

DOROTA HOJA-ŁUKOWICZ

Pracownia Badań Biostrukturalnych  
Instytut Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego  
ul. Ingardena 6, 30-060 Kraków  
e-mail: hoja@zuk.iz.uj.edu.pl

## TRANSPORT KWAŚNYCH HYDROLAZ DO LIZOSOMÓW NA PRZYKŁADZIE β-GLUKURONIDAZY

### WSTĘP

β-Glukuronidaza (E.C.3.2.1.31) jest kwaśną hydrolazą szeroko rozpowszechnioną w tkankach ssaków. U szczura i myszy znaleziono ją we frakcji mikrosomowej oraz lizosomowej hepatocytów, płuc, nerek, języka i ślinianek podżuchwowych (MEDDA i współaut. 1987a). Nie stwierdzono obecności mikrosomowej β-glukuronidazy w śledzionie, mózgu, sercu, erytrocytach, jądrach i skórze oraz w organizmach innych gatunkach ssaków (ZHEN i współaut. 1995). β-Glukuronidaza jest egzoglikozydaza, katalizuje hydrolizę naturalnych i syntetycznych β-D-glukuronidów do aglikanów i wolnego kwasu glukuronowego bez względu na to, czy aglikan jest alkilem, aryłem lub jest alicykliczny (NIEMANN i BUDDECKE 1982) i bez względu na to, czy aglikan dołączony jest wiązaniem eterowym czy estrowym (RAPATZ i współaut. 1988). Lizosomowa β-glukuronidaza bierze udział w etapowej degradacji kwasu glukuronowego zawierającego glikozaaminoglikany, a jej niedobór wywołuje w organizmie człowieka, szczura i myszy mukopolisacharydozę typu VII, to jest odkładanie się nierozłożonych glikozaaminoglikanów w lizosomach śledziony, wątroby, nerek, mózgu i układu szkieletowego oraz wydalanie wraz z moczem dużych ilości częściowo zdegradowanych glikozaaminoglikanów. Z klinicznego punktu widzenia, choroba ta charakteryzuje się skróconym czasem życia i niedorozwojem umy-

słowym (TOMATSU i współaut. 1994, SANDS i współaut. 1995, YAMADA i współaut. 1995, WALKLEY 1998). *In vivo* mikrosomowa β-glukuronidaza bierze udział w reakcji dekonjugacji dotyczącej hydrolizy glukuronidu bilirubiny (ZHEN i współaut. 1995), działa jako modulator poziomu krążących glukuronidowych leków i endogennych związków (MEDDA i współaut. 1987b) oraz odgrywa istotną rolę w biosyntezie witaminy C w wątrobie stymulowanej obecnością ksenobiotyków (HORIO i HORIE 1997). Szczurza i mysia β-glukuronidaza są homotetramerami, a β-glukuronidaza z łożyska ludzkiego i ludzkiej hepatomy są heterotetramerami (TANAKA i współaut. 1992). Podobnie jak w przypadku wszystkich enzymów lizosomowych, które syntetyzowane są w postaci pro-enzymu i następnie przekształcane w formę dojrzałą o niższej masie molekularnej (z wyjątkiem katepsyny D i karboksypeptydazy, dla których prekursorami są zymogeny) tak i β-glukuronidaza syntetyzowana jest jako forma prekursorowa o wyższej masie molekularnej od formy dojrzałej. Łańcuch polipeptydowy zbudowany jest z trzech części: pre-pro-β-glukuronidaza. Pre-forma zawiera peptyd sygnałowy na N-końcu, wprowadzający białko do światła siateczki śródplazmatycznej (ER). Po odcięciu hydrofobowego fragmentu „pre” (TWARDOWSKI i NOWAK 1988) przez peptydazę sygnałową powstaje prekursor

Stosowane skróty: AG — aparat Golgiego; Arg — arginina; Asn — asparagina; Asp — kwas asparaginowy; ER — siateczka śródplazmatyczna; Glc — glukoza; Gln — glutamina; GlcNAc — N-acetylo-glukozaamina; Glu — kwas glutaminowy; His — histydyna; IGF-II — insulino podobny czynnik wzrostu II; Leu — leucyna; Lys — lizyna; Man — mannoza; Man-6-P — reszta mannozo-6-fosforanowa; MHC II — główny układ zgodności tkankowej klasy II; MPR — receptor mannozyłowy; Phe — fenyloalanina; Pro — prolina; TGN — sieć trans aparatu Golgiego; Tyr — tyrozyna.

$\beta$ -glukuronidazy. Prekursor zawiera hydrofobowy propeptyd na C-końcu, który odcinany jest w endosomach, przed wejściem do lizosomów, dając dojrzałe białko (GEHRMANN i współaut. 1994). Forma prekursorowa odpowiada mikrosomowej  $\beta$ -glukuronidazie, natomiast forma dojrzała odpowiada lizosomowej  $\beta$ -glukuronidazie (ZHEN i współaut. 1995). U szczura część mikrosomowej  $\beta$ -glukuronidazy za pośrednictwem hydrofobowego propeptydu tworzy kompleks z egazyną (esteraza-3), zakotwiczoną w błonie od strony światła ER (GEHRMANN i współaut. 1994). Druga część pozostaje w formie wolnej, niezasocjowanej (MEDDA i współaut. 1987a). Kompleksy te zawierają 5–10 cząsteczek egazyny. Dla  $\beta$ -glukuronidazy wyróżniono trzy różne formy podjednostek: X (występuje w ER) oraz La i Lb (występują w lizosomach). Formy lizosomowe podjednostek tworzą się w wyniku rozszczepienia formy X na jej C-końcu w endosomach. W hepatocytach szczura występuje co najmniej dziewięć form  $\beta$ -glukuronidazy: X4 (wolny proenzym  $\beta$ -glukuronidazy), M5, M6, M7, M8, M9 i M10 (kompleksy proenzym  $\beta$ -glukuronidaza–egazyna; indeks oznacza liczbę cząsteczek egazyny przypadającą na jedną cząsteczkę  $\beta$ -glukuronidazy w danym kompleksie) oraz La4 i Lb4 (formy dojrzałe lizosomowe) (Ho 1991). U myszy cała populacja mikrosomowej  $\beta$ -glukuronidazy tworzy kompleksy z esterazą-3, przy czym kompleksy te wykazują niższe masy molekularne i są to: M1, M2, M3 i M4 (MEDDA i współaut. 1987a). Ta asocjacja enzymu z egazyną ma charakter czasowy i chroni prekursorową formę  $\beta$ -glukuronidazy przed enzymami modyfikującymi cukry podczas przechodzenia enzymu przez AG (SWANK i współaut. 1986). Stosunek mikrosomowej do lizosomowej  $\beta$ -glukuronidazy wynosi 1:3 (TULSIANI i współaut. 1978). Przypuszcza się, że funkcją  $\beta$ -glukuronidazy w ER jest modulowanie aktywności esterazowej egazyny (Li i współaut. 1990). Porównanie sekwencji aminokwasowych szczurzej wątrobowej i ludzkiej łożyskowej  $\beta$ -glukuronidazy ujawniło, że homologia w regionie propeptydu wynosi tylko 40%, a w pozostałym obszarze aż 77% (ISLAM i współaut. 1993). Ponadto miejsce wiążące egazynę występujące w szczurzej i mysiej  $\beta$ -glukuronidazie, w przypadku ludzkiego enzymu jest tylko częściowo zachowane. Lizosomowa i mikrosomowa  $\beta$ -glukuronidaza są glikoproteinami (ZHEN i współaut. 1995) i różnią się nieznacznie składem aminokwasowym i cukrowym (MEDDA i współaut. 1987b). Każda podjednostka ludzkiego enzymu posiada 4 potencjalne miejsca N-glikozytacji i wszystkie one są glikozyłowane (SHIPLEY i współaut. 1993). Mysia i szczurza  $\beta$ -glukuronidaza

