainly in cell-cell interactions (Crocker et al. 1998). If intracellular lectins exist and play a role as sensors, the next question will be how this information translates into changes in steady-state mRNA levels. Two possibilities are the regulation of mRNA stability and transcriptional regulation itself, although neither of these processes is known to be regulated by sialylated proteins. Until now, this concept has not been discussed at any length.

Carbohydrates in glycoproteins and glycolipids display a highly remarkable complexity that does not have a parallel in terms of functional significance (see discussion by Varki 1993). Recent data indicate that Fringe is a fucosyltransferase that modulates the ability of Notch ligands to activate the Notch signaling pathway (Moloney et al. 2000). It is therefore possible that new roles for other sugars, such as sialic acid, will be described in the future. The generation of mice deficient in sialyltransferases should also yield information on their function (Muramatsu 1999; Priatel et al. 2000). The findings described here provide clues regarding the regulation of sialic acid level and distribution in epithelial cells.

Acknowledgments

Supported in part by grants from Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (SAF97-0085), the Mizutani Foundation for Glycoscience, and Biomed BMH4-CT98-3222.

We apologize to many investigators who have analyzed sialic acid expression using lectins and whose work was not cited because of space constraints. We thank A. Zweibaum, G. Huet, and P. Delannoy for valuable discussions and for sharing unpublished results, and the investigators mentioned in the text for providing cells and reagents. We are grateful to the Department of Pathology, Hospital del Mar, for valuable contributions, and to S. Castel and Servicios Científico-Técnicos de la Universitat de Barcelona for confocal microscopic analysis.

Literature Cited

- Arroyo AG, Sanchez-Mateos P, Campanero MR, Martin-Padura I, Dejana E, Sanchez-Madrid F (1992) Regulation of the VLA integrin-ligand interactions through the β 1 subunit. *J Cell Biol* 117:659-670
- Babal P, Gardner WA (1996) Histochemical localization of sialylated glycoconjugates with *Trichomonas mobilensis* lectin (TLM). *Histol Histopathol* 11:621-631
- Barton ES, Connolly JL, Forrest JC, Chappell JD, Dermody TS (in press) Utilization of sialic acid as a coreceptor enhances reovirus attachment by multi-step adhesion-strengthening. *J Biol Chem*
- Burger PC, Lotscher M, Streiff M, Kleene R, Kaissling B, Berger EG (1998) Immunocytochemical localization of α 2,3 (N)-sialyltransferase (ST3Gal III) in cell lines and rat kidney tissue sections: evidence for Golgi and post-Golgi localization. *Glycobiology* 8:245-257
- Byrd JC, Dahiya R, Huang J, Kim YS (1995) Inhibition of mucin synthesis by benzyl-alpha-GalNAc in KATO III gastric cancer and Caco-2 colon cancer cells. *Eur J Cancer* 31A:1498-1505
- Carraway KL, Price-Schiavi SA, Komatsu M, Idris N, Perez A, Li P, Jepson S, Zhu X, Carvajal ME, Carraway CA (2000) Multiple facets of sialomucin complex/MUC4, a membrane mucin and erbb2 ligand, in tumors and tissues (Y2K update). *Front Biosci* 5:D95-107
- Chou HH, Takematsu H, Diaz S, Iber J, Nickerson E, Wright KL, Muchmore EA, Nelson DL, Warren ST, Varki A (1998) A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the Homo-Pan divergence. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11751-11756
- Crocker PR, Clark EA, Filbin M, Gordon S, Jones Y, Kehrl JH, Kelm S, Le Douarin N, Powell L, Roder J, Schnaar RL, Sgroi DC, Stamenkovic K, Schauer R, Schachner M, van den Berg TK, van der Merwe PA, Watt SM, Varki A (1998) Siglecs: a family of sialic-acid binding lectins. *Glycobiology* 8:v
- Dall'Olio F, Malagolini N, Guerrini S, Serafini-Cessi F (1993) Resistance to methotrexate is associated with selective changes of alpha 2,6- and alpha 2,3-sialyltransferase activities toward N-acetylglucosaminic sequences in human colon cancer cell line HT-29. *Biochem Biophys Res Commun* 196:714-720
- Delannoy P, Kim I, Emery N, De Bolos C, Verbert A, Degand P, Huet G (1996) Benzyl-N-acetyl-alpha-D-galactosaminide inhibits the sialylation and the secretion of mucins by a mucin secreting HT-29 cell subpopulation. *Glycoconj J* 13:717-726
- Fiedler K, Simons K (1994) A putative novel class of animal lectins in the secretory pathway homologous to leguminous lectins. *Cell* 77:625-626
- Fiedler K, Simons K (1996) Characterization of VIP36, an animal lectin homologous to leguminous lectins. *J Cell Sci* 109:271-276
- Fukuda M, Tsuboi S (1999) Mucin-type O-glycans and leukosialin. *Biochim Biophys Acta* 1455:205-217
- Hennebicq-Reig S, Lesuffleur T, Capon C, de Bolos C, Kim I, Moreau O, Richet C, Hemon B, Recchi MA, Maes E, Aubert JP, Real FX, Zweibaum A, Delannoy P, Degand P, Huet G (1998) Permanent exposure of mucin-secreting HT-29 cells to benzyl-N-acetyl-alpha-D-galactosaminide induces abnormal O-glycosylation of mucins and inhibits constitutive and stimulated MUC5AC secretion. *Biochem J* 334:283-295

- Huet G, Hennebicq-Reig S, de Bolos C, Ulloa F, Lesuffleur T, Barbat A, Carriere V, Kim I, Real FX, Delannoy P, Zweibaum A (1998) GalNAc-alpha-O-benzyl inhibits NeuAc α 2-3 glycosylation and blocks the intracellular transport of apical glycoproteins and mucus in differentiated HT-29 cells. *J Cell Biol* 141:1311-1322
- Huet G, Kim I, de Bolos C, Lo-Guidice JM, Moreau O, Hemon B, Richet C, Delannoy P, Real FX, Degand P (1995) Characterization of mucins and proteoglycans synthesized by a mucin-secreting HT-29 cell subpopulation. *J Cell Sci* 108:1275-1285
- Kaneko Y, Yamamoto H, Colley KJ, Moskal JR (1995) Expression of Gal β 1-4GlcNAc α 2,6-sialyltransferase and α 2,6-linked sialoglycoconjugates in normal human and rat tissues. *J Histochem Cytochem* 43:945-954
- Kannagi R (1997) Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer. *Glycoconj J* 14:577-584
- Kelm S, Schauer R (1997) Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int Rev Cytol* 175:137-240
- Kemperman H, Wijmants Y, Wesseling J, Niessen CM, Sonnenberg A, Roos E (1994) The mucin epiglycanin on TA3/Ha carcinoma cells prevents alpha 6 beta 4-mediated adhesion to laminin and kalinin and E-cadherin-mediated cell-cell interaction. *J Cell Biol* 127:2071-2080
- Kimmel KA, Carey TE (1986) Altered expression in squamous carcinoma cells of an orientation restricted epithelial antigen detected by monoclonal antibody A9. *Cancer Res* 46:3614-3623
- Leguizamon MS, Mocetti E, Garcia Rivello H, Argibay P, Campetella O (1999) Trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces apoptosis in cells from the immune system in vivo. *J Infect Dis* 180:1398-1402
- Lesuffleur T, Violette S, Vasile-Pandrea I, Dussaulx E, Barbat A, Muleris M, Zweibaum A (1998) Resistance to high concentrations of methotrexate and 5-fluorouracil of differentiated HT-29 colon-cancer cells is restricted to cells of enterocytic phenotype. *Int J Cancer* 76:383-392
- Ligtenberg MJ, Buijs F, Vos HL, Hilkens J (1992) Suppression of cellular aggregation by high levels of episialin. *Cancer Res* 52:2318-2324
- Manjunath N, Correa M, Ardman M, Ardman B (1995) Negative regulation of T-cell adhesion and activation by CD43. *Nature* 377:535-538
- Marmorstein AD, Csaky KG, Baffi J, Lam L, Rahaal F, Rodriguez-Boulan E (2000) Saturation of, and competition for entry into, the apical secretory pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3248-3253
- McFarland TA, Ardman B, Manjunath N, Fabry JA, Lieberman J (1995) CD43 diminishes susceptibility to T lymphocyte-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 154:1097-1104
- Moloney DJ, Panin VM, Johnston SH, Chen J, Shao L, Wilson R, Wang Y, Stanley P, Irvine KD, Haltiwanger RS, Vogt TF (2000) Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* 406:369-375
- Muramatsu T (1999) Essential roles of carbohydrate signals in development, immune response and tissue functions, as revealed by gene targeting. *J Biochem* 127:171-176
- Priatel JJ, Chui D, Hiraoka N, Simmons CJ, Richardson KB, Page DM, Fukuda M, Varki NM, Marth JD (2000) The ST3Gal-I sialyltransferase controls CD8+ T lymphocyte homeostasis by modulating O-glycan biosynthesis. *Immunity* 12:273-283
- Reutter W, Stäsche R, Stehling P, Baum O (1997) The biology of sialic acids: Insights into their structure, metabolism and function in particular during viral infection. In Gabius HJ, Gabius S, eds. *Glycosciences. Status and Perspectives*. Weinheim, Chapman & Hall, 245-259
- Roggentin P, Schauer R, Hoyer LL, Vimr ER (1993) The sialidase superfamily and its spread by horizontal gene transfer. *Mol Microbiol* 9:915-921
- Roth J (1993) Cellular sialoglycoconjugates: a histochemical perspective. *Histochem J* 25:687-710
- Sata T, Lackie PM, Taatjes DJ, Peumans W, Roth J (1989) Detection of the Neu5Ac (α 2,3) Gal (β 1,4) GlcNAc sequence with the leukoagglutinin from *Maackia amurensis*: light and electron microscopy demonstration of differential tissue expression of terminal sialic acid in α 2,3- and α 2,6-linkage. *J Histochem Cytochem* 37:1577-1588
- Sata T, Roth J, Zuber C, Stamm B, Heitz PU (1991) Expression of α 2,6-linked sialic acid residues in neoplastic but not in normal human colonic mucosa. *Am J Pathol* 139:1435-1448
- Schauer R (1982) Sialic acids: chemistry, metabolism, and function. In Schauer R, ed. *Cell Biology Monographs*. Vol 10. New York, Springer-Verlag, 7-67.
- Shibuya N, Goldstein IJ, Broekaert WF, Nsimba-Lubaki M, Peeters B, Peumans W (1987) The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(alpha 2-6)Gal/GalNAc sequence. *J Biol Chem* 262:1596-1601
- Slimane TA, Lenoir C, Sapin C, Maurice M, Trugnan G (2000) Apical secretion and sialylation of soluble dipeptidyl peptidase IV are two related events. *Exp Cell Res* 258:184-194
- Taatjes DJ, Roth J (1988) Alteration in sialyltransferase and sialic acid expression accompanies cell differentiation in rat intestine. *Eur J Cell Biol* 46:289-298
- Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P (1995) The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* 9:866-873
- Traving C, Schauer R (1998) Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cell Mol Life Sci* 54:1330-1349
- Tsuji S (1996) Molecular cloning and functional analysis of sialyltransferases. *J Biochem* 120:1-13
- Ulloa F, Franci C, Real FX (2000) GalNAc-alpha-O-benzyl inhibits sialylation of de novo synthesized apical but not basolateral sialoglycoproteins and blocks lysosomal enzyme processing in a post-TGN compartment. *J Biol Chem* 275:18785-18793
- Van Waes C, Kozarsky KF, Warren AB, Kidd L, Paugh D, Liebert M, Carey TE (1991) The A9 antigen associated with aggressive human squamous carcinoma is structurally and functionally similar to the newly defined integrin α 6/ β 4. *Cancer Res* 51:2395-2402
- Varki A (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 3:97-130
- Varki A (1997) Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *FASEB J* 11:248-255
- Velasco A, Hendricks L, Moremen KW, Tulsiani DR, Touster O, Farquhar MG (1993) Cell type-dependent variations in the subcellular distribution of alpha-mannosidase I and II. *J Cell Biol* 122:39-51
- Vilá MR, Lloreta J, Schussler MH, Berrozpe G, Welt S, Real FX (1995) New pancreas cancers cell lines that represent distinct stages of ductal differentiation. *Lab Invest* 72:395-404
- Wang WC, Cummings RD (1988) The immobilized leukoagglutinin from the seeds of *Maackia amurensis* binds with high affinity to complex-type Asn-linked oligosaccharides containing terminal sialic acid-linked alpha-2,3 to penultimate galactose residues. *J Biol Chem* 263:4576-4585
- Wesseling J, van der Valk SW, Vos HL, Sonnenberg A, Hilkens J (1995) Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. *J Cell Biol* 129:255-265
- Zanetta JP, Gouyer V, Maes E, Pons A, Hemon B, Zweibaum A, Delannoy P, Huet G (2000) Massive in vitro synthesis of tagged oligosaccharides in 1-benzyl-2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranoside treated HT-29 cells. *Glycobiology* 10:565-575

2. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON BENZIL GalNAc SOBRE CÉLULAS EPITELIALES EN CULTIVO

INTRODUCCIÓN

Hasta el momento de iniciar este estudio, los efectos del tratamiento crónico con benzil GalNAc habían sido estudiados con detalle en muy pocos tipos celulares. Ellos incluían fundamentalmente las células HT-29 y las subpoblaciones derivadas de ellas, y las células Caco-2 (Huet et al., 1998; Zweibaum y Lesuffleur; de Bolós y cols., resultados no publicados). A diferencia de lo descrito en células HT-29 M6, las células Caco-2 prácticamente no se veían afectadas por el tratamiento con benzil GalNAc incluso a concentraciones de hasta 10 mM (Huet et al., 1998; Zweibaum y Lesuffleur; de Bolós y cols., resultados no publicados). Las causas de estas diferencias eran desconocidas. La sensibilidad a este análogo de GalNAc no parecía estar relacionada con el fenotipo celular puesto que se observaban efectos similares sobre las células HT-29 parentales - con un fenotipo indiferenciado - y sobre poblaciones derivadas de ellas con un fenotipo mucosecretor o absorbivo (Huet et al., 1998; Zweibaum y Lesuffleur, resultados no publicados). Notoriamente, el benzil GalNAc inhibía la sialilación en células HT-29 pero no en las células Caco-2 (ver Introducción, sección 4.4). Sin embargo, no se podía descartar que los efectos observados en células HT-29 fuesen una particularidad de este tipo celular. Por lo tanto, era indispensable disponer de más información acerca del efecto benzil GalNAc sobre un amplio panel de células en cultivo.

Los resultados que se describen en esta sección responden al objetivo de describir los efectos del tratamiento crónico con benzil GalNAc en varios tipos celulares epiteliales. Nos hemos centrado en el análisis de los parámetros que el benzil GalNAc afecta en las células HT-29 M6, es decir: proliferación, morfología, acumulación de vesículas en el citoplasma, sialilación y distribución de glicoproteínas de membrana.

RESULTADOS

Efecto del benzil GalNAc sobre la proliferación y la morfología de células epiteliales

Proliferación. Para determinar si el tratamiento crónico con benzil GalNAc afectaba la proliferación celular, se llevó a cabo el recuento del número total de células en cultivos realizados en

ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM a diferentes días de cultivo. Las curvas de crecimiento resultantes están representadas en la figura 2.1.

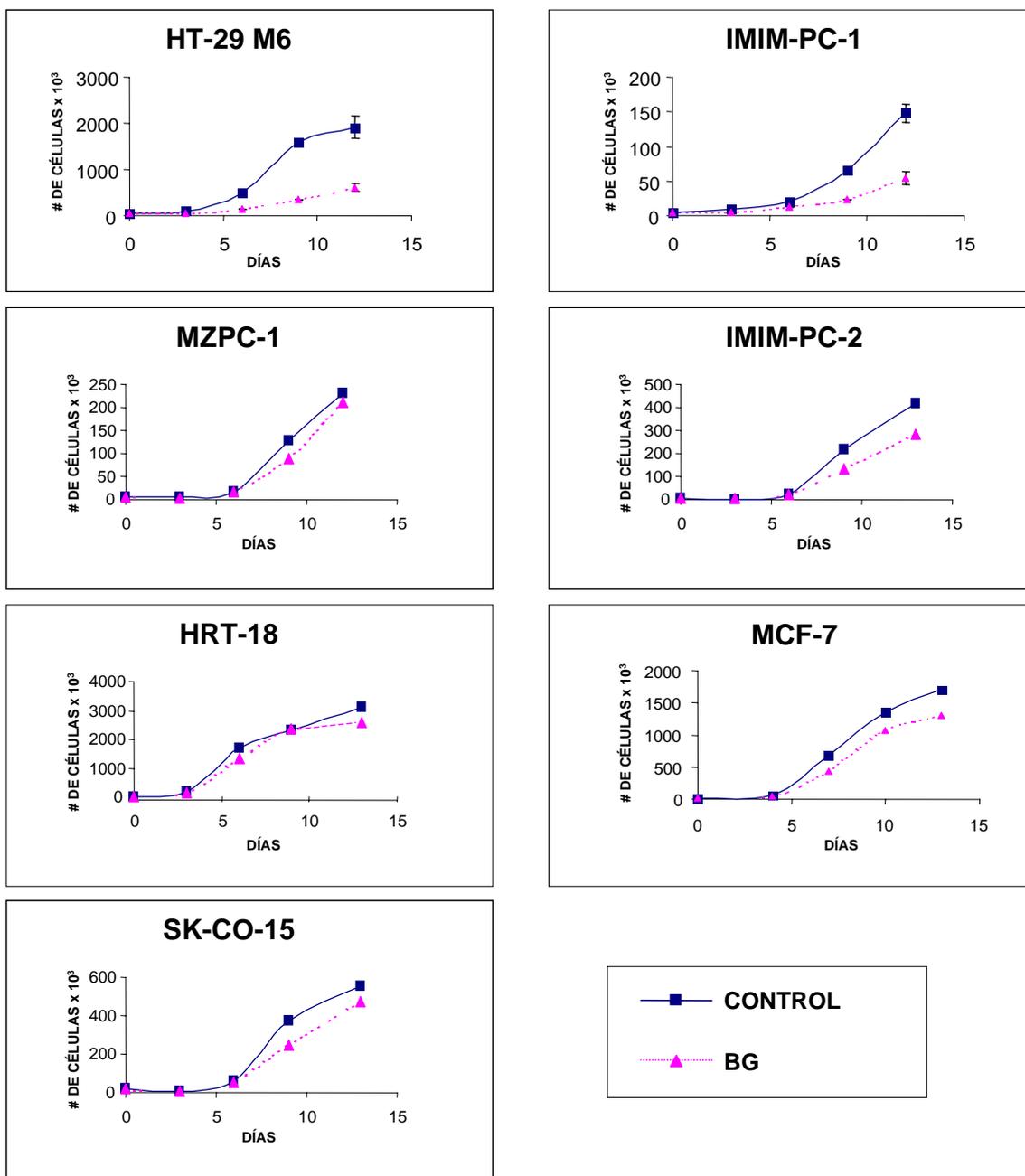


Figura 2.1 Efecto del tratamiento crónico con benzil GalNAc sobre la proliferación de células epiteliales en cultivo. Curvas de crecimiento de células epiteliales cultivadas en ausencia (control) o presencia de benzil GalNAc 2 mM (BG) (para detalles, ver anexo de Materiales y Métodos). El tratamiento reduce el crecimiento de las células IMIM-PC-1 de forma similar a lo observado en células HT-29 M6.

El tratamiento con benzil GalNAc inhibió la proliferación de células IMIM-PC-1, derivadas de un adenocarcinoma ductal del páncreas exocrino (Vilá et al., 1995), de una manera similar a la observada en células HT-29 M6. A diferencia de las células HT-29 M6, que nunca alcanzaban la confluencia en presencia del azúcar, las células IMIM-PC-1 tratadas alcanzaban la confluencia 2 - 4 días después de que lo hicieran las células control. El tratamiento con benzil GalNAc no afectó notoriamente al crecimiento del resto de células analizadas.

Morfología. Los efectos del benzil GalNAc sobre la morfología celular se analizaron por microscopía de contraste de fases, microscopía óptica de cortes semifinos y microscopía electrónica de cortes ultrafinos. Los efectos más notorios sobre la morfología celular se produjeron en las células IMIM-PC-1. Éstos eran fácilmente distinguibles entre los 7 - 9 días de cultivo, edad a la que las células control alcanzaban la confluencia, y eran menos dramáticos en las células postconfluyentes (figura 2.2). Las células IMIM-PC-1 constituyen una población heterogénea de células epiteliales con un grado variable de diferenciación: cuando alcanzan la confluencia, la mayoría de células se disponen regularmente en forma de adoquinado, observándose numerosas células relativamente "altas" y una población minoritaria de células aplanadas (Vilá et al., 1995). A los 7 - 9 días, el tratamiento con benzil GalNAc indujo un predominio de células con aspecto aplanado que mostraban prolongaciones celulares que no estaban presentes en las células control. También se advirtió en muchas células la presencia de quistes intracelulares, los cuales también podían detectarse – aunque en menor número y tamaño - en células no tratadas (figura 2.2). Al igual que las células HT-29, las células IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc eran mayores que las células control. Este efecto se ponía de manifiesto más claramente al analizar suspensiones unicelulares tras la tripsinización (figura 2.2 recuadro). El aspecto de la monocapa postconfluyente de células IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc era similar al de las células control. Ambas desarrollaban domos esporádicos similares en tamaño y número. Sin embargo, en algunas células tratadas con benzil GalNAc, los quistes intracelulares podían observarse incluso a los 15 días de cultivo.

La morfología de la mayoría de las células MZPC-1 cultivadas en la presencia de benzil GalNAc no sufrió cambios drásticos con respecto a las células no tratadas (figura 2.2); sin embargo, en los cultivos tratados con benzil GalNAc algunas células presentaban numerosas prolongaciones celulares que no se detectaban en los cultivos control.

Las células HRT-18 tratadas con benzil GalNAc presentaban un aspecto similar al de las células control, si bien en las primeras se observaban numerosos quistes extracelulares (figura 2.2). La morfología de los cultivos del resto de las células analizadas no varió mayormente por el tratamiento con benzil GalNAc (figura 2.2).

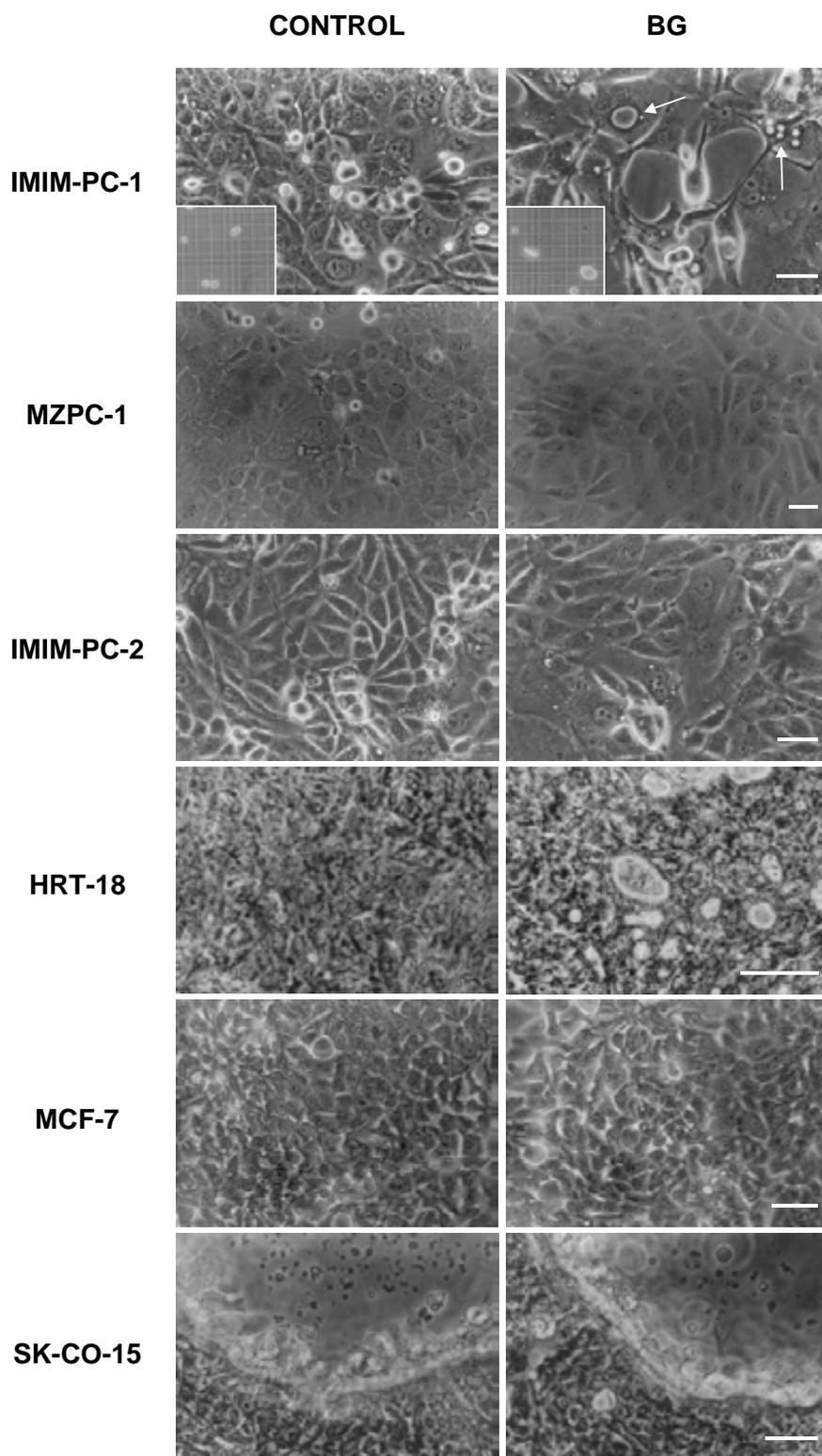


Figura 2.2 Morfología de células epiteliales tratadas con benzil GalNAc. Imágenes de contraste de fases de células epiteliales cultivadas durante 9 días en ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM. El tratamiento con benzil GalNAc produce cambios morfológicos dramáticos en las células IMIM-PC-1, entre los que se incluyen el aumento del tamaño celular (recuadro: comparación de suspensiones unicelulares de células tripsinizadas) y la formación de grandes quistes intracelulares (flechas) (para detalles, ver texto). Barra de escala: 50 μ m.

Aspecto ultraestructural. El análisis de cortes semifinos (figura 2.3A) y ultrafinos de células cultivadas durante 15 días en la ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM reveló que, al igual que se ha descrito para células HT-29, el tratamiento con benzil GalNAc inducía una severa acumulación de vesículas, de frecuentemente 0,8 - 1,6 μm de diámetro, en el citoplasma de células IMIM-PC-1 y, más moderadamente, en el de células MZPC-1. Por el contrario, esta acumulación no fue aparente en el resto de células estudiadas. El análisis ultraestructural de los cultivos IMIM-PC-1 mostró en las células control una cierta heterogeneidad: la mayoría de ellas contenían un moderado número de vacuolas electrón-lúcidas de 0,4 - 1 μm de diámetro en el citoplasma, que no eran evidentes en el resto de la población (figura 2.3B). En algunas de ellas se observaba la presencia de material electrón-denso. Las células MZPC-1 tratadas con benzil GalNAc también presentaban vesículas citoplasmáticas cuyo aspecto ultraestructural era similar al de las células IMIM-PC-1 cultivadas en la presencia de benzil GalNAc (dato no mostrado).

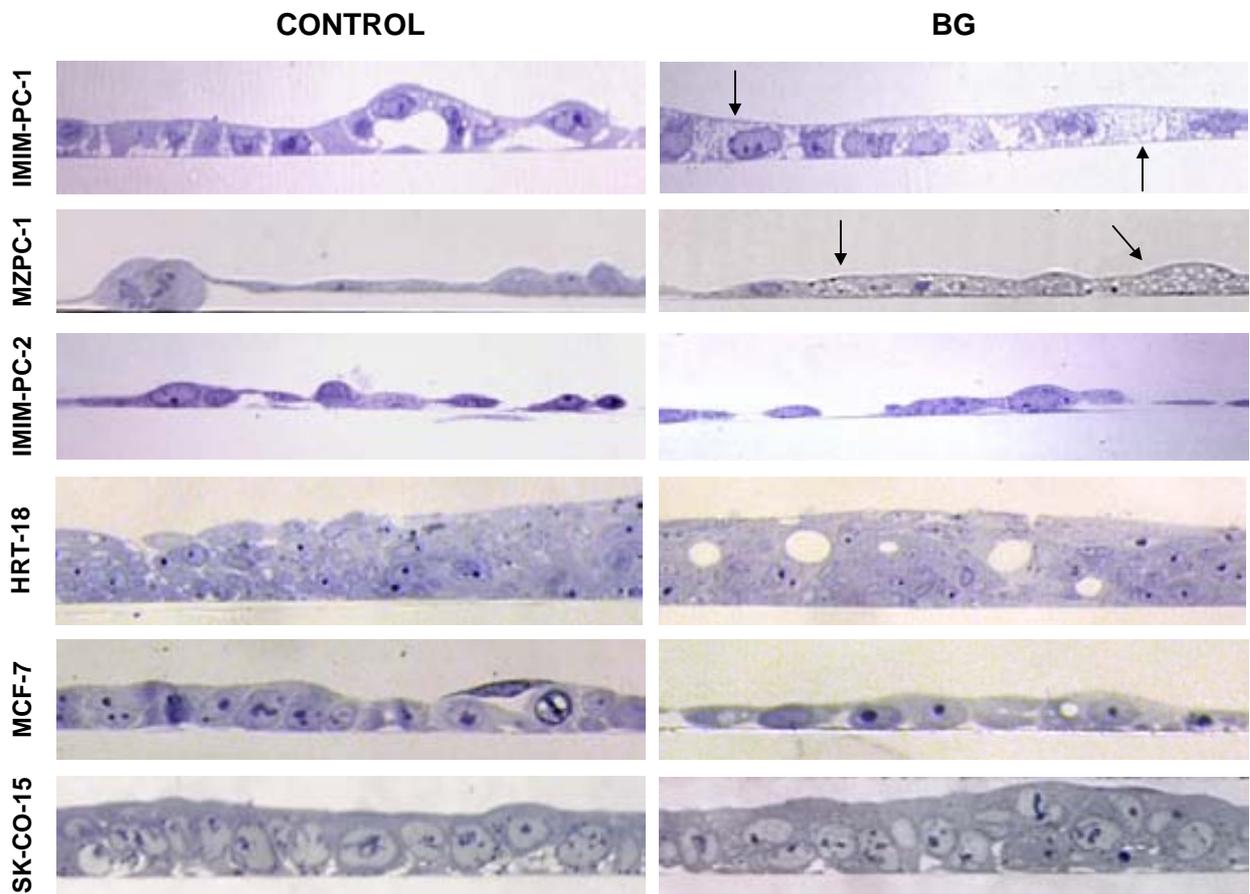
En los cortes semifinos de cultivos de células IMIM-PC-2 y MCF-7 tratadas con benzil GalNAc no se observaron diferencias apreciables con respecto a los de células control. Sin embargo, el análisis por microscopía electrónica reveló la presencia de un reducido número de pequeñas vesículas citoplasmáticas (0,1 - 0,3 μm de diámetro) en ambos tipos celulares. Los cortes semifinos de las células HRT-18 mostraron que éstas forman en postconfluencia una multicapa de células, tal y como había sido previamente descrito (Tompkins et al., 1974; Chantret et al., 1987); las células HRT-18 tratadas con benzil GalNAc mostraron una apariencia y disposición similares a las de las células control con la salvedad de que desarrollaban numerosos quistes extracelulares, confirmando las observaciones realizadas con microscopía de contraste de fases. En cortes ultrafinos de células HRT-18 tratadas con benzil GalNAc, a diferencia de las células control, se observó la presencia de pequeñas vesículas que se alineaban por debajo de la membrana que limita los quistes (dato no mostrado).

Efecto del tratamiento con benzil GalNAc sobre la sialilación en células epiteliales

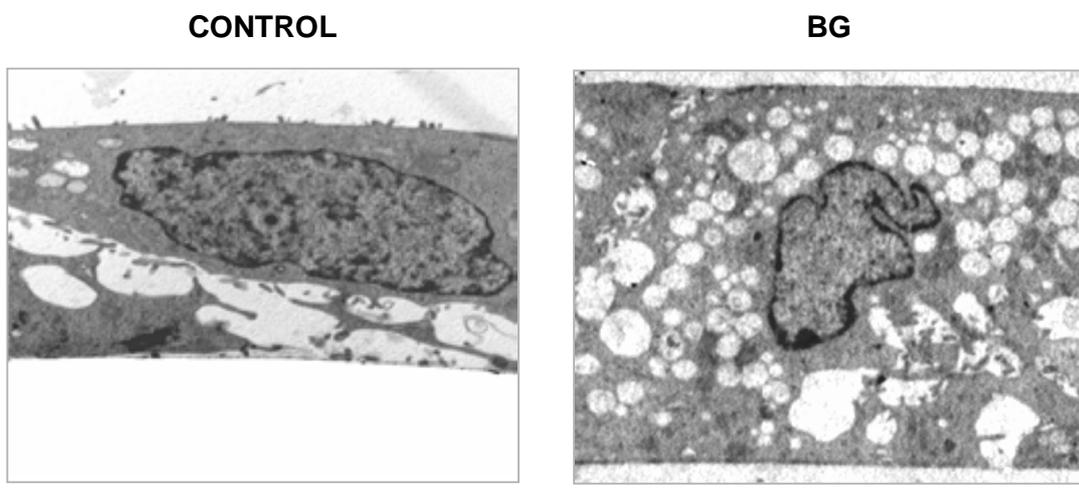
El panel de células analizado había sido seleccionado sobre la base de la diversidad de la expresión de ácido siálico en posición α 2,3 y α 2,6. Esto se hizo debido a que las observaciones preliminares indicaban que el benzil GalNAc tenía importantes efectos sobre células HT-29 M6, que expresan predominantemente ácido siálico en α 2,3 y reaccionan fundamentalmente con la lectina MAL, y tenía poco efecto sobre las células Caco-2, que expresan primordialmente ácido siálico en α 2,6 y reaccionan fuertemente con la lectina SNA (Huet et al., 1998).

Para determinar cómo afectaba el tratamiento con benzil GalNAc a la sialilación, se analizó la reactividad de las lectinas MAL, SNA y PNA con células cultivadas 15 días en presencia o ausencia del benzil GalNAc utilizando fluorescencia y *blotting* (para descripción de la especificidad de las lectinas ver anexo de Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos por fluorescencia (tabla 2.1) y *blotting* (figura 2.4A) fueron, en general, concordantes.

A



B



Las células cuyas glicoproteínas contenían predominantemente ácido siálico en posición α 2,3 fueron HT-29 M6, IMIM-PC-1, MCF-7 y HRT-18. Las células cuyas glicoproteínas estaban sialiladas tanto en α 2,6 como α 2,3 fueron MZPC-1, IMIM-PC-2 y SK-CO-15. La cantidad relativa de la sialilación en α 2,3, con respecto a la de α 2,6, que se detectó en células MZPC-1 e IMIM-PC-2, fue menor por *blotting* que por fluorescencia. Finalmente, las glicoproteínas de las células Caco-2 mostraron una fuerte reactividad a SNA, lo que concuerda con descripciones previas (Huet et al., 1998). Sin embargo, a pesar de que se considera que las células Caco-2 sialilan fundamentalmente sus glicoproteínas en α 2,6, en nuestros ensayos de *blotting* se detectaron niveles considerables de sialilación en α 2,3 en estas células (figura 2.4A).

El tratamiento con benzil GalNAc tuvo importantes efectos sobre la sialilación en todas las células excepto en HRT-18 y en MCF-7. La tabla 2.1 muestra un resumen de los principales hallazgos obtenidos por fluorescencia. El principal efecto observado fue una reducción de la reactividad a MAL - lo que indica una reducción de la sialilación en α 2,3 - acompañado de un aumento en la reactividad a SNA y a PNA, indicativos de un aumento de la sialilación en α 2,6 y una reducción de la glicosilación terminal ligada al antígeno T, respectivamente (figura 2.4A; datos de *blotting* con PNA no mostrados). Todas las líneas, a excepción de las células MCF-7 y, más moderadamente, las HRT-18, mostraban niveles reducidos de su contenido de α 2,3 ácido siálico al ser tratadas con benzil GalNAc. En algunas células, el tratamiento indujo un aumento de la sialilación en α 2,6: HT-29 M6, IMIM-PC-1, MZPC-1, IMIM-PC-2 y SK-CO-15. El tratamiento con benzil GalNAc indujo un importante aumento de la reactividad a PNA en todas las células analizadas excepto en las MCF-7. En la figura 2.4B se puede apreciar la reactividad a las lectinas MAL, SNA y PNA, analizadas por fluorescencia, de las células IMIM-PC-1, las cuales representan el paradigma de células cuya reactividad a lectinas fue drásticamente alterada por el tratamiento con benzil GalNAc, y de las células MCF-7, las cuales constituyen un ejemplo de células cuya reactividad a lectinas casi no fue modificada por el tratamiento con benzil GalNAc.

El conjunto de estos hallazgos indica que el principal efecto del benzil GalNAc es una disminución de la sialilación en α 2,3 y que los cambios en la glicosilación son dependientes del tipo celular.

Figura 2.3 Acumulación de vesículas en el citoplasma de células epiteliales inducida por el tratamiento con benzil GalNAc. *Panel A.* Cortes semifinos de cultivos de células tratadas durante 15 días en ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM, teñidos con azul de toluidina y analizados por microscopía óptica. El tratamiento induce la acumulación de vesículas en el citoplasma de las células IMIM-PC-1 y MZPC-1 (flechas). *Panel B.* Imágenes de microscopía electrónica de células IMIM-PC-1 cultivadas durante 15 días en ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM. Se aprecia claramente la acumulación de vesículas en el citoplasma de las células tratadas (para detalles, ver texto). Barra de escala: 2 μ m.

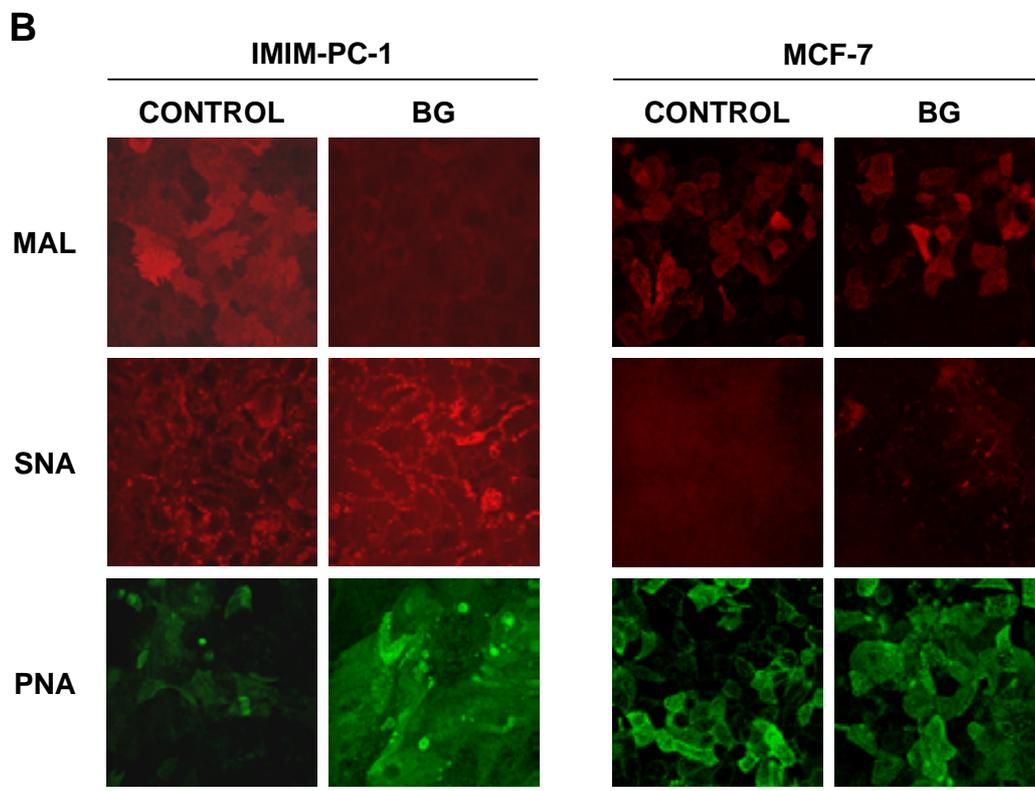
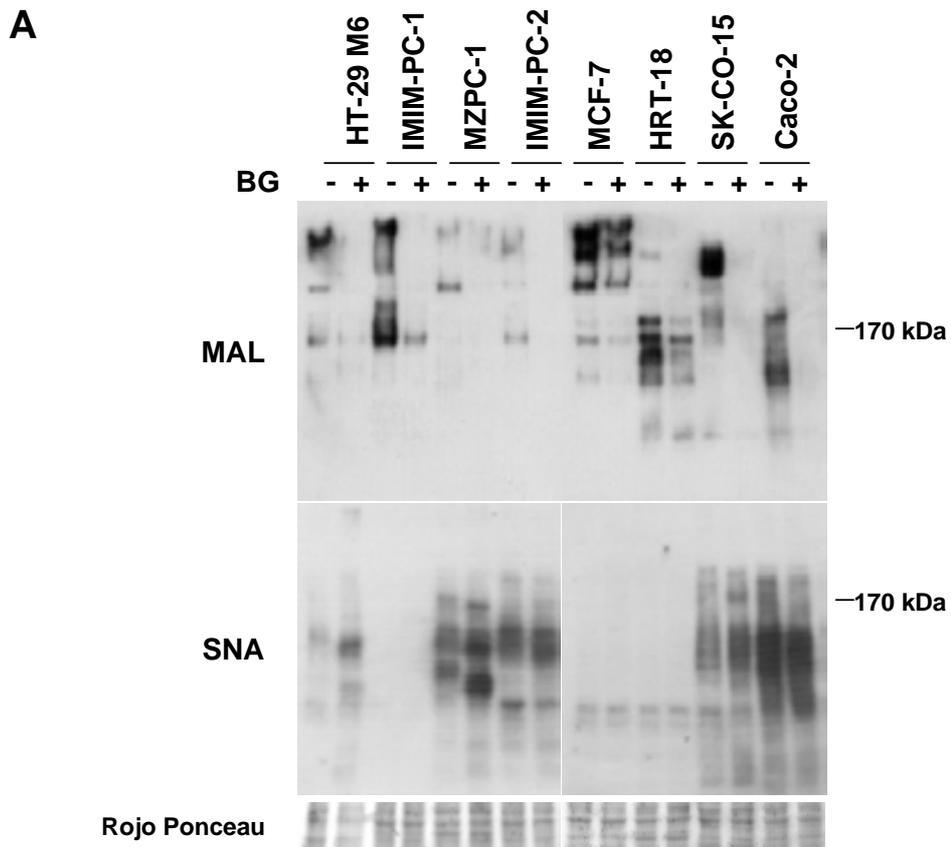


Tabla 2.1 Efecto del benzil GalNAc sobre la reactividad de células epiteliales a lectinas

<u>Línea Celular</u>	<u>LECTINAS</u>						
	<u>MAL</u>		<u>SNA</u>		<u>PNA</u>		
	<i>Control</i>	<i>Benzil GalNAc</i>	<i>Control</i>	<i>Benzil GalNAc</i>	<i>Control</i>	<i>Benzil GalNAc</i>	
HT-29 M6	+++	-	+	(h) +/++	+	(30% +++)	+++
IMIM-PC-1	(h) ++/+++	-	(h) -/+	++	+	(5% +++)	+++
MZPC-1	(h) +/++	+	+++	(v) 60 %+++ (20% + 10% -)	70% - (30% ++/+++)		+++
IMIM-PC-2	(h) +/++	+	(h) +/++	(v) +++	+		+++
MCF-7	+	(h) -/+	++	+	+++		+++
	(10% +++)	(2% +++)					
HRT-18	++	+	(h) +/++	(h) +/+++	+		++
		(5% ++)					

Análisis de fluorescencia realizados con lectinas sobre células cultivadas sobre cubreobjetos 15 días en la ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM. Cuando no se menciona lo contrario, la señal corresponde a, al menos, el 90% de las células. Se ha considerado la señal como negativa cuando no se podía distinguir una señal discernible del fondo a 400 X. Entre paréntesis se indica la señal de una minoría de células que a nuestro criterio es digna de remarcar.

Simbología:

+: Señal débil. Observable solo a 400 X
 ++: Señal moderada. Observable a ≥ 200 X
 +++: Señal fuerte: Observable a ≥ 100 X

(h): Distribución heterogénea de la señal en la población celular.

(v): Resultados de la reactividad variables en diferentes experimentos. Se describe el más frecuente

Figura 2.4 Efecto del tratamiento con benzil GalNAc sobre la reactividad de lectinas que detectan ácido siálico. *Panel A.* Lectin blot realizado con 25 μ g proteína total proveniente de células cultivadas 15 días en ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM. Los extractos de proteínas fueron fraccionados por electroforesis en un gel del poliacrilamida-SDS del 6%, transferidos a una membrana de nitrocelulosa e incubados con lectinas que detectan ácido siálico ligado en posición α 2,3 (MAL) o α 2,6 (SNA). Durante la transferencia se conservó el gel concentrador para visualizar la reactividad de proteínas de alto peso molecular.

Panel B. Fluorescencia de células IMIM-PC-1 y MCF-7 cultivadas durante 15 días en ausencia o presencia de benzil GalNAc 2mM. Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos, fijadas con PFA al 4%, permeabilizadas con saponina al 0,1% en PBS - BSA 1% e incubadas con las lectinas indicadas (para detalles, ver anexo de Materiales y Métodos). La lectina PNA detecta el epítipo GalGalNAc-R, el cual queda expuesto en ausencia de ácido siálico en algunas glicoproteínas. IMIM-PC-1 y MCF-7 representan los paradigmas de células en las que el tratamiento con benzil GalNAc altera drásticamente o no, respectivamente, la reactividad de lectinas (para más detalles, ver texto). Barra de escala: 50 μ m.

El tratamiento con benzil GalNAc induce en células IMIM-PC-1 la acumulación en el citoplasma de glicoproteínas de membrana

Los resultados descritos anteriormente indican que el benzil GalNAc indujo en las células IMIM-PC-1 un conjunto de efectos similares a los observados en células HT-29 M6: *i*) disminución de la proliferación, *ii*) aumento del tamaño celular, *iii*) acumulación de vesículas electrón-lúcidas en el citoplasma y *iv*) reducción de la sialilación en α 2,3. Debido a esto, decidimos determinar si, en estas células, el benzil GalNAc también modificaba la distribución de glicoproteínas de la membrana plasmática. Para ello, analizamos por microscopía confocal la distribución de una glicoproteína apical, MUC1, y una glicoproteína basolateral, β 1 integrina (figura 2.5). En células control, a los 4 días de cultivo, MUC1 se detectaba fundamentalmente al nivel de la membrana plasmática y el citoplasma o, exclusivamente en el citoplasma, de la mayoría de las células. Notoriamente, en alrededor del 5 - 10% de las células, se localizaba en quistes intracelulares (frecuentemente de 2,5 - 6 μ m de diámetro; 1 - 3 quistes por célula), los cuales mostraban una reactividad considerable. A los 7 - 9 días, se localizaba en el dominio apical de alrededor de un 50% de las células, mientras que en el resto se hallaba en el citoplasma – casi no se detectaban quistes - o en la membrana apical y el citoplasma. A los 11 y a los 15 días, MUC1 se detectaba predominantemente en la membrana apical, aunque era posible detectar esporádicamente células no polarizadas con una señal citoplasmática de MUC1. El tratamiento con benzil GalNAc indujo una acumulación parcial de MUC1 en el citoplasma. Al día 4, el número de células con quistes intracelulares positivos para MUC1 era mayor que el de las células control (alrededor del 30 – 40% de células; 1 – 10 quistes por célula; frecuentemente 6 - 15 μ m de diámetro). A los 7 - 9 días, MUC1 se localizaba fundamentalmente en el citoplasma de un 50% de células, incluyendo quistes intracelulares, aunque también era posible detectarla exclusivamente en la membrana apical o en la membrana apical y el citoplasma. La señal de MUC1 era muy intensa en los quistes. A los 15 días de cultivo, la mayoría de las células tratadas con benzil GalNAc mostraban MUC1 localizado en el dominio apical aunque un 30% de células mostraba también una distribución citoplasmática de MUC1 (figura 2.5A). En algunas células tratadas con benzil GalNAc, MUC1 se localizaba exclusivamente en citoplasma.