także posiadają 4 potencjalne miejsca glikozytacji na każdym merze, ale tylko 3 z nich są podstawione cukrem. Miejsca glikozyłowane odpowiadają 1, 3 i 4 miejscu glikozytacji ludzkiej  $\beta$ -glukuronidazy i wykazują one ograniczoną fosforylację. W wątrobowej ludzkiej  $\beta$ -glukuronidazie, w miejscach 2 i 3 reszty mannozo-we są fosforyłowane preferencyjnie (defosforylacja tych miejsc wydatnie zmniejsza przenoszenie  $\beta$ -glukuronidazy do lizosomów, natomiast zwiększa wydzielanie enzymu). W miejscu 4-tym reszta mannozy w minimalnym stopniu jest podstawiona resztą fosforanową, a miejscu 1-szym w ogóle nie podlega fosforylacji (GOLDBERG i KONFELD 1981).

Lizosomy odgrywają kluczową rolę w fizjologii komórki stanowiąc centrum rozkładu wszystkich czterech klas biomolekuł (kwasy nukleinowe, białka, lipidy, cukry) i kierowania powstałych prostych związków chemicznych do ponownego ich wykorzystania w komórce. Funkcję kataboliczną spełniają dzięki obecności ponad 40 enzymów hydrolitycznych, na które składają się: lipazy i fosfolipazy, nukleazy, fosfatazy i sulfatazy, proteazy i glikozydazy. Hydrolazy te wykazują optymalną aktywność w środowisku kwaśnym o pH bliskim 5. I chociaż błona lizosomowa jest normalnie nieprzepuszczalna dla tych enzymów w kierunku do cytoplazy — fakt, że wymagają one niskiego pH dla swojej działalności chroni komórkę przed uszkodzeniem, gdyby nastąpiło ich uwolnienie. Przedział lizosomowy wchodzi w skład centralnego układu wakuolarnego odpowiedzialnego za komunikowanie wnętrza komórki z jej otoczeniem. Jeden koniec tego układu to nieustanna strefa biosyntezy (ER, AG), a drugi — strefa zachodzących procesów endocytozy (endosomy i lizosomy). Sieć lizosomowa jest układem dynamicznym, poszczególne lizosomy są połączone między sobą oraz z innymi przedziałami komórkowymi dzięki fuzji z pęcherzykami transportującymi powstałymi drogą pączkowania specyficznych obszarów błonowych ER, AG oraz błony komórkowej. Procesy fuzji umożliwiają dostarczanie składników wewnątrzkomórkowych jak i zewnątrzkomórkowych do lizosomów w celu ich degradacji i przetwarzania. Dodatkowo, obserwuje się bezpośredni transport przez błonę do światła lizosomu specyficznych białek cytoplazmatycznych posiadających sekwencję aminokwasową Lys-Phe-Glu-Arg-Gln lub pokrewną, za pośrednictwem opiekuńczych białek (ang. chaperons; CUERVO i DICE 1996, HAYES i DICE 1996, AGARRABERES i współaut. 1997). Obecność lizosomów stwierdzono we wszystkich typach komórek Eukariota. Szczególnie licznie występują w komórkach

nabłonkowych jelita, narządów wydzielniczych i wydalniczych (wątroba, nerki, płuca, macica), w komórkach fagocytarnych układu siateczkowo-śródbłonkowego (szpik kostny, śledziona). Wyjątkowo bogatym źródłem są leukocyty. Ciekawym i wyjątkowym przykładem są „lizosomy wydzielnicze” (ang. lytic granules), występujące w cytotoksycznych limfocytach T, w komórkach NK, eozynofilach, neutrofilach, bazofilach, trombocytach, mastocytach i makrofagach. Lizosomy tych komórek wykazują podwójną funkcję: dzięki obecności pełnego zestawu kwaśnych hydrolaz działają jako typowe lizosomy degradujące materiał dostarczany do ich światła, a dzięki obecności specyficznych białek sekrecyjnych (granzymy, perforyna, TIA-1) działają jako organelle wydzielnicze wyrzucając swą zawartość na zewnątrz komórki w celu destrukcji komórek rozpoznanych przez układ immunologiczny jako obce (PAGE i współaut. 1998).

ER jest miejscem, gdzie zachodzi synteza białek błonowych, wydzielniczych oraz białek rezydencyjnych ER, aparatu Golgiego (AG) i lizosomów. W nieselektywny sposób cała masa zsyntezowanych białek wkracza na ścieżkę wydzielniczą i jest przenoszona do miejsc swej ostatecznej lokalizacji. Poszczególne białka niosą sygnał, który kontroluje dalsze losy w dostarczaniu ich do organelli, jak również w zatrzymaniu wewnątrz organelli (ZHEN i współaut. 1995). Około 30-50% wątrobowej szczurzej i mysiej  $\beta$ -glukuronidazy zostaje zatrzymane w ER w wyniku asocjacji z esterazową egazyną (MEDDA i współaut. 1987b, ISLAM i współaut. 1993, ZHEN i współaut. 1993, 1995). Różnorodne białka światła ER mają na C-końcu tetrapeptyd Lys-Asp-Glu-Leu, który jest głównym sygnałem zatrzymującym dla wielu białek światła ER. Egazyna posiada sekwencję His-Thr-Glu-Leu na C-końcu będącą koniecznym i wystarczającym sygnałem zatrzymania jej w ER. Zatrzymanie  $\beta$ -glukuronidazy w świetle ER związane jest z co najmniej dwoma mechanizmami:

— mechanizm zwracający kompleks peptyd sygnałowy-receptor. Białka posiadające

na C-końcu Lys-Asp-Glu-Leu (lub blisko spokrewnione sygnały jak His-Thr-Glu-Leu w przypadku egazyny) są rozpoznawane przez receptor w regionie cis AG i zwracane do ER,

— mechanizm tworzenia kompleksu ligand-enzym.  $\beta$ -Glukuronidaza, która sama nie posiada sygnału zatrzymania w ER, jest zatrzymywana w ER w wyniku tworzenia niekowalencyjnego kompleksu pomiędzy jej C-końcowym propeptydem (kluczową rolę w przypadku mysiego i szczurzego enzymu odgrywa pięcioaminokwasowa sekwencja Arg-Pro-Phe-x-Phe podobna do sekwencji Arg-Pro-Phe-Thr-Phe miejsca reaktywnego serpin) a esterazowym miejscem katalitycznym egazyny. Kompleks egazyna- $\beta$ -glukuronidaza jest podobny do kompleksu proteinaza serynowa-serpinowy inhibitor. Zatem, serpinowopodobna sekwencja na jednym białku służy do wiązania tego białka do katalitycznego miejsca esterazowego innego białka, które z kolei posiada wewnętrzny sygnał zatrzymujący w ER (przez co i pierwsze białko zostaje również zatrzymane w ER). Tworzenie kompleksu pomiędzy propeptydem  $\beta$ -glukuronidazy a egazyną nie jest tak skuteczne jak pomiędzy białkami zakończonymi sekwencją Lys-Asp-Glu-Leu (lub His-Thr-Glu-Leu) a ich receptorami. Dzięki temu więcej niż połowa cząsteczek  $\beta$ -glukuronidazy przechodzi do lizosomów i nie pozostaje w ER nawet przy 10-krotnym nadmiarze wolnej egazyny w stosunku do  $\beta$ -glukuronidazy wewnątrz ER. Natomiast w przypadku ludzkiej  $\beta$ -glukuronidazy trzy aminokwasy są identyczne (x-Pro-Phe-x-Phe) z sekwencją pięcioaminokwasową serpin (Li i współaut. 1990) i jak dotąd nie znaleziono formy mikrosomowej ludzkiej  $\beta$ -glukuronidazy (ZHEN i współaut. 1995).

Propeptyd  $\beta$ -glukuronidazy jest konieczny nie tylko do zatrzymania enzymu w ER, ale również do całkowitej ekspresji i osiągnięcia aktywności katalitycznej enzymu oraz właściwej jego fosforylacji będącej warunkiem jego transportu do lizosomów.

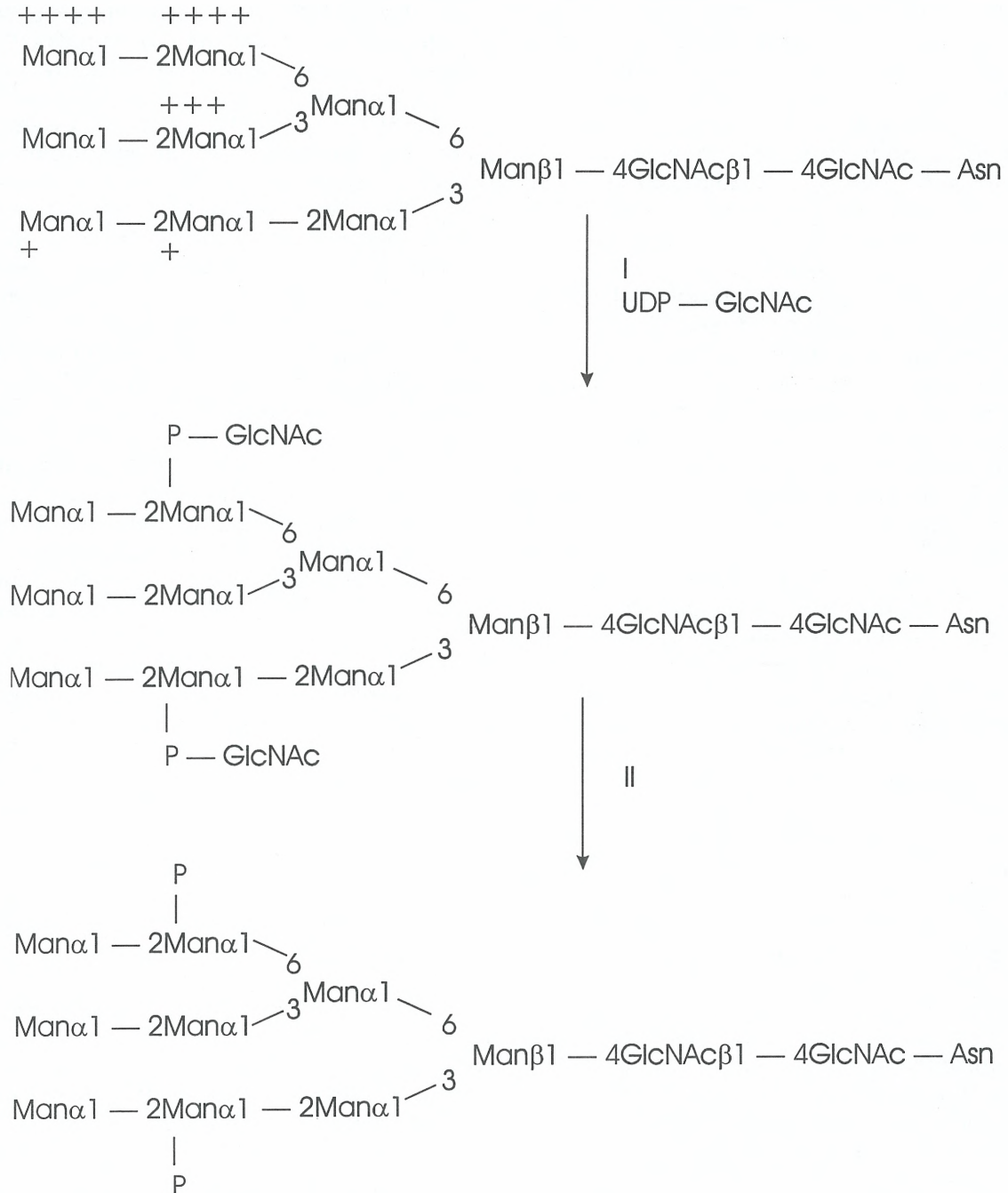
#### TRANSPORT LIZOSOMOWYCH HYDROLAZ ZALEŻNY OD MAN-6-P

Jest to główny mechanizm docelowego transportu rozpuszczalnych enzymów lizosomowych u wyższych Eukaryota. Białkami tymi są glikoproteiny z fosforylowanymi resztami mannozowymi (Man) oligosacharydów typu oligomannozowego związanych z Asn. Fosforylowane reszty służą jako marker rozpoznawania dla receptorów fosfomannozylowych (MPR) zasocjowanych z błoną opłaszczoną komple-

ksami złożonymi z klatryny i białka adaptorowego AP-1 lub AP-2 (JOHNSON i KORNFIELD 1992, Le Borge i HOFACK 1998). Receptory te wiążą marker to jest resztę mannozo-6-fosforanową (Man-6-P), pośrednicząc w dostarczaniu białek do lizosomów. Proces fosforylacji mannozy jest zdarzeniem posttranslacyjnym, dwuetapowym. W etapie pierwszym N-acetylglukozyloaminotransferaza zlokalizowana w ER przenosi N-

acetylglikozaamino-1-fosforan z UDP-GlcNAc na wyselekcjonowane reszty mannozowe oligosacharydu tworząc fosfodiester (Ryc.1). Mikrosomowa  $\beta$ -glukuronidaza zasocjowana z

na w cysternach cis AG usuwa resztę GlcNAc eksponując mannozo-6-fosfomonoester (Ryc.1) (GOLDBERG i KORNFIELD 1981). Transferaza posiada miejsce wiążące, rozpoznające nie tylko



Ryc. 1. Fosforylowane oligosacharydy typu oligomannozowego.