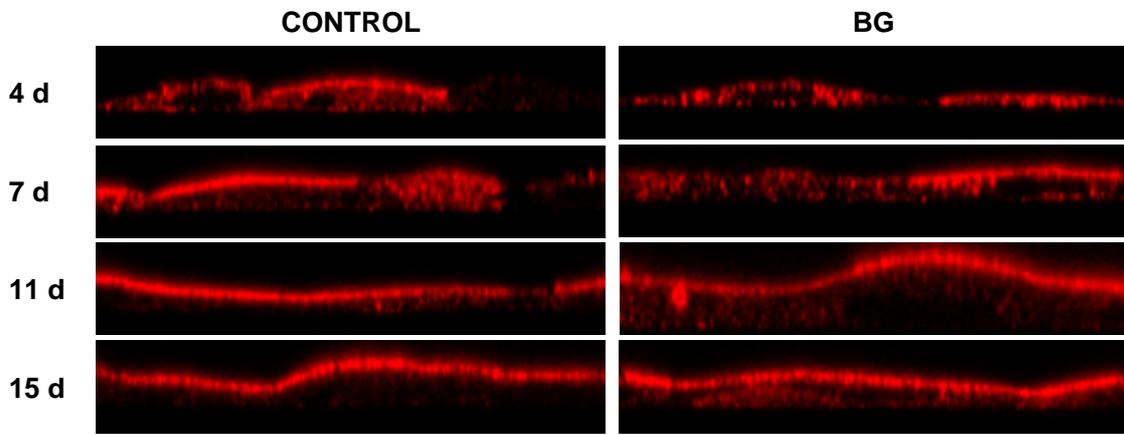
La distribución de la β 1 integrina en células IMIM-PC-1 control cultivadas durante 7 - 9 días era fundamentalmente de membrana, con una leve señal citoplasmática en la mayoría de las células; a los 15 días de cultivo, la β 1 integrina se localizaba casi exclusivamente en la membrana basolateral. Sorprendentemente, a los 7 - 9 días de tratamiento con benzil GalNAc se observaba una severa acumulación de β 1 integrina en el citoplasma en casi la totalidad de las células. Al igual que MUC1, la β 1 integrina también podía localizarse en algunos quistes intracelulares. A los 15 días, y contrariamente a lo observado para MUC1, no se detectaron mayores diferencias entre la distribución de β 1 integrina en las células control y en las tratadas con benzil GalNAc (figura 2.5C y D). Sin embargo, esporádicamente en algunas células era posible detectar la proteína en quistes o en pequeñas vesículas citoplasmáticas. El tratamiento con benzil GalNAc indujo cambios similares en la distribución de otras dos proteínas basolaterales analizadas, gp525 y E-cadherina (figura 2.6).

Notoriamente, la acumulación de E-cadherina era aparente incluso a los 15 días de cultivo, aunque ésta era menos dramática que a los 8 días.

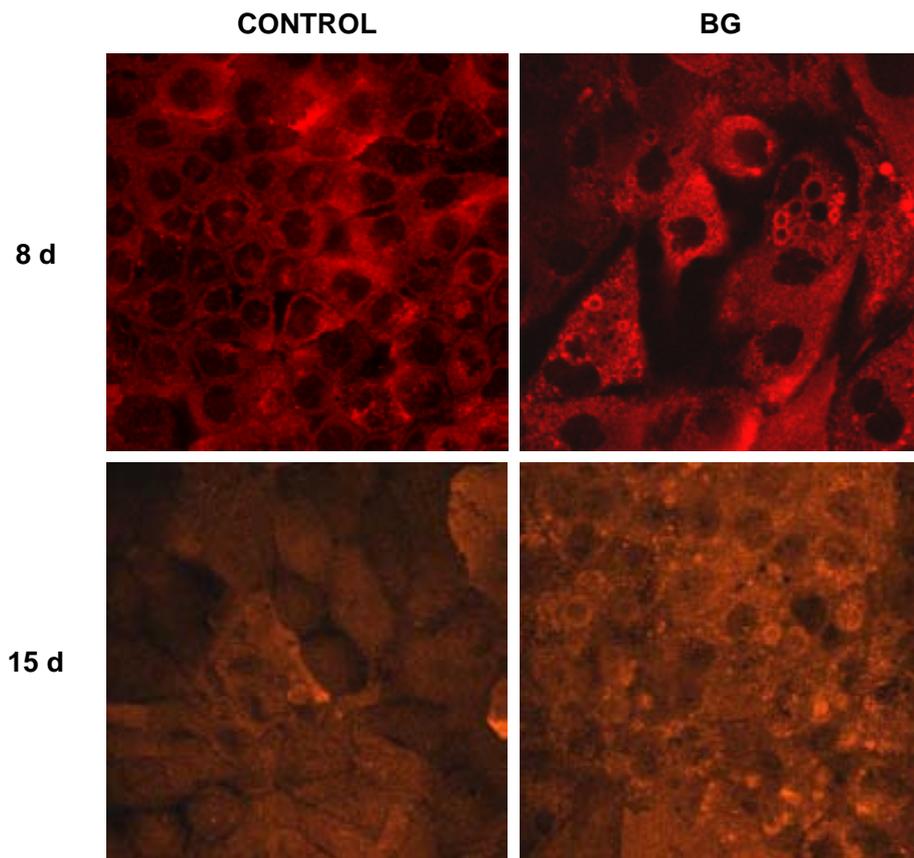
Experimentos de doble inmunofluorescencia para localizar MUC1 y β 1 integrina en células IMIM-PC-1 cultivadas en la presencia de benzil GalNAc durante 8 días, analizados por microscopía confocal, indicaron que en aquellas células donde MUC1 se acumulaba en el citoplasma, un $42,97 \pm 13,84$ % de esta glicoproteína colocalizaba con β 1 integrina (figura 2.7), tanto en las vesículas como en los quistes. En algunas células, sin embargo, se podían detectar quistes positivos solo para MUC1 o para β 1 integrina. Para confirmar si las glicoproteínas de membrana se acumulaban en las vesículas citoplasmáticas inducidas por el tratamiento con benzil GalNAc, se analizó la distribución de la β 1 integrina por inmunomicroscopía electrónica en células IMIM-PC-1 cultivadas durante 8 días en presencia o ausencia de benzil GalNAc 2 mM. En células tratadas, la β 1 integrina se localizaba tanto en la membrana celular como en las vesículas citoplasmáticas (figura 2.8).

Estos resultados indican que el tratamiento de células IMIM-PC-1 con benzil GalNAc no solo afecta la distribución de una glicoproteína apical sino que también afecta la distribución de glicoproteínas basolaterales, que ambos tipos de moléculas muestran una colocalización parcial en las vesículas citoplásmicas y que las células se "adaptan" a los efectos del azúcar, normalizándose en parte la distribución a tiempos más largos de cultivo.

A



B



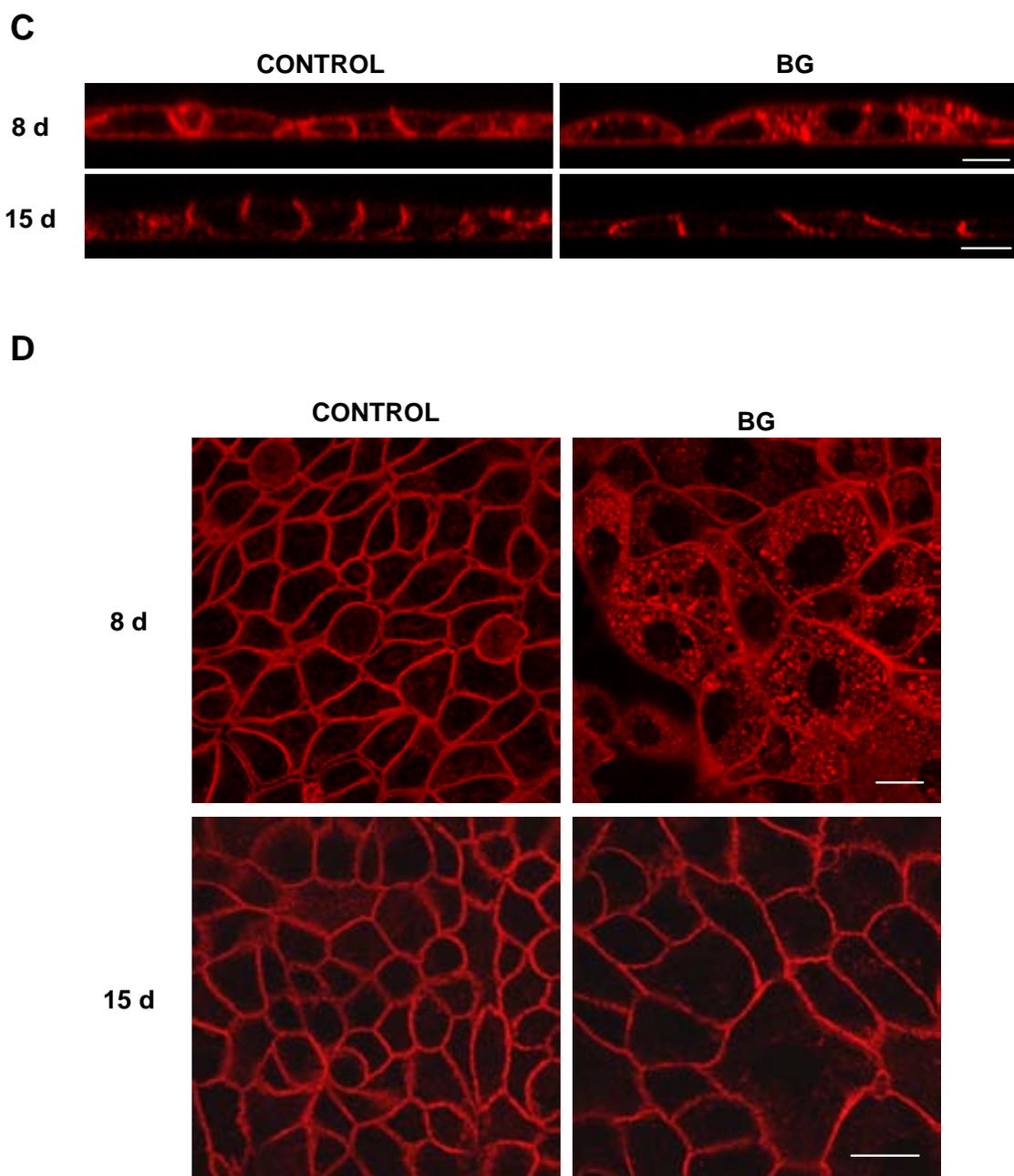


Figura 2.5 Distribución de MUC1 y $\beta 1$ integrina en células IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc. Secciones verticales (A, C) y horizontales (B, D) obtenidas por microscopía confocal de células IMIM-PC-1 cultivadas durante los días indicados en ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM. Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos, fijadas con PFA al 4%, permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,5% en PBS-BSA 1% e incubadas con un anticuerpo anti-MUC1 (M8) (A,B) o anti- $\beta 1$ integrina (TS2/16) (C,D). En las secciones verticales se ha evitado mostrar los quistes para facilitar la visualización del material acumulado en el citoplasma de las células tratadas. Barra de escala: A y C: 10 μ m; B y D: 20 μ m.

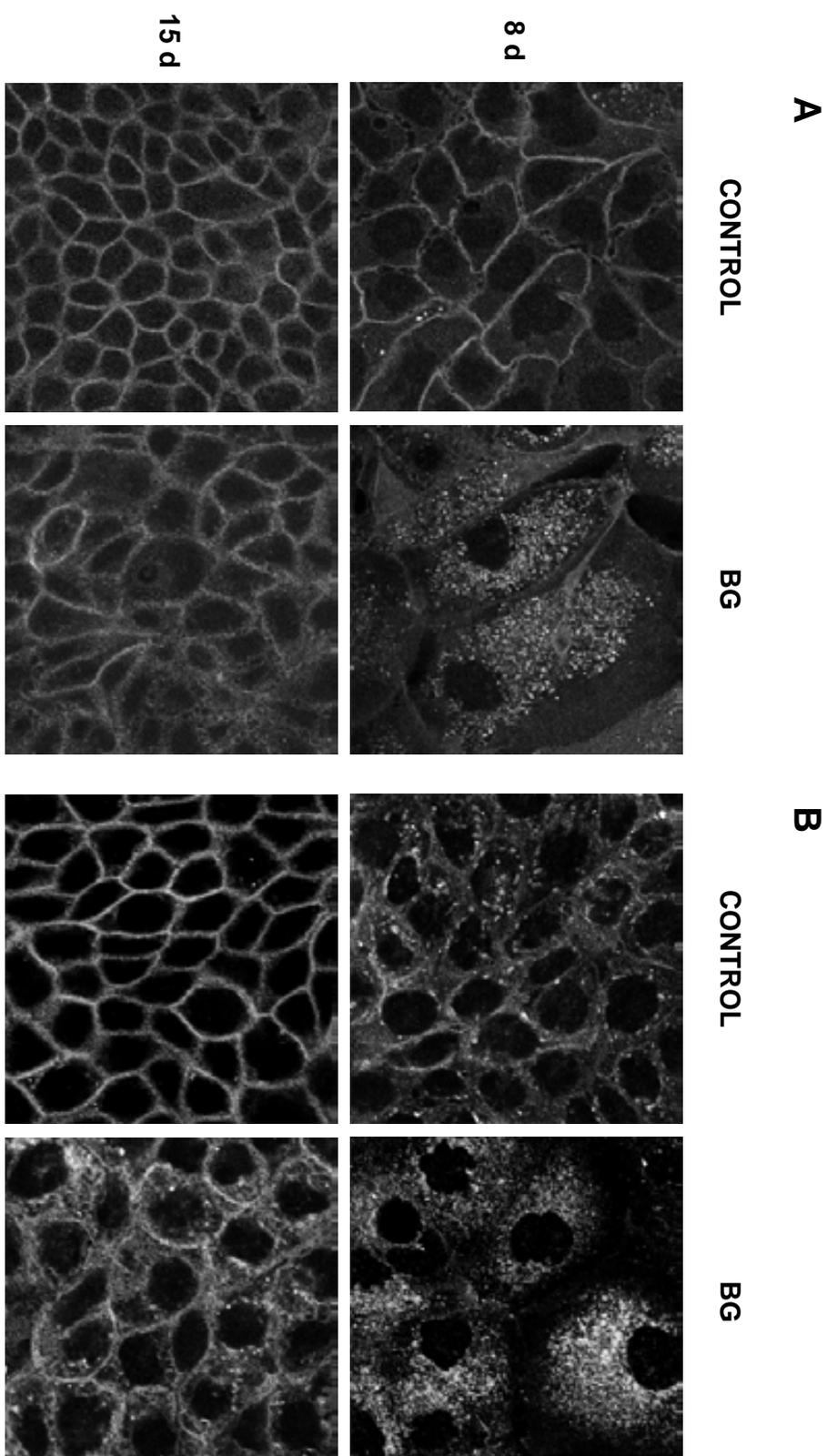


Figura 2.6 Distribución de las glicoproteínas basolaterales gp525 y E-cadherina en células IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc. Secciones horizontales obtenidas por microscopía confocal de células IMIM-PC-1 cultivadas durante los días indicados en ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM. Las células fueron procesadas según se describe en la leyenda de la figura 2.5 e incubadas con un anticuerpo anti-gp525 (A) o anti-E-cadherina (clon 36) (B) (para detalles, ver anexo de Materiales y Métodos). Barra de escala: 20 µm.

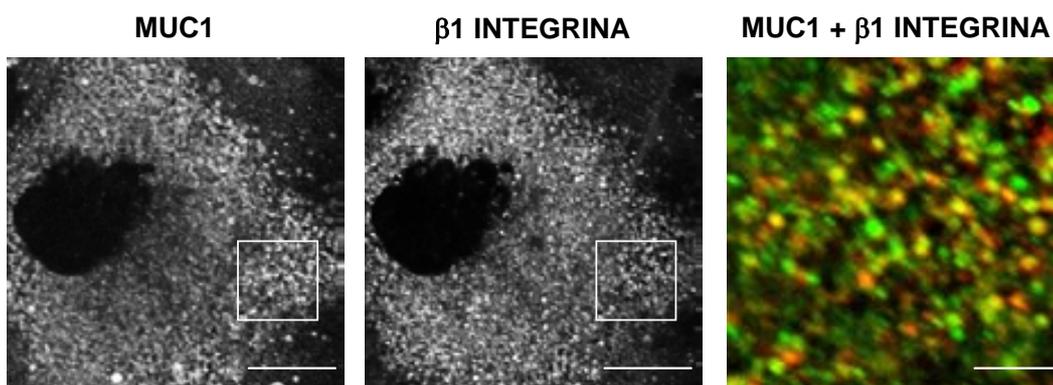


Figura 2.7 Colocalización de MUC1 y $\beta 1$ integrina en células IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc. Secciones horizontales obtenidas por microscopía confocal de células IMIM-PC-1 cultivadas durante 8 días en presencia de benzil GalNAc 2 mM. Las células fueron procesadas como se describe en la leyenda de la figura 2.5 e incubadas con los anticuerpos anti-MUC1 (M8) y anti- $\beta 1$ integrina (T2S/16) de manera secuencial (para más detalles, ver anexo de Materiales y Métodos). Para los análisis de colocalización se eligieron las células que acumulaban MUC1. Nótese la colocalización parcial de MUC1 (rojo) y $\beta 1$ integrina (verde) en estas células (imagen derecha). Barra de escala: 25 μm (imágenes izquierda y central) y 5 μm (imagen derecha).

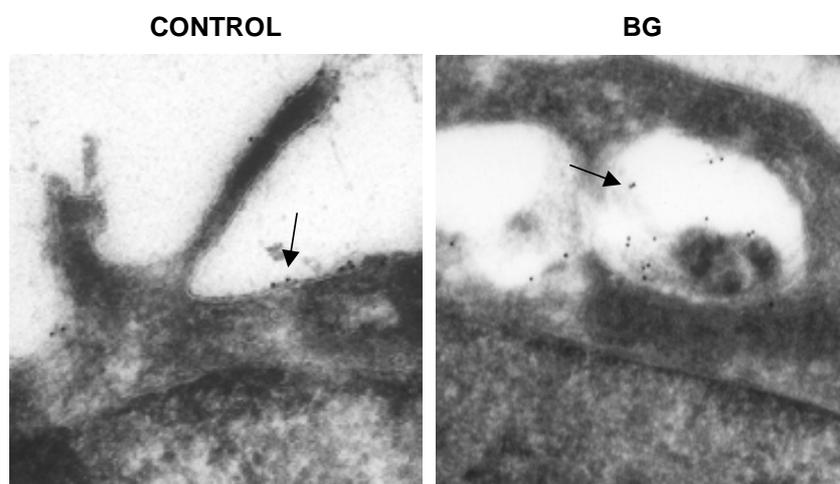


Figura 2.8 Localización de $\beta 1$ integrina en las vesículas citoplasmáticas que se acumulan en células IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc. Inmunomicroscopía electrónica de secciones provenientes de células IMIM-PC-1 cultivadas durante 8 días en ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM. Las monocapas celulares fueron raspadas de las placas de cultivo y luego sedimentadas por centrifugación. Los botones resultantes fueron embebidos en sucrosa y congelados en nitrógeno líquido. Ultra-criosecciones de estas células fueron incubadas con un anticuerpo que detecta $\beta 1$ integrina (T2S/16) y reveladas con un anticuerpo secundario marcado con partículas de oro coloidal. En las células tratadas con benzil GalNAc, esta glicoproteína se localiza en las vesículas citoplasmáticas (flechas), mientras que en las células control se localiza al nivel de la membrana plasmática.

Expresión de ST3Gal I y ST6Gal I en líneas celulares

Los datos disponibles sobre la sialilación de las glicoproteínas en células HT-29 y Caco-2, así como el análisis de los niveles de expresión de los transcritos de sialiltransferasas y de las correspondientes actividades enzimáticas, sugieren una relación entre éstos y la sensibilidad al benzil GalNAc. Mientras que en células HT-29 M6 la sialiltransferasa mayoritaria es la ST3Gal I, en células Caco-2 lo era la ST6Gal I. Sobre la base de estas observaciones, se determinó, mediante *northern blot*, el patrón de expresión de ST3Gal I y ST6Gal I en las células estudiadas. Para este análisis se usó RNA total proveniente de células cultivadas en la ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM hasta 10 días después de que las células control alcanzaran la confluencia (figura 2.9). Las células HT-29 M6, IMIM-PC-1 y MZPC-1 mostraban niveles relativamente más altos de transcritos de ST3Gal I que de ST6Gal I. Los niveles de los transcritos de ambas sialiltransferasas eran relativamente altos en células IMIM-PC-2 y relativamente bajos en MCF-7 y HRT-18. Las células SK-CO-15 y Caco-2 mostraban mayor expresión de transcritos de ST6Gal I que de ST3Gal I.

El tratamiento con benzil GalNAc indujo un aumento en la cantidad de transcritos de ST3Gal I en células HT-29 M6, tal y como había sido descrito previamente (Huet et al., 1998; Hennebicq-Reig et al., 1998), y en MZPC-1. La expresión de transcritos de ST3Gal I no se modificó por el tratamiento con benzil GalNAc en el resto de células analizadas, a excepción de las células IMIM-PC-2, las cuales mostraban una disminución de los transcritos de ST3Gal I en presencia de benzil GalNAc. Los niveles de transcritos de ST6Gal I no se modificaron de forma sustancial por el tratamiento con benzil GalNAc.

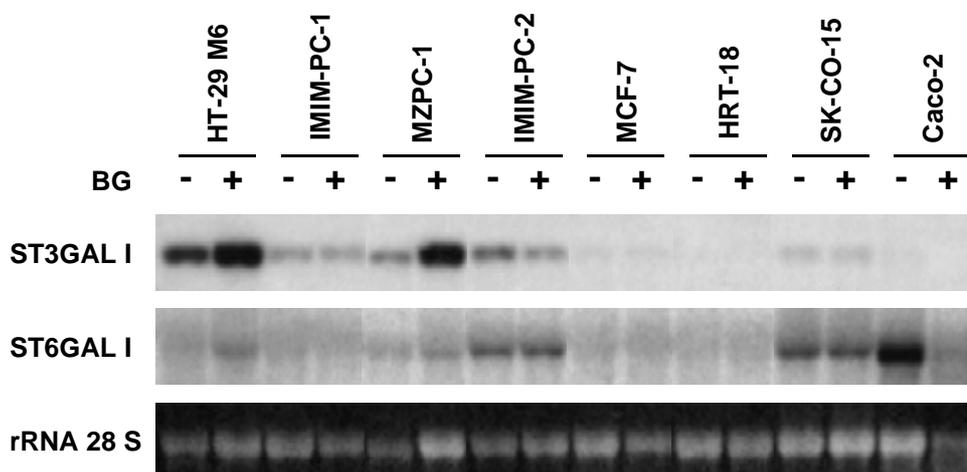


Figura 2.9 Expresión de ST3Gal I y ST6Gal I en líneas celulares epiteliales. *Northern blot* realizado con 12 µg de RNA total procedente de células epiteliales cultivadas en ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM hasta 10 días después de que las células control alcanzaran la confluencia (para detalles, ver anexo de Materiales y Métodos).

Dado que existen diversos enzimas capaces de llevar a cabo la sialilación de glicoproteínas, se determinó la actividad α 2,3 sialiltransferasa en extractos de células representativas de los efectos observados, utilizando como aceptor benzil GalNAcGal. Se determinó la actividad a partir de lisados de células control o de células tratadas con benzil GalNAc hasta 10 días después de que las células control alcanzaran la confluencia. Como control se midió la actividad de extractos de células HT-29 M6; ésta fue de $11,06 \pm 4,61$ nmoles/mg/h, lo que concuerda con los datos previamente descritos (Huet et al., 1995; Delannoy et al., 1996). Las actividades obtenidas figuran en la tabla 2.2.

Tabla 2.2 Actividad α 2,3 sialiltransferasa de líneas celulares epiteliales sobre el aceptor benzil GalNAc-Gal

Línea Celular ⁽¹⁾	Actividad (nmoles/mg/h)		Actividad (nmoles/mg/h) en ausencia de aceptor exógeno	
	Control	Benzil GalNAc	Control	Benzil GalNAc
IMIM-PC-1	$0,53 \pm 0,16$	$0,53 \pm 0,09$	0,05	0,24
IMIM-PC-2	$0,31 \pm 0,22$	$0,10 \pm 0,06$	0,04	0,29
MCF-7	$0,51 \pm 0,08$	$0,73 \pm 0,09$	0,07	0,08
SK-CO-15	$2,03 \pm 0,49$	$8,55 \pm 1,67$	0,06	0,43

(1) Las actividades fueron medidas en extractos celulares procedentes de células cultivadas en ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM hasta 10 días después de que las células control alcanzaran la confluencia.

Todas las células analizadas mostraron cierta actividad α 2,3 sialiltransferasa sobre el aceptor benzil GalNAc-Gal. Sin embargo, esta actividad no correlacionaba necesariamente con la cantidad de transcritos de ST3Gal I ni con la señal de MAL detectada. Por ejemplo, mientras que las células HT-29 M6 tienen una actividad aproximadamente 20 veces superior a la de IMIM-PC-1, su reactividad a MAL determinada por *blotting* es similar. A pesar de que las células MCF-7 y las SK-CO-15 expresan bajos niveles de transcritos de ST3Gal I, ambas muestran una actividad considerable, en especial las SK-CO-15, lo que sugiere que en estas células se expresan otras α 2,3 sialiltransferasas diferentes a ST3Gal I que son las responsables de esta actividad. En células HT-29 tratadas con benzil GalNAc se ha descrito que la actividad Neu5Ac α 2,3GalGalNAc-*p*-nitrofenol se incrementa aproximadamente 2,8 veces con respecto a las células control (Huet et al., 1998). En el panel de células estudiado los efectos observados fueron variables: un aumento en células SK-CO-15 (4,21 veces) y MCF-7, una disminución en IMIM-PC-2 y no se observaron cambios en IMIM-PC-1.

Los estudios realizados previamente en células HT-29 indicaban que, en ausencia de aceptor exógeno, las sialiltransferasas presentes en extractos de células tratadas con benzil GalNAc son capaces de utilizar como sustrato benzil GalNAc-Gal, el cual es generado a partir del benzil GalNAc. Así, en estas células se pueden detectar niveles considerables de benzil GalNAc-Gal α 2,3Neu5Ac, así como de otros metabolitos derivados del análogo (Huet et al., 1995; Delannoy et al., 1996; Zanetta et

al., 2000) (ver Introducción sección 4.4). Cuando estos experimentos se realizaron utilizando extractos de los diferentes tipos celulares empleados en este estudio, en todos ellos - a excepción de las MCF-7 - se demostró la presencia de moléculas aceptoras de ácido siálico.

Estos resultados apoyan la idea de que el metabolismo del benzil GalNAc es altamente dependiente del tipo celular analizado, refleja el contexto de glicosiltransferasas expresado en cada tipo celular y probablemente determina los efectos del análogo sobre la glicosilación de glicoproteínas celulares.

3. EFECTOS DEL BENZIL GaINAc SOBRE EL PROCESAMIENTO DE GLICOPROTEINAS EN CÉLULAS HT-29 M6

INTRODUCCIÓN

Diversas publicaciones han descrito la acumulación de glicoproteínas de membrana en células tratadas con benzil GaINAc (Huet et al., 1998; Hennebicq-Reig et al., 1998, ver Resultados sección 2), sin embargo, los efectos del tratamiento sobre el procesamiento de las glicoproteínas celulares no han sido analizados con detalle.

Los resultados descritos en esta sección responden al objetivo general de determinar el efecto que tiene el tratamiento crónico con benzil GaINAc sobre la maduración de glicoproteínas apicales, basolaterales y lisosomales en células HT-29 M6.

Artículo: "GalNAc- α -O-benzyl Inhibits Sialylation of de Novo Synthesized Apical but Not Basolateral Sialoglycoproteins and Blocks Lysosomal Enzyme Processing in a Post-trans-Golgi Network Compartment"

Fausto Ulloa, Clara Francí, and Francisco X.Real

The Journal of Biological Chemistry (2000) 275:18785-18793

GalNAc- α -O-benzyl Inhibits Sialylation of *de Novo* Synthesized Apical but Not Basolateral Sialoglycoproteins and Blocks Lysosomal Enzyme Processing in a Post-trans-Golgi Network Compartment*

Received for publication, January 24, 2000, and in revised form, April 3, 2000
Published, JBC Papers in Press, April 5, 2000, DOI 10.1074/jbc.M000510200

Fausto Ulloa‡, Clara Francí, and Francisco X. Real§

From the Unitat de Biologia Cel·lular i Molecular, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Universitat Pompeu Fabra, carrer Dr. Aiguader, 80, 08003 Barcelona, Spain

Glycosylation plays an important role in glycoprotein traffic. Our previous work has shown that long term treatment of mucus-secreting HT-29 cells with GalNAc- α -O-benzyl reversibly inhibits sialylation and causes the accumulation of apical glycoproteins in cytoplasmic vesicles. We have analyzed at the biochemical level the effects of GalNAc- α -O-benzyl on glycoprotein processing. Both apical and basolateral membrane glycoproteins were sialylated, but GalNAc- α -O-benzyl selectively inhibited the sialylation of apical glycoproteins. In addition, lysosomal α -glucosidase, which is partially targeted to the apical membrane, was abnormally processed leading to the accumulation of an immature molecular species. Several findings support the conclusion that accumulation of this protein occurs in a post-trans-Golgi network (TGN) compartment: 1) it is partially sialylated; 2) it does not occur when glycoprotein exit from the TGN is blocked at 20 °C; 3) upon Triton X-114 partition, it distributes to the aqueous phase, a characteristic that is acquired in a post-TGN compartment; and 4) its appearance is inhibited when cells are cultured in the presence of NH₄Cl. The processing of cathepsin D was also found to be affected by GalNAc- α -O-benzyl treatment. In conclusion, GalNAc- α -O-benzyl selectively inhibits sialylation of apical glycoproteins and perturbs lysosomal enzyme processing; these effects occur in a post-TGN acidic compartment and are reminiscent of the alterations found in sialic acid storage diseases.

In the secretory pathway, glycoproteins are sorted and subsequently targeted to specific cellular domains (for review, see Ref. 1). Targeting signals for basolateral proteins have been extensively studied, and they correspond to specific peptide sequences, such as dihydrophobic amino acid motifs and tyrosine-dependent motifs, in the cytoplasmic domain (1–3). Apical targeting signals have been less extensively studied and appear to be more diverse. The role of the glycosylphosphatidylinositol linkage (1, 4–6) and the transmembrane domain of viral gly-

coproteins has been well established (7–9); recent evidence supports a role for *N*- and/or *O*-glycans in the extracellular domain in the targeting of apical, but not basolateral, glycoproteins (10–15). Neither the sugars nor the putative lectins involved in the selection of glycoproteins for apical targeting have been identified until now (Ref. 15; see discussion in Ref. 16).

Epithelial cell lines that form a polarized monolayer provide useful *in vitro* systems to examine the signals involved in targeting. A series of subpopulations derived from HT-29 colon cancer cells have been obtained that exhibit various types of differentiated features (17, 18). Among them, the populations selected in 10⁻⁶ and 10⁻⁵ M methotrexate display a mucus-secreting phenotype (17); the mucins produced by these cells contain mainly *O*-glycans with core 1 structure, in particular NeuAc α 2,3-Gal β 1–3GalNAc (19). To examine the relevance of glycosylation in mucin biosynthesis and secretion in mucus-secreting HT-29 cells, we have previously used the sugar analogue GalNAc- α -O-benzyl (BG)¹ (19–22). BG was initially reported to selectively inhibit *O*-glycosylation through its ability to compete with GalNAc-*O*-Ser/Thr for the β 1–3galactosyltransferases involved in the biosynthesis of *O*-glycans (23). However, short exposure (24 h) of mucus-secreting HT-29 cells to 5 mM BG resulted in a 13-fold decrease in the levels of mucin-associated sialic acid and an increase of T antigen, suggesting that the major step inhibited by treatment with this sugar analogue was sialylation rather than the transfer of Gal to GalNAc- α -O-Ser/Thr (20). These effects were associated with the metabolism of GalNAc- α -O-benzyl to Gal β 1–3GalNAc- α -O-benzyl, which is a potent competitor of the α 2,3-sialyltransferase activity present in HT-29 cell extracts (20, 21). To examine in more detail the effects of BG on mucin biosynthesis and secretion, mucus-secreting and undifferentiated HT-29 cells were cultured for 20 days in the presence of 2 mM BG; this was associated with a 6-fold increase in cell volume, an accumulation of small cytoplasmic vesicles containing electron-lucid material, a marked decrease in the sialylation of cellular glycoproteins, and a dramatic alteration in the subcellular distribution of apical glycoproteins (22). These effects were fully reversible upon withdrawal of the drug. BG appeared to selectively affect apical glycoproteins, such as MUC1, dipepti-

* This work was supported in part by Grant SAF97-0085 from Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, Grant SGR-00433 from Comissió Interdepartamental de Recerca i Tecnologia (Generalitat de Catalunya), and a grant from the Mizutani Foundation for Glycoscience. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ Recipient of a predoctoral fellowship from the MUTIS Program.

§ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-93-2211009; Fax: 34-93-2213237; E-mail: preal@imim.es.

¹ The abbreviations used are: BG, GalNAc- α -O-benzyl; AAG, acid α -glucosidase; APN, aminopeptidase N; DPP-IV, dipeptidylpeptidase IV; gp, glycoprotein; M6, HT-29 cells selected in 1 μ M methotrexate; MAL, *Maackia amurensis* lectin; PNA, peanut agglutinin; SASD, sialic acid storage disease; SI, sucrase-isomaltase; TGN, trans-Golgi network; FBS, fetal bovine serum; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; PBS, phosphate-buffered saline; mAb, monoclonal antibody; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; endo H, endoglycosidase H; ST, sialyltransferase.

dylopeptidase IV (DPP-IV), and carcinoembryonic antigen. The basolateral glycoprotein gp120 and non-glycosylated apical proteins, such as villin and ZO-1, did not accumulate in cytoplasmic vesicles as determined using immunofluorescence microscopy (22). In addition, immunoprecipitation and lectin-blotting experiments showed that, in control cells, apical glycoproteins express NeuAc α 2,3-Gal-R reactive with the sialic acid-specific *Maackia amurensis* lectin (MAL); by contrast, apical glycoproteins immunoprecipitated from BG-treated cells display a decreased sialylation, a loss of reactivity with MAL, and an increased reactivity with peanut agglutinin (PNA), a lectin that binds Gal-R (22). When BG is removed from the cultures, sialylation is recovered. We and others have proposed that the effects of BG may be due to the accumulation of BG-derived metabolites that inhibit α 2,3 sialyltransferases (20–23).

These results led to the analysis of the reactivity of sialic acid-reactive lectins with mucus-secreting HT-29 cells, and sialic acid appeared to be restricted to the apical membrane, as determined by confocal immunofluorescence. This finding, together with the effect of BG on apical but not basolateral glycoproteins, led us to propose a possible role for sialic acid in processes related to apical targeting (22). In this work we have aimed at analyzing in closer detail at the biochemical level the presence of sialic acid in apical and basolateral glycoproteins, as well as the effects of BG on the processing of apical, basolateral, and lysosomal glycoproteins in polarized mucus-secreting HT-29 cells. Several glycoproteins from each of these groups were selected in order to assess if similar changes take place in proteins having a common destination and to rule out that the observed effects reflect the particular behavior of a given protein. DPP-IV and aminopeptidase N (APN) are brush-border-associated enzymes expressed in the apical membrane of intestinal cells; integrins are heterodimeric glycoproteins destined to the basolateral membrane, where the gp525 glycoprotein also localizes; acid α -glucosidase (AAG) and cathepsin D are lysosomal enzymes that undergo proteolytic processing to generate a mature isoform.

In this work, we present biochemical evidence that: 1) BG perturbs the intracellular processing of apical glycoproteins as well as lysosomal enzymes, but not of basolateral glycoproteins; 2) despite its selective effects on apical glycoproteins, both apical and basolateral glycoproteins are sialylated; and 3) altered processing of lysosomal enzymes occurs in a post-trans Golgi network (TGN) acidic compartment. The alterations found in HT-29 cells treated with BG are reminiscent of those present in cells from patients with sialic acid storage diseases (SASD).

MATERIALS AND METHODS

Reagents—DMEM and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Life Technologies, Inc. (Glasgow, United Kingdom (UK)). All chemicals used were of the highest chemical grade and were purchased, unless otherwise indicated, from Sigma.

Cells and Antibodies—HT-29 cells selected with 10^{-6} M methotrexate (here designated as HT-29 M6 cells) and Caco-2 colon cancer cells were obtained from Drs. Alain Zweibaum and Thécia Lesuffleur (INSERM U505, Paris, France) and were maintained with DMEM supplemented with 10 or 20% FBS, respectively, at 37 °C in an atmosphere of 5% CO $_2$. HT-29 M6 cells and Caco-2 cells were seeded on plastic at 2×10^4 cells/cm 2 and 1×10^4 cells/cm 2 , respectively. Culture medium was changed daily. When cells were cultured in the presence of 2 mM GalNAc- α -O-benzyl, the drug was added to the cells 3 days after seeding, unless specified otherwise, and it was maintained throughout the culture period. In some experiments, HT-29 M6 cells were seeded at 2×10^4 cells/cm 2 on Transwell filters and cells were maintained for 21 days. Prior to use, the impermeability of the monolayer was established by adding [14 C]mannitol to the upper compartment and testing its diffusion to the lower compartment. Cultures in which less than 5% of counts/min were present in the lower compartment after 3 h were used. mAbs S6 and Hbb3/153/63, detecting DPP-IV (24) and APN (25), re-

spectively, were obtained from Dr. L. J. Old (Ludwig Institute for Cancer Research New York Branch, Sloan-Kettering Institute, New York) and Dr. H. P. Hauri (Biozentrum, Basel, Switzerland); mAb 525 detecting a basolateral glycoprotein of 38–40 kDa was obtained from Dr. A. Le Bivic (IBDM, Marseille, France) (26); mAb A9 detecting β_4 integrin was obtained from Dr. T. Carey (University of Michigan, MI) (27); rabbit anti-AAG polyclonal antibodies were obtained from Dr. A. Reuser (Erasmus University, Rotterdam, The Netherlands) (28); rabbit polyclonal anti-cathepsin D antibodies were purchased from Dako (Glostrup, Denmark).

Metabolic Labeling and Immunoprecipitation—Cells were cultured as indicated above and used for metabolic labeling 10 days after seeding, unless otherwise indicated. For pulse-chase experiments, cells were maintained for 30 min in methionine-free minimal essential medium containing 10% dialyzed FBS, pulse-labeled for 1 h with 50 μ Ci/ml [35 S]Met/Cys (Tran 35 S-label, ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA) in the same medium, and chased with DMEM supplemented with 10% FBS and 2 mM methionine for the indicated periods of time. In the case of cells treated with the drug, the medium was supplemented with 2 mM BG. Cells were washed three times with PBS, lysed with 50 mM Tris/HCl, pH 8, 1% Triton X-100, 62.5 mM EDTA, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/ml aprotinin, and 1 μ g/ml leupeptin for 30 min at 4 °C, and lysates were centrifuged at $10,000 \times g$ for 30 min. All immunoprecipitation steps were carried out at 4 °C. Supernatants were precleared with preimmune rabbit antiserum for 2 h and Protein A-Sepharose for 30 min (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Antibodies were added to the precleared supernatants for 3–16 h in the presence of 0.2% SDS. When using mAbs, rabbit anti-mouse Ig (Dako) was added for 2 h. Immune complexes were isolated using Protein A-Sepharose A protein for 2 h. Immunoprecipitates were washed three times with RIPA buffer (10 mM Tris/HCl, 0.1% SDS, 1% deoxycholate, 1% Nonidet P-40, 0.15M NaCl), three times with TNEN high salt buffer (10 mM Tris/HCl, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 0.1% SDS), and twice with PBS. Immunoprecipitates were resuspended in sample buffer, resolved by SDS-PAGE, and revealed by fluorography. [14 C]-Labeled standards (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) were used to estimate the molecular mass.

Glycosidase Treatment—For digestion with endoglycosidase H (endo H), immunoprecipitates were boiled for 5 min in 0.1 M phosphate buffer, pH 6.1, containing 1% SDS and 50 mM EDTA, diluted 10-fold in 0.1 M phosphate buffer, pH 6.1 containing protease inhibitors (10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml pepstatin, 100 μ g/ml benzamide HCl, 100 μ g/ml soybean trypsin inhibitor), and 1% 2-mercaptoethanol, and divided in two aliquots, to one of which 2 milliunits of endo H (Genzyme, Boston, MA) was added. Samples were incubated overnight at 37 °C, and the reaction was stopped with sample buffer. For neuraminidase treatment, immunoprecipitates were resuspended in 20 mM acetate buffer pH 5, containing 5 mM CaCl $_2$ and 20 milliunits of neuraminidase from *Arthrobacter ureafaciens* (Roche Molecular Biochemicals), incubated at 37 °C for 3 h, washed with 10 mM Tris/HCl, and resuspended in sample buffer.

Triton X-114 Fractionation—Triton X-114 phase separation was performed as described elsewhere (29). Briefly, cells were solubilized in 1% Triton X-114, 10 mM Tris/HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, and 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. Lysates were centrifuged at $10,000 \times g$ for 30 min at 4 °C, and supernatants were warmed at 30 °C; 5 min later, detergent and water phases were separated by centrifugation at 2000 rpm for 1 min at room temperature. This procedure was repeated three times.

Immunoelectron Microscopy—Ultrastructural analysis of the distribution of AAG in HT-29 M6 and Caco-2 cells 21 days after seeding and in normal human colon was performed using procedures described in detail elsewhere (30). Briefly, cell monolayers or tissues were fixed sequentially with 3% paraformaldehyde and 0.1–0.5% glutaraldehyde, rinsed, and embedded in Lowicryl K4M at –35 °C. Ultrathin sections were cut and placed on parlodion/carbon-coated nickel grids. Sections were floated on a droplet of PBS and incubated with rabbit anti-AAG antibodies for 2 h at 22 °C in a moist chamber. After two washes with PBS, sections were floated on a droplet of Protein A-gold (15 nm) for 1 h. After washing with PBS and distilled water, droplets were allowed to dry and were stained with uranyl acetate and lead citrate. Controls included the use of normal rabbit serum at the same dilution as the anti-AAG serum.

RESULTS

Processing of Apical and Basolateral Glycoproteins in Benzyl GalNAc-treated HT-29 M6 Cells—We have previously shown

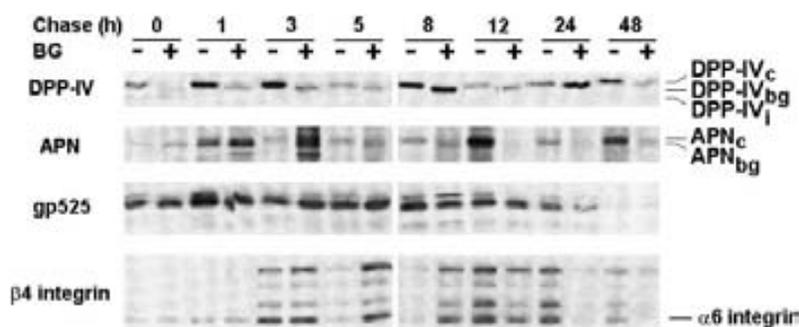
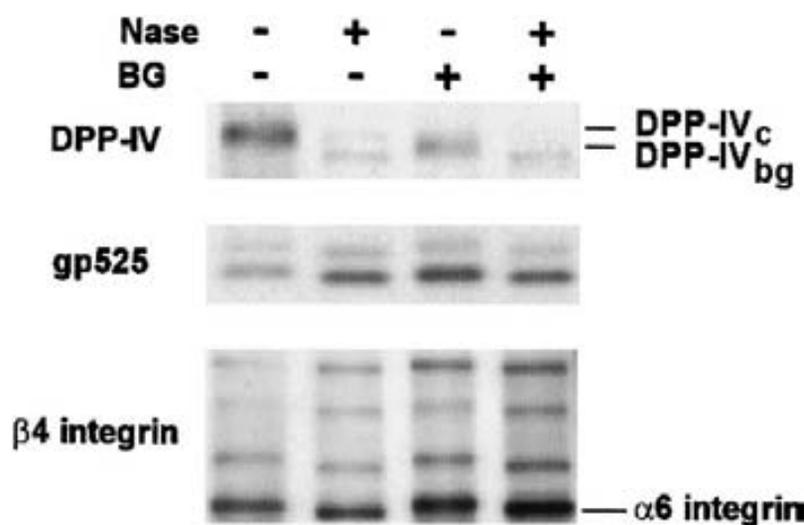


FIG. 1. GalNAc- α -O-benzyl selectively affects the processing of apical glycoproteins in HT-29 M6 cells. Ten days after seeding, cells were metabolically labeled with [35 S]Met/Cys for 1 h and chased for the indicated periods of time. Cells were cultured in the absence or in the presence of BG. Cell lysates were immunoprecipitated with antibodies detecting apical (DPP-IV and APN) or basolateral (gp525 and β_4 integrin subunit) glycoproteins. Immunoprecipitates were resolved by SDS-PAGE (8% for DPP-IV and APN, 10% for gp525, and 6% for β_4 integrin) and revealed by fluorography. -, control untreated cells; +, cells treated with 2 mM BG starting on day 3 of culture. BG induces changes in the electrophoretic mobility of apical, but not basolateral, glycoproteins. $DPP-IV_i$, immature DPP-IV; $DPP-IV_c$, control cells; $DPP-IV_{bg}$, BG-treated cells; APN_c , control cells; APN_{bg} , BG-treated cells.

FIG. 2. GalNAc- α -O-benzyl partially inhibits the sialylation of apical but not basolateral glycoproteins of HT-29 M6 cells.

Ten days after seeding, cells were metabolically labeled with [35 S]Met/Cys for 1 h and chased for 8 h. Cells were cultured in the absence or in the presence of 2 mM BG. Cell lysates were immunoprecipitated with antibodies against DPP-IV, gp525, and β_4 integrin subunit. Immunoprecipitated molecules were incubated with buffer (-) or with neuraminidase (+) and subsequently were resolved by SDS-PAGE (8% for DPP-IV and APN, 12% for gp525, and 6% for β_4 integrin), and revealed by fluorography. The four polypeptide chains detected in the immunoprecipitates obtained with anti- β_4 integrin antibodies correspond to the previously reported β_4 chains (205, 175, and 140 kDa) and the 125-kDa α_6 subunit (27). *Nase*, neuraminidase; $DPP-IV_c$, control cells; $DPP-IV_{bg}$, BG-treated cells.



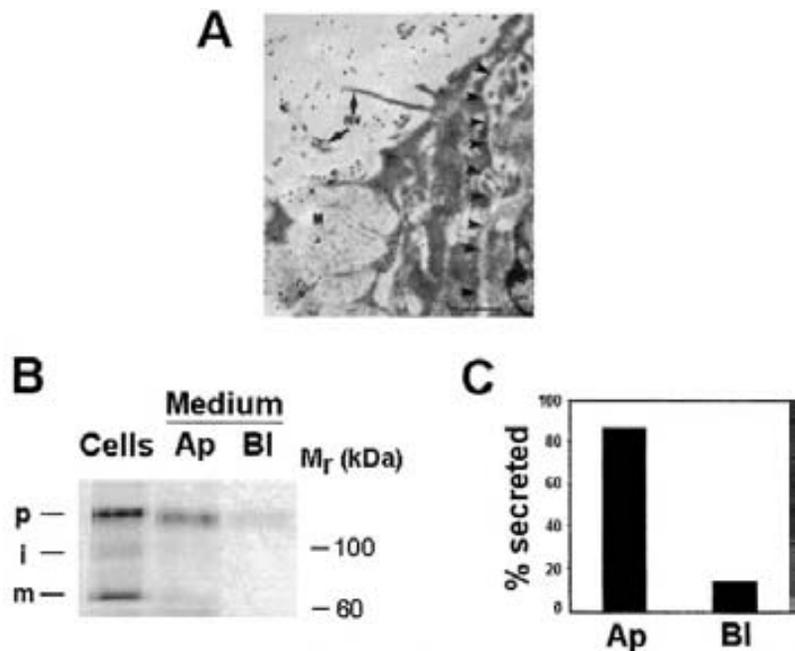
that long term treatment of HT-29 M6 cells with 2 mM BG induces a dramatic accumulation of cytoplasmic vesicles containing apical glycoproteins. Among them are DPP-IV, carcinoembryonic antigen, and MUC1. By contrast, non-glycosylated apical proteins, such as villin or ZO-1, and the basolateral glycoprotein gp120 display a normal subcellular distribution (22). These changes are already detectable after culture of cells for 7 days in the presence of the drug (data not shown); this time point was selected for labeling because uptake of radiolabeled amino acids is higher under these conditions than at day 21 of culture. To examine the effects of BG at the biochemical level, HT-29 M6 cells were treated with the drug starting on day 3 after seeding until day 10, when metabolic labeling and immunoprecipitation of marker apical and basolateral membrane glycoproteins were performed. After 1 h of pulse with [35 S]Met/Cys and in the absence of a chase period, immunoprecipitates obtained using anti-DPP-IV antibodies showed two components: the higher mobility one, designated $DPP-IV_i$ and representing the immature protein, showed a similar apparent molecular mass (93 kDa) in control and BG-treated cells. By contrast, the component with a lower mobility, corresponding to mature DPP-IV, migrated differently in control and in BG-treated cells: its estimated molecular mass was 112 kDa in control untreated cells ($DPP-IV_c$) and 107 kDa in BG-treated cells ($DPP-IV_{bg}$). At all chase time points, only the slower migrating component, corresponding to mature DPP-IV, was detected and $DPP-IV_{bg}$ always showed a greater mobility than

$DPP-IV_c$ from control cultures (Fig. 1). The half-life of $DPP-IV$ was similar in control and BG-treated cells (Fig. 1). Using anti-APN antibodies, the immunoprecipitated molecules showed a similar migration 1 h after chase; by contrast, after 3 h of chase and at all later time points, APN from BG-treated cells (APN_{bg}) showed a slightly higher mobility than APN from control cells (APN_c). Their estimated molecular masses were 123 and 128 kDa, respectively. Unlike these two apical glycoproteins, the electrophoretic mobility of three basolateral glycoproteins, gp525, β_4 integrin, and α_6 integrin was undistinguishable in control and BG-treated cells. BG did not affect the half-lives of these glycoproteins (Fig. 1). The same results were obtained when SDS-PAGE gels with variable composition (6–12%) were used in order to increase the resolution of the electrophoretic analysis. These results confirm and extend our previous findings (22).