I — N-acetylglikozaaminylotrasferaza; II — N-acetylglikozaamino-1-fosfodiester N-acetylglikozaaminydaza; preferencje w fosforylowaniu reszt mannozowych zaznaczono znakami +.

egazyną posiada przykryte resztami N-acetylglikozaaminowymi (GlcNAc) reszty Man-6-P. Około 12% oligosacharydów mikrosomowej  $\beta$ -glukuronidazy wątroby szczura występuje jako fosfodiester (MIZOUCHI i współaut. 1981). W drugim etapie N-acetylglikozaamino-1-fosfodiester N-acetylglikozaaminydaza zlokalizowa-

oligosacharydy, ale również konformację białkową wspólną dla wszystkich hydrolaz, a nie występującą na białkach wydzielniczych to jest pewne specyficzne reszty lizyny oraz pewną trzeciorzędową domenę w enzymach lizosomowych (LIS i SHARON 1993, HIMENO i TANAKA 1995a). Oligosacharydy enzymów lizosomo-

wych posiadają jedną lub dwie reszty fosforanowe w postaci fosfodiesterów lub fosfomonoesterów. Zaburzenia w syntezie markera Man-6-P prowadzą do wystąpienia ciężkiej choroby spichrzeniowej — mukolipidozy II (choroba wtęretów komórkowych, ang. I-cell disease). Taki sam fenotyp pojawia się przy braku receptorów MPR w fibroblastach (SOHAR i współaut. 1998).

Sortowanie i dostarczanie rozpuszczalnych, fosforylowanych hydrolaz do lizosomów zachodzi za pośrednictwem MPR. W większości typów komórek 90% tych receptorów znajduje się wewnątrz komórki, a jedynie 10% na powierzchni błony komórkowej (HUGHES 1983). W komórce receptory skupione są w regionie trans AG, ale mogą być również zlokalizowane w regionie cis AG (ZHEN i współaut. 1995). Zidentyfikowano dwa typy tych receptorów:

— IGF-II/CI-MPR, czyli receptor fosfomannozylowy niezależny od kationów jest to transbłonowa glikoproteina typu I o  $M_r = 280$  kDa. Na podstawie analizy sekwencyjnej receptora wołowego stwierdzono, iż zbudowany jest on z: N-końcowej sekwencji sygnałowej (40 aminokwasów), zewnątrzplazmatycznego regionu składającego się z 15 homologicznych domen (2269 aminokwasów), pojedynczego regionu transbłonowego (23 aminokwasów) i C-końcowej domeny cytoplazmatycznej (164 aminokwasów). Receptor ten u ssaków (w odróżnieniu od płazów, gadów i ptaków) wykazuje wielofunkcyjność, ponieważ wiąże zarówno białka posiadające resztę Man-6-P uczestnicząc w sortowaniu i endocytozie kwaśnych hydrolaz, jak również bierze udział w wiązaniu hormonu peptydowego: insulino-podobnego czynnika wzrostu II (białko niefosforylowane). Receptor ten odpowiedzialny jest za wychwytywanie zewnątrzkomórkowego IGF-II, a zatem jest istotną składową układu regulującego rozwój organizmu. Pomimo, że miejsca wiązania obu ligandów na receptorze nie pokrywają się ze sobą, to jednak, prawdopodobnie ze względów konformacyjnych, wiązanie IGF-II nie pozwala na wiązanie enzymów lizosomowych (NISSLEY i współaut. 1993, LUDWIG i współaut. 1995, SCHMIDT i współaut. 1995),

— CD-MPR, czyli receptor fosfomannozylowy zależny od kationów jest transbłonową glikoproteiną typu I o  $M_r = 46$  kDa; zbudowaną z: N-końcowej sekwencji sygnałowej (28 aminokwasów), zewnątrzplazmatycznej domeny (159 aminokwasów), pojedynczego regionu transbłonowego (25 aminokwasów) oraz C-końcowej domeny cytoplazmatycznej (67 aminokwasów). Receptor ten obok funkcji sortowania bierze udział w sekrecji enzymów lizosomowych do płynu zewnątrzkomórkowego (CHAO i współaut. 1990).

Oba receptory nie wykazują wyraźnego podobieństwa sekwencyjnego w stosunku do innych lektyn oraz posiadają odmienną klasę domen wiążących cukier, dlatego też wyodrębniono je i oznaczono jako odrębną klasę lektyn typu P. Sugeruje się, że ze względu na wspólną funkcję to jest docelowy transport lizosomowych enzymów oraz podobieństwa w sekwencji aminokwasowej obu receptorów, geny które je kodują wyeluowały ze wspólnego genu przodków. Z porównania struktury CD-MPR ze znanymi strukturami białek zaskakujące jest uderzające podobieństwo strukturalne wspomnianego receptora do awidyny — białka wiążącego biotynę (ROBERTS i współaut. 1998). Oba białka wiążą odpowiednie ligandy w tym samym obszarze struktury, z jedną różnicą: miejsce wiążące w cząsteczce awidyny ulokowane jest nieco głębiej.

Wydaje się, że receptor niezależny od kationów odgrywa większą rolę w biogenezie lizosomowej (transportuje 60–70% nowosyntetyzowanych enzymów) i jest wymagany przez większość komórek do skutecznego, docelowego transportu lizosomowych białek (JOHNSON i KONFELD 1992, POHLMANN i współaut. 1995, SOHAR i współaut. 1998). IGF-II/CI-MPR wykazuje większe powinowactwo i rozpoznaje większe spektrum izoform poszczególnych enzymów lizosomowych niż CD-MPR, ale do wiązania wszystkich mannozo-6-fosforylowanych białek potrzebne są jednocześnie oba receptory, dlatego też, obecnie uważa się, że oba receptory funkcjonalnie są komplementarne względem siebie. Utrata któregokolwiek z receptorów związana jest z niewłaściwym sortowaniem nowosyntetyzowanych enzymów lizosomowych i ich wydzielaniem na zewnątrz komórki. Przypuszcza się, że heterogenność markerów Man-6-P (fosfodiester lub fosfomonoester, liczba reszt fosforanowych oraz miejsce podstawienia oligosacharydu resztą fosforanową) jest przyczyną występowania więcej niż jednego receptora MPR, przez co wzrasta skuteczność wychwytywania i transportu kwaśnych hydrolaz do lizosomów (POHLMANN i współaut. 1995, MARRON-TERADA i współaut. 1998). Oba receptory wykazują wyższe powinowactwo do oligosacharydów z dwiema grupami monofosfoestrowymi. Docelowe miejsca, do których oba receptory transportują swoje ligandy są różne. CD-MPR transportuje je do wczesnego endosomu, a IGF-II/CI-MPR do późnego przedziału endosomowego (SOHAR i współaut. 1998). Poziom ekspresji obu receptorów zależy od aktualnego stadium rozwojowego organizmu oraz typu tkanki (SAHAGIAN i NOVKIFF 1994, NISSLEY i współaut. 1993).

Receptory MPR wiążą fosforylowane białka lizosomowe w AG, oddzielając je od innych białek przeznaczonych do sekrecji w sieci aparatu Golgiego (TGN). Receptory z przyłączonymi ligandami skupiają się w TGN i pakowane są w pęcherzyki transportujące, opłaszczone kompleksami złożonymi z klatryny i AP-1. Segregacja ta zachodzi dzięki oddziaływaniu determinant sortujących domeny cytoplazmatycznej receptorów z AP-1. Główną rolę odgrywają tu sekwencje di-leucynowe rozpoznawane przez AP-1 to jest sekwencja His-Leu-Leu w domenie cytoplazmatycznej receptora CD-MPR oraz sekwencja Leu-Leu-His w domenie cytoplazmatycznej receptora IGF-II/CI-MPR. Pęcherzyki transportujące oddzielają się od TGN i zlewają się z wczesnymi endosomami, dostarczając w ten sposób kompleksy receptor-hydrolaza do przedziału prelizosomowego. Kompleksy te są niestabilne w pH niższym niż 5.5 i w wyniku zmiany konformacji receptora ulegają dysocjacji w środowisku późnego endosomu. Uwolnione hydrolazy przechodzą do lizosomów, a receptory powracają do AG oraz do błon plazmatycznych w celu ponownego ich wykorzystania. W lizosomach hydrolazy podlegają proteolitycznej obróbce charakterystycznej dla większości białek lizosomowych. CD-MPR, w odróżnieniu od IGF-II/CI-MPR w znikomym stopniu pośredniczy w endocytozie zewnątrzkomórkowych hydrolaz, z fosforylowanymi resztami mannozowymi. Receptory ulokowane w AG, endosomach i błonie plazmatycznej krążą nieprzerwanie pomiędzy tymi przedziałami wychwytyjąc białka lizosomowe w AG i na powierzchni komórki, i lokując je w endosomach. Cykliczne krążenie pomiędzy wspomnianymi trzema przedziałami komórkowymi zachodzi dzięki obecności różnorodnych sygnałów sortujących w domenach cytoplazmatycznych obu receptorów (BÖKER i współaut. 1997).

Receptory powierzchni komórki wiążą fosforylowane hydrolazy lizosomowe i dostarczają je do endosomów tak samo jak powyżej, przy czym białkiem adaptorowym w tym przypadku jest AP-2, które rozpoznaje reszty tyrozyny w domenie cytoplazmatycznej IGF-II/CI-MPR, a w przypadku CD-MPR dwa sygnały sortujące: pierwszy z nich zawiera resztę Tyr, a drugi reszty Phe i Trp (JOHNSON i KORNFELD 1992, Le Borge i HOFLACK 1998). Nie jest znany cel istnienia tej ścieżki. Prawdopodobnie, transport kwaśnych hydrolaz drogą endocytozy jest mechanizmem ratowniczym, który wychwytuje niewłaściwie ulokowane zewnątrzkomórkowe hydrolazy. Wiele typów komórek posługuje się tym szlakiem biochemicznym. Większość nowosyntezowanych hydrolaz osiąga lizosomy

bez opuszczania komórki. Zewnątrzkomórkowy enzym jest konsekwencją braku normalnej wewnątrzkomórkowej segregacji za pośrednictwem wewnątrzkomórkowych receptorów.

#### PODSTAWY MOLEKULARNE DZIAŁANIA MPR

1 mol IGF-II/CI-MPR wiąże 2 mole reszt Man-6-P. Dwa miejsca wiążące reszty fosfomannozyłowe blisko sąsiadują ze sobą i są zdolne do równoczesnego oddziaływania z obydwoma resztami fosforanowymi difosforylowanego oligosacharydu. Ów typ oddziaływania wystarczający jest do produktywnego wiązania do receptora, chociaż prawdopodobnie w przypadku hydrolaz wysokie powinowactwo wiązania osiągnięte jest dzięki oddziaływaniu receptora z dwiema resztami Man-6-P na dwóch różnych, sąsiadujących oligosacharydach. Oba miejsca wiążące marker nie są funkcjonalnie równocenne na przykład w stosunku do  $\beta$ -glukuronidazy domena 9 ma dwukrotnie niższe powinowactwo ( $K_d = 4.3 \pm 1.5$  nM) niż domena 3 ( $K_d = 2.0 \pm 0.6$  nM), (MARRON-TERADA i współaut. 1998). Natomiast CD-MPR, który w błonach występuje przede wszystkim jako dimer (DAHMS i KONFELD 1989), wiąże po jednym ligandzie na każdy łańcuch polipeptydowy. Oba te miejsca rozpoznające cukier w dimerze CD-MPR są oddalone od siebie o 40 Å w linii prostej i zorientowane przestrzennie w tym samym kierunku. Odległość ta jest na tyle duża, że każda z reszt fosfomannozyłowych oddziaływująca z centrum wiążącym podjednostek CD-MPR musi występować na oddzielnych resztach oligosacharydowych (przeciętna odległość pomiędzy końcowymi resztami mannozowymi w oligosacharydzie typu wielomannożowego wynosi 20 Å). Opisywane strukturalne wymogi dla tworzenia kompleksu CD-MPR-ligand tłumaczą obserwowane różnice w powinowactwie wiązaniowym prezentowanym przez CD-MPR w stosunku do różnych enzymów lizosomowych. Różnice te są wypadkową umiejscowienia i ilości reszt fosfomannozyłowych na oligosacharydzie oraz przestrzennej orientacji tych łańcuchów cukrowych na cząsteczce enzymu lizosomowego. Warunki optymalne do wiązania reszt fosfomannozyłowych przez oba typy receptorów to pH w zakresie 6.3–6.5. Nie obserwowano wiązania poniżej pH 5 co jest zgodne z faktem, że w kwaśnym przedziale prelizosomowym następuje oddysocjowanie transportowanego enzymu od receptora. Tylko IGF-II/CI-MPR wykazuje powinowactwo do liganda w neutralnym pH, fakt ten może wyjaśniać dlaczego CD-MPR nie uczestniczy w endocytozie na powierzchni komórki. Już wcześniej stwierdzono, że do efektywnego

wiązania wystarcza sama domena zewnątrzcytoplazmatyczna. CD-MPR (DAHMS i KORNFIELD 1989, WENDLAND i współaut. 1989). W przypadku IGF-II/CI-MPR dwa miejsca wiążące zlokalizowano na domenach 1-3 i 7-9. Duży krok w zrozumieniu molekularnych podstaw działania obu receptorów, a zwłaszcza CD-MPR uczynili ROBERTS i współpracownicy (ROBERTS i współaut. 1998). Otrzymali oni zewnątrzcytoplazmatyczną domenę CD-MPR oraz domeny 3 i 9 receptora IGF-II/CI-MPR w postaci krystalicznej i określili trójwymiarową strukturę CD-MPR. Ponadto, jako pierwsi stworzyli modelowy kompleks receptor-ligand pomiędzy CD-MPR a  $\beta$ -glukuronidazą w celu ustalenia mechanizmu rozpoznawania liganda. Analiza struktury CD-MPR ujawniła obecność trzech mostków disiarczkowych w domenie zewnątrzcytoplazmatycznej, ich istotną rolę w rozpoznawaniu reszty cukrowej oraz w stabilizacji struktury i orientacji w przestrzeni miejsc wiążących resztę mannozofosforanową. W miejscach wiążących ligand zlokalizowano His-105 i Arg-111. His-105 odpowiedzialna jest za wiązanie ujemnie naładowanej grupy fosforanowej liganda i tworzenie odpowiedniego pH do zajścia tego oddziaływania. Natomiast Arg-111 tworzy wiązanie wodorowe z atomami tlenu przy C2 pierścienia mannozowego. Ponadto reszty Asp-103, Asn-104 i His-105, cząsteczka wody tworząca wiązanie wodorowe z resztą karboksylową Asp-103 oraz  $Mn^{+2}$  wchodzący w wiązanie koordynacyjne z His-105, Arg-111, Glu-101 i atomem tlenu reszty fosforanowej, przyczyniają się do wzmocnienia oddziaływania pomiędzy CD-MPR a częścią fosforanową markera Man-6-P. Dodatkowo zidentyfikowano reszty aminokwasowe, które tworzą wiązania wodorowe z grupami hydroksylowymi mannozy i są to: Arg-135 (grupa hydroksylowa przy C4), Glu-133 (grupy hydroksylowe przy C3 i C4), Tyr-143 (grupa hydroksylowa przy C3), Arg-111 (grupa hydroksylowa przy C2), Gln-66 (grupa hydroksylowa przy C2) i Tyr-45 (grupa hydroksylowa przy C1). Aminokwasy te wraz z Asp-103, Asn-104 i His-105 są zachowane w wołowym, ludzkim, szczurzym i mysim CD-MPR. W odróżnieniu od innych lektyn wiążących mannozę i/lub glukozę wiązanie Man-6-P do CD-MPR nie wymaga oddziaływań z grupami aromatycznymi łańcuchów bocznych polipeptydu. Markery w postaci fosfodiesterów mannozowych słabo wiążą się do CD-MPR, ponieważ grupa fosforanowa ciasno wchodzi w głąb struktury receptora, nie pozostawiając miejsca na dodatkowe podstawniki to jest resztę N-acetyloglukozoaminową czy też grupę metylową. Istnienie tej przeszkody sterycznej może tłumaczyć wybiórcze powinowactwo