BG has been shown to decrease the sialylation of glycoproteins in HT-29 cells, likely as a result of the ability of BG-derived metabolites to inhibit sialyltransferases such as ST3Gal I, the main sialyltransferase expressed in these cells (21, 22). To determine if this effect might be responsible for the observed change in electrophoretic mobility of apical glycoproteins, we analyzed the sialylation of apical and basolateral glycoproteins in cells cultured in the absence or in the presence of BG by treating immunoprecipitated molecules with neuraminidase and analyzing their electrophoretic behavior. As shown in Fig. 2, the migration of DPP-IV from control and

FIG. 3. AAG is detected in the apical membrane of HT-29 M6 cells, and is secreted through the apical domain.

Panel A, subcellular distribution of AAG as determined using immunoelectron microscopy on sections of Lowicryl-embedded cell layers. Gold particles are observed along microvilli and in the apical membrane (*arrows*) but are absent from the basolateral membrane (*arrowheads*). *Bar* = 0.5 μ m. **Panel B**, Cells were grown on porous filters for 21 days, pulse-labeled with [³⁵S]Met/Cys for 1 h, and chased at 36 h. Apical (*Ap*) and basal (*Bl*) media and cell lysates were immunoprecipitated with anti-AAG antibodies. Immunoprecipitates were resolved by SDS-PAGE and revealed by fluorography. **Panel C**, proportion of AAG secreted to the apical and basolateral culture medium. *Bars* correspond to a densitometric quantitation of the autoradiography shown in *panel A*. *p*, precursor form; *i*, intermediate form; *m*, mature form.



BG-treated cells increased after neuraminidase treatment and desialylated DPP-IV from both cultures showed the same mobility, indicating that BG reduces, but does not abolish, sialylation of DPP-IV and suggesting that it does not affect other glycosylation steps. The electrophoretic mobility of the basolateral glycoproteins gp525, β_4 integrin, and α_6 integrin increased upon neuraminidase treatment, indicating that they are sialylated. The observed shift and the mobility of the neuraminidase-treated molecules were undistinguishable in control and BG-treated cells. These findings indicate that basolateral glycoproteins are also sialylated and that differential sialylation of apical and basolateral glycoproteins does not account for the selective effects of BG on apical glycoproteins.

BG Affects the Processing of Lysosomal Enzymes in HT-29 M6 Cells—To determine the extent of the effects of BG on glycoprotein traffic, we examined its ability to affect the endosomal-lysosomal pathway. AAG was chosen because: 1) a fraction of its precursor form has been shown to be targeted selectively to the apical membrane in Caco-2 colon cancer cells (31); 2) it allows the topological dissection of the effects of BG as, after glycosylation in the Golgi complex, it is processed by stepwise proteolytic cleavage in a post-trans Golgi network compartment (32–34); and 3) we have previously characterized its biosynthesis in detail in HT-29 M6 cells (34). First, we examined whether AAG also has a selective apical membrane distribution in HT-29 M6 cells using immunocytochemical techniques. Confocal microscopy did not yield conclusive results due to low levels of fluorescence. Using immunoelectron microscopy, AAG was detected in lysosomes in HT-29 M6 cells (data not shown). Fig. 3A illustrates the detection of AAG in the apical membrane, in close association with microvilli (Fig. 3A, *arrows*) and its absence from the basolateral membrane (Fig. 3A, *arrowheads*). Similarly, AAG was detected in the apical membrane of Caco-2 cells and normal colonic epithelial cells. The precursor form of AAG was mainly secreted through the apical route. HT-29 M6 cells were cultured in Transwells and 21 days after seeding; when the monolayer was impermeable, cells were labeled with [³⁵S]Met/Cys for 1 h. After 36 h of chase, AAG was immunoprecipitated from apical and basolateral medium; as shown in Fig. 3 (B and C), >80% of AAG was secreted to the apical compartment.

AAG is synthesized as a polypeptide of 97 kDa that is glyco-

sylated and phosphorylated, yielding a precursor form of 110 kDa that is subsequently proteolytically processed to an intermediate form of 95–100 kDa, and to mature forms of 70–76 kDa (33). In HT-29 M6 cells cultured in the absence of BG, only the precursor form is detected after a 1-h pulse and 3 h of chase. After 24 h of chase, the three forms of AAG are detected in control cells and the expected processing is observed thereafter (34) (Fig. 4). By contrast, in the presence of BG, all *de novo* synthesized protein is partially processed to a 100-kDa species with a mobility in between that of the precursor and intermediate forms, designated AAG_{bg}. N-Glycosidase F digestion of AAG immunoprecipitated from control and BG-treated cells showed a lower apparent molecular mass for AAG_{bg}, indicating that this form has undergone partial proteolytic processing (data not shown). In BG-treated cells, the normally processed forms of AAG are not detectable at any time of chase and labeled AAG is undetectable after 72 h of chase, suggesting that it is degraded (Fig. 4A). As with the precursor form, the electrophoretic mobility of the AAG_{bg} molecules immunoprecipitated after 24 h of chase increased slightly upon neuraminidase treatment (Fig. 4B), indicating that BG does not abolish the sialylation of AAG. Importantly, BG completely blocked the secretion of AAG in cells cultured on plastic (Fig. 4C).

To determine if the observed effects of BG on the processing of AAG are extensive to other lysosomal enzymes, cathepsin D was analyzed. This enzyme is synthesized as a 53-kDa precursor that is proteolytically processed to a single-chain form of 47 kDa and subsequently cleaved to two subunits, the large one having an apparent molecular mass of 28 kDa (35). In control cells, the mature 28-kDa component was already detectable after 1 h of chase and it was present until 48 h of chase (Fig. 5). By contrast, in BG-treated cells, the 28-kDa mature form was undetectable until the 3-h chase time point and a 32-kDa form was present instead. This molecular species was observed, together with the 28-kDa mature form, all throughout the chase period, indicating incomplete maturation of the enzyme (Fig. 5).

The Blockade of Processing of Acid α -Glucosidase Occurs in a Post-TGN Compartment—To determine where the blockade in glycoprotein processing takes place in HT-29 M6 cells treated with BG, we took advantage of the sequential maturation of AAG. We have previously shown DPP-IV acquires endo H

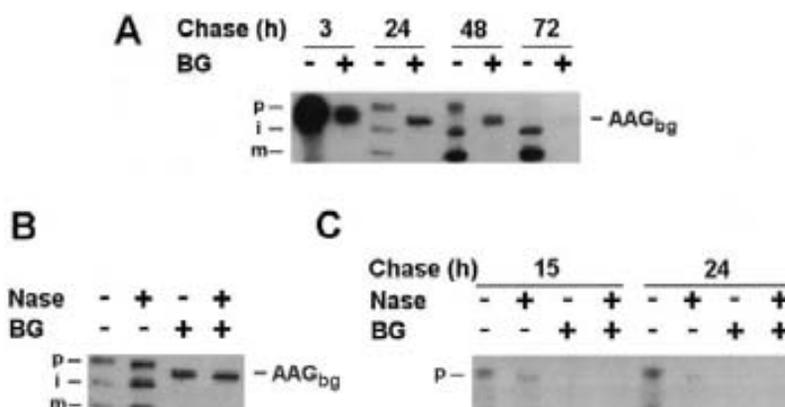


FIG. 4. GalNAc- α -O-benzyl alters the processing, and inhibits the secretion of acid α -glucosidase in HT-29 M6 cells. *Panel A*, 10 days after seeding, cells were pulse-labeled with [35 S]Met/Cys for 1 h and chased for the indicated periods of time. Cells were cultured in the absence or in the presence of 2 mM BG. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-AAG antibodies, and immunoprecipitated molecules were divided into two aliquots. One of them was incubated with buffer, and the other was incubated with neuraminidase (*Nase*). Subsequently, samples were resolved by SDS-PAGE and revealed by fluorography. The normal maturation of AAG is inhibited by BG, leading to the accumulation of an abnormal protein (AAG_{bg}) with a mobility intermediate between that of the precursor and the intermediate forms observed in untreated cells. *Panel B*, neuraminidase sensitivity of AAG from control and BG-treated cells immunoprecipitated after 24 h of chase as described in *panel A*; the control lanes correspond to those shown in *panel A*. The abnormal form that accumulates in BG-treated cells is neuraminidase-sensitive. *Panel C*, culture medium from cells cultured used in the experiment shown in *panel A* was used to immunoprecipitate AAG; after digestion with neuraminidase, SDS-PAGE and fluorography were performed. BG inhibits the secretion of AAG. *Nase*, neuraminidase; *p*, precursor form; *i*, intermediate form; *m*, mature form.

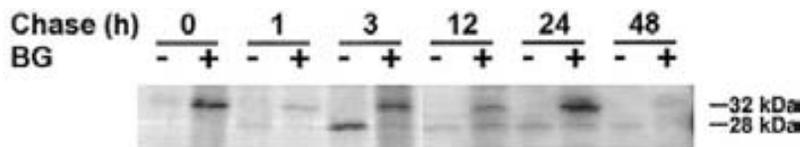


FIG. 5. GalNAc- α -O-benzyl perturbs the maturation of cathepsin D in HT-29 M6 cells. Ten days after seeding, cells were metabolically labeled with [35 S]Met/Cys for 1 h and chased for the indicated periods of time. Cell lysates were immunoprecipitated with antibodies against cathepsin D. Immunoprecipitates were resolved by 12% SDS-PAGE. -, control untreated cells; +, cells treated with 2 mM BG starting on day 3 of culture. In control cultures, cathepsin D is proteolytically cleaved and the large subunit has an electrophoretic mobility corresponding to 28 kDa; in the presence of BG, a defective maturation is observed and a partially processed form of 32 kDa is present throughout the chase period.

resistance in HT-29 cells treated with BG, indicating that at least it has undergone processing steps that typically occur in the cis-medial Golgi (22). The work shown here demonstrates that both DPP-IV and AAG are partially sialylated (Figs. 2 and 4B), suggesting that these glycoproteins have reached the medial/trans-Golgi cisternae where sialyltransferases are thought to be present (36–38). To determine more precisely the site at which the blockade of AAG processing occurs in BG-treated cells, we took advantage of the TGN accumulation of en route glycoproteins induced by culture at 20 °C (39–41). We have previously shown that, in untreated cells, culture at 20 °C results in the accumulation of the 110-kDa precursor form of AAG and, upon transfer to 37 °C, normal processing is resumed, indicating that proteolytic cleavage requires exit from the TGN (34). In BG-treated cells, the 20 °C block also results in the accumulation of the 110-kDa precursor form. In these cells, release from the 20 °C block leads to the proteolytic processing to the abnormally processed AAG_{bg} species described above (Fig. 6A). As in cells continually cultured at 37 °C, processing after release from the 20 °C is abnormal; these results indicate that the blockade observed in BG-treated cells takes place in a post-TGN compartment.

AAG is transported to the lysosomes as a transmembrane protein that is anchored to the membrane by its signal peptide (33). Removal of the signal peptide, rendering the enzyme water-soluble, also occurs in a post-TGN compartment (33, 34). Therefore, we examined the Triton X-114 partition properties of the partially processed form that accumulates in BG-treated cells; this molecular species is completely water-soluble (Fig. 6B), indicating that it has already undergone proteolysis of the transmembrane domain. Altogether, these findings support the

contention that the main effects of BG on AAG processing take place in a post-TGN compartment.

To determine if AAG molecules reach acidic compartments in the presence of BG, HT-29 M6 cells were pulse-labeled and chased in presence of NH₄Cl. In control cells treated with 10 mM NH₄Cl, the precursor and intermediate forms were present at 24 h of chase, but the mature form was undetectable, indicating that processing of the intermediate form takes place in acidic compartments. In cells exposed to BG for 7 days and treated with NH₄Cl, the only detectable molecular species had a mobility that was in-between that of the precursor form and the AAG_{bg} form present in the absence of NH₄Cl (Fig. 7). These results indicate that, in BG-treated cells, AAG reaches an acidic compartment.

DISCUSSION

In this study, we show that prolonged exposure of HT-29 M6 cells to the sugar analogue BG leads to altered intracellular processing of apical and lysosomal glycoproteins, whereas no effects are observed on three basolateral glycoproteins. These findings confirm and extend prior immunocytochemical data showing that apical glycoproteins accumulate intracellularly upon prolonged treatment with this sugar analogue.

The altered processing of apical glycoproteins is associated with a marked decrease in sialylation causing changes in electrophoretic behavior of DPP-IV and APN. In the case of DPP-IV, several pieces of evidences support this contention. 1) The mobility of DPP-IV after neuraminidase digestion is undistinguishable in control and BG-treated cultures, suggesting that no other major changes in glycosylation take place; 2) DPP-IV from control cells reacts with MAL but not with PNA, whereas

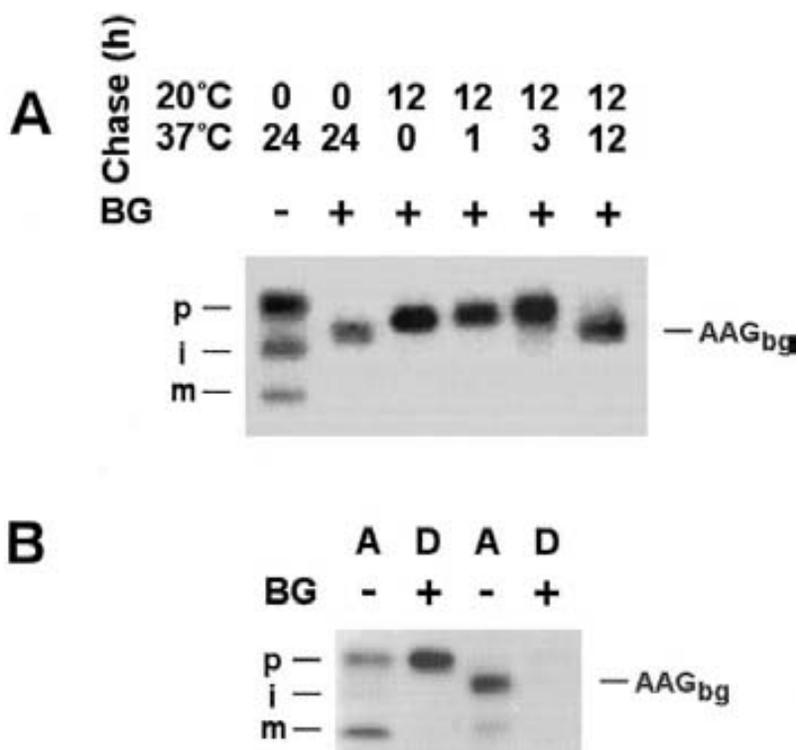


FIG. 6. GalNAc- α -O-benzyl blocks acid α -glucosidase processing in a post-TGN compartment in HT-29 M6 cells. *Panel A*, ten days after seeding cells cultured in the absence or in the presence of 2 mM BG were pulse-labeled with [35 S]Met/Cys for 1 h and incubated for 12 h at 20 °C to arrest labeled glycoproteins in the TGN. Subsequently, cells were transferred to 37 °C and chased for 1, 3, and 12 h. For reference, AAG processing in cells continuously cultured at 37 °C in the absence or in the presence of BG is shown at the 24-h chase time point. The partially processed form that accumulates in cells treated with BG (AAG_{bg}) appears only after release from the 20 °C temperature block. *Panel B*, 10 days after seeding, cells cultured in the absence or in the presence of 2 mM BG were pulse-labeled with [35 S]Met/Cys for 1 h and chased for 24 h. Cells were lysed in a buffer containing 1% Triton X-114, which allows the isolation of integral membrane proteins in the detergent fraction. Aqueous and detergent fractions were isolated as described under "Materials and Methods." AAG was immunoprecipitated from both fractions, resolved by SDS-PAGE, and revealed by fluorography. AAG_{bg} is found exclusively in the aqueous fraction, indicating that processing takes place in a post-TGN compartment. *p*, precursor form; *i*, intermediate form; *m*, mature form; *A*, aqueous fraction; *D*, detergent fraction; *C*, control cells; *BG*, BG-treated cells.

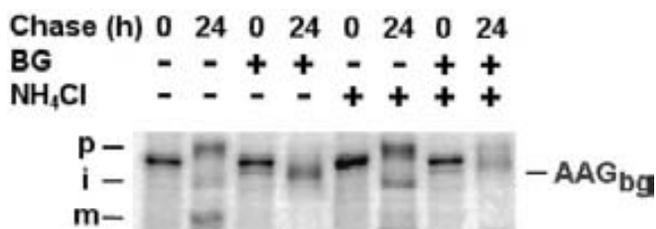


FIG. 7. Acid α -glucosidase molecules reach an acidic compartment in HT-29 M6 cells treated with GalNAc- α -O-benzyl. Ten days after seeding cells were metabolically labeled with [35 S]Met/Cys for 1 h and chased for the indicated periods of time. Cells were cultured in the absence or in the presence of 2 mM BG, added starting on day 3 of culture. NH₄Cl (10 mM) was added for the duration of metabolic labeling and the complete chase period. The partially processed form detected in cells treated with BG (AAG_{bg}) does not form in the presence of NH₄Cl, indicating that its appearance requires that AAG reaches an acidic compartment. *p*, precursor form; *i*, intermediate form; *m*, mature form.

DPP-IV from BG-treated cells reacts with PNA and does not react with MAL, supporting the reduced sialylation of the protein in treated cells (22); and 3) the activity of the enzyme is preserved in BG-treated cells, indicating the lack of major conformational changes (22). Nevertheless, these observations do not preclude minor changes in glycosylation in addition to the reduced sialylation. The above mentioned hypothesis is also supported by the known fate of BG in HT-29 cells; it is metabolized to Gal-GalNAc- α -O-benzyl as well as to NeuAc α 2,3Gal-GalNAc- α -O-benzyl (20, 21). The former is a competitive inhibitor of ST3Gal I, the main sialyltransferase expressed in HT-29

cells, and it may also act as an inhibitor of other sialyltransferases such as ST3Gal IV (see discussion in Ref. 22). It has recently been shown that DPP-IV, sucrase-isomaltase (SI), and APN are both *N*- and *O*-glycosylated, and it has been proposed that when *O*-glycosylation is perturbed in Caco-2 cells, the apical targeting of DPP-IV and SI (but not that of APN) is affected (42). Furthermore, treatment of Caco-2 cells with BG is associated with an inhibition of *O*-glycosylation of SI and a loss of its selective targeting to the apical membrane (43). Nevertheless, the overall effects of prolonged exposure to BG on HT-29 M6 and Caco-2 cells are very different, and the described biochemical effects should be considered in light of these differences (see below).

A remarkable finding in this work was that basolateral glycoproteins were not affected by BG despite the fact that they are sialylated. In our previous study we showed that α 2,3NeuAc is mainly distributed in the apical membrane of polarized HT-29 M6 cells, as determined by confocal microscopy analysis of the reactivity with MAL, and that there was no colabeling of MAL and antibodies recognizing β ₁ integrin (22). These findings do not appear unique to HT-29 M6 cells, nor artifactual; using confocal microscopy, α 2,3NeuAc was detected predominantly in the apical membrane of HRT18 cells, α 2,6NeuAc was mainly detected in the apical membrane of Caco-2 cells, and both α 2,3NeuAc and α 2,6NeuAc were detected in the apical membrane of MZPC-1 pancreas cancer cells using MAL and *Sambucus nigra* agglutinin, respectively.²

² F. Ulloa and F. X. Real, manuscript in preparation.

These findings are also substantiated by a large amount of work showing that sialic acid is mainly found in the apical membrane of epithelia in tissues (reviewed in Ref. 44). Here, we show, using neuraminidase digestion of metabolically labeled immunoprecipitates, that three basolateral proteins whose processing is not affected by BG, gp525, β_4 integrin, and α_6 integrin, are indeed sialylated. The apparent contradiction between the immunocytochemical and biochemical findings may be accounted for in several ways. 1) *De novo* synthesized apical and basolateral glycoproteins may be sialylated, whereas, in the steady state, the latter would be predominantly desialylated, possibly through the action of sialidases; 2) apical glycoproteins may become hypersialylated through recycling after reaching the apical membrane; a precedent for this exists with MUC1, an apical mucin-type glycoprotein whose sialylation is inhibited by BG (22) and which acquires sialic acid as it is recycled from the plasma membrane (45); 3) basolateral glycoproteins may be sialylated by different enzymes, or in different compartments, than apical glycoproteins. This hypothesis might also explain the differential effects of BG on apical and basolateral glycoproteins, as the latter might not be exposed to the metabolites that are involved in the inhibition of sialylation of apical glycoproteins. In relationship with these possibilities, we have found that the apical membrane of MDCK strain II cells is strongly reactive with MAL and unreactive with *S. nigra* agglutinin, whereas the opposite is true for the basolateral membrane, suggesting that either apical and basolateral glycoproteins are selectively recognized by ST or that the enzymes reside in different compartments. These hypotheses are currently being examined in our laboratory.

Besides altering the intracellular processing of apical glycoproteins, BG affected the processing of lysosomal enzymes. A small fraction of AAG is normally targeted to the apical membrane but altered apical targeting cannot account for the observed effects as defective maturation affected all AAG synthesized. Furthermore, we have shown that in untreated HT-29 M6 cells, 30% of the synthesized molecules remain in the precursor form after 24 h of chase, whereas in the presence of BG all AAG molecules are processed to the AAG_{bg} abnormal species described here, suggesting that proteolysis is more efficient. The precursor form has previously been shown to be soluble in Triton X-100 (33), suggesting that its absence from the immunoprecipitates in BG-treated cells is not due to its insolubility. AAG_{bg}, the molecular species present in BG-treated cells, is sialylated and distributes to the aqueous phase upon Triton X-114 extraction, indicating that it has exited the TGN. The precise proteolytic steps leading to the intermediate and mature forms of AAG have been studied by Wisselaar *et al.* (33); based on this evidence and on the presence of multiple additional bands in various cell types (34), it is likely that multiple proteases (and perhaps several distinct compartments) are involved in this process. The lack of reagents to distinguish these molecular species hampers their precise biochemical characterization and the identification of the subcellular compartments in which they reside. The proteolytic processing of the intermediate form to the mature form depends on the action of thiol proteases (33, 34); Wisselaar *et al.* have shown that in their presence, a 100-kDa intermediate is apparent, the size of which is similar to that of AAG_{bg}. It has been shown that thiol proteases, including cathepsins, are involved in the processing of other lysosomal enzymes (35, 46), and their altered maturation might, in turn, contribute to the accumulation of AAG_{bg} described here. Although there is no evidence that AAG is *O*-glycosylated (33), it cannot be formally excluded that altered sialylation of both *N*- and *O*-glycans may be involved in its abnormal processing in HT-29 M6 cells.

The major questions raised by the findings described here are how this sugar analogue affects processing of apical and lysosomal glycoproteins and what is the nature of the intracellular vesicles that appear in BG-treated HT-29 M6 cells. Regarding the former, the BG-derived metabolites are likely to account for the effects on sialylation and targeting. *N*-Glycosylation has been shown to play a role in apical targeting of secreted, GPI-anchored, and transmembrane forms of rat growth hormone (10, 15). Recent work with MDCK cells transfected with the neurotrophin receptor has provided evidence that the *O*-glycosylation-rich stalk of this protein is involved in apical targeting (13, 14) and similar data have been published regarding SI in Caco-2 cells treated with BG (42) and in MDCK cells transfected with a cDNA encoding a pro-SI lacking the Ser/Thr-rich stalk domain (43). A role for intracellular lectins in these processes has been proposed, but there are no firm candidates yet (11, 15, 16, 47, 48). BG affects both apical and lysosomal glycoproteins. It seems unlikely that this might be due to the codistribution of both types of proteins in the same vesicles coming out of the TGN. Rather, we favor the hypothesis that the contents of independent vesicles targeted to the apical membrane and the lysosomes, respectively, meet at a later step, possibly in the cytoplasmic vesicles that accumulate in BG-treated HT-29 M6 cells (see below and Fig. 8).

It is remarkable that an inhibition of sialylation and apical targeting occurs both in HT-29 and in Caco-2 cells (19, 20, 42) because they display very distinct patterns of sialylation; Caco-2 cells contain mainly ST6 Gal I, and its glycoproteins are mainly α 2,6-sialylated (49, 50), whereas HT-29 cells contain mainly ST3 Gal I and its glycoproteins are mainly α 2,3-sialylated (22). Furthermore, prolonged exposure of Caco-2 cells to BG does not result in major changes of cell morphology at the light microscopy or ultrastructural levels nor in the accumulation of apical glycoproteins in cytoplasmic vesicles (Ref. 22 and data not shown). These observations indicate that inhibition of sialylation of glycoproteins cannot explain by itself the intracellular accumulation of abnormally glycosylated apical proteins. Differences in the structure and/or levels of BG metabolites in HT-29 and in Caco-2 cells may account for the accumulation of glycoproteins in vesicles.

Regarding the nature of such vesicles, the data reported here together with the endo H resistance and low sialylation of the accumulated apical proteins support the notion that they correspond to a post-TGN compartment. This proposal is compatible with the idea that such vesicles may contain BG-derived metabolites as a fraction thereof is sialylated and would, therefore, be synthesized in the late Golgi compartments. The accumulation of high concentrations of metabolites, including Gal-GalNAc- α -*O*-benzyl and NeuAc α 2,3Gal-GalNAc- α -*O*-benzyl (21), together with their osmotic activity due to their low liposolubility, would lead to a situation reminiscent of the accumulation of sialic acid in endocytic compartments in SASD. Cultured fibroblasts from patients with SASD contain small lysosomes, accumulate sialic acid, and display an abnormal processing of cathepsin B (51, 52). This phenotype can be mimicked by treatment of normal fibroblasts with the non-degradable disaccharide sucrose, which accumulates within large vesicles ("sucrosomes") resulting from the osmotic influx of water (53, 54). It is not clear whether such structures, which morphologically resemble the cytoplasmic vesicles of BG-treated HT-29 M6 cells, represent swollen lysosomes or vesicles from the late endosomal compartments. The accumulation of sucrose interferes with the formation of a dense lysosomal matrix (55). When normal fibroblasts are cultured in the presence of *N*-acetylmannosamine, the intracellular levels of sialic acid increase, but there is no effect on lysosomal enzyme processing

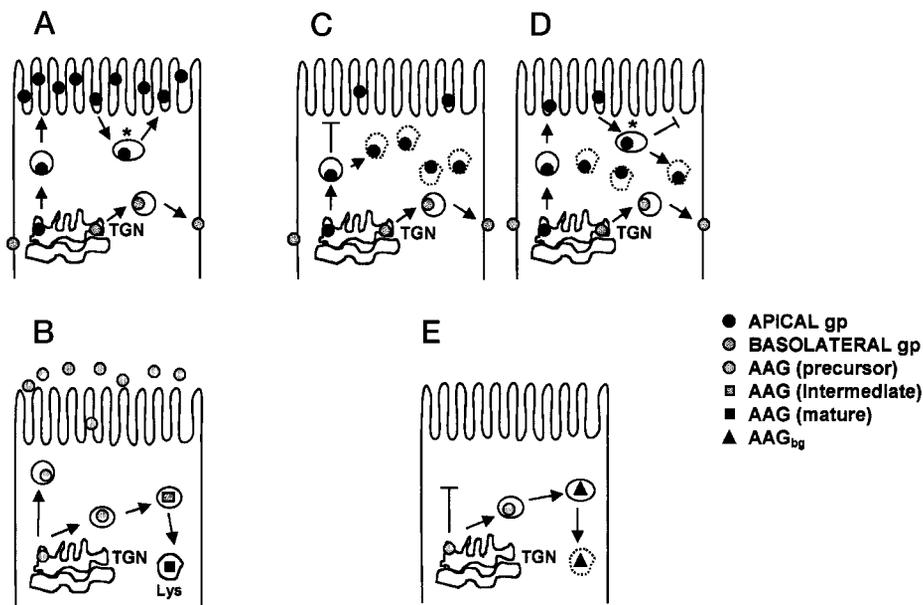


FIG. 8. Model accounting for the effects of BG on glycoprotein processing in HT-29 M6 cells. Intracellular pathways followed by apical and basolateral glycoproteins in untreated control cells are shown in *panel A*; the pathway followed by lysosomal AAG in control cells is shown in *panel B*. The asterisk in *panel A* indicates the recycling of glycoproteins from the apical membrane. Upon chronic treatment with BG, processing of apical and lysosomal glycoproteins is affected, whereas processing of basolateral glycoproteins is not. *Panels C* and *D* depict two hypothetical models that are not mutually exclusive and can account for the effects of BG on apical glycoproteins. In *panel C*, their cytoplasmic accumulation results from a blockade in targeting of Golgi-derived apical vesicles to the apical membrane and a re-routing to BG-induced cytoplasmic vesicles. In *panel D*, Golgi-to-apical membrane targeting is unaffected; apical glycoproteins undergo endocytosis but cannot recycle back to the apical membrane and accumulate in the cytoplasmic vesicles. In both models, the BG-induced cytoplasmic vesicles would correspond to an aberrant endosomal compartment (*dotted lines*). *Panel E* shows a model accounting for the effects of BG on lysosomal AAG; BG blocks apical membrane targeting and secretion as well as complete maturation of the 75-kDa form. The 100-kDa anomalous form of AAG (AAG_{bg}) that accumulates in BG-treated cells is formed in an acidic, endosomal, compartment that may be aberrant in nature (*dotted lines*). It remains to be determined whether apical and lysosomal glycoproteins accumulate in the same vesicles or not.

(56), probably due to its exit from the endocytic compartment through the activity of an anion transporter. In SASD, mutations in the gene coding for this transporter have recently been demonstrated (57), leading to the accumulation of sialic acid in late endocytic compartments, an altered processing of lysosomal enzymes, and an altered formation of lysosomes (52). BG-derived metabolites might similarly interfere with the biogenesis of lysosomes; in fact, the block in the processing of the 33-kDa form of cathepsin D suggests that a late endosomal event is affected in BG-treated cells. We propose that the cytoplasmic vesicles accumulating in these cells correspond to an endosomal compartment; whether this compartment is normal or not remains to be elucidated. Fig. 8 shows a model of the mechanisms by which altered processing of apical and lysosomal glycoproteins occurs in BG-treated cells. Current work in our laboratory aims at examining the validity of such model.

Although the findings described here do not fully unravel the complex mechanisms through which BG induces a "glycoprotein traffic jam" in HT-29 M6 cells, we provide evidence that there is a differential effect of BG on the sialylation of apical versus basolateral glycoproteins, the former being partially inhibited and the latter unaffected. This effect correlates with the alteration in the subcellular distribution of apical glycoproteins demonstrated using immunocytochemistry. Furthermore, we show that BG also blocks the processing of lysosomal glycoproteins in a post-TGN compartment and propose that it induces a cellular phenotype that is reminiscent of that observed in SASD. Therefore, the use of BG may give insights into the molecular mechanisms involved in the biosynthesis and maintenance of the integrity of the endosomal/lysosomal compartments as well as into the role of sialylation in proper targeting of cellular glycoproteins.

Acknowledgments—We thank the investigators mentioned in the text for providing reagents; P. Delannoy, G. Huet, A. Le Bivic, L. Mach,

G. Trugnan, and A. Zweibaum for valuable discussions; G. Egea for performing the immunoelectron microscopy analysis and for a critical review of the manuscript; and A. Mallabiarrena and X. Mayol for valuable discussions and critical review of the manuscript.

Note Added in Proof—A detailed description of BG-derived metabolites produced in HT-29 cells is reported by Zanetta, J. P., Gouyer, V., Maes, E., Pons, A., Hemon, B., Zweibaum, A., Delannoy, A., and Huet, G. (2000) *Glycobiology* **10**, in press.

REFERENCES

- Matter, K., and Mellman, I. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 545–554
- Aroeti, B., Kosen, P. A., Kuntz, I. D., Cohen, F. E., and Mostov, K. E. (1993) *J. Cell Biol.* **123**, 1149–1160
- Matter, K., Hunziker, W., and Mellman, I. (1992) *Cell* **71**, 741–753
- Lisanti, M. P., Sargiacomo, M., Graeve, L., Saltiel, A. R., and Rodriguez-Boulan, E. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 9557–9561
- Brown, D. A., and Rose, J. K. (1992) *Cell* **68**, 533–544
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997) *Nature* **387**, 569–572
- Kundu, A., Avalos, R. T., Sanderson, C. M., and Nayak, D. P. (1996) *J. Virol.* **70**, 6508–6515
- Scheiffele, P., Roth, M. G., and Simons, K. (1997) *EMBO J.* **16**, 5501–5508
- Huang, X. F., Compans, R. W., Chen, S., Lamb, R. A., and Arvan, P. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 27598–27604
- Scheiffele, P., Peränen, J., and Simons, K. (1995) *Nature* **378**, 96–98
- Rodriguez-Boulan, E., and Gonzalez, A. (1999) *Trends Cell Biol.* **9**, 291–294
- Gut, A., Kappeler, F., Hyka, N., Balda, M. S., Hauri, H. P., and Matter, K. (1998) *EMBO J.* **17**, 1919–1929
- Yeaman, C., Le Gall, A. H., Baldwin, A. N., Monlauzeur, L., Le Bivic, A., and Rodriguez-Boulan, E. (1997) *J. Cell Biol.* **139**, 929–940
- Monlauzeur, L., Breuza, L., and Le Bivic, A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 30263–30270
- Benting, J. H., Rietveld, A. G., and Simons, K. (1999) *J. Cell Biol.* **46**, 313–320
- Füllekrug, J., Scheiffele, P., and Simons, K. (1999) *J. Cell Sci.* **112**, 2813–2821
- Lesuffleur, T., Barbat, A., Dussaux, E., and Zweibaum, A. (1990) *Cancer Res.* **50**, 6334–6343
- Lesuffleur, T., Barbat, A., Luccioni, C., Beaumatin, J., Clair, M., Kornowski, A., Dussaux, E., Dutrillaux, B., and Zweibaum, A. (1991) *J. Cell Biol.* **115**, 1409–1418
- Hennebicq-Reig, S., Lesuffleur, T., Capon, C., de Bolós, C., Kim, I., Moreau, O., Richet, C., Hemon, B., Recchi, M. A., Maes, E., Aubert, J. P., Real, F. X., Zweibaum, A., Delannoy, P., Degand, P., and Huet, G. (1998) *Biochem. J.* **334**, 283–295
- Huet, G., Kim, I., de Bolós, C., Lo-Guidice, J. M., Moreau, O., Hemon, B., Richet, C., Delannoy, P., Real, F. X., and Degand, P. (1995) *J. Cell Sci.* **108**, 1275–1285

21. Delannoy, P., Kim, I., Emery, N., de Bolós, C., Verbert, A., Degand, P., and Huet, G. (1996) *Glycoconj. J.* **13**, 717–726
22. Huet, G., Hennebicq-Reig, S., de Bolós, C., Ulloa, F., Lesuffleur, T., Barbat, A., Carriere, V., Kim, I., Real, F. X., Delannoy, P., and Zweibaum A. (1998) *J. Cell Biol.* **141**, 1311–1322
23. Kuan, S. F., Byrd, J. C., Basbaum, C., and Kim, Y. S. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 19271–19277
24. Ueda, R., Ogata, S. I., Morrissey, D. M., Finstad, C. L., Szkudlarek, J., Whitmore, W. F., Oettgen, H. F., Lloyd, K. O., and Old, L. J. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 5122–5126
25. Hauri, H. P., Sterchi, E. E., Bienz, D., Fransen, J. A. M., and Marxer, A. (1985) *J. Cell Biol.* **101**, 838–851
26. Le Bivic, A., Real, F. X., and Rodriguez-Boulan, E. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 9313–9317
27. Van Waes, C., Kozarsky, K., Warren, A., Kidd, L., Paugh, D., Liebert, M., and Carey, T. E. (1991) *Cancer Res.* **51**, 2395–2402
28. Hermans, M. M. P., Kroos, M. A., van Beeumen, J., Oostra, B. A., and Reuser, A. J. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 13507–13512
29. Bordier, C. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 1604–1607
30. Egea, G., Francí, C., Gambús, G., Lesuffleur, T., Zweibaum, A., and Real, F. X. (1993) *J. Cell Sci.* **105**, 819–830
31. Klumperman, J., Fransen, J. A., Boekestijn, T. C., Oude Elferink, R. P., Matter, K., Hauri, H. P., Tager, J. M., and Ginsel, L. A. (1991) *J. Cell Sci.* **100**, 339–347
32. Oude Elferink, R. P. J., Fransen, J. A. M., Klumperman, J., Ginsel, L. A., and Tager, J. M. (1989) *Eur. J. Cell Biol.* **50**, 299–303
33. Wisselaar, H. A., Kroos, M. A., Hermans, M. M. P., van Beeumen, J., and Reuser, A. J. J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 2223–2231
34. Franci, C., Egea, G., Arribas, R., Reuser, A. J., and Real, F. X. (1996) *Biochem. J.* **314**, 33–40
35. Hasilik, A. (1992) *Experientia (Basel)* **48**, 130–151
36. Whitehouse, C., Burchell, J., Gschmeissner, S., Brockhausen, I., Lloyd, K. O., and Taylor-Papadimitriou, J. (1997) *J. Cell Biol.* **137**, 1229–1241
37. Burger, P. C., Lotscher, M., Streiff, M., Kleene, R., Kaisling, B., and Berger, E. R. (1998) *Glycobiology* **8**, 245–257
38. Rabouille, C., Hui, N., Hunte, F., Kieckbusch, R., Berger, E. G., Warren, G., Nilsson, T. (1995) *J. Cell Sci.* **108**, 1617–1627
39. Matlin, K., and Simons, K. (1983) *Cell* **34**, 233–239
40. Saraste, J., and Kuismanen, E. (1984) *Cell* **38**, 535–542
41. Griffiths, G., and Simons, K. (1986) *Science* **234**, 438–443
42. Naim, H. Y., Joberty, G., Alfalah, M., and Jacob, R. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 17961–17967
43. Alfalah, M., Jacob, R., Preuss, U., Zimmer, K. P., Naim, H., and Naim H. Y. (1999) *Curr. Biol.* **9**, 593–596
44. Roth, J. (1993) *Histochem. J.* **25**, 687–710
45. Litvinov, S. V., and Hilken, J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 21364–21371
46. Bohley, P., and Seglen, P. O. (1992) *Experientia (Basel)* **48**, 151–157
47. Fiedler, K., Parton, R. G., Kellner, R., Etzold, T., and Simons, K. (1994) *EMBO J.* **13**, 1729–1740
48. Fiedler, K., and Simons, K. (1996) *J. Cell Sci.* **109**, 271–276
49. Dall'Olio, F. N., Malagolini, S., and Serafini-Cessi, F. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**, 1405–1410
50. Dall'Olio, F. N., Malagolini, S., Guerrini, S., Lau, J. T., and Serafini-Cessi, F. (1996) *Glycoconj. J.* **13**, 115–121
51. Gahl, W. A., Schneider, J. A., and Aula, P. P. (1995) *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, pp. 3763–3797, McGraw-Hill, New York
52. Schmid, J. A., Mach, L., Paschke, E., and Glössl, J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 19063–19071
53. Montgomery, R. R., Webster, P., and Mellman, I. (1991) *J. Immunol.* **147**, 3087–3095
54. DeCourcy, K., and Storrie, B. (1991) *Exp. Cell Res.* **192**, 52–60
55. Bright, N. A., Reaves, B. J., Mullock, B. M., and Luzzio, J. P. (1997) *J. Cell Sci.* **110**, 2027–2040
56. Tietze, F., Seppala, R., Renlund, M., Hopwood, J. J., Harper, G. S., Thomas, G. H., and Gahl, W. A. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 15316–15322
57. Verheijen, F. W., Verbeek, E., Aula, N., Beerens, C. E., Havelaar, A. C., Joosse, M., Peltonen, L., Aula, P., Galjaard, H., van der Spek, P. J., and Mancini, G. M. (1999) *Nat. Genet.* **23**, 462–465

RESULTADOS COMPLEMENTARIOS

Las vesículas citoplasmáticas que se acumulan en células HT-29 M6 como consecuencia del tratamiento con benzil GalNAc contienen AAG

Para determinar si la AAG se localizaba en las vesículas citoplasmáticas que se acumulan en células HT-29 M6 como consecuencia del tratamiento con benzil GalNAc, se determinó su distribución subcelular utilizando inmunomicroscopía electrónica. Mientras que en células control, la AAG se encontró en los lisosomas, Golgi, vacuolas de moco (figura 3.1A y B) y en las microvellosidades apicales (figura 3A artículo adjunto), en células tratadas con benzil GalNAc, la AAG se detectó en algunas vesículas (figura 3.1C) pero no en las microvellosidades. En las secciones analizadas no se pudieron distinguir lisosomas, por lo que no se ha podido determinar si la α -glucosidasa se localiza o no en estas organelas.

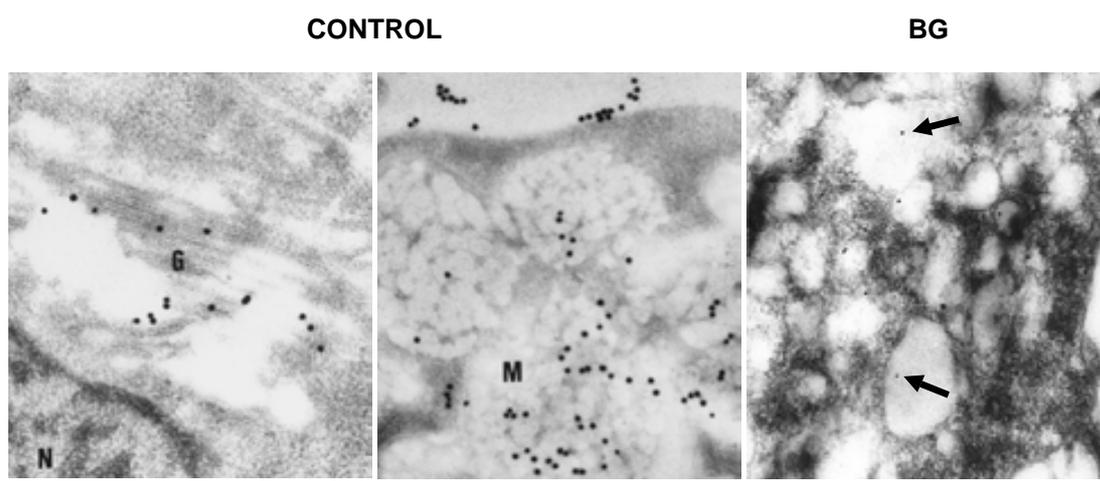


Figura 3.1 La α -glucosidasa lisosomal se localiza en las vesículas citoplasmáticas que se acumulan por el tratamiento con benzil GalNAc en células HT-29 M6. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de secciones ultrafinas de células HT-29 M6 cultivadas 21 días en ausencia (control) o presencia de benzil GalNAc 2 mM (BG), incluidas en Lowicryl K4M e incubadas con un anticuerpo que detecta la α -glucosidasa lisosomal (AAG). M: gránulo de moco, N: núcleo, G: Golgi. En las células tratadas con benzil GalNAc, la AAG se localiza en las vesículas citoplasmáticas (flechas) (para detalles, ver texto). Barra de escala: 200 nm.

El tratamiento con benzil GalNAc modifica la distribución de los compartimentos ácidos en células HT-29 M6

Las alteraciones del procesamiento de la AAG descritas en el artículo adjunto así como el análisis de su distribución subcelular sugerían que al menos una parte de las vesículas que se originan por el tratamiento con benzil GalNAc podrían corresponder a compartimentos ácidos. Para determinar si el tratamiento de células HT-29 M6 con benzil GalNAc afectaba a la distribución de

compartimentos ácidos, células cultivadas durante 15 días en presencia o ausencia de benzil GalNAc 2 mM fueron incubadas con LysoSensor® green DND-189, un marcador de compartimentos ácidos cuya fluorescencia es sensible al pH. Mientras que en las células control la señal de LysoSensor® se localizaba mayoritariamente en la región basal de las células, en células tratadas con benzil GalNAc la señal estaba distribuida por todo el citoplasma (figura 3.2A y B). Como se puede observar en la figura 3.2C, algunas vesículas citoplasmáticas no son reactivas a LysoSensor® y, por tanto, son menos ácidas. Estos resultados indican que al menos una parte de las vesículas que se acumulan en las células tratadas con benzil GalNAc tienen un pH ácido y sugieren que este fenómeno está relacionado, al nivel mecanístico, con las alteraciones descritas en el procesamiento de la AAG.