CD-MPR do pewnych enzymów lizosomowych. Region zewnątrzcytoplazmatyczny CD-MPR wykazuje podobieństwo sekwencyjne w zakresie 14%–28% z każdą z 15 powtarzających się domen zewnątrzcytoplazmatycznego regionu IGF-II/CI-MPR. Z tych 15 powtarzających się domen jedynie domeny 3 i 9 IGF-II/CI-MPR odgrywają istotną rolę w wiązaniu Man-6-P, a zwłaszcza Arg-435 w domenie 3 i Arg-1334 w domenie 9; ich odpowiednikiem jest reszta Arg-111 w CD-MPR (MARRON-TERADA i współaut. 1998). Z porównania struktur przestrzennych: zewnątrzcytoplazmatycznej CD-MPR i domen 3 oraz 9 IGF-II/CI-MPR wynika, iż najbliższe sąsiedztwo miejsc wiążących cukier w domenach jest zmienione w stosunku do regionu zewnątrzcytoplazmatycznego CD-MPR. Natomiast reszty aminokwasowe odpowiedzialne za tworzenie wiązania z ligandem z małym wyjątkiem pozostają zachowane i są to: Tyr-45 (numeracja wg CD-MPR), Gln-66, Arg-111 i Tyr-143. Reszty Glu-133 i Arg-135 są wymienione w IGF-II/CI-MPR na Thr i Glu w domenie 3 oraz Leu i Glu w domenie 9. Obszar w CD-MPR odpowiedzialny za wiązanie reszty fosforanowej w IGF-II/CI-MPR jest skrócony o 4 reszty aminokwasowe w obu domenach. Ta, z pozoru niewielka różnica w budowie prawdopodobnie umożliwia obserwowane już wcześniej (DISTLER i współaut. 1991) wiązanie nieco większego markera fosfomanozowego to jest oligosacharydu podstawionego fosfodiestrami. Okazało się również, że zarówno domena 3, jak i 9 nie posiadają odpowiednika reszty Asp-103 (reszta tworząca wiązanie koordynacyjne z dwuwartościowym kationem). Fakt ten może wyjaśniać dlaczego w obecności kationu nie obserwuje się zwiększenia powinowactwa IGF-II/CI-MPR do liganda. Jednakże do zweryfikowania tej hipotezy trzeba poczekać, aż do ustalenia pełnej struktury IGF-II/CI-MPR. Stworzony model interakcji CD-MPR z  $\beta$ -glukuronidazą potwierdził stwierdzone już wcześniej duże powinowactwo enzymu do receptora ( $K_d = 0.28$  nM; WATANABE i współaut. 1990), ( $K_d = 4.4$ – $5.1$  nM; MA i współaut. 1991). Dzięki temu modelowi udało się zaobserwować, iż jedynie reszta oligosacharydowa przy Asn-173  $\beta$ -glukuronidazy jest rozpoznawana przez CD-MPR oraz, że dimer CD-MPR wiąże dwie reszty oligosacharydowe umieszczone na oddzielnych łańcuchach polipeptydowych tetramerycznego enzymu. Model ten jest zgodny z wcześniejszymi badaniami, które pokazały, że CD-MPR wykazuje większe powinowactwo w stosunku do oligosacharydów z jednym fosfomonoestrem podczas gdy IGF-II/CI-MPR preferencyjnie wiąże oligosacharydy zawierające dwa fosfomonoestry.

## TRANSPORT LIZOSOMOWYCH HYDROLAZ NIEZALEŻNY OD MAN-6-P

MPR nie jest uniwersalnym elementem transportującym. W przypadku pacjentów z chorobą wtrętów komórkowych (mukolipidoza II, ang. I-cell disease), w wyniku błędu genetycznego dotyczącego jednego z enzymów biorącego udział w fosforylacji mannozy, nie dochodzi do utworzenia ugrupowania Man-6-P w cząsteczce enzymów lizosomowych. W przypadku fibroblastów, błąd w fosforylacji enzymów jest powodem wydalania ich poza komórkę i podniesienia się poziomu wielu hydrolaz lizosomowych w surowicy, moczu i ślinie. Natomiast w limfocytach, wątrobie, nerce, mózgu i śledzionie poziom kwaśnych hydrolaz pozostaje prawie niezmienny. Fakt ten wskazuje na występowanie alternatywnego mechanizmu przenoszącego kwaśne hydrolazy do lizosomów (OWADA i NEUFELD 1982). Podstawy działania mechanizmu alternatywnego nie są jeszcze dokładnie poznane. Wiadomo natomiast, że w przypadku niektórych enzymów lizosomowych, propeptyd może służyć nie tylko jako czynnik asocjujący białko z błoną, ale również jako sygnał sortujący (COHNNER 1992, BENING i współaut. 1998) odcinany proteolitycznie w endosomach. Przypuszcza się, iż interakcja prekursorowej  $\beta$ -glukuronidazy i egazyny może służyć przesyłaniu prekursora wzdłuż alternatywnej wewnątrzkomórkowej drogi (SWANK i współ. 1986). W limfocytach B u pacjentów z mukolipidozą II, w obszarze C-końca katepsyny D występuje determinanta podobna do markera fosfotransferazy, a

rozpoznawana przez nieznaną specyficzną białko (GLICKMANN i KORNFELD 1993). GLICKMANN i współpracownicy ustalili, że katepsyna D oraz kompleksy złożone z MHC II (główny układ zgodności tkankowej klasy II) i łańcucha I skupiają się w tym samym obszarze TGN i razem pakowane są w pęcherzyki transportujące pozabawione klatryny oraz receptorów MPR. Pęcherzyki te drogą fuzji łączą się z endosomami tworząc przedział komórkowy wzbogacony w MHC II (MIIC). Przedział ten podobny jest do lizosomów, ponieważ zawiera kwaśne hydrolazy i białka błony lizosomowej, posiada odczyn kwaśny i ulokowany jest w końcowym obszarze ścieżki endocytarnej (GLICKMANN i współaut. 1996).

Kwaśna fosfataza jest rzadkim przykładem transportu kwaśnej hydrolazy do lizosomów bez pośrednictwa receptorów MPR. HIMENO i TANAKA stwierdzili, że motywu Gly-Tyr zlokalizowany w domenie cytoplazmatycznej kwaśnej fosfatazy odgrywa istotną rolę w transporcie tego enzymu. Po osiągnięciu lizosomów, kwaśna fosfataza związana z błoną (67 kDa) zostaje uwolniona do światła lizosomu pod wpływem katepsyny D dając białko o  $M_r = 64$  kDa, na które z kolei działa prawdopodobnie lizosomowa proteinaza cysteinowa uwalniająca polipeptyd o  $M_r = 1$  kDa. Powstałe białko ( $M_r = 55$  kDa) zostaje następnie przeprowadzone w formę dojrzalą kwaśnej fosfatazy o  $M_r = 48$  kDa (HIMENO i TANAKA 1995b).

 $\beta$ -GLUCURONIDASE AS AN EXAMPLE OF TRANSPORT OF ACID HYDROLASES TO LYSOSOMES

## Summary

$\beta$ -Glucuronidase (EC 3. 2. 1. 31) of rat liver displays a unique subcellular distribution with significant activity being associated with both the microsomal and lysosomal subcellular compartments. Microsomal and lysosomal  $\beta$ -glucuronidase differ somewhat in amino acid and sugars composition. The microsomal enzyme is a precursor of the lysosomal enzyme. Selective subcellular targeting of proteins implies that individual proteins bear signals that control either their forward progress to, or their retention within, discrete organelles. The endoplasmic reticulum (ER) is the site where membrane proteins, secretory proteins, and resident ER, Golgi and lysosomal proteins are synthesized. In a nonselective fashion, the bulk of the synthesized proteins enter the secretory pathway and are

targeted to their final destinations.  $\beta$ -Glucuronidase is retained within ER via complex formation with egasyn-3, which in turn has a COOH-terminal HTEL retention sequence. That interaction involves the esterase active site of egasyn and the serpin-related carboxyl-terminal propeptide of glucuronidase.  $\beta$ -Glucuronidase undergoes proteolytic COOH-terminal processing during or after its transport to lysosomes. The propeptide of  $\beta$ -glucuronidase is required for full expression of catalytic activity, intracellular retention, and proper phosphorylation that, in turn, provide proper transport to lysosomes. Both Man-6-P-dependent transport and Man-6-P-independent transport of lysosomal hydrolases are presented.

## LITERATURA

AGARRABERES F.A., TERLECKY S. R., CICE J. F., 1997. An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation. *J. Cell Biol.* 137, 825-834.

BENING U., CASTINO R., HARTH N., ISIDORO C., HASILIK A., 1998. Lysosomal segregation of a mannose-rich glycoprotein imparted by the prosequence of myeloperoxidase. *J. Cell Biochem.* 71, 158-168.