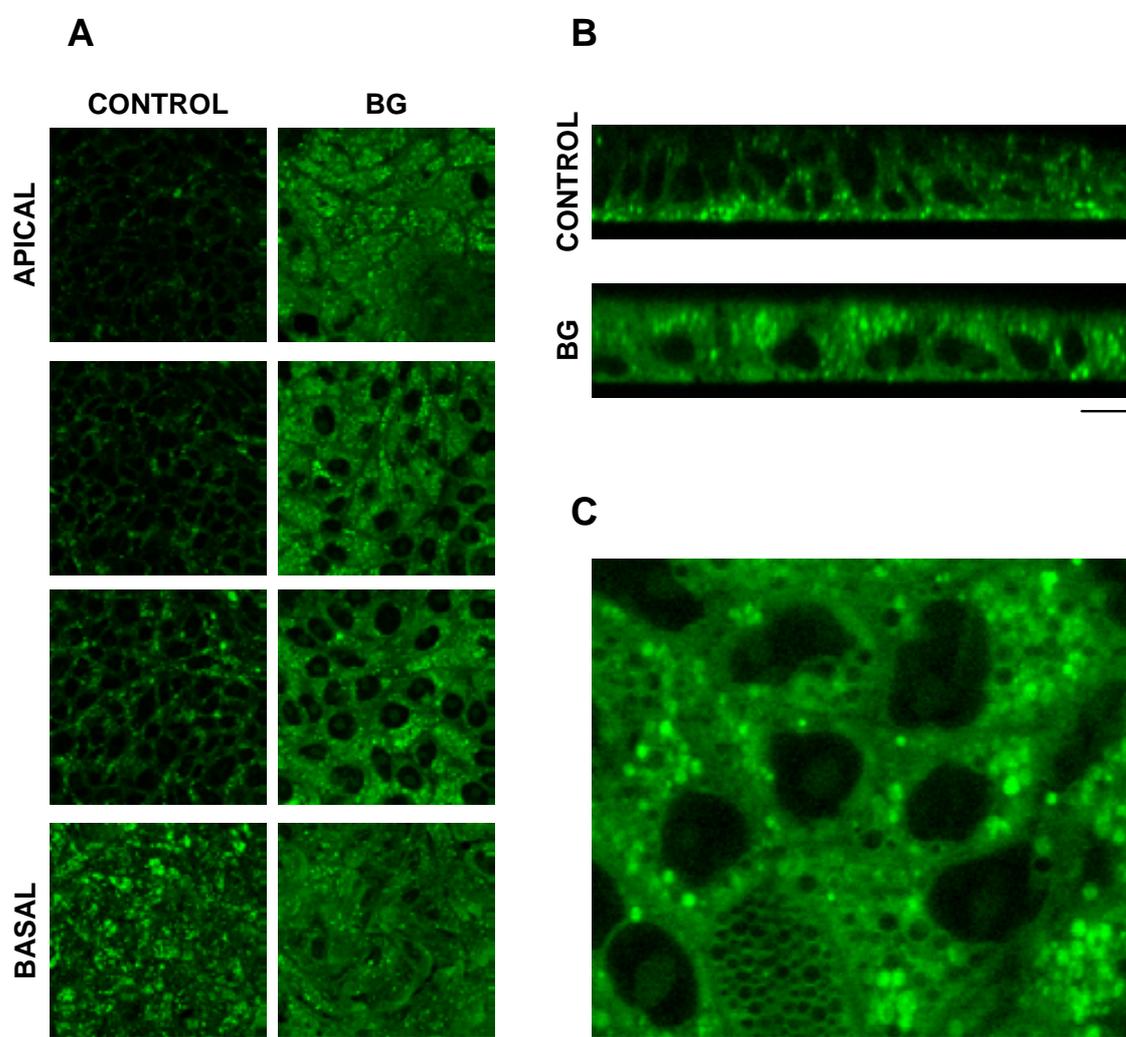


Figura 3.2 El tratamiento con benzil GalNAc induce una acumulación y cambios en la distribución de vesículas ácidas en células HT-29 M6. Secciones transversales (paneles A y C) y verticales (B), obtenidas por microscopía confocal, de células HT-29 M6 cultivadas 15 d en ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM. Las células vivas fueron incubadas durante 30 min con 1 μ M de LysoSensor® green DND-189, el cual se acumula y fluoresce en compartimentos ácidos (para detalles, ver texto). En el panel C se aprecia que solamente algunas vesículas citoplasmáticas acumuladas muestran reactividad a LysoSensor®. Barra de escala: A) 20 μ m, B) 10 μ m, C) 5 μ m

El tratamiento de células HT-29 M6 con benzil GalNAc tiene efectos diferenciales sobre la glicosilación de la DPP-IV y sobre el procesamiento de la α -glucosidasa lisosomal

Una hipótesis subyacente a las alteraciones del tráfico intracelular de glicoproteínas inducidas por el benzil GalNAc es la relacionada con el efecto de los metabolitos celulares derivados de este fármaco. De ser así, cabría proponer que la naturaleza y/o concentración de los metabolitos dependería de la concentración y/o el tiempo de incubación con benzil GalNAc. Ello podría conducir a la afectación diferencial de diversos procesos bioquímicos en la célula (p. ej. maduración de glicoproteínas apicales y de enzimas lisosomales). Así, comparamos el procesamiento de la DPP-IV y de la AAG en células HT-29 M6 cultivadas en la ausencia o presencia de benzil GalNAc durante diferentes tiempos y a distintas concentraciones. Para esto, las células se marcaron con ^{35}S metionina durante 1 hora y al cabo de 24 horas la DPP-IV y la AAG se inmunoprecipitaron mediante anticuerpos específicos. Los inmunoprecipitados se fraccionaron por electroforesis y se visualizaron por autorradiografía.

Primeramente, se analizó el procesamiento de estas dos moléculas en células pretratadas con benzil GalNAc 2 mM durante períodos variables de tiempo antes del marcado metabólico (figura 3.3A). Se debe tener en cuenta que el tiempo total de cultivo en presencia de benzil GalNAc 2mM incluye a los tiempos de pretratamiento indicados en la figura 3.3A más 1 hora de pulso y 24 horas de caza. En las células tratadas con benzil GalNAc se observó un aumento de la movilidad electroforética de la DPP-IV a partir de los 30 min. Curiosamente, la movilidad de la DPP-IV era mayor a tiempos cortos que a tiempos largos de pretratamiento. El procesamiento de la AAG también se vio afectado desde los 30 min, si bien el bloqueo de la maduración y la acumulación de la forma AAG_{bg} solo se observaron en los cultivos pretratados con benzil GalNAc durante 4 días. A tiempos más cortos se detectaban las formas precursora, intermedia y madura de la AAG, si bien las bandas correspondientes eran algo más difusas que en las células control, posiblemente como consecuencia de efectos sobre la glicosilación.

Posteriormente, se analizó el procesamiento de estas dos glicoproteínas en células tratadas con diferentes concentraciones de benzil GalNAc (0,05 - 2 mM) durante las 24 horas previas al marcado metabólico (figura 3.3B). En estas condiciones se observó que el tratamiento con benzil GalNAc afectaba a la movilidad electroforética de la DPP-IV a concentraciones $\geq 0,05$ mM. Por el contrario, el bloqueo parcial del procesamiento de la AAG solamente se observó cuando las células se cultivaron con 2 mM de benzil GalNAc (figura 3.3B). Estos resultados sugieren que la inhibición de la sialilación, indicada por los cambios en la movilidad electroforética de la DPP-IV, no es suficiente para inducir el bloqueo de la maduración de la AAG.

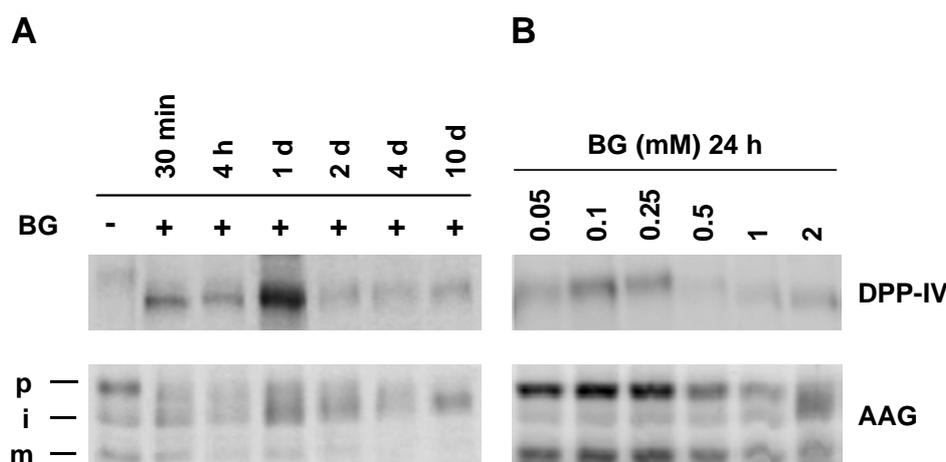


Figura 3.3 Las modificaciones de la glicosilación de la DPP-IV y del procesamiento de la α -glucosidasa lisosomal ocurren en condiciones diferentes de tratamiento con benzil GalNAc.

Panel A: Células HT-29 M6 cultivadas durante 10 días fueron tratadas con benzil GalNAc 2 mM durante los tiempos indicados en la figura, previos a un marcado metabólico de 1 h con ^{35}S Met/Cys y caza de 24 h. Las células fueron lisadas y los inmunoprecipitados, obtenidos usando anticuerpos específicos de la DPP-IV y la AAG, fueron fraccionados por electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 8%. Las moléculas inmunoaisladas se revelaron por autorradiografía. *Panel B:* Células HT-29 M6 cultivadas durante 10 días fueron tratadas con concentraciones variables de benzil GalNAc durante 24 h y, posteriormente, fueron marcadas metabólicamente durante 1 h con ^{35}S Met/Cys y sometidas a una caza de 24 h. El análisis de los inmunoprecipitados se realizó como se ha descrito en el panel A. Se indica la migración de las formas precursora (p), intermedia (i) y madura (m) de la AAG.

Formación de vesículas en células HT-29 M6 tratadas cultivadas a diferentes condiciones de benzil GalNAc

Los resultados anteriores, junto con otros ya publicados (Delannoy et al., 1996; Huet et al., 1995), indican que los efectos sobre la glicosilación de proteínas sintetizadas *de novo* son detectables tras la incubación de células HT-29 M6 con benzil GalNAc durante períodos relativamente cortos de tiempo (24 h). Para determinar la cinética de formación de vesículas, células HT-29 M6 cultivadas durante 10 días que habían alcanzado la confluencia fueron tratadas con benzil GalNAc 2 mM durante diferentes períodos de tiempo y procesadas para su observación por microscopía electrónica. A partir de una 1 hora de tratamiento fue posible distinguir claramente la presencia de pequeñas vesículas hacia la región subapical de las células tratadas con benzil GalNAc. A tiempos mayores de tratamiento aumentaba el número de las vesículas citoplasmáticas (figura 3.4A).

De forma similar, células HT-29 M6 cultivadas durante 10 días fueron tratadas con distintas concentraciones de benzil GalNAc durante 48 horas y procesadas para el análisis ultraestructural. La presencia de vesículas fue aparente en las células tratadas con benzil GalNAc a todas las concentraciones analizadas, observándose una relación directa entre la concentración de la droga y la cantidad de vesículas acumuladas (figura 3.4B).

El conjunto de estos resultados indica que la acumulación de vesículas y los mecanismos conducentes al bloqueo de la sialilación de la DPP-IV no son suficientes para inducir las alteraciones observadas en la maduración de la α -glucosidasa.

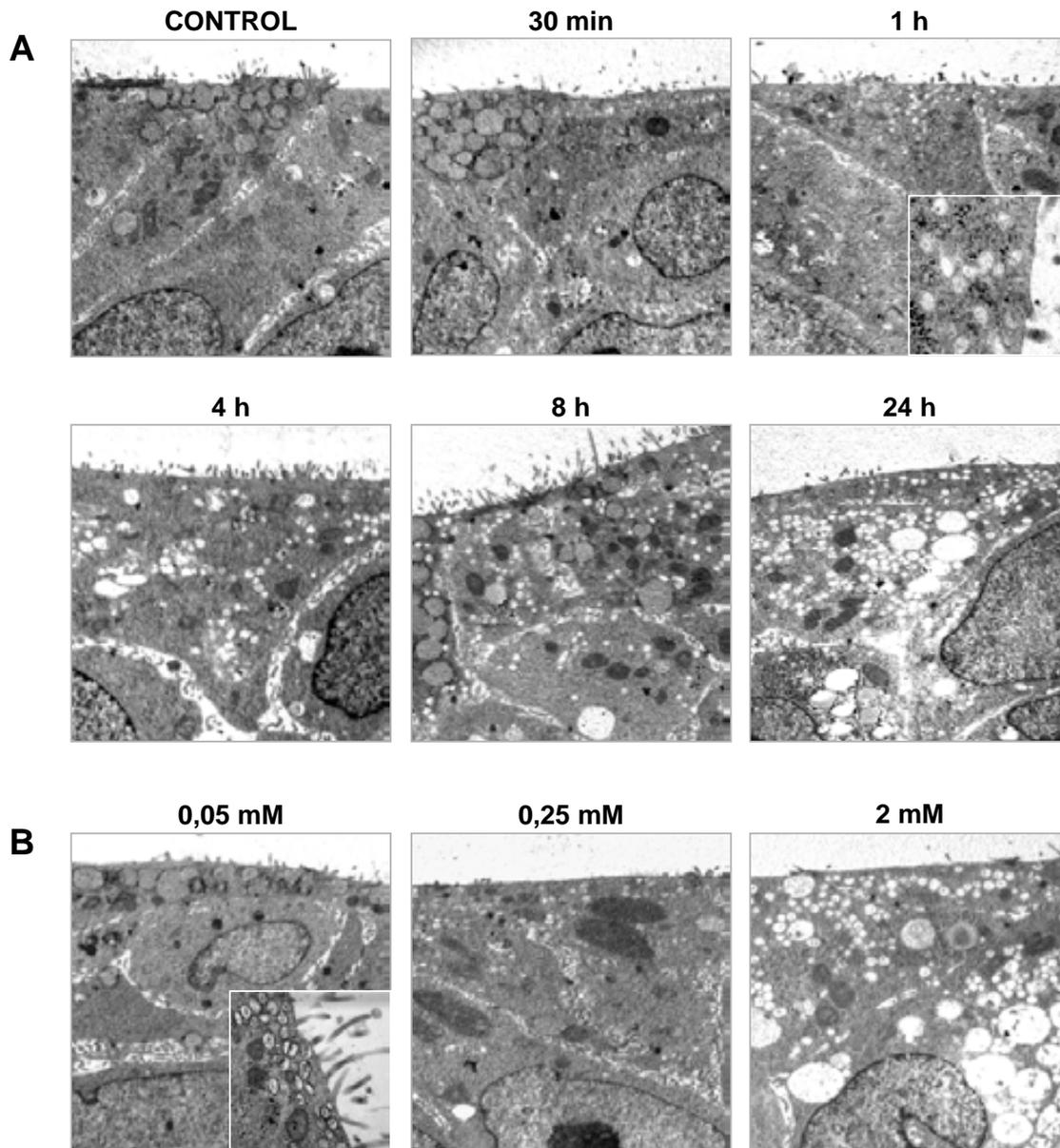


Figura 3.4 Efectos del benzil GalNAc sobre la formación de vesículas en células HT-29 M6. Imágenes de microscopía electrónica obtenidas a partir de secciones ultrafinas de células HT-29 M6 cultivadas 10 días y tratadas con benzil GalNAc 2 mM durante los tiempos indicados (A) o a las concentraciones indicadas durante las 48 h previas a la fijación (B). Barra de escala: 2 μ m.

4. EL TRATAMIENTO CRÓNICO DE CÉLULAS HT-29 M6 E IMIM-PC-1 CON BENZIL GaINAc INDUCE DEFECTOS SIMILARES A LOS QUE OCURREN EN PATOLOGÍAS DE DEPÓSITO LISOSOMAL

INTRODUCCIÓN

Uno de los efectos más destacables del tratamiento crónico de las células HT-29 e IMIM-PC-1 con benzil GaINAc es la acumulación de numerosas vesículas citoplasmáticas que contienen glicoproteínas que normalmente se localizan en la membrana plasmática. Se desconoce tanto la naturaleza de las vesículas como los mecanismos por los cuáles se generan. En un principio se sugirió que estas vesículas podrían derivarse del TGN y hallarse bloqueadas en su tránsito hacia la membrana plasmática. Por otra parte, las modificaciones del procesamiento de enzimas lisosomales presentes en células HT-29 M6 tratadas con benzil GaINAc sugerían que este fármaco podría afectar tanto a la ruta secretora como endosomal.

En este capítulo se describen experimentos cuyos objetivos han sido: *i*) determinar los efectos del benzil GaINAc sobre la secreción y sobre la internalización de proteínas de membrana; *ii*) determinar la identidad de las vesículas que se acumulan en las células tratadas con benzil GaINAc, por medio del análisis de colocalización de glicoproteínas de membrana con marcadores de la ruta secretora y de la ruta endosomal, y *iii*) definir la relación entre la inhibición de la sialilación de proteínas y su acumulación en vesículas.

RESULTADOS

El tratamiento de células HT-29 M6 e IMIM-PC-1 con benzil GaINAc no afecta la tasa global de secreción de proteínas

Estudios previos habían descrito que el tratamiento con benzil GaINAc afecta a la ruta secretora en células HT-29 M6, puesto que inhibe la secreción de mucinas y de la α -glucosidasa lisosomal (Hennebicq-Reig et al., 1998; Huet et al., 1998; Huet et al., 1995; ver artículo sección 3 de Resultados).

En primer lugar, determinamos la secreción "constitutiva" de proteínas en células HT-29 M6 e IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc 2 mM. Las células HT-29 M6 fueron cultivadas durante 15 días en Transwells® para obtener una monocapa impermeable [la impermeabilidad de la monocapa fue determinada midiendo la resistencia al paso de manitol ^{14}C]; posteriormente, fueron cultivadas durante 7 días en medio suplementado con benzil GalNAc 2 mM. Las células IMIM-PC-1 fueron cultivadas 8 días sobre plástico en ausencia o presencia del fármaco. Después de un marcado metabólico con ^{35}S Met/Cys durante 1 hora y una caza de 24 horas, las proteínas de las células y del medio de cultivo fueron precipitadas con TCA y cuantificadas en un contador de centelleo. En ninguno de los casos se observó una reducción notoria de la tasa de secreción proteica en las células tratadas con benzil GalNAc (figura 4.1).

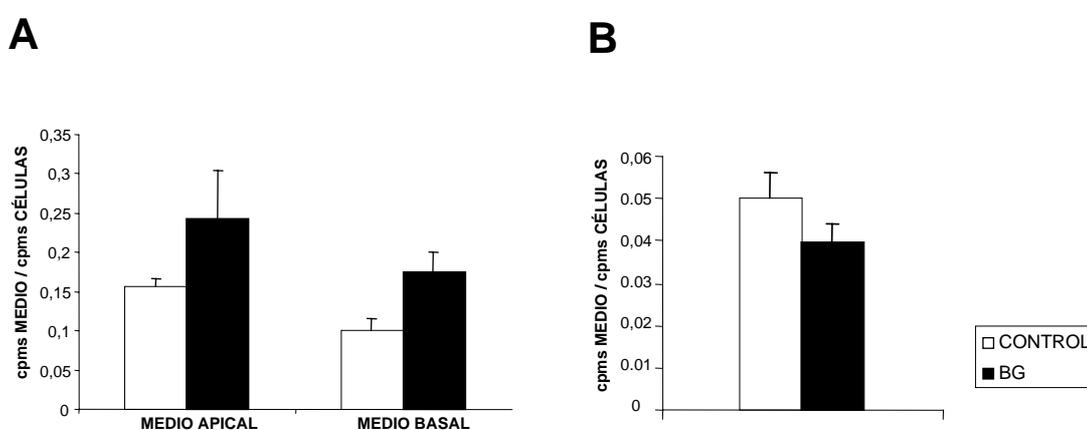


Figura 4.1 El tratamiento con benzil GalNAc no inhibe la secreción global de proteínas en células HT-29 M6 e IMIM-PC-1. *Panel A.* Células HT-29 M6 cultivadas en Transwells® durante 15 días, tratadas o no con benzil GalNAc 2 mM durante 7 días adicionales fueron marcadas con ^{35}S Met/Cys durante 1 hora y, al cabo de 24 horas, los medios de cultivo de los compartimentos apical y basolateral fueron recogidos y las células fueron lisadas con tampón RIPA. Posteriormente, las proteínas de los medios de cultivo y de los extractos celulares fueron precipitadas con TCA y cuantificadas en un contador de centelleo. *Panel B.* Células IMIM-PC-1 fueron cultivadas sobre plástico durante 8 días en la ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM, marcadas con ^{35}S Met/Cys durante 1 hora y, al cabo de 24 horas, los medios de cultivo y las células fueron procesados según se describe en el panel A.

El tratamiento de células IMIM-PC-1 con benzil GalNAc modifica la endocitosis de glicoproteínas de membrana plasmática

Para los siguientes estudios se usaron las células IMIM-PC-1 como modelo debido a que son más fáciles de manipular que las células HT-29 M6 y, por ser más aplanadas que éstas, ofrecen mejor resolución en análisis de localización de estructuras subcelulares por fluorescencia. Para determinar si el tratamiento con benzil GalNAc afectaba a la tasa de endocitosis de células IMIM-PC-1, se cuantificó la internalización de proteínas de membrana en células cultivadas en presencia o ausencia del fármaco. Para ello, las proteínas de membrana fueron marcadas con sulfo-SS-biotina en frío. Posteriormente, las células se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante diferentes tiempos, se eliminó la biotina

remanente en la membrana plasmática mediante incubaciones con glutatión-SH y las proteínas internalizadas marcadas con biotina fueron reveladas por *western blot* empleando estreptavidina-peroxidasa. El análisis densitométrico cuantitativo mostró que, la tasa de internalización de proteínas de membrana es menor en las células tratadas con benzil GalNAc. Sin embargo, a partir de las 4h hasta las 24h de internalización, las células tratadas con benzil GalNAc acumulaban una proporción más alta del material internalizado que las células control (figura 4.2). Este resultado sugiere una retención del material endocitado en las células IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc.

Internalización de proteínas de membrana en células IMIM-PC-1

Tiempo de internalización	Control ¹	Benzil GalNAc ¹	Benzil GalNAc / Control
5 min	30,4	16,0	0,53
10 min	36,7	25,7	0,70
30 min	45,6	30,0	0,66
1 h	22,3	13,0	0,58
2 h	15,0	7,3	0,49
4 h	5,6	16,1	2,88
24 h	0,4	2,2	5,5

(1) Proteína localizada en la membrana al momento del pulso = 100%

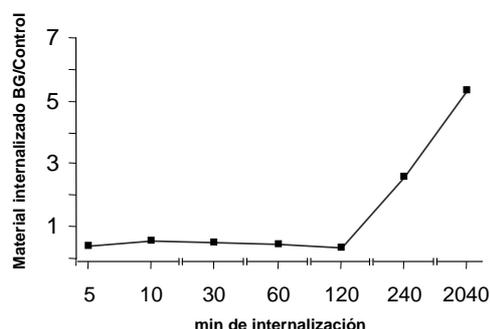
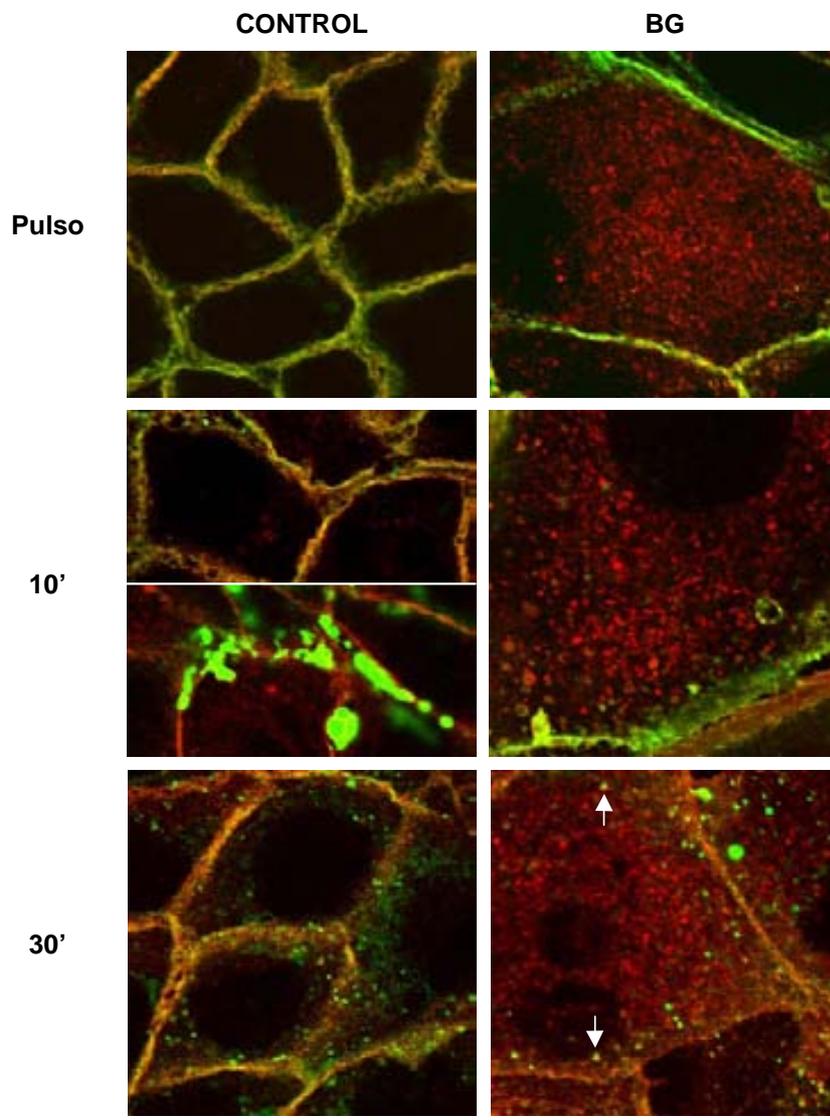


Figura 4.2 El tratamiento con benzil GalNAc afecta a la internalización de proteínas de membrana en células IMIM-PC-1. Las proteínas de membrana de células IMIM-PC-1 cultivadas durante 8 días en ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM fueron marcadas en frío con sulfo-S-S-biotina. Posteriormente, se permitió que internalizaran a 37 °C durante diferentes tiempos y la biotina remanente en la membrana plasmática fue eliminada mediante 2 incubaciones con glutatión-SH 60 mM en PBS en frío. Las células fueron lisadas con RIPA y los extractos celulares fueron fraccionados por electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 7%. Las proteínas biotiniladas fueron detectadas con estreptavidina-peroxidasa y la señal obtenida fue cuantificada por densitometría. Los valores que se citan en la tabla adjunta son expresados como porcentaje de proteína internalizada con respecto a la proteína localizada en la membrana al momento del pulso. La gráfica muestra el índice relativo de acumulación de material endocitado en las células tratadas con benzil GalNAc con respecto a las células control. Este índice sería igual a 1 si la endocitosis fuese igual en ambas condiciones de cultivo.

Los compartimentos donde se acumulan glicoproteínas en células IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc reciben material endocitado

Para determinar el destino de las proteínas de membrana internalizadas en células IMIM-PC-1 cultivadas durante 8 días en ausencia o presencia de benzil GalNAc, éstas se marcaron con sulfo-biotina en frío. Posteriormente, se permitió la internalización incubando las células a 37 °C durante períodos variables de tiempo. La distribución de las proteínas marcadas con biotina se determinó por fluorescencia mediante estreptavidina conjugada a un fluorocromo. En células control, a tiempos cortos de internalización (5 – 10 min), la señal mayoritaria era de membrana. En aproximadamente un 30 - 50 % de células se observó una importante acumulación de material en vesículas de gran tamaño (figura 4.3). A los 30 y 60 min de internalización, se pudo observar en casi la totalidad de las

células la acumulación progresiva de vesículas citoplasmáticas, cuyo número disminuía paulatinamente a mayores tiempos de internalización (figura 4.3). En células tratadas con benzil GalNAc, la señal detectada a tiempos cortos de internalización (5 – 10 min) se localizaba también fundamentalmente en la membrana plasmática. Al igual que en las células no tratadas, a partir de los 30 min de internalización se observó la acumulación de vesículas endocíticas en la mayoría de las células cultivadas en presencia de benzil GalNAc. A diferencia de las células control, el número y el tamaño de algunas de estas vesículas aumentaba a medida que pasaba el tiempo de incubación. A partir de las 2 horas se observó una mayor acumulación de vesículas en el citoplasma de células tratadas con benzil GalNAc que en las células control (figura 4.3).



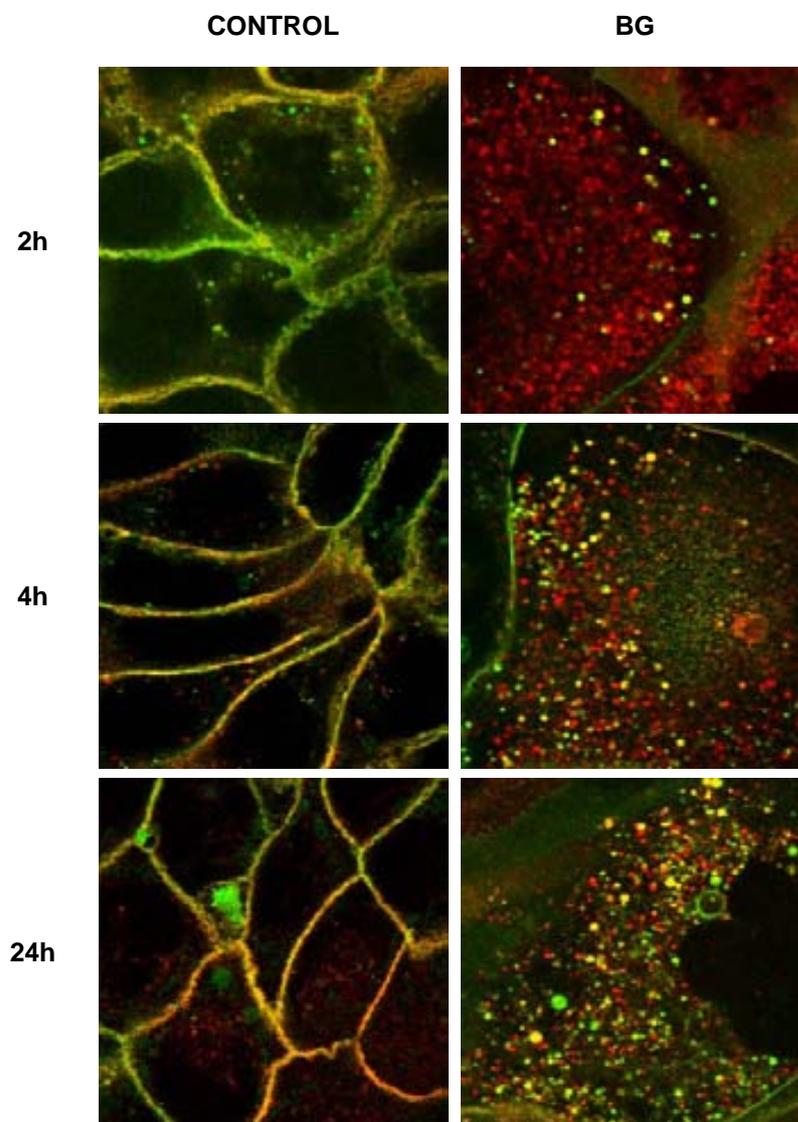
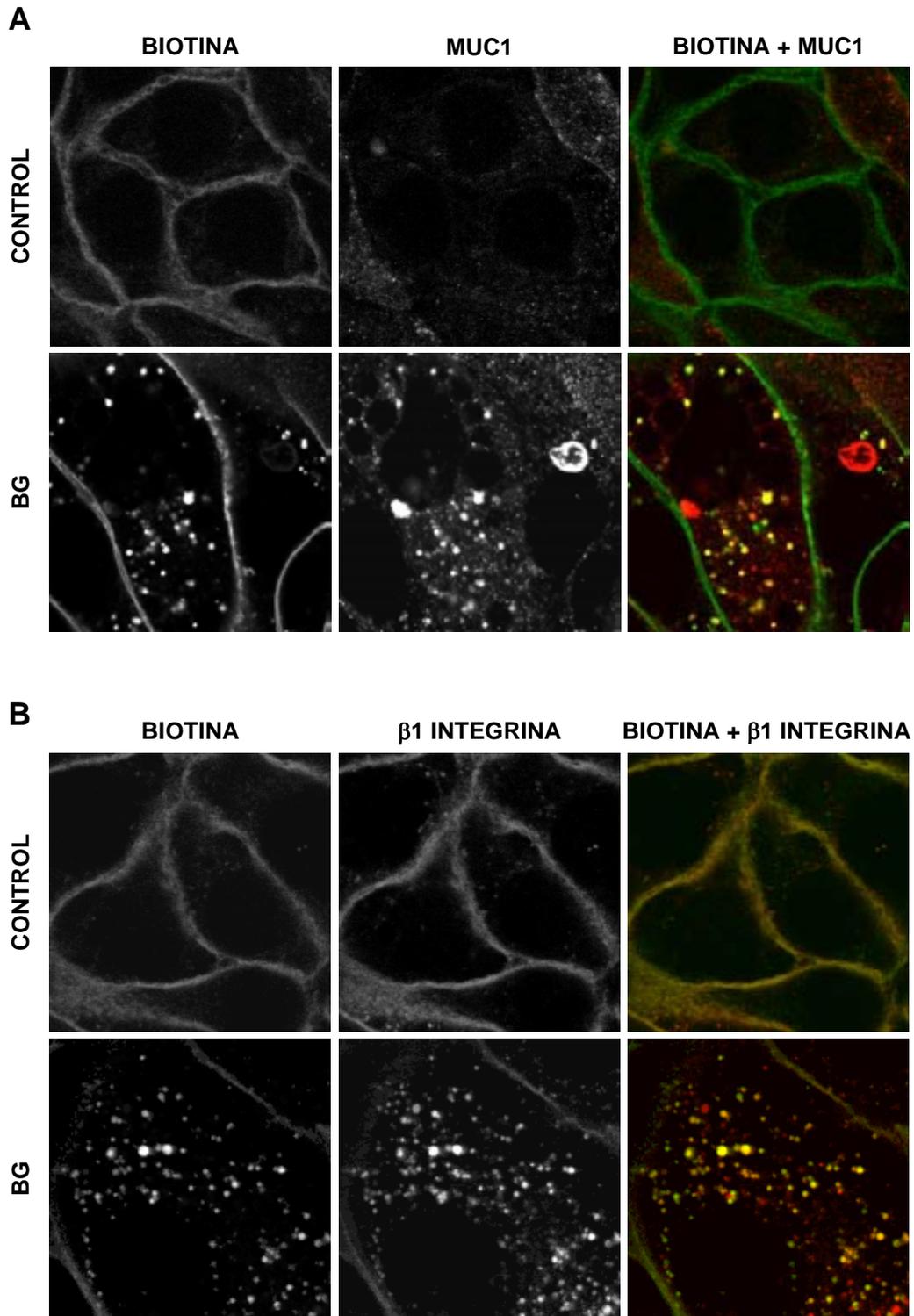


Figura 4.3 El tratamiento de las células IMIM-PC-1 con benzil GalNAc induce la acumulación intracelular de proteínas de la membrana plasmática. Secciones transversales obtenidas por microscopía confocal de células IMIM-PC-1 cultivadas sobre cubreobjetos durante 8 días en ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM. Las proteínas de la membrana plasmática fueron marcadas en frío con biotina; posteriormente, las células fueron incubadas a 37 °C durante los tiempos indicados, fijadas con PFA al 4%, permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,5% en PBS-BSA 1% e incubadas con estreptavidina-FITC para detectar la biotina (verde) y con un anticuerpo que detecta $\beta 1$ integrina (TS2/16) (rojo). Nótese la acumulación intracelular de material biotinilado en células tratadas con benzil GalNAc, el cual colocaliza parcialmente con $\beta 1$ integrina a partir de los 30 min de incubación (flechas). Barra de escala: 10 μ m.

En células tratadas con benzil GalNAc, se pudo observar que el material acumulado en vesículas colocalizaba con MUC1 o $\beta 1$ integrina (figura 4.4).



Esta colocalización fue detectada a partir de los 30 min de internalización. Se observó un aumento progresivo de la distribución de las glicoproteínas de membrana endocitadas en las vesículas que acumulaban MUC1 o β 1 integrina (figura 4.3). Estos resultados indican que los compartimentos donde se acumulan glicoproteínas en células IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc reciben material internalizado proveniente de la membrana plasmática.

Análisis en células tratadas con benzil GalNAc en las que se dejó internalizar las proteínas de membrana biotiniladas durante 24 horas, y marcadas con anticuerpos que detectan MUC1 y β 1 integrina y con estreptavidina-FITC, mostraron una notable heterogeneidad en el marcado de las vesículas citoplasmáticas (figura 4.5), resultado que sugiere que éstas podrían corresponder a un conjunto de subpoblaciones diferentes.

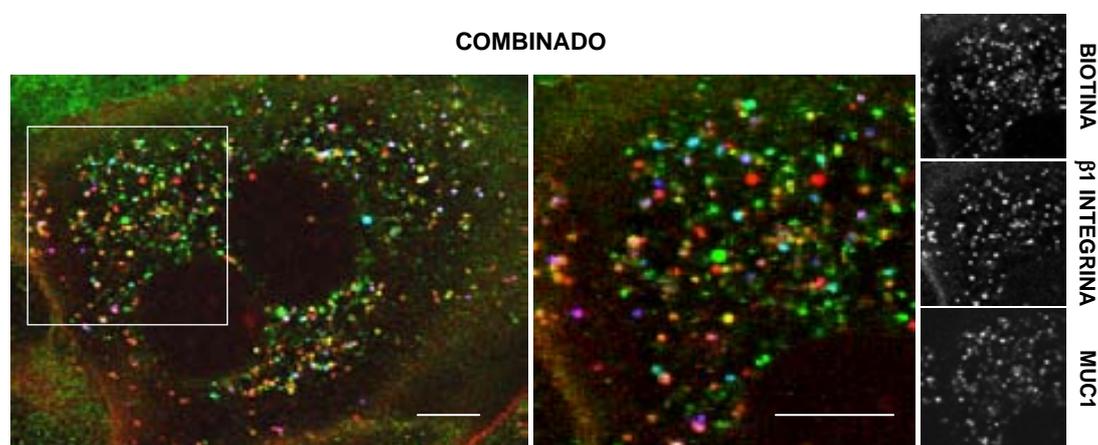


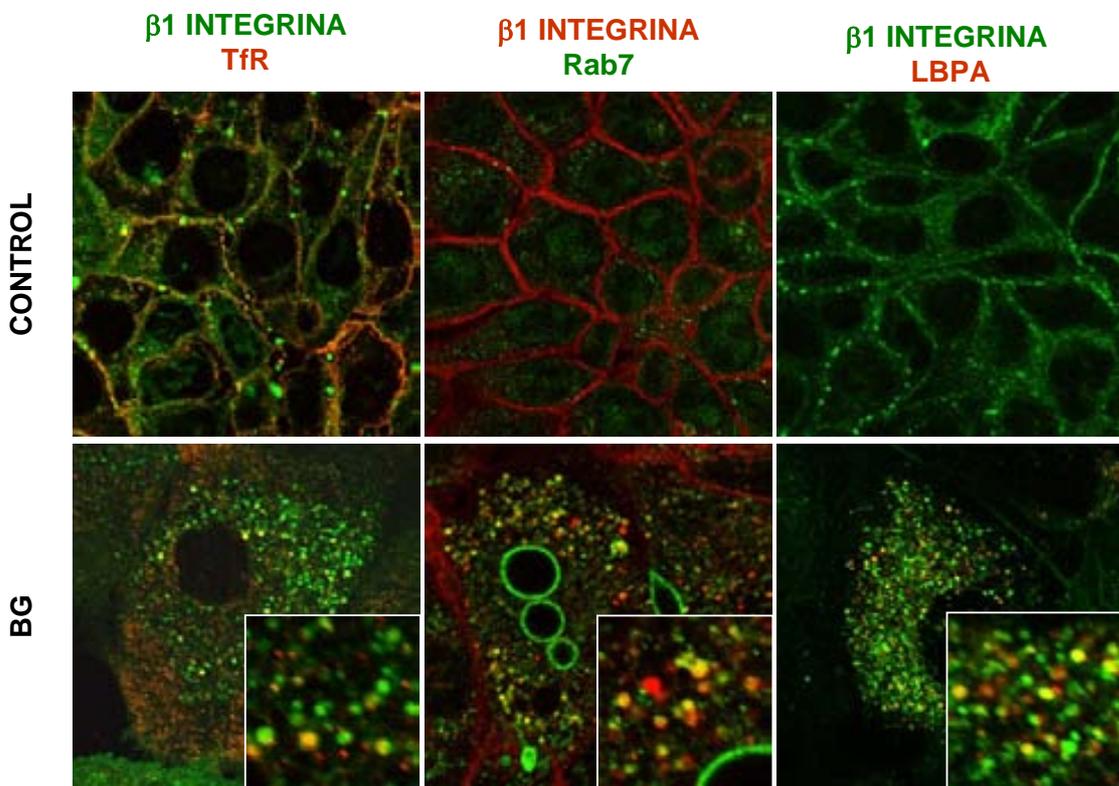
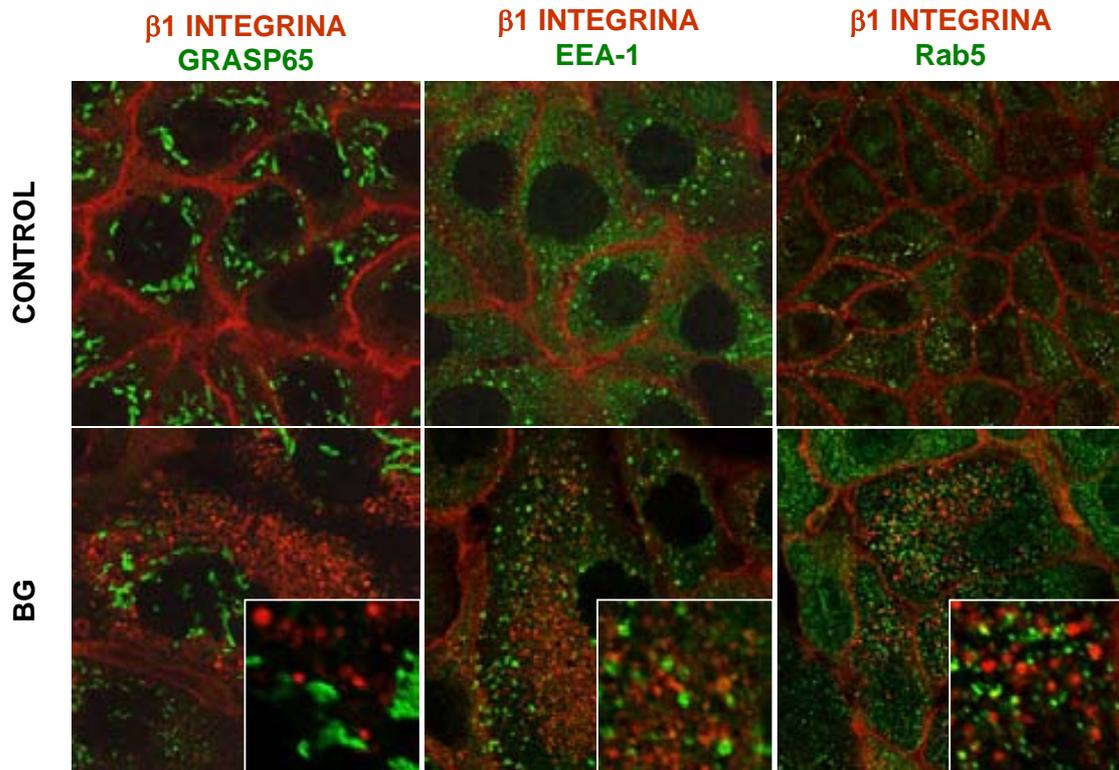
Figura 4.5 Las vesículas que se acumulan en el citoplasma de células tratadas con benzil GalNAc constituyen una población heterogénea. Secciones transversales obtenidas por microscopía confocal de células IMIM-PC-1 cultivadas sobre cubreobjetos durante 8 días en ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM. Las proteínas de la membrana plasmática fueron marcadas en frío con biotina y, posteriormente, las células fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas y fueron procesadas según se indica en el pie de la figura 4.3. Las células fueron incubadas con estreptavidina-TRITC (rojo), y anticuerpos que detectan MUC1 (azul) y β 1 integrina (verde). Barra de escala: 10 μ m.

Figura 4.4 En células IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc, los compartimentos que acumulan glicoproteínas reciben material endocitado. Secciones transversales obtenidas por microscopía confocal de células IMIM-PC-1 cultivadas sobre cubreobjetos durante 8 días en ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM. Las proteínas de la membrana plasmáticas fueron marcadas en frío con biotina y, posteriormente, las células fueron incubadas a 37 °C durante 4 horas y fueron procesadas según se indica en el pie de la figura 4.3. Adicionalmente, las células se incubaron con anticuerpos que detectan MUC1 (A) o β 1-integrina (B) (rojo). Para más detalles, ver anexo de Materiales y Métodos. Barra de escala: 10 μ m.

En células IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc, las vesículas donde se acumula β 1 integrina colocalizan con marcadores de endosomas tardíos

Para determinar la identidad de las vesículas cuya acumulación se induce por el tratamiento con benzil GalNAc, se analizó la colocalización de β 1 integrina con marcadores de compartimentos de las rutas secretora y endosomal en células IMIM-PC-1 cultivadas 8 días en ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM. No se detectó una colocalización apreciable de proteínas del *cis* y *trans*-Golgi (GRASP65 y TGN46, respectivamente) o de endosomas tempranos (EEA1 y Rab 5) con β 1 integrina. Notoriamente, TGN46 se localizaba en vesículas citoplasmáticas, negativas para β 1 integrina, en un 20 - 40% de células. La señal que detectamos para la proteína MAL, un marcador de estructuras de transporte apical, fue demasiado débil para obtener documentación aceptable y realizar análisis de colocalización. No obstante, tanto en células control como tratadas con benzil GalNAc, su distribución era compatible con una localización apical y no con una acumulación en vesículas citoplasmáticas. Por el contrario, la β 1 integrina colocalizaba parcialmente con marcadores de endosomas tardíos como Rab7 y el lípido LBPA (figura 4.6). Se ha de destacar que algunas vesículas positivas para β 1 integrina eran negativas para Rab7 o LBPA y viceversa, lo que sugiere la existencia de varias subpoblaciones de estas vesículas. La distribución del TfR resultó muy afectada por el tratamiento con benzil GalNAc. Así, mientras que en las células control esta proteína se localizaba en la membrana plasmática y en estructuras citoplasmáticas (presumiblemente endosomas tempranos y de reciclaje), en células tratadas se distribuía completamente en vesículas citoplasmáticas, algunas de las cuales correspondían a aquellas positivas para β 1 integrina. Lastimosamente, la señal obtenida con los marcadores de lisosomas, lamp-1 y lamp-2, no fue lo suficientemente intensa como para evaluar su distribución. No obstante, se detectó una colocalización parcial entre β 1 integrina y la catepsina D, lo que, como será discutido más adelante, no revela necesariamente una identidad lisosomal (no mostrado).

Figura 4.6 Marcadores de endosomas tardíos colocalizan con las vesículas donde se acumula β -1 integrina en células IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc. Secciones transversales obtenidas por microscopía confocal de células IMIM-PC-1 cultivadas sobre cubreobjetos durante 8 días en ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM. Las células fueron fijadas con PFA al 4%, permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,5% en PBS-BSA 1% (saponina al 0,05% en PBS-BSA 1% en el caso del marcaje para LBPA) e incubadas con un anticuerpo que detecta β 1 integrina y las moléculas indicadas (para detalles, ver anexo de Materiales y Métodos). Nótese que los marcadores de endosomas tardíos Rab7 y LBPA colocalizan parcialmente con las vesículas que acumulan β 1 integrina. Barra de escala: 12 μ m, recuadro: 5 μ m.



Los análisis de inmunofluorescencia indicaron que el tratamiento con benzil GalNAc indujo cambios en los niveles de diversos marcadores. Así, se detectó un importante aumento de los niveles de Rab7 y de LBPA, así como un incremento más moderado de Rab5 y catepsina D. El caso del LBPA fue especialmente llamativo porque este lípido era casi indetectable en las células control. Para corroborar estas observaciones, se realizaron análisis de los niveles de proteínas marcadoras de distintos compartimentos por *western blot*. No se detectaron cambios apreciables en la cantidad de p115 y Rab5 en células tratadas con benzil GalNAc; por el contrario, se observó un descenso de los niveles de EEA1 y un importante aumento de los de Rab7 (figura 4.7).

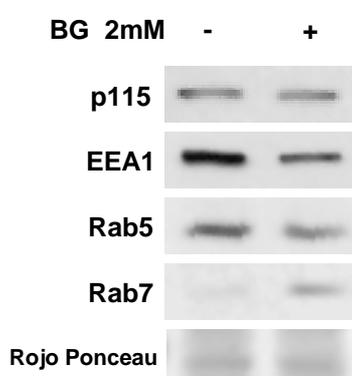


Figura 4.7 El tratamiento con benzil GalNAc en células IMIM-PC-1 modifica los niveles totales de Rab 7 y EEA1. *Western blot* realizado con de 30 μ g de extractos proteicos totales provenientes de células IMIM-PC-1 cultivadas durante 8 días en ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM. Las células fueron lisadas con RIPA y los extractos proteicos fueron fraccionados por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 7% (p115 y EEA1) o al 12 % (Rabs), transferidos a membranas de nitrocelulosa e incubados con anticuerpos específicos. Nótese que el tratamiento con benzil GalNAc induce el descenso de EEA1 o aumento de Rab7, pero no afecta los niveles de la proteína asociada al Golgi p115 o de Rab5.

Tomados en conjunto, estos resultados indican que las vesículas donde se acumulan glicoproteínas en células IMIM-PC-1 corresponden a compartimentos endosomales y que una fracción de las vesículas acumuladas contiene también marcadores de endosomas tardíos.

El tratamiento con benzil GalNAc modifica la distribución de colesterol en células HT-29 M6 e IMIM-PC-1

El tratamiento con benzil GalNAc causa en células IMIM-PC-1 un incremento en los niveles de LBPA, un lípido que ha sido implicado en la regulación de la distribución del colesterol intracelular (Kobayashi et al., 1999). Para determinar si el tratamiento con benzil GalNAc afectaba la distribución del colesterol se realizaron tinciones con filipina, un antibiótico que al unirse al colesterol fluoresce en el rango del ultravioleta. El tratamiento con benzil GalNAc 2 mM indujo cambios en la distribución de colesterol tanto en células IMIM-PC-1 como HT-29 M6. En ambos tipos celulares se observó en la mayoría de las células tratadas un aumento de la señal citoplasmática de filipina respecto de las células control (figura 4.8).