- BÓKER C., von FIGURA K., HILLE-REHFELD A., 1997. *The carboxy-terminal peptides of 46 kDa and 300 kDa mannose 6-phosphate receptors share partial sequence homology and contain information for sorting in the early endosomal pathway.* J Cell Sci. 110, 1023–1032.
- CHAO H. H.-J., WAHEED A., POHLMANN R., HILLE A., von FIGURA K., 1990. *Mannose 6-phosphate receptor-dependent secretion of lysosomal enzymes.* EMBO J. 3507–3513.
- COHNNER G. E., 1992. *The role of the cathepsin D propeptide in sorting to the lysosome.* J. Biol. Chem. 267, 21738–21745.
- CUERVO A. M., DICE J. F., 1996. *A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes.* Science 273, 501–503.
- DAHMS N. M., KORNFIELD S., 1989. *The cation-dependent mannose 6-phosphate receptor: structural requirements for mannose 6-phosphate binding and oligomerization.* J. Biol. Chem. 264, 11458–11467.
- DISTLER N. M., GUO J., JOURDIAN G. W., SRIVASTAVA O. P., HINDSGAUL O., 1991. *The binding specificity of high and low molecular weight phosphomannosyl receptor from bovine testes. Inhibition studies with chemically synthesized 6-O-phosphorylated oligomannosides.* J. Biol. Chem. 266, 21687–21692.
- GEHRMANN M. C., OPPER M., SEDLACEK H. H., BOSSET K., CZECH J., 1994. *Biochemical properties of recombinant human  $\beta$ -glucuronidase synthesized in baby hamster kidney cells.* Biochem. J. 301, 821–828.
- GLICKMAN J. N., KORNFIELD S., 1993. *Mannose 6-phosphate-independent targeting of lysosomal enzymes in I-cell disease B lymphoblasts.* J. Cell Biol. 123, 99–108.
- GLICKMAN J. N., MORTON P. A., SLOT J. W., KORNFIELD S., GEUZE H. J., 1996. *The biogenesis of the MHC class II compartment in humane I-cell disease B lymphoblast.* J. Cell Biol. 132, 769–785.
- GOLDBERG D. E., KORNFIELD S., 1981. *The phosphorylation of  $\beta$ -glucuronidase oligosaccharides in mouse P388D1 cells.* J. Biol. Chem. 256, 13060–13067.
- HAYES S. A., DICE J. F., 1996. *Roles of molecular chaperones in protein degradation.* J. Cell Biol. 132, 255–258.
- HIMENO M., TANAKA Y., 1995a. *Lysosomal hydrolases have specific conformational domains for acquisition of mannose-6-phosphate.* Nippon Rinsho 53, 2892–2897.
- HIMENO M., TANAKA Y., 1995b. *Biosynthesis, processing, and lysosome targeting of acid phosphatase.* Nippon Rinsho 53, 2898–2903.
- HO K. J., 1991. *A large-scale purification of  $\beta$ -glucuronidase from human liver by immunofluorescence chromatography.* Biotech. Appl. Biochem. 14, 296–305.
- HORIO F., HORIE T., 1997. *The role of microsomal beta-glucuronidase in ascorbic acid biosynthesis stimulated by xenobiotics in rat.* Biosci. Biotechnol. Biochem. 61, 109–112.
- HUGHES R. C., 1983. *Glycoproteins.* CHAPMAN and Hall Ltd, New York, str. 36–53.
- ISLAM M. R., GRUBB J. H., SLY W. S., 1993. *C-terminal processing of human  $\beta$ -glucuronidase.* J. Biol. Chem. 268, 22627–22633.
- JOHNSON K. F., KORNFIELD S., 1992. *A His-Leu-Leu sequence near the carboxyl terminus of the cytoplasmic domain of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor is necessary for the lysosomal enzyme sorting function.* J. Biol. Chem. 267, 17110–17115.
- Le BORGNE R., HOFACK B., 1998. *Protein transport from the secretory to the endocytic pathway in mammalian cell.* Biochem. Biophys. Acta 1404, 195–209.
- LI H., TAKEUCHI K. H., MANLY K., CHAPMAN V., SWANK R. T., 1990. *The propeptide of  $\beta$ -glucuronidase.* J. Biol. Chem. 265, 14732–14735.
- LIS H., SHARON N., 1993. *Protein glycosylation. Structural and functional aspects.* Eur. J. Biochem. 218, 1–27.
- LUDWIG T., Le BORGNE R., HOFACK B., 1995. *Roles for mannose 6-phosphate receptor in lysosomal enzyme sorting, IGF-II binding and clathrin-coated assembly.* Trends Cell Biol. 5, 202–206.
- MA Z., GRUBB J. H., SLY W. S., 1991. *Cloning, sequencing, and functional characterization of the murine 46-kDa mannose 6-phosphate receptor.* J. Biol. Chem. 266, 10589–10595.
- MARRON-TERADA P. G., BRZYCKI-WESSELL M. A., DAHMS N. M., 1998. *The two mannose 6-phosphate binding sites of the insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor display different ligand binding properties.* J. Biol. Chem. 273, 22358–22366.
- MEDDA S., STEVENS A. M., SWANK R. T., 1987a. *Involvement of the esterase active site of egasyn in compartmentalization of  $\beta$ -glucuronidase within the endoplasmic reticulum.* Cell 50, 604–617.
- MEDDA S., TAKEUCHI K., DEVORE-CARTER D., von DEIMLING O., HEYMANN E., SWANK R. T., 1987b. *An accessory protein identical to mouse egasyn is complex with rat microsomal  $\beta$ -glucuronidase and is identical to rat esterase-3.* J. Biol. Chem. 262, 7248–7253.
- MIZOUCHI T., NISHIMURA Y., KATO K., KOBATA A., 1981. *Comparative studies of asparagine-linked oligosaccharide structures of rat liver microsomal and lysosomal  $\beta$ -glucuronidases.* Arch. Biochem. Biophys. 209, 298–303.
- NIEMANN R., BUDDECKE E., 1982. *Substrate specificity and regulation of activity of rat liver  $\beta$ -D-glucuronidase.* Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 591–598.
- NISSLEY P., KIESS W., SKLAR M., 1993. *Developmental expression of the IGF-II/mannose 6-phosphate receptor.* Mol. Rep. Develop. 35, 408–413.
- OWADA M., NEUFELD E. F., 1982. *Is there a mechanism for introducing acid hydrolases into liver lysosomes that is independent of mannose 6-phosphate recognition? Evidence from I-cell disease.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 105, 814–820.
- PAGE L. J., DARMON A. J., UELLNER R., GRIFFITHS G. M., 1998. *L is for lytic granules: lysosomes that kill.* Biochim. Biophys. Acta. 1401, 146–156.
- POLHMANN R., WENDLAND M., BOEKER M. W. C., von FIGURA K., 1995. *The two mannose 6-phosphate receptors transport distinct complements of lysosomal proteins.* J. Biol. Chem. 270, 27311–27318.
- RAPATZ E., AMBROS M., KOPP B., PITTNER F., 1988. *Studies on immobilization of glucuronidase (part 2).* Appl. Biochem. Biotech. 19, 235–242.
- ROBERTS D. L., WEIX D. J., DAHMS N. M., 1998. *Molecular basis of lysosomal enzyme recognition: three-dimensional structure of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor.* Cell 93, 639–648.
- SAHAGIAN G. G., NOVIKOFF P. M., 1994. *Lysosomes.* [W:] *The Liver: Biology and Pathobiology.* ASIAS I. M., BOYER J. L., FAUSTO N., JAKOBY W. B., SCHACHTER D. A., SHAFRITZ D. A. (red.), Raven Press, Ltd., New York, str. 275–291.
- SANDS M. S., ERWAY L. C., VOGLER C., SLY W. S., BIRKENMEIER E. H., 1995. *Syngeneic Bone Marrow Transplantation reduces the hearing loss associated with murine mucopolysaccharidosis type VII.* Blood 86, 2033–2040.
- SCHMIDT B., KIECKE-SIEMSEN C., WAHEED A., BRAULKE T., von FIGURA K., 1995. *Localization of the insulin-like growth factor II binding site to amino acid 1508–1566 in repeat 11 of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor.* J. Biol. Chem. 270, 14975–14982.
- SHIPLEY J. M., GRUBB J. H., SLY W. S., 1993. *Human  $\beta$ -glucuronidase glycosylation and phosphorylation.* J. Biol. Chem. 268, 12193–12198.
- SOHAR I., SLEAT D., LIU C. G., LUDWIG T., LOBEL P., 1998. *Mouse mutants lacking the cation-independent mannose 6-phosphate. insulin-like growth factor II receptor are impaired in lysosomal enzyme transport: comparison of cation-independent and cation-dependent mannose*

- 6-phosphate receptor-deficient mice. *Biochem. J.* 330, 903-908.
- SWANK R. T., PFISTER K., MILLER D., CHAPMANN V., 1986. *The egasyn gene affects the processing of oligosaccharides of lysosomal  $\beta$ -glucuronidase in liver.* *Biochem. J.* 240, 445-454.
- TANAKA J., GASA S., SAKURADA K., MIYAZAKI T., KASAI M., MAKITA A., 1992. *Characterization of the subunits and sugar moiety of human placental and leukemic  $\beta$ -glucuronidase.* *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 373, 57-62.
- TOMATSU S., FUKUDA S., YAMADA S., SUKEGAWA K., ORII T., 1994. *Molecular basis of mucopolysaccharidosis VII.* *Connective Tissue* 26, 147-152.
- TULSIANI D. R. P., SIX H., TOUSTER O., 1978. *Rat liver microsomal and lysosomal  $\beta$ -glucuronidase differ in both carbohydrate and amino acid composition.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 3080-3084.
- TWARDOWSKI J., NOWAK I., 1988. *Posttranslacyjne modyfikacje hydrolaz lizosomowych.* *Zagadnienia Biofizyki Współczesnej* 13, 61-80.
- WALKLEY S. U., 1998. *Cellular pathology of lysosomal storage disorders.* *Brain Pathol.* 8, 175-93.
- WATANABE H., GRUBB J. H., SLY W. S., 1990. *The overexpressed human 46-kDa mannose 6-phosphate receptor mediates endocytosis and sorting of  $\beta$ -glucuronidase.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8036-8040.
- WENDLAND M., HILLE A., NAGEL G., WAHEED A., VON FIGURA K., POHLMANN R., 1989. *Synthesis of truncated Mr 46000 mannose 6-phosphate receptor that is secreted and retains ligand binding.* *Biochem. J.* 260, 201-206.
- YAMADA S., TOMATSU S., SLY W. S., ISLAM R., WENGER D. A., FUKUDA S., SUKEWAGA K., ORII T., 1995. *Four novel mutations in Mucopolysaccharidosis type VII including a unique base substitution in exon 10 of the  $\beta$ -glucuronidase gene that create a novel 5'-splice site.* *Human Mol. Genet.* 4, 651-655.
- ZHEN L., BAUMANN H., NOVAK E., SWANK R. T., 1993. *The signal for retention of the egasyn-glucuronidase complex within the endoplasmic reticulum.* *Arch. Biochem. Biophys.* 304, 402-414.
- ZHEN L., RUSINAK M. E., SWANK T., 1995. *The  $\beta$ -glucuronidase propeptide contains a serpin-related octamer necessary for complex formation with egasyn esterase and for retention within the endoplasmic reticulum.* *J. Biol. Chem.* 270, 11912-11920.