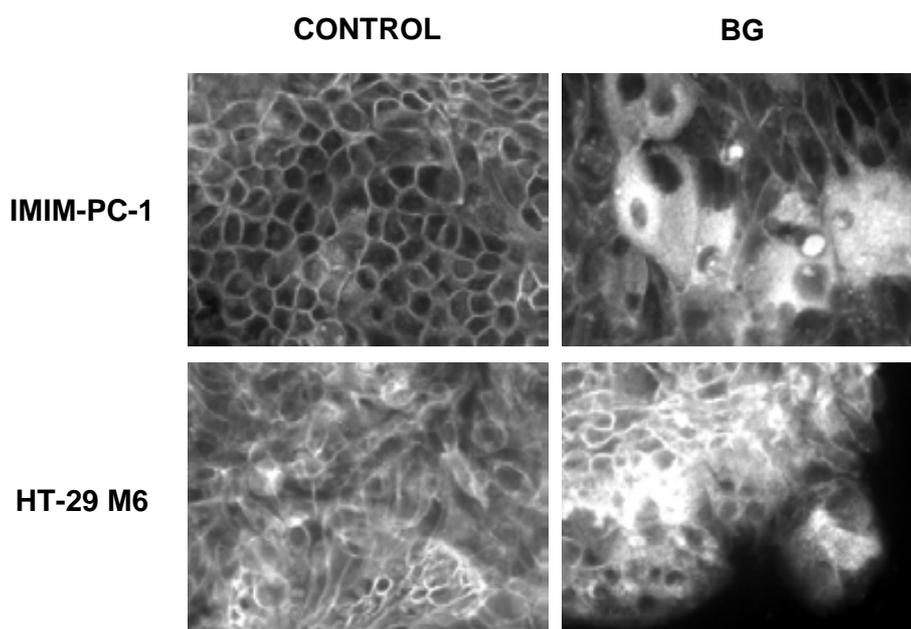


Figura 4.8 El tratamiento con benzil GalNAc induce cambios en la distribución de colesterol. Imágenes de microscopía de fluorescencia convencional de células IMIM-PC-1 y HT-29 M6 cultivadas en ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM y teñidas con filipina, la cual fluoresce cuando está unida a colesterol (para detalles, ver anexo de Materiales y Métodos).

Las alteraciones en el procesamiento de la α -glucosidasa ácida en fibroblastos ISSD recuerdan aquellas que ocurren en células HT-29 M6 tratadas con benzil GalNAc

Los efectos del benzil GalNAc sobre los compartimentos endosomales y la distribución de colesterol recuerdan, en parte, al fenotipo descrito en células de pacientes con enfermedades de depósito lisosomal (EDL). Por otro lado, se han descrito defectos en el procesamiento de la catepsina B en fibroblastos provenientes de pacientes con *infantile sialic acid storage disease* (ISSD) (Schmid et al., 1999), una enfermedad autosómica recesiva en la que se acumula ácido siálico causada por una deficiencia en el transportador lisosomal de ácido siálico (Tietze et al., 1989; revisado en Aula y Gahl, 2001; ver Introducción sección 3.4.1). Estos defectos son similares a los observados en el procesamiento de la catepsina D en células HT-29 M6 tratadas con benzil GalNAc (ver artículo sección 3 de Resultados). Para determinar si en fibroblastos de pacientes afectados de ISSD el procesamiento de la α -glucosidasa también estaba alterado, se realizaron experimentos de marcado metabólico con fibroblastos provenientes de un paciente de ISSD y de sus padres, no afectados por la enfermedad. Tras un pulso de 1 h y caza de 1 h se detectó solamente la forma precursora de la α -glucosidasa, tanto en fibroblastos normales como en los de pacientes con ISSD. En todos los casos, la forma precursora tenía una movilidad electroforética similar. A las 4 horas de caza, la α -glucosidasa era procesada en ambos tipos de fibroblastos; sin embargo, en fibroblastos ISSD la forma intermedia presentaba un ligero *smear* cuya movilidad electroforética era superior a la de la

forma intermedia de fibroblastos normales. Esta forma recuerda la observada en células HT-29 M6 tratadas con benzil GalNAc (ver artículo sección 2). Finalmente, a las 24 horas de caza, se detectaron las formas intermedia y madura en fibroblastos normales e ISSD, no apreciándose diferencias notables en su movilidad electroforética en ambos tipos celulares (figura 4.9). Estos resultados indican que, en células de pacientes con ISSD, se produce una acumulación transitoria de una forma de α -glucosidasa cuya movilidad es similar a la de las células HT-29 M6 tratadas con benzil GalNAc.

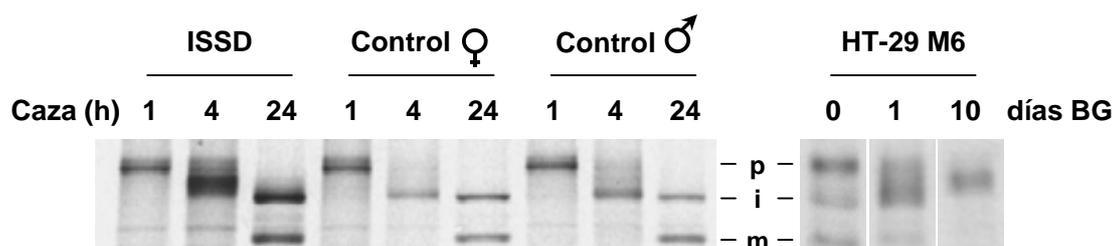


Figura 4.9 El procesamiento de la α -glucosidasa lisosomal está alterado en fibroblastos de pacientes con ISSD de forma similar a como se altera en células HT-29 M6 tratadas con benzil GalNAc. Fibroblastos provenientes de un paciente de ISSD y de sus padres portadores sanos fueron marcados metabólicamente con ^{35}S Met/Cys durante 1 h y lisados a los tiempos indicados. Los lisados celulares fueron incubados con anticuerpos anti- α -glucosidasa lisosomal (AAG) y las moléculas inmunoprecipitadas fueron fraccionadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 8% y reveladas por autorradiografía. Se indica la migración de las formas precursora (p), intermedia (i) y madura (m) de la AAG.

El tratamiento con sacarosa reproduce el fenotipo inducido por el tratamiento con benzil GalNAc en células IMIM-PC-1. El conjunto de resultados descritos anteriormente sugería que el tratamiento con benzil GalNAc inducía algunos defectos análogos a los descritos en células provenientes de pacientes con EDL. El tratamiento con sacarosa ha sido usado para el estudio de los mecanismos implicados en el fenotipo de depósito lisosomal en varios tipos celulares, ya que esta molécula origina la acumulación de vesículas citoplasmáticas electrón-lúcidas, denominadas sacarosomas (Karageorgos et al., 1997; DeCourcy y Storrie, 1991; Cohn y Ehrenreich, 1969), cuya morfología es similar a de las vesículas que se acumulan por el tratamiento con benzil GalNAc. Por otra parte, el tratamiento de fibroblastos con sacarosa induce defectos en el procesamiento de la catepsina B semejantes a los encontrados en fibroblastos ISSD (Schmid et al., 1999). Para determinar si este fenotipo también se acompañaba de la acumulación intracelular de glicoproteínas de membrana, células IMIM-PC-1 fueron cultivadas 8 días en presencia de sacarosa 50 y 100 mM. Las células tratadas mostraban una morfología parecida a la de aquéllas tratadas con benzil GalNAc (figura 4.11A). El análisis de la distribución de MUC1 y $\beta 1$ integrina mostró que estas glicoproteínas se acumulaban en las células cultivadas en presencia de sacarosa (figura 4.12B y C), especialmente a 100 mM. Al igual que ocurre con las células tratadas con benzil GalNAc, no todas las células tratadas con sacarosa acumulaban MUC1.

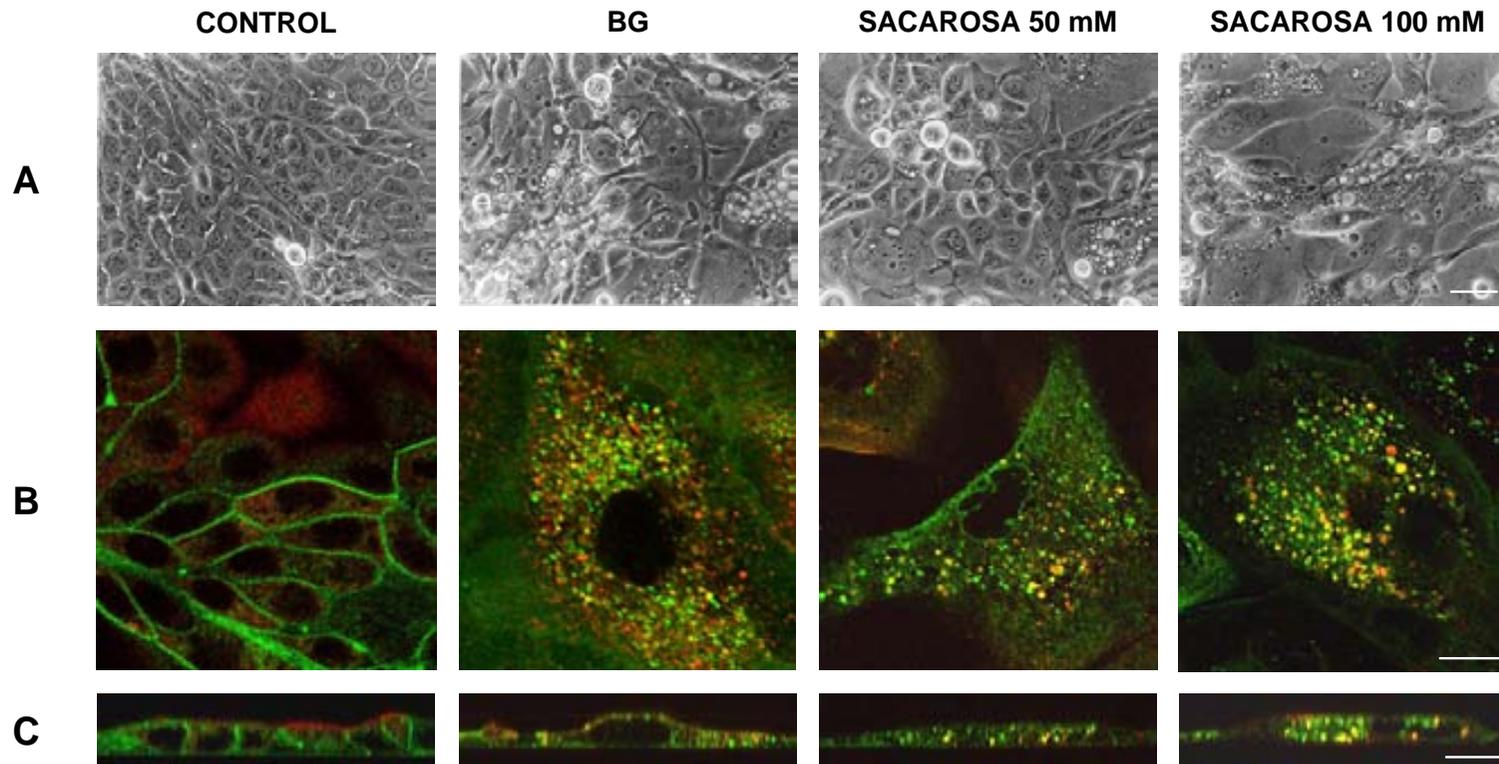


Figura 4.10 El tratamiento con sacarosa induce un fenotipo similar al inducido por el benzil GalNAc en células IMIM-PC-1. *Panel A.* Imágenes de microscopía de contraste de fases de células IMIM-PC-1 cultivadas 8 días en la ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM o sacarosa 50 o 100 mM. Barra de escala: 50 μ m. *Paneles B y C.* Secciones transversales (B) y verticales (C) obtenidas por microscopía confocal de células IMIM-PC-1 cultivadas sobre cubreobjetos durante 8 días en la ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM o sacarosa 50 o 100 mM. Las células fueron entonces fijadas con PFA al 4%, permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,5% en PBS-BSA 1% e incubadas con anticuerpos que detectan MUC1 (rojo) o β 1-integrina (verde). El tratamiento con sacarosa induce la acumulación intracelular de MUC1 y β 1 integrina de forma similar a lo observado en las células tratadas con benzil GalNAc. Barra de escala: 20 μ m.

En células cultivadas en presencia de sacarosa 50 mM no se detectaron cambios en la reactividad de las lectinas MAL, SNA y PNA, indicando la ausencia de efectos sobre la sialilación en $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$. Por otra parte, las células cultivadas en presencia de sacarosa 50 mM acumulaban intracelularmente material reactivo para la lectina MAL. Estos resultados indican que los mecanismos que originan el fenotipo descrito en células HT-29 e IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc son similares a aquéllos que producen el fenotipo de células provenientes de EDL y que la acumulación intracelular de glicoproteínas de membrana no requiere de cambios en la sialilación.

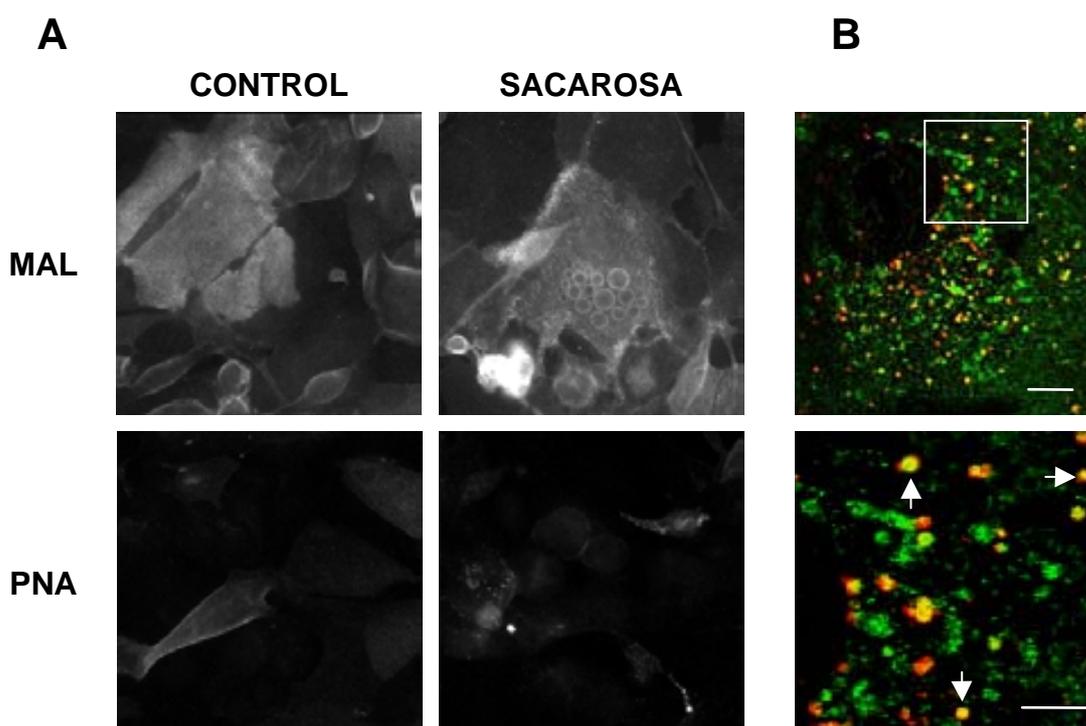


Figura 4.11 En células IMIM-PC-1 tratadas con sacarosa, las vesículas que acumulan MUC1 contienen material sialilado. *Panel A.* Fluorescencia de células IMIM-PC-1 cultivadas sobre cubreobjetos durante 8 días en ausencia o presencia de sacarosa 50 mM. Las células fueron fijadas con PFA al 4%, permeablizadas con saponina al 0,1% en PBS-BSA 1% e incubadas con las lectinas indicadas. El tratamiento con sacarosa no induce cambios importantes de la reactividad de las células a las lectinas analizadas. *Panel B.* Secciones transversales obtenidas por microscopía confocal de células IMIM-PC-1 cultivadas sobre cubreobjetos durante 8 días en presencia, o no, de sacarosa 50 mM. Las células fueron procesadas según se describe en el panel A e incubadas con un anticuerpo anti-MUC1 y la lectina MAL. Nótese que algunas vesículas son positivas tanto para MUC1 como para MAL (flechas). Barra de escala: panel B superior: 10 μ m, panel B inferior 5 μ m.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Las preguntas principales que hemos planteado en este trabajo son: ¿cuál es el espectro de efectos del benzil GalNAc en diferentes tipos celulares? y ¿cómo un inhibidor de glicosilación como el benzil GalNAc produce tantos efectos diferentes?.

Los estudios realizados en células HT-29 apoyan la idea de que la metabolización de este análogo de azúcar a benzil GalNAc-Gal en las células constituye un aspecto central de su mecanismo de acción. Esta molécula puede ser usada como aceptor, e inhibidor competitivo, de una gran variedad de glicosiltransferasas conduciendo así a efectos pleiotrópicos (ver Introducción sección 4.4). Sobre la base de estas observaciones hemos propuesto dos hipótesis (ver figura 1):

i) la inhibición de la sialilación de glicoproteínas es responsable del fenotipo global "benzil GalNAc" debido, sobre todo, a un posible requerimiento de la presencia de ácido siálico en las glicoproteínas para su transporte/*sorting* a la membrana plasmática.

ii) la acumulación de metabolitos glicosilados derivados del benzil GalNAc originaría el conjunto de efectos descritos, posiblemente a través de mecanismos análogos a los que conducen a los defectos observados en células con deficiencias de depósito lisosomal.

La discusión de este trabajo se hará a la luz de estas dos hipótesis. Primeramente, nos referiremos a las evidencias que, a nuestro criterio, permiten descartar la idea de que defectos en la glicosilación conducen a la acumulación intracelular de glicoproteínas de membrana y al resto de efectos descritos en células tratadas con benzil GalNAc. Posteriormente, discutiremos sus efectos sobre el sistema endosomal, su analogía con las anomalías descritas en células de ciertas patologías de depósito lisosomal causadas por la acumulación de sacáridos en compartimentos endocíticos y la posibilidad de que la acumulación de los metabolitos glicosilados derivados del benzil GalNAc sean los responsables del desarrollo del fenotipo global de las células tratadas con esta droga. Finalmente, especularemos acerca de los posibles mecanismos a través de los cuales la acumulación de metabolitos glicosilados podría originar los defectos descritos en células tratadas con benzil GalNAc y/o en células con patologías de depósito lisosomal.

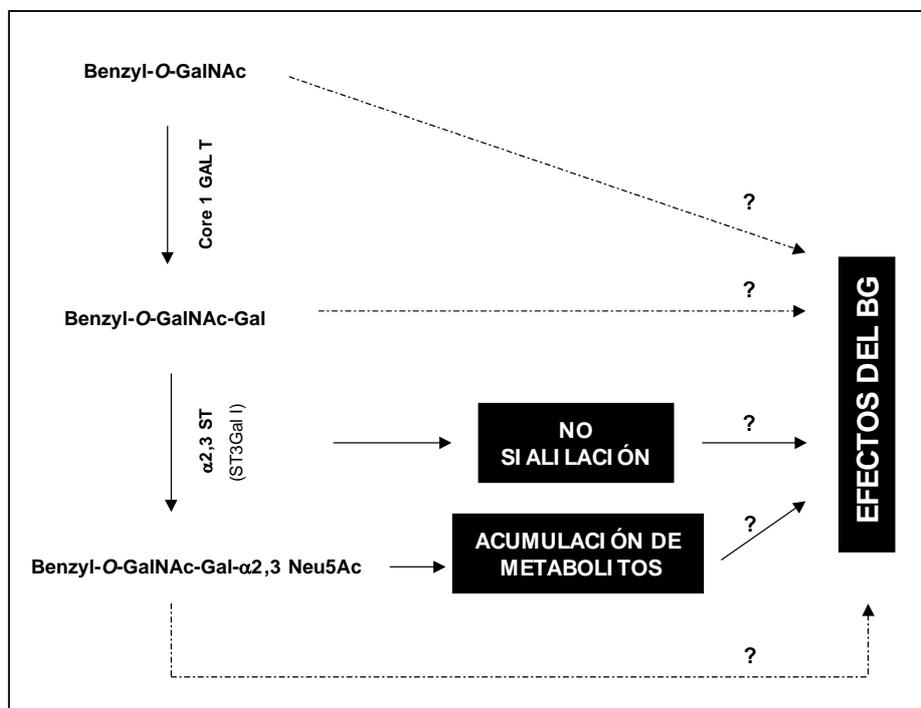


Figura 1. Los efectos del benzil GalNAc pueden originarse por múltiples vías. En la presente discusión se analizan dos de ellas: la hiposialilación de glicoproteínas y la acumulación de metabolitos glicosilados derivados del benzil GalNAc.

I. La hiposialilación de glicoproteínas no explica el conjunto de efectos producidos por el tratamiento crónico con benzil GalNAc en células HT-29 M6 e IMIM-PC-1

Reducción de la sialilación y acumulación intracelular de glicoproteínas de membrana:

inicialmente se propuso que la hiposialilación de glicoproteínas apicales producida por el benzil GalNAc sería la causa de su acumulación en las células HT-29 M6 y que, por tanto, el ácido siálico sería requerido para el transporte/*sorting* de glicoproteínas apicales a la membrana (Huet et al., 1998, ver sección Objetivos). Una predicción de esta hipótesis es que estos efectos deberían ser reproducidos por la supresión de la sialilación por medios distintos al tratamiento con benzil GalNAc. Lastimosamente, los intentos de suprimir la sialilación por métodos que no involucren el empleo de esta droga han sido infructuosos. No obstante, los mutantes CHO Lec2 presentan mutaciones que inactivan el transportador de CMP-Neu5Ac en el Golgi, sialilan escasamente sus glicoproteínas (Eckhardt et al., 1998), presentan defectos en el envío a la membrana plasmática del receptor de la tirotrópina (TSHR) (Nagayama et al., 1998), pero no parecen presentar una severa acumulación

intracelular ni de vesículas ni de glicoproteínas de membrana. Por otra parte, clones de MDCK seleccionados sobre la base de su resistencia a la ricina (MDCK^R), los cuales presentan una hiposialilación de glicoproteínas, no muestran una severa acumulación de éstas en vesículas citoplasmáticas (Rodríguez-Boulan, com pers)]. Estos datos sugieren que, al menos en estas células, la reducción de la sialilación de glicoproteínas de membrana no conduce a su acumulación intracelular ni tampoco a la de vesículas citoplasmáticas.

Otros investigadores han descrito que el benzil GalNAc, suplementado por períodos cortos de tiempo, perturba la asociación con rafts, la O-glicosilación y el *sorting* de la sacarosa isomaltasa, una hidrolasa asociada al borde en cepillo, en células Caco-2 (Alfalah et al., 1999), así como la sialilación y la secreción apical de una forma soluble de la DPP-IV en células MDCK (Aït Slimane et al., 2000). Por el contrario, en estas células la hiposialilación en α 2,3 inducida por el el benzil GalNAc no alteró el *sorting* apical de la endolina (Ihrke et al., 2001). En estos estudios no se demostró ni un bloqueo en el transporte hacia la membrana plasmática ni una acumulación intracelular de estas glicoproteínas, indicando que, en estas células, la ausencia de ácido siálico no acarrea necesariamente la inhibición del transporte de glicoproteínas hacia la membrana plasmática.

En nuestro trabajo, hemos demostrado que el tratamiento de las células IMIM-PC-1 con benzil GalNAc conduce a la acumulación intracelular de glicoproteínas de membrana y a una reducción en su sialilación en α 2,3. Cuando estas células se cultivan durante 15 días en presencia de benzil GalNAc, casi la totalidad de la población muestra una considerable reducción en su contenido de ácido siálico en α 2,3 mientras que la acumulación citoplásmica de MUC1 se observa solo en aproximadamente un 30% de ellas. Para evitar los problemas derivados de esta heterogeneidad celular, hemos obtenido clones por dilución límite. Uno de ellos, denominado IMIM-PC-1 A13, presenta en post-confluencia un fenotipo polarizado y contiene predominantemente ácido siálico en posición en α 2,3. Cuando se tratan con benzil GalNAc, las células A13 muestran una importante hiposialilación en α 2,3, sin que se modifiquen los niveles ni localización del ácido siálico ligado en α 2,6, así como un gran incremento de vesículas intracelulares sin que se acumule MUC1 en ellas (figura 2). En consecuencia *ni la hiposialilación ni la acumulación de vesículas intracelulares son suficientes para inducir la acumulación intracelular de glicoproteínas apicales.*

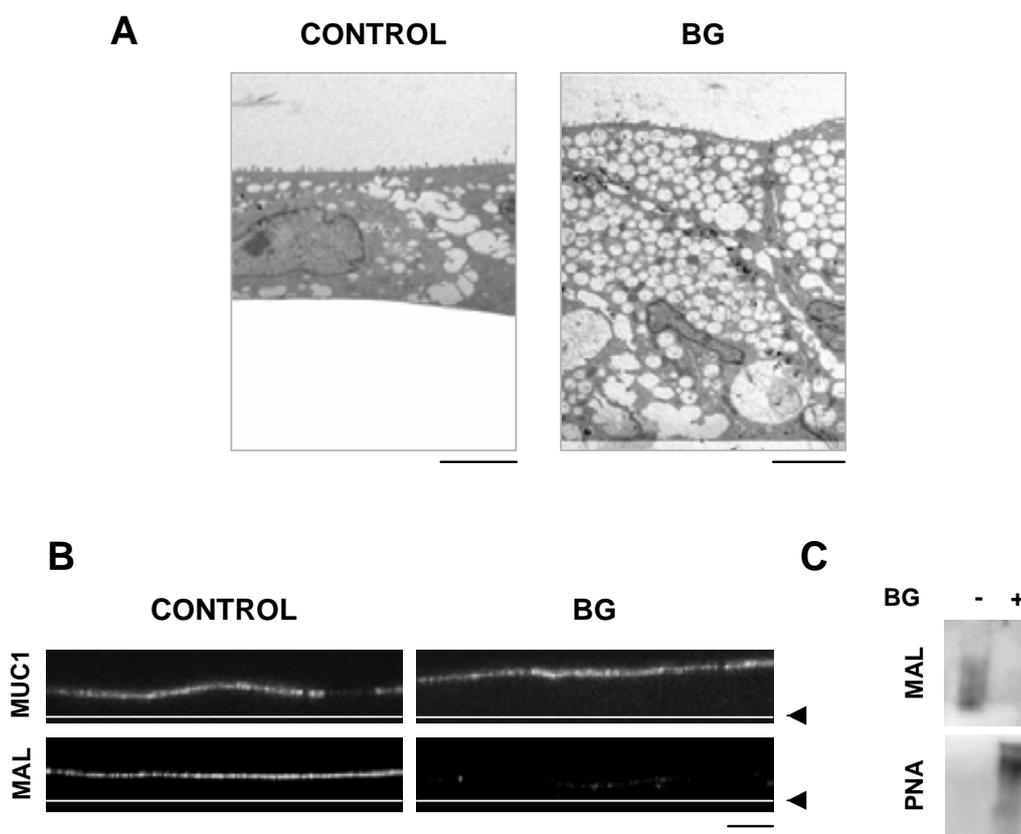


Figura 2. La hiposialilación de MUC1 no se acompaña de cambios en su distribución subcelular en células IMIM-PC-1 A13. *Panel A.* Imágenes de microscopía electrónica de células IMIM-PC-1 A13 cultivadas durante 15 días en ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM. Nótese la masiva acumulación de vesículas de gran tamaño que el tratamiento con benzil GalNAc induce en estas células. Barra de escala: 5 μ m. *Panel B.* Secciones verticales obtenidas por microscopía confocal de células IMIM-PC-1 A13 cultivadas sobre cubreobjetos durante 15 días en ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM. Las células fueron fijadas con PFA al 4%, permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,5% en PBS-BSA 1% e incubadas con un anticuerpo anti-MUC1 - M8 - o con la lectina MAL. Las cabezas de flecha indican la posición del cubreobjetos. Barra de escala: 10 μ m. *Panel C.* Lectin blot de inmunoprecipitados de MUC1 de células IMIM-PC-1 A13 cultivadas durante 15 días en ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM. Las células fueron lisadas en Tris-HCl 50 mM - Tritón X-100 1%. A continuación, MUC1 fue inmunoprecipitada de los extractos celulares empleando el anticuerpo M8 y los inmunoprecipitados fueron fraccionados por electroforesis utilizando un gel de poliacrilamida-SDS al 6% y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, los filtros fueron incubados con las lectinas MAL o PNA. Nótese que el tratamiento con benzil GalNAc induce una importante reducción en la sialilación de MUC1 pero no su acumulación intracelular.

Por otra parte, las células IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc acumulan también glicoproteínas basolaterales, como β 1 integrina, gp525 y E-cadherina, cuyo transporte/*sorting* a la membrana plasmática se piensa que no es dependiente de glicosilación (ver la reciente revisión de Gu et al., 2001). El tratamiento con sacarosa induce en estas células efectos similares a los originados por el tratamiento con benzil GalNAc, incluyendo la acumulación intracelular tanto de MUC1 como de β 1 integrina, sin afectar el contenido de ácido siálico en las células. Además, las vesículas donde se acumula MUC1 en células IMIM-PC-1 tratadas con sacarosa contienen material

sialilado. Tomados en conjunto, estos resultados indican que *el mecanismo por el cual se acumulan glicoproteínas de membrana en células IMIM-PC-1, y por extensión el de las células HT-29 M6, tratadas con benzil GalNAc, es independiente de su estado de sialilación.*

Reducción de la sialilación y defectos en el procesamiento de enzimas lisosomales: los resultados descritos en este trabajo indican que la reducción sialilación/glicosilación tampoco puede explicar los defectos en el procesamiento de enzimas lisosomales descritos en células HT-29 M6 tratadas con benzil GalNAc. A la concentración mínima a la cual el benzil GalNAc induce un claro aumento en la movilidad de la DPP-IV o del número de vesículas citoplásmicas, no se detectan cambios en el procesamiento de la AAG. De forma similar, el bloqueo total de la maduración de la AAG solo se produce a tiempos de tratamiento muy superiores a los que afectan a la movilidad de la DPP-IV (ver Resultados sección 3). En conjunto, estos datos indican que los mecanismos que conducen a una hiposialilación de glicoproteínas de membrana y al acúmulo de vesículas intracelulares no son suficientes para inducir defectos en la maduración de enzimas lisosomales. Además, estas observaciones sugieren que los efectos descritos en células HT-29 M6 tratadas crónicamente con benzil GalNAc corresponderían a fenómenos independientes, idea que está esquematizada en la figura 3. Planteamos que en el desarrollo de estos efectos, podría jugar un rol clave la acumulación de metabolitos glicosilados derivados del benzil GalNAc (MBG), descrita por Zanetta et al. (2000). Es lógico pensar que la acumulación de estos metabolitos esté correlacionada con el tiempo y concentración de droga a la que las células estén expuestas (figura 3). De este modo, las observaciones descritas en los experimentos en que se han usado diferentes condiciones de tratamiento con benzil GalNAc, se podrían explicar si los diferentes efectos se produjeran a determinados niveles de acumulación de metabolitos.

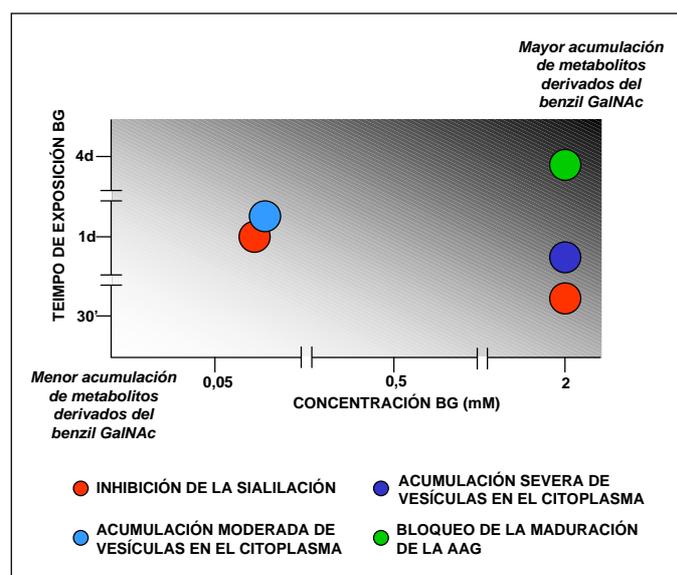


Figura 3. Esquema que muestra la dependencia del tiempo de exposición y concentración de benzil GalNAc en la inducción de efectos en células HT-29 M6. Los círculos indican las condiciones mínimas a partir de las cuales se observa un determinado tipo de efecto. Se distingue una gradación de efectos que van desde una reducción de la sialilación/glicosilación de proteínas, para los cuales se requieren tan solo bajas concentraciones del inhibidor y tiempos cortos de tratamiento, hasta defectos en el procesamiento de enzimas lisosomales, los que solo se producen a altas concentraciones de benzil GalNAc y a tiempos largos de tratamiento. Estas observaciones sugieren que estos efectos son fenómenos independientes y que el tipo y severidad de los mismos podrían estar presumiblemente relacionados con el nivel de acumulación de metabolitos derivados de esta droga.

En resumen, las evidencias disponibles apoyan la idea de que: *i)* la reducción de la sialilación/glicosilación no explica el conjunto de efectos del benzil GalNAc sobre células HT-29 M6 e IMIM-PC-1 y *ii)* el ácido siálico no es imprescindible para el transporte de glicoproteínas apicales hacia la membrana plasmática. Sin embargo, no podemos descartar definitivamente un papel de este sacárido en el *sorting* de glicoproteínas apicales.

II. El tratamiento crónico con benzil GalNAc origina en las células HT-29 M6 e IMIM-PC-1 un fenotipo de depósito lisosomal

Diversas evidencias presentadas en este trabajo indican que el tratamiento con benzil GalNAc afecta la ruta endosomal: *i)* la modificación del procesamiento de enzimas lisosomales, *ii)* la reducción de la internalización de proteínas de la membrana plasmática, *iii)* los cambios en los niveles de expresión de EEA1, un marcador de endosomas tempranos, en células IMIM-PC-1 y, *iv)* la similitud entre la composición de los endosomas tardíos y las vesículas electrón-lúcidas donde se acumulan glicoproteínas de membrana en células HT-29 M6 e IMIM-PC-1.

Las vesículas citoplasmáticas que se acumulan por el tratamiento con benzil GalNAc están relacionadas con endosomas tardíos: la comprensión de los mecanismos que conducen al establecimiento del fenotipo benzil GalNAc requiere la caracterización de la identidad de las vesículas que se acumulan en el citoplasma de células tratadas con esta droga (denominadas de aquí en adelante vesículas-BG). Los resultados descritos en este trabajo indican que éstas no parecen corresponder a transportadores exocíticos derivados del TGN, tal y como fue hipotetizado inicialmente, sino más bien a una población heterogénea de endosomas aberrantes. Así: *i)* en células IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc, MUC1 y β 1 integrina colocalizan en las vesículas, sugiriendo que no se trata de vesículas exocíticas porque, según el conocimiento actual, las proteínas apicales y basolaterales utilizan diferentes transportadores (Keller et al., 2001); *ii)* las vesículas-BG reciben material internalizado desde la membrana plasmática, lo que sugiere su naturaleza endosomal; *iii)* en las vesículas-BG donde se acumula β 1 integrina se localizan también marcadores de endosomas tardíos, como LBPA y Rab7, pero no de endosomas tempranos ni del Golgi, sugiriendo que podrían corresponder a endosomas tardíos aberrantes. Esta idea vendría apoyada por la descripción de que los sacarosomas, vesículas citoplasmáticas que se forman en células tratadas con sacarosa y cuya morfología es similar a la de las vesículas-BG, están relacionados con endosomas tardíos (Bright et al., 2001, 1997).

A juzgar por la distribución de proteínas de membrana/marcadores, en las células tratadas con benzil GalNAc se acumula una población muy heterogénea de vesículas. Esta heterogeneidad podría ser real o resultar de la dinámica de su formación. Notoriamente, en células NRK tratadas con

sacarosa se distinguen dos poblaciones de sacarosomas positivas para LBPA, una que presenta M6PR y otra que presenta Igp120 (el homólogo de rata de lamp-1) (Bright et al., 2001).

Las células tratadas con sacarosa acumulan marcadores lisosomales como lamp-1 (Isaac et al., 2000; Karageorgos et al., 1997) mientras que en células IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc hemos observado una acumulación de catepsina D, la cual puede colocalizar con $\beta 1$ integrina en las vesículas-BG (dato no mostrado). Estas observaciones sugieren que algunas vesículas podrían corresponder a lisosomas aberrantes o que proteínas lisosomales podrían acumularse en endosomas tardíos.

La gran heterogeneidad de las vesículas presentes en las células tratadas con benzil GalNAc no permite descartar que algunas de ellas puedan corresponder a otros compartimentos. Así, en un 20 - 40% de células IMIM-PC-1, TGN46 se acumula en vesículas citoplasmáticas distintas de las que acumulan $\beta 1$ integrina y cuya naturaleza desconocemos.

De momento, no se han llevado a cabo análisis de colocalización entre marcadores de compartimentos celulares y glicoproteínas apicales en células HT-29 M6 tratadas con benzil GalNAc, por lo que no sabemos si la naturaleza de las vesículas-BG de estas células es o no semejante a la de aquéllas de células IMIM-PC-1. No obstante, algunas evidencias sugieren que podría tratarse del mismo tipo de compartimento. Así, la morfología de las vesículas de células HT-29 M6 e IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc es similar. Además, hemos observado que en células HT-29 tratadas con benzil GalNAc se acumula LBPA (no mostrado) y que algunas vesículas citoplasmáticas corresponden a compartimentos acídicos (ver Resultados sección 3), lo cual es compatible con la posibilidad de que se traten de endosomas tardíos. Cabe notar que en células HT-29 M6 es importante también definir dónde se localizan las mucinas secretadas, las cuales es poco probable que se acumulen en un compartimento endocítico.

Benzil GalNAc y enfermedades de depósito: algunas características fenotípicas de células tratadas con benzil GalNAc recuerdan aquéllas descritas en células provenientes de pacientes con enfermedades de depósito lisosomal (EDL). Así, existe una similitud entre las alteraciones del procesamiento de la catepsina B y D en fibroblastos ISSD y en células HT-29 M6 tratadas con benzil GalNAc, respectivamente. Asimismo, el procesamiento de la AAG en fibroblastos ISSD presenta anomalías semejantes a las encontradas en células HT-29 M6 tratadas con benzil GalNAc. Schmid et al. (1999) han descrito un defecto en la maduración de los lisosomas de fibroblastos ISSD, los cuales tienen características de compartimentos prelisosomales con un pH mayor que lo normal. La redistribución de los compartimentos acídicos y su menor intensidad de fluorescencia cuando se marcan con LysoSensor®, indicativa de una alcalinización, recuerdan los hallazgos en células ISSD. Otro hecho destacable es la aparente acumulación intracelular de colesterol que recuerda lo descrito

en células de varios tipos de EDL, entre las que destaca la enfermedad de Niemann-Pick tipo C (ver Patterson et al., 2001).

La idea de que el benzil GalNAc induce en las células defectos análogos a aquellos descritos en EDL se ve apoyada por la semejanza de los efectos provocados por la sacarosa, un agente ampliamente usado para inducir un fenotipo de depósito lisosomal (Karageorgos et al., 1997; DeCourcy y Storrie, 1991), y los inducidos por el benzil GalNAc en células IMIM-PC-1. Entre éstos se cuentan, por ejemplo, los cambios morfológicos y la acumulación intracelular de MUC1 y β -1 integrina. El conjunto de evidencias anteriormente citadas nos permiten concluir que *el tratamiento crónico con benzil GalNAc origina en las células HT-29 M6 e IMIM-PC-1 un fenotipo de depósito lisosomal.*

III. ¿Es la acumulación de metabolitos derivados de benzil GalNAc responsable de sus efectos celulares?

Diversas patologías de depósito lisosomal, como la sialidosis, las enfermedades de depósito de ácido siálico y la enfermedad de Schindler presentan una acumulación de ácido siálico, libre o conjugado a oligosacáridos, en los compartimentos degradativos (ver Desnick y Shindler, 2001; Aula y Gahl, 2001; Thomas, 2001). Las células de estos pacientes muestran en su citoplasma vesículas electrón-lúcidas de morfología similar a las vesículas-BG (ver figura 4). Por otra parte, las células HT-29 tratadas con benzil GalNAc acumulan intracelularmente una cantidad masiva de oligosacáridos, fundamentalmente sialilados, derivados del benzil GalNAc (Zanetta et al., 2000). Este conjunto de observaciones conduce a la idea de que de manera similar a lo que ocurre en estas células y aquellas tratadas con sacarosa, el fenotipo observado en las células tratadas con benzil GalNAc se originaría por la acumulación de metabolitos glicosilados derivados de esta droga.

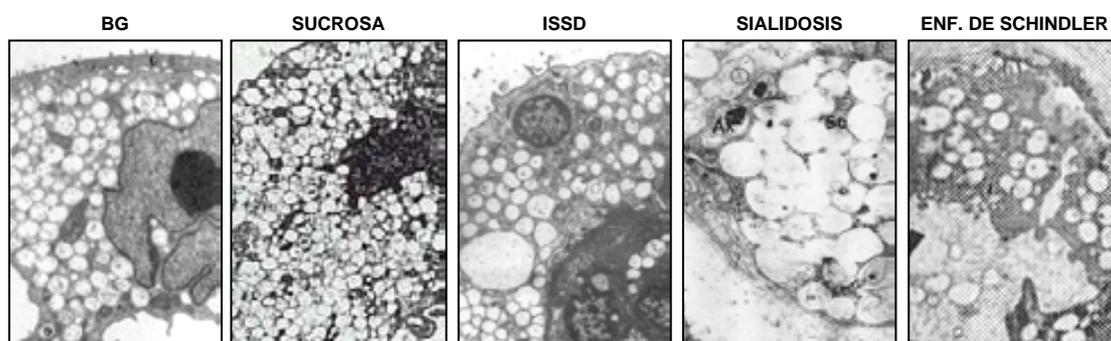


Figura 4. Ultraestructura de células IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc y de células en las que se acumulan sacáridos en los compartimentos degradativos. En estas células se acumulan en el citoplasma vesículas morfológicamente similares. (Imágenes tomadas de: *sacarosa*, Karageorgos et al., 1997; *ISSD*, Lemyre et al., 1999; *sialidosis*, Yamano et al., 1985; *enfermedad de Schindler*, Desnick y Schindler, 2001, imagen original en Kanzaki et al., 1993).

Actualmente no contamos con evidencias directas que demuestren que la acumulación de metabolitos glicosilados derivados del benzil GalNAc (MBG) es responsable de sus efectos celulares. La aproximación experimental para probarlo, que consistiría en el bloqueo completo de la capacidad de las células para metabolizar el benzil GalNAc, no es una tarea sencilla, puesto que las estrategias de inhibición (p. ej. oligonucleótidos antisentido, transfectantes estables con construcciones antisentido) no son siempre exitosas y, además, porque numerosas glicosiltransferasas podrían participar en la síntesis de los metabolitos. No obstante, a falta de análisis bioquímicos que lo demuestren, los resultados del estudio de los efectos de diferentes condiciones de tratamiento con benzil GalNAc (tiempo y concentración) sobre células HT-29 M6 son compatibles con la idea de que la acumulación de los MBG estaría asociada al tipo y severidad de estos efectos. Si, como sugerimos, la acumulación de los MBG es un factor importante en el desarrollo de los efectos del benzil GalNAc, aunque quizás no él único, cabría esperar diferencias sustanciales en la naturaleza o el grado de acumulación de estos metabolitos en diferentes tipos de células. El análisis detallado de los MBG sintetizados en varias líneas celulares está siendo realizado en la actualidad (Huet G, Ulloa F y Real FX). Los resultados preliminares muestran una clara asociación entre la producción masiva de metabolitos complejos y la acumulación de vesículas electrón-lúcidas en el citoplasma celular (ver figura 5 y tabla 1). Sin embargo, cabe recalcar que esta asociación no constituye evidencia de causalidad.

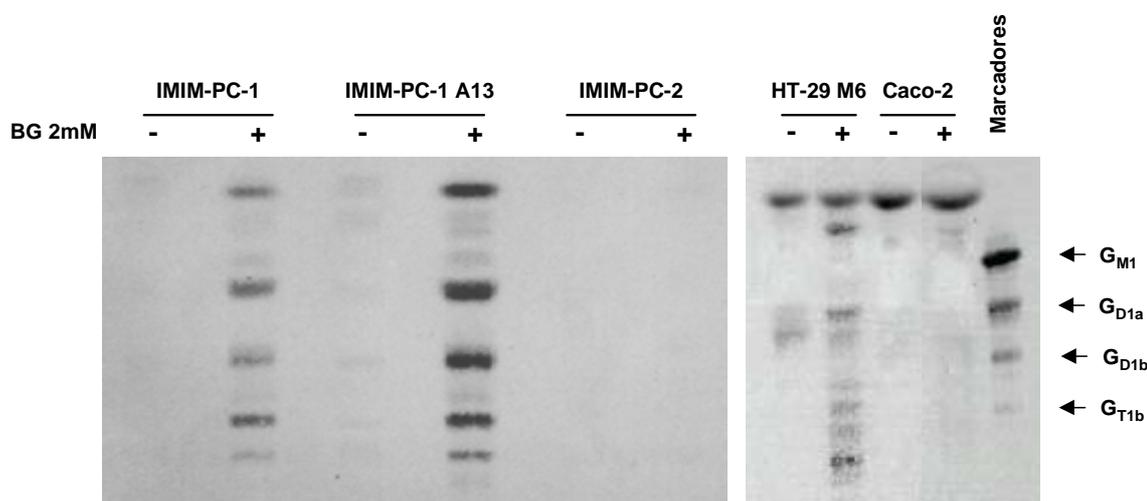


Figura 5. Producción de metabolitos derivados del benzil GalNAc en líneas celulares. Extractos lipídicos provenientes de células cultivadas en ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM fueron separados por cromatografía de capa fina y revelados con resorcinol. El análisis de la naturaleza de las bandas positivas obtenidas en células tratadas ha revelado que se tratan de compuestos glicosilados derivados del benzil GalNAc (Zaneta et al., 2000; resultados no publicados). Nótese que las células sensibles al benzil GalNAc (IMIM-PC-1 y HT-29) acumulan una cantidad apreciable de estos metabolitos.

Tabla 1. Producción de metabolitos derivados del benzil GalNAc y acumulación de vesículas citoplasmáticas¹

Línea Celular	Acumulación de MBG	Acumulación de vesículas en el citoplasma
HT-29	+	+
IMIM-PC-1	+	+
LS174 T	+	+
CAPAN-1	+	+
IMIM-PC-2	-	-
MCF-7	-	-
T47 D	-	-
Caco-2	-	-

(1) Datos preliminares de estudios que se están llevando a cabo en la actualidad

Utilizando un panel de líneas celulares epiteliales, el tratamiento crónico con benzil GalNAc puede inducir un rango de fenotipos que va desde la práctica ausencia de efectos demostrables, es el caso de las células MCF-7, hasta una afectación severa, como las células HT-29 M6. En otras células, como IMIM-PC-2, SK-CO-15 y, Caco-2, el efecto es intermedio: se inhibe la sialilación en α 2,3 pero no hay acumulación masiva de vesículas en el citoplasma ni cambios significativos en su morfología y proliferación, aunque no pueden descartarse efectos más sutiles. Finalmente, las células IMIM-PC-1 reproducen, *a grosso modo*, los efectos descritos en células HT-29 M6. Anteriormente hemos propuesto la existencia de una relación entre el grado de acumulación de metabolitos y el tipo/severidad de los efectos celulares (representado en la figura 3). Así, el espectro de efectos observados en los diferentes tipos celulares podría estar determinado por diferencias en el grado de acumulación de los MBG (figura 6). Es probable que no solamente la cantidad, sino también la naturaleza de los metabolitos producidos y otros factores dependientes del tipo celular, contribuyan a determinar el tipo y severidad de efectos que induce el tratamiento con benzil GalNAc en las células. La pertinencia del modelo propuesto deberá determinarse en el futuro con experimentos adicionales.

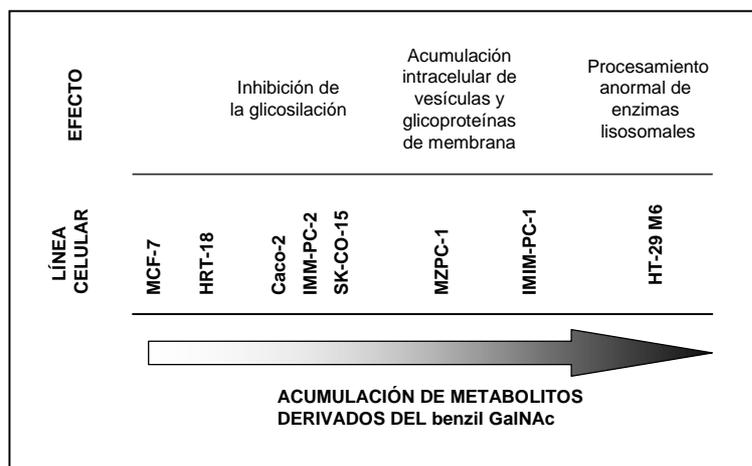


Figura 6. Representación esquemática de la hipotética relación entre el grado de acumulación de metabolitos derivados del benzil GalNAc y la naturaleza y severidad de los efectos producidos en diferentes tipos celulares por el tratamiento con esta droga. Posiblemente, otros factores dependientes del tipo celular, también condicionarían la naturaleza y severidad de estos efectos.

¿Determina el patrón de actividad de glicosiltransferasas la sensibilidad de las células al tratamiento con benzil GalNAc?: Si la acumulación de los MBG determina los efectos celulares, la síntesis y degradación de éstos deberán ser objeto de estudio detallado. Carecemos de datos que indiquen en qué medida estos dos factores priman a la hora de determinar la acumulación de metabolitos, aunque es probable que una sobreproducción de los mismos en las células podría superar su capacidad de degradarlos. Diferencias en el patrón de actividad de glicosiltransferasas podrían originar diferencias en la síntesis de los MBG. Así, solo aquellas células capaces de convertir masivamente esta droga a benzil GalNAc-Gal, y posteriormente a derivados más complejos, serían sensibles al fármaco. Dado que la enzima encargada de convertir el benzil GalNAc a benzil GalNAc-Gal es la Gal T core 1, la cual se piensa es ubicua, las diferencias entre células dependerían de otras glicosiltransferasas, concretamente de las que podrían usar como aceptor al benzil GalNAc-Gal [por ejemplo, las que intervienen en procesos de glicosilación terminal, como algunas α 2,3 sialiltransferasas y fucosiltransferasas (revisado en Gouyer et al., 2001a)]. De este modo, células con una elevada actividad sialiltransferasa capaz de transferir ácido siálico a benzil GalNAc-Gal (p. ej. de ST3Gal I) serían "sensibles" al tratamiento con benzil GalNAc mientras que las que careciesen de esta actividad serían "insensibles". Este es el caso de las células HT-29 M6 y Caco-2, respectivamente. Sin embargo, las evidencias indican una mayor complejidad:

i) apenas hemos observado efectos del benzil GalNAc 5 mM sobre células de cáncer de mama T47D transfectadas con ST3Gal I. Esto indica que la sobreexpresión de enzimas como ST3Gal I no es suficiente para el desarrollo de un fenotipo de depósito. El análisis de la actividad sialiltransferasa evidenció que ni las células T47D parentales ni las transfectadas tratadas con benzil GalNAc sintetizaban aceptores capaces de ser sialilados. Así, el hecho de que estas células posean actividad Gal T core 1 (evidenciado por la presencia de epítomos reactivos a PNA), pero no produzcan benzil GalNAc-Gal, plantea la contribución de otros enzimas/isoformas.

ii) el modelo no explica los hallazgos en las células IMIM-PC-2 y SK-CO-15, las cuales aparentemente producen benzil GalNAc-Gal y tienen una capacidad de transferir ácido siálico a esta molécula a un nivel comparable al de células HT-29 M6 (en el caso de SK-CO-15) o IMIM-PC-1 (en el caso de IMIM-PC-2). Es posible que diferencias en la capacidad degradativa, la actividad de otras sialiltransferasas o glicosiltransferasas (las cuales podrían competir por las moléculas donadoras y/o aceptoras), la topología de su distribución o, la disponibilidad de moléculas donadoras (p. ej. CMP-Neu5Ac), expliquen este fenómeno.

IV. Mecanismos por los cuales la acumulación de metabolitos glicosilados derivados del benzil GalNAc podrían originar un fenotipo de depósito lisosomal

Por el momento carecemos de datos sobre dichos mecanismos. Proponemos que éstos serían análogos a los que originan los defectos descritos en algunas EDL. El modelo del tratamiento con sacarosa ha sido bien caracterizado y puede dar luz, al menos en parte, sobre los efectos del benzil GalNAc.

Formación de las vesículas BG: uno de los efectos más espectaculares del benzil GalNAc es la acumulación de las vesículas-BG, las cuales proponemos son análogas a los sacarosomas y a las vesículas que se observan en células de algunos tipos de EDL.

La formación de los sacarosomas ha sido explorada con cierto detalle: la sacarosa es tomada por endocitosis de fase fluida y, en células deficientes de invertasa, se acumula en los compartimentos degradativos porque no puede ser digerida por las hidrolasas lisosomales donde induciría un influxo osmótico de agua y la dilatación de estos compartimentos (DeCourcy y Storrie, 1991). La acumulación de los MBG - moléculas osmóticamente activas - podría provocar una dilatación de compartimentos degradativos a través del mismo mecanismo. Pero la dilatación no se explicaría tan solo por mecanismos de índole osmótica. Así, sobre la base de estudios morfométricos y cinéticos realizados en células NRK tratadas con sacarosa, Bright et al. (2001) han encontrado que los sacarosomas, aunque pueden recibir influxos de membrana de otros compartimentos, presentan fallos en el reciclaje de membranas hacia otros destinos celulares, hecho que contribuiría a su paulatina dilatación. Estos autores proponen, para explicar esta observación, que los sacarosomas presentarían una relación superficie de membrana/volumen máxima, por lo cual no tendrían suficiente membrana para generar vesículas de transporte. La eventual participación de estas explicaciones biomecánicas en la generación de las vesículas-BG requiere estudios adicionales.

De acuerdo con este esquema cabe preguntarse ¿por qué tanto los sacarosomas como las vesículas-BG tienen características de endosomas tardíos, si son los lisosomas los que acumularían finalmente la sacarosa y los MBG?. En primer lugar, como se ha discutido previamente, es posible que una población de vesículas-BG pueda estar relacionada con lisosomas. En segundo lugar, esta cuestión se podría explicar si se considera la dinámica de transporte de materiales entre endosomas tardíos y lisosomas. Al parecer, éste se realiza por fusión directa entre los dos orgánulos. Dos modelos describen este proceso (revisado en Luzio et al., 2000). El primero propone la formación de un compartimento híbrido transitorio donde se mezclan los contenidos de los orgánulos, luego de lo cual éstas se reformarían. El segundo, denominado *kiss and run* (Storrie y Desjardins, 1996), supone que el transporte de materiales se daría a través de un contacto mucho más rápido, sin la formación de un orgánulo híbrido. La fusión endosoma tardío-lisosoma y la formación de un orgánulo híbrido ha sido documentada en células NRK tratadas con sacarosa (Bright et al., 1997). En ellas, los lisosomas

son capaces de fusionarse con los sacarosomas, pero aparentemente no pueden regenerarse, quedando "estabilizada" el orgánulo híbrido. De este modo, en células tratadas con benzil GalNAc, los lisosomas, que serían el destino final de los MBG, mezclarían su contenido con el de los endosomas tardíos en sucesivas rondas de fusión y reformación. Sin embargo, a un determinado nivel de acumulación de MBG, los lisosomas no se podrían reformar, dando como resultado un orgánulo que desarrollará la apariencia típica de las vesículas-BG y que presentaría marcadores propios de endosomas tardíos. Este modelo predice la disminución del número de lisosomas maduros en la célula, hecho verificado en células NRK tratadas con sacarosa y en células con deficiencias de depósito lisosomal como fibroblastos ISSD (Bright et al., 1997; Schmid et al., 1999) y que no ha sido analizado en nuestro trabajo.

Como se ha visto anteriormente, es muy probable que la formación de vesículas-BG, así como la de los sacarosomas, involucre defectos en eventos de fusión-fisión relacionados con endosomas tardíos. Se ha descrito una diversidad de moléculas implicadas en estos procesos (para detalles, ver Piper y Luzio, 2001), entre las que destacan la sintaxina 7 y Rab7. La sintaxina 7 es una SNARE localizada en endosomas tardíos y lisosomas que está involucrada en procesos de fusión homotípica entre endosomas tardíos y en los de fusión heterotípica entre endosomas tardíos y lisosomas (Ward et al., 2000; Mullock et al., 2000). La sobreexpresión de una forma dominante negativa de sintaxina 7 en células NIH3T3 inhibe la ruta de transporte endosomas tempranos-endosomas tardíos e, interesantemente, provoca el desarrollo de estructuras multivesiculares y multilamelares aberrantes de hasta 5 μm de diámetro (Nakamura et al., 2000). Rab7 es una proteína clave en la biogénesis de los lisosomas. La expresión de formas dominante-negativas de esta proteína causa la dispersión de lisosomas perinucleares, los cuales sufren un proceso de alcalinización (Bucci et al., 2000), cambios semejantes a los observados en compartimentos acídicos en células HT-29 M6 tratadas con benzil GalNAc. En células tratadas con benzil GalNAc hemos observado un aumento de la cantidad de Rab7 pero no sabemos nada acerca de su actividad. Recientemente, ha sido descrita la participación de anexina VI en el tráfico entre endosomas tardíos y lisosomas (Pons et al., 2001). Esta proteína puede translocarse del citosol a la membrana de los endosomas tardíos - proceso regulado por Ca^{+2} - donde podría interactuar con elementos del citoesqueleto; de este modo, la anexina VI podría jugar un papel importante, entre otros aspectos, en la determinación de la morfología, distribución y motilidad de los endosomas tardíos/lisosomas. Obviamente, la caracterización funcional de la maquinaria que regula la fusión de endosomas tardíos-lisosomas en células tratadas con benzil GalNAc o de depósito lisosomal, es un aspecto clave para la comprensión del fenotipo descrito en estas células.

Las alteraciones estructurales descritas anteriormente en las vesículas-BG sugieren también una importante disrupción funcional. Así, la acumulación de MBG, podría conllevar no solo la dilatación de los endosomas, sino que también cambios en su densidad y pH, como ocurre en los sacarosomas (Montgomery et al., 1991) y compartimentos degradativos de células de algunos tipos

de EDL como fibroblastos ISSD o de mucopolidosis IV (Schmid et al., 1999; Bach et al., 1999). El pH intraluminal es crítico para el transporte de proteínas desde varios compartimentos, entre los que se incluyen el TGN y los compartimentos endosomales. Así, la inhibición de la H⁺ ATPasa vacuolar previene el transporte desde los endosomas tardíos hacia los lisosomas (van Weert et al., 1995). Asimismo, se ha postulado la idea que la acidificación pudiera ser un requisito para la formación de lisosomas maduros (Schmid et al., 1999). Por tanto, cambios en el pH interno de endosomas tardíos/lisosomas podrían acarrear alteraciones funcionales en estos compartimentos las cuales a su vez podrían tener efectos patogénicos. El análisis funcional de estos compartimentos en las células tratadas con benzil GalNAc debiera ser revelador.

Los lípidos ¿jugadores importantes?: las vesículas-BG son reactivas a anticuerpos que reconocen LBPA, un lípido típico de endosomas tardíos, y los niveles de LBPA están incrementados en células tratadas con benzil GalNAc. Algunas evidencias indican que el LBPA juega un rol clave en la regulación de la distribución celular de otros lípidos como el colesterol (Kobayashi et al., 1999), un hecho que podría estar en relación con el aumento de sus niveles en células tratadas con benzil GalNAc. Dado que el colesterol afecta a las propiedades biofísicas de las membranas, es posible que estos cambios perturben la dinámica del ciclo citosol-membrana de proteínas Rab en los compartimentos degradativos, lo que traería como consecuencia defectos en el transporte desde y/o hacia estos orgánulos y en su fusión homo y/o heterotípica. Así, ha sido recientemente demostrado que la extractabilidad de Rab7 de la membrana de los endosomas tardíos por su GDI disminuye cuando las células son tratadas con U18666A, una droga que induce la acumulación de colesterol en los compartimentos degradativos de forma similar a lo que ocurre en células NPC (Lebrand et al., 2002). Además, niveles aberrantes de colesterol afectan la movilidad y, por ende, modifican la distribución de endosomas tardíos (Lebrand et al., 2002).

Los niveles y distribución del colesterol - y por extensión de otros lípidos que forman rafts - influyen en una multitud de procesos en las células, entre los que destacan el tráfico vesicular y la transducción de señales. Así, el colesterol podría cumplir un papel central a la hora de explicar la diversidad de efectos vistos en las células tratadas con benzil GalNAc. Resta por determinar cuál o cuáles de estos efectos responden a los cambios de los niveles y/o distribución de colesterol.

Acumulación intracelular de glicoproteínas de membrana en células tratadas con benzil GalNAc: ¿cómo y por qué llegan las glicoproteínas de membrana a las vesículas-BG? A pesar de los intentos experimentales, las evidencias obtenidas en este trabajo no nos permiten definir cuál es la ruta que siguen las glicoproteínas de membrana antes de acumularse en estas vesículas. Lamentablemente, se desconoce la(s) ruta(s) que normalmente siguen las glicoproteínas de membrana en células HT-29 o IMIM-PC-1, dato clave para entender la naturaleza de los defectos que ocasiona el tratamiento con benzil GalNAc. Según hemos indicado previamente (ver discusión artículo de la sección 3 de Resultados) se pueden plantear dos modelos no mutuamente excluyentes:

de acuerdo al primero, las glicoproteínas se acumularían antes de llegar a la membrana ("ruta directa"), y en el segundo las glicoproteínas llegarían a la membrana y se acumularían posteriormente durante su internalización ("ruta indirecta"). Teniendo en cuenta que las vesículas-BG corresponderían a endosomas tardíos aberrantes, la "ruta directa" necesariamente implica necesariamente la existencia de defectos en el *sorting* de glicoproteínas de membrana. En la ruta "indirecta", no es necesario implicar defectos en el *sorting* de glicoproteínas; los hallazgos serían compatibles con la posibilidad de que las proteínas de membrana lleguen normalmente a los endosomas tardíos y que se acumulen en ellos por deficiencias en el transporte/degradación. La afectación de las vías de endocitosis es más amplia: el benzil GalNAc reduce la tasa de endocitosis de proteínas de membrana en células HT-29 M6 e IMIM-PC-1 así como la del marcador de fase fluida sulforodamina-101 (datos no mostrados). La posible afectación diferencial de diversos tipos de endocitosis no ha sido estudiada con detenimiento. En cualquier caso, defectos en la endocitosis, *sorting* de proteínas y/o en la degradación en los endosomas tardíos están probablemente implicados en el fenotipo benzil GalNAc. La posible participación de la "ruta indirecta" se apoya en los experimentos de internalización de proteínas de membrana biotiniladas en células IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc, ya que las vesículas-BG reciben material endocitado. Aunque no se puede descartar que algunas proteínas de membrana se dirijan al Golgi y desde allí a las vesículas, es poco probable que todas las proteínas de membrana se comporten así a la luz de los conocimientos actuales. En cualquier caso, proporcionamos aquí evidencias definitivas de la participación de la ruta endocítica, sin que se pueda excluir completamente un papel concomitante de la ruta anterógrada.

Interesantemente, en células IMIM-PC-1, la acumulación intracelular de glicoproteínas de membrana es mayor a los 8 días que a los 15 días de tratamiento con benzil GalNAc. ¿Cómo explicar estos hallazgos?. Si las proteínas se acumularan durante eventos de internalización, podríamos plantear la posibilidad de que diferencias en su tasa de internalización dependientes de la edad de las células explicasen estos resultados. Observaciones preliminares acerca del análisis de la internalización de MUC1 en células IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc sugieren que estas células internalizan más MUC1 a los 8 días que a los 15 días de cultivo. Por otra parte, el TfR, una proteína basolateral que muestra una alta tasa de reciclaje entre la membrana y los compartimentos endosomales, se distribuye casi totalmente en el citoplasma de células IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc. Esta situación es diferente a la de la β 1 integrina, proteína que presumiblemente se internaliza menos que el TfR, y que se localiza tanto en el citoplasma como en la membrana plasmática de células tratadas con benzil GalNAc. Obviamente, caben otras explicaciones para justificar estas observaciones por lo este aspecto tiene que ser verificado con más detalle.

¿Por qué se acumulan las glicoproteínas de membrana que llegan a las vesículas-BG?. Ésta es una pregunta para la que de momento no existe respuesta. No hemos encontrado en la literatura trabajos donde se reporte la acumulación intracelular masiva de glicoproteínas de membrana ni en

EDL ni en el modelo de sacarosa. Como previamente se ha mencionado, un conjunto de factores entre los que se incluyen, deficiencias en la degradación y en el transporte a partir de las vesículas-BG podrían explicar esta acumulación. Además, se podría pensar que si las membranas de las vesículas se enriquecen de rafts, las glicoproteínas de membrana que se asocian a éstos microdominios, como diversas glicoproteínas apicales, serían propensas a acumularse en estas vesículas. Otra pregunta sin resolver es por qué mientras que en células IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc se acumulan tanto proteínas apicales como basolaterales, en células HT-29 M6 y otras células HT-29 polarizadas, se acumulan solamente glicoproteínas apicales. Claramente, esta droga no afecta en estas células la distribución de las *N*-glicoproteínas gp120 (Huet et al., 1998) y gp525 (Gouyer et al., 2001b). Sin embargo, recientemente se ha descrito que la *O*-glicoproteína basolateral CD44, la cual se asocia a rafts, se acumula intracelularmente en células HT-29 G⁻ tratadas con benzil GalNAc (Gouyer et al., 2001b), lo que indica que en estas células no se acumulan exclusivamente glicoproteínas apicales. Además, cabe notar que las diferencias encontradas en la distribución de glicoproteínas de membrana entre células IMIM-PC-1 y HT-29 tratadas con benzil GaNAc podrían ser el reflejo de las condiciones en que las que se han hecho los experimentos. Así, la acumulación de glicoproteínas basolaterales como β 1 integrina y gp525 en células IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc es aparente hasta los 12 - 15 días de cultivo, mientras que a días posteriores no hemos podido observar una severa acumulación intracelular de esta glicoproteínas. Los análisis de distribución de glicoproteínas en células HT-29 M6 tratadas con benzil GalNAc se han efectuado únicamente al cabo de 21 días de cultivo, por lo que desconocemos si a edades más tempranas estas células acumulan o no proteínas basolaterales y, por lo tanto no es posible descartar la ausencia de un efecto transitorio del benzil GalNAc sobre estas proteínas. Como repetidamente se ha mencionado en esta discusión, se necesitan más estudios. Así, sería interesante verificar si la dinámica de internalización de proteínas apicales y basolaterales en estas células es diferente, si hay un *sorting* diferencial entre proteínas apicales y basolaterales hacia las vesículas-BG y si proteínas con tendencia a asociarse a rafts, como las proteínas apicales, son realmente más proclives a acumularse en las vesículas-BG.

Sobre la base de los resultados obtenidos en este trabajo planteamos un modelo que describe los principales efectos observados en células HT-29 e IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc (figura 7, contrastar con la figura 1 de la sección de Objetivos). Este modelo servirá como punto de partida para estudios futuros. Seguramente, al igual que lo que ha ocurrido con nuestro modelo inicial, se demostrará que éste es insatisfactorio al cabo de un tiempo.

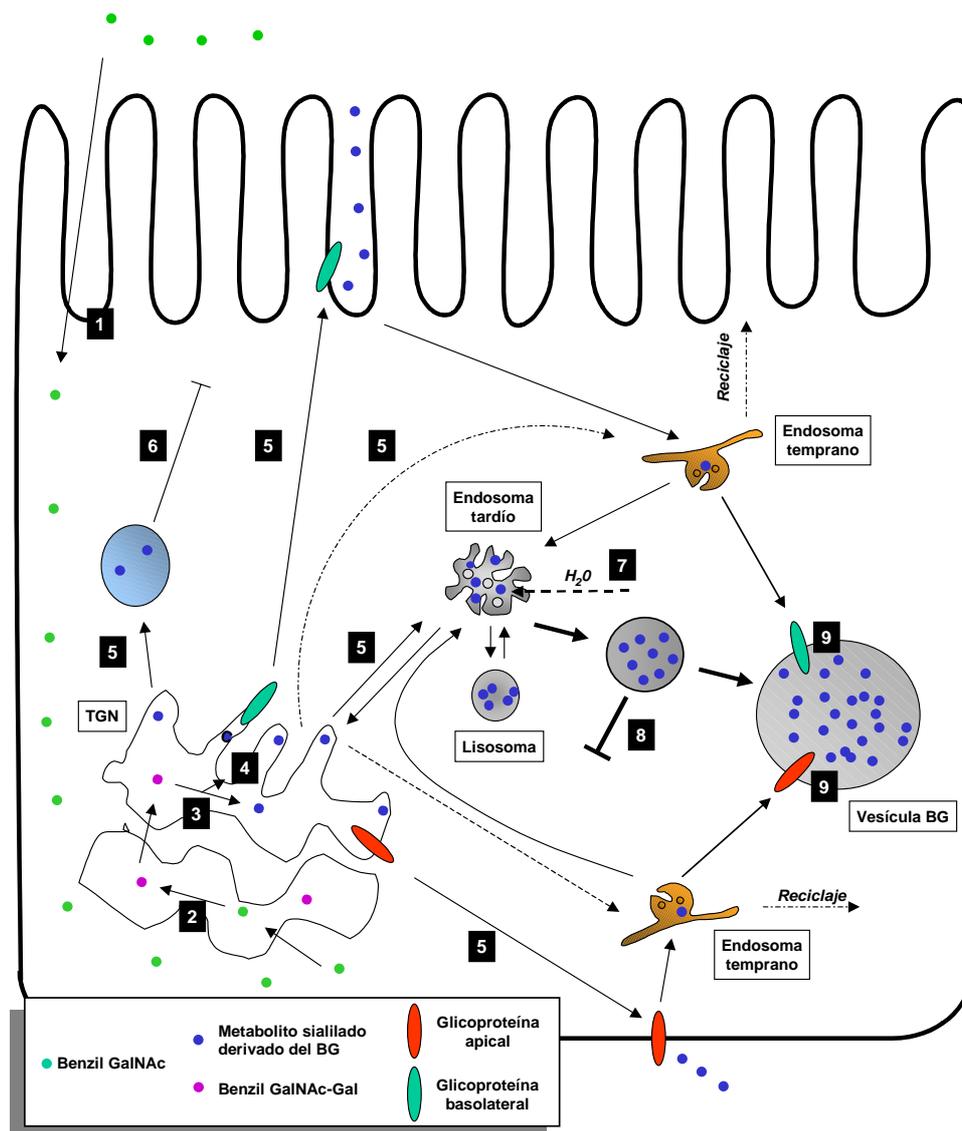


Figura 7. Efectos del benzil GalNAc: un modelo de trabajo. El benzil GalNAc entra en la célula (1), es metabolizado a benzil GalNAc-Gal por la Gal T core 1 (2) y usado como aceptor por varias glicosiltransferasas (p. ej. ST3Gal I) en el *trans*-Golgi, TGN, y quizás en compartimentos post-TGN. Como consecuencia de ello, se sintetizarían metabolitos glicosilados más complejos (MBG), como el benzil GalNAc-GalNeu5Ac (3) y disminuirían los niveles de algunos tipos de glicosilación terminal, como la sialilación en $\alpha 2,3$ (4). Los MBG viajarían a diferentes destinos celulares, incorporándose a las estructuras de transporte derivadas del TGN (5). En células HT-29 M6 la infraglicosilación de las mucinas y/o la acción de los MBG afectaría a la maduración de los gránulos de moco lo que provocaría una drástica disminución de su secreción (6). Los MBG se secretarían hacia el medio extracelular presumiblemente a través de intermediarios de transporte exocíticos.

La gran cantidad de MBG sintetizados, que no podrían ser degradados por la célula, provocaría su acumulación en los endosomas tardíos/lisosomas, resultando en la dilatación de estos compartimentos degradativos, tal vez por mecanismos osmóticos (7). La dilatación inicial de los endosomas tardíos/lisosomas provocaría cambios en su medio interno (p. ej. densidad y pH). Estos cambios, sumados a otros condicionados por la biomecánica de la dilatación, podrían afectar al transporte hacia otros destinos, entre otros procesos, incrementando su dilatación (8). Así se formarían las vesículas-BG, las cuales corresponderían mayoritariamente a endosomas tardíos.

La acumulación de MBG en los compartimentos degradativos se asociaría a un incremento de LBPA y cambios en la distribución de colesterol que podrían originar una desregulación de la composición de membranas y, a su vez, efectos pleiotrópicos (p. ej. disminución de la endocitosis y defectos en el tráfico de membranas).

Las proteínas de membrana alcanzarían la membrana plasmática y se acumularían en las vesículas-BG durante su internalización hacia compartimentos endosomales (9). Esta acumulación se produciría por defectos en el transporte desde las vesículas-BG, por una reducción de su capacidad degradativa, o por la asociación de las proteínas de membrana a los rafts en que las vesículas-BG estarían enriquecidas. La tasa de llegada de las proteínas de membrana a endosomas tardíos/vesículas-BG podría estar incrementada por errores en el *sorting* a nivel, por ejemplo, de los endosomas primarios. Las alteraciones de la funcionalidad de los compartimentos degradativos y del tráfico de membranas serían lo suficientemente severas en células HT-29 M6 para provocar defectos en el procesamiento de sus enzimas lisosomales.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El ácido siálico ligado en posición α 2,3 se distribuye fundamentalmente en la membrana apical de células epiteliales polarizadas. En cambio, el ácido siálico ligado en posición α 2,6 muestra una distribución menos restringida.
2. El efecto inhibitor del benzil GalNAc sobre la sialilación en α 2,3 es dependiente del tipo celular.
3. La acumulación intracelular de vesículas y de glicoproteínas de membrana, como producto del tratamiento crónico con benzil GalNAc, es dependiente del tipo celular, pero no es exclusiva de las células HT-29.
4. El tratamiento de células HT-29 M6 afecta no solo al procesamiento de proteínas apicales sino también al de enzimas lisosomales.
5. La hiposialilación de glicoproteínas no es responsable de su acumulación intracelular o de la formación de vesículas. Asimismo, no explica el fenotipo global descrito en células tratadas con benzil GalNAc.
6. El tratamiento crónico con benzil GalNAc induce defectos en células HT-29 M6 e IMIM-PC-1 similares a los descritos en algunas células con deficiencias de depósito lisosomal, concretamente, aquellas que presentan una acumulación de sacáridos en los compartimentos endosomales degradativos.
7. Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la idea de que la acumulación de metabolitos glicosilados derivados del benzil GalNAc, y no la inhibición de la sialilación de glicoproteínas, sería responsable del origen del fenotipo descrito en células HT-29 e IMIM-PC-1 tratadas crónicamente con este fármaco.

ANEXO:MATERIALES Y MÉTODOS

ANEXO: MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares: las células de cáncer de colon Caco-2 y HT-29 M6 fueron donadas por A. Zweibaum y T. Lesuffleur (INSERM U505, París), las SK-CO-15 por L.J. Old (Ludwig Institute for Cancer Research, New York Branch, New York) mientras que las HRT-18 fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA). Las células de cáncer de páncreas MZPC-1 fueron donadas por A. Knuth (Nordwestern Krankenhaus, Frankfurt) y las IMIM-PC-1 e IMIM-PC-2 fueron establecidas en nuestro laboratorio (Vilá et al., 1995). Las células de cáncer de mama MCF-7 fueron obtenidas de la ATCC.

Condiciones de cultivo celular: las células fueron mantenidas en *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (4,5 g/l de glucosa) (Gibco BRL Life Technologies, Glasgow) suplementado con glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml y suero fetal bovino (FBS) al 10% (Gibco BRL Life Technologies), a 37 °C y en una atmósfera húmeda que contenía 5% de CO₂ y 95% de aire. Excepto en los experimentos donde se indica lo contrario, el benzil GalNAc fue añadido a una concentración final de 2 mM al día siguiente de la siembra. Las densidades a las que se sembraron las células fueron las siguientes: HT-29 M6, HRT-18, SK-CO-15 y MCF-7 (2×10^4 células/cm²); Caco-2 (1×10^4 células/cm²); IMIM-PC-1, IMIM-PC-2 y MZPC-1 (5×10^3 células/cm²). A esta densidad las células alcanzaban la confluencia aproximadamente entre los días 6 - 10 de cultivo. En este trabajo se usaron las placas de cultivo Nunc (Nalge Nunc International, Dinamarca).

Análisis de proliferación celular: las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos a las densidades mencionadas anteriormente y se mantuvieron en la ausencia o presencia de benzil GalNAc. A diferentes días de cultivo se realizó, por triplicado, un recuento del número de células presentes en los pocillos. Para esto, las células se individualizaron por tripsinización y se contaron en un hemocitómetro. La determinación de la curva de proliferación se realizó al menos en dos ensayos independientes. Los valores indicados en la figura 2.1 de Resultados, proceden de uno de ellos.

Microscopía electrónica: se usó el protocolo descrito en Lesuffleur et al. (1991). Brevemente, las células fueron fijadas en glutaraldehído 2,5 % en PBS durante 30 min. Después fueron post-fijadas con OsO₄ al 2% durante 1 h en condiciones de protección de la luz, lavadas con agua destilada y deshidratadas en sucesivos baños de etanol a concentración creciente [etanol al 30%, etanol al 50%, etanol al 70%, etanol al 95% (x2) y etanol al 100% (x2)] durante 5 min por incubación.

Posteriormente, las células fueron incubadas tres veces durante 5 min y dos veces durante 15 min con hidroxipropil metacrilato (HPMA) (Merck, Darmstad, Alemania). Entonces, las células fueron incluidas en Epon (Bio-Rad Laboratories, CA). Para esto, se realizaron incubaciones consecutivas con Epon/HPMA (1:2) (15 min), Epon/HPMA (1:1) (15 min), Epon:HPMA (2:1) (30 min) y Epon (10 min x3). Luego las células se incubaron en Epon a 37 °C durante 16-18 h y a 60 °C durante 24 h. Las muestras fueron reincluidas en Epon para hacer cortes perpendiculares a la capa de células. Los cortes semifinos (0,5 - 0,6 μm) se tiñeron con azul de toluidina. Los cortes ultrafinos (500 - 800 Å) se colocaron sobre rejillas de cobre y fueron teñidos con acetato de uranilo al 5% en etanol absoluto y citrato de plomo.

Northern blot: el RNA total de células en cultivo fue extraído de acuerdo con el método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). Las muestras de RNA total (12 μg) se desnaturalizaron a 65 °C durante 10 min en formamida 50% y formaldehído 6,5% en MOPS (MOPS 20 mM, acetato de sodio 5 mM, EDTA 0,1 mM). Posteriormente, los RNA se fraccionaron por electroforesis en geles de agarosa 1%, formaldehído 6,5% en MOPS y se transfirieron durante 18 h por capilaridad en SSC10X (NaCl 3M, citrato sódico 0,3 M, pH 7,0) a una membrana de nailon Z-Probe (Bio-Rad). Para la prehibridación e hibridación se usó la solución ExpressHyb Hybridization solution (Clontech) según las recomendaciones del fabricante. Brevemente, los filtros fueron prehibridados a 68 °C al menos 30 min e hibridados con la sonda marcada radioactivamente al menos 1 h a 68 °C. Los filtros se lavaron dos veces con SSC 2X, SDS 0,5% a 55 °C durante 15 min y una vez con SSC 0,1X, SDS 0,05% a 55 °C durante 20 min. Los filtros fueron revelados por autorradiografía.

Como sondas de sialiltransferasas se usaron los productos de RT-PCR obtenidos según lo descrito por Recchi et al. (1998b). Los cebadores usados fueron:

ST3Gal I: (5'-361) TCAGAGTGGTGCCTGGGAATGT; (3'-877) CGTTTCCCTTGACCGTGGTGAT

ST6Gal I: (5'-849) TATCGTAAGCTGCACCCCAATC; (3'-1199) GAAGGCCTGGTAAGTGACGATT

Una mezcla típica de reacción de PCR contenía Tris-HCl 10 mM pH 8,8, MgCl_2 1,5 mM, KCl 50 mM, deoxinucleótidos trifosfato 0,2 mM, cebadores 0,6 mM y Taq polimerasa 0,6 – 1 U. Las condiciones de amplificación fueron 36 ciclos de 94 °C 1 min, 58 °C 1 min y 72 °C 1,5 min. Para marcar las sondas, se usó $\alpha^{32}\text{P}$ [dCTP] (3000 Ci/mol) (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA) y el sistema Rediprime (Amersham, R.U.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las sondas marcadas se purificaron en columnas MicroSpin S-400 HR (Pharmacia).

Detección por fluorescencia: el procedimiento general usado para realizar las citofluorescencias fue el siguiente. Las células cultivadas sobre cubreobjetos fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 10 min. Posteriormente, se incubaron con CINH_4 50 mM durante 15 – 30 min y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,5% en PBS-BSA 1% durante 20 – 30 min. Luego, las células fueron incubadas secuencialmente con los reactivos primarios y, según los casos, con los reactivos

secundarios. Todos los reactivos fueron diluidos en saponina al 0,1% en PBS-BSA 1%. Entre cada incubación las células fueron lavadas sumergiendo el cubreobjetos repetidas veces en PBS. Los anticuerpos primarios fueron incubados durante 1 h. La estreptavidina-FITC (*fluorescein isothiocyanate*) (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) fue incubada durante 30 min a una concentración de 10 µg/ml. Los anticuerpos secundarios acoplados a un grupo fluorescente fueron incubados durante 1 h (ver tablas 1 y 2). Finalmente, las preparaciones fueron montadas en Mowiol para su visualización por microscopía confocal. La cuantificación de la colocalización entre MUC1 y β 1 integrina en células IMIM-PC-1 tratadas con benzil GalNAc (ver Resultados sección 2) se determinó empleando el programa Metamorph 4.0 (Universal Imaging, Westchester, PA) a partir de 20 secciones horizontales de aprox. 30 x 30 µm, elegidas al azar y provenientes de dos ensayos independientes.

Detección de LBPA: las células cultivadas sobre cubreobjetos fueron tratadas como se indica anteriormente excepto que fueron permeabilizadas con saponina al 0,05 % en PBS-BSA 1%. El anticuerpo 6C4, que detecta LBPA, y el anticuerpo secundario fueron diluidos en saponina al 0,05% en PBS-BSA 1% dado que la permeabilización con Tritón X-100 resultaba en la ausencia de señal.

Tabla 1. Anticuerpos primarios usados en este trabajo

Anticuerpo	Antígeno	Dilución	Procedencia
1397 ⁽²⁾	β 1 integrina	IF: 1/100	Chemicon International Inc. (Temecula, CA)
6C4 ⁽¹⁾	LBPA	IF: 1/50	J. Gruenberg (U. Ginebra, Suiza)
Clone 14 ⁽¹⁾	EEA1	WB: 1/2500	Transduction Laboratories (San Diego, CA)
Clone 36 ⁽¹⁾	E-cadherina	IF: 1/200	Transduction Laboratories
Clone 46 ⁽¹⁾	p115	WB: 1/500	Transduction Laboratories
M8 ⁽¹⁾	MUC1	IF: 1/2	D. Swallow (University College of London, R.U.)
TS2/16 ⁽¹⁾	β 1 integrina	IF: 1/2 IE: Si diluir	F. Sánchez Madrid (UAM, Madrid)
α -catepsina D ⁽¹⁾	catepsina D	IF: 1/100	Dako (Glostrup, Dinamarca)
α -EEA1 ⁽²⁾	EEA1	IF: 1/100	H. Stenmark (Norwegian Radium Hospital, Oslo, Noruega)
α -MAL ⁽¹⁾	MAL	IF: 1/200	MA Alonso (UAM, Madrid)
α -gp525 ⁽¹⁾	gp525	IF: 1/100	A. Le Bivic (IBDM, Marseille, Francia)
α -rab5 ⁽²⁾	rab5	IF: 1/100	P. Chavrier (Institut Curie, Paris, Francia)
α -rab5 ⁽²⁾	rab5	WB: 1/400	A. Le Bivic
α -rab7 ⁽²⁾	rab7	IF: 1/100	P. Chavrier
α -rab7 ⁽²⁾	rab7	WB: 1/400	A. Le Bivic
α -TfR ⁽¹⁾	TfR	IF: 1/200	MA Alonso
α -TGN46 ⁽³⁾	TGN46	IF: 1/30	S. Ponnambalam (U. Dundee, R.U.)
α -GRASP65 ⁽¹⁾	GRASP65	IF: 1/1000	V. Malhotra (UCSD, La Jolla, CA)/ A. Mallabiabarrena (UPF, Barcelona)

(1) monoclonal de ratón; (2) policlonal de conejo; (3) policlonal de oveja.

IF: Inmunofluorescencia; IE: Inmunomicroscopía electrónica; WB: *Western blot*

Tabla 2. Anticuerpos secundarios usados en este trabajo

Anticuerpo	Dilución	Procedencia
anti-Ig de ratón FITC	1/40	Dako
anti-Ig de ratón TRITC	1/100	Pierce Chemical Co.
anti-Ig de ratón Alexa Fluor® 633		Molecular Probes
anti-Ig de conejo FITC	1/30 - 1/40	Dako
anti-Ig de oveja Alexa Fluor® 488	1/300	Molecular Probes
anti-Ig de ratón HRP	1/2500	Dako
anti-Ig de conejo HRP	1/2500	Dako

FITC: *fluorescein isothiocyanate*; TRITC: *tetramethylrhodamine isothiocyanate*
 HRP: *Horseradish peroxidase*

Tinción de compartimentos acídicos: células cultivadas en placas Lab-Tek® (Nunc) fueron incubadas con LysoSensor® Green DND-189 1 μ M (Molecular Probes, Leiden, Holanda) en DMEM 10% FBS, suplementado o no con benzil GalNAc 2 mM, a 37 °C y durante 30 min. Posteriormente, las células se incubaron con DMEM 10% FBS, suplementado o no con benzil GalNAc 2 mM, a 37 °C y durante 5 min. Las células fueron entonces visualizadas por microscopía confocal (488 nm excitación y filtro de fluoresceína), para lo cual se añadió HEPES al medio a una concentración final de 0,02 M.

Detección de colesterol: las células cultivadas sobre cubreobjetos fueron fijadas en PFA al 4% durante 10 min. Posteriormente, fueron incubadas con CINH_4 50 mM durante 20 min y con filipina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) 125 μ g/ml en PBS durante 30 min (el stock de filipina se mantenía congelado en dimetil formamida). Los cubreobjetos fueron montados en Mowiol y las células fueron analizadas por microscopía de fluorescencia.

Lectin blot: para los análisis de *lectin blot* se usaron lectinas marcadas con digoxigenina (Roche Molecular Biochemicals, Manheim, Alemania). Las células fueron lisadas en Tris-HCl 50 mM pH 8,0, Tritón X-100 1%, EDTA 62,5 mM, suplementado con inhibidores de proteasas [Pefabloc® 1 mM (Roche Molecular Biochemicals), leupeptina 10 μ g/ml, pepstatina 10 μ g/ml] y los lisados fueron centrifugados a 13000 rpm durante 30 min a 4 °C. Los extractos proteicos fueron fraccionados por electroforesis de poliacrilamida al 6%-SDS y transferidos a un filtro de nitrocelulosa. En la transferencia se conservó el gel concentrador. El protocolo seguido a continuación fue distinto según la lectina empleada.

MAL y PNA: se usaron los reactivos y el procedimiento descrito en el DIG Glycan Differentiation Kit® (Roche Molecular Biochemicals). Brevemente, el filtro fue bloqueado con solución de bloqueo [reactivo bloqueante (*blocking reagent*) diluido 10 veces con TBS, pH 7,5] durante 30 min y lavado dos veces por 10 min con TBS y una vez por 10 min con tampón 1 (TBS suplementado con MgCl_2 1

mM, Mn Cl_2 1 mM, Ca Cl_2 , pH 7,5). Posteriormente, el filtro fue incubado con la lectina diluida en tampón 1 durante 1 h (MAL 5 $\mu\text{g/ml}$; PNA 10 $\mu\text{g/ml}$), lavado tres veces con TBS e incubado con fragmentos Fab de un anticuerpo policlonal de oveja anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina (1 $\mu\text{l/ml}$ en TBS) durante 1 h. A continuación, el filtro fue lavado dos veces con TBS durante 10 min y una vez por 5 min con un tampón de dietanolamina 0,1 M, MgCl_2 1 mM, pH 10,0 (para preparar este tampón el pH se ajustaba con HCl concentrado antes de añadir el MgCl_2). Para el revelado se usó el sustrato luminiscente CPSD® (Tropix). Una solución típica de revelado contenía 50 μl de CPSD®, 250 μl del reactivo amplificador de luminiscencia Nitro-Block® (Tropix) y 4,7 ml de tampón de dietanolamina 0,1M, MgCl_2 1 mM, pH 10,0.

SNA: se usó el procedimiento descrito en Huet et al. (1998). Brevemente, el filtro fue bloqueado con polivinilpirrolidona K30 2% en TBS durante 2 h, luego de lo cual se realizaron dos lavados de 5 min con TBS y uno de 5 min con tampón 1. Posteriormente, el filtro se incubó con la lectina a 1 $\mu\text{g/ml}$ en tampón 1 durante 1 h. Entonces, se efectuaron tres lavados de 5 min con TBS y se bloqueó nuevamente el filtro con reactivo bloqueante al 0,5 % (disuelto previamente a 60 – 65 °C en TBS) durante 30 min. A continuación, el filtro se incubó con el fragmento Fab anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina (1 $\mu\text{l/ml}$ en TBS) durante 1 h y se procedió como lo indicado anteriormente para las lectinas MAL y PNA, excepto que en la solución de revelado no se añadía Nitro-Block®.

Western blot: las células fueron lisadas en RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, SDS 0,1%, deoxicolato de sodio 0,5%, Nonidet P-40 1%) suplementado con inhibidores de proteasas. Los extractos proteicos (30 μg) fueron fraccionados por electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS y transferidos a un filtro de nitrocelulosa. Un procedimiento típico consistía en bloquear los filtros con leche en polvo al 5% en TBS, Tritón X-100 0,1% durante 1 h e incubarlos secuencialmente con los anticuerpos primario y secundario diluidos en TBS, BSA 1%, Tritón X-100 0,1% durante 1 h. Después de cada incubación con anticuerpos, los filtros fueron lavados cuatro veces con TBS, Tritón X-100 0,1% durante 5 min cada vez. El revelado se realizó por quimioluminiscencia incubando los filtros con el reactivo ECL (Amersham) según las indicaciones del fabricante.

Cuantificación de la secreción: la secreción global de proteínas fue cuantificada en células HT-29 M6 cultivadas sobre Transwells® (Corning) y sobre células IMIM-PC-1 cultivadas sobre plástico. Las células HT-29 M6 fueron cultivadas sobre Transwells® durante 15 días en condiciones estándar y, posteriormente, durante 7 días en presencia o ausencia de benzil GalNAc 2 mM. La impermeabilidad de la monocapa fue verificada midiendo la resistencia al paso de [^{14}C] manitol (ICN Biomedicals). Para esto, 1 μl de [^{14}C] manitol fue añadido al compartimento superior (medio apical). Al cabo de 3 - 5 horas, alícuotas del medio de los compartimentos superior e inferior (medio basal) fueron cuantificadas en un contador de centelleo. Solo se usaron las células que cuyo medio basal presentaba menos del 5% de la señal del medio apical. Las células IMIM-PC-1 fueron cultivadas durante 8 días en ausencia o presencia de benzil GalNAc 2 mM.

Para el marcaje metabólico las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con MEM sin Met suplementado con 10% FBS dializado a 37 °C y durante 30 min. A continuación se añadió al medio [³⁵S]Met a una concentración final de 150 µCi/ml y se incubaron las células a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, se lavaron las células tres veces con PBS, se les añadió medio de caza (DMEM suplementado con FBS 10% y Met 2 mM), suplementado o no con benzil GalNAc 2 mM, y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. A continuación los medios fueron recogidos y las células fueron lisadas en RIPA sobre hielo. Las proteínas de los lisados y del medio se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final del 10% durante 1 h en hielo. Después, los lisados y los medios se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 min y los botones se solubilizaron o/n a 4 °C con NaOH 1M. El material precipitado con TCA se cuantificó en un contador de centelleo. Los valores indicados en la figura 4.1 de Resultados son las medias de triplicados. En el caso de las células HT-29 M6 se hicieron tres ensayos independientes a diferentes condiciones de cultivo que mostraron los mismos resultados, mientras que en el caso de las IMIM-PC-1 se hizo un solo ensayo.

Cuantificación de la internalización de proteínas de membrana: se usó una modificación del procedimiento descrito por Le et al. (1999). Las células sembradas en placas de 24 pocillos fueron lavadas tres veces con PBS frío e incubadas con sulfo-NHS-SS-biotina fría (Pierce Chemical Co.) a 0,5 mg/ml en D-PBS (PBS, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM; el stock de sulfobiotina se mantenía congelado en dimetil sulfóxido). Posteriormente, se lavaron dos veces con PBS frío y se incubaron con DMEM frío durante 15 min para bloquear la sulfobiotina libre. Hasta este punto, todas las incubaciones se hicieron sobre hielo. Después, se añadió a las células DMEM al 10% FBS atemperado a 37 °C, suplementado o no con benzil GalNAc, y se las incubó a 37 °C durante diferentes periodos de tiempo. A continuación, las células se incubaron sobre hielo dos veces con glutatión-SH frío 60 mM en PBS durante 20 min para eliminar la sulfobiotina de la superficie celular. Las células fueron lisadas con RIPA suplementado con inhibidores de proteasas. Los lisados fueron centrifugados a 13000 rpm durante 30 min a 4 °C. Los extractos proteicos obtenidos fueron fraccionados por electroforesis en poliacrilamida-SDS al 7%. Las proteínas fueron entonces transferidas a un gel de nitrocelulosa. Para detectar la biotina, el filtro fue bloqueado con BSA al 2% en TBS por 1 h a temperatura ambiente e incubado con estreptavidina peroxidasa (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA) 62,5 µg/ml durante 10 min. El revelado se realizó por quimioluminiscencia incubando los filtros con el reactivo ECL (Amersham) según las indicaciones del fabricante. La señal obtenida fue cuantificada por medio del programa GenQuant® (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Los valores obtenidos se expresaron como porcentaje del valor obtenido en el pulso sin eliminar la biotina de membrana.

Para detectar la distribución del material internalizado, las células cultivadas sobre cubreobjetos fueron incubadas durante 15 min con sulfo-NHS-biotina (Pierce Chemical Co.) fría a 0,5 mg/ml en D-PBS, luego de lo cual se procedió como se ha indicado previamente a excepción de que al final de las incubaciones a 37 °C las células fueron fijadas con PFA 4% durante 10 min. La biotina fue detectada entonces por medio de estreptavidina-FITC.

Immunomicroscopía electrónica: Se realizó por dos métodos: i) en cortes ultrafinos provenientes de células incluidas en Lowicryl K4M (ver métodos artículo sección 3), para la AAG, y en ultracriosecciones de células incluidas en sacarosa, para la $\beta 1$ integrina. Para ésto, se siguió el protocolo descrito por Hennebicq-Reig et al. (1996). Brevemente, las células se lavaron tres veces con PBS, se fijaron con PFA 4%, glutaraldehido 0,05 % en PBS y se rascaron. El botón de células fue embebido en sacarosa 2,3 M y polivinilpirrolidona 20% y congelado en nitrógeno líquido. Las ultracriosecciones fueron incubadas secuencialmente con los anticuerpos TS2/16 (anti $\beta 1$ integrina), anti-Ig G de ratón proveniente de conejo y con proteína A conjugada a partículas de oro (8 nm) (todos los reactivos fueron disueltos en FBS al 10% en PBS). Las rejillas fueron contrateñidas con metilcelulosa y acetato de uranilo.

Actividad de $\alpha 2,3$ sialiltransferasas: se siguió el protocolo usado por P. Delannoy (com. pers.) (Université des Sciences et Technologies de Lille, Francia). Las células fueron lisadas sobre hielo con un tampón de cacodilato de sodio-HCl 10 mM pH 6,5 conteniendo Tritón X-100 1%, glicerol 20%, ditiotretitol 0,5 mM y $MnCl_2$ e inhibidores de proteasas. El extracto fue incubado 20 min en hielo y posteriormente centrifugado a 10000 g durante 15 min a 4 °C. Se recogieron los sobrenadantes y se mantuvieron a -20 °C hasta su uso.

El medio de reacción (120 μ l de volumen final) contenía los siguientes componentes: CMP- $[^{14}C]$ -Neu5Ac 1,27 mM (3,67 KBq) (Amersham) usado como molécula donadora, benzil-O-GalNAc $\beta 1$ -3Gal 1 mM (Sigma Chemical Co.) usado como molécula aceptora, galactosa 200 mM (Sigma Chemical Co.) usado como inhibidor de galactosidasas, 2,3 dehidro-2-desoxi-Neu5Ac 1 mM (Sigma Chemical Co.) usado como inhibidor de sialidasas, Tritón X-100 1% y extracto proteico 0,5 - 1 mg. Los medios de reacción fueron incubados a 37 °C y la reacción fue detenida con 120 μ l de etanol. Posteriormente, éstos fueron centrifugados a 12000 g durante 15 min a temperatura ambiente. Los sobrenadantes fueron recogidos, ajustados a 1 ml con agua destilada y pasados a través de una columna "Sep-Pak" C_{18} (Waters). La columna se lavó con agua destilada y el producto de la reacción fue eluido con 5 ml de acetonitrilo al 30% en agua destilada. La transferencia de ácido siálico sobre la molécula aceptora fue cuantificada en un contador de centelleo.

Para cada línea celular analizada se hicieron incubaciones por triplicado durante cuatro períodos de tiempo distintos (mínimo 0,5 h, máximo 4 h). Los valores de actividad se expresaron en nmoles/mg proteína/h. La actividad $\alpha 2,3$ sialiltransferasa para cada línea celular analizada se realizó en, al menos, dos ensayos independientes.

Métodos descritos en los artículos de Resultados:

Sección 1:

Detección fluorescente e histoquímica con lectinas

Sección 3:

- Marcado metabólico e inmunoprecipitación
- Fraccionamiento en Tritón X-114
- Inmunomicroscopía electrónica (en células incluidas en Lowicryl K4M)

Reactivos comunes:

Acetato de uranilo (Taab Laboratories, CA)
Acetonitrilo (Sigma Chemical Co.)
Acido tricloroacético (Sigma Chemical Co.)
Albúmina de suero bovino (Sigma Chemical Co.)
Citrato de plomo (Taab Laboratories, CA)
Citrato de sodio (Merck)
Cloruro de amonio (Merck)
Cloruro de calcio (Merck)
Cloruro de magnesio (Merck)
Cloruro de manganeso (Merck)
Deoxicolato de sodio (Sigma Chemical Co.)
Dimetil sulfóxido (Sigma Chemical Co.)
Dodecil sulfato de sodio (Bio-Rad)
EDTA (Sigma Chemical Co.)
Etanol (Merck)
Galactosa (Sigma Chemical Co.)
Glutación-SH (Sigma Chemical Co.)
HEPES (Sigma Chemical Co.)
Hidróxido de sodio (Merck)
Leupeptina (Sigma Chemical Co.)
MOPS (Sigma Chemical Co.)
Mowiol (Calbiochem, La Jolla, CA)
Nonidet P-40 (Calbiochem)
Paraformaldehido (Merck; Sigma Chemical Co.)
Pepstatina (Sigma Chemical Co.)
Poliacrilamida (Amresco,
Polivinilpirrolidona (Sigma Chemical Co.)
Saponina (Sigma Chemical Co.)
Tris (USB)
Tritón X-100 (Merck)

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

A

Aas-Eng DA, Asheim HC, Deggerdal A, Smeland E, Funderud S. Characterization of a promoter region supporting transcription of a novel human beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase transcript in HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta* (1995) 1261:166-169

Aït Slimane T, Lenoir C, Sapin C, Maurice M, Trugnan G. Apical secretion and sialylation of soluble dipeptidyl peptidase IV are two related events. *Exp Cell Res* (2000) 258:184-194

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002) *Molecular biology of the cell*. 4^a ed. Garland Science, New York

Alfalah M, Jacob R, Preuss U, Zimmer KP, Naim H, Naim HY. O-linked glycans mediate apical sorting of human intestinal sucrase-isomaltase through association with lipid rafts. *Curr Biol* (1999) 9:593-596

Alonso MA, Fan L, Alarcón B. Multiple sorting signals determine apical localization of a nonglycosylated integral membrane protein. *J Biol Chem* (1997) 272:30748-30752

Amidon B, Brown A, Waite M. Transacylase and phospholipases in the synthesis of bis(monoacylglycerol)phosphate. *Biochemistry* (1996) 35:13995-134002

Andrews NW Regulated secretion of conventional lysosomes. *Trends Cell Biol* (2000) 10:316-321

Angata K, Yen TY, El-Battari A, Macher BA, Fukuda M. Unique disulfide bond structures found in ST8Sia IV polysialyltransferase are required for its activity. *J Biol Chem* (2001) 276:15369-15377

Apodaca G. Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic* (2001) 2:149-159

Apodaca G, Katz LA, Mostov KE. Receptor-mediated transcytosis of IgA in MDCK cells is via apical recycling endosomes. *J Cell Biol* (1994) 125:67-86

Aroeti B, Okhrimenko H, Reich V, Orzech E. Polarized trafficking of plasma membrane proteins: emerging roles for coats, SNAREs, GTPases and their link to the cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* (1998) 1376:57-90

Arvan P, Castle D. Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward. *Biochem J* (1998) 332:593-610

Aula P, Autio S, Raivio KO, Rapola J, Thoden CJ, Koskela SL, Yamashina I. "Salla disease": a new lysosomal storage disorder. *Arch Neurol* (1979) 36:88-94

Aula P, Gahl WA. (2001) Disorders of Free Sialic Acid Storage. En: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW y Vogelstein B, eds) 8^a ed. McGraw Hill, New York

B

Bach G, Chen CS, Pagano RE. Elevated lysosomal pH in Mucopolidiosis type IV cells. *Clin Chim Acta* (1999) 280:173-179

Barbero P, Bittova L, Pfeffer SR. Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells *J Cell Biol* (2002) 156:511-518

Barlowe C, Orci L, Yeung T, Hosobuchi M, Hamamoto S, Salama N, Rexach MF, Ravazzola M, Amherdt M, Schekman R: COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* (1994) 77:895-908

Baron CL, Malhotra V. Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane. *Science* (2002) 295:325-328

Bast BJEG, Zhou L-J, Freeman GJ, Colley KJ, Ernst TJ, Munro JM, Tedder TF. The HB-6, CDw75, and CD76 differentiation antigens are unique cell-surface carbohydrate determinants generated by the β -galactoside α 2,6-sialyltransferase. *J Cell Biol* (1992) 116:423-435

Baumkötter J, Cantz M, Mendla K, Baumann W, Friebolin H, Gehler J, Spranger J. N-Acetylneuraminic acid storage disease. *Hum Genet* (1985) 71:155-159

Bennett EP, Hassan H, Clausen H. cDNA cloning and expression of a novel human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine. Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, GalNAc-t3. *J Biol Chem* (1996) 271:17006-17012

Bennett EP, Hassan H, Mandel U, Mirgorodskaya E, Roepstorff P, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, Hollingsworth MA, Merx G, van Kessel AG, Eiberg H, Steffensen R, Clausen H. Cloning of a human UDP-N-acetyl-alpha-D-Galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase that complements other GalNAc-transferases in complete O-glycosylation of the MUC1 tandem repeat. *J Biol Chem* (1998) 273:30472-30481

Benting JH, Rietveld AG, Simons K. N-Glycans mediate the apical sorting of a GPI-anchored, raft-associated protein in Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* (1999) 146:313-320

Berger EG, Hesford FJ. Localization of galactosyl- and sialyltransferase by immunofluorescence: evidence for different sites. *Proc Natl Acad Sci USA* (1985) 82:4736-4739

Blanchette-Mackie EJ, Dwyer NK, Amende LM, Kruth HS, Butler JD, Sokol J, Comly ME, Vanier MT, August JT, Brady RO, et al. Type-C Niemann-Pick disease: low density lipoprotein uptake is associated with premature cholesterol accumulation in the Golgi complex and excessive cholesterol storage in lysosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* (1988) 85:8022-8026

Blazquez M, Thiele C, Huttner WB, Docherty K, Shennan KI. Involvement of the membrane lipid bilayer in sorting prohormone convertase 2 into the regulated secretory pathway. *Biochem J* (2000) 349:843-852

Bock JB, Matern HT, Peden AA, Scheller RH. A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* (2001) 409:839-841

Boehm M, Bonifacino JS. Adaptins: the final recount. *Mol Biol Cell* (2001) 12:2907-2920

Boll W, Ohno H, Songyang Z, Rapoport I, Cantley LC, Bonifacino JS, Kirchhausen T. Sequence requirements for the recognition of tyrosine-based endocytic signals by clathrin AP-2 complexes. *EMBO J* (1996) 15:5789-5795

Bonifacino JS, Dell'Angelica EC. Molecular Bases for the Recognition of Tyrosine-based Sorting Signals *J Cell Biol* (1999) 145:923-926

- Bonifacino JS, Marks MS, Ohno H, Kirchhausen T. Mechanisms of signal-mediated protein sorting in the endocytic and secretory pathways. *Proc Assoc Am Physicians* (1996) 108:285-295
- Breton C, Mucha J, Jeanneau C. Structural and functional features of glycosyltransferases. *Biochimie* (2001) 83:713-718
- Bright NA, Lindsay MR, Stewart A, Luzio JP. The relationship between luminal and limiting membranes in swollen late endocytic compartments formed after wortmannin treatment or sucrose accumulation. *Traffic* (2001) 2:631-642
- Bright NA, Reaves BJ, Mullock BM, Luzio JP. Dense core lysosomes can fuse with late endosomes and are re-formed from the resultant hybrid organelles. *J Cell Sci* (1997) 110: 2027-2040
- Brockhausen I. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* (1999) 1473:67-95
- Brockhausen I. (1995). Biosynthesis. 3. Biosynthesis of O-glycans of the N-acetylgalactosamine- α -Ser/thr linkage type. In *Glycoproteins* (ed. J. Montreuil, H. Scachter and J.F.G. Vliegenhart), pp. 201-259. Elsevier Science B.V.
- Brockhausen I, Rachaman ES, Matta KL, Schachter H. The separation by liquid chromatography (under elevated pressure) of phenyl, benzyl, and O-nitrophenyl glycosides of oligosaccharides. Analysis of substrates and products for four N-acetyl-D-glucosaminyl-transferases involved in mucin synthesis. *Carbohydr Res* (1983) 120:3-16
- Brockhausen I, Schutzbach J, Kuhns W. Glycoproteins and their relationship to human disease. *Acta Anat* (1998) 161:37-78
- Brown DA, London E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* (2000) 275:17221-17224
- Brown DA, London E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* (1998) 14:111-136
- Brückner K, Perez L, Clausen H, Cohen S. Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* (2000) 406:411-415
- Brusés JL, Rutishauser U. (2000) Polysialic acid in neural cell development: roles, regulation and mechanism. En: *Molecular and Cellular Glycobiology* (Fukuda, M., Hindsgaul O., eds.) Oxford University Press, Oxford, UK, 116-132
- Bucci C, Thomsen P, Nicoziani P, McCarthy J, van Deurs B. Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell* (2000) 11:467-480
- Bucci C, Wandinger-Ness A, Lutcke A, Chiariello M, Bruni CB, Zerial M. Rab5a is a common component of the apical and basolateral endocytic machinery in polarized epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (1994) 91:5061-5065
- Burger PC, Lotscher M, Streiff M, Kleene R, Kaissling B, Berger EG. Immunocytochemical localization of alpha2,3(N)-sialyltransferase (ST3Gal III) in cell lines and rat kidney tissue sections: evidence for golgi and post-golgi localization. *Glycobiology* (1998) 8:245-257
- Byrd JC, Dahiya R, Huang J, Kim YS. Inhibition of mucin synthesis by benzyl-alpha-GalNAc in KATO III gastric cancer and Caco-2 colon cancer cells. *Eur J Cancer* (1995) 31A:1498-1505

C

- Campbell JA, Davies GJ, Bulone V, Henrissat B. A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* (1997) 326:929-939
- Carroll, K.S., J. Hanna, I. Simon, J. Krise, P. Barbero, and S.R. Pfeffer. Role of the Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47. *Science* (2001) 292:1373–1377.
- Chang ML, Eddy RL, Shows TB, Lau JT. Three genes that encode human beta-galactoside alpha 2,3-sialyltransferases. Structural analysis and chromosomal mapping studies. *Glycobiology* (1995) 5:319-325
- Chantret I, Chevalier G, Dussaulx E, Zweibaum A. A and H blood group antigens as markers of sucrase-isomaltase from the enterocyte-like differentiated human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2. *Cancer Res* (1987) 47:1426-1433
- Chardin P, McCormick F. Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive. *Cell* (1999) 97:153-55
- Chavrier P, Gorvel JP, Stelzer E, Simons K, Gruenberg J, Zerial M. Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal. *Nature* (1991) 353:769-772
- Chavrier P, Goud B. The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* (1999) 11:466-475
- Chen C, Ma J, Lazic A, Backovic M, Colley KJ. Formation of insoluble oligomers correlates with ST6Gal I stable localization in the golgi. *J Biol Chem* (2000) 275:13819-13826
- Chen CS, Martin OC, Pagano RE. Changes in the spectral properties of a plasma membrane lipid analog during the first seconds of endocytosis in living cells. *Biophys J* (1997) 72:37-50
- Chen CS, Patterson MC, Wheatley CL, O'Brien JF, Pagano RE. Broad screening test for sphingolipid-storage diseases. *Lancet* (1999) 354:901-905
- Chen YA, Scheller RH SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2001) 2:98-106
- Cheong KH, Zacchetti D, Schneeberger EE, Simons K. VIP17/MAL, a lipid raft-associated protein, is involved in apical transport in MDCK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999) 96:6241–6248
- Chiang HL, Dice JF. Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal. *J Biol Chem* (1988) 263:6797-805
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* (1987) 162:156-159
- Christoforidis S, McBride HM, Burgoyne RD, Zerial M. The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* (1999) 397:621-625
- Chuang JZ, Sung CH. The cytoplasmic tail of rhodopsin acts as a novel apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* (1998) 142:1245–1256
- Clausen H, Bennett EP. A family of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferases control the initiation of mucin-type O-linked glycosylation. *Glycobiology* (1996) 6:635-646
- Cohn ZA, Ehrenreich BA. The uptake, storage, and intracellular hydrolysis of carbohydrates by macrophages. *J Exp Med* (1969) 129:201-225

Collawn JF, Stangel M, Kuhn LA, Esekogwu V, Jing SQ, Trowbridge IS, Tainer JA Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis. *Cell* (1990) 63:1061-1072

Colley K. Golgi localization of glycosyltransferases: more questions than answers. *Glycobiology* (1997) 7:1-13

Cosson P, Letourneur F. Coatomer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* (1994) 263:1629-1631

Coutinho PM, Henrissat B. (1999) Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. En: Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering (H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat and B. Svensson eds.) The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 3-12.

Creutz CE. The annexins and exocytosis. *Science* (1992) 258:924-931

Crocker PR, Clark EA, Filbin M, Gordon S, Jones Y, Kehrl JH, Kelm S, Le Douarin N, Powell L, Roder J, Schnaar RL, Sgroi DC, Stamenkovic K, Schauer R, Schachner M, van den Berg TK, van der Merwe PA, Watt SM, Varki A. Siglecs: a family of sialic-acid binding lectins. *Glycobiology* (1998) 8:v

Crocker PR, Varki A. Siglecs in the immune system. *Immunology* (2001) 103:137-45

Crump CM, Xiang Y, Thomas L, Gu F, Austin C, Tooze SA, Thomas G. PACS-1 binding to adaptors is required for acidic cluster motif-mediated protein traffic. *EMBO J* (2001) 20:2191-2201

Cruz JC, Sugii S, Yu C, Chang TY. Role of Niemann-Pick type C1 protein in intracellular trafficking of low density lipoprotein-derived cholesterol. *J Biol Chem* (2000) 275:4013-4021

Cuervo AM, Dice JF. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* (1996) 273: 501-503

Cuervo AM, Dice JF, Knecht E. A population of rat liver lysosomes responsible for the selective uptake and degradation of cytosolic proteins. *J Biol Chem* (1997) 272:5606-5615

D

Dall'Olio F. The sialyl- α 2,6-lactosaminyl-structure: biosynthesis and functional role. *Glycoconj J* (2000) 17:669-676

Dall'Olio F, Malagolini N, Serafini-Cessi F. The expression of soluble and cell-bound α 2,6 sialyltransferase in human colonic carcinoma CaCo-2 cells correlates with the degree of enterocytic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* (1992) 184:1405-110

Datta AK, Chammas R, Paulson JC. Conserved cysteines in the sialyltransferase sialylmotifs form an essential disulfide bond. *J Biol Chem* (2001) 276:15200-15207

Datta AK, Paulson JC. Sialylmotifs of sialyltransferases. *Indian J Biochem Biophys* (1997) 34:157-165

Datta AK, Paulson JC. The sialyltransferase "sialylmotif" participates in binding the donor substrate CMP-NeuAc. *J Biol Chem* (1995) 270:1497-1500

Datta A., Sinha A., Paulson JC. Mutation of the sialyltransferase S-sialylmotif alters the kinetics of the donor and acceptor substrates. *J Biol Chem* (1998) 273:9608-9614

Davies JP, Chen FW, Ioannou YA. Transmembrane molecular pump activity of Niemann-Pick C1 protein. *Science* (2000) 290:2295-2298

- Davies J, Ioannou Y, Topological analysis of Niemann-Pick C1 protein reveals that the membrane orientation of the putative sterol-sensing domain is identical to those of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein. *J Biol Chem* (2000) 275:24367-24374
- D'Azzo A, Hoogeveen A, Reuser AJ, Robinson D, Galjaard H. Molecular defect in combined beta-galactosidase and neuraminidase deficiency in man. *Proc Natl Acad Sci USA* (1982) 79:4535-4539
- DeCourcy K, Storrie B. Osmotic swelling of endocytic compartments induced by internalized sucrose is restricted to mature lysosomes in cultured mammalian cells. *Exp Cell Res* (1991) 192:52-60
- Delannoy P, Kim I, Emery N, De Bolós C, Verbert A, Degand P, Huet G. Benzyl-N-acetyl- α -D-galactosaminide inhibits the sialylation and the secretion of mucins by a mucin secreting HT-29 cell subpopulation. *Glycoconj J* (1996) 13:717-726
- Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HF, Stoorvogel W, Geuze HJ. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci* (2000) 113:3365-3374
- Desnick, Shindler (2001) Schindler's disease. En: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW y Vogelstein B, eds) 8^{ava} ed. McGraw Hill, New York
- Desseyn JL, Aubert JP, Porchet N, Laine A. Evolution of the large secreted gel-forming mucins. *Mol Biol Evol* (2000) 17:1175-1184
- Desseyn JL, Buisine MP, Porchet N, Aubert JP, Degand P, Laine A. Evolutionary history of the 11p15 human mucin gene family. *J Mol Evol* (1998) 46:102-106
- Dhanvantari S, Loh YP. Lipid raft association of carboxypeptidase E is necessary for its function as a regulated secretory pathway sorting receptor. *J Biol Chem* (2000) 275:29887-29893
- Diaz E, Pfeffer SR. TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking. *Cell* (1998) 93:433-443.
- Diaz E, Schimmöller F, Pfeffer SR. A novel Rab9 effector required for transport from endosomes to the TGN. *J Cell Biol*. (1997) 138:283-290
- Dilulio NA, Bhavanandan VP. The saccharides of the MUC1 mucin-type glycoprotein, epitectin, produced by H.Ep.2 cells in the presence of aryl-N-acetyl- α -galactosaminides. *Glycobiology* (1995) 5:195-199
- Dittie AS, Hajibagheri N, Tooze SA. The AP-1 adaptor complex binds to immature secretory granules from PC12 cells, and is regulated by ADP-ribosylation factor. *J Cell Biol* (1996) 132: 523-536
- Dittie AS, Klumperman J, Tooze SA. Differential distribution of mannose-6-phosphate receptors and furin in immature secretory granules. *J Cell Sci* (1999) 112:3955-3966
- Dittie AS, Thomas L, Thomas G, Tooze SA. Interaction of furin in immature secretory granules from neuroendocrine cells with the AP-1 adaptor complex is modulated by casein kinase II phosphorylation. *EMBO J* (1997) 16:4859-4870
- Draper, R.K., Y. Goda, F.M. Brodsky, and S.R. Pfeffer. Anti-clathrin antibodies inhibit endocytosis but not receptor recycling to the *trans* Golgi network in vitro. *Science* (1990) 248:1539-1541
- Duncan JR, Kornfeld S. Intracellular movement of two mannose 6-phosphate receptors: return to the Golgi apparatus. *J Cell Biol* (1988) 106:617-628

E

Eberle W, Sander C, Klaus W, Schmidt B, von Figura K, Peters C. The essential tyrosine of the internalization signal in lysosomal acid phosphatase is part of a beta turn. *Cell* (1991) 67:1203-1209

Echard A, Jollivet F, Martinez O, Lacapere JJ, Rousselet A, Janoueix-Lerosey I, Goud B. Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science* (1998) 279:580-585

Eckhardt M, Gotza B, Gerardy-Schahn R. Mutants of the CMP-sialic acid transporter causing the Lec2 phenotype. *J Biol Chem* (1998) 273:20189-20195

Egea G, Franci C, Gambus G, Lesuffleur T, Zweibaum A, Real FX. cis-Golgi resident proteins and O-glycans are abnormally compartmentalized in the RER of colon cancer cells. *J Cell Sci* (1993) 105:819-830

Ellies LG, Jones AT, Williams MJ, Ziltener HJ. Differential regulation of CD43 glycoforms on CD4+ and CD8+ T lymphocytes in graft-versus-host disease. *Glycobiology* (1994) 4:885-893

Emans N, Gorvel JP, Walter C, Gerke V, Kellner R, Griffiths G, Gruenberg J. Annexin II is a major component of fusogenic endosomal vesicles. *J Cell Biol* (1993) 120:1357-1370

Eng FJ, Varlamov O, Fricker LD. Sequences within the cytoplasmic domain of Gp180/carboxypeptidase D mediate localization to the trans-Golgi network. *Mol Biol Cell* (1999) 10:35-46

Evans WH, Hardison WG. Phospholipid, cholesterol, polypeptide and glycoprotein composition of hepatic endosome subfractions. *Biochem J* (1985) 232:33-36

F

Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, Jahn R. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci USA* (1998) 95:15781-15786

Fernandez-Borja M, Wubbolts R, Calafat J, Janssen H, Divecha N, Dusseljee S, Neefjes J. Multivesicular body morphogenesis requires phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Curr Biol* (1999) 9:55-58

Fialka I., Steinlein P., Ahorn H., Böck G., Burbelo PD., Haberfellner M., Lottspeich F., Paiha K., Pasquali C., Huber L.A. Identification of syntenin as a protein of apical early endocytic compartment in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* (1999) 274:26233-26239

Fiedler K, Lafont F, Parton RG, Simons K. Annexin XIIIb: a novel epithelial specific annexin is implicated in vesicular traffic to the apical plasma membrane. *J Cell Biol* (1995) 128:1043-1053

Fogh, J, Trempe, G. (1975) New human tumor cell lines. Human Tumor Cells in vitro, ed. J. Fogh, Plenum Publication Corporation, New York: pp. 115-140.

Folsch H, Ohno H, Bonifacino JS, Mellman I. A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* (1999) 99:189-198

Foxall C, Watson SR, Dowbenko D, Fennie C, Lasky LA, Kiso M, Hasegawa A, Asa D, Brandley BK. The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis(x) oligosaccharide. *J Cell Biol* (1992) 117:895-902

Fowler J, Vinall L, Swallow D. Polymorphism of the human muc genes. *Front Biosci* (2001) 6:D1207-D1215

Freeze HH Update and perspectives on congenital disorders of glycosylation. *Glycobiology* (2001) 11:129R-143R

Fukuda M. (2000) Cell surface carbohydrates: cell type-specific expression En: Molecular and Cellular Glycobiology (Fukuda, M., Hindsgaul O., eds.) Oxford University Press, Oxford, UK, 1-61

Fukuda M. Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens. *Cancer Res* (1996) 56:2237-2244

Fukuda M, Tsuboi S. Mucin-type O-glycans and leukosialin. *Biochim Biophys Acta* (1999) 1455:205-217

Furukawa K, Takamiya K, Okada M, Inoue M, Fukumoto S, Furukawa K. Novel functions of complex carbohydrates elucidated by the mutant mice of glycosyltransferase genes. *Biochim Biophys Acta* (2001) 1525:1-12

G

Gagescu R, Demaurex N, Parton RG, Hunziker W, Huber LA, Gruenberg J. The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney cells is a mildly acidic compartment rich in raft components. *Mol Biol Cell* (2000) 11:2775-2791

Galbiati F, Razani B, Lisanti MP. Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* (2001) 106:403-411

Gallatin WM, Weissman IL, Butcher EC A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* (1983) 304:30-34

Gallwitz D, Donath C, Sander C. A yeast gene encoding a protein homologous to the human c-ha/bas proto-oncogene product. *Nature* (1983) 306:704-707

Gaullier JM, Simonsen A, D'Arrigo A, Bremnes B, Stenmark H, Aasland R. FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature* (1998) 394:432-433

Gavel Y, von Heijne G. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng* (1990) 3:433-442

Gendler SJ. MUC1, the renaissance molecule. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* (2001) 6:339-353

Geremia, RA, Harduin-Lepers, A, Delannoy, P : Identification of two novel conserved amino acid residues in eukaryotic sialyltransferases: implications for their mechanism of action. *Glycobiology* (1997) 7:v-vii

Gibson A, Futter CE, Maxwell S, Allchin EH, Shipman M, Kraehenbuhl JP, Domingo D, Odorizzi G, Trowbridge IS, Hopkins CR. Sorting mechanisms regulating membrane protein traffic in the apical transcytotic pathway of polarized MDCK cells. *J Cell Biol* (1998) 143:81-94

Gillooly DJ, Morrow IC, Lindsay M, Gould R, Bryant NJ, Gaullier JM, Parton RG, Stenmark H. Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J* (2000) 19:4577-4588

Giordanengo V, Bannwarth S, Laffont C, Van Miegem V, Harduin-Lepers A, Delannoy P, Lefebvre JC. Cloning and expression of cDNA for a human Gal(beta1-3)GalNAc alpha2,3-sialyltransferase from the CEM T-cell line. *Eur J Biochem* (1997) 247:558-566

- Gokay K.E, Wilson J.M. Targeting of an apical endosomal protein to endosomes in MDCK cells. *Traffic* (2000) 1:354-365
- Goodson HV, Valetti C, Kreis TE. Motors and membrane traffic. *Curr Opin Cell Biol* (1997) 9:18-28
- Gouyer V, Leteurtre E, Delmotte P, Steelant WF, Krzewinski-Recchi MA, Zanetta JP, Lesuffleur T, Trugnan G, Delannoy P, Huet G. Differential effect of GalNAc α -O-bn on intracellular trafficking in enterocytic HT-29 and Caco-2 cells: correlation with the glycosyltransferase expression pattern. *J Cell Sci* (2001b) 114:1455-1471
- Gouyer V, Leteurtre E, Zanetta JP, Lesuffleur T, Delannoy P, Huet G. Inhibition of the glycosylation and alteration in the intracellular trafficking of mucins and other glycoproteins by GalNAc α -O-bn in mucosal cell lines: an effect mediated through the intracellular synthesis of complex GalNAc α -O-bn oligosaccharides. *Front Biosci* (2001a) 6:D1235-D1244
- Green PJ, Tamatani T, Watanabe T, Miyasaka M, Hasegawa A, Kiso M, Yuen CT, Stoll MS, Feizi T. High affinity binding of the leucocyte adhesion molecule L-selectin to 3'-sulphated-Le(a) and -Le(x) oligosaccharides and the predominance of sulphate in this interaction demonstrated by binding studies with a series of lipid-linked oligosaccharides. *Biochem Biophys Res Commun* (1992) 188:244-251
- Grindstaff K, Yeaman C, Anandasabapathy N, Hsu S-C, Rodriguez-Boulan E, Scheller RH, Nelson WJ: Sec6/8 complex is recruited to cell-cell contacts and specifies transport vesicle delivery to the basal-lateral membrane in epithelial cells. *Cell* (1998) 93:731-740
- Gruenberg J. The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2001) 2: 721-730
- Grundmann U, Nerlich C., Rein T, Zettlmeissl G. Complete cDNA sequence encoding human human β -galactoside α 2,6-sialyltransferase. *Nucleic Acids Res* (1990) 18: 667
- Gu F, Crump CM, Thomas G. Trans-Golgi network sorting. *Cell Mol Life Sci* (2001) 58:1067-1084
- Gu F, Gruenberg J. Biogenesis of transport intermediates in the endocytic pathway. *FEBS Lett* (1999) 452:616-6
- Gum JR, Byrd JC, Hicks JW, Toribara NW, Lampport DT, Kim YS. Molecular cloning of human intestinal mucin cDNAs. Sequence analysis and evidence for genetic polymorphism. *J Biol Chem* (1989) 264:6480-6487
- Gum JR Jr, Hicks JW, Toribara NW, Rothe EM, Lagace RE, Kim YS. The human MUC2 intestinal mucin has cysteine-rich subdomains located both upstream and downstream of its central repetitive region. *J Biol Chem* (1992) 267:21375-21383
- Gum JR Jr, Hicks JW, Toribara NW, Siddiki B, Kim YS. Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA. Identification of the amino terminus and overall sequence similarity to prepro-von Willebrand factor. *J Biol Chem* (1994) 269:2440-2446
- Guo W, Sacher M, Barrowman J, Ferro-Novick S, Novick P. Protein complexes in transport vesicle targeting. *Trends Cell Biol* (2000) 10:251-255

H

- Hakomori S. Glycosphingolipids in cellular interactions, differentiation and oncogenesis. *Annu Rev Biochem* (1981) 50:733-764
- Hammer JA 3rd, Wu XS. Rabs grab motors: defining the connections between Rab GTPases and motor proteins. *Curr Opin Cell Biol* (2002) 14:69-75

- Hancock LW, Thaler MM, Horwitz AL, Dawson G. Generalized N-acetylneuraminic acid storage disease: quantitation and identification of the monosaccharide accumulating in brain and other tissues. *J Neurochem* (1982) 38:803-809
- Hanisch FG, Muller S. MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. *Glycobiology* (2000) 10:439-449
- Hansen JE, Lund O, Engelbrecht J, Bohr H, Nielsen JO, Hansen JES, Brunak S. Prediction of O-glycosylation of mammalian proteins: Specificity patterns of UDP-GalNAc:-polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. *Biochem J* (1995) 308:801-813
- Hansen JE, Lund O, Rapacki K, Brunak S. O-glycbase version 2.0 - A revised database of O-glycosylated proteins. *Nucleic Acids Res* (1997) 25: 278-282
- Hansen JE, Lund O, Tolstrup N, Gooley AA, Williams KL, Brunak S. NetOglyc: Prediction of mucin type O-glycosylation sites based on sequence context and surface accessibility. *Glycoconj J* (1998) 15:115-130
- Hara-Kuge S, Ohkura T, Seko A, Yamashita K. Vesicular-integral membrane protein, VIP36, recognizes high-mannose type glycans containing alpha1-->2 mannosyl residues in MDCK cells. 1999, *Glycobiology* (1999) 9:833-839
- Harder T, Kellner R, Parton RG, Gruenberg J. Specific release of membrane-bound annexin II and cortical cytoskeletal elements by sequestration of membrane cholesterol. *Mol Biol Cell* (1997) 8:533-545
- Harduin-Lepers A, Vallejo-Ruiz V, Krzewinski-Recchi MA, Samyn-Petit B, Julien S, Delannoy P. The human sialyltransferase family. *Biochimie* (2001) 83:727-737
- Harduin-Lepers A, Stokes DC, Steelant WF, Samyn-Petit B, Krzewinski-Recchi MA, Vallejo-Ruiz V, Zanetta JP, Auge C, Delannoy P. Cloning, expression and gene organization of a human Neu5Ac alpha 2-3Gal beta 1-3GalNAc alpha 2,6-sialyltransferase: hST6GalNAcIV. *Biochem J* (2000) 352:37-48
- Hart GW, Kreppel LK, Comer FI, Arnold CS, Snow DM, Ye Z, Cheng X, DellaManna D, Caine DS, Earles BJ, Akimoto Y, Cole RN, Hayes BK. O-GlcNAcylation of key nuclear and cytoskeletal proteins: reciprocity with O-phosphorylation and putative roles in protein multimerization. *Glycobiology* (1996) 6:711-716
- Hauri H, Appenzeller C, Kuhn F, Nufer O. Lectins and traffic in the secretory pathway. *FEBS Lett* (2000) 476:32-37
- Hay JC. SNARE complex structure and function. *Exp Cell Res* (2001) 271:10-21
- Hebert E. Endogenous lectins as cell surface transducers *Biosci Rep* (2000) 20:213-237
- Helenius A, Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* (2001) 291:2364-2369
- Hennebicq Reig S, Kim I, Janin A, Grard G, Hemon B, Moreau O, Porchet N, Aubert JP, Degand P, Huet G. Regulation of cathepsin D dependent on the phenotype of colon carcinoma cells. *Int J Cancer* (1996) 68:479-484
- Hennebicq-Reig S, Lesuffleur T, Capon C, De Bolos C, Kim I, Moreau O, Richet C, Hemon B, Recchi MA, Maes E, Aubert JP, Real FX, Zweibaum A, Delannoy P, Degand P, Huet G Permanent exposure of mucin-secreting HT-29 cells to benzyl-N-acetyl- α -D-galactosaminide induces abnormal O-glycosylation of mucins and inhibits constitutive and stimulated MUC5AC secretion. *Biochem J* (1998) 334:283-295

Hennet T, Chui D, Paulson JC, Marth JD. Immune regulation by the ST6Gal sialyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1998) 95:4504-4509

Higgins ME, Davies JP, Chen FW, Ioannou YA. Niemann-Pick C1 is a late endosome-resident protein that transiently associates with lysosomes and the trans-Golgi network. *Mol Genet Metab* (1999) 68:1-13

Hirabayashi Y, Ichikawa S. (2000) Roles of sphingolipids and glycosphingolipids in biological membranes. en *Molecular and Cellular Glycobiology* (Fukuda, M., Hindsgaul O., eds.) Oxford University Press, Oxford, UK, 220-248

Hirokawa N, Noda Y, Okada Y. Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr Opin Cell Biol* (1998) 10:60-73

Hirschberg K, Miller CM, Ellenberg J, Presley JF, Siggia ED, Phair RD, Lippincott-Schwartz J. Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells. *J Cell Biol* (1998a) 143:1485-1503

Hirschberg CB, Robbins PW, Abeijon C. Transporters of nucleotide sugars, ATP, and nucleotide sulfate in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem* (1998b) 67:49-69

Hirst J, Robinson MS. Clathrin and adaptors. *Biochim Biophys Acta* (1998) 1404:173-193

Hobert ME, Kil SJ, Medof ME, Carlin CR. The cytoplasmic juxtamembrane domain of the epidermal growth factor receptor contains a novel autonomous basolateral sorting determinant. *J Biol Chem* (1997) 272:32901-32909

Hoekstra D, van IJzendoorn SC. Lipid trafficking and sorting: how cholesterol is filling gaps. *Curr Opin Cell Biol* (2000) 12:496-502

Homeister JW, Lowe JB. (2000) Carbohydrate recognition in leukocyte-endothelial cell interactions. En *Molecular and Cellular Glycobiology*, Fukuda M y Hindsgaul O Eds. Oxford University Press. Oxford 62-115

Höning S, Hunziker W. Cytoplasmic determinants involved in direct lysosomal sorting, endocytosis, and basolateral targeting of rat Igp120 (lamp-I) in MDCK cells. *J Cell Biol* (1995) 128:321-332

Hoogeveen AT, Verheijen FW, Galjaard H. The relation between human lysosomal beta-galactosidase and its protective protein. *J Biol Chem* (1983) 258:12143-12146

Hsu SC, Hazuka CD, Foletti DL, Scheller RH. Targeting vesicles to specific sites on the plasma membrane: the role of the sec6/8 complex. *Trends Cell Biol* (1999) 9:150-153

Hsu SC, Ting AE, Hazuka CD, Davanger S, Kenny JW, Kee Y, Scheller RH. The mammalian brain rsec6/8 complex. *Neuron* (1996) 17:1209-1219

Huang J, Byrd JC, Yoon WH, Kim YS. Effect of benzyl-alpha-GalNAc, an inhibitor of mucin glycosylation, on cancer-associated antigens in human colon cancer cells. *Oncol Res* (1992) 4:507-515

Huet G, Hennebicq-Reig S, de Bolos C, Ulloa F, Lesuffleur T, Barbat A, Carriere V, Kim I, Real FX, Delannoy P, Zweibaum A. GalNAc-alpha-O-benzyl inhibits NeuAalpha2-3 glycosylation and blocks the intracellular transport of apical glycoproteins and mucus in differentiated HT-29 cells. *J Cell Biol* (1998) 141:1311-1322

Huet G, Kim I, de Bolos C, Lo-Guidice JM, Moreau O, Hemon B, Richet C, Delannoy P, Real X, Degand P. Characterization of mucins and proteoglycans synthesized by a mucin-secreting HT-29 cell subpopulation. *J Cell Sci* (1995) 108:1275-1285

I

Ihrke G, Bruns JR, Luzio JP, Weisz OA. Competing sorting signals guide endolyn along a novel route to lysosomes in MDCK cells. *EMBO J* (2001) 20:6256-6264

Ikehara Y, Kojima N, Kurosawa N, Kudo T, Kono M, Nishihara S, Issiki S, Morozumi K, Itzkowitz S, Tsuda T, Nishimura SI, Tsuji S, Narimatsu H. Cloning and expression of a human gene encoding an N-acetylgalactosamine- α 2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc I): a candidate for synthesis of cancer-associated sialyl-Tn antigens. *Glycobiology* (1999) 9:1213-1224

Ikonen E. Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* (2001) 13:470-477

Ikonen E, Simons K. Protein and lipid sorting from the trans-Golgi network to the plasma membrane in polarized cells. *Semin Cell Dev Biol* (1998) 9:503-509

Imperiali B, O'Connor SE. Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. *Curr Opin Chem Biol* (1999) 3:643-649

Ioannou YA. The structure and function of the Niemann-Pick C1 protein. *Mol Genet Metab* (2000) 71:175-181

Isaac EL, Karageorgos LE, Brooks DA, Hopwood JJ, Meikle PJ. Regulation of the lysosome-associated membrane protein in a sucrose model of lysosomal storage. *Exp Cell Res* (2000) 254:204-209

Ishii A, Ohta M, Watanabe Y, Matsuda K, Ishiyama K, Sakoe K, Nakamura M, Inokuchi J, Sanai Y, Saito M. Expression cloning and functional characterization of human cDNA for ganglioside GM3 synthase. *J Biol Chem* (1998) 273:31652-31655

Itin C., N. Ulitzur, B. Muhlbauer, and S.R. Pfeffer. Mapmodulin, cytoplasmic dynein, and microtubules enhance the transport of mannose 6-phosphate receptors from endosomes to the trans Golgi network. *Mol Biol Cell* (1999) 10:2191-2197

Itin C, Roche AC, Monsigny M, Hauri HP. ERGIC-53 is a functional mannose-selective and calcium-dependent human homologue of leguminous lectins. *Mol Biol Cell* (1996) 7:483-493

J

Jacob R, Naim HY. Apical membrane proteins are transported in distinct vesicular carriers. *Curr Biol* (2001) 11:1444-1450

Jacob R, Preuss U, Panzer P, Alfalah M, Quack S, Roth MG, Naim H, Naim HY. Hierarchy of sorting signals in chimeras of intestinal lactase-phlorizin hydrolase and the influenza virus hemagglutinin. *J Biol Chem* (1999) 274:8061-8067

Jaeken J, Matthijs G. Congenital disorders of glycosylation. *Annu Rev Genomics Hum Genet* (2001) 2:129-51

Jahn R, Südhof TC. Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem* (1999) 68: 863-911

K

Kamal A, Goldstein LS. Principles of cargo attachment to cytoplasmic motor proteins. *Curr Opin Cell Biol* (2002) 14:63-68

- Kamal A, Goldstein LS. Connecting vesicle transport to the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* (2000) 12:503-508
- Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* (1996) 88:3259-3287
- Kaplan HA, Woloski BM, Hellman M, Jamieson JC. Studies on the effect of inflammation on rat liver and serum sialyltransferase. Evidence that inflammation causes release of Gal beta 1 leads to 4GlcNAc alpha 2 leads to 6 sialyltransferase from liver. *J Biol Chem* (1983) 258:11505-11509
- Karageorgos LE, Isaac EL, Brooks DA, Ravenscroft EM, Davey R, Hopwood JJ, Meikle PJ. Lysosomal biogenesis in lysosomal storage disorders. *Exp Cell Res* (1997) 234:85-97
- Karlsson KA. Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria. *Annu Rev Biochem* (1989) 58:309-350
- Kawai H, Allende ML, Wada R, Kono M, Sango K, Deng C, Miyakawa T, Crawley JN, Werth N, Bierfreund U, Sandhoff K, Proia RL. Mice expressing only monosialoganglioside GM3 exhibit lethal audiogenic seizures. *J Biol Chem* (2001) 276:6885-6888
- Keller P, Simons K.. Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin. *J Cell Biol* (1998) 140:1357-1367
- Keller P, Simons K Post-Golgi biosynthetic trafficking. *J Cell Sci* (1997) 110:3001-3009
- Keller P, Toomre D, Diaz E, White J, Simons K. Multicolour imaging of post-Golgi sorting and trafficking in live cells. *Nat Cell Biol* (2001) 3:140-149
- Kelm S, Schauer R. Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int Rev Cytol* (1997) 175: 137-240
- Kenworthy AK, Petranova N, Edidin M: High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI-anchored protein in cell plasma membranes. *Mol Biol Cell* (2000) 11:1645-1655.
- Kern HF, Roher HD, von Bulow M, Kloppel G. Fine structure of three major grades of malignancy of human pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* (1987) 2:2-13
- Kim T, Fiedler K, Madison DL, Krueger WH, Pfeiffer SE. Cloning and characterization of MVP17: a developmentally regulated myelin protein in oligodendrocytes. *J Neurosci Res* (1995) 42:413-422
- Kim YJ, Kim KS, Kim SH, Kim CH, Ko JH, Choe IS, Tsuji S, Lee YC. Molecular cloning and expression of human Gal beta 1,3GalNAc alpha 2,3-sialyltransferase (hST3Gal II). *Biochem Biophys Res Commun* (1996) 228:324-327
- Kim YJ, Kim KS, Do S, Kim CH, Kim SK, Lee YC. Molecular cloning and expression of human alpha2,8-sialyltransferase (hST8Sia V). *Biochem Biophys Res Commun* (1997) 235:327-330
- Kirchhausen T. Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2000) 1:187-197
- Kitagawa H, Paulson JC. Differential expression of five sialyltransferase genes in human tissues. *J Biol. Chem* (1994a) 269:17872-17878
- Kitagawa H, Paulson JC. Cloning of a novel α 2,3-sialyltransferase that sialylates glycoprotein and glycolipid carbohydrate groups. *J Biol. Chem* (1994b) 269:1394-1401
- Kitagawa H, Paulson JC. Cloning and expression of human Gal β 1,3(4)GlcNAc α 2,3-sialyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* (1993) 194:375-382

- Kitagawa H, Mattei MG, Paulson JC. Genomic organization and chromosomal mapping of the Gal beta 1,3GalNAc/Gal beta 1,4GlcNAc alpha 2,3-sialyltransferase. *J Biol Chem* (1996) 271:931-938
- Klein A, Roussel P. O-acetylation of sialic acids. *Biochimie* (1998) 80:49-57
- Knight A, Hughson E, Hopkins CR, Cutler DF. Membrane protein trafficking through the common apical endosome compartment of polarized Caco-2 cells. *Mol Biol Cell* (1995) 6:597-610
- Ko, D. C., Gordon, M. D., Jin, J. Y., Scott, M. P. Dynamic Movements of Organelles Containing Niemann-Pick C1 Protein: NPC1 Involvement in Late Endocytic Events. *Mol. Biol. Cell* (2001) 12: 601-614
- Kobayashi T, Beuchat MH, Lindsay M, Frias S, Palmiter RD, Sakuraba H, Parton RG, Gruenberg J. Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nat Cell Biol* (1999) 1:113-118
- Kobayashi T, Gu F, Gruenberg J. Lipids, lipid domains and lipid-protein interactions in endocytic membrane traffic. *Semin Cell Dev Biol* (1998b) 9:517-526
- Kobayashi T, Stang E, Fang KS, de Moerloose P, Parton RG, Gruenberg J A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* (1998a) 395:193-197
- Kobayashi T, Startchev K, Whitney AJ, Gruenber J. Localization of lysobisphosphatidic acid-rich membrane domains in late endosomes. *Biol Chem* (2001a) 382:483-485
- Kobayashi T, Yamaji-Hasegawa A, Kiyokawa E. Lipid domains in the endocytic pathway. *Semin Cell Dev Biol* (2001b) 12:173-182
- Kojima N, Lee YC, Hamamoto T, Kurosawa N, Tsuji S. Kinetic properties and acceptor substrate preferences of two kinds of Gal beta 1,3GalNAc alpha 2,3-sialyltransferase from mouse brain. *Biochemistry* (1994) 33:5772-5776
- Kolisis FN, Hervagault JF. Theoretical and experimental study on the competition of NANA-aldolase and cytidine-5'-monophosphosialate-synthase for their common substrate N-acetylneuraminic acid. *Biochem Int* (1986) 13:493-500
- Kolter T, Sandhoff K. Glycosphingolipid degradation and animal models of GM2-gangliosidoses. *J Inher Metab Dis* (1998) 21:548-563
- Kono M, Ohyama Y, Lee YC, Hamamoto T, Kojima N, Tsuji S. Mouse beta-galactoside alpha 2,3-sialyltransferases: comparison of in vitro substrate specificities and tissue specific expression. *Glycobiology* (1997) 7:469-479
- Kopitz J (1997) Glycolipids: Structure and Function. En: Glycosciences. Status and Perspectives. (Gabijs HJ y Gabiys S, eds). Chapman&Hall, Weinheim
- Kornfeld S, Mellman I. The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* (1989) 5:483-525.
- Kreitzer G, Marmorstein A, Okamoto P, Vallee R, Rodriguez-Boulan E: Kinesin and dynamin are required for post-Golgi transport of a plasma membrane protein. *Nat Cell Biol* (2000) 2:125-127
- Krise JP, Sincock PM, Orsel JG, Pfeffer SR Quantitative analysis of TIP47 (tail-interacting protein of 47kD)-receptor cytoplasmic domain in-teractions: implications for endosome-to-trans Golgi network trafficking. *J Biol Chem* (2000) 275:25188–25193
- Krömer A, Glombik MM, Huttner WB, Gerdes HH. Essential role of the granin-loop for sorting to secretory granules is revealed by expression of chromogranin B in the absence of endogenous protein synthesis. *J. Cell Biol* (1996) 140:1059–1070

Kuan S, Byrd JC, Basbaum C, Kim Y. Inhibition of mucin glycosylation by Aryl-N-acetyl- α -galactosaminides in Human Colon Cancer Cells. *J Biol Chem* (1989) 264:19271-19277

Kudo T, Ikehara Y, Togayachi A, Morozumi K, Watanabe M, Nakamura M, Nishihara S, Narimatsu H. Up-regulation of a set of glycosyltransferase genes in human colorectal cancer. *Lab Invest* (1998) 78:797-811

Kuehn MJ, Schekman R: COPII and secretory cargo capture into transport vesicles. *Curr Opin Cell Biol* (1997) 9:477-483

Kukuruzinska MA, Lennon K. Protein N-glycosylation: molecular genetics and functional significance. *Crit Rev Oral Biol Med* (1998) 9:415-448

Kuliawat R, Klumperman J, Ludwig T, Arvan P. Differential sorting of lysosomal enzymes out of the regulated secretory pathway in pancreatic beta-cells. *J Cell Biol* (1997) 137:595-608

Kundu A, Avalos RT, Sanderson CM, Nayak DP. Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J Virol* (1996) 70:6508-6515

L

Lafont F, Lecat S, Verkade P, Simons K. Annexin XIIIb associates with lipid microdomains to function in apical delivery. *J Cell Biol* (1998) 142:1413-1427

Lannert H, Gorgas K, Meissner I, Wieland FT, Jeckel D. Functional organization of the Golgi apparatus in glycosphingolipid biosynthesis. Lactosylceramide and subsequent glycosphingolipids are formed in the lumen of the late Golgi. *J Biol Chem* (1998) 273:2939-2946

Lapierre LA, Kumar R, Hales CM, Navarre J, Bhartur SG, Burnette JO, Provance DW Jr, Mercer JA, Bahler M, Goldenring JR. Myosin vb is associated with plasma membrane recycling systems. *Mol Biol Cell* (2001) 12:1843-1857

Le Bivic A, Quaroni A, Nichols B, Rodriguez-Boulan E. Biogenetic pathways of plasma membrane proteins in Caco-2, a human intestinal epithelial cell line. *J Cell Biol* (1990) 111:1351-1361

Lebrand C, Corti M, Goodson H, Cosson P, Cavalli V, Mayran N, Faure J, Gruenberg J. Late endosome motility depends on lipids via the small GTPase Rab7. *EMBO J* (2002) 21:1289-1300

Lecat S, Lafont F. Annexins and their interacting proteins in membrane traffic. *Protoplasma* (1999) 207:133-140

Le TL, Yap AS, Stow JL. Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. *J Cell Biol* (1999) 146:219-232

Lee YC, Kim YJ, Lee KY, Kim KS, Kim BU, Kim HN, Kim CH, Do SI. Cloning and expression of cDNA for a human Sia alpha 2,3Gal beta 1, 4GlcNA:alpha 2,8-sialyltransferase (hST8Sia III). *Arch Biochem Biophys* (1998) 360:41-46

Lee YC, Kojima N, Wada E, Kurosawa N, Nakaoka T, Hamamoto T, Tsuji S. Cloning and expression of cDNA for a new type of Gal β 1,3GalNAc α 2,3-sialyltransferase. *J Biol Chem* (1994) 269:10028-10033

Lee YC, Kurosawa N, Hamamoto T, Nakaoka T, Tsuji S. Molecular cloning and expression of Gal beta 1,3GalNAc alpha 2,3-sialyltransferase from mouse brain. *Eur J Biochem* (1993) 216: 377-385

Lemyre E, Russo P, Melancon SB, Gagne R, Potier M, Lambert M. Clinical spectrum of infantile free sialic acid storage disease. *Am J Med Genet* (1999) 82:385-891

- Leighton J, Brada Z, Estes LW, Justh G. Secretory activity and oncogenicity of a cell line (MDCK) derived from canine kidney. *Science* (1969) 163:472-473
- Lesuffleur T, Barbat A, Dussaulx E, Zweibaum A. Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Res* (1990) 50:6334-6343
- Lesuffleur T, Barbat A, Luccioni C, Beaumatin J, Clair M, Kornowski A, Dussaulx E, Dutrillaux B, Zweibaum A. Dihydrofolate reductase gene amplification-associated shift of differentiation in methotrexate-adapted HT-29 cells. *J Cell Biol* (1991) 115:1409-1418
- Lesuffleur T, Porchet N, Aubert JP, Swallow D, Gum JR, Kim YS, Real FX, Zweibaum A. Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations. *J Cell Sci* (1993) 106:771-783
- Lesuffleur T, Roche F, Hill AS, Lacasa M, Fox M, Swallow DM, Zweibaum A, Real FX. Characterization of a mucin cDNA clone isolated from HT-29 mucus-secreting cells. The 3' end of MUC5AC? *J Biol Chem* (1995) 270:13665-13673
- Leung SM, Ruiz WG, Apodaca G. Sorting of membrane and fluid at the apical pole of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* (2000) 11:2131-2150
- Ligtenberg MJ, Kruijshaar L, Buijs F, van Meijer M, Litvinov SV, Hilkens J. Cell-associated episialin is a complex containing two proteins derived from a common precursor. *J Biol Chem* (1992) 267:6171-6177
- Liljedahl M, Maeda Y, Colanzi A, Ayala I, Van Lint J, Malhotra V. Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network. *Cell* (2001) 104:409-420
- Lippincott-Schwartz J, Cole NB. Roles for microtubules and kinesin in membrane traffic between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex *Biochem Soc Trans* (1995) 23:544-548
- Lisanti MP, Caras IW, Davitz MA, Rodriguez-Boulan E. A glycopospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* (1989) 109:2145-2156
- Liscum L, Klanssek JJ. Niemann-Pick disease type C. *Curr Opin Lipidol* (1998) 9:131-135
- Liscum L, Munn NJ. Intracellular cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta* (1999) 1438:19-37
- Litvinov SV, Hilkens J. The epithelial sialomucin, episialin, is sialylated during recycling. *J Biol Chem* (1993) 268:21364-21371
- Lloyd KO, Furukawa K. Biosynthesis and functions of gangliosides: recent advances. *Glycoconj J* (1998) 15:627-636
- Lloyd V, Ramaswami M, Kramer H: Not just pretty eyes: Drosophila eye-colour mutations and lysosomal delivery. *Trends Cell Biol* (1998) 8:257-259
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Molecular cell biology, 4^a ed. W.H. Freeman and Company. New York
- Lombardi D, Soldati T, Riederer MA, Goda Y, Zerial M, Pfeffer SR. Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network in vitro. *EMBO J* (1993) 12:677-682
- Low SH, Miura M, Roche PA, Valdez AC, Mostov KE, Weimbs T. Intracellular redirection of plasma membrane trafficking after loss of epithelial cell polarity. *Mol Biol Cell* (2000) 11:3045-3060
- Lukong KE, Elsliger MA, Chang Y, Richard C, Thomas G, Carey W, Tylki-Szymanska A, Czartoryska B, Buchholz T, Criado GR, Palmeri S, Pshezhetsky AV. Characterization of the sialidase molecular

defects in sialidosis patients suggests the structural organization of the lysosomal multienzyme complex. *Hum Mol Genet* (2000) 9:1075-1085

Lukong KE, Landry K, Elsliger MA, Chang Y, Lefrancois S, Morales CR, Pshezhetsky AV. Mutations in sialidosis impair sialidase binding to the lysosomal multienzyme complex. *J Biol Chem* (2001) 276:17286-17290

Luzio JP, Rous BA, Bright NA, Pryor PR, Mullock BM y Piper RC. Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J Cell Sci* (2000) 113:1515-1524.

M

Ma J, Colley KJ. A disulfide-bonded dimer of the Golgi beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase is catalytically inactive yet still retains the ability to bind galactose. *J Biol Chem* (1996) 271:7758-7766

Ma J, Qian R, Rausa FM 3rd, Colley KJ. Two naturally occurring alpha2,6-sialyltransferase forms with a single amino acid change in the catalytic domain differ in their catalytic activity and proteolytic processing. *J Biol Chem* (1997) 272:672-679

Ma J, Simonovic M, Qian R, Colley KJ. Sialyltransferase isoforms are phosphorylated in the cis-medial Golgi on serine and threonine residues in their luminal sequences. *J Biol Chem* (1999) 274: 8046-8052

Maeda Y, Beznoussenko GV, Van Lint J, Mironov AA, Malhotra V. Recruitment of protein kinase D to the trans-Golgi network via the first cysteine-rich domain. *EMBO J* (2001) 20:5982-5990

Maier O, Ait Slimane T, Hoekstra D. Membrane domains and polarized trafficking of sphingolipids. *Semin Cell Dev Biol* (2001) 12:149-161

Majuri ML, Niemela R, Tiisala S, Renkonen O, Renkonen R. Expression and function of α -2,3-sialyl- and α -1,3/1,4-fucosyltransferases in colon adenocarcinoma cell lines: role in synthesis of E-selectin counter-receptors. *Int J Cancer* (1995) 63:551-559

Mallet WG, Maxfield FR Chimeric forms of furin and TGN38 are transported with the plasma membrane in the trans-Golgi network via distinct endosomal pathways. *J Cell Biol* (1999) 146:345-359

Marks MS, Woodruff L, Ohno H, Bonifacino JS. Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals: evidence for distinct saturable components. *J Cell Biol* (1996) 135:341-354

Martín-Belmonte F, Arvan P, Alonso MA. MAL Mediates Apical Transport of Secretory Proteins in Polarized Epithelial Madin-Darby Canine Kidney Cells. *J Biol Chem* (2001) 276:49337-49342

Martín-Belmonte F, Kremer L, Albar JP, Marazuela M, Alonso MA. Expression of the MAL gene in the thyroid: the MAL proteolipid, a component of glycolipid-enriched membranes, is apically distributed in thyroid follicles. *Endocrinology* (1998) 139:2077-2084

Martín-Belmonte F, Puertollano R, Millan J, Alonso MA. The MAL proteolipid is necessary for the overall apical delivery of membrane proteins in the polarized epithelial Madin-Darby canine kidney and fischer rat thyroid cell lines. *Mol Biol Cell* (2000) 11:2033-2045

Matter K, Brauchbar M, Bucher K, Hauri HP. Sorting of endogenous plasma membrane proteins occurs from two sites in cultured human intestinal epithelial cells (Caco-2). *Cell* (1990) 60:429-437

Matter K, Mellman I. Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol* (1994) 6:545-554

- Matter K, Yamamoto EM, Mellman I. Structural requirements and sequence motifs for polarized sorting and endocytosis of LDL and Fc receptors in MDCK cells. *J Cell Biol* (1994) 126:991-1004
- May AP, Whiteheart SW, Weis WI. Unraveling the mechanism of the vesicle transport ATPase NSF, the N-ethylmaleimide-sensitive factor. *J Biol Chem* (2001) 276:21991-21994
- Mayer A, Wickner W, Haas A. Sec18p (NSF)-driven release of Sec17p (α -SNAP) can precede docking and fusion of yeast vacuoles. *Cell* (1996) 85:83-94
- McNew JA, Parlati F, Fukuda R, Johnston RJ, Paz K, Paumet F, Sollner TH, Rothman JE. Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* (2000) 407:194-198
- Meyer C, Zizioli D, Lausmann S, Eskelinen EL, Hamann J, Saftig P, von Figura K, Schu P μ 1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *EMBO J* (2000) 19:2193-2203
- Millán J, Puertollano R, Fan L, Alonso MA. Caveolin and MAL, two protein components of internal detergent-insoluble membranes, are in distinct lipid microenvironments in MDCK cells. *Biochem Biophys Res Commun* (1997) 233:707-712
- Miller RL, Collawn JF Jr, Fish WW. Purification and macromolecular properties of a sialic acid-specific lectin from the slug *Limax flavus*. *J Biol Chem* (1982) 257:7574-7580
- Molloy SS, Anderson ED, Jean F, Thomas G. Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends Cell Biol* (1999) 9:28-35
- Moloney DJ, Panin VM, Johnston SH, Chen J, Shao L, Wilson R, Wang Y, Stanley P, Irvine KD, Haltiwanger RS, Vogt TF. Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* (2000) 406:369-375
- Moniaux N, Escande F, Porchet N, Aubert JP, Batra SK. Structural organization and classification of the human mucin genes. *Front Biosci* (2001) 6:D1192-D1206
- Montgomery RR, Webster P, Mellman I. Accumulation of indigestible substances reduces fusion competence of macrophage lysosomes. *J Immunol* (1991) 147:3087-3095
- Mostov KE, Verges M, Altschuler Y. Membrane traffic in polarized epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol* (2000) 12:483-490
- Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR. Endocytosis. *Physiol Rev* (1997) 77:759-803
- Mukherjee S, Soe TT, Maxfield FR. Endocytic sorting of lipid analogues differing solely in the chemistry of their hydrophobic tails. *J Cell Biol* (1999) 144:1271-1284
- Mullins RD. How WASP-family proteins and the Arp2/3 complex convert intracellular signals into cytoskeletal structures. *Curr Opin Cell Biol* (2000) 12:91-96
- Mullock BM, Bright NA, Fearon CW, Gray SR, Luzio JP Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. *J Cell Biol* (1998) 140:591-601
- Mullock BM, Smith CW, Ihrke G, Bright NA, Lindsay M, Parkinson EJ, Brooks DA, Parton RG, James DE, Luzio JP, Piper RC. Syntaxin 7 is localized to late endosome compartments, associates with Vamp 8, and is required for late endosome-lysosome fusion. *Mol Biol Cell* (2000) 11:3137-3153
- Muramatsu T. Essential roles of carbohydrate signals in development, immune response and tissue functions, as revealed by gene targeting. *J Biochem* (2000) 127:171-176

Müsch A, Xu H, Shields D, Rodriguez-Boulan E. Transport of vesicular stomatitis virus G protein to the cell surface is signal mediated in polarized and nonpolarized cells. *J Cell Biol* (1996) 133:543-558

Muth TR, Ahn J, Caplan MJ. Identification of sorting determinants in the C-terminal cytoplasmic tails of the gamma-aminobutyric acid transporters GAT-2 and GAT-3. *J Biol Chem* (1998) 273: 25616-25627

Munro S. Localization of proteins to the Golgi apparatus. *Trends Cell Biol* (1998) 8:11-15

N

Nadano D, Iwasaki M, Endo S, Kitajima K, Inoue S, Inoue Y. A naturally occurring deaminated neuraminic acid, 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid (KDN). Its unique occurrence at the nonreducing ends of oligosialyl chains in polysialoglycoprotein of rainbow trout eggs. *J Biol Chem* (1986) 261:11550-11557

Nagai Y, Iwamori M. (1995) Cellular biology of gangliosides. En: Biology of the sialic acids (ed. Rosenberg A.), pp. 197-241. Plenum Press, New York.

Nagayama Y, Namba H, Yokoyama N, Yamashita S, Niwa M. Role of asparagine-linked oligosaccharides in protein folding, membrane targeting, and thyrotropin and autoantibody binding of the human thyrotropin receptor. *J Biol Chem* (1998) 273:33423-33428

Nakagawa T, Setou M, Seog D, Ogasawara K, Dohmae N, Takio K, Hirokawa N. A novel motor, KIF13A, transports mannose-6-phosphate receptor to plasma membrane through direct interaction with AP-1 complex. *Cell* (2000) 103:569-581

Nakamura N, Yamamoto A, Wada Y, Futai M. Syntaxin 7 mediates endocytic trafficking to late endosomes. *J Biol Chem* (2000) 275:6523-6529

Nakano T, Matsui T, Ota T. Benzyl- α -GalNAc inhibits sialylation of O-glycosidic sugar chains on CD44 and enhances experimental metastatic capacity in B16BL6 melanoma cells. *Anticancer Res* (1996) 16:3577-3584

Nakayama J, Fukuda MN, Fredette B, Ranscht B, Fukuda M. Expression cloning of a human polysialyltransferase that forms the polysialylated neural cell adhesion molecule present in embryonic brain. *Proc Natl Acad Sci USA* (1995) 92:7031-7035

Nakayama J, Fukuda MN, Hirabayashi Y, Kanamori A, Sasaki K, Nishi T, Fukuda M. Expression cloning of a human GT3 synthase. GD3 AND GT3 are synthesized by a single enzyme. *J Biol Chem* (1996) 271:3684-3691

Nara K, Watanabe Y, Maruyama K, Kasahara K, Nagai Y, Sanai Y. Expression cloning of a CMP-NeuAc:NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer α 2,8-sialyltransferase (GD3 synthase) from human melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (1994) 91:7952-7956

Naureckiene S, Sleat DE, Lackland H, Fensom A, Vanier MT, Wattiaux R, Jadot M, Lobel P. Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science* (2000) 290:2298-2301

Nielsen MS, Madsen P, Christensen EI, Nykjaer A, Gliemann J, Kasper D, Pohlmann R, Petersen CM. The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J* (2001) 20:2180-2190

Nosjean O, Briolay A, Roux B. Mammalian GPI proteins: sorting, membrane residence and functions. *Biochim Biophys Acta* (1997) 1331:153-186

Novick P, Zerial M. The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr Opin Cell Biol* (1997) 9:496-504

O

Odorizzi G, Pearse A, Domingo D, Trowbridge IS, Hopkins CR. Apical and basolateral endosomes of MDCK cells are interconnected and contain a polarized sorting mechanism. *J Cell Biol* (1996) 135:139-152

O'Hanlon TP, Lau KM, Wang XC, Lau JT. Tissue-specific expression of beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase. Transcript heterogeneity predicts a divergent polypeptide. *J Biol Chem* (1989) 264:17389-17394

Okakima T, Fukumoto S, Miyazaki H, Ishida H, Kiso M, Furukawa K, Urano T, Furukawa K. Molecular cloning of a novel α 2,3-sialyltransferase (ST3Gal VI) that sialylates type II lactosamine structures on glycoproteins and glycolipids. *J Biol Chem* (1999) 274:11479-11486

Ong WY, Kumar U, Switzer RC, Sidhu A, Suresh G, Hu CY, Patel SC. Neurodegeneration in Niemann-Pick type C disease mice. *Exp Brain Res* (2001) 141:218-231

Owen DJ, Luzio JP. Structural insights into clathrin-mediated endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* (2000) 12:467-474

P

Pagano RE, Puri V, Dominguez M, Marks DL. Membrane traffic in sphingolipid storage diseases. *Traffic* (2000) 1:807-815

Parlati F, McNew JA, Fukuda R, Miller R, Sollner TH, Rothman JE. Topological restriction of SNARE-dependent membrane fusion. *Nature* (2000) 407:194-198

Parry G, Beck JC, Moss L, Bartley J, Ojakian GK. Determination of apical membrane polarity in mammary epithelial cell cultures: the role of cell-cell, cell-substratum, and membrane-cytoskeleton interactions. *Exp Cell Res* (1990) 188:302-311

Patel SC, Suresh S, Kumar U, Hu CY, Cooney A, Blanchette-Mackie EJ, Neufeld EB, Patel RC, Brady RO, Patel YC, Pentchev PG, Ong WY. Localization of Niemann-Pick C1 protein in astrocytes: implications for neuronal degeneration in Niemann-Pick type C disease. *Proc Natl Acad Sci USA* (1999) 96:1657-1662

Patterson MC, Vanier MT, Suzuki K, Morris JA, Carstea ED, Neufeld EB, Blanchette Mackie EJ, Pentchev PG. (2001) En: *Meta-bolic and Molecular Basis of Inherited Disease* (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Vale, D. D., eds) 8th Ed., Chap. 145, pp. 3611-3634 McGraw-Hill, New York

Paulson JC, Colley KJ. Glycosyltransferases. *J Biol Chem* (1989) 264:17615-17618

Paulson JC, Weinstein J, Schauer A. Tissue-specific expression of sialyltransferases. *J Biol Chem* (1989) 264:10931-10934

Pereira-Leal JB, Seabra MC. The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily *J Mol Biol* (2000) 301:1077-1087

Perez-Vilar J, Hidalgo J, Velasco A. Presence of terminal N-acetylgalactosamine residues in subregions of the endoplasmic reticulum is influenced by cell differentiation in culture. *J Biol Chem* (1991) 266:23967-23976

- Pfeffer SR. Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends Cell Biol* (2001) 11:487-491
- Pfeffer SR. Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. *Nat Cell Biol* (1999) 1:E17-E22
- Pigny P, Guyonnet-Duperat V, Hill AS, Pratt WS, Galiegue-Zouitina S, d'Hooge MC, Laine A, Van-Seuningen I, Degand P, Gum JR, Kim YS, Swallow DM, Aubert JP, Porchet N. Human mucin genes assigned to 11p15.5: identification and organization of a cluster of genes. *Genomics* (1996) 38:340-352
- Piguet V, Wan L, Borel C, Mangasarian A, Demaurex N, Thomas G, Trono D. HIV-1 Nef protein binds to the cellular protein PACS-1 to downregulate class I major histocompatibility complexes. *Nat Cell Biol* (2000) 2:163-167
- Piper RC, Luzio JP. Late endosomes: sorting and partitioning in multivesicular bodies. *Traffic* (2001) 2:612-621
- Poirier MA, Xiao W, Macosko JC, Chan C, Shin YK, Bennett MK. The synaptic SNARE complex is a parallel four-stranded helical bundle. *Nat Struct Biol* (1998) 5:765-769
- Polishchuk RS, Polishchuk EV, Marra P, Alberti S, Buccione R, Luini A, Mironov AA. Correlative light-electron microscopy reveals the tubular-saccular ultrastructure of carriers operating between Golgi apparatus and plasma membrane. *J Cell Biol* (2000) 148:45-58
- Pons M, Grewal T, Rius E, Schnitgerhans T, Jackle S, Enrich C. Evidence for the involvement of annexin 6 in the trafficking between the endocytic compartment and lysosomes. *Exp Cell Res* (2001) 269:13-22
- Powell LD, Varki A. I-type lectins. *J Biol Chem* (1995) 270:14243-14246
- Pralle A, Keller P, Florin EL, Simons K, Hörber JKH. Sphingolipid cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol* (2000) 148:997-1007
- Prekeris R, Klumperman J, Chen YA, Scheller RH. Syntaxin 13 mediates cycling of plasma membrane proteins via tubulovesicular recycling endosomes. *J Cell Biol* (1998) 143:957-971
- Priatel JJ, Chui D, Hiraoka N, Simmons CJ, Richardson KB, Page DM, Fukuda M, Varki NM, Marth JD. The ST3Gal-I sialyltransferase controls CD8+ T lymphocyte homeostasis by modulating O-glycan biosynthesis. *Immunity* (2000) 12: 273-283
- Pshezhetsky AV, Potier M. Association of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase with the multienzyme lysosomal complex of beta-galactosidase, cathepsin A, and neuraminidase. Possible implication for intralysosomal catabolism of keratan sulfate. *J Biol Chem* (1996) 271:28359-28365
- Pshezhetsky AV, Richard C, Michaud L, Igdoura S, Wang S, Elsliger MA, Qu J, Leclerc D, Gravel R, Dallaire L, Potier M. Cloning, expression and chromosomal mapping of human lysosomal sialidase and characterization of mutations in sialidosis. *Nat Genet* (1997) 15:316-320
- Puertollano R, Aguilar RC, Gorshkova I, Crouch RJ, Bonifacino JS. Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs. *Science* (2001a) 292:1712-1716
- Puertollano R, Martin-Belmonte F, Millan J, de Marco MC, Albar JP, Kremer L, Alonso MA. The MAL proteolipid is necessary for normal apical transport and accurate sorting of the influenza virus hemagglutinin in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol* (1999) 145:141-145
- Puertollano R, Randazzo PA, Presley JF, Hartnell LM, Bonifacino JS. The GGAs promote ARF-dependent recruitment of clathrin to the TGN. *Cell* (2001b) 105:93-102

Puri V, Watanabe R, Dominguez M, Sun X, Wheatley CL, Marks DL, Pagano RE. Cholesterol modulates membrane traffic along the endocytic pathway in sphingolipid-storage diseases. *Nat Cell Biol* (1999) 1:386-388

Puri V, Watanabe R, Singh RD, Dominguez M, Brown JC, Wheatley CL, Marks DL, Pagano RE. Clathrin-dependent and -independent internalization of plasma membrane sphingolipids initiates two Golgi targeting pathways *J Cell Biol* (2001) 154:535-547

Q

Qian R, Chen C, Colley KJ. Location and mechanism of alpha 2,6-sialyltransferase dimer formation. Role of cysteine residues in enzyme dimerization, localization, activity, and processing. *J Biol Chem* (2001) 276:28641-28649

R

Rabouille C, Hui N, Hunte F, Kieckbusch R, Berger EG, Warren G, Nilsson T. Mapping the distribution of Golgi enzymes involved in the construction of complex oligosaccharides. *J Cell Sci* (1995) 108:1617-1627

Rainer TH. L-selectin in health and disease. *Resuscitation* (2002) 52:127-141

Recchi MA, Hebbar M, Hornez L, Harduin-Lepers A, Peyrat JP, Delannoy P. Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction assessment of sialyltransferase expression in human breast cancer. *Cancer Res* (1998) 58:4066-4070

Recchi MA, Harduin-Lepers A, Boilly-Marer Y, Verbert A, Delannoy P. Multiplex RT-PCR method for the analysis of the expression of human sialyltransferases: application to breast cancer cells. *Glycoconj J* (1998) 15:19-27

Remy L. The intracellular lumen: origin, role and implications of a cytoplasmic neostructure. *Biol Cell* (1986) 56:97-105

Reuter W. (1997) Sialic Acids. En: Glycosciences. Status and Perspectives. (Gabijs HJ y Gabijs S, eds). Chapman&Hall, Weinheim

Rindler, MJ. Carboxypeptidase E, a peripheral membrane protein implicated in the targeting of hormones to secretory granules, co-aggregates with granule content proteins at acidic pH. *J Biol Chem* (1998) 273:31180-31185

Rodriguez-Boulan E, Gonzalez A. Glycans in post-Golgi apical targeting: sorting signals or structural props? *Trends Cell Biol* (1999) 9:291-294

Robinson MS, Bonifacino SJ. Adaptor-related proteins *Curr Opin Cell Biol* (2001) 13:444-453

Rohn WM, Rouille Y, Waguri S, Hoflack B. Bi-directional trafficking between the trans-Golgi network and the endosomal/lysosomal system. *J Cell Sci* (2000) 113:2093-2101

Rohrer J, Schweizer A, Russell D, Kornfeld S. The targeting of Lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. *J Cell Biol* (1996) 132:565-576

Roth J. Subcellular organization of glycosylation in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* (1987) 906:405-436

Roth J, Taatjes DJ, Lucocq JM, Weinstein J, Paulson JC. Demonstration of an extensive trans-tubular network continuous with the Golgi apparatus stack that may function in glycosylation. *Cell* (1985) 43:287-295

Roth J, Wang Y, Eckhardt AE, Hill RL. Subcellular localization of the UDP-N-acetyl-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-mediated O-glycosylation reaction in the submaxillary gland. *Proc Natl Acad Sci USA* (1994) 91:8935-8939

Roth J. (1995) Biosynthesis. 4c. Compartmentation of glycoprotein biosynthesis. En: Glycoproteins, Montreuil, J., Schachter, H., and Vliegthart, J.F.G., Eds., Elsevier.

Rothman JE. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* (1994) 372:55-63

Roush DL, Gottardi CJ, Naim HY, Roth MG, Caplan MJ. Tyrosine-based membrane protein sorting signals are differentially interpreted by polarized Madin-Darby canine kidney and LLC-PK1 epithelial cells. *J Biol Chem* (1998) 273:26862-26869

S

Salminen A, Novick PJ. A ras-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion. *Cell* (1987) 49:527-538

Samyn-Petit B, Krzewinski-Recchi MA, Steelant WF, Delannoy P, Harduin-Lepers A. Molecular cloning and functional expression of human ST6GalNAc II. Molecular expression in various human cultured cells. *Biochim Biophys Acta* (2000) 1474:201-211

Sasaki K, Kurata K, Kojima N, Kurosawa N, Ohta S, Hanai N, Tsuji S, Nishi T. Expression cloning of a GM3-specific alpha-2,8-sialyltransferase (GD3 synthase). *J Biol Chem* (1994) 269:15950-15956

Sasaki K, Watanabe E, Kawashima K, Sekine S, Dohi T, Oshima M, Hanai N, Nishi T, Hasegawa M. Expression cloning of a novel Gal(β 1-3/1-4)GlcNAc α 2,3-sialyltransferase using lectin resistance selection. *J Biol Chem* (1993) 268:22782-22787

Schauer R, Kamerling JP (1997) Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids. En: Glycoproteins II, pp. 241-400, Montreuil J., Vliegthart JFG y Schachter H (eds), Elsevier, Amsterdam

Schauer R, Kelm S., Reuter G., Roggentin P y Shaw L (1995) Biochemistry and role of sialic acids. En: Biology of Sialic Acids, chapter 2, pp 7-67, Rosemberg A. (ed.) Plenum Press, New York

Scheidegger EP, Sternberg LR, Roth J, Lowe JB. A human STX cDNA confers polysialic acid expression in mammalian cells. *J Biol Chem* (1995) 270:22685-22688

Scheiffele P, Peranen J, Simons K. N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature* (1995) 378:96-98

Schimmöller F, Simon I, Pfeffer SR. Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J Biol Chem* (1998) 273:22161-22164

Schmid JA, Mach L, Paschke E, Glossl J. Accumulation of sialic acid in endocytic compartments interferes with the formation of mature lysosomes. Impaired proteolytic processing of cathepsin B in fibroblasts of patients with lysosomal sialic acid storage disease. *J Biol Chem* (1999) 274:19063-19071

Schmid S. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem* (1997) 66:511-548

- Schnaar RL. Glycosphingolipids in cell surface recognition. *Glycobiology* (1991) 1:477-485
- Schneider F, Kemmner W, Haensch W, Franke G, Gretscher S, Karsten U, Schlag PM. Overexpression of sialyltransferase CMP-sialic acid:Galbeta1,3GalNAc-R alpha6-Sialyltransferase is related to poor patient survival in human colorectal carcinomas. *Cancer Res* (2001) 61:4605-4611
- Schutz GJ, Kada G, Pastushenko VP, Schindler H: Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *EMBO J* (2000) 19:892-901
- Schwarzkopf M, Knobloch KP, Rohde E, Hinderlich S, Wiechens N, Lucka L, Horak I, Reutter W, Horstkorte R. Sialylation is essential for early development in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002) 99:5267-5270
- Segev N Ypt and Rab GTPases: insight into functions through novel interactions. *Curr Opin Cell Biol* (2001) 13:500-511
- Sever S, Damke H, Schmid SL. Garrotes, springs, ratchets, and whips: putting dynamin models to the test. *Traffic* (2000) 1:385-392
- Shibuya N, Goldstein IJ, Broekaert WF, Nsimba-Lubaki M, Peeters B, Peumans WJ. The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(alpha 2-6)Gal/GalNAc sequence. *J Biol Chem* (1987) 262:1596-1601
- Sheng ZQ, Hull SR, Carraway KL. Biosynthesis of the cell surface sialomucin complex of ascites 13762 rat mammary adenocarcinoma cells from a high molecular weight precursor. *J Biol Chem* (1990) 265:8505-8510
- Shur BD, Evans S, Lu Q. Cell surface galactosyltransferase: current issues. *Glycoconj J* (1998) 15:537-548
- Sillanauke P, Ponnio M, Jaaskelainen IP. Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders. *Eur J Clin Invest* (1999) 29:413-425
- Simmen T, Honing S, Icking A, Tikkanen R, Hunziker W. AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. *Nat Cell Biol* (2002) 4:154-159
- Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* (1997) 387:569-572
- Simmons PJ, Levesque JP, Haylock DN. Mucin-like molecules as modulators of the survival and proliferation of primitive hematopoietic cells. *Ann N Y Acad Sci* (2001) 938:196-206
- Simons K, van Meer G. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* (1988) 27:6197-6202
- Skibbens JE, Roth MG, Matlin KS. Differential extractability of influenza virus hemagglutinin during intracellular transport in polarized epithelial cells and nonpolar fibroblasts. *J Cell Biol* (1989) 108: 821-832
- Snider MD, Rogers OC. Intracellular movement of cell surface receptors after endocytosis: resialylation of asialo-transferrin receptor in human erythroleukemia cells. *J Cell Biol* (1985) 100, 826-834
- Sobue M, Habuchi H, Ito K, Yonekura H, Oguri K, Sakurai K, Kamohara S, Ueno Y, Noyori R, Suzuki S. beta-D-xylosides and their analogues as artificial initiators of glycosaminoglycan chain synthesis. Aglycone-related variation in their effectiveness in vitro and in ovo. *Biochem J* (1987) 241:591-601
- Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* (1993) 362: 318-324

Sonnichsen B, De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf J, Zerial M. Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol* (2000) 149:901-914

Sonnino S, Chigorno V. Ganglioside molecular species containing C18- and C20-sphingosine in mammalian nervous tissues and neuronal cell cultures. *Biochim Biophys Acta* (2000) 1469:63-77

Spiegel S., Foster D. y Kolesnick R. Signal transduction through lipid second messengers. *Curr Opin Cell Biol* (1996) 8:159-167

Springer S, Spang A, Schekman R. A Primer on Vesicle Budding. *Cell* (1999) 97:145-148

Stamenkovic I, Asheim HC, Deggerdal A, Blomhoff HK, Smeland E, Funderud S. The B cell antigen CD75 is a cell surface sialyltransferase. *J Exp Med* (1990) 172:641-643

Steeigmaier M, Levinovitz A, Isenmann S, Borges E, Lenter M, Kocher HP, Kleuser B, Vestweber D. The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature* (1995) 373:615-620

Stephens DJ, Banting G. Specificity of interaction between adaptor-complex medium chains and the tyrosine-based sorting motifs of TGN38 and Igp120. *Biochem J* (1998) 335:567-572

Stephens DJ, Lin-Marq N, Pagano A, Pepperkok R, Paccaud JP. COPI-coated ER-to-Golgi transport complexes segregate from COPII in close proximity to ER exit sites. *J Cell Sci* (2000) 113:2177-2185

Stinchcombe JC, Griffiths GM. Regulated secretion from hemopoietic cells. *J Cell Biol* (1999) 147:1-5

Storrie B, Desjardins M. The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process? *Bioessays* (1996) 18:895-903

Swallow DM, Gendler S, Griffiths B, Corney G, Taylor-Papadimitriou J, Bramwell ME. The human tumour-associated epithelial mucins are coded by an expressed hypervariable gene locus PUM. *Nature* (1987) 328:82-84

T

Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* (2001) 81:153-208

Takano R, Muchmore E, Dennis JW. Sialylation and malignant potential in tumour cell glycosylation mutants. *Glycobiology* (1994) 4:665-674

Tai AW, Chuang JZ, Bode C, Wolfrum U, Sung CH. Rhodopsin's carboxy-terminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein by binding to the dynein light chain Tctex-1. *Cell* (1999) 97:877-887

Taniguchi A, Kaneta R, Morishita K, Matsumoto K. Gene structure and transcriptional regulation of human Gal beta1,4(3) GlcNAc alpha2,3-sialyltransferase VI (hST3Gal VI) gene in prostate cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun* (2001) 287:1148-1156

Tauber R, Abetz J, Schwartz A, Katz N, Gerok W, Reutter W. Degradation of plasma membrane glycoproteins in primary cultures of rat hepatocytes and in rat liver. Role of Asn-linked glycans. *Biol Chem Hoppe-Seyler* (1988) 369:930-931

Taunton J. Actin filament nucleation by endosomes, lysosomes and secretory vesicles *Curr Opin Cell Biol* (2001) 13:85-91

Thomas GH. Disorders of Glycoprotein Degradation: α -Mannosidosis, β -Mannosidosis, Fucosidosis, and Sialidosis. En: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW y Vogelstein B, eds) 8^{ava} ed. McGraw Hill, New York (2001)

Tietze F, Seppala R, Renlund M, Hopwood JJ, Harper GS, Thomas GH, Gahl WA. Defective lysosomal egress of free sialic acid (N-acetylneuraminic acid) in fibroblasts of patients with infantile free sialic acid storage disease. *J Biol Chem* (1989) 264:15316-15322

Toivonen S, Aitio O, Renkonen O. α 2,3-Sialylation of terminal GalNAc beta 1-3Gal determinants by ST3Gal II reveals the multifunctionality of the enzyme. The resulting Neu5Ac α 2-3GalNAc linkage is resistant to sialidases from Newcastle disease virus and *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* (2001) 276:37141-37148

Tompkins WA, Watrach AM, Schmale JD, Schultz RM, Harris JA. Cultural and antigenic properties of newly established cell strains derived from adenocarcinomas of the human colon and rectum. *J Natl Cancer Inst* (1974) 52:1101-1110

Toomre D, Keller P, White J, Olivo JC, Simons K. Dual-color visualization of trans-Golgi network to plasma membrane traffic along microtubules in living cells. *J Cell Sci* (1999) 112:21-33

Tooze SA, Martens GJ, Huttner WB. Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE. *Trends Cell Biol* (2001) 11:116-122

Toribara NW, Gum JR Jr, Culhane PJ, Lagace RE, Hicks JW, Petersen GM, Kim YS. MUC-2 human small intestinal mucin gene structure. Repeated arrays and polymorphism. *J Clin Invest* (1991) 88:1005-1013

Tondeur M, Libert J, Vamos E, Van Hoof F, Thomas GH, Strecker G. Infantile form of sialic acid storage disorder: clinical, ultrastructural, and biochemical studies in two siblings. *Eur J Pediatr* (1982) 139:142-147

Traving C, Schauer R. Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cell Mol Life Sci* (1998) 54:1330-1349

Trowbridge IS, Collawn JF, Hopkins CR. Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Biol* (1993) 9:129-161

Tsuji S. Molecular cloning and functional analysis of sialyltransferases. *J Biochem* (1996) 120:1-13

Tsuji S, Datta AK, Paulson JC. Systematic nomenclature for sialyltransferases. *Glycobiology* (1996) 6:v-vii

Tugizov S, Maidji E, Xiao J, Zheng Z, Pereira, L. Human cytomegalovirus glycoprotein B contains autonomous determinants for vectorial targeting to apical membranes of polarized epithelial cells *J Virol* (1998) 72:7374-7386

U

Uittenbogaard A, Ying Y, Smart EJ. Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking. *J Biol Chem* (1998) 273:6525-6535

V

van Echten G, Sandhoff K. Ganglioside metabolism. Enzymology, Topology, and regulation. *J Biol Chem* (1993) 268:5341-5344

- van Klinken BJ, Einerhand AW, Buller HA, Dekker J. The oligomerization of a family of four genetically clustered human gastrointestinal mucins. *Glycobiology* (1998) 8:67-75
- van IJzendoorn SC, Hoekstra D. (Glyco)sphingolipids are sorted in sub-apical compartments in HepG2 cells: a role for non-Golgi-related intracellular sites in the polarized distribution of (glyco)sphingolipids. *J Cell Biol* (1998) 142:683-696
- van IJzendoorn SC, Hoekstra D. Polarized sphingolipid transport from the subapical compartment: evidence for distinct sphingolipid domains. *Mol Biol Cell* (1999) 10:3449-3461
- van IJzendoorn SC, Hoekstra D. Polarized sphingolipid transport from the subapical compartment changes during cell polarity development. *Mol Biol Cell* (2000) 11:1093-1101
- van den Steen P, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* (1998) 33:151-208
- van Weert AW, Dunn KW, Gueze HJ, Maxfield FR, Stoorvogel W. Transport from late endosomes to lysosomes, but not sorting of integral membrane proteins in endosomes, depends on the vacuolar proton pump. *J Cell Biol* (1995) 130:821-834
- Varki A. Factors controlling the glycosylation potential of the Golgi apparatus. *Trends Cell Biol* (1998) 8:34-40
- Varki A. Sialic acid as ligands in recognition phenomena. *FASEB J* (1997) 11:248-255
- Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of theories are correct. *Glycobiology* (1993) 3: 97-130
- Varky A. Diversity in the sialic acids. *Glycobiology*. (1992) 2:25-40
- Varki A. (1999) Cummings R., Esko J., Freeze H., Hart G., Marth J. (eds) Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Varma R, Mayor S: GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* (1998) 394:798-801
- Vega-Salas DE, Salas, P.J., and Rodriguez-Boulan, E. Modulation of the expression of an apical plasma membrane protein of Madin-Darby canine kidney epithelial cells: cell-cell interactions control the appearance of a novel intracellular storage compartment. *J Cell Biol* (1987) 104:1249-1259.
- Vega-Salas DE, San Martino JA, Salas PJ, Baldi A.. Vacuolar apical compartment (VAC) in breast carcinoma cell lines (MCF-7 and T47D): failure of the cell-cell regulated exocytosis mechanism of apical membrane. *Differentiation* (1993) 54:131-141.
- Verheijen FW, Verbeek E, Aula N, Beerens CE, Havelaar AC, Joosse M, Peltonen L, Aula P, Galjaard H, van der Spek PJ, Mancini GM. A new gene, encoding an anion transporter, is mutated in sialic acid storage diseases. *Nat Genet* (1999) 23:462-465
- Vilá MR, Lloreta J, Schussler MH, Berrozpe G, Welt S, Real FX. New pancreas cancers cell lines that represent distinct stages of ductal differentiation. *Lab Invest* (1995) 72:395-404
- Vinall LE, Hill AS, Pigny P, Pratt WS, Toribara N, Gum JR, Kim YS, Porchet N, Aubert JP, Swallow DM. Variable number tandem repeat polymorphism of the mucin genes located in the complex on 11p15.5. *Hum Genet* (1998) 102:357-366
- Vinogradova MV, Michaud L, Mezentsev AV, Lukong KE, El-Alfy M, Morales CR, Potier M, Pshezhetsky AV Molecular mechanism of lysosomal sialidase deficiency in galactosialidosis involves its rapid degradation. *Biochem. J* (1998) 330: 641-650

X

Xiang Y, Molloy SS, Thomas L, Thomas G. The PC6B cytoplasmic domain contains two acidic clusters that direct sorting to distinct trans-Golgi network/endosomal compartments. *Mol Biol Cell* (2000) 11:1257-1273

W

Wan L, Molloy SS, Thomas L, Liu G, Xiang Y, Rybak SL, Thomas G. PACS-1 defines a novel gene family of cytosolic sorting proteins required for trans-Golgi network localization *Cell* (1998) 94:205-216

Wandall HH, Hassan H, Mirgorodskaya E, Kristensen AK, Roepstorff P, Bennett EP, Nielsen PA, Hollingsworth MA, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, Clausen H. Substrate specificities of three members of the human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family, GalNAc-T1, -T2, and -T3. *J Biol Chem* (1997) 272:23503-23514

Wang WC, Cummings RD. The immobilized leucoagglutinin from the seeds of *Maackia amurensis* binds with high affinity to complex-type Asn-linked oligosaccharides containing terminal sialic acid-linked alpha-2,3 to penultimate galactose residues. *J Biol Chem* (1988) 263:4576-4585

Wang E, Pennington JG, Goldenring JR, Hunziker W, Dunn KW, Brefeldin A rapidly disrupts plasma membrane polarity by blocking polar sorting in common endosomes of MDCK cells. *J Cell Sci* (2001) 114:3309-3321

Wang Y, Thiele C, Huttner WB Cholesterol is required for the formation of regulated and constitutive secretory vesicles from the trans-Golgi network. *Traffic* (2000) 1:952-962

Wang X, Vertino A, Eddy RL, Byers MG, Jani-Sait SN, Shows TB, Lau JT. Chromosome mapping and organization of the human beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase gene. Differential and cell-type specific usage of upstream exon sequences in B-lymphoblastoid cells. *J Biol Chem* (1993) 268:4355-4361

Ward DM, Pevsner J, Scullion MA, Vaughn M, Kaplan J. Syntaxin 7 and VAMP-7 are soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors required for late endosome-lysosome and homotypic lysosome fusion in alveolar macrophages. *Mol Biol Cell* (2000) 11:2327-2333

Waters MG, Clary DO, Rothman JE. A novel 115-kD peripheral membrane protein is required for intercisternal transport in the Golgi stack. *J Cell Biol* (1992) 118:1015-1026

Waters MG, Serafini T, Rothman JE. Coatomer: a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature* (1991) 349:248-251

Weinstein J, Lee EU, McEntee K, Lai PH, Paulson JC. Primary structure of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. Conversion of membrane-bound enzyme to soluble forms by cleavage of the NH₂-terminal signal anchor. *J Biol Chem* (1987) 262:17735-17743

Wen DX., Livingstone BD., Medzihradzky KF., Kelm S., Burlingame AL., Paulson JC. Primary structure of Gal β 1,3(4)GlcNAc α 2,3-sialyltransferase determined by mass spectrometry sequence analysis and molecular cloning. *J Biol. Chem* (1992) 267:21011-21019

Whitehouse C, Burchell J, Gschmeissner S, Brockhausen I, Lloyd KO, Taylor-Papadimitriou J. A transfected sialyltransferase that is elevated in breast cancer and localizes to the medial/trans-Golgi apparatus inhibits the development of core-2-based O-glycans. *J Cell Biol* (1997) 137:1229-1241

Whyte JR, Munro S. The Sec34/35 Golgi transport complex is related to the exocyst, defining a family of complexes involved in multiple steps of membrane traffic. *Dev Cell* (2001) 1:527-537

Wilson DW, Whiteheart SW, Wiedmann M, Brunner M, Rothman JE. A multisubunit particle implicated in membrane fusion. *J Cell Biol* (1992) 117:531-538

Woodman PG. Biogenesis of the sorting endosome: the role of Rab5. *Traffic* (2000) 1:695-701

Wormald MR, Dwek RA. *Structure Fold Des* (1999) 7:R155

Y

Yamamoto M, Bharti A, Li Y, Kufe D. Interaction of the DF3/MUC1 breast carcinoma-associated antigen and beta-catenin in cell adhesion. *J Biol Chem* (1997) 272:12492-12494

Yamano T, Shimada M, Sugino H, Dezawa T, Koike M, Okada S, Yabuuchi H. Ultrastructural study on a severe infantile sialidosis (beta-galactosidase-alpha-neuraminidase deficiency). *Neuropediatrics* (1985) 16:109-112

Yeaman C, Grindstaff KK, Nelson WJ. New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. *Physiol Rev* (1999) 79:73-98

Yeaman C, Le Gall AH, Baldwin AN, Monlauzeur L, Le Bivic A, Rodriguez-Boulan E The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* (1997) 139:929-940

Yoshimori T, Keller P, Roth MG, Simons K. Different biosynthetic transport routes to the plasma membrane in BHK and CHO cells. *J Cell Biol* (1996) 133:247-256

Z

Zacchetti D, Peranen J, Murata M, Fiedler K, Simons K. VIP17/MAL, a proteolipid in apical transport vesicles. *FEBS Lett* (1995) 377:465-469

Zanetta JP, Gouyer V, Maes E, Pons A, Hemon B, Zweibaum A, Delannoy P, Huet G. Massive in vitro synthesis of tagged oligosaccharides in 1-benzyl-2-acetamido-2-deoxy-alpha-D-galactopyranoside treated HT-29 cells. *Glycobiology* (2000) 10:565-575

Zeller CB, Marchase RB. Gangliosides as modulators of cell function. *Am J Physiol* (1992) 262:C1341-55

Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2001) 2:107-117

Zerial M, Stenmark H. Rab GTPases in vesicular transport. *Curr Opin Cell Biol* (1993) 5:613-620

Zhang M, Dwyer NK, Neufeld EB, Love DC, Cooney A, Comly M, Patel S, Watari H, Strauss JF 3rd, Pentchev PG, Hanover JA, Blanchette-Mackie EJ Sterol-modulated glycolipid sorting occurs in niemann-pick C1 late endosomes *J Biol Chem* (2001) 276:3417-3425

Zhang, C-F. Identification of a novel prohormone sorting signal-binding site on carboxypeptidase E, a regulated secretory pathway-sorting receptor. *Mol Endocrinol* (1999) 13:527-536

Zheng X, Lu D, Sadler JE. Apical sorting of bovine enteropeptidase does not involve detergent-resistant association with sphingolipid-cholesterol rafts. *J Biol Chem* (1999) 274:1596-1605

Ziak M, Qu B, Zuo X, Zuber C, Kanamori A, Kitajima K, Inoue S, Inoue Y, Roth J. Occurrence of poly(alpha2,8-deaminoneuraminic acid) in mammalian tissues: widespread and developmentally regulated but highly selective expression on glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* (1996) 93:2759-2763

Zrihan-Licht S, Baruch A, Elroy-Stein O, Keydar I, Wreschner DH. Tyrosine phosphorylation of the MUC1 breast cancer membrane proteins. Cytokine receptor-like molecules. *FEBS Lett* (1994) 356:130-136

FE DE ERRATAS

Memoria de la tesis “Efectos del inhibidor de glicosilación benzil GalNAc sobre las rutas secretora y endocítica de células epiteliales”

Fausto Ulloa. IMIM. Barcelona

RESULTADOS

- Página 107. Figura 4.2 Minutos de internalización

Donde dice: 5, 10, 30 ... 2040
Debería decir: 5, 10, 30 ... **1440**

- Página 111. Figura 4.5. Encabezados recuadros en escala de grises

Donde dice: BIOTINA
Debería decir: **β1 INTEGRINA**

Donde dice: β1 INTEGRINA
Debería decir: **BIOTINA**

- Página 116. Párrafo 2^{do}. “El tratamiento con sacarosa reproduce el fenotipo...”
Décimo cuarta y quinta líneas

Donde dice: figura 4.11A
Debería decir: figura **4.10A**

Donde dice: figura 4.12B y C
Debería decir: figura **4.10B y C**

- Página 118. Figura 4.11B

No se indican los canales de MUC1 y MAL.
Los canales son: **MUC1 (rojo) y MAL (verde)**

DISCUSIÓN

- Página 120. Figura 1

Donde dice: Benzyl
Debería decir: Benzil

- Página 126. Figura 4. Encabezado

Donde dice: SUCROSA
Debería decir: **SACAROSA**

- Página 133. Cuarta línea

Donde dice: la “ruta directa” necesariamente implica necesariamente la existencia...
Debería decir: la “ruta directa” implica necesariamente la existencia...

- Página 135. Figura 7. Pie de figura. Antepenúltima línea

Donde dice: endosomas primarios
Debería decir: **endosomas tempranos**

ANEXO: MATERIALES Y MÉTODOS

- Página 142. Tabla 2. Tercera línea

No se cita la dilución del anticuerpo anti-Ig de ratón Alexa Fluor® 633
La dilución utilizada fue **1/1000**

- Página 143. Primera línea

No se cita la concentración del CaCl₂
La concentración utilizada fue **1 mM**

- Página 144. Párrafo 2^{do}. "Cuantificación de la internalización ..." Tercera y cuarta líneas

No se cita el tiempo de incubación con sulfo-NHS-SS-biotina fría.
El tiempo de incubación empleado fue de **15 min**

- Página 144. Párrafo 2^{do}. "Cuantificación de la internalización ..." Décimo sexta línea

Donde dice: incubado con estreptavidina peroxidasa ... 62,5 µg/ml
Debería decir: . **62,5 ng/ml